

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

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE NOVAS ENTIDADES
QUÍMICAS FRENTE A DIFERENTES PATÓGENOS FÚNGICOS DE DIFÍCIL
TRATAMENTO**

GABRIELLA DA ROSA MONTE MACHADO

TESE DE DOUTORADO

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Coorientador: Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade

Porto Alegre

2019

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

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE NOVAS ENTIDADES
QUÍMICAS FRENTE A DIFERENTES PATÓGENOS FÚNGICOS DE DIFÍCIL
TRATAMENTO**

Gabriella da Rosa Monte Machado
Mestra em Microbiologia Agrícola e do
Ambiente

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de Doutor em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia
Ambiental

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Coorientador: Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Abril, 2019

CIP - Catalogação na Publicação

Machado, Gabriella da Rosa Monte
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE NOVAS
ENTIDADES QUÍMICAS FRENTE A DIFERENTES PATÓGENOS
FÚNGICOS DE DIFÍCIL TRATAMENTO / Gabriella da Rosa
Monte Machado. -- 2019.
234 f.
Orientador: Alexandre Meneghello Fuentefria.

Coorientador: Saulo Fernandes de Andrade.

Tese (Doutorado) -- 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, 2019.

1. potencial antifúngico. 2. novas entidades
químicas. 3. Candida spp.. 4. dermatófitos. 5.
Fusarium spp.. I. Fuentefria, Alexandre Meneghello,
orient. II. de Andrade, Saulo Fernandes, coorient.
III. Título.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

DEDICATÓRIA

Dedico esta Tese aos meus pais, Naisson e Diva, pois sem eles não seria possível alcançar mais esta etapa em minha vida.

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento de uma Tese não nasce de um dia para o outro e nem tão pouco se faz sozinho. Uma Tese é um trabalho em equipe, pois, é necessário que diversas pessoas estejam envolvidas, mesmo que indiretamente, apenas para que um experimento obtenha sucesso. Sim, em algumas vezes você irá depender do empenho de seus colegas e até mesmo de pessoas que você nem conhece para chegar ao resultado que você deseja. Parece simples, mas não é. Aliás, poucos sabem o que se passa ao longo de quatro anos de um Doutorado. Quantas incertezas, quantos erros, quantas trocas de projeto, quanta insistência, paciência e resiliência são precisas para não desistir, para continuar tentando e para fazer “dar certo”, mesmo que tudo pareça em vão. Mas, nada é em vão e, tudo serve como aprendizado. Ao longo desses anos, muitas pessoas foram fundamentais para o meu crescimento pessoal e profissional.

Primeiramente, eu gostaria de agradecer aos meus pais, Naisson e Diva, por tudo o que fizeram e ainda fazem por mim, pelos sacrifícios feitos durante toda uma vida para me proporcionar sempre o melhor, não medindo esforços para que a minha formação superior estivesse sempre em primeiro lugar, desde os tempos de cursinho pré-vestibular até a finalização deste Doutorado, mesmo que para isso fosse preciso virar noites de trabalho, viajar e abdicar de suas próprias vontades. Mesmo se eu vivesse várias vezes essa vida não seria possível retribuir nem a metade de tudo o que vocês me proporcionaram. Eu não tenho palavras para agradecer, eu não poderia ter nascido em uma família melhor. Obrigada Deus por eles serem os meus pais!! Às minhas primas e colegas Farmacêuticas Viviane e Cláudia, por todo apoio, ajuda, carinho, preocupação e por me incentivarem sempre, a minha eterna gratidão.

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Alexandre, pela oportunidade em fazer parte de seu grupo de pesquisa, por ter agredido em mim desde quando eu lhe enviava e-mails em 2012 para uma vaga de Mestrado. Obrigada por não ter desistido de mim, por relevar os meus choros e lamentações, por ser essa pessoa paciente e acolhedora, sempre disposta a ouvir e aconselhar, agindo como um amigo psicólogo! Parabéns pelo excelente profissional que és, sempre buscando inovar e destacar o nosso grupo de pesquisa. Gostaria de agradecer ao meu coorientador, Prof. Saulo, que entrou no meio do caminho do projeto e sempre esteve disposto a me ajudar e esclarecer as minhas dúvidas na área da química. Obrigada pela assistência e apoio mesmo quando as coisas não caminhavam bem. Parabéns por ser esse excelente profissional.

Não poderia deixar de agradecer às minhas amigas e colegas de GPMA. Um grupo que quando eu entrei quase nem tinha um laboratório para trabalhar, mas que a vontade e a persistência fizeram deste grupo um sucesso atualmente! À minha amiga Bruna, uma colega de laboratório que se tornou colega de apartamento e hoje é uma grande amiga. Cinco anos de convívio diário, de muito respeito, amizade, apoio nas horas difíceis e parceria nas horas boas! Obrigada pelos

ensinamentos passados, pelas viagens, pelas alegrias divididas e pela cumplicidade. A tua amizade é essencial para mim, foi um presente que Porto Alegre me deu e que é um dos motivos responsáveis por me fazer suportar a saudade de casa. Obrigada por tudo, sempre! À Paula, por ser essa amiga e colega incrível, sempre pronta para ajudar. Obrigada pela companhia de laboratório, pelos momentos divertidos e por se preocupar comigo. À Vanessa, obrigada pelos momentos de convívio, pelas viagens e pelas risadas no laboratório, com certeza ele não é mais o mesmo sem você! À minha IC Viviane, pela dedicação e pela amizade conquistada ao longo de um TCC, mesmo longe você é muito especial pra mim. À Daiane, obrigada pela ajuda recebida quando entrei no Mestrado, pela parceria das aulas e pelas risadas. À Luana, obrigada pelo convívio no laboratório, pelas festas e pelos bons momentos vividos. À Bruna Batista, a qual eu tenho pouco contato, mas sempre se mostra uma ótima companhia e disposta a ajudar. À nova geração do GPMA, Priscilla, Magda, Bárbara, Taís e Anderson, obrigada pelos momentos de convívio e trocas de experiências no laboratório. À Liliane e a Valéria, colegas que moram longe e que quero levar para sempre comigo. À minha IC Natália, por toda ajuda e comprometimento como o meu trabalho, muito obrigada. À Simone Merkel, pela amizade conquistada no meio de experimentos que não dão certo, você é muito especial para mim. À Fernanda e a Leticía, pela amizade e bons momentos compartilhados. À Simone Berlitz, obrigada por ser essa pessoa acessível, engraçada e sempre disposta a entrar nas minhas loucuras na pesquisa, obrigada por toda a ajuda. Às minhas amigas de Santa Maria, obrigada por todo apoio e parceria, mesmo que de longe.

À banca, formada pela Prof^a. Sueli, Prof. Régis, Prof. Rômulo e Marcela, obrigada por estarem presentes nesse momento importante e contribuírem de forma positiva com este trabalho. Aos demais Professores envolvidos e a todas as pessoas que fizeram parte de alguma forma para a concretização desta etapa, o meu muito obrigada.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE NOVAS ENTIDADES QUÍMICAS FRENTE A DIFERENTES PATÓGENOS FÚNGICOS DE DIFÍCIL TRATAMENTO

Autora: Gabriella da Rosa Monte Machado

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Coorientador: Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade

RESUMO

Nas últimas décadas, as infecções fúngicas tornaram-se um problema de saúde pública global, afetando milhões de pessoas anualmente. O aumento do número de pacientes imunodeprimidos associado à expansão da seleção de resistência fúngica e ao limitado arsenal terapêutico disponível têm contribuído para este cenário. Apesar dos investimentos realizados, existem poucos estudos envolvendo o desenvolvimento de novas terapias antifúngicas, visto que, as infecções fúngicas são negligenciadas. Nesse sentido, a prospecção por novas entidades químicas que apresentem eficácia antifúngica vem sendo uma das principais estratégias adotadas na tentativa de contrapor esse panorama atual. Assim, este estudo investigou o potencial de derivados de cloroacetamidas e quinolínicos frente a diferentes gêneros fúngicos e a sua aplicabilidade como possíveis novas alternativas para a terapia clínica de infecções fúngicas. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos seguiu o proposto pelos documentos M27-A3 e M28-A2 (CLSI, 2008). Os compostos foram submetidos a diferentes metodologias para avaliação de parâmetros toxicológicos em nível tópico e sistêmico. A eficácia e a aplicabilidade dos compostos foram avaliadas em diferentes formulações farmacêuticas. Como resultado, ambas as classes de compostos foram ativas frente aos organismos testados, destacando a eficácia do composto *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida frente a espécies de dermatófitos (CIM 6,25 - 25 µg/mL) e de *Fusarium* (12,5 - 50 µg/mL), e do composto 2-metil-4-fenil-quinolina frente a dermatófitos (CIM 12,5 - 25 µg/mL). Ambos os compostos não provocaram alergenicidade e toxicidade dérmica, sugerindo sua segurança para uso tópico. Esses compostos apresentaram ação fungicida sobre as espécies avaliadas, provocando dano e alterações morfológicas nas células fúngicas. Além disso, a incorporação do composto *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida a um anfissoma, o qual foi adicionado a um sistema formador de filme (SFF) antecipou o efeito fungicida deste derivado, indicando ser um bom veículo carreador para o mesmo. A análise de parâmetros de toxicidade sugere que o composto 2-metil-4-fenil-quinolina é seguro para uso sistêmico. Além disso, quando incorporado a um esmalte, o composto reduziu significativamente a infecção por *T. rubrum* em um modelo de onicomicose *ex vivo*. Assim, podemos concluir que ambos os compostos são fortes candidatos para o possível desenvolvimento de novas formulações eficazes para o tratamento de infecções fúngicas cutâneas.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (234 p.) abril, 2019.

EVALUATION OF THE ANTIFUNGAL POTENTIAL OF NEW CHEMICAL ENTITIES AGAINST DIFFERENT FUNGAL PATHOGENS DIFFICULT TO TREAT

Author: Gabriella da Rosa Monte Machado

Supervisor: Alexandre Meneghello Fuentefria

Co-supervisor: Saulo Fernandes de Andrade

ABSTRACT

In recent decades, fungal infections have become a global public health problem, affecting millions of people annually. The increase in the number of immunocompromised patients associated with the expansion of selection of fungal resistance and the limited therapeutic arsenal available have contributed to this scenario. Despite the investments made, there are few studies involving the development of new antifungal therapies, since fungal infections are neglected. Thus, the prospection for new chemical entities that present antifungal efficacy has been one of the main strategies adopted in the attempt to counterpose this current panorama. Thus, this study investigated the potential of chloroacetamide and quinoline derivatives against different fungal genera and their applicability as possible new alternatives for the clinical therapy of fungal infections. The determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) of the compounds followed the proposed by documents M27-A3 and M28-A2 (CLSI, 2008). The compounds were submitted to different methodologies for evaluation of toxicological parameters at the topical and systemic level. The efficacy and applicability of the compounds were evaluated in different pharmaceutical formulations. As a result, both classes of compounds were active against the organisms tested, highlighting the efficacy of *N*-(4-bromophenyl)-2-chloroacetamide against dermatophyte (MIC 6.25 - 25 µg/mL) and *Fusarium* species (MIC 12.5 - 50 µg/mL), and of 2-methyl-4-phenyl-quinoline (MIC 12.5 - 25 µg/mL) against dermatophytes. Both compounds did not cause allergy and dermal toxicity, suggesting their safety for topical use. These compounds presented fungicidal action on species evaluated, causing damage and morphological changes in the fungal cells. In addition, the incorporation of *N*-(4-bromophenyl)-2-chloroacetamide to an anisome, which was added to a film forming system (FFS) anticipated the fungicidal effect of this derivative, indicating be a good carrier vehicle for it. Analysis of toxicity parameters suggests that 2-methyl-4-phenyl-quinoline is safe for systemic use. In addition, when incorporated into a lacquer, the compound significantly reduced *T. rubrum* infection in an *ex vivo* onychomycosis model. Thus, we can conclude that both compounds are strong candidates for the possible development of new and effective formulations for the treatment of cutaneous fungal infections.

¹Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (234 p.). April, 2019.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2.1. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo Geral.....	3
2.2. Objetivos Específicos.....	3
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3.1. Aspectos gerais sobre o gênero <i>Candida</i>	4
3.2. Infecções causadas por espécies de <i>Candida</i>	5
3.3. Aspectos gerais sobre os gêneros <i>Microsporium</i> e <i>Trichophyton</i>	12
3.4. Infecções causadas por espécies de <i>Microsporium</i> e <i>Trichophyton</i>	14
3.5. Aspectos gerais sobre o gênero <i>Fusarium</i>	20
3.6. Infecções causadas por espécies de <i>Fusarium</i>	22
3.7. Terapia antifúngica e mecanismo de ação farmacológica	26
3.8. Principais problemáticas relacionadas à terapia clínica para infecções fúngicas.....	32
3.9. Estratégias para sobrepor o atual panorama relacionado à terapia antifúngica	35
3.10. Escolha de novas entidades químicas com potencial antifúngico	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1. Locais de realização da pesquisa	42
4.2. Seleção dos microrganismos de interesse	43
4.3. Obtenção dos compostos derivados de cloroacetamidas e quinolinas.....	43
4.4. Preparação dos compostos e antifúngicos.....	44
4.5. Preparação de partículas anfissomas	45

4.6.Sistema formador de filme	47
4.7.Formulações a base de esmalte	48
4.8.Avaliação da suscetibilidade antifúngica de derivados de cloroacetamidas e derivados quinolínicos.....	49
4.9. Ensaio de proteção do sorbitol.....	50
4.10. Efeito sobre o ergosterol exógeno.....	51
4.11. Ensaio de tempo de morte	51
4.12. Microscopia eletrônica de varredura	53
4.13. Modelo de infecção onicomicótica <i>ex vivo</i>	53
4.14. Ensaio da membrana corioalantoide do ovo da galinha (HET-CAM).....	54
4.15. Avaliação histopatológica em modelo <i>ex vivo</i>	55
4.16. Ensaio de citotoxicidade	56
4.17. Teste do micronúcleo.....	57
4.18. Teste de toxicidade aguda em modelo <i>in vivo</i>	57
5. ARTIGOS	59
5.1. Artigo 1	59
5.2. Artigo 2.....	86
5.3. Artigo 3	108
5.4. Artigo 4	126
5.5. Artigo 5	154
6. DISCUSSÃO GERAL	177
7. CONCLUSÕES	191
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	193

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 195

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem representativa da estrutura micromorfológica das células de *Candida albicans* (a) indicando a presença de hifas – forma filamentosa e *Candida glabrata* (b) indicando a presença de blastoconídios – forma leveduriforme; (c) imagem representativa da estrutura macromorfológica das colônias de *C. albicans*
Fonte: *Mycology Online*.....5
- Figura 2.** Imagem representativa da estrutura micromorfológica das células de *M. canis* (a) e *T. rubrum* (c) - hifas, macroconídios e microconídios; imagem representativa da estrutura macromorfológica das colônias de *M. canis* (b) *T. rubrum* (d), verso e reverso, respectivamente. Fonte: *Mycology Online*14
- Figura 3.** Imagem representativa da estrutura micromorfológica das células de *F. solani* – presença de macroconídios e hifas (a), seguida pela representação da estrutura macromorfológica de suas colônias, verso (b) e reverso (c). Fonte: *Mycology Online*.....21
- Figura 4.** Desenho esquemático representando o mecanismo de ação farmacológico das principais classes de antifúngicos. Adaptado de Martinez & Falson (2014).....32
- Figura 5.** Estrutura química da cloroacetamida (Machado, 2019).....39
- Figura 6.** Estrutura química do núcleo quinolínico (Machado, 2019).....40

LISTA DE ABREVIATURAS

ABD: ágar batata dextrose

ADME: absorção, distribuição, metabolismo e excreção

AMB: anfotericina B

AND: anidulafungina

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASD: ágar sabouraud dextrose

CAN: *Candida não-albicans*

CIM: concentração inibitória mínima

CLSI: *Clinical Laboratory Standards Institute*

CPX: ciclopirox olamina

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucleico

FDA: *Food and Drug Administration*

FLC: fluconazol

KCT: cetoconazol

HIV: indivíduo portador da síndrome da imunodeficiência adquirida

MEV: microscopia eletrônica de varredura

MOPS: *3-(n-morpholino)-propanesulfonic acid*

PBS: tampão fosfato salino

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

SFF: sistema formador de filme

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a incidência global de infecções fúngicas tem aumentado drasticamente devido ao número crescente de pacientes em risco, incluindo indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV-positivos), receptores de transplantes, pacientes com câncer, neonatos prematuros e idosos. Esses indivíduos são mais propensos ao desenvolvimento dessas infecções por apresentarem um sistema imune deprimido, o que também favorece o aumento do número de casos de recidivas da infecção e, como consequência, o aumento da exposição aos antifúngicos, contribuindo para a seleção de resistência e para as falhas terapêuticas. Dessa forma, além do elevado número de pacientes imunodeprimidos, tem-se como conhecimento que uma das principais razões para o aumento da incidência de infecções fúngicas é a expansão da seleção de resistência, a qual tem sido relatada para os mais diversos gêneros fúngicos frente à terapia antifúngica atual.

Um fator preocupante relacionado à seleção de resistência fúngica é o uso indiscriminado de antifúngicos pela população. Na grande maioria das vezes, os tratamentos recomendados para uma infecção fúngica são caros e dispendem de longos períodos de tempo, podendo levar até um ano para atingirem a cura total da infecção. Essas desvantagens fazem com que o paciente não realize o tratamento indicado ou o interrompa antes do período final, favorecendo a seleção de resistência. Também é interessante ressaltar que o uso desses fármacos de maneira desenfreada e por longos períodos de tempo está associado a altos índices de toxicidade e efeitos colaterais indesejáveis ao paciente, tanto a nível tópico quanto sistêmico.

Consideradas um problema de saúde pública global, estima-se que as infecções fúngicas acometam mais de um bilhão de pessoas, resultando em aproximadamente 11 milhões de casos de infecções ao ano (GAFFI, 2015). Embora nas últimas décadas muitos avanços tenham sido realizados no diagnóstico dessas infecções e no desenvolvimento de novos antifúngicos, ainda é necessário mais investimentos neste setor, a fim de reduzir os dados alarmantes de incidência e mortalidade promovidos pelas infecções fúngicas e a qualidade de vida do paciente. Entretanto, essas infecções são negligenciadas por fatores sociais e políticos. Isso

pode ser observado pelo fato de que mesmo apresentando um arsenal terapêutico limitado, pois poucas classes de antifúngicos estão disponíveis atualmente, existem poucos estudos em fase clínica envolvendo o desenvolvimento de novos antifúngicos. Em vista de reverter esse panorama, diversos grupos de pesquisa têm por objetivo rastrear novos compostos sintéticos que apresentam características compatíveis a um novo candidato a antifúngico.

A prospecção por novas entidades químicas eficazes no combate à resistência fúngica e seguras ao paciente se faz necessária e urgente. Esses são os principais objetivos no rastreamento de novas entidades com potencial antifúngico. Além disso, a reversão da resistência é a chave para reduzir a incidência das infecções fúngicas e, com isso, reduzir as taxas de mortalidade relacionadas a essas infecções.

A escolha por uma classe de compostos sintéticos para o rastreamento de sua atividade biológica pode ser baseada em relatos da literatura que comprovam que compostos derivados de determinada classe apresentam eficácia sobre algum microrganismo. Dessa forma, alguns estudos comprovam a eficácia de derivados de cloroacetamidas com ação antileishmania, antibacteriana e antifúngica (Marco-Contelles & Gomez-Sanchez, 2005; Katke et al., 2011; Aschale, 2012; Lavorato et al., 2017). Assim como esses derivados, as quinolinas ganham destaque como uma classe de compostos muito promissora para o desenvolvimento de um novo candidato a antifúngico. Isso pode ser observado devido a uma gama de estudos reportando a efetividade biológica de derivados dessa classe, como, ação antineoplásica, antifúngica, antibacteriana, antitoxoplasma, anti-inflamatória e antimalárica (Kumar et al., 2011; Singh et al., 2011; Afzal et al, 2015; Wen et al., 2015; Liberato et al., 2017; El-Shehry et al, 2018; Teng et al., 2018).

A partir do contexto exposto, o presente estudo tem por finalidade investigar o potencial antifúngico de derivados de cloroacetamidas e quinolínicos frente a leveduras de *Candida* spp. e fungos filamentosos, como *Fusarium* spp., *Microsporum* spp., e *Trichophyton* spp. Espera-se que esses compostos sejam ativos sobre esses gêneros e que não apresentem possível toxicidade sobre os parâmetros avaliados, para que este estudo possa contribuir de maneira positiva no rastreamento e posterior desenvolvimento de um novo candidato a antifúngico.

2.1. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar o potencial antifúngico de novas entidades químicas derivadas de cloroacetamidas e quinolinas frente a diferentes gêneros fúngicos patogênicos e de difícil tratamento, como possíveis novas alternativas para o tratamento de infecções causadas por esses organismos.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Avaliar o perfil de suscetibilidade antifúngica de compostos derivados de cloroacetamidas frente a cepas de *Candida* spp., *Fusarium* spp. e dermatófitos;

2.2.2. Avaliar o perfil de suscetibilidade antifúngica de compostos derivados quinolínicos frente a cepas de *Candida* spp. e dermatofitos;

2.2.3. Investigar o provável mecanismo de ação antifúngico de derivados de cloroacetamidas sobre cepas de *Candida* spp., *Fusarium* spp. e dermatófitos, e de um derivado quinolínico sobre cepas dermatofíticas;

2.2.4. Avaliar a cinética da relação dose-resposta de derivados de cloroacetamidas sobre cepas de *Candida* spp., *Fusarium* spp. e de dermatófitos, e de derivados quinolínicos sobre as cepas dermatofíticas;

2.2.5. Visualizar através de microscopia eletrônica de varredura o efeito da ação antifúngica de derivados de cloroacetamidas – sobre cepas de *Candida* spp., dermatófitos e *Fusarium* spp., e de derivados quinolínicos sobre cepas dermatofíticas;

2.2.6. Avaliar parâmetros toxicológicos dérmicos, em mucosa e a nível sistêmico frente a derivados de cloroacetamidas e derivados quinolínicos;

2.2.7. Avaliar a eficácia da aplicabilidade de derivados de cloroacetamidas e quinolínicos quando incorporados em diferentes formulações farmacêuticas;

2.2.8. Determinar a eficácia de derivados quinolínicos quando incorporados a uma formulação à base de esmalte sobre um modelo *ex vivo* de onicomicose utilizando cascos suínos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Aspectos gerais sobre o gênero *Candida*

O gênero *Candida* é composto por microrganismos leveduriformes e eucariontes pertencentes ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Blastomycetes e Família Cryptococcacea. Esse gênero compreende mais de 200 espécies, sendo o principal entre as leveduras patogênicas causadoras de infecções em humanos e animais (Giolo & Svidzinski, 2010; Sardi et al., 2013). Leveduras do gênero *Candida* distribuem-se de forma ubíqua no meio ambiente, sendo encontradas em vegetais, em alimentos, na água e no solo. Além disso, essas leveduras fazem parte da microbiota comensal de humanos e animais, colonizando a pele e superfícies das mucosas do trato respiratório superior, gastrointestinal e gênito-urinário (Mcmanus & Coleman, 2014; Uppuluri et al., 2017).

Em meios de cultura sólidos, como o ágar sabouraud dextrose (ASD), é possível visualizar o crescimento de leveduras do gênero *Candida*. Assim, a análise macromorfológica revela a presença de colônias de aspecto mucoide, lisa ou rugosa e coloração esbranquiçada à amarelada. No exame direto com hidróxido de potássio (KOH) 20% a micromorfologia das colônias pode revelar a presença de células leveduriformes com formato arredondado ou ovalado e com diâmetro variando entre 3 – 14 µm de tamanho; pseudo-hifas (células em forma de elipse, com constrições no local dos septos e sem poro de comunicação entre as células); e hifas verdadeiras (células uniformes contendo septos verdadeiros e poros para comunicação entre as células) (Lacaz et al., 2002) (Figura 1). Espécies de *Candida* apresentam-se geralmente na forma leveduriforme, como ao colonizarem a microbiota comensal de humanos e animais. Porém, algumas espécies podem desenvolver pseudo-hifas - também conhecidas por forma filamentosa. Esse processo atua como um fator de virulência colaborando para a adesão e invasão da levedura comensal nos tecidos, tornando-as patogênicas e iniciando o processo infeccioso no indivíduo (Mcmanus & Coleman, 2014; Richardson et al., 2018). Devido a essas distinções morfológicas apresentadas pelo gênero *Candida*, a forma leveduriforme (unicelular) facilita a sua disseminação no ambiente e a forma de hifa (pluricelular) possibilita uma característica patogênica às espécies (Thompson et al., 2011).

Apesar de o gênero *Candida* ser constituído por centenas de espécies, 90% das infecções fúngicas causadas por essas leveduras são ocasionadas por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, descritas como as cinco principais espécies de relevância clínica (Serefhanoglu et al., 2012; Polvi, et al., 2015; Diba et al., 2018). Cada uma dessas espécies apresenta um potencial de virulência, perfil de suscetibilidade antifúngico e epidemiológico (Pappas et al., 2016). Espécies de *Candida* são consideradas leveduras oportunistas, visto que, tornam-se patogênicas em situações as quais o sistema imune do hospedeiro encontra-se deprimido. Assim, indivíduos HIV-positivos, pacientes transplantados, portadores de doenças crônicas ou que fazem uso de agentes quimioterápicos ou corticosteroides estão mais suscetíveis ao desenvolvimento de infecções causadas por *Candida* spp. (Polvi et al., 2015; Farmakiotis & Kontoyiannis, 2017).

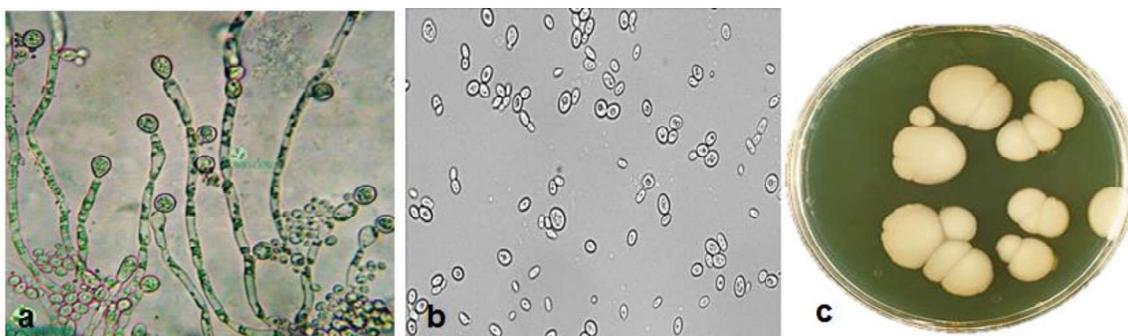


Figura 1. Imagem representativa da estrutura micromorfológica das células de *Candida albicans* (a) indicando a presença de hifas – forma filamentosa e *Candida glabrata* (b) indicando a presença de blastoconídios – forma leveduriforme; (c) imagem representativa da estrutura macromorfológica das colônias de *C. albicans*.

Fonte: *Mycology Online*.

3.2. Infecções causadas por espécies de *Candida*

Espécies de *Candida* são os principais patógenos fúngicos oportunistas em humanos e animais. Essas leveduras são capazes de provocar diferentes formas clínicas de infecção nesses hospedeiros, desde candidíase superficial e de mucosa, até infecções invasivas e disseminadas, associadas à candidemias. Essas infecções apresentam ocorrência mundial e estão estritamente relacionadas com altas taxas

de morbidade e mortalidade principalmente em indivíduos imunodeprimidos (Hani et al., 2015, Ramos et al., 2015, Pappas et al., 2016).

O desenvolvimento da infecção por *Candida* spp. ocorre através de etapas cruciais, como adesão, colonização e subsequente penetração fúngica nos tecidos do hospedeiro, envolvendo a produção de enzimas hidrolíticas essenciais para o estabelecimento da infecção (Ramos et al., 2015). A incidência de candidíases e candidemias aumentou consideravelmente nas últimas décadas. Tal fato está relacionado ao aumento do número de pacientes imunocomprometidos, principalmente indivíduos HIV-positivos e às falhas apresentadas pela terapia clínica antifúngica disponível, que contribuem para os casos de resistência fúngica (Pfaller & Catanheira, 2016; Fuentefria et al., 2016). Atualmente, *Candida* spp. é responsável por 80% das infecções fúngicas sistêmicas, consideradas a quarta, sexta e a sétima principal causa de infecções nosocomiais nos Estados Unidos da América (EUA), Europa e Brasil, respectivamente (Wisplinghoff et al., 2014; Canela et al., 2017; Uppuluri et al., 2017).

Dentre as infecções causadas por *Candida* spp., a candidíase ungueal é uma onicomicose não-dermatofítica que se desenvolve nas unhas dos pés e das mãos, tanto de indivíduos saudáveis quanto imunocomprometidos (Sav et al., 2018). A infecção manifesta-se por lesões denominadas paroníquias, em que ocorre um processo inflamatório da pele com eritema e alterações edematosas do tecido mole da dobra ungueal circundante (Arce & Gutiérrez-Mendoza, 2017). Leveduras de *Candida* spp. são amplamente consideradas a causa de onicomicose secundária à doença paroniquial e doença vascular periférica (Ortasevic et al., 2016). A incidência de candidíase ungueal varia de 2% a 15% na população mundial, de acordo com a localização geográfica e com o perfil de suscetibilidade dos indivíduos (Reyes-Montes et al., 2017). Dessa forma, indivíduos imunodeprimidos, como portadores de doenças crônicas, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), idosos, pacientes submetidos à hemodiálise ou que manifestam outras doenças infecciosas – como a psoríase – e trauma pré-existente na região ungueal, estão mais suscetíveis ao desenvolvimento de candidíase ungueal (Coleman et al., 2014).

Candidíase superficial ou cutânea ocorre devido ao crescimento descontrolado de *Candida* spp. presente na microbiota da pele, o qual é decorrente de um desequilíbrio no sistema imune do indivíduo. As regiões da pele mais

propensas ao desenvolvimento da infecção são as regiões das dobras cutâneas, como virilhas e axilas, e as regiões interdigitais entre os dedos das mãos e dos pés (Rigopoulos, 2015). Esses locais do corpo possuem uma maior umidade e temperatura, favorecendo o crescimento fúngico. Além disso, regiões que se encontram sob uma área oclusiva, como em processos de imobilização de algum membro ou a região das costas em pacientes hospitalizados, são as áreas mais predispostas ao desenvolvimento da infecção (Kaushik et al., 2015). A manifestação das lesões cutâneas surge em forma de máculas papulomatosas que provocam eritema, vermelhidão e prurido no local afetado (Kaufman et al., 2017).

Leveduras de *Candida* spp. também são responsáveis por causarem infecções que acometem as regiões das mucosas do nosso organismo. A candidíase oral é um exemplo dessas manifestações, atingindo principalmente indivíduos imunocomprometidos e neonatos. Essa infecção é a manifestação mais comum em pacientes HIV-positivos e considerada um dos primeiros sinais clínicos decorrentes da imunossupressão (Lourenço et al., 2017). As causas para o estabelecimento da candidíase oral são complexas, envolvendo fatores como: higiene oral do indivíduo, idade, uso de prótese removível e a associação destes com doenças crônicas e sistêmicas, como diabetes e SIDA (Muadcheingka & Tantivitayakul, 2015; Meira et al., 2017). A infecção se manifesta através de lesões que podem ser de coloração esbranquiçada - forma de apresentação clássica - e decorrentes de candidíase pseudomembranosa e hiperplásica, ou de coloração avermelhada, que abrange a forma eritematosa, incluindo a candidíase atrófica aguda e a estomatite protética (Meira et al., 2017).

A candidíase esofágica pode iniciar o seu desenvolvimento em decorrência de uma candidíase oral (Pappas et al., 2016). Classificada como uma infecção de mucosa, a candidíase esofágica pode ser considerada uma forma de candidíase invasiva caso não seja diagnosticada e erradicada rapidamente, visto que, a infecção pode progredir levando ao início de manifestações clínicas mais graves (Takahashi et al., 2015). Como grupo de risco, indivíduos que apresentam doenças esofágicas prévias, desnutrição ou alcoolismo, pacientes quimioterápicos, diabéticos, HIV-positivos e aqueles que fazem uso de terapias com inibidores das bombas de prótons, antibacterianas e corticosteroides, encontram-se mais

suscetíveis ao desenvolvimento de uma candidíase esofágica (Onishi et al., 2015; Hoversten et al., 2019).

A candidíase vulvovaginal é definida como uma das principais manifestações de infecção fúngica em mucosas. Isso pode ser observado devido à sua alta incidência nos últimos anos, sendo considerada a causa mais frequente de infecção sintomática no trato genital inferior (Donders et al., 2016). Embora gestantes e mulheres imunocomprometidas sejam o grupo mais propenso ao desenvolvimento de candidíase vulvovaginal, estima-se que até 70% das mulheres serão atingidas por algum episódio da infecção durante o seu período de vida. Um dos principais fatores que leva ao estabelecimento dessa infecção é o desequilíbrio da microbiota local decorrente do uso de terapias antibióticas, as quais provocam alterações no pH da mucosa vaginal, promovendo o aumento do crescimento fúngico local. Como consequência disso, ocorre a manifestação dos sintomas, como vermelhidão, fissuras, prurido e corrimento esbranquiçado mucoide (Masri et al., 2015; Cauchie et al., 2017).

Além das formas de apresentações de candidíase descritas, um dos principais agravantes envolvendo o gênero *Candida* é a manifestação sistêmica e invasiva da infecção, a qual apresenta altas taxas de mortalidade e morbidade no Brasil e no mundo (Antinori et al., 2016; Doi et al., 2016). Casos de candidíase invasiva englobam um espectro de manifestações clínicas difíceis de diagnosticar, pois estão associados a outras enfermidades que envolvem órgãos como o coração, rins, olhos, peritônio, fígado, baço, ossos e pulmão (Clancy & Nguyen, 2013). A candidemia – forma de manifestação da infecção por *Candida* spp. no sangue - apresenta a maior prevalência dentre as infecções invasivas causada por essas leveduras. Essa manifestação clínica afeta principalmente indivíduos imunocomprometidos e hospitalizados que fazem uso de nutrição parenteral, cateteres e sondas. No Brasil, a infecção está relacionada a 50% da taxa de mortalidade hospitalar e a altos custos com a saúde pública (Doi et al., 2016; Farmakiotis & Kontoyiannis, 2017).

Um outro exemplo de manifestação clínica de candidíase invasiva é a endocardite ocasionada por *Candida* spp. Essa forma de infecção atinge a região das válvulas cardíacas e acomete principalmente pacientes idosos submetidos a cirurgias cardíacas, dessa forma, estando altamente associada ao uso de válvulas

protéticas e ao cateterismo (Badiee et al., 2014; Yuan, 2016). Esses dispositivos médicos favorecem a formação de biofilmes de *Candida* spp. em seu interior, os quais podem migrar para outros órgãos disseminando a infecção pelo organismo do paciente. Além disso, as células de *Candida* spp. presentes em um biofilme apresentam maiores taxas de resistência fúngica à terapia clínica atual quando comparadas às células livres, o que contribui para o aumento da mortalidade em pacientes portadores dessas infecções (Antinori et al., 2016).

Embora com menor frequência, mas com um elevado grau de severidade, espécies de *Candida* também podem ocasionar outras doenças, como meningite, pneumonia, endoftalmite, osteomielite e inflamações na região peritonial do abdome (Antinori et al., 2016). Geralmente essas infecções provêm de uma candidemia não diagnosticada previamente e que pode estender-se para os sítios estéreis do organismo, levando a uma infecção disseminada (Della Pepa et al., 2016).

Em todas as manifestações clínicas relacionadas à candidíase, *C. albicans* destaca-se como a espécie mais prevalente, responsável pela grande maioria dos casos, desde candidíase superficial à sistêmica (Millsop & Fazel, 2016; Kaufman et al., 2017; Meira et al., 2017; Whaley et al., 2017; Canela et al., 2018; Hayette et al., 2019). Porém, nos últimos anos, as espécies de *Candida* não-*albicans* (CNA) têm sido amplamente relatadas em casos dessas infecções, sendo consideradas patógenos oportunistas emergentes. Tal problemática pode ser observada devido ao aumento no número de casos de onicomicoses, candidíase cutânea e candidemias relacionados a *C. parapsilosis* (Ramos et al., 2015; Doi et al., 2016). Além disso, relatos de candidíase vulvovaginal e candidemias associados a espécies como *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* vêm aumentando consideravelmente no Brasil e no mundo (Powell et al., 2016; Rolston, 2017; Whaley et al., 2017; Brandão et al., 2018). Acredita-se que uma das razões para a emergência dessas espécies seja devido ao aumento da seleção de isolados resistentes aos fármacos azólicos, utilizados com primeira linha de combate a infecções por *Candida* spp. (Brandolt et al., 2017; Brandão et al., 2018).

3.2.1. Terapia antifúngica para infecções causadas por *Candida* spp.

A escolha de uma terapia antifúngica adequada para o tratamento de infecções causadas por *Candida* spp. é baseada no quadro clínico do paciente e no resultado apresentado pelo diagnóstico micológico proveniente da coleta de amostra do sítio da infecção do paciente. Assim, exames de microscopia direta e cultura do material coletado são realizados. Além disso, técnicas mais atuais de diagnóstico, como o uso de biologia molecular, também podem ser empregadas (Nenoff et al., 2014b).

O tratamento atual para candidíases e candidemias envolve quatro principais classes de antifúngicos: azóis, poliênos, análogos de pirimidinas e equinocandinas, utilizados por via tópica, oral ou intravenosa (Campoy & Adrio, 2017). A anfotericina B, flucitosina e o fluconazol estão na lista de medicamentos essenciais aprovados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Kneale et al., 2016). Dessa forma, os antifúngicos mais comumente indicados para essas infecções são o fluconazol – fármaco de primeira escolha - e a anfotericina B. Entretanto, para casos de infecções mais severas, invasivas ou sistêmicas e que apresentam difícil tratamento, azóis de última geração - como o voriconazol e o posaconazol, juntamente com as equinocandinas, são recomendados (Barros et al., 2013).

Para o tratamento de candidíases superficiais e cutâneas recomenda-se o uso de antifúngicos tópicos, os quais apresentam vantagens em relação à terapia sistêmica. Como exemplo, o uso de uma terapia antifúngica local limita o risco de efeitos colaterais ao paciente, além de permitir que o tratamento seja diretamente direcionado para o sítio local da infecção (Schaller et al., 2016). Além disso, a administração concomitante de antifúngicos locais e sistêmicos é restrita, uma vez que contribui para o aumento da seleção de resistência fúngica e severa toxicidade ao paciente, indicada somente quando a terapia tópica não é eficaz. Assim, para o tratamento de candidíase superficial e cutânea geralmente são utilizados cremes e pomadas de nistatina, miconazol, cetoconazol e clotrimazol (Allen et al., 2015; Lyu et al., 2016).

Nistatina, miconazol e clotrimazol têm sido recomendados como fármacos de primeira escolha para casos não complicados de candidíase oral. Entretanto, se o paciente não responde ou apresenta intolerância ao tratamento tópico inicial,

antifúngicos sistêmicos são necessários, como os triazóis fluconazol e itraconazol (Antinori et al., 2016). O fluconazol tem demonstrado uma maior taxa de cura clínica da infecção quando comparado ao itraconazol. Isso pode ser explicado pelas interações medicamentosas entre o itraconazol e outros fármacos administrados concomitantemente pelo paciente (Garcia-Cuesta et al., 2014).

Como em todos os casos de infecções fúngicas, o diagnóstico micológico a nível de espécie é fundamental para a escolha adequada de uma terapia antifúngica. Além do mais, esse fator é determinante pra que o tratamento de uma candidíase vulvovaginal obtenha sucesso, pois as altas taxas de recorrência da infecção estão relacionadas à escolha de uma terapia antifúngica inadequada que induz à seleção de isolados resistentes (Donders & Sobel, 2016). O uso de antifúngicos sistêmicos como fluconazol ou itraconazol tem sido indicado para o tratamento da infecção, porém, esses fármacos têm apresentado altas taxas de toxicidade relatadas pelos pacientes após determinado tempo de exposição, o que limita o uso desses agentes. Além disso, casos de infecções devido a espécies de CNA são menos suscetíveis ao fluconazol e ao itraconazol. Com isso, nesses casos a administração de voriconazol é indicada (Gonçalves et al., 2015; Garcia-Cuesta et al., 2016).

Devido à severidade da maioria dos casos, o tratamento antifúngico recomendado para as candidíases invasivas e sistêmicas necessita de fármacos mais eficazes que promovam a cura clínica da infecção de uma maneira rápida e eficiente (Lyu et al., 2016). Atualmente, as equinocandinas são consideradas a mais potente classe antifúngica disponível. Elas representam a primeira linha de escolha para a terapia clínica em casos de candidíases invasivas e candidemias, pois uma menor incidência de relatos de resistência fúngica a essa classe são descritos, além de apresentar uma potente ação fungicida contra *Candida* spp., incluindo as espécies de CNA (Pappas et al., 2016; Wagener & Loiko, 2018). Em casos iniciais dos sintomas ou menos graves da infecção invasiva por espécies de *Candida*, o tratamento com anfotericina B ou triazóis de segunda geração pode ser indicado, pois estes podem ser capazes de promover a cura clínica da infecção e dispendem de um menor custo à saúde pública quando comparado às equinocandinas (Allen et al., 2015).

3.3. Aspectos gerais sobre os gêneros *Microsporum* e *Trichophyton*

Diferentemente do gênero *Candida*, os gêneros *Microsporum* e *Trichophyton* são fungos filamentosos, hialinos e pluricelulares, pertencentes ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Euascomycetes Ordem Onygenales e Família Arthrodermataceae (Rouzaud et al., 2016). Esses organismos apresentam abrangência mundial e natureza saprofítica, pois eles têm como seu habitat o ambiente terrestre e aquático, além de estarem presentes na microbiota comensal dos pelos de animais. Os gêneros *Microsporum* e *Trichophyton* geralmente são anamórficos – reproduzem-se de forma assexuada, e apresentam uma estrutura celular formada por hifas hialinas e conídios (estruturas de reprodução) (Dalla Lana et al., 2016).

A partir do crescimento fúngico em meio de cultura, como em ágar batata dextrose (ABD), é possível visualizar as características morfológicas de cada espécie dermatofítica. Para ambos os gêneros, *Microsporum* e *Trichophyton*, a análise micromorfológica permite a visualização de hifas e conídios. As hifas são originadas a partir da extensão apical dos filamentos e o seu crescimento pode ocorrer com ou sem a formação de septos. Assim, a formação de septos é decorrente da separação da parede celular do restante dos compartimentos celulares. Por outro lado, o crescimento contínuo das hifas resulta em uma rede complexa, denominada micélio fúngico (Powers-Fletcher et al., 2016).

A produção de conídios e hifas juntamente com a morfologia dessas estruturas varia entre os gêneros *Microsporum* e *Trichophyton*. O primeiro produz microconídios piriformes com cerca de 2-3 μm e macroconídios multiseptados que apresentam uma parede celular fina ou espessa, variando conforme a espécie, em forma de fuso. Os macroconídios podem ser numerosos ou escassos. Já o gênero *Trichophyton* produz numerosos microconídios piriformes ou ovalados, em cachos ou distribuindo-se ao longo das hifas, também com cerca de 2-3 μm . Seus macroconídios apresentam paredes lisas e finas em forma de cilindro (Lacaz et al., 2002).

O crescimento fúngico em meio de cultura também possibilita a análise macromorfológica das colônias fúngicas. Para ambos os gêneros, *Microsporum* e *Trichophyton*, as colônias possuem coloração branca com aparência cotonosa e aveludada, já o reverso das colônias varia de acordo com o gênero e a espécie,

podendo apresentar coloração púrpura a avermelhada, amarela, castanha e marrom-amarelada. A pigmentação visualizada no reverso das colônias surge no decorrer do tempo a partir do início cultivo, assim, cultivos com poucos dias de crescimento podem apresentar discreta pigmentação (Sidrim & Rocha, 2004).

Os gêneros *Microsporum* e *Trichophyton* estão entre os principais representantes de um grupo de fungos denominados dermatófitos. Esses organismos são considerados queratinofílicos e queratinolíticos, capazes de causar infecção em tecidos queratinizados de humanos e animais, como pele, unha, cabelo e pelos (Hayette & Sacheli, 2015; Garces et al., 2016). Dermatófitos são classificados em três subgrupos: antropofílicos – espécies que vivem em ambientes urbanos, como vestiários, academias de ginástica, piscinas públicas e podem causar infecção em humanos, como a espécie *Trichophyton rubrum*; zoofílicos - espécies que fazem parte da microbiota de animais, como gato, cachorro e cavalos e que podem desenvolver infecção tanto nestes quanto em humanos, como as espécies *Microsporum canis* e *T. mentagrophytes*; geofílicos – espécies que vivem de forma livre no solo e que podem tornar-se patogênicas ao homem dependendo de fatores relacionados ao hospedeiro, representada por *M. gypseum* (Khosravi et al., 2016; Zhan et al., 2018). A partir dessa classificação, os dermatófitos de origem antropofílica e zoofílica são os subgrupos predominantes isolados em infecções em humanos (Hayette & Sacheli, 2015). Embora apresentem abrangência mundial, a predominância de cada gênero dermatofítico e o local da manifestação clínica das lesões que desenvolvem no hospedeiro são condicionados pela localização geográfica fatores ambientais (Dalla Lana et al., 2016).

Estudos relatam que cerca de 10 espécies dermatofíticas são comumente encontradas no hospedeiro humano (De Hoog et al., 2017; Graser et al., 2018). *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* estão entre os principais agentes relacionados a infecções nesse hospedeiro, dentre os quais, *T. rubrum* é a espécie mais prevalente, responsável por 80% das infecções dermatofíticas em humanos (Rouzaud et al., 2016; Zhan & Liu, 2017; Song et al., 2018; Zhan et al. 2018). Na Figura 2 é possível visualizar macro e micromorfológicamente a estrutura de ambos os gêneros descritos. A incidência das dermatofitoses tem aumentado significativamente nos últimos anos. Um dos principais fatores desencadeantes dessa problemática é o aumento da incidência de doenças como diabetes tipo 2,

doenças vasculares e ao envelhecimento da população, o que contribui para o aumento do número de pacientes imunocomprometidos, mais suscetíveis às infecções dermatofíticas (Hayette & Sacheli, 2015; Gupta et al., 2018; Song et al., 2018).

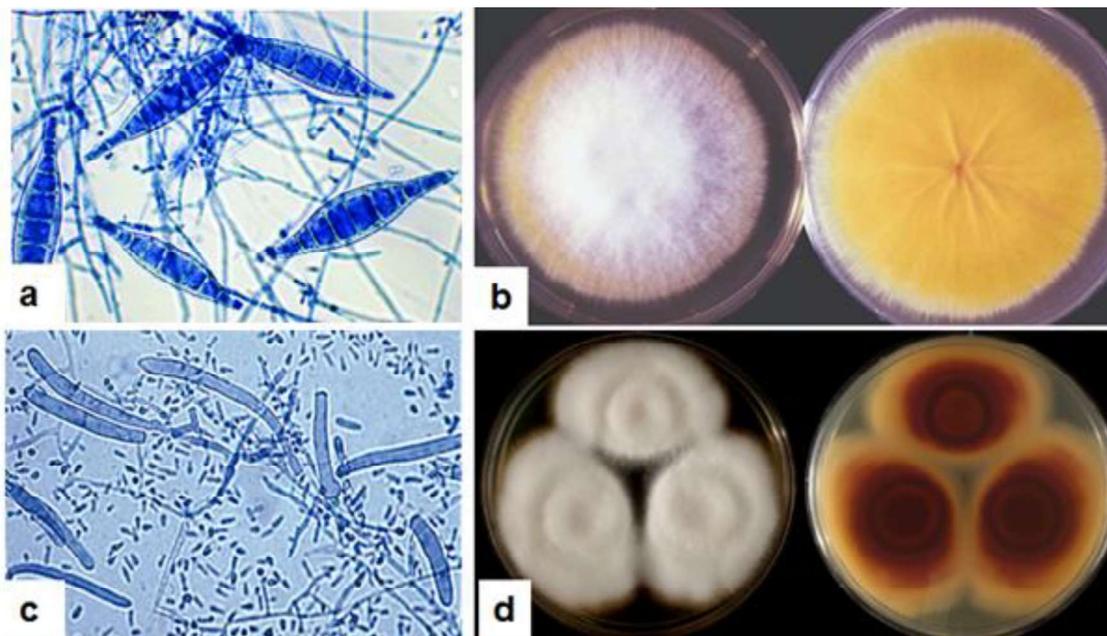


Figura 2. Imagem representativa da estrutura micromorfológica das células de *M. canis* (a) e *T. rubrum* (c) - hifas, macroconídios e microconídios; imagem representativa da estrutura macromorfológica das colônias de *M. canis* (b) *T. rubrum* (d), verso e reverso, respectivamente. Fonte: *Mycology Online*.

3.4. Infecções causadas por espécies de *Microsporum* e *Trichophyton*

Como descrito, os gêneros *Microsporum* e *Trichophyton* são capazes de causar infecções em humanos e animais. As dermatofitoses, também conhecidas por *tineas*, são consideradas a quarta doença infecciosa mais prevalente no mundo (Rouzaud et al., 2017) e a principal infecção fúngica em humanos (Faway et al., 2018). Com isso, estima-se que atualmente 25% da população mundial manifeste uma infecção de origem dermatofítica (Faway et al., 2018; Sahni et al., 2018). Apesar de os EUA ser um país desenvolvido, a prevalência de dermatofitoses afeta 20% da população, semelhante aos dados epidemiológicos relatados no Brasil, onde

essas infecções são relatadas entre 18 a 23% da população (Dalla Lana et al., 2016). Tal problemática tem ocasionado um custo anual com despesas de saúde estimado em 500 milhões de dólares (Faway et al., 2018). Mesmo apresentando altos índices de prevalência, as pesquisas envolvendo novas estratégias de tratamento a fim de reduzir o alto índice de dermatofitoses são limitadas. Um dos motivos está relacionado ao fato de que as manifestações da infecção são geralmente superficiais e consideradas apenas um problema estético e, com isso, negligenciadas (Graser et al., 2018). Porém, grupos de risco como pacientes HIV-positivos, indivíduos transplantados ou portadores de doenças crônicas, como diabetes, podem desenvolver formas severas, invasivas e crônicas da infecção, as quais podem ocasionar em falhas terapêuticas, pois são de difícil tratamento clínico (Rouzaud et al., 2016; Sahni et al., 2016).

O desenvolvimento das dermatofitoses tem início a partir da colonização do fungo no sítio alvo do hospedeiro com posterior estimulação dos queratinócitos – células responsáveis pela síntese de queratina. Os queratinócitos, por sua vez, induzem a produção de citocinas que medeiam a resposta inflamatória e o acúmulo de neutrófilos no tecido infectado (Martínez & Rossi, 2014). Os sinais clínicos da infecção resultam da degradação de tecidos queratinizados devido à produção de metabólitos tóxicos pelo microrganismo e da resposta imune específica do hospedeiro infectado. A partir de então, a infecção manifesta-se através de lesões circulares e delimitadas com bordas avermelhadas, podendo ocorrer descamação, ressecamento, presença de fissuras e eritema da pele, couro cabeludo ou outras regiões do corpo (Saxena et al., 2017). No entanto, algumas formas clínicas de dermatofitoses apresentam diferentes lesões, o que será abordado no decorrer deste tópico. Assim, as dermatofitoses podem ser classificadas de acordo o sítio da lesão: *tinea barbae* (face - região da barba), *tinea capitis* (cabelo ou pelos), *tinea corporis* (pele do corpo), *tinea cruris* (região da virilha), *tinea faciei* (face), *tinea pedis* (pés) e *tinea unguium* (unha - onicomicose) (Zhan & Liu, 2017).

Os dermatófitos são os principais agentes causadores de onicomicoses em humanos, compreendendo cerca de 90 e 50% dos casos de infecção nas unhas dos pés e nas unhas das mãos, respectivamente (Martínez et al., 2014). Alguns fatores como trauma na região das unhas, predisposição genética e umidade são condições desencadeantes para a infecção (Shemer & Bbabev, 2018). A forma

clássica de manifestação clínica de uma onicomicose de origem dermatofítica é o aparecimento de placas brancas e facilmente removíveis na região dorsal das unhas associadas à hiperqueratose e onicolise, sem que haja penetração fúngica para áreas mais profundas das mesmas (Pichardo-Geisinger, 2014). Caso a infecção não seja diagnosticada precocemente, as lesões clássicas podem progredir até casos em que ocorre a distrofia total da unha, com destruição de todas as partes da placa ungueal, resultando em um leito ungueal mais espesso e anormal. Em indivíduos imunocomprometidos essa manifestação ocorre inicialmente, sem que haja a necessidade de progressão das lesões clássicas iniciais (Gupta, 2018).

Dermatófitos também podem invadir a superfície inferior da placa ungueal, provocando casos de infecção subungueal. Nessa situação, as lesões atingem a região distal e lateral das unhas dos pés e a placa ungueal adquire uma coloração branco-amarelada ou tons que variam de marrom a preto (Piraccini & Alessandrini, 2015). Em situações mais graves, a infecção pode ocasionar um dermatofitoma, manifestação caracterizada pelo acúmulo subungueal de hifas fúngicas e escamas resistentes ao tratamento antifúngico sistêmico, a qual necessita de excisão cirúrgica para promover a cura clínica total da infecção (Shemer et al., 2017).

A *tinea pedis*, conhecida popularmente como pé de atleta, é considerada a segunda manifestação mais frequente de origem dermatofítica. A infecção manifesta-se predominantemente em adultos e apresenta uma prevalência três vezes maior em indivíduos diabéticos, visto que, estes estão mais propensos a desenvolver essa infecção (Nijenhuis-Rosien et al., 2015; Schaller et al., 2016). Alguns fatores como umidade e altas temperaturas aliados a condições de higiene, são fatores desencadeantes para o desenvolvimento da *tinea pedis* (Dalla Lana et al., 2016). As manifestações provocadas pela infecção incluem três formas distintas: i) vesículas bolhosas com caráter inflamatório; ii) hiperqueratose, presença de fissuras e espessamento da pele na região da sola dos pés e dos calcanhares; iii) eczemas e lesões na forma de fissuras, que provocam vermelhidão e ardor na região interdigital, a qual apresenta-se como a manifestação mais comum da infecção (Behzadi et al., 2014). Além disso, *tinea pedis* é a porta de entrada para outras manifestações clínicas, como onicomicose e infecções bacterianas, podendo

ocasionar desordens mais severas no indivíduo se não tratada adequadamente (Nenoff et al., 2014a).

Considerada a terceira manifestação mais prevalente de infecção fúngica cutânea - seguida apenas do número de casos relatados para *tinea pedis* e onicomicose, a *tinea corporis* acomete todas as regiões da pele, com exceção da virilha, sola dos pés, das mãos e de regiões interdigitais (Shemer & Babaev, 2018). Quando os sinais clínicos da infecção manifestam-se nas regiões da virilha e do púbis, a infecção é denominada *tinea cruris*, mais frequentemente observada em homens adultos (Vega-Sánchez et al., 2016). As lesões típicas dessas manifestações possuem o formato de placas arredondadas e delimitadas que apresentam uma borda inflamatória ativa, com a região central da lesão de coloração mais clara e que provocam coceira e ardor (Shemer & Babaev, 2018).

Apesar de ser uma das infecções cutâneas mais frequentes em crianças, a *tinea capitis* está relacionada à falta de higiene e baixo poder econômico, apresentando uma alta incidência em todas as regiões do mundo (John et al., 2018). Em adultos, a infecção por *M. canis* tem sido frequentemente associada a estados imunossupressores (Mao et al., 2014). Animais domésticos como cães e gatos geralmente são o reservatório de infecção além de serem portadores saudáveis do gênero *Microsporum* (Zhan et al., 2015). As lesões provocadas pela infecção variam desde leve descamação do couro cabeludo com pouca perda de cabelo até grandes regiões inflamatórias e pustulosas podendo provocar alopecia (Fuller et al., 2014). A infecção também pode se manifestar com caráter inflamatório, apresentando linfadenopatia cervical e lesões mais severas, denominadas kérions. Essas lesões apresentam-se como placas arredondadas e doloridas com drenagem purulenta que invadem o folículo piloso, provocando séria inflamação e perda de cabelo (Hay, 2017).

Dermatófitos também podem colonizar e invadir o tecido epitelial da pele do rosto - excluindo a região da barba em homens – condição denominada *tinea faciei*, a qual representa cerca de 4% dos casos de *tinea corporis* (Dav et al., 2017; Saxena et al., 2017). Assim como nas demais manifestações clínicas provocadas pelas *tineas* que acometem diferentes regiões da pele, a *tinea faciei* também manifesta-se através de placas anulares e eritematosas com a presença de um halo central mais claro, causando descamação da pele e coceira (Alkeswani et al., 2019).

Quando a manifestação dermatofítica atinge a região da área da barba e pescoço, ela é conhecida como *tinea barbae*. Essa condição acomete quase que exclusivamente jovens do sexo masculino (Singh et al., 2017). Os animais como gatos e cachorros constituem uma das fontes de infecção. As manifestações clínicas da *tinea barbae* podem ser inflamatórias ou não, incluindo placas profundas com o aspecto de kérion e lesões superficiais típicas que se assemelham a *tinea corporis* (Saxena et al., 2017).

As infecções dermatofíticas predisõem o indivíduo a outras condições patológicas que se desenvolvem a partir do comprometimento inicial da barreira da pele. Assim, as dermatofitoses são uma fonte considerável de casos de morbidade principalmente relacionados a pacientes imunodeprimidos (Costa et al., 2015). Dessa forma, relatos de dermatofitose severa estão mais estritamente relacionados a indivíduos HIV-positivos, pois são um grupo de risco mais susceptível às mesmas. Nesse caso, as manifestações da infecção incluem formas diferentes e invasivas, como, por exemplo, a dermatofitose profunda e granuloma de Majocchi, e a dermatofitose extensa (Rouzaud et al., 2016). Com isso, o rápido diagnóstico e tratamento das dermatofitoses são essenciais para prevenir o desenvolvimento de manifestações mais graves, principalmente em pacientes incluídos nos grupos de risco (Rosa et al., 2017).

T. rubrum é a espécie responsável por cerca de 70% dos casos de onicomicose, seguida por *T. mentagrophytes*, a qual encontra-se relacionada a 20% dos casos (Del Rosso, 2014; Zhan & Liu, 2017; Shemer & Bbabev, 2018). Já as espécies *M. canis* e *M. gypseum* são patógenos menos frequentes, envolvendo 10% dos casos de dermatofitoses em humanos (Fike, et al., 2018). Dentre os principais agentes relacionados à *tinea pedis*, *tinea corporis* e *tinea cruris*, *T. rubrum* é a espécie mais prevalente, totalizando cerca de 50% dos casos (Costa et al., 2015; El-Zawawy & Ali, 2016; Gobbato, et al, 2019). Por outro lado, *M. canis* é a principal espécie em casos de *tinea capitis*, seguida por demais espécies do gênero *Trichophyton* (Khosravi et al., 2016; Zhan & Liu, 2017). Em casos de *tinea faciei* os principais patógenos envolvidos são as espécies *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans* e *T. rubrum* (Chen et al., 2017). Além disso, relatos de *tinea barbae* têm sido amplamente relacionados a *T. mentagrophytes*, o qual tem sido responsável por 70% desses casos (Zhan & Liu, 2017).

3.4.1. Terapia antifúngica para infecções causadas por *Microsporium* spp. e *Trichophyton* spp.

Assim como ocorre com as demais infecções fúngicas, o diagnóstico rápido e preciso das espécies envolvidas em uma dermatofitose se faz necessário, a fim de obter sucesso na terapêutica promovendo a cura total da infecção. Métodos tradicionais como a cultura do material da lesão fúngica apresentam baixa sensibilidade, em torno de 75%, aliados ao longo tempo de crescimento fúngico, que pode variar entre 2 a 4 semanas, demonstra desvantagens frente a ferramentas de diagnóstico moleculares, as quais oferecem um resultado preciso em um prazo de até dois dias (Hayette & Sacheli, 2015).

O tratamento das dermatofitoses irá depender do local e da extensão das lesões manifestadas no paciente. No caso de onicomicose, a terapia depende da gravidade da lesão e do número de unhas envolvidas. Terapias antifúngicas sistêmicas apresentam algumas limitações, como potencial toxicidade hepática e renal, além de interações medicamentosas. Por outro lado, antifúngicos tópicos possuem uma eficácia limitada. Assim, apesar dos riscos inerentes decorrentes do seu uso, a combinação de um tratamento tópico e sistêmico é geralmente a melhor escolha (Piraccini & Alessandrini, 2015). O tratamento tópico para onicomicose na forma de soluções e pomadas geralmente não é eficaz devido à penetração limitada dessas formas farmacêuticas através do leito ungueal. Com isso, amorolfina e ciclopirox olamina na forma de esmaltes são as terapias mais recomendadas para essas infecções (Tabara et al., 2015). Porém, em casos em que a onicomicose compromete toda a matriz ungueal, recomenda-se como primeira escolha o tratamento sistêmico com terbinafina (Shemer & Babaev, 2018).

Casos brandos de *tinea pedis* respondem satisfatoriamente ao tratamento tópico, com a administração de terbinafina na forma de creme, ciclopirox olamina ou econazol. Porém, cerca de 30% dos casos da infecção não respondem a esse tratamento. Por outro lado, quando a terbinafina é administrada por via oral, a infecção apresenta uma taxa de cura em 80% dos casos, possivelmente devido à ação fungicida desse fármaco (Shemer & Babaev, 2018).

Caso a infecção por *tinea corporis* e *tinea faciei* seja localizada ou apenas uma única lesão esteja presente, o tratamento com um antifúngico tópico, como o clotrimazol ou miconazol, é geralmente suficiente para promover a cura da infecção.

Porém, quando ocorre o envolvimento de uma área superficial extensa ou quando múltiplas lesões estão presentes, o tratamento sistêmico com terbinafina é indicado (Schaller et al., 2016; Saxena et al., 2017). De maneira semelhante, o tratamento para *tinea barbae* e *tinea cruris* requer a administração de terapia oral através de terbinafina ou itraconazol, apresentando uma taxa de cura em 80% dos casos para está última (Singh et al., 2017; Shemer & Babev, 2018).

Em casos de *tinea capitis*, a terapia tópica disponível não é capaz de penetrar no interior dos folículos pilosos dos cabelos ou dos pelos (Schaller et al., 2016). Assim, o uso de antifúngicos orais também se faz necessário, envolvendo o uso de terbinafina, griseofulvina e itraconazol. Entretanto, devido a relatos severos de toxicidade, a griseofulvina vem sendo amplamente substituída pela terbinafina em diversos países (Sigurgeirsson, 2016).

3.5. Aspectos gerais sobre o gênero *Fusarium*

O gênero *Fusarium* é composto por fungos filamentosos classificados como hialohifomicetos (presença de hifas hialinas) e pertencentes ao Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Hypocreales e Família Nectriaceae (Aoki et al., 2014; Lombard et al., 2015). Esses organismos são saprófitos e ubíquos, amplamente distribuídos na natureza e vivendo de forma livre em ambientes como o solo, água e plantas. Representantes do gênero *Fusarium* são cosmopolitas - apresentam abrangência mundial – e podem ser encontrados em áreas tropicais, desertos, regiões montanhosas, regiões de clima temperado e até ártico (Diongue et al., 2017). Além disso, esse gênero é mundialmente conhecido por apresentar importantes fitopatógenos de diversas culturas de cereais e grãos, os quais produzem micotoxinas, danosas às plantas e à saúde humana (Nucci et al., 2015; Debourgogne et al., 2016).

Atualmente, com as vantagens oferecidas pela biologia molecular, é possível reconhecer mais de 200 espécies pertencentes ao gênero *Fusarium* (Laurence et al., 2015). Essas espécies encontram-se classificadas em 22 complexos, os quais apresentam diferenças quanto às suas características morfológicas, interação com o hospedeiro e parâmetros moleculares (Al-Hatmi et al., 2017).

Quando cultivado em meios de cultura tradicionais, como o ABD, *Fusarium* spp. apresenta crescimento rápido, sendo possível verificar sob a análise microscópica a sua micromorfologia. Dessa forma, pode ser visualizada a presença de hifas hialinas septadas e ramificadas e a formação de conídios (estruturas de reprodução) (Van Diepeningen, 2014). *Fusarium* spp. possui microconídios pequenos e ovais, contendo ou não a formação de septos. Por outro lado, seus macroconídios são numerosos, multiseptados e semelhantes à uma canoa, considerados a característica clássica e principal do gênero (Leslie & Summerell, 2006). A visualização macroscópica de espécies de *Fusarium* permite observar colônias com aspecto cotonoso e esbranquiçado, as quais desenvolvem coloração mais escura no centro e uma borda externa mais clara à medida que amadurecem. Assim, a coloração do verso das colônias pode variar de rosa a violeta, laranja a marrom e de azul a verde. O reverso das colônias pode apresentar ou não uma leve pigmentação (Lainhart, 2018). Na Figura 3 é possível visualizar a estrutura micro e macromorfológica de *Fusarium solani*.

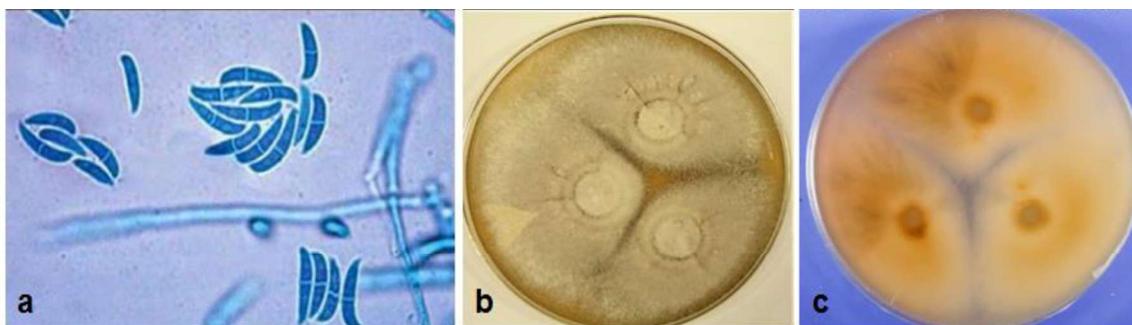


Figura 3. Imagem representativa da estrutura micromorfológica das células de *F. solani* – presença de macronídios e hifas (a), seguida pela representação da estrutura macromorfológica de suas colônias, verso (b) e reverso (c) Fonte: *Mycology Online*.

Embora o gênero *Fusarium* seja composto por centenas de espécies, somente 12 estão relacionadas à maioria dos casos de fusariose em humanos. *F. solani* apresenta-se como a espécie mais prevalente, relatada em cerca de 50% dos casos dessas infecções, seguida por *F. oxysporum* (20% dos casos), *F. verticillioides* e *F. moniliforme*, essas últimas relacionadas a 10% dos casos (Dabas et al., 2016).

Fusarium spp. representa um desafio para o controle das infecções fúngicas, pois seus conídios podem dispersar-se no ambiente a uma longa distância podendo infectar um novo hospedeiro suscetível, incluindo humanos, animais e plantas (Taj-Aldeen 2017). Além disso, populações de áreas que desenvolvem atividades rurais e trabalhadores do campo encontram-se mais propensos a entrar em contato direto com os conídios de *Fusarium* spp., visto que, o mesmo é um dos principais patógenos de culturas de cereais e pode contaminar tais indivíduos (Debourgogne et al., 2016).

3.6. Infecções causadas por espécies de *Fusarium*

Fusarium spp. é um preocupante patógeno oportunista que representa a segunda causa mais comum de infecção por fungos filamentosos em humanos, seguida apenas por *Aspergillus* spp. (Salah et al., 2015; Taj-Aldeen, 2017). Conhecidas como fusarioses, essas infecções vêm apresentando um aumento considerável nos últimos anos, tanto em indivíduos imunocomprometidos quanto em imunocompetentes (Gupta et al., 2016; Al-Hatmi et al., 2017; Batista et al., 2017).

A manifestação clínica da fusariose depende do estado imunológico do indivíduo e da porta de entrada do microrganismo, a qual ocorre principalmente através da inalação dos seus conídios, seguida pelo rompimento das membranas da pele e mucosas (Dabas et al., 2016). Assim, as fusarioses podem acometer regiões da pele, das unhas e dos olhos. Essas infecções são localizadas e ocorrem principalmente em hospedeiros imunocompetentes (Van Diepeningen et al., 2014). Por outro lado, espécies de *Fusarium* também podem ocasionar formas disseminadas de infecção, as quais são mais prevalentes em pacientes imunocomprometidos e, muitas vezes, estão associadas a outros fatores desencadeantes (Batista et al., 2017). A fusariose disseminada apresenta altas taxas de mortalidade (50 a 70% dos casos) sendo principalmente relatada em pacientes com leucemia e naqueles que recebem transplantes de células hematopoiéticas, devido ao estado imunológico dos mesmos (Ersal et al., 2015; Rosa et al., 2017). No Brasil, a prevalência de infecções invasivas por *Fusarium* spp. representa 40 a 60% dos casos de suspeita de infecção fúngica (Batista et al., 2017).

Dentre as principais espécies patogênicas em humanos, o complexo de espécies *F. solani* (FSSC) apresenta uma maior característica de virulência quando comparado aos complexos *F. oxysporum* (FOSC) e *F. fujikuroi* (FFSC), os quais incluem as espécies *F. proliferatum* e *F. verticillioides*, respectivamente (Guarro, 2013).

A ceratite fúngica é uma inflamação que acomete a córnea e que está relacionada a mais frequente manifestação clínica causada por *Fusarium* spp. em humanos, acometendo tanto indivíduos saudáveis quanto imunocomprometidos (Hassan et al., 2015; Taj-Aldeen, 2017; Walther et al., 2017). As causas dessa infecção têm sido associadas à solução de limpeza de lentes de contato contaminada, traumas cirúrgicos, imunossupressão e a sistemas de água de ambientes hospitalares, os quais são reservatórios de espécies infectantes de *Fusarium*. Dependendo da situação de imunocomprometimento do paciente, a ceratite pode progredir para manifestações mais severas como as endoftalmites, que podem ocasionar em cegueira (Walther et al., 2017). Casos de ceratite por *Fusarium* spp. são mais comumente relatados em regiões de clima tropical e subtropical, destacando a sua alta prevalência em países como o Brasil e a Índia (Oechsler et al., 2013; Das et al., 2015). De acordo com Farias et al. (2017), *Fusarium* spp. foi responsável por mais de 60% dos casos de ceratite relatados no Brasil nos últimos anos.

Como descrito anteriormente, os dermatófitos são os principais patógenos responsáveis pelos casos de onicomicoses em humanos. Porém, no decorrer das últimas décadas, casos dessa infecção relacionados a fungos não-dermatofíticos, como *Fusarium* spp., ganhou destaque considerável. Com isso, *Fusarium* é o gênero fúngico não-dermatofítico mais comumente isolado em onicomicoses no Brasil atualmente (Galletti et al., 2015; Rosa et al., 2017). Em indivíduos saudáveis, estudos relatam que cerca de 10% dos casos de onicomicose são devidos a espécies de *Fusarium* (Ray et al., 2016; Van Diepeningen & Hoog, 2016). A infecção geralmente envolve as unhas dos pés, especialmente aquelas acometidas por alguma lesão traumática e distrófica, ou unhas primeiramente infectadas por outros patógenos, como dermatófitos (Rosa et al., 2017). Em pacientes imunocompetentes, a lesão característica de onicomicose por *Fusarium* spp. apresenta aspecto branco e agride a camada superficial da unha (Ray et al., 2016). No caso de pacientes

imunodeprimidos, além dessas lesões, a unha pode ser um mecanismo inicial para o fungo migrar para outros tecidos e infectar outras regiões do corpo, podendo desenvolver uma infecção disseminada (Veiga et al., 2018).

Fusarioses invasivas e disseminadas são uma grande problemática de saúde a nível mundial, visto que, elas apresentam taxas de mortalidade alarmantes, alcançando 75% desses casos (Stempel et al., 2015; Taj-Aldeen, 2017). Essas infecções estão relacionadas principalmente a indivíduos imunodeprimidos, como HIV-positivos, pacientes oncológicos e transplantados (Dabas et al., 2016). A fusariose invasiva apresenta-se tipicamente com sintomas de febre, infecção no trato respiratório e lesões na pele e nos tecidos moles, como manchas e nódulos. Os sintomas cutâneos dessa infecção também podem ser decorrentes de uma manifestação disseminada (Garnica et al., 2014). Casos de sinusite fúngica por espécies de *Fusarium* que podem evoluir para pneumonia têm sido constantemente relatados em indivíduos imunodeprimidos (Dabas et al., 2016; Sassi et al., 2017; Nucci et al., 2018). Segundo Garnica et al. (2014) e Stempel et al. (2015), *F. solani* tem sido a espécie mais prevalente em casos de infecções invasivas e disseminadas.

Infecções na corrente sanguínea devido a espécies de *Fusarium* têm sido relacionadas como consequência de uma fusariose disseminada ou como causa de uma infecção hospitalar (Gyarmati et al., 2016). Em indivíduos imunocomprometidos, as hemoculturas podem ser positivas para *Fusarium* spp. entre 50 a 70% dos casos (Rosanova et al., 2016). Além de fatores como o imunocomprometimento do paciente, a presença de elevadas taxas de carga microbiana no ar, como conídios, contaminação de fluidos intravenosos, cateteres e água, também são fontes potenciais para essa fungemia (Georgiadou et al., 2014).

Em casos de ceratite fúngica por *Fusarium* spp., as espécies do complexo *F. solani* são as mais prevalentes, seguidas por espécies do complexo *F. oxysporum* (Al-Hatmi, et al., 2016). Em seu estudo, Rosa et al. (2017) demonstram que *F. keratoplasticum* e *F. oxysporum* são as espécies predominantes em casos de oncomicoses causadas por este gênero. Já para Galletti et al. (2015), as principais espécies identificadas foram *F. oxysporum* (37%) e *F. solani* (32%). Tais dados demonstram a variabilidade das espécies dentro de uma mesma manifestação clínica. Embora a maioria das espécies pertencentes ao complexo *F. solani* possa

ser isolada a partir de qualquer manifestação de fusariose, as espécies possuem diferentes preferências pela região do corpo a qual infectam. Dessa forma, *F. falciforme* pode ser a espécie mais prevalente em infecções superficiais, como ceratite e onicomicose, enquanto que *F. keratoplasticum* e *F. petroliphilum* estão mais relacionados ao desenvolvimento de infecções invasivas (Muraosa et al., 2017).

3.6.1. Terapia antifúngica para infecções causadas por *Fusarium* spp.

Espécies de *Fusarium* são conhecidas por apresentarem um perfil de suscetibilidade refratário em relação aos antifúngicos disponíveis comercialmente. Além disso, o complexo de espécies *F. solani* exibe uma menor suscetibilidade *in vitro* quando comparado à suscetibilidade encontrada para espécies do complexo *F. fujikuroi* (Al-Hatmi et al., 2018). Devido a esses fatores, as opções de tratamento clínico para as fusarioses restringem-se, na maioria dos casos, à anfotericina B, à nistatina e aos azóis voriconazol e posaconazol (Ersal et al., 2015). No Brasil, uso de voriconazol é indicado com sucesso em casos de fusariose refratária à anfotericina B. Já as equinocandinas não são indicadas para o tratamento de fusarioses, pois são inativas frente a *Fusarium* spp. (Perlin, 2015).

Em casos de onicomicose devido a *Fusarium* spp., os antifúngicos sistêmicos itraconazol e terbinafina são geralmente indicados (Al-Hatmi et al., 2018). Como terapia tópica, opta-se por utilizar formas farmacêuticas oclusivas, como esmaltes, a fim de alcançar melhores concentrações farmacológicas na região da placa ungueal. Assim, o uso de ciclopirox olamina e amorolfina é indicado (Lurati et al., 2012). Em alguns casos, combinações entre a terapia sistêmica e tópica também são indicadas, como o uso de terbinafina e ciclopirox olamina ou amorolfina (Al-Hatmi et al., 2018). O principal desafio para a eficácia terapêutica das onicomicoses causadas por *Fusarium* spp. é que todas as células fúngicas devem ser eliminadas durante o tratamento, visto que, células fúngicas latentes, conhecidas como conídios, são as principais causas para a falha clínica e recidiva dessa infecção (Seidl et al., 2015). Em casos mais graves, para que ocorra o sucesso da cura clínica, é realizado o desbridamento cirúrgico da placa ungueal infectada (Van Diepeningen et al., 2014).

Atualmente, o tratamento de ceratite causada *Fusarium* spp. é empírico, pois não existe um consenso a partir dos resultados obtidos através de testes de suscetibilidade antifúngica, assim, não há uma orientação na escolha de uma terapia ideal (Qiu et al., 2015). Em muitos países, a natamicina é o fármaco de escolha para o tratamento de casos de ceratite relacionados a fungos filamentosos (Patil et al., 2017). Embora os protocolos de tratamento para essa infecção tenham sido atualizações durante os últimos anos, havendo uma redução no uso de anfotericina B e um aumento do uso de natamicina e voriconazol, ainda existem lacunas, sendo ainda necessário estabelecer um protocolo de tratamento para casos graves de ceratite causada por *Fusarium* spp. (Rosa et al., 2018).

Casos de manifestações respiratórias devido a *Fusarium* spp., como a sinusite fúngica, foram controlados somente após punção cirúrgica da massa nasal e administração de voriconazol sistêmico por longos períodos de tempo. Estudos *in vitro* demonstram que a terapia combinada entre terbinafina e azóis leva a efeitos sinérgicos, indicando uma boa opção para o tratamento dessa manifestação clínica (Stempel et al., 2015). As diretrizes para o tratamento de infecções profundas e disseminadas causadas por *Fusarium* spp. foram recentemente publicadas pelo *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (ESCMID) and *The European Confederation of Medical Mycology* (ECMM) (Tortorano et al., 2014). Após a sua aprovação pelo *Food and Drug Administration* (FDA), o voriconazol tornou-se o tratamento de escolha para a fusariose disseminada devido à sua menor toxicidade e maior eficácia clínica quando comparado à anfotericina B (Al-Hatmi et al., 2018).

Por fim, os estudos atuais ainda mostram-se inconclusivos para estabelecer a melhor terapia antifúngica para o tratamento das fusarioses. Apesar dessa dificuldade, o teste de suscetibilidade antifúngica e a identificação fúngica a nível de espécie ainda são fundamentais para inferir um tratamento clínico adequado e que possa promover a cura da infecção (Batista et al., 2017).

3.7. Terapia antifúngica e mecanismo de ação farmacológica

Os principais antifúngicos atualmente disponíveis para o tratamento das infecções fúngicas atuam em diferentes alvos da célula microbiana, podendo ser classificados através do seu mecanismo de ação farmacológico: desestabilizadores

da membrana celular fúngica – poliênos; inibidores da síntese de ergosterol – azóis, alilaminas e amorolfinas; inibidores da síntese de parede celular – equinocandinas; inibidores da síntese de ácidos nucleicos – análogo de pirimidina; inibidores dos processos de transporte intracelular – ciclopirox olamina; inibidores da síntese de microtúbulos – griseofulvina (Campoy & Adrio, 2017; Jampilek, 2016).

- **Desestabilizadores da membrana celular fúngica**

Na década de 1950 houve o surgimento da primeira classe de antifúngicos no mercado, os poliênos. Fazem parte dessa classe a anfotericina B, a nistatina e a natamicina (Perfect, 2017). Os poliênos tem origem natural, sendo produzidos por cepas de *Streptomyces noursei*. Esses fármacos apresentam uma estrutura de caráter hidrofílico e lipofílico, sendo amplamente utilizados contra infecções causadas por *Candida* spp. (Lyu et al., 2016). Antifúngicos poliênicos agem através de sua ligação ao ergosterol presente na membrana celular fúngica. Como resultado, ocorre a formação de um complexo capaz de aumentar a permeabilidade celular por meio de canais transmembranares, os quais provocam o extravasamento do material intracelular e subsequente morte dos organismos (Gonzales et al., 2017). A anfotericina B possui baixa biodisponibilidade oral e, por isso, sua administração é somente através da via intravenosa. O uso deste antifúngico está comprometido devido aos diversos casos de reações adversas, principalmente relacionados à disfunção renal, hepática e gastrointestinal (Butani et al., 2014). A nistatina por sua vez é administrada somente através da via tópica, na forma de cremes, géis e pomadas, devido a sua alta toxicidade sistêmica e baixa biodisponibilidade (Muzyka & Epifanio, 2013). Assim como a nistatina, a natamicina é utilizada somente como tratamento tópico, pois apresenta uma estrutura molecular longa e baixa biodisponibilidade, considerada o único antifúngico tópico aprovado pelo FDA para ser utilizado em casos de infecções fúngicas oftálmicas (Qiu et al., 2015). Além disso, a natamicina apresenta um espectro de ação especialmente frente a fungos filamentosos, sendo indicada pela clínica médica principalmente em casos de ceratite causada por *Fusarium* spp. (Muller et al., 2013).

- **Inibidores da síntese de ergosterol**

Uma das principais classes antifúngicas utilizadas na terapia clínica frente a infecções fúngicas são os azóis (Benhamou et al., 2017). Esta classe encontra-se dividida entre fármacos imidazólicos e triazólicos, devido a diferenças entre a estrutura química de ambos. Fármacos como o cetoconazol, miconazol e clotrimazol são classificados como imidazólicos, pois apresentam em sua estrutura um anel azólico contendo cinco átomos, dos quais, três são átomos de carbono e dois são átomos de nitrogênio. Já os fármacos denominados triazólicos possuem três átomos de nitrogênio neste anel. Dentro deste grupo estão incluídos os fármacos fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol (Sahu et al., 2013).

Na década de 1970 foram lançados no mercado os primeiros antifúngicos azóis através dos fármacos clotrimazol e miconazol. Esses fármacos surgiram como uma alternativa ao uso tópico do poliêno nistatina (Allen et al., 2015). A introdução dos triazóis ocorreu mais tardiamente, tendo o seu início na década de 1990, através dos fármacos fluconazol e itraconazol, classificados como triazóis de primeira geração (Maertens et al., 2004; Allen et al., 2015). Considerados triazóis de segunda geração, o voriconazol e o posaconazol foram aprovados pelo FDA durante a última década. Esses fármacos estão disponíveis somente na forma intravenosa e possuem espectros de ação semelhantes (Kim et al., 2014). Além disso, o voriconazol e o posaconazol apresentam um maior espectro de ação e eficácia frente a infecções mais graves (Campoy & Adrio, 2017). Mesmo após três décadas de sua introdução no mercado farmacêutico, o fluconazol ainda é considerado o fármaco de primeira escolha para o tratamento de candidíases superficiais e mucosas. Tal fato é devido a sua excelente biodisponibilidade oral e aceitável segurança ao paciente (Nett & Andes, 2016).

O mecanismo de ação dos fármacos azóis ocorre através da inibição da enzima lanosterol 14- α -desmetilase - pertencente ao citocromo P450 - interrompendo a rota de biossíntese do ergosterol, principal constituinte da membrana celular fúngica. Assim, além de haver depleção nos níveis de ergosterol, colesterol essencial para a célula fúngica, também ocorre um acúmulo de metabólitos tóxicos, o que contribui para a inibição do crescimento fúngico (Sagatova et al., 2016). Os azóis, em sua grande maioria, são considerados fungistáticos frente a cepas de *Candida* spp. Porém, os triazóis de segunda geração

atuam de maneira fungicida sobre essas leveduras, promovendo a morte celular e, devido a isso, mais eficazes farmacologicamente (Carmona & Limper, 2017).

A terbinafina pertence à classe das alilaminas e foi introduzida no mercado farmacêutico no final da década de 1990 (Van Duyn Graham & Elewsk, 2011). Seu mecanismo de ação ocorre pela inibição da enzima esqualeno epoxidase, uma das enzimas envolvidas nas etapas iniciais da rota de biossíntese do ergosterol. Devido à interrupção da biossíntese de ergosterol, metabólitos tóxicos acumulam-se no interior da célula fúngica, o que acarreta em um efeito tóxico adicional sobre essas células, exercendo assim, um efeito fungicida (Ghannoum, 2016; Sigurgeirsson, 2016). A terbinafina pode ser utilizada através da via tópica ou oral, apresentando um amplo espectro de ação frente a infecções dermatofíticas, porém, exibe pouca eficácia frente a leveduras, incluindo a maioria das espécies de *Candida* (Tauber & Müller-Goymann, 2014).

A amorolfina é um antifúngico semissintético pertencente à classe das morfolinas e atualmente comercializado na forma de esmalte (Campoy & Adrio, 2017). Semelhantemente aos azóis e à terbinafina, a ação antifúngica da amorolfina ocorre na membrana celular do microrganismo, por meio da inibição de duas enzimas essenciais presentes na rota biossintética do ergosterol. Com isso, a depleção nos níveis de ergosterol acarreta na inibição do crescimento e possível morte celular, devido ao acúmulo de esteróis tóxicos no interior da célula fúngica (Al-Hatmi et al., 2018). A amorolfina é utilizada como tratamento tópico para as onicomicoses e pode apresentar atividade fungistática e fungicida *in vitro* (Sant et al., 2016).

- **Inibidores da síntese de parede celular**

As equinocandinas são a mais recente classe antifúngica lançada comercialmente. Em 2002, a caspofungina foi o primeiro fármaco representante da classe aprovado pelo FDA nos EUA, seguido pela micafungina e anidulafungina (Wiederhold, 2017). Esses fármacos possuem uma estrutura química de natureza lipopeptídica e de alto peso molecular. Com isso, são fracamente absorvidas por via oral, com o seu uso restrito a apresentações intravenosas (Carmona & Limper, 2017). Diferentemente das demais classes antifúngicas, as equinocandinas agem a nível de parede celular fúngica através da inibição da enzima 1,3- β -D-glucana

sintase, levando à interrupção da rota de biossíntese de β -glicanos, principais polissacarídeos constituintes da parede celular leveduriforme. A depleção nos níveis de β -glicanos ocasiona um desequilíbrio osmótico e ruptura celular, levando à morte das células fúngicas (Nett & Andes, 2016). Além disso, as equinocandinas possuem uma vantagem dentre as demais classes antifúngicas, pois desempenham um efeito fungicida sobre a maioria das espécies de *Candida* (Revie et al., 2018).

- **Inibidor da síntese de ácidos nucleicos**

A flucitosina pertence à classe dos análogos de pirimidinas e teve a sua introdução no mercado farmacêutico durante a década de 1970 (Hope et al., 2004). O mecanismo de ação deste fármaco interfere na síntese de ácidos nucleicos e na síntese de proteínas da célula fúngica (Carmona & Limper, 2017). Devido à maioria dos fungos filamentosos não possuírem a enzima timidilato sintase, um dos alvos de ação da flucitosina, o seu espectro de atividade é restrito a leveduras patogênicas, incluindo espécies de *Candida* (Campoy & Adrio, 2017). O uso de flucitosina tem sido limitado devido à rápida seleção de resistência fúngica quando administrado como monoterapia. Assim, a combinação com outros antifúngicos, como a anfotericina B e os azóis tem sido recomendada (Chandra & Ghannoum, 2017).

- **Inibidores dos processos de transporte intracelular**

O ciclopirox olamina é um derivado sintético de hidroxipiridona lançado comercialmente durante a década de 1990 na forma farmacêutica de esmalte (Shen & Huang, 2016). Embora essa apresentação farmacêutica seja a mais indicada, atualmente existem diversas apresentações deste fármaco, como creme, suspensão e solução (Tabara et al., 2015). Como um de seus mecanismos de ação antifúngica, o ciclopirox olamina age como quelante de cátions trivalentes, como Fe^{3+} e Al^{3+} , acarretando na inibição de enzimas metais-dependentes, particularmente citocromos, catalases e peroxidases. Tal fato leva à redução do transporte de íons através das membranas fúngicas e, com isso, ocorre uma redução da síntese de proteínas e da absorção de nutrientes vitais para a célula fúngica, promovendo a sua morte (Subissi et al., 2010). O ciclopirox olamina também é capaz de alterar a permeabilidade de aminoácidos que compõem a célula fúngica, ocasionando a perda de íons Na^+ e desestabilização celular (Gupta et al., 2013). Este antifúngico

apresenta um amplo espectro de ação frente a dermatófitos, *Candida* spp. e *Fusarium* spp., sendo amplamente indicado para o tratamento de infecções relacionadas a esses gêneros, podendo exercendo uma ação fungicida ou fungistática (Feldstein et al., 2015).

• Inibidores da biossíntese de microtúbulos

A griseofulvina é um metabólito natural isolado em 1939 a partir do fungo *Penicillium griseofulvum* (Petersen et al., 2016). O mecanismo de ação desse agente ocorre através de ligações com a tubulina, promovendo alterações na estrutura dos microtúbulos presentes na célula fúngica. Os microtúbulos são polímeros constituídos por α e β -tubulina, responsáveis por formar um esqueleto celular altamente organizado em organismos eucariontes. Assim, a inibição desses componentes acarreta na inibição da mitose, uma vez que os microtúbulos são essenciais para a formação do fuso mitótico, interrompendo a divisão celular (Campoy & Adrio, 2017). A griseofulvina atua no núcleo da célula fúngica de maneira fungistática, apresentando um amplo espectro de ação frente a dermatófitos e pouca efetividade frente a leveduras e outros fungos filamentosos. Com isso, ela é utilizada basicamente no tratamento de infecções dermatofíticas (Sigurgeirsson, 2016). A Figura 4 ilustra o mecanismo de ação farmacológico das principais classes de antifúngicos.

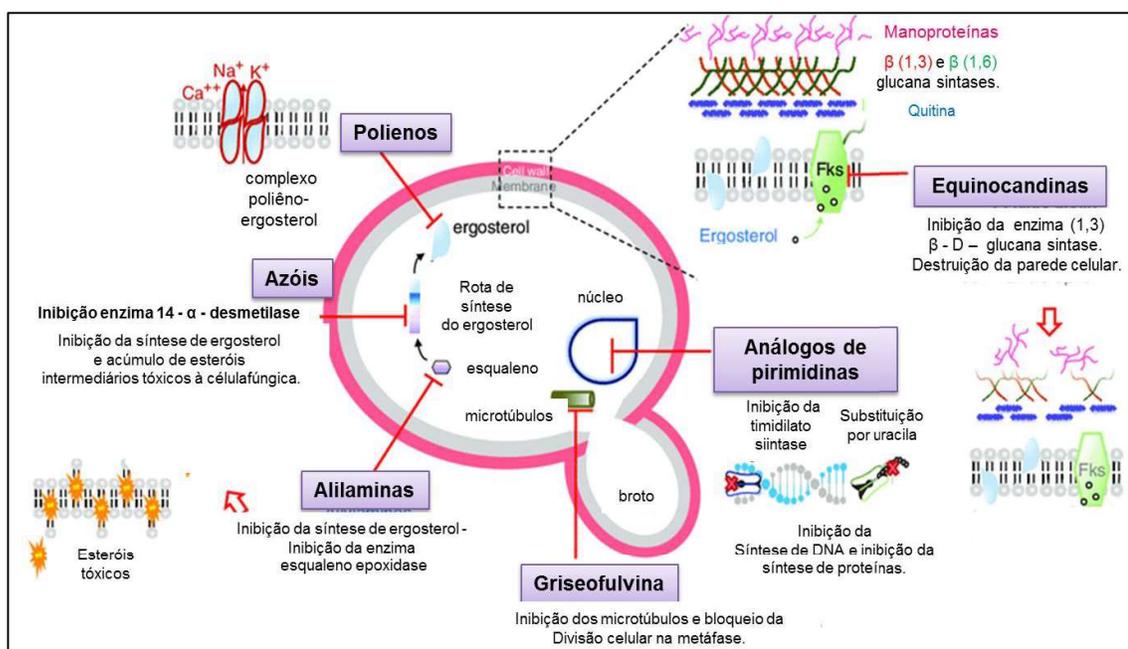


Figura 4. Desenho esquemático representando o mecanismo de ação farmacológico das principais classes de antifúngicos. Adaptado de Martinez & Falson (2014).

3.8. Principais problemáticas relacionadas à terapia clínica para infecções fúngicas

Como podemos observar, as infecções fúngicas apresentam um alto impacto na saúde humana e, ainda assim, não são devidamente apreciadas. Como abordado neste estudo, o arsenal terapêutico disponível para o tratamento dessas infecções apresenta algumas limitações. Como exemplos dessas adversidades, pode-se destacar a seleção de isolados resistente a esses fármacos e a presença de toxicidade ao paciente (Denning & Bromley, 2015; Pianalto & Alspaugh, 2016). A detecção de isolados fúngicos resistentes é possível através da realização de testes de suscetibilidade antifúngica (*in vitro*), padronizados pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) e EUCAST (*The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) e atualmente aceitos como métodos de referência para tal avaliação (Morace et al., 2014).

Atualmente, a seleção de isolados fúngicos resistentes limita severamente a terapêutica clínica, pois poucas opções de tratamento tornam-se eficazes frente a esses patógenos. Além disso, a utilização de antifúngicos relacionados à clínica médica na agricultura resulta em reservatórios ambientais de microrganismos resistentes a esses fármacos, contribuindo para a seleção de resistência fúngica (Perlin et al., 2017). Casos de resistência são observados através do aumento da concentração inibitória mínima de determinado antifúngico quando em contato com um determinado isolado fúngico. Essa problemática pode acarretar em falhas na cura clínica e recidiva de infecções, podendo levar ao óbito. A resistência fúngica pode ser classificada em intrínseca – quando a espécie fúngica possui mecanismos de resistência a determinado antifúngico antes mesmo de ser exposta a ele; ou adquirida – quando a resistência fúngica ocorre devido à exposição gradativa a um determinado antifúngico (Revie et al., 2018).

A resistência adquirida tem sido um desafio para a clínica médica, pois não pode ser prevista somente a partir da identificação da espécie fúngica, como ocorre em casos de resistência intrínseca, tornando mais difícil a escolha de um tratamento eficaz (Arendrup, 2014). Diversos mecanismos moleculares podem ser

expressos no interior da célula fúngica para que um isolado torne-se resistente a um antifúngico. Destes, os mecanismos adaptativos de resistência fúngica podem incluir: diminuição na absorção do fármaco; alterações estruturais promovendo instabilidades na ligação sítio-alvo, superexpressão de transportadores de múltiplos fármacos e ativação de respostas de estresse, gerando espécies reativas de oxigênio (Sanglard, 2016; Scorzoni et al., 2017). Aliados a esses mecanismos, outros fatores como a formação de biofilmes fúngicos que ocasionam em uma menor suscetibilidade frente aos antifúngicos e alterações na permeabilidade celular também estão relacionados à resistência intrínseca (Ghamnoum, 2016).

Isolados de *Candida* spp. apresentam altos índices de resistência ao fluconazol e demais azóis. Casos de resistência em espécies de CNA têm se mostrado crescentes em diferentes instituições e regiões geográficas (Yapar, 2014; Wiederhold, 2017). Embora menos comum, quando comparada aos azóis, a seleção de isolados de *Candida* resistentes às equinocandinas tem sido relatada, geralmente devido à exposição prolongada a essa classe (Jensen et al., 2015; Perlin et al., 2015; Wiederhold, 2016). Por outro lado, casos de resistência em *Candida* spp. frente ao poliêno anfotericina B são mais raros (Nett & Andes, 2016).

Dentre os principais relatos de resistência fúngica em isolados dermatofíticos, os principais são decorrentes do uso de azóis, tanto através da via tópica quanto sistêmica, e de alilaminas. Os antifúngicos azólicos potencializam a seleção de resistência em dermatófitos. Tal fato possivelmente é devido à ação fungistática desses fármacos frente a esses organismos, inibindo apenas o seu crescimento e possibilitando a ocorrência de mutações em enzimas relacionadas à biossíntese do ergosterol (Ghamnoum, 2016). Dessa forma, o número de isolados dermatofíticos resistentes ao fluconazol é alto, problemática que também está associada à fácil aquisição e ao uso indiscriminado desse antifúngico pela população (Khatri et al., 2017). No caso das alilaminas, como a terbinafina, o longo tempo de exposição a esse antifúngico é uma das razões para a seleção de isolados dermatofíticos resistentes à mesma (Yamada et al., 2017; Kano et al., 2018).

Espécies de *Fusarium* estão entre os patógenos fúngicos que apresentam um grande número de casos de resistência, visto que, as fusarioses geralmente são refratárias ao tratamento antifúngico disponível, principalmente em casos de infecção relacionada a pacientes imunodeprimidos (Stempel et al., 2015; Taj-Adeen,

2017). A resistência em espécies de *Fusarium* apresenta alta variabilidade entre as espécies, sendo que *F. solani* e *F. verticillioides* apresentam resistência majoritária frente aos azóis e aos poliênicos e, por outro lado, *F. oxysporum* apresenta maior suscetibilidade aos azóis (Dabas et al., 2016; Taj-Adden et al., 2016).

Nos últimos anos, novos perfis de resistência fúngica têm sido relatados, como a seleção de resistência simultânea a no mínimo duas classes diferentes de antifúngicos, um fenômeno conhecido como multirresistência ou resistência a múltiplos fármacos (Sanglard, 2016; Campoy & Adrio, 2017). A multirresistência tem sido observada em diversos gêneros fúngicos, incluindo *Candida*, *Aspergillus*, *Microsporum*, *Trichophyton*, *Fusarium* (Martins et al., 2016; Arendrup & Patterson, 2017; Tupaki-Sreepurna et al., 2017). O tratamento de infecções que possuem perfis de isolados multirresistentes é extremamente difícil e limitado. Diretrizes de protocolos especializados baseiam-se em relatos de evidências clínicas para orientar suas recomendações, porém, poucos dados estão disponíveis para que um tratamento eficaz possa ser inferido ao paciente (Pappas et al., 2016).

A seleção de isolados resistentes às classes antifúngicas mais comumente utilizadas tem contribuído para o aumento exacerbado da incidência de infecções fúngicas nas últimas décadas, tornando-as uma ameaça crescente à saúde pública. Essa problemática tem sido agravada principalmente devido ao aumento do número de pacientes imunodeprimidos, os quais estão mais propensos ao desenvolvimento dessas infecções (Vallabhaneni et al., 2016; Fuentesfria et al., 2018). Além disso, outros fatores estão envolvidos com a expansão da resistência em fungos patogênicos, podendo citar o uso profilático de antifúngicos em processos pré-cirúrgicos ou após a realização de um transplante de órgãos, além da terapia empírica inadequada praticada pela população (Ghannoum et al., 2016; Perlin et al., 2017). Com base nessas informações, podemos notar que o cenário atual relacionado às infecções fúngicas é preocupante, uma vez que estudos de fase pré-clínica e fase clínica envolvendo a aprovação de novos antifúngicos, que possam sobrepor os casos de resistência fúngica à terapia atual são escassos (McCarthy et al., 2017).

Outra condição agravante associada ao uso de antifúngicos é a presença de altas taxas de toxicidade ao paciente, tanto a nível tópico quanto a nível sistêmico (Liu & Warshaw, 2014; Tverdek et al., 2016; Shibata et al., 2017). Dentre os

antifúngicos que apresentam relatos de toxicidade em humanos, a anfotericina B é responsável por casos graves relacionados à toxicidade renal e hepatotoxicidade, tendo o seu uso amplamente restrito. Com isso, nanoformulações contendo anfotericina B foram desenvolvidas a fim de reduzir a incidência de toxicidade ao paciente (Nett & Andes, 2016). Os azóis podem causar diversos tipos de toxicidade tanto em humanos quanto em animais de laboratório, podendo citar, por exemplo, danos hepáticos, renais, gastrointestinais, cardíacos, teratogênicos, alergias e irritação na pele (Giavini & Menegola, 2010; Glynn et al., 2015). O uso de griseofulvina está relacionado a diversos efeitos colaterais, como a ocorrência de danos hepáticos, colestase, confusão mental e tonturas (Liu et al., 2015). As equinocandinas apresentam relatos de toxicidade menos frequentes quando comparadas às demais classes antifúngicas, mas são capazes de causar perturbações gastrointestinais, cefaleia e aumento dos marcadores de lesões nas células hepáticas do paciente (Tverdeek et al., 2016). Além disso, o ciclopirox olamina tem demonstrado relatos de ardência, irritação e eritema local, desordem ungueal, erupção cutânea, alopecia e dermatite de contato (Wier et al., 2011).

Com base no contexto apresentado é evidente a necessidade de novas abordagens capazes de sobrepor à resistência fúngica e os inúmeros relatos de toxicidade ao paciente decorrentes do uso dos antifúngicos tradicionais, a fim de proporcionar um tratamento seguro ao paciente. A reversão da resistência é a chave para reduzir a incidência de infecções fúngicas, e, com isso, as taxas de mortalidade devido a essas infecções.

3.9. Estratégias para sobrepor o atual panorama relacionado à terapia antifúngica

Para que haja o controle da disseminação de fungos resistentes e redução da incidência de infecções fúngicas, novos investimentos abrangendo um contexto geral devem ser tomados. Assim, algumas estratégias como: o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos, novas opções de terapia clínica, esforços de organizações de saúde pública, vigilância social e intervenção de autoridades governamentais, podem ser adotadas (McCarthy, 2017; Zhan & Liu, 2017).

Especialistas concordam que patógenos fúngicos são uma séria ameaça à saúde humana. Porém, a falta de financiamento para monitorar a incidência de infecções e a resistência fúngica muitas vezes depende de órgãos sem fins lucrativos, como o Fundo de Ação Global para Infecções Fúngicas (GAFFI), visto que os recursos destinados ao monitoramento dessas infecções são limitados (Tudela & Denning, 2017). Além disso, as infecções fúngicas são negligenciadas tanto pela sociedade quanto pelos órgãos governamentais. Isso se torna evidente ao compararmos os avanços realizados para o desenvolvimento de novos agentes antibacterianos com os estudos relacionados à descoberta de novos antifúngicos eficazes e seguros ao paciente, os quais encontram-se em desvantagem (McCarthy, 2017; Wiederhold et al., 2017). Com o intuito de reverter essa problemática, diversos grupos de pesquisa têm utilizado bibliotecas de compostos sintéticos a fim de rastrear a possível atividade antifúngica dos mesmos (LaFleur et al., 2011; Rabjohns et al., 2014; Fuentefria et al., 2018; Teng et al., 2018). Além de incluir compostos com alvos moleculares de ação nas mesmas estruturas biológicas e vias metabólicas que os antifúngicos atuais, mas que apresentem características farmacológicas superiores, a triagem destas novas entidades químicas possibilita o desenvolvimento de compostos que atuem em alvos diferentes daqueles já existentes, possibilitando a descoberta de novos mecanismos de ação antifúngica (Pianalto & Alspaugh, 2016; Nicola et al., 2019).

Além de eficácia, para que uma nova entidade química torne-se um possível novo antifúngico, essa deve apresentar idealmente algumas características, tais como: a) espectro de ação estendido contra fungos patogênicos e resistentes; b) ação farmacológica seletiva ao patógeno; c) ausência ou baixa toxicidade às células do hospedeiro; d) poucas ou nenhuma interação farmacológica com outros fármacos; e) melhora da farmacocinética e farmacodinâmica, visto que a frequência da administração do fármaco pode causar impacto na profilaxia; f) apresentar preferencialmente ação fungicida, para que a duração do tratamento seja reduzida, ao contrário da terapia atual, a qual dispense de um longo período de duração (Perfect, 2016; Campoy & Adrio 2017; Fuentefria et al., 2018).

O descobrimento de um novo candidato a antifúngico que apresente todas as qualidades citadas acima é extremamente difícil e dispendioso, visto que, poucos compostos são aprovados para a fase de ensaios clínicos, pois violam

alguma das características necessárias para prosseguir com o seu estudo. Além disso, as pesquisas realizadas nessa área necessitam de fontes financiadoras que desejam investir em longo prazo, pois o desenvolvimento de um novo medicamento, desde a sua triagem inicial até a sua aprovação e uso clínico, pode demorar uma década. Porém, se o mecanismo de ação de uma nova entidade química que possui potencial antifúngico for elucidado rapidamente, isso pode reduzir o tempo de aprovação deste candidato (Sheng & Zhang, 2011; Scorzoni et al., 2017).

Assim como os seres humanos, fungos são organismos eucariotos. Tal característica dificulta o desenvolvimento de antifúngicos seguros ao hospedeiro, visto que existem poucas diferenças entre a maquinaria celular fúngica e humana (Nicola et al., 2019). Dessa forma, um dos principais obstáculos na descoberta de novos antifúngicos é a identificação de alvos de ação que estejam presentes especificamente na célula fúngica para que não resulte em efeitos tóxicos ao paciente (Perfect, 2017; Revie et al., 2018).

3.10. Escolha de novas entidades químicas com potencial antifúngico

A escolha por uma classe de compostos químicos para dar início a ensaios de triagem de ação antifúngica pode ser realizada com base em relatos na literatura para a atividade biológica da classe. Nesse caso, grande parte das pesquisas envolvendo o desenvolvimento de um possível fármaco utiliza como triagem bibliotecas de compostos que possam apresentar uma estrutura molecular única, conhecida como estrutura privilegiada - *privileged scaffold*, a qual possa fornecer compostos com atividades farmacológicas específicas (Sheng & Zhang, 2011; Musiol, 2017). Estruturas privilegiadas geralmente são constituídas por derivados heterocíclicos que servem de modelo para o *design* de novas entidades desenvolvidas através da química medicinal, com o intuito de descobrir estruturas moleculares eficazes biologicamente (Welsch et al., 2010; Schneider & Schneider, 2017).

Como descrito, o descobrimento de novas entidades químicas bioativas necessita de um longo período de tempo e investimento financeiro. Nesse sentido, a otimização desses fatores através da correlação de propriedades físico-químicas e a probabilidade de absorção por via oral de novos compostos surge como uma

atraente possibilidade. Dessa forma, podem-se aplicar os índices de semelhança de fármacos, como descrito pela Regra dos 5 de Lipinski (Lipinski, 2004). Segundo Lipinski, para que um composto seja definido como um bom candidato a fármaco, ele deve apresentar: a) valores de $\text{LogP} \leq 5$; b) massa molecular ≤ 500 g/mol; c) aceptores de ligação de hidrogênio menores ou iguais a 10; d) doadores de ligação de hidrogênio menores ou iguais a 5.

Dentre as principais características físico-químicas relacionadas a um composto, a sua lipofilicidade atua como um dos fatores cruciais para estimar provável atividade biológica. Assim, para que um composto seja ativo biologicamente, tal ação poderá depender da lipofilicidade do mesmo (Vastag et al., 2018). A lipofilicidade é definida através do coeficiente de partição do composto, LogP - logaritmo da razão das concentrações de soluto no sistema 1-octanol-água. Quanto maior o valor de LogP , maior o caráter lipofílico de um composto (Lavorato et al., 2017). A estrutura química da maioria dos fármacos existentes difere da estrutura dos componentes naturais de uma célula. Com isso, esses fármacos são incapazes de ser transportados através da membrana celular por processos ativos, sendo transportados por meio de processos passivos, os quais dependerão de sua lipossolubilidade (Liu et al., 2011).

A partir do contexto apresentado, é notória a importância do conhecimento prévio a respeito de determinada classe de compostos para inicializar os estudos relacionados ao rastreamento da ação microbiológica dos mesmos. Conhecer as características físico-químicas de um composto e aplicá-las através de princípios já estabelecidos na literatura é fundamental para alcançar o sucesso na prospecção de uma nova entidade química com potencial antifúngico. Dessa forma, o presente estudo buscou avaliar o potencial antifúngico e aprimorar o conhecimento biológico sobre novas entidades químicas pertencentes às classes das cloroacetamidas e quinolinas para a prospecção de um possível candidato a antifúngico.

3.10.1. Derivados de cloroacetamidas

Dentre os numerosos derivados de amidas estruturalmente diferentes, as acetamidas apresentam o mais diverso potencial farmacológico, pois as suas características possibilitam a aplicação desta classe em diferentes áreas

farmacológicas (Vastag et al., 2018). Estudos recentes demonstram que derivados de acetamidas possuem ação antifúngica (Bardiot et al., 2015), antibacteriana (Addla et al., 2014), inseticida (Wan et al., 2011) e anticonvulsivante (Ali et al., 2015). Esses estudos são de grande importância, uma vez que, as acetamidas possuem as mais variadas ações biológicas, despertando o interesse científico nesta classe.

As cloroacetamidas e seus derivados estão entre os herbicidas mais utilizados no mundo (Boger 2003; Katke et al., 2011; Karier et al., 2017). Esses herbicidas têm como função combater o crescimento de gramíneas e outras plantas invasoras principalmente nas culturas de milho, soja e algodão (Souissi et al., 2013). As cloroacetamidas também são utilizadas como intermediários para a síntese de novas substâncias bioativas (Siddiqui et al., 2010; Amrutkar et al., 2012; Jain et al., 2013). Além disso, estudos demonstram que esses compostos e seus derivados apresentam ação biológica comprovada, como, por exemplo, ação antileishmania (Lavorato et al., 2017), ação antibacteriana (Marco-Contelles & Gomez-Sanchez, 2005; Katke et al., 2011; Aschale, 2012) e ação antifúngica (Katke et al., 2011; Aschale, 2012).

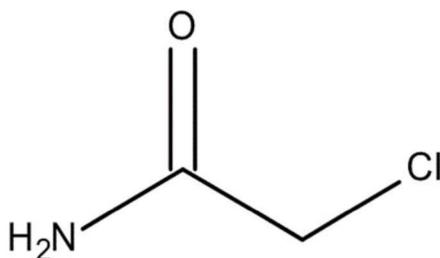


Figura 5. Estrutura química da cloroacetamida (Machado, 2019)

A ação herbicida das cloroacetamidas ocorre na membrana plasmática dos vegetais através da inibição de enzimas responsáveis pela biossíntese de ácidos graxos de cadeia muito longa. Essa inibição representa a primeira consequência fisiológica da ação desses agentes, seguida de uma cascata de efeitos secundários que levam à morte das plantas (Eckermann et al., 2003). Por outro lado, não existem relatos sobre o provável mecanismo de ação antifúngica de derivados de cloroacetamidas. Os dados reportados por Katke et al. (2011) e Aschale (2012), trazem informações apenas sobre o perfil de suscetibilidade de uma cepa de *Candida* spp. *A. niger* e *F. oxysporum* frente a derivados de

cloroacetamidas, além de utilizarem metodologias simplificadas para tal avaliação, como o método de disco difusão em ágar. Além disso, não existem estudos avaliando a possível ação antifúngica de derivados de cloroacetamidas frente a cepas dermatofíticas.

A escassez relacionada à falta de estudos aprofundados envolvendo o potencial e o mecanismo de ação antifúngica de derivados de cloroacetamidas demonstra a necessidade de promover pesquisas direcionadas a esses compostos, a fim de elucidar seu provável modo de ação e ampliar os conhecimentos biológicos sobre os mesmos.

3.10.2. Derivados quinolínicos

As quinolinas são uma classe de compostos amplamente presentes na natureza atuando como subunidades estruturais de produtos naturais complexos e produtos sintéticos (Chung et al., 2015). Compostos que possuem uma estrutura quinolínica representam grupos farmacofóricos que desempenham um papel fundamental na química medicinal para o desenvolvimento de novos fármacos (El-Gamal et al., 2015; Chu et al., 2019). Os derivados quinolínicos são compostos heterocíclicos nitrogenados e que contêm dois anéis aromáticos, sendo um destes, um anel de benzeno fundido com uma piridina em dois átomos de carbono adjacentes (Keri & Patil, 2014).

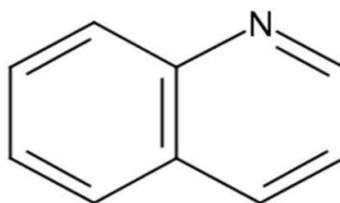


Figura 6. Estrutura química do núcleo quinolínico (Machado, 2019)

A versatilidade sintética apresentada pelo núcleo estrutural quinolínico facilita o desenvolvimento de vários derivados estruturalmente diferentes, proporcionando um amplo espectro de ação biológica (Solomon & Lee, 2011; Keri & Patil, 2014; El-Gamal et al., 2015; Musiol, 2017).

Atualmente, existem fármacos comercialmente disponíveis que possuem em sua estrutura o núcleo central quinolínico, como, por exemplo, a nitroxolina – apresenta ação antibacteriana; a cloroquina – possui ação antimalárica; e a bedaquilina, a qual apresenta ação frente a cepas multirresistente em casos de tuberculose (Pinheiro et al., 2010; Chung et al., 2015; Parhizgar & Tahghighi, 2017). A maioria dos fármacos conhecidos que apresenta estrutura quinolínica possui uma cadeia lateral ligada à posição C-4 ou C-8 do núcleo quinolínico. Porém, a alteração de uma cadeia lateral funcionalizada ao redor desse núcleo central para outras posições, pode originar novas oportunidades de descobertas de compostos bioativos (El-Shehry et al., 2018).

Uma variedade estudos tem sido conduzida relatando diversas propriedades farmacológicas de derivados quinolínicos, podendo citar, ação anticancerígena (Afzal et al, 2015), antimalárica (Singh et al., 2011), anti-inflamatória (Wen et al., 2015), antituberculostática (Casal & Asís, 2017), antitoxoplasma (Kadri et al., 2014), antibacteriana (Desai et al., 2014; Teng et al., 2018) e antifúngica (Kumar et al., 2011; Liberato et al., 2017; El-Shehry et al, 2018). Nesses estudos, derivados quinolínicos demonstraram ação antifúngica frente a cepas de *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp e *Penicillium* spp. Porém, estudos avaliando o perfil de suscetibilidade de derivados quinolínicos frente a cepas dermatofíticas são raros.

Além do elevado espectro de ação biológica, diversos estudos têm relatado que derivados quinolínicos apresentam baixo ou ausente potencial em provocar toxicidade. Segundo Yang et al. (2010), Kouznetsov et al. (2012) e Supong et al. (2016), esses compostos apresentam baixa citotoxicidade sobre células epiteliais de linhagem renal de macacos – conhecidas como células Vero. Além disso, de acordo com Suzuki et al. (2007) e Uno et al. (2015), derivados contendo núcleo quinolínico não foram capazes de induzir potencial genotóxico sobre as células da medula óssea, do trato gastrointestinal e do epitélio pulmonar de roedores. A partir desses resultados é evidente que os derivados quinolínicos indicam um bom perfil de segurança para dar prosseguimento o desenvolvimento de novos compostos com potencial antifúngico.

A presença do núcleo quinolínico na estrutura de um composto ou fármaco pode resultar em diferentes mecanismos de ação farmacológica. A ação da

cloroquina resulta em danos às membranas dos protozoários do gênero *Plasmodium* - parasita causador da Malária - devido a mecanismos de peroxidação lipídica (Thomé et al., 2013). Por sua vez, a bedaquilina inibe uma enzima chave responsável pelo processo de fosforilação oxidativa e produção de ATP, promovendo depleção dos níveis de energia e morte celular bacteriana (Cholo et al., 2017). Segundo Coimbra et al. (2016), derivados quinolínicos com ação anti-leishmania produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) que causam estresse oxidativo mitocondrial e morte parasitária. Embora o mecanismo de ação desses fármacos e compostos contendo o núcleo quinolínico esteja basicamente elucidado frente a esses microrganismos, o mesmo não é observado frente a fungos, uma vez que, estudos de mecanismos de ação antifúngica envolvendo derivados quinolínicos são escassos. Além disso, o mecanismo exato pelo qual os derivados quinolínicos exercem a sua atividade biológica, ainda não está elucidado (Chung et al., 2015). Dessa forma, mais estudos são necessários para investigar o possível modo de ação antifúngica destes derivados.

A efetividade biológica e baixa toxicidade comprovada aliada a capacidade de vir a se tornar um novo fármaco, aumenta o interesse científico em pesquisas relacionadas a compostos quinolínicos, sustentando o *status* do anel quinolínico como uma estrutura privilegiada para *design* de novas entidades químicas com potencial antifúngico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Locais de realização da pesquisa

Os ensaios experimentais descritos neste estudo foram realizados na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) e no Instituto Federal Catarinense (IFC-Campus Concórdia). A execução dos experimentos microbiológicos e relacionados à tecnologia farmacêutica foi conduzida no Laboratório de Micologia Aplicada e no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e Cosmética Aplicada, respectivamente, ambos pertencentes à Faculdade de Farmácia da UFRGS. A avaliação de parâmetros toxicológicos foi realizada em parceria com laboratórios da UNIPAMPA e IFC.

4.2. Seleção dos microrganismos de interesse

Para esse estudo foram selecionados 51 microrganismos: *C. albicans* (ATCC 18804, CA 01, CA 05 e CA17), *C. glabrata* (CG 09, CG RL24m, CG RL34 e CG RL49), *C. krusei* (CK 02, CK RL52, CK 03 e CK Den43), *C. parapsilosis* (CP RL13m, CP RL38 e CP RL52) e *C. tropicalis* (ATCC 750, CT 72A, CT 94P, CT 07 e CT 72P); *M. canis* (MCA 01, MCA 29, MCA 33 e MCA 40), *M. gypseum* (MGY 42, MGY 50 e MGY 58); *F. falciforme* (F 9, F 20 e HCF 19), *F. keratoplasticum* (F 21, HCF 17 e HCF 26), *F. oxysporum* (F 24, F 35, HCF 22 e HCF 46), *F. proliferatum* (F2) e *F. solani* (ATCC 36031, F 28, F 33, F 34 e HCF 41); *T. mentagrophytes* (TME 16, TME 32, TME 40 e TME 60) e *T. rubrum* (ATCC 18288, TRU 45, TRU 47 e TRU 51). As cepas CA 01, CG RL24m, CP RL13m, CT 72A, MGY 58, TME 16 e TRU 45 são resistentes a pelo menos uma classe de antifúngicos. Todas as cepas de *Fusarium* spp. são consideradas multirresistentes, pois apresentam resistência a mais de uma classe de antifúngicos. As cepas de *Candida* spp. e dermatófitos foram analisadas fenotipicamente através do Sistema Vitek Yeast Biochemical Card (BioMerieux Vitek - Hazelwood, Missouri, EUA) ou foram confirmados por meio de sequenciamento das regiões ITS e D1/D2 do gene 26S ribossomal. As cepas de *Fusarium* spp. foram inicialmente identificadas por meio de análise de sequências de DNA e comparadas através da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) em banco de dados *Multilocus sequence typing* (MLST). Todas as cepas são provenientes da micoteca do Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada (GPMA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4.3. Obtenção dos compostos derivados de cloroacetamidas e quinolinas

Neste estudo foram avaliados 11 compostos derivados de cloroacetamidas: (1) *N*-fenil-2-cloroacetamida (PM: 169,61 g/mol); (2) *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida (PM: 248,5 g/mol); (3) *N*-(4-nitrofenil)-2-cloroacetamida (PM: 214,61 g/mol); (4) 4-(2-cloroacetilamino) benzoato de etilo (PM: 241,67 g/mol); (5) *N*-(4-clorofenil)-2-cloroacetamida (PM: 204,05 g/mol); (6) *N*-(4-metilfenil)-2-cloroacetamida (PM: 183,6 g/mol); (7) *N*-(4-metoxifenil)-2-cloroacetamida (PM: 199,63 g/mol); (8) 3-(2-cloroacetilamino) benzoato de etilo (PM: 241,67 g/mol); (9) *N*-(4-acetilfenil)-2-cloroacetamida (PM: 211,64 g/mol); (10) *N*-(4-aminossulfonilfenil)-2-

cloroacetamida (PM: 248,69 g/mol); **(11)** ácido 4-(2-cloroacetilamino) benzoico (PM: 213,62 g/mol). Os compostos foram sintetizados de acordo com Lavorato et al. (2017), com rendimentos variando entre 54 a 96%. Os compostos foram totalmente caracterizados pelos seus pontos de fusão e através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H , ^1R e ^{13}C . Todos os compostos demonstraram pontos de fusão consistentes com relatórios anteriores (Harte e Gunnlaugsson, 2006; Singh et al., 2011).

Para os derivados quinolínicos, seis compostos foram avaliados neste estudo: **(1)** 4-metil-6-bromo-quinolina (PM: 222,08 g/mol), **(2)** 2-metil-quinolina (PM: 143,19 g/mol), **(3)** 2-metil-4-etilquinolina (PM: 171,24 g/mol), **(4)** 2-metil-4-(2-feniletil)quinolina (PM: 247,33 g/mol), **(5)** 2-metil-4-fenil-quinolina (PM: 219,28 g/mol) e **(6)** 2,4-difenilquinolina (PM: 281,35 g/mol). Os compostos foram sintetizados a partir da metodologia desenvolvida por Diedrich (2018), com rendimentos variando entre 14 a 77%. Todos os compostos foram identificados através de espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C .

4.4. Preparação dos compostos e antifúngicos

Neste estudo, soluções-estoque de fluconazol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), cetoconazol (KCT - Cristália, São Paulo, Brasil), anidulafungina (AND - Pfizer, Nova York, Nova York, EUA), anfotericina B (AMB - Cristália, São Paulo, Brasil) e ciplopirox olamina (CPX- Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) foram preparadas de acordo com o padronizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). Essas soluções foram posteriormente diluídas em meio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, Nova York, EUA) com tampão MOPS (pH 7,0) no momento da realização de cada experimento, obtendo-se a concentração requerida. As soluções contendo os compostos derivados de cloroacetamidas e derivados quinolínicos foram preparadas no momento da realização de cada metodologia, a fim de preservar as características físico-químicas dos mesmos. Assim, os compostos foram primeiramente dissolvidos em solvente DMSO a 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e o restante do volume foi completado com meio RPMI 1640 em tampão MOPS pH 7,0 para obter as concentrações necessárias para cada ensaio.

4.5. Preparação de partículas anfissomas

4.5.1. Materiais utilizados

Para a preparação dos anfissomas avaliados neste estudo foram utilizados: Eudragit® RS 100 (EUD RS 100) (Evonik®, Alemanha), monooleína (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), acetona (Êxodo Científica®, Brasil), polissorbato 80 (Alpha Química, Brasil) e metanol (Synth® Brasil).

4.5.2. Preparação de partículas anfissomas

Um sistema nanoestruturado denominado anfissoma foi desenvolvido para avaliação da suscetibilidade do composto *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida frente a dermatófitos quando incorporado a este sistema. A metodologia foi realizada através do método de microdiluição em caldo, seguindo o proposto pelo documento M38-A2 (CLSI, 2008). Os anfissomas foram preparados de acordo com Guerreiro et al. – dados depositados na patente BR 10 2018 0676903 no ano de 2018. Para obtenção do sistema uma fase orgânica (FO) constituída por Eudragit® RS 100 (100 mg), monooleína (250 mg) e acetona (27 mL), juntamente com uma fase aquosa (FA), constituída por polissorbato 80 (77 mg) e água ultrapurificada (53 mL), foram previamente preparadas. Os componentes da FO foram dissolvidos sob agitação magnética em banho de água à temperatura de 40°C. Após a solubilização dos componentes, o composto (10 mg) foi adicionado e mantido sob as mesmas condições até sua completa solubilização. Logo, esta FO foi vertida sobre a FA. Em paralelo, um anfissoma branco sem a presença do composto foi preparado seguindo as mesmas condições descritas. Após 10 min, as nanoformulações foram evaporadas sob pressão reduzida em evaporador rotativo R-100 (Büchi, Suíça) a fim de remover o solvente residual, obtendo-se um volume final de 10 mL. Quando necessário, o volume foi ajustado com água ultrapurificada em balão volumétrico.

4.5.3. Análise macroscópica

Os anfissomas desenvolvidos foram avaliados macroscopicamente através da coloração, homogeneidade e ausência de material particulado.

4.5.4. Determinação do pH

O pH dos anfissomas foi determinado utilizando o medidor de pH Digimed DM-22 através da técnica de potenciometria. O medidor foi calibrado com duas soluções padrão (pH 4,0 e 7,0), sob uma temperatura de 25°C.

4.5.5. Distribuição de tamanho e tamanho de partícula

A distribuição do tamanho de partícula dos anfissomas foi determinada pela técnica de Difração a Laser (Malvern® 2000 Mastersizer, Malvern Instruments, UK). Para essa análise, as nanoformulações foram adicionadas diretamente ao aparelho contendo água destilada. Os resultados de tamanho são demonstrados por $D[4,3]$, considerando o volume das partículas e o diâmetro médio expresso em volume da esfera correspondente (Equação 1). A distribuição de tamanho foi expressa pelo valor de Span (Equação 2), onde $D_{0,1}$, $D_{0,5}$ e $D_{0,9}$ são os diâmetros de 10, 50 e 90% da curva de distribuição, respectivamente. Ambos foram calculados por número (n) e volume (v) de partículas.

$$D[4,3] = \frac{\sum d^4}{\sum d^3} \quad (1)$$

$$Span = \frac{D_{0,9} - D_{0,1}}{D_{0,5}} \quad (2)$$

A avaliação do tamanho das partículas foi realizada através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (Zetasizer Nano ZS®, Malvern Instruments, Reino Unido) em um ângulo de 173° a 25°C. Assim, as formulações foram diluídas (1:500 v/v) em água ultrapurificada. Os resultados foram expressos através do diâmetro médio (Zaverage) e do índice de polidispersão (PDI) (Equação 3).

$$PDI = \sigma^2 / Z_D^2 \quad (3)$$

4.5.6. Potencial Zeta

O potencial zeta das partículas foi determinado através da mobilidade eletroforética no equipamento Zetasizer® (Malvern Instruments, UK). As formulações

foram diluídas 500 vezes (v/v) em solução de NaCl 10 mM, previamente filtradas em membrana de 0,45 µm (Filtril®, Brasil) à temperatura de 25 °C.

4.5.7. Ensaios de teor e taxa de incorporação

A quantificação do teor de *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida contido no anfissoma foi realizada utilizando um espectrofotômetro UV/Vis UV-1800 (Shimadzu, Japão) em comprimento de onda de 250 nm. Parâmetros como linearidade, especificidade e precisão do método foram avaliados. O composto foi testado em uma faixa de concentração variando de 6 a 18 µg/mL, com coeficiente de correlação médio (r^2) para as três curvas padrão de 0,9999, coeficiente angular de 0,0764 e coeficiente linear igual a - 0,0862.

A avaliação da taxa de incorporação do composto foi realizada com o filtrado obtido pela técnica de ultrafiltração-centrifugação (Amicon® 10.000 MW, Millipore) a 4500 rpm durante 10 min. Assim, o ultrafiltrado foi quantificado por espectrofotômetro UV/Vis e a taxa de incorporação foi calculada pela diferença entre a concentração total do composto e a concentração livre no ultrafiltrado (Equação 4).

$$\text{Taxa de Incorporação (\%)}: \frac{C_{Total} - C_{Ultrafiltrado}}{C_{Total}} \times 100 \quad (4)$$

4.5.8. Estudo de estabilidade

A estabilidade das formulações foi monitorada pelos seguintes parâmetros: pH, teor, aparência, tamanho e distribuição granulométrica. Assim, as formulações foram armazenadas em geladeira a 4°C e analisadas durante 7, 15 e 30 dias.

4.6. Sistema formador de filme

4.6.1. Materiais

Para a preparação do sistema formador de filme foi utilizado o polímero Carbopol® 980 (Wickliffe, Ohio, EUA), Pullulan® (Corn Products, São Paulo, Brasil) e solvente DMSO para dissolução do composto avaliado.

4.6.2. Preparação do sistema formador de filme

O sistema formador de filme (SFF) avaliado neste estudo consiste em um hidrogel transparente de baixa viscosidade. Tais características permitem a avaliação do perfil de suscetibilidade antifúngica do composto *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida quando incorporado a esse sistema através do método de microdiluição em caldo (CLSI, 2008). Assim, o SFF foi avaliado frente a cepas de *Candida* spp. e dermatófitos através dos protocolos M27-A3 e M38-A2 (CLSI, 2008), respectivamente. Para tal fim, o composto foi primeiramente dissolvido em 2% de DMSO e, sobre essa mistura, foi adicionada uma solução aquosa contendo Carbopol® 980 (0,65 mg/mL) e o polímero pullulan (20 mg/mL) sob agitação magnética. Após homogeneização, o sistema foi ajustado com solução de NaOH a 9% a fim de obter pH 5,5, semelhante ao pH da pele. O DMSO possui propriedades potenciadoras de permeação, sendo utilizado para dissolver o composto e possivelmente melhorar as características de permeação da formulação quando testada *in situ* (Williams & Barry 2004; Lane, 2013).

4.7. Formulações a base de esmalte

4.7.1. Materiais

A base de esmalte utilizada neste estudo é constituída por nitrocelulose, tolueno sulfonamida, acetato de etila, acetato de butila, óleo de mamona, álcool isopropílico e dimeticona (Bonatto Ind. Ltda - Cachoeirinha, RS, Brasil). Como solvente para dissolução do composto avaliado, DMSO foi utilizado.

4.7.2. Preparação de formulações a base de esmalte

Dentre os antifúngicos tópicos disponíveis para o tratamento de onicomicoses, formulações a base de esmaltes são as formas farmacêuticas mais utilizadas devido a suas vantagens frente a outras apresentações tópicas. Sistemas a base de esmalte são constituídos por solventes voláteis que evaporam quando administrados sobre a placa ungueal e, com isso, uma maior concentração de composto ou fármaco permanece em contato com a lâmina ungueal, levando a uma maior eficácia do tratamento (Elsayed, 2015; Sigurgeirsson, 2016). Com base nesses conhecimentos, este estudo avaliou a efetividade de um derivado quinolínico

quando incorporado a uma base de esmalte sobre um modelo *ex vivo* de infecção onicomicótica por dermatófitos.

Inicialmente, o composto 2-metil-4-fenil-quinolina (4 mg) foi dissolvido em 2% de DMSO e incorporado a uma base de esmalte para as unhas, a fim de obter uma formulação na concentração de 4 mg/mL. Seguindo as mesmas condições, uma formulação contendo CPX (4 mg/mL) também foi preparada e utilizada como fármaco controle do teste. Uma formulação não tratada à base de esmalte e contendo apenas 2% de DMSO foi usada como controle de veículo (esmalte branco).

4.8. Avaliação da suscetibilidade antifúngica de derivados de cloroacetamidas e derivados quinolínicos

A avaliação da suscetibilidade antifúngica de derivados de cloroacetamidas e derivados quinolínicos frente a leveduras de *Candida* spp., *Fusarium* spp. e dermatófitos foi realizada através de um *screening* inicial.

Primeiramente, as soluções referentes a cada composto foram preparadas a 2% de DMSO para auxiliar na dissolução dos mesmos e o restante do volume completado com meio RPMI 1640, obtendo-se uma concentração de 100 µg/mL para cada composto. Em paralelo, as suspensões contendo os inóculos fúngicos foram preparadas em solução salina estéril 0,85%, de acordo com os protocolos M27-A3 (*Candida* spp.) e M38-A2 (fungos filamentosos) padronizados pelo CLSI (2008). Todos os inóculos fúngicos foram ajustados em espectrofotômetro (GT7220, Global Trade Technology) em comprimento de onda de 530 nm, a fim de obter uma turbidez equivalente a 1 a 5×10^6 UFC/mL para cepas de *Candida* spp., 2 a 6×10^3 UFC/mL para dermatófitos e 0,5 a 4×10^4 para *Fusarium* spp. Após a leitura, as suspensões leveduriformes foram diluídas 1:50 em solução salina estéril e, a partir desta, uma diluição 1:20 em meio RPMI 1640 foi preparada, obtendo-se um inóculo de aproximadamente 1 a 5×10^3 UFC/mL para cada cepa, os quais foram utilizados no experimento. Por outro lado, as suspensões contendo os fungos filamentosos foram diluídas 1:50 em meio RPMI 1640, resultando em aproximadamente 1 a 3×10^3 UFC/mL para dermatófitos e 0,5 a 4×10^4 para *Fusarium* spp. Um volume de 100 µL de cada solução contendo os compostos foi transferido para microplacas de 96 poços e, posteriormente, 100 µL de cada inóculo

fúngico foi adicionado sobre cada solução de composto a ser avaliado, totalizando um volume final de 200 µL. Logo, as microplacas contendo os inóculos de *Fusarium* spp. e *Candida* spp. foram incubadas a 32 e 35°C durante 48 h, respectivamente. Já as microplacas contendo os inóculos dermatofíticos foram incubadas a 32°C durante 96 h. A presença de atividade antifúngica foi determinada quando os compostos avaliados foram capazes de inibir 100% de crescimento fúngico quando comparado ao controle positivo através de leitura visual.

Após a avaliação do *screening* inicial, os compostos considerados ativos foram submetidos à determinação da concentração inibitória mínima (CIM) através da técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2008), de acordo com os protocolos descritos acima. Os compostos foram testados em uma faixa de concentração variando entre 50 a 0,09 µg/mL, sendo a CIM definida como a menor concentração de composto capaz de inibir 100% de crescimento fúngico quando comparada ao controle positivo através de leitura visual.

4.9. Ensaio de proteção do sorbitol

A avaliação de possível dano sobre a integridade da parede celular fúngica devido à ação dos compostos *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida e 2-metil-4-fenil-quinolina foi realizada através do ensaio de proteção do sorbitol (Bowman et al., 2002). Dessa forma, o derivado de cloroacetamida foi avaliado frente às cepas ATCC 18804 (*C. albicans*), CG 09 (*C. glabrata*) CK 02 (*C. krusei*), CP RL38 (*C. parapsilosis*), CT 72A (*C. tropicalis*), MCA 01 (*M. canis*), MGY 42 (*M. gypseum*), TME 16 (*T. mentagrophytes*) e TRU 45 (*T. rubrum*). Já o derivado quinolínico foi testado frente às mesmas cepas dermatofíticas, adicionando a cepa ATCC 28188 (*T. rubrum*). O sorbitol atua como um protetor osmótico da parede celular fúngica, impedindo a lise e ruptura da mesma. Com isso, na presença de sorbitol, espera-se que a CIM de um composto ou antifúngico aumente, quando comparada a CIM de um composto na ausência de sorbitol. Neste ensaio, a determinação dos valores de CIM para os compostos foi conduzida na presença e na ausência de sorbitol (Sigma, St. Louis, EUA) 0,8 mol/L, seguindo os protocolos M27-A3 e M38-A2 (CLSI, 2008). Como controle do ensaio, a avaliação da CIM da anidulafungina na presença e na ausência de sorbitol foi conduzida em paralelo, seguindo as mesmas condições descritas. As microplacas foram incubadas a 32°C (dermatófitos) e 35°C (*Candida*

spp.) durante 168 h, com a leitura dos resultados sendo determinada em 48 e 168 h para *Candida* spp., e em 96 e 168 h para dermatófitos. Logo, a leitura visual para obtenção dos resultados foi realizada.

4.10. Efeito sobre o ergosterol exógeno

Este ensaio tem por objetivo avaliar a possível interação dos compostos *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida e 2-metil-4-fenil-quinolina sobre a membrana celular fúngica na presença de diferentes concentrações de ergosterol exógeno. Compostos que interagem com o ergosterol presente na membrana da célula fúngica irão formar complexos na presença de ergosterol exógeno, deixando livre o ergosterol intracelular, mantendo o crescimento celular fúngico. Isso acarreta em um aumento na CIM do composto quando comparada a CIM sem adição de ergosterol. Nesse sentido, a avaliação da CIM dos compostos foi realizada na ausência e na presença de concentrações crescentes de ergosterol exógeno (50 - 250 µg/mL). O derivado de cloroacetamida foi avaliado frente às cepas ATCC 18804 (*C. albicans*), CG 09 (*C. glabrata*) CK 02 (*C. krusei*), CP RL38 (*C. parapsilosis*), CT 72A (*C. tropicalis*), MCA 01 (*M. canis*), MGY 42 (*M. gypseum*), TME 16 (*T. mentagrophytes*) e TRU 45 (*T. rubrum*). Já o derivado quinolínico foi testado frente às mesmas cepas dermatofíticas, adicionando a cepa ATCC 28188 (*T. rubrum*). A metodologia seguiu os protocolos M27-A3 e M38-A2 (CLSI, 2008).

Primeiramente, o ergosterol exógeno (Sigma, St. Louis, EUA) foi dissolvido em 0,1% de dimetilformamida (Sigma, St. Louis, EUA) e, posteriormente, diluído em meio RPMI 1640 para ser utilizado no ensaio. Como fármaco controle, a avaliação da CIM para a anfotericina B foi conduzida em paralelo em uma faixa de concentração variando entre 0,031 a 16 µg/mL. A seguir, as microplacas foram incubadas a 35°C durante 48 h para *Candida* spp., e a 32°C durante 96 h para dermatófitos. Por fim, a leitura visual das microplacas foi realizada (Escalante et al., 2008).

4.11. Ensaio de tempo de morte

A avaliação da cinética da relação dose-resposta para os compostos *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida e 2-metil-4-fenil-quinolina foi conduzida através do ensaio de tempo de morte celular. Nesta metodologia, é possível verificar se o

composto apresenta comportamento fungicida ou fungistático sobre determinada cepa fúngica, o qual pode variar em função da concentração utilizada e do tempo decorrido. Para tal fim, além das soluções dos compostos também foram avaliados o anfissoma e o sistema formador de filme, todos preparados nas concentrações CIM, CIMx2, CIMx4 e CIMx8 frente a determinada cepa fúngica. Assim, para o derivado de cloroacetamidas o ensaio foi realizado frente às cepas ATCC 18804 (*C. albicans*), MCA 01 (*M. canis*) e ATCC 31360 (*F. solani*). Já para o derivado quinolínico, as cepas ATCC 28188 (*T. rubrum*) e MCA 01 (*M. canis*) foram testadas.

A turbidez de cada inóculo fúngico foi ajustada em escala 0,5 McFarland em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 530 nm. Posteriormente, uma diluição 1:10 foi realizada para os inóculos de *Candida* spp., obtendo-se uma concentração de aproximadamente 1 a 5×10^5 UFC/mL. Para as cepas dermatofíticas e *Fusarium* spp., as suspensões dos inóculos fúngicos foram diluídas 1:50 em meio RPMI a fim de obter uma concentração final de aproximadamente 1 a 3×10^3 e 0,5 - 4×10^4 UFC/mL, respectivamente. O ensaio foi realizado em triplicata. Três tubos contendo RPMI e inóculo fúngico foram utilizados como controle de crescimento para cada cepa. Os tempos 0, 3, 6, 12, 24 e 48 h foram escolhidos para a determinação do tempo de morte para *Candida* spp. e *Fusarium* spp., adicionando o tempo 96 h para dermatófitos. A determinação da curva de morte celular para as formulações (SFF e anfissoma) foi realizada nos tempos 0, 24, 48, 96 e 120 h. Em cada um dos tempos decorridos, 100 µL de cada solução ou formulação foram removidos e diluídos 1:10 com água estéril até 10^{-3} , para realização da contagem das colônias fúngicas. Em seguida, 20 µL de cada amostra foram semeadas em ASD através de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 35 °C/48 h para *Candida* spp. e 32°C durante 48 e 96 h para *Fusarium* spp. e dermatófito, respectivamente.

Após o período de incubação, foi realizada a contagem das colônias fúngicas e os resultados foram expressos por meio da plotagem dos valores de \log_{10} UFC/mL. Os compostos foram considerados fungicidas quando uma diminuição $\geq 99,9\%$ foi observada no \log_{10} UFC/mL, e fungistática quando esta redução foi $< 99,9\%$ no \log_{10} UFC/mL, em comparação com o inóculo inicial (tempo zero). As médias de cada contagem de UFC/mL foram convertidas em \log_{10} . Essa metodologia seguiu o proposto por Pippi et al. (2017) com modificações.

4.12. Microscopia eletrônica de varredura

Primeiramente, para a realização da microscopia eletrônica de varredura (MEV), os valores de CIM foram obtidos para o composto *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida e 2-metil-4-fenil-quinolina frente a cepas de *Candida* spp., *Fusarium* spp. e dermatófitos. Assim, o derivado de cloroacetamidas foi avaliado frente às cepas ATCC 18804 (*C. albicans*), CT 72A (*C. tropicalis*), MGY 42 (*M. gypseum*), TRU 45 (*T. rubrum*) e ATCC 31036 (*F. solani*). Por sua vez, o composto quinolínico foi avaliado frente às cepas ATCC 28188 (*T. rubrum*) e MCA 29 (*M. canis*). A técnica de microdiluição em caldo seguiu o proposto pelos protocolos M27-A3 e M38-A2 (CLSI, 2008). Após a leitura das CIM's, uma alíquota de cada amostra na concentração CIM/2 foi coletada e encaminhada para visualização em MEV. Dessa forma, as amostras foram preparadas através de diversas etapas, incluindo lavagem, fixação e centrifugação, conforme descrito por Joubert et al. (2015), com algumas modificações. Após a conclusão destas etapas, foi possível obter os *pellets* contendo as amostras fúngicas na presença dos compostos. Logo, os *pellets* foram aderidos a lamínulas previamente tratadas com poli-L-lisina durante 1 h. Em seguida, as lamínulas foram desidratadas em uma série de soluções de acetona (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil): 30, 50, 70, 95 (5 min) e 100% (10 min). Por fim, as amostras foram submetidas à secagem em ponto crítico de CO₂ (MS CPD 300, Leica), revestidas com ouro e paládio e introduzidas ao microscópio eletrônico de varredura (Carl Zeiss JEOL 6060 - Carl, Oberkochen, Alemanha), utilizando uma corrente de 10 Kv.

4.13. Modelo de infecção onicomycótica *ex vivo*

O uso de modelos de infecção onicomycótica *ex vivo* utilizando cascos bovinos e suínos é uma alternativa aos modelos de infecção *in vivo*, uma vez que fornecem uma metodologia simples e rápida para o rastreamento de novas formulações e compostos antifúngicos (Lusiana et al., 2013; Thatai & Sapra, 2014).

Para este estudo, cascos suínos foram gentilmente fornecidos pela Yargo Suinocultura (Itaquí, RS, Brasil) e o material foi autoclavado para facilitar a remoção de tecidos como pele e cartilagens. Logo, os cascos limpos foram mantidos em uma prensa durante 24 h para facilitar a posterior formação de discos de unha. Os discos de unha foram formados através de um cilindro padrão e a espessura medida em

micrômetro digital (Mitutoyo, Tóquio, Japão), obtendo-se discos com área de 8 mm e 1,2 a 1,5 mm de espessura. Após, os discos foram mantidos em solução etanólica 30% (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil) para evitar o ressecamento das estruturas ungueais. Por fim, os discos foram esterilizados no momento da realização do teste.

Para realização do teste, o derivado quinolínico 2-metil-4-fenil-quinolina foi avaliado frente à cepa ATCC 18288 (*T. rubrum*). Primeiramente, a cepa foi cultivada em ágar batata dextrose (ABD) a 32°C durante 5 a 7 dias, a fim de favorecer o desenvolvimento de suas estruturas de reprodução (conídios). Logo, um inóculo fúngico contendo esta cepa foi preparado em solução salina estéril 0,85% e a contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer, resultando em aproximadamente 10^5 UFC/mL. Posteriormente, 100 µL desta suspensão foram semeados em placas de Petri contendo ABD. Os discos de unha suína foram esterilizados, adicionados a essas placas e incubados a 32°C durante 5 dias. Após o estabelecimento da infecção fúngica sobre os discos, eles foram transferidos para placas de Petri contendo SDA e tratados diariamente, durante 7 dias, com 30 µL de cada formulação a base de esmalte (esmalte contendo o derivado quinolínico, esmalte contendo CPX e esmalte branco) – descritas no item 3.7., o que resultou em uma dose de 120 µg/dia/área. Os discos de unha infectados e não tratados foram utilizados como controle de desenvolvimento de infecção fúngica. Finalmente, o número total de células viáveis de *T. rubrum* após exposição aos tratamentos foi expresso por \log_{10} UFC/mL. Dessa forma, os discos ungueais foram adicionados a 5 mL de solução salina estéril e mantidos em banho USC-800 Unique (Indaiatuba, São Paulo, Brasil) durante 45 min. Após, as amostras foram diluídas 1:10 até a diluição 10^{-3} , cultivadas em SDA e incubadas a 32°C por 96 h para contagem das colônias fúngicas. O ensaio foi realizado em quadruplicata para cada tratamento e seguiu o proposto por Quatrin et al. (2019) com modificações.

4.14. Ensaio da membrana corioalantoide do ovo da galinha (HET-CAM)

A avaliação do possível grau de irritação ou alergenicidade em mucosa foi avaliada através do ensaio da membrana corioalantoide do ovo da galinha (HET-CAM). Para a realização do ensaio, ovos Lohmann brancos férteis e frescos

(Lohmann selecionado Leghorn, LSL) foram selecionados. Os ovos foram mantidos sob condições otimizadas de incubação, com temperatura e umidade variando entre 38 a 39°C e 55 a 60%, respectivamente, durante 10 dias. No 10º dia, a casca do ovo foi removida cuidadosamente com uma ferramenta rotativa (Dremel, WI). Assim, foi possível adicionar 300 µL dos compostos derivados de cloroacetamidas (1 mg/mL) e do composto quinolínico 2-metil-4-fenil-quinolina (500 µg/mL) juntamente com os controles sobre a membrana corioalantoide de cada ovo de galinha. Como controle negativo e positivo, uma solução salina 0,9% e uma solução NaOH 0,1 mol/L foram utilizadas, respectivamente. Os efeitos irritantes foram observados em 0,5, 2 e 5 min após a aplicação de cada tratamento. O resultado do score de irritação (IS) dos compostos foi expresso de acordo com a equação abaixo, na seguinte escala: não irritante ou praticamente não irritante (0 a 4.9); irritação moderada (5 a 8.9) e irritação grave ou severa (9 a 21). O ensaio metodologia seguiu o proposto pelo Comitê de Coordenação Interagências sobre a Validação de Métodos Alternativos (ICCVAM, 2010):

$$IS = \left(\left(\frac{(301 - \text{Tempo de hemorragia})}{300} \right) x 5 \right) + \left(\left(\frac{(301 - \text{Tempo de Lise})}{300} \right) x 7 \right) + \left(\left(\frac{(301 - \text{Tempo de coagulação})}{300} \right) x 9 \right) \quad (1)$$

4.15. Avaliação histopatológica em modelo *ex vivo*

A avaliação do potencial de toxicidade dérmica provocado pela ação dos compostos *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida e 2-metil-4-fenil-quinolina foi conduzida em amostras de pele de orelha de porcos adultos, machos, recém abatidos no Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC) - campus Concórdia. Os porcos foram abatidos de acordo com as regras estabelecidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil, respeitando o bem-estar animal (Brasil, 2013). Logo, as amostras de pele foram removidas e os pelos foram cuidadosamente retirados através de um aparador elétrico e transportados para o laboratório em tampão Krebs-Hepes (2°C).

Após a preparação, as amostras de pele foram montadas em um difusor de célula de Franz (Logan Instrument Corp., NJ) com área de difusão de 1,75 cm². O lado epidérmico da pele foi exposto aos tratamentos. Assim, os derivados de cloroacetamidas (6,25, 12,5, 25 e 50 µg/mL) e derivados quinolínicos (25, 100, 200 e 400 µg/mL), juntamente com uma solução tampão fosfato (PBS) em pH 7,0 (controle negativo) e uma solução NaOH 0,1 mol/L (controle positivo) foram adicionados sobre as amostras de pele durante 6 h cada. Posteriormente, os fragmentos de tecido foram coletados, fixados em solução de formalina a 10% com tampão neutro, processados rotineiramente e corados com hematoxilina e eosina (HE). Por fim, as amostras de pele foram examinados sob microscopia de luz óptica. Os experimentos foram realizados em triplicata (Machado et al., 2016).

4.16. Ensaio de citotoxicidade

A avaliação da possível citotoxicidade provocada pela ação dos compostos quinolínicos foi realizada sobre células de rim de macaco verde, conhecidas como células Vero®. Assim, células Vero® foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Inicialmente, as células foram adicionadas em frascos e cultivadas em meio DMEM High (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (FBS - Cripton, Andradina, São Paulo, Brasil) inativado pelo calor, 1% de penicilina e estreptomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) ambas na concentração de 100 µg/mL a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Quando uma confluência de aproximadamente 80 - 90% da monocamada celular foi obtida, as células foram destacadas para serem submetidas ao ensaio. Assim, uma concentração de aproximadamente 7 x 10³ células/poço foram dispensadas em microplacas de 96 poços e incubadas durante 24 h para obtenção da monocamada celular. Posteriormente, as células foram tratadas com os compostos quinolínicos em concentrações que variaram de 6,25 a 100 µg/mL durante 48 h a 37°C em 5% de CO₂. Como controle sem tratamento, foi utilizado DMSO 0,5%. O ensaio foi realizado em triplicata.

Após o período de incubação, uma solução de MTT 0,5 mg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) foi adicionada sobre as células tratadas e as microplacas foram incubadas durante 2 h a 37°C. A coloração apresentada pelas células é diretamente proporcional ao número de células viáveis e é medida através

da densidade óptica. Finalmente, as microplacas foram lidas em espectrofotômetro (Spectramax 190-Molecular Devices) em comprimento de onda de 570 nm. O ensaio foi realizado de acordo com Ishida et al. (2011), com modificações.

4.17. Teste do micronúcleo

O teste do micronúcleo é amplamente utilizado como indicador de genotoxicidade em nível cromossômico decorrente da ação de uma amostra em estudo, como um novo composto ou fármaco. Estudos toxicológicos de dano ao DNA em nível cromossômico são essenciais para identificar a ocorrência de mutações nesse local, um evento importante que ocorre na carcinogênese (Fenech, 2000).

Neste estudo, a presença de eventos de micronúcleo provocados pela ação do composto 2-metil-4-fenil-quinolina foi avaliada frente a linfócitos humanos.

Primeiramente, o sangue venoso foi coletado de um voluntário adulto com mais de 18 anos que não faz uso de medicação por venopunção. Os linfócitos foram obtidos por gradiente de centrifugação e imediatamente transferidos para meio RPMI 1640 (protocolo aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Pampa, sob número 27045614.0.0000.5323). Em seguida, frascos de cultura celular contendo o composto em uma concentração de 100 µg/mL foram incubados a 37°C por 72 h juntamente com o controle positivo (bleomicina 3 µg/mL) e controle negativo (tampão PBS em pH 7,4). Após o tempo de incubação, as lâminas contendo os tratamentos foram coradas com Renylab® e analisadas sob microscopia óptica em um aumento de 1000x. Por fim, um número total de 500 células foram contadas em cada lâmina e classificadas quanto à quantidade de células mononucleares com a presença de micronúcleo, células binucleares com a presença de micronúcleo, células em processo necrótico e células em processo apoptótico. A metodologia seguiu Schmid (1975) e Fenech (2000), com modificações.

4.18. Teste de toxicidade aguda em modelo *in vivo*

Hospedeiros invertebrados como *Tenebrio molitor* têm sido utilizados como um novo modelo alternativo para triagem da avaliação de toxicidade sistêmica aguda provocada por novos compostos ou fármacos. O método apresenta algumas vantagens, como a rápida e simples realização da técnica, além de evitar o uso de

animais vertebrados e mamíferos em testes preliminares de toxicidade (Doke & Dhawale, 2015; De Souza et al. al., 2015). Neste estudo, a avaliação de possível toxicidade aguda provocada pela ação dos compostos N-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida e 2-metil-4-fenil-quinolina foi conduzida em larvas de *T. molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), conhecidas popularmente como as larvas da farinha. Primeiramente, as larvas foram anestesiadas por resfriamento (2°C) durante 2 min. Em seguida, 50 µL de cada composto, ambos na concentração de 100 µg/mL, foram aplicados em paralelo em cada larva. A aplicação foi realizada com um suporte de uma microseringa no hemocelo, no segundo ou terceiro esternito visível acima das pernas, na porção ventral. As larvas foram incubadas a 37°C em placas de petri contendo dieta de criação. O número de larvas mortas foi registrado em intervalos de 4 h durante 48 h. O ensaio foi realizado em triplicata com grupos de sete larvas, com um total de 21 larvas para cada tratamento (De Souza et al., 2015).

6. DISCUSSÃO GERAL

Como descrito ao longo deste estudo, as escolhas terapêuticas atuais para o tratamento de infecções fúngicas são limitadas a poucos antifúngicos disponíveis. Aliado a isso, a elevada seleção de resistência fúngica contribui significativamente para a ineficácia desses fármacos, ocasionando em recidivas e em altas taxas de mortalidade relacionadas a essas infecções. Dessa forma, a busca por novas entidades químicas com potencial antifúngico e seguras ao paciente foi realizada inicialmente através da avaliação da suscetibilidade antifúngica de compostos derivados de cloroacetamidas e derivados quinolínicos.

A partir dos resultados obtidos neste estudo ficou evidente que a presença de ação antifúngica demonstrada pelos compostos derivados de cloroacetamidas e quinolínicos está relacionada à estrutura química e às propriedades físico-químicas de cada derivado. A introdução ou a remoção de determinado substituinte ao núcleo desses compostos levou ao aumento ou à inibição do potencial antifúngico dos mesmos. Isso pode ser observado por Jablonkai (2003), onde alterações na posição dos substituintes ligados ao anel fenílico interferem na reatividade das cloroacetamidas, o que pode levar à perda de ação biológica em alguns casos. Em nosso estudo, os derivados de cloroacetamidas apresentaram uma maior eficácia frente aos gêneros dermatofíticos - CIM variando entre 3,12 – 50 µg/mL - quando comparados aos gêneros de *Candida* e *Fusarium* - CIM variando entre 25 – 50 µg/mL. A ação destes derivados parece ser seletiva, uma vez que, os compostos apresentaram menores valores de CIM frente a dermatófitos quando comparado aos valores de CIM obtidos frente a espécies de *Candida*. As diferenças apresentadas no perfil de suscetibilidade de leveduras e fungos filamentosos frente a esses compostos pode ser devido às características morfológicas apresentadas por cada gênero, o que pode afetar a permeação do composto através da célula fúngica (Bowmann e Free, 2006; Fukuda et al., 2009).

Dentre os derivados de cloroacetamidas ativos, podemos destacar os compostos **2**, **3** e **4**, considerados os mais efetivos por apresentaram as menores CIM's dentre os demais derivados desta classe. Segundo Lavorato et al. (2017), os compostos **2** (LogP 2,52), **3** (LogP 1,69) e **4** (LogP 2,11), possuem valores de LogP indicativos de lipossolubilidade. Assim, acredita-se que a ação antifúngica está

relacionada às características lipofílicas desses compostos, o que facilitaria a sua penetração através da célula fúngica. Além disso, a eficácia antifúngica dos compostos **2** e **5** pode ser explicada devido à presença de substituintes halogenados, uma vez que, antifúngicos como o fluconazol e o clotrimazol apresentam halogênios em sua estrutura, o que colabora para uma maior eficácia (Corrêa et al., 2011; Crowley e Gallagher 2014). Por outro lado a ausência de atividade antifúngica apresentada pelos compostos **10** e **11** provavelmente é devida à baixa hidrofobicidade dos mesmos. Para Lavorato et al. (2017), esses compostos apresentam baixos valores de LogP, como 0,35 (composto **10**) e -1,66 (composto **11**), o que acarretaria em uma maior dificuldade de penetrar a celular fúngica.

Neste estudo, as posições C-2, C-3 e C-6 do núcleo quinolínico foram modificadas a fim de obter compostos com atividade antifúngica. Assim como os derivados de cloroacetamidas, os derivados quinolínicos também apresentaram maior eficácia frente às cepas dermatofíticas quando comparados às cepas de *Candida* spp. Porém, neste caso, a ação antifúngica foi estritamente seletiva, uma vez que, os compostos **2** e **3** apresentaram somente ação anti-*Candida*, enquanto que, para os compostos **5** e **6**, uma ação anti-dermatofítica seletiva pode ser observada. A presença de um substituinte fenil na posição C-4 diretamente ligado ao anel quinolínico demonstra que este grupo foi fundamental para a ação antifúngica apresentada pelos compostos **5** e **6**. Segundo Patel et al. (2015), a introdução de um substituinte fenil ao anel quinolínico resultou em uma boa ação microbiológica para os compostos avaliados. A introdução de um substituinte metila na posição C-2 e um fenil na posição C-4 resultou em uma maior eficácia para o composto **5** (GM = 19,14 µg/mL), o qual apresentou os menores valores de CIM quando comparado a presença de um grupo fenil nas posições C2 e C-4 (composto **6**) (GM = 41,07 µg/mL). A potente ação apresentada por este composto pode ocorrer devido aos efeitos eletrônicos provocados pelo grupo metila que poderia doar elétrons por efeito indutivo para o anel quinolínico e melhorar as interações com os alvos da célula fúngica. Para El-Shehry et al. (2018) e Singh et al. (2015), a introdução de um grupo metila em derivados quinolínicos mostrou uma boa ação frente ao gênero *Aspergillus* e *Mycobacterium*, respectivamente. Porém, apenas a presença deste substituinte não foi suficiente para o desenvolvimento de uma ação sobre os dermatófitos, uma vez que, os compostos **1-4** não apresentaram atividade frente aos mesmos.

Por outro lado, os compostos **2** e **3** também possuem um substituinte metila na posição C-2 do anel quinolínico. Segundo Liberato et al. (2017), derivados quinolínicos contendo dissbstituintes em C-2,4 ligados núcleo quinolina, semelhantemente ao composto **3**, demonstram ação anti-*Candida* e anti-*Cryptococcus*. A ação seletiva anti-*Candida* apresentada pelos compostos **2** e **3** pode ser devida a eles apresentarem menor peso molecular e menor conjugação de elétrons quando comparados aos demais compostos. Essa menor estrutura molecular poderia facilitar a penetração destes compostos através da célula leveduriforme.

Os compostos **1** e **4** não apresentaram potencial antifúngico frente a nenhum gênero avaliado. A ausência de um substituinte na posição C-2, juntamente com a introdução do bromo - grupo retirador de elétrons - na posição C-6 do núcleo quinolínico, pode ter contribuído para a perda de ação antifúngica pelo composto **1**. Além disso, a introdução de etilfenil, um substituinte rico em elétrons, na posição C-4, contribuiu para a perda de atividade pelo composto **4**. Isso indica que a presença de um grupo fenil diretamente ligado ao anel quinolínico confere a rigidez necessária para promover a ação antifúngica. Isso indica que a presença do grupo fenil diretamente ligado ao anel quinolínico confere a rigidez necessária e é crucial para a eficácia da ação antifúngica.

A avaliação de parâmetros como solubilidade, coeficiente de partição e biodisponibilidade oral são fundamentais para indicar o potencial de um composto como um novo antifúngico. Assim, todos os compostos quinolínicos avaliados neste estudo demonstraram parâmetros físico-químicos satisfatórios através de sua predição pela plataforma *on-line* SwissADME.

Por fim, podemos observar que a seletividade antifúngica apresentada pelos compostos derivados de cloroacetamidas e derivados quinolínicos é devida às características estruturais dos mesmos, visto que, modificações nos substituintes ligados ao anel interferiram diretamente no desempenho da eficácia antifúngica relatada pelos compostos, juntamente às características morfológicas apresentadas por fungos leveduriformes e filamentosos, as quais parecem afetar a penetração do composto através das células fúngica.

Neste estudo, todos os compostos avaliados apresentaram parâmetros aceitáveis dentro dos limites estabelecidos pela Regra dos 5 (Lipinski et al. 1997, 2001), indicando o prosseguimento do estudo microbiológico para essas novas

entidades químicas. Com isso, após a avaliação do perfil de suscetibilidade antifúngica dos compostos, aqueles considerados os mais efetivos frente aos gêneros fúngicos avaliados foram submetidos à análise de parâmetros de toxicidade tópica e sistêmica.

O ensaio da membrana corioalantoide (HET-CAM) tem sido aceito como um modelo alternativo a outros testes *in vivo* para avaliação de irritação em mucosa devido à alta sensibilidade da membrana corioalantoide em apresentar lesões na presença de compostos irritantes, servindo como um parâmetro para avaliar o grau de irritabilidade de novas entidades químicas (ICCVAM, 2010). Neste estudo, este ensaio foi realizado para os derivados de cloroacetamidas denominados como composto **2**, **3** e **4**, e para o derivado quinolínico denominado composto **5**. Esses compostos foram escolhidos por apresentarem uma maior eficácia (menores CIM's) frente às cepas avaliadas. O composto **2**, contendo um substituinte bromo na posição C-4 do anel de cloroacetamida, não foi capaz de provocar irritação sobre a membrana corioalantoide. De acordo com Martínez-Poveda et al. (2007), compostos halogenados com ação antiangiogênica não apresentaram irritação ou alergenicidade quando avaliados sobre a membrana corioalantoide. Por outro lado, os compostos **3** e **4** apresentaram potencial irritante, não sendo indicados para uso tópico. Por ser considerado o derivado quinolínico mais eficaz frente às cepas fúngicas testadas, o grau de irritação do composto **5** sobre mucosas também foi avaliado. Da mesma maneira que o composto **2**, o composto **5** também não provocou irritabilidade e alergenicidade sobre a membrana corioalantoide, demonstrando que os substituintes C-2-metil-4-fenil, ligados ao anel quinolínico, não induzem toxicidade em mucosas.

Ensaio *ex vivo* utilizando pele de orelha de porco têm sido amplamente utilizados para a avaliação de toxicidade dérmica devido a grande similaridade fisiológica e anatômica desta pele com a pele humana (Abd et al., 2016; Pippi et al., 2017). Dessa forma, é possível obter um resultado confiável e que forneça uma resposta significativa em relação à toxicidade tópica de novas opções para terapias antifúngicas (Sheu et al., 2014). Semelhante ao HET-CAM, tanto o composto *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida quanto o composto 2-metil-4-fenilquinolina não provocaram danos histopatológicos, inflamação ou alterações nos tecidos das células de pele de porco, mesmo em concentrações maiores que suas CIM's. Esses resultados são muito relevantes, uma vez que, os antifúngicos atuais utilizados no

tratamento de micoses cutâneas têm apresentado toxicidade tópica severa. Estudos relatam que o uso tópico de terbinafina e cetoconazol tem provocado alergia na pele e alterações histopatológicas no estrato córneo (Verma et al., 2013; Liu & Warshaw, 2014). Além disso, o tratamento tópico da onicomiose dermatofítica com ciclopirox olamina resultou em desordem ungueal, prurido, erupção cutânea e dermatite de contato (Pinheiro et al., 2013). Com isso, podemos sugerir que os compostos avaliados são seguros para o uso em formulações tópicas. Além disso, o composto **5** apresentou LogKp aceitável para a permeabilidade através da pele, o que reforça sua aplicação como uma possível terapia tópica antifúngica.

A prospecção de novas entidades químicas com potencial antifúngico almeja o desenvolvimento de compostos seguros sobre as células humanas, atuando especificamente sobre as células fúngicas (Scorzoni et al., 2017). Tendo em vista esse objetivo, o perfil de citotoxicidade para os derivados quinolínicos **3**, **5** e **6**, considerados os compostos mais efetivos da classe, foi avaliado. Como resultado, nenhum composto demonstrou efeito citotóxico ($IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$) sobre a linhagem de células Vero testada, mesmo em concentrações maiores que seus valores de CIM. Corroborando com esses resultados, diversos estudos demonstram que derivados quinolínicos com ação microbiológica apresentam baixa citotoxicidade sobre células Vero, com $IC_{50} > 30 \mu\text{g/mL}$ (Yang et al., 2010), $IC_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ (Kouznetsov et al., 2012) e $IC_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$ (Supong et al., 2016). Além disso, a viabilidade das células Vero não foi dependente dos substituintes introduzidos nas posições C-2,4 do anel quinolínico, uma vez que, os três compostos apresentaram comportamento similar sobre estas células. Ao contrário do nosso estudo, diversos relatos apontam que a maioria dos antifúngicos orais utilizados atualmente na clínica médica causa algum dano tóxico ao paciente, como, por exemplo, nefro e hepatotoxicidade, os quais são considerados os principais efeitos tóxicos relacionados ao uso desses fármacos (Lewis, 2011; Okuyan & Altin, 2013; Ashbee et al., 2014; Choudhary et al., 2014; Folk et al., 2016; Tverdek et al., 2016; Shibata et al., 2017). Dessa forma, nosso estudo sugere que os derivados quinolínicos são seguros para utilização em células de mamíferos, embora ensaios de citotoxicidade *in vivo* ainda sejam necessários.

A importância no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos que não induzam genotoxicidade é crucial para garantir a segurança ao paciente. Neste estudo, o composto **5** (2-metil-4-fenil-quinolina) demonstrou ausência de potencial

genotóxico sobre leucócitos humanos, não induzindo o desenvolvimento de mutações cromossômicas. Esses dados vão ao encontro dos estudos reportados por Uno et al. (2015) e Suzuki et al. (2007), os quais compostos quinolínicos não provocaram a formação de eventos micronúcleo em células da medula óssea e do trato gastrointestinal de ratos, e em células de fibroblastos de pulmão de *hamsters*, respectivamente. Indo de encontro a esses achados, os antifúngicos atuais, como o fluconazol - em concentrações entre 25 e 50 µg/mL e a giseofulvina, têm induzido severa mutagenicidade sobre leucócitos humanos (Kolachana & Smith, 1994; Yuzbasioglu et al., 2008). Por fim, podemos sugerir que nossos resultados são promissores, visto que, o composto avaliado apresenta um bom perfil de segurança quando comparado aos antifúngicos atuais.

Este é o primeiro estudo avaliando o potencial de derivados de cloroacetamidas e quinolínicos em provocar toxicidade sistêmica aguda *in vivo* sobre larvas de *T. molitor*. Esse invertebrado tem se mostrado como um hospedeiro promissor para ser utilizado como modelo alternativo em ensaios de triagem de novos compostos ativos biologicamente, evitando o uso de animais vertebrados para este fim (Doke & Dhawale, 2015; De Souza et al., 2015). Como resultado, as larvas de *T. molitor* demonstraram uma alta taxa de sobrevivência e semelhante ao controle PBS após 48 h de exposição aos compostos *N*-(4-bromofnil)-2-cloroacetamida e 2-metil-4-fenil-quinolina (composto **5**), sugerindo que ambos não provocam toxicidade sistêmica aguda sobre este hospedeiro. Além disso, o composto **5** possui características lipofílicas e coeficiente de solubilidade aceitável aos parâmetros de Lipinski (LogS -4,20), indicando uma porcentagem de absorção oral desejável para um candidato a fármaco. Estes resultados sugerem que este composto provavelmente apresenta uma boa biodisponibilidade oral sobre as larvas de *T. molitor*. Estes resultados sugerem que ambos os compostos são seguros para uso sistêmico. Entretanto, estudos utilizando modelos de animais mamíferos avaliando o perfil de toxicidade sistêmica desses compostos são necessários para confirmar esses resultados.

O possível mecanismo de ação antifúngica dos compostos avaliados neste estudo foi investigado para o composto **2** (*N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida) sobre cepas de *Candida* spp. e dermatofíticas, e para o composto 2-metil-4-fenil-quinolina. A escolha destes compostos para realização desta etapa do estudo foi determinada a

partir dos resultados observados através dos parâmetros de toxicidade avaliados e de eficácia antifúngica apresentada.

Em vegetais, a ação herbicida das cloroacetamidas ocorre na membrana plasmática através da inibição da biossíntese de ácidos graxos de cadeia muito longa (VLCF). Essa depleção representa a primeira consequência fisiológica da ação desses herbicidas, seguida de uma cascata de efeitos secundários que levam à morte do vegetal (Eckermann et al., 2003). Esses dados nos levam a sugerir que o provável mecanismo de ação antifúngica de derivados de cloroacetamidas também possa ocorrer na membrana celular fúngica. Embora o composto **2** (*N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida) não tenha sido capaz de formar complexos com o ergosterol exógeno adicionado em concentrações crescentes para avaliação da CIM do mesmo, indicando não atuar sobre o ergosterol presente na membrana fúngica, é possível que este composto atue em outros alvos existentes nesta membrana, ainda não desvendados por este estudo. Além disso, o derivado de cloroacetamidas não demonstrou aumento nos valores de CIM na presença de sorbitol, sugerindo que sua ação provavelmente não ocorra na parede celular fúngica

Através da avaliação das curvas de cinética dose-resposta para o composto **2** (*N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida) foi possível visualizar as diferenças envolvidas em seu modo de ação sobre as cepas de *Candida* spp., *Fusarium* spp. e dermatófitos. Quando avaliado frente a dermatófitos, o composto demonstrou uma ação fungicida na CIM em 48 h. No entanto, para concentrações mais altas (CIMx2 e CIMx4), essa ação foi observada apenas em 96 h. Dessa forma, podemos concluir que a ação fungicida apresentada pelo composto é dependente da concentração do composto e do tempo decorrido. Além disso, para a concentração CIMx8, a ação fungicida não foi observada. Com base nesses resultados, podemos observar que o composto **2** apresentou efeito paradoxal, uma vez que, sua eficácia foi maior quando avaliado em concentrações mais baixas. Este fenômeno ocorre quando algumas cepas são capazes de se desenvolverem na presença de concentrações mais altas de algum fármaco ou substância de teste, enquanto que, esses organismos são suscetíveis a concentrações mais baixas desses agentes (Wagener e Loiko, 2018). Uma das explicações para a ocorrência de efeito paradoxal é devido a adaptações no metabolismo fúngico, como o aumento da expressão de genes funcionais responsáveis pelo metabolismo da síntese de carboidratos e proteínas, levando à

manutenção do crescimento das células fúngicas sobre o efeito de altas concentrações de um composto ou fármaco (Fortwendel et al., 2010; Rueda et al., 2010). al., 2017). Vários estudos têm demonstrado a presença de efeito paradoxal na ação antifúngica de equinocandinas (Fortwendel et al., 2010; Carrillo-Munoz et al., 2012; Rueda et al., 2014) e azóis (Alcazar-Fuoli et al., 2009; Rueda et al., 2017) sobre isolados de *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e dermatófitos.

Para *Fusarium* spp., concentrações maiores à CIM (CIMx2, CIMx4 e CIMx8) para o composto *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida ocasionaram em uma ação fungicida dependente da concentração. Como observado, o composto apresentou ação fungicida sobre todos os gêneros filamentosos avaliados, embora sobre *Fusarium* spp. esta ação necessite de concentrações maiores que a CIM do composto. Por outro lado, o composto parece agir somente de maneira fungistática frente a *Candida* spp., promovendo apenas uma redução do crescimento fúngico. Além disso, em concentrações elevadas, um maior crescimento leveduriforme foi notado quando comparado ao controle no tempo inicial (tempo zero). Esses resultados podem ser explicados devido a maior concentração de inóculo fúngico utilizado nesta metodologia frente a leveduras, quando comparado com as concentrações de inóculo utilizadas para avaliação da suscetibilidade antifúngica.

A definição de ação fungicida ou fungistática não é absoluta. A variação de comportamento entre fungicida e fungistático frente a um mesmo isolado é observada até mesmo em antifúngicos comerciais, como fluconazol, anfotericina B, terbinafina e equinocandinas, visto que o efeito fungicida dos mesmos dependerá da concentração administrada de cada fármaco (Ingham & Schneeberger, 2012; Kovacic & Cooksy, 2012; Sigurgeirsson & Hay, 2016; Lee & Lee, 2018).

O fármaco bedaquilina, o qual apresenta um núcleo quinolínico em sua estrutura, atua através da inibição de uma enzima chave responsável pelo processo de fosforilação oxidativa e produção de adenosina trifosfato (ATP), causando depleção nos níveis de energia e morte celular bacteriana (Cholo et al., 2017). De acordo com Coimbra et al. (2016), derivados quinolínicos com ação anti-leishmanial produzem espécies reativas de oxigênio (EROS) que provocam estresse oxidativo mitocondrial e morte parasitária. Embora o mecanismo de ação desse fármaco e compostos contendo o núcleo quinolínico seja elucidado contra esses

microrganismos, o mesmo não é observado frente a células fúngicas, visto que, estudos de mecanismos de ação antifúngica para estes derivados, são escassos.

Neste estudo, assim como o observado para o composto **2** (*N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida), o composto 2-metil-4-fenil-quinolina também não apresentou aumento nos valores de CIM quando avaliado frente a concentrações crescentes de ergosterol exógeno e na presença do protetor osmótico sorbitol, sugerindo que os derivados quinolínicos provavelmente não atuem nesses alvos da célula fúngica. Dessa forma, o dano provocado pelo composto às hifas dermatofíticas é provavelmente devido a um mecanismo de ação ainda não identificado neste estudo. Porém, devido às características lipofílicas deste composto (LogP 3,84), nós sugerimos que ele possa penetrar através da célula fúngica atingindo o núcleo e exercendo a sua ação. Esta hipótese é apoiada por El-Gamal et al. (2018), uma vez que, estudos de *molecular docking* - ferramenta utilizada em modelagem molecular para prever a orientação preferencial de uma molécula a uma segunda para formar um complexo estável - indicam que derivados quinolínicos com ampla ação antifúngica interagem com a enzima DNA-girase, presente no DNA das células fúngicas e bacterianas. Dessa forma, esta enzima atua como um importante alvo para as fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina e a gatifloxacina (Collin et al., 2011).

A análise das curvas de tempo de morte celular demonstra que assim como para o composto **2** (*N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida), o composto 2-metil-4-fenil-quinolina também atua de maneira fungicida, confirmando o potente efeito inibitório deste último sobre as cepas dermatofíticas. Os resultados obtidos para ambos os compostos são muito relevantes e promissores, uma vez que, uma ação fungicida é preferível a uma ação fungistática para compostos candidatos a novos fármacos antifúngicos. De acordo com Elsayed (2015) e Ghannoum et al. (2016), uma ação fungicida deve estar presente para o sucesso de um tratamento tópico efetivo para infecções fúngicas. Tal preferência é devido à ação fungistática apenas reduzir o crescimento e a reprodução das células fúngicas, mantendo células residuais que podem se tornar resistentes após sucessivas exposições ao agente antifúngico, causando falhas terapêuticas e recidivas de infecções (Campoy & Adrio, 2017). Essa problemática pode ser observada através do uso de fármacos azóis devido à sua característica fungistática, a qual permite a ocorrência de mutações em enzimas relacionadas à biossíntese do ergosterol - alvo de ação desses agentes (Ghannoum

et al., 2016). Essa é uma das razões para a alta seleção de resistência fúngica aos azóis.

A análise das microfotografias obtidas através da MEV confirma que a ação do composto **2** (*N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida) ocorre de maneira diferente sobre fungos leveduriformes e filamentosos. Como pode ser observado, o dano provocado por este composto foi menos pronunciado sobre leveduras quando comparado aos demais gêneros avaliados, uma vez que, não houve alteração morfológica e dano sobre as células de *Candida* spp. Assim, é provável que em concentrações sub-inibitórias (CIM/2), este composto apenas promova alterações metabólicas que inibam a taxa de replicação celular. Para as cepas dermatofíticas e *Fusarium* spp., as concentrações sub-inibitórias do composto **2** foram tão efetivas quanto as suas CIM's, promovendo rupturas e alterações morfológicas sobre as hifas destes gêneros. Por fim, é sugerido que a ação do composto pode levar a distúrbios metabólicos que afetam alvos específicos na membrana de células fúngicas, os quais resultam em colapso celular.

De maneira semelhante ao composto **2**, o composto 2-metil-4-fenil-quinolina também foi capaz de provocar danos morfológicos e estruturais sobre as células dermatofíticas em concentrações sub-inibitórias, comprovando a sua eficácia.

Filmes de barreira podem ser utilizados como uma alternativa aos cremes e pomadas tradicionais indicados para o tratamento de micoses cutâneas. Esses produtos são adicionados a uma formulação e acarretam na formação de um filme *in situ* quando aplicados sobre a pele (Been et al., 2016). Neste estudo, o composto *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida manteve a sua ação sobre as cepas de *Candida* spp. e dermatófitos quando incorporado a um SFF (CIM 6,25 – 50 µg/mL), demonstrando valores de CIM semelhantes ao composto em sua forma livre. Esse sistema pode proporcionar um tratamento mais confortável e funcional ao paciente quando comparado aos cremes e pomadas tradicionais (Junior et al., 2014). Tais características estão relacionadas com a transparência e ausência de oleosidade apresentadas pelo SFF, uma vez que, ele é capaz de formar um filme transparente quando em contato com a pele (*in situ*). Além disso, o polímero pulullan foi utilizado a fim de promover o aumento do tempo de permanência do SFF sobre a pele (Cheng et al., 2011). Assim, as vantagens apresentadas por esse sistema é a obtenção de um produto que permita uma dosagem menos frequente, promovendo o aumento do

tempo de permanência da formulação na pele, visto que, a manutenção da dose em um SFF é fundamental para a eficácia do produto e adesão do paciente ao tratamento tópico (Ammar et al., 2013; Frederiksen et al. al., 2016; Kathe & Kathpalia, 2017).

Formulações farmacêuticas, desde as suas mais variadas apresentações, têm por objetivo incorporar um composto natural, sintético ou um fármaco em seu interior a fim de controlar a sua liberação, melhorar a sua solubilidade e biodisponibilidade e reduzir a possível toxicidade destes agentes. (Wais et al., 2016; Lopalco & Lopalco, 2018). A partir dos ensaios de caracterização realizados neste estudo observou-se que o anfissoma contendo o composto *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida possui uma eficiência de incorporação considerada satisfatória (98%) e tamanho de partícula adequado. Essas características podem por fim garantir a adesão e interação deste sistema com as células biológicas. Além disso, os anfissomas avaliados apresentaram potencial zeta positivo. Tal característica é de extrema relevância, uma vez que, formulações contendo partículas carregadas positivamente apresentam um maior grau de ligação sobre a pele, a qual é carregada negativamente, o que leva ao aumento da penetração de fármacos através dessa via de administração mais eficientemente (Wu et al., 2010). O anfissoma apresentou valores de pH variando entre 4,5 a 7,5, compatível com a faixa de pH permitida para ser administrado através da pele (Daudt et al., 2015).

A determinação de teor do composto *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida contido no anfissoma demonstrou uma redução do conteúdo do mesmo em 7 dias ($65,05 \pm 3,11$), quando comparado ao tempo zero ($101,31 \pm 0,81$). Porém, os valores de teor permaneceram estáveis a partir dos demais tempos avaliados (15, 21 e 30 dias). Essa situação pode estar relacionada com a ocorrência de reações químicas entre os constituintes do anfissoma e o composto. Dessa forma, o composto pode ser adsorvido na superfície da formulação ou ser desestabilizado. Além disso, é de conhecimento prévio que a estabilidade de nanoformulações pode apresentar algumas limitações devido à agregação e liberação precoce do composto ativo pelo sistema (Voltan et al., 2016; Ghasemiyeh & Mohammadi-Samani, 2018).

Embora uma redução no teor de composto contido no anfissoma tenha sido observada, isso não interferiu na manutenção da ação antifúngica do sistema, visto que, o mesmo demonstrou eficácia frente a todas as espécies dermatofíticas avaliadas, mantendo uma faixa de CIM semelhante ao composto em sua forma livre

(CIM 6,25 – 25 µg/mL). Como demonstrado neste estudo, esse composto não provocou irritação e toxicidade sobre a pele e mucosa, sugerindo sua segurança para possível aplicação tópica. Além disso, um representante da classe, denominado 2-cloroacetamida, tem o seu uso autorizado pela FDA como conservante em produtos cosméticos e de higiene para uso humano, pois esta substância não apresenta toxicidade dérmica, irritação e sensibilidade ocular, como evidenciado em um estudo *in vivo* realizado com animais mamíferos (Liebert, 1991). No Brasil, a ANVISA determina que esse preservativo possa ser utilizado nesses produtos a uma concentração máxima de 0,3% (ANVISA, 2012), indicando a segurança do mesmo para uso tópico em humanos.

A avaliação da cinética dose-resposta através do ensaio de tempo de morte celular demonstrou que o SFF promoveu o aumento da eficácia do composto *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida sobre as células dermatofíticas, visto que, uma ação fungicida foi observada 24 h após a exposição às células fúngicas, mantendo-se ao longo de todo o tempo decorrido (Artigo 2, Figura 3a). Já em sua forma livre, o composto apresentou ação fungicida somente em 48 h (resultados demonstrados no artigo 1). Nossos resultados são muito relevantes, visto que, o SFF manteve o comportamento fungicida do composto além de promover a antecipação do início da morte celular fúngica.

Quando incorporado em um anfissoma, o composto apresentou ação fungicida dependente da concentração e do tempo, com início em 48 h na concentração CIMx4 (Resultados expressos na Figura 3b). Considerando que nanoformulações são sistemas carreadores que possuem diversas vantagens, como promover a liberação controlada de um fármaco em seu sítio de ação, é provável que o anfissoma possa apresentar esse comportamento e liberar o composto gradativamente sobre as células fúngicas (Gaba et al., 2015; Voltan et al., 2016; Soliman, 2017). Este efeito também foi observado ao longo de todos os tempos avaliados, confirmando a manutenção da eficácia deste sistema. No entanto, estudos de liberação são necessários para confirmar o possível efeito gradual do anfissoma sobre as células fúngicas.

Assim como observado para o SFF, a incorporação do anfissoma neste sistema antecipou o efeito fungicida do composto *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida para 24 h. Embora nesse caso este efeito seja observado apenas para CIMx8,

sugerindo uma possível liberação gradual do composto e, com isso, a presença de um ação fungicida apenas em concentrações mais elevadas. Por outro lado, em 96 h o sistema anfisoma-SFF demonstrou um efeito fungicida na sua CIM mantendo-se até o tempo final (120 h). Assim como demonstrado pelas curvas de dose-resposta obtidas para o anfisoma, o tempo também foi um fator determinante para a presença de ação fungicida em concentrações menores (CIM) no sistema anfisoma-SFF.

Finalmente, tanto o SFF quanto o anfisoma foram capazes de aprimorar o efeito fungicida promovido pelo composto quando comparados a obtenção das curvas dose-resposta para a sua forma livre (Artigo 1). O efeito dose-resposta demonstrado para o sistema anfisoma-SFF foi mais eficaz quando comparado com o efeito obtido para o anfisoma isoladamente. Além disso, quando comparado às curvas dose-resposta obtidas para o SFF, o sistema anfisoma-SFF demonstrou uma ação fungicida controlada, a qual pode ser favorável para a manutenção da ação do composto em uma formulação sobre a pele.

Tendo em vista estes resultados, aliados ao fato de que sistemas nanoestruturados proporcionam um maior contato com a superfície cutânea, devido à elevada área superficial e baixo tamanho de suas partículas (Gaba et al., 2015; Goyal et al., 2016), nós sugerimos que o sistema anfisoma-SFF apresenta potencial como veículo carreador para a incorporação do composto *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida, com possível aplicabilidade para o desenvolvimento de uma formulação tópica para o tratamento de dermatofitoses.

Alguns estudos envolvendo modelos *ex vivo* de onicomicose dermatofítica utilizando cascos bovinos demonstram eficácia no desenvolvimento da infecção e avaliação de novos compostos e formulações antifúngicas (Sleven et al., 2015; Tauber & Müller-Goymann, 2015; Sleven et al., 2016). Por outro lado, modelos de infecção ungueal *ex vivo* utilizando cascos suínos são escassos. Neste estudo, o modelo *ex vivo* de onicomicose utilizando cascos suínos foi eficaz no estabelecimento da infecção dermatofítica, confirmando que os cascos suínos são excelentes fontes de queratina para os dermatófitos. Além disso, o desenvolvimento da infecção sobre as unhas suínas foi eficaz mesmo em um ambiente artificial e controlado. O modelo avaliado simula o desenvolvimento de uma onicomicose, fornecendo resultados de eficácia de um composto ou fármaco mais próximo a uma condição real de infecção *in vivo*, quando comparado a resultados de suscetibilidade antifúngica *in vitro*.

Um dos maiores desafios da terapia antifúngica tópica atual é reduzir sua longa duração aprimorando características como a penetração do fármaco através da lâmina ungueal (Thatai & Sapa, 2014; McAuley et al., 2016). Para superar essa problemática, sistemas de liberação, como esmaltes, contendo o composto 2-metil-4-fenil-quinolina, foram avaliados sobre o modelo *ex vivo* de infecção dermatofítica utilizando discos de unhas suínas. Sistemas a base de esmaltes contêm solventes voláteis que evaporam quando administrados sobre a placa ungueal do paciente, permitindo um maior contato do composto ou fármaco sobre a lâmina ungueal e, com isso, aumentando a eficácia da ação antifúngica (Elsayed, 2015; Sigurgeirsson, 2016). Como resultado, o composto manteve a sua eficácia sobre a cepa de *T. rubrum* quando incorporado a uma formulação a base de esmalte, reduzindo significativamente a contagem de células fúngicas viáveis sobre os discos de unhas suínas.

Como descrito anteriormente, o composto 2-metil-4-fenil-quinolina não apresentou toxicidade dérmica e alergenicidade sobre membranas mucosas mesmo em concentrações mais elevadas que suas CIM's. Além disso, o composto possui LogKp compatível para que ocorra a permeação cutânea de fármacos, sugerindo seu forte potencial para aplicação em uma formulação tópica como esmaltes para o possível tratamento de onicomicoses dermatofíticas.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados no presente estudo, podemos concluir que:

✓ Tanto os derivados de cloroacetamidas quanto os derivados quinolínicos apresentaram potencial antifúngico, salientando uma maior eficácia frente a fungos filamentosos;

✓ Os derivados de cloroacetamidas (compostos **2**, **3**, e **4**) e os derivados quinolínicos (compostos **3**, **5** e **6**) foram os compostos mais eficazes de cada classe avaliada, demonstrando os menores valores de CIM's;

✓ Tanto o derivado de cloroacetamidas - *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida, quando o derivado quinolínico - 2-metil-4-fenil-quinolina, não apresentaram aumento dos valores de suas CIM's na presença de ergosterol exógeno e de sorbitol, sugerindo que possivelmente esses compostos não atuem por meio da complexação com o ergosterol presente na membrana e na parede celular fúngica, respectivamente;

✓ O derivado *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida apresentou ação fungicida sobre cepas dermatofíticas e de *Fusarium* spp. Porém, sobre espécies de *Candida*, apenas uma ação fungistática foi observada;

✓ O composto 2-metil-4-fenil-quinolina demonstrou efeito fungicida sobre as cepas dermatofíticas, apresentando uma melhor eficácia sobre o gênero *Trichophyton*;

✓ O composto *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida provocou redução do micélio fúngico além de alterações morfológicas e estruturais sobre hifas dermatofíticas e de *Fusarium* spp, confirmando a sua eficácia antifúngica;

- ✓ O composto 2-metil-4-fenil-quinolina provocou redução do micélio fúngico e alterações ao longo das hifas dermatofíticas, confirmando o seu efeito antifúngico;
- ✓ Os compostos quinolínicos **3**, **5** e **6** não apresentaram potencial citotóxico sobre células Vero, mesmo em concentrações maiores que suas CIM's, sugerindo segurança para o seu uso em mamíferos, embora ensaios *in vivo* ainda sejam necessários;
- ✓ Tanto o derivado de cloroacetamidas *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida quanto o derivado quinolínico 2-metil-4-fenil-quinolina não provocaram irritabilidade e alergenicidade sobre mucosa, assim como não causaram danos e alterações dérmicas em modelo *ex vivo* com pele de porco, sugerindo a sua segurança para uso tópico;
- ✓ O derivado quinolínico 2-metil-4-fenil-quinolina não induziu genotoxicidade em linfócitos humanos mesmo em uma concentração mais elevada que sua CIM, sugerindo provável segurança para o seu uso sistêmico;
- ✓ A taxa de sobrevivência das larvas de *T. molitor* permaneceu alta após 48 h de exposição aos compostos 2-metil-4-fenil-quinolina e *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida, sugerindo segurança para o seu uso a nível sistêmico, embora estudos *in vivo* com modelos animais mamíferos ainda sejam necessários;
- ✓ O composto *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida manteve sua ação antifúngica quando incorporado a um sistema formador de filme e a um anfissoma; sugerindo essas formulações como possíveis novas alternativas para o tratamento de infecções fúngicas de pele;
- ✓ A incorporação do composto *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida em um SFF antecipou o início de sua ação fungicida sobre as células dermatofíticas, se comparado com a avaliação das curvas dose-resposta obtidas para a sua forma livre, indicando que este sistema promove uma melhora no potencial fungicida do composto;

✓ A incorporação do composto *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida em um anfissoma retardou o início da ação fungicida do mesmo em relação ao SFF. Assim, é provável que o anfissoma possa promover a liberação do composto de maneira gradativa sobre as células fúngicas, uma vez que, sistemas nanoestruturados apresentam tal característica;

✓ O sistema anfissoma-SFF antecipou o início da ação fungicida do composto *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida, indicando o seu potencial como veículo carreador para a incorporação desta entidade química, com possível aplicabilidade para o desenvolvimento de uma formulação tópica para o tratamento de dermatofitoses;

✓ O derivado 2-metil-4-fenil-quinolina foi eficaz no tratamento de uma infecção onicomicótica realizada em um modelo *ex vivo* utilizando unhas suínas. Este composto reduziu drasticamente a contagem de células fúngicas viáveis sobre este substrato, além de manter a sua eficácia quando incorporado a uma formulação a base de esmalte.

8. PERSPECTIVAS

Como descrito neste estudo, diversas estratégias de combate às infecções fúngicas vêm sendo realizadas nas últimas décadas. Essas infecções tornaram-se um problema de saúde pública mundial principalmente devido a seleção de isolados fúngicos resistentes à terapia disponível, requerendo diversos investimentos nesta área a fim de contrapor esse cenário. A prospecção por novas entidades químicas capazes de sobrepor a problemática exposta é extremamente necessária e mostra-se como uma forte estratégia de combate para tal fim. Neste estudo, os compostos *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida e 2-metil-4-fenil-quinolina demonstraram forte potencial como possíveis candidatos a novas terapias para o tratamento de infecções causadas por *Candida* spp., dermatófitos e *Fusarium* spp. Nesse sentido, despertando o interesse científico em prosseguir com estudos futuros envolvendo esses compostos, tais como:

- ✓ Investigar o possível mecanismo de ação antifúngico a nível de núcleo celular para o derivado de cloroacetamidas e para o composto quinolínico através do ensaio cometa utilizando leveduras de *Saccharomyces* spp.;
- ✓ Avaliar o grau de permeação em pele humana devido à exposição ao derivado de cloroacetamidas e do composto quinolínico;
- ✓ Avaliar o possível grau de toxicidade dérmica e características sensorias do sistema formador de filme e do anfiósmo sobre a pele humana após determinado período de exposição;
- ✓ Avaliar a toxicidade sistêmica do composto quinolínico através de testes *in vivo* utilizando animais mamíferos;
- ✓ Estudos de simulações de modelagem farmacocinética/farmacodinâmica (pk/pd) a partir dos resultados obtidos através da análise das curvas de tempo de morte celular, tanto para o derivado de cloroacetamida quanto para o derivado quinolínico, permitindo uma estimativa dos efeitos *in vivo* em resposta à ação antifúngica desses compostos;
- ✓ Avaliação da eficácia do composto *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida sobre modelo *ex vivo* de infecção onicomicótica causada por *Fusarium* spp.;
- ✓ Determinar a eficácia do composto *N*-(4-bromofenil)-2-cloroacetamida em *Drosophyla melanogaster* infectadas com *Fusarium* spp. como modelo de infecção *in vivo*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addla D, Jallapally A, Gurram D, Yogeewari P, Sriram D, Kantevari S. 2014. Design, synthesis and evaluation of 1,2,3-triazole-adamantylacetamide hybrids as potent inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg Med Chem Lett*. 24(8):1974-9.
- Afzal O, Kumar S, Haider MR, Ali MR., Kumar R, Jaggi M, Bawa S. 2015. A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline. *Eur J Med Chem*. 97:871-90.
- Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. 2009. Species identification and antifungal susceptibility patterns of species belonging to *Aspergillus* section *Nigri*. *Antimicrob Agents Chemother*. 53(10): 4514-17.
- Al-Hatmi AMS, Curfs-Breuker I, De Hoog GS, Meis JF, Verweij PE. 2017. Antifungal susceptibility testing of *Fusarium*: a practical approach. *J Fungi*. 3(2):19.
- Al-Hatmi AMS, Bonifaz A, Ranque S, Sybren de Hoog G, Verweij PE, Meis JF. 2018. Current antifungal treatment of fusariosis. *Int J Antimicrob Agents*. 51(3):326–32.
- Ali R, Siddiqui N. 2015. New benzo[d]thiazol-2-yl-aminoacetamides as potential anticonvulsants: synthesis, activity and prediction of molecular properties. *Arch Pharm*. 348 (4):254-65.
- Alkeswani A, Duncan JR, Theos 2019. A. *tinea faciei* starting at day two of life. *Pediatr Dermatol*. 36(1):20–2.
- Allen D, Wilson D, Drew R, Perfect J. 2015. Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 13(6):787–8.
- Ammar HO, Ghorab M, Mahmoud AA, Makram TS, Ghoneim AM. 2013. Rapid pain relief using transdermal film forming polymeric solution of ketorolac. *Pharm Dev Technol*. 18(5):1005-16.
- Amrutkar SV, Khairnar MV, Ranawat MS, Wagh DN. 2012. Synthesis, characterization and biological evaluation of 2-[(2'-ethyl-4'-oxoquinazolin-3'-yl)amino-N-aryl acetamide derivatives. *Int J Drug Design Disc*. 3(3):846-50.
- Antinori S, Milazzo L, Sollima S, Galli M, Corbellino M. 2016. Candidemia and invasive candidiasis in adults: a narrative review. *Eur J Intern Med*. 34:21–8.
- ANVISA [website](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3285739/RDC_29_2012_.pdf/c74fbb1a-c98b4899-81ae-7ad9e18d807e). Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3285739/RDC_29_2012_.pdf/c74fbb1a-c98b4899-81ae-7ad9e18d807e. Acesso em 05 de fevereiro de 2019.
- Aoki T, O'Donnell K, Geiser DM. 2014. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: Current status and future challenges. *J Gen Plant Pathol*. 80(3):189–1.

- Arce M, Gutiérrez-Mendoza D. 2017. Fungal paronychia: clinical, diagnosis and treatment aspects. *Curr Fungal Infect Rep.* 11(3):98–3.
- Arendrup MC, Patterson TF. 2017. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *J Infect Dis.* 216(3):S445-51
- Arendrup MC. 2014. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clin Microbiol Infect.* 20(6):42–8.
- Aschale M. 2012. Synthesis and antimicrobial evaluation of some novel substituted 2-chloroacetanilides. *Int J ChemTech Res.* 4:1437-41.
- Ashbee HR, Barnes RA, Johnson EM, Richardson MD, Gorton R, Hope WW. 2014. Therapeutic drug monitoring (TDM) of antifungal agents: guidelines from the British society for medical mycology. *J Antimicrob Chemother.* 69(5):1162-76.
- Badiee P, Amirghofran AA, Ghazi Nour M, Shafa M, Nemati MH. 2014. Incidence and outcome of documented fungal endocarditis. *Int Cardiovasc Res J.* 8(4):152–5.
- Bardiot D, Thevissen K, De Brucker K, Peeters A, Cos P, Taborda CP, McNaughton M, Maes L, Chaltin P, Cammue BPA, Marchand A. 2015. 2-(2-Oxo-morpholin-3-yl)-acetamide derivatives as broad-spectrum antifungals agents. *Eur J Med Chem* 58(3):1502-12.
- Barros FMC, Pippi B, Dresch RR, Dauber B, Luciano, SC, Apel MA, Fuentefria AM, Poser GLV. 2013. Antifungal and antichemotactic activities and quantification of phenolic compounds in lipophilic extracts of *Hypericum* spp. native to South Brazil. *Ind Crops Prod.* 44:294-99.
- Batista BG, Dalla Lana DF, Silveira GP, Sá MM, Ferreira M, Russo TVC, Canto RFS, Barbosa FAR, Braga AL, Kaminski TFA, De Oliveira LFS, Machado MM, Lopes W, Vainstein MH, Teixeira ML, Andrade SF, Fuentefria AM. 2017. Allylic selenocyanates as new agents to combat *Fusarium* involved with human infections. *ChemistrySelect.* 2(35):1926-32.
- Been RA, Bernatchez SF, Conrad-Vlasak DM, Asmus RA, Ekholm BP, Parks PJ. 2016. *In vivo* methods to evaluate a new skin protectant for loss of skin integrity. *Wound Repair Regen.* 24(5):851-59.
- Behzadi P, Behzadi E, Ranjbar R. 2014. Dermatophyte fungi: infections, diagnosis and treatment. *SMU Med J.* 1(2):50-2.
- Benhamou RI, Bibi M, Steinbuch KB, Engel H, Levin M, Roichman Y, Berman J, Fridman M. 2017. Real-time imaging of the azole class of antifungal drugs in live *Candida* cells. *ACS Chem Biol.* 12(7):1769–77.
- Boger P. 2003. Mode of action of chloroacetamides and functionally related compounds. *J Pest Sci.* 28(3):324-29.

Bowman JC, Hicks PS, Kurtz MB, Rosen H, Schmatz DM, Liberator PA, Douglas CM. 2002. The antifungal echinocandin caspofungin acetate kills growing cells of *Aspergillus fumigatus* *in vitro*. *Antimicrobi Agents Chemother.* 46(9):3001-12.

Bowmann SM, Free SJ, 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays.* 28(8):799-08.

Brandão LDS, Boniek D, Stoianoff RMA, Da Mata FMR, De Azevedo PRM, Fernandes JV, Andrade VS. 2018. Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida* species among pregnant women attending a school maternity at Natal, Brazil. *Lett Appl Microbiol.* 67(3):285-91.

Brandolt TM, Klafke GB, Gonçalves CV, Bitencourt LR, Martinez AMB, De Mendes JF, Meireles MCA, Xavier MO. 2017. Prevalence of *Candida* spp. in cervical-vaginal samples and the *in vitro* susceptibility of isolates. *Braz J Microbiol* 48(1):145–50.

Butani D., Yewale C., Misra A. 2014. Amphotericin B topical microemulsion: formulation, characterization and evaluation. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 116:351-58.

Campoy S, Adrio JL. 2017. Antifungals. *Biochem Pharmacol.* 133:86-6.

Canela HMS, Cardoso B, Vitali LH, Coelho HC, Martinez R, Ferreira MES. 2018. Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. *Mycoses.* 61(1):11–1.

Carmona EM, Limper AH. 2017. Overview of treatment approaches for fungal infections. *Clin Chest Med.* 38(3):393–02.

Carrillo-Muñoz AJ, Tur-Tur C, Cardenas D, Rojas F, Giusiano G. 2012. Sertaconazole antifungal profile determined by a microdilution method versus nine topical substances against dermatophyte fungi. *Chemotherapy.* 58(5):399-04.

Casal JJ, Asís SE. 2017. Natural and synthetic quinoline derivatives as antituberculosis agentes. *Austin Tuberc Res Treat.* 2(1):1007.

Cauchie M, Desmet S, Lagrou K. 2017. *Candida* and its dual lifestyle as a commensal and a pathogen. *168(9-10):802-10.*

Chandra J, Ghannoum MA. (2017). Flucytosine treatment and resistance mechanisms. In: Mayers D, Sobel J, Ouellette M, Kaye K, Marchaim D. (eds) *Antimicrobial Drug Resistance.* Springer, Cham. p 407-13.

Chen KL, Chien MM, Lu CL, Chiu HC. 2017. Zoophilic *tinea faciei*. *J Pediatr.* 182:395–95.

Cheng KC, Demirci A, Catchmark JM. 2011. Pullulan: biosynthesis, production, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 92:29-4.

Cholo MC, Mothiba MT, Fourie B, Anderson R. 2017. Mechanisms of action and therapeutic efficacies of the lipophilic antimycobacterial agents clofazimine and bedaquiline. *J Antimicrob Chemother.* 72(2): 338-53.

Choudhary NS, Kotecha H, Saraf N, Gautam D, Saigal S. 2014. Terbinafine induced liver injury: a case report. *J Clin Exp Hepatol.* 4(3):264–65.

Chu XM, Wang C, Liu W, Liang LL, Gong KK, Zhao CY, Sun KL. 2019. Quinoline and quinolone dimers and their biological activities: an overview. *Eur J Med Chem.* 161: 101-17

Chung PY, Bian ZX, Pun HY, Dessy C, Chan AS, Chui CH, Tang JC, Lam KH. 2015. Recent advances in research of natural and synthetic bioactive quinolines. *Future Med. Chem.* 7(7):947–67.

Clancy CJ, Nguyen MH. 2013. Finding the “missing 50%” of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis.* 56(9):1284–92.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard, 3rd edn. Wayne, PA: CLSI Document M27–A3. Clinical Laboratory Standards Institute.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous fungi; Approved Standard, 2ed edn. Wayne, PA: CLSI Document M38-A2. Clinical Laboratory Standards Institute.

Coimbra ES, Antinarelli LM, Silva NP, Souza IO, Meinel RS, Rocha MN, Soares RP, Da Silva AD. 2016. Quinoline derivatives: synthesis, leishmanicidal activity and involvement of mitochondrial oxidative stress as mechanism of action. *Chem Biol Interac.* 260:50-7.

Coleman NW, Fleckman P, Huang JI. 2014. Fungal nail infections. *J Hand Sur.* 39(5):985-88.

Collin F, Karkare S, Maxwell A. 2011. Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 92(3):479–87.

Corrêa JCR, Salgado HRN. 2011. Review of fluconazole properties and analytical for its determination. *Crit Rev Anal Chem.* 41(2):124-32.

Costa JEF, Neves RP, Delgado MM, Lima-Neto RG, Morais VMS, Coêlho M. 2015. Dermatophytosis in patients with human immunodeficiency virus infection: clinical aspects and etiologic agents. *Acta Trop.* 150:111–5.

Crowley PD, Gallagher HC. 2014. Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. *J Appl Microbiol.* 117(3):611-17.

- Dabas Y, Bakhshi S, Xess I. 2016. Fatal cases of bloodstream infection by *Fusarium solani* and review of published literature. *Mycopathologia*. 181(3-4):291–96.
- Dalla Lana DF, Batista BG, Alves SH, Fuentefria AM. 2016. Dermatophytoses: etiologic agents, clinical forms, therapy and new perspectives of treatment. *Clin Biomed Res*. 36(4):230-41.
- Das S, Sharma S, Mahapatra S, Sahu SK. 2015. *Fusarium* keratitis at a tertiary eye 532 care centre in India. *Int Ophthalmol* 35:387-93.
- Daudt RM, Back PI, Cardozo NSM, Marczak LDF, Guerreiro ICK. 2015. Pinhão starch and coat extract as new natural cosmetic ingredients: topical formulation stability and sensory analysis. *Carbohydr Polym*. 134:573–80.
- De Hoog G.S. 2017. Dukik K., Monod M. Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. *Mycopathologia*, 182.pp. 5-31.
- De Souza PC, Morey AT, Castanheira GM, Bocate KP, Panagio LA, Ito FA, Almeida RS. 2015. *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. *J. Microbiol Methods*. 118:182-86.
- Debourgogne A, Dorin J, Machouart M. 2016. Emerging infections due to filamentous fungi in humans and animals: only the tip of the iceberg? *Environ Microbiol Rep*. 8 (3):332-42.
- Del Rosso JQ. 2014. The role of topical antifungal therapy for onychomycosis and the emergence of newer agents. *J Clin Aesthet Dermatol*. 7(7):10-8.
- Della Pepa R, Picardi M, Sorà F, Stamouli M, Busca A, Candoni A, Delia M, Fanci R, Perriello V, Zancanella M, Nosari A, Salutari P, Marchesi F, Pane F, Pagano L. 2016. Successful management of chronic disseminated candidiasis in hematologic patients treated with high-dose liposomal amphotericin B: a retrospective study of the SEIFEM registry. *Support Care in Cancer*. 24(9):3839–45.
- Denning DW, Bromley MJ. 2015. Infectious disease: How to bolster the antifungal pipeline. *Science*. 347(6229):1414–16.
- Desai NC, Dodiya AM. 2014. Synthesis, characterization and antimicrobial screening of quinoline based quinazolinone-4-thiazolidinone heterocycles. *Arab J Chem*. 7(6): 906–13.
- Dev T, Saginatham H, Sethurama G. 2017. Tinea faciei: challenges in the diagnosis. *J Pediatr*. 187:331.
- Diba K, Makhdoomi K, Nasri E, Vaezi A, Javidnia J, Gharabagh DJ, Jazanif NH, Chavshing AR, Badieeh P, Badalie H, Fakhim H. Emerging *Candida* species isolated from renal transplant recipients: Species distribution and susceptibility profiles. *Microb Pathog*. 125:240-45.

Diedrich D. 2018. **Síntese e avaliação da atividade biológica de derivados quinolínicos**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Diongue K, Ndiaye M, Seck MC, Diallo MA, Badiane AS, Ndiaye D. 2017. Onychomycosis caused by *Fusarium* spp. in Dakar, Senegal: epidemiological, clinical, and mycological study. *Dermatol Res Pract*. 2017:4.

Doi AM, Pignatari ACC, Edmond MB, Marra AR, Camargo LFA, Siqueira RA, Da Mota VP, Colombo AL. 2016. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a brazilian national surveillance program. *Plos One*. 11(1):e0146909.

Doke SK, Dhawale SC. 2015. Alternatives to animal testing: a review. *Saudi Pharm. J*. 23(3):223-29.

Donders GGG, Sobel JD. 2017. *Candida* vulvovaginitis: A store with a butterfly and a show window. 60(2):70-2.

Eckermann C, Matthes B, Nimtz M, Reiser V, Lederer B, Boger P, Schroder P. 2003. Covalent binding of chloroacetamide herbicides to the active site cysteine of plant type III polyketide synthases. *Phytochemistry*. 64(6):1045-54.

EI-Gamal KMA, Sherbiny FF, EI-Morsi AM, Abu-El-khair HE, Eissa IH, EI-Sebaei MM. 2015. Design, synthesis and antimicrobial evaluation of some novel quinoline derivatives. *Pharm Pharmacol Int J* 2(5):165-77

Elsayed MM. 2015. Development of topical therapeutics for management of onychomycosis and other nail disorders: a pharmaceutical perspective. *J Control Release*. 199:132–4.

EI-Shehry MF, Ghorab MM, Abbas SY, Fayed EA, Shedid SA, Ammar YA. 2018. Quinoline derivatives bearing pyrazole moiety: synthesis and biological evaluation as possible antibacterial and antifungal agents. *Eur J Med Chem*. 143:463-73.

EI-Zawawy NA, Ali SS. 2016. Pyocyanin as anti-tyrosinase and anti *tinea corporis*: A novel treatment study. *Microb Pathog*. 100, 213–220.

Ersal T, Al-Hatmi ASM, Cilo DB, Curfs-Breuker I, Meis JF, Özkalemkaş F, Ener B, Van Diepeningen, AD. 2015. Fatal disseminated infection with *Fusarium petroliphilum*. *Mycopathologia*. 179(1-2):119–124.

Escalante A, Gattuso M., Perez P., Zacchino S. 2008. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B Isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *J Nat Prod*. 71(10):1720-1725.

Farias R, Pinho L, Santos R. 2017. Epidemiological profile of infectious keratitis. *Rev Bras Oftalmol*. 76(3):116-20.

- Farmakiotis D, Kontoyiannis D.P. 2017. Epidemiology of antifungal resistance in human pathogenic yeasts: current viewpoint and practical recommendations for management. *Int J Antimicrob Agents*. 50(3):318-24.
- Faway E, De Rouvroit CL., Poumay Y. 2018. *In vitro* models of dermatophyte infection to investigate epidermal barrier alterations. *Exp Dermatol*. 27(8):915–22.
- Feldstein S, Totri C, Friedlander SF. 2015. Antifungal therapy for onychomycosis in children. *Clin Dermatol*. 33(3):333–39.
- Fenech M. 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat. Res.*, v. 455, p. 81-95.
- Fike JM, Kollipara R, Alkul S, Stetson CL. 2018. Case report of onychomycosis and *Tinea corporis* due to *Microsporum gypseum*. *J Cutan Med Surg*. 22(1):94–6.
- Folk A, Cotoraci C, Balta C, Suciu M, Herman H, Boldura OA, Dinescu S, Paiusan L, Ardelean A, Hermenean A. 2016. Evaluation of hepatotoxicity with treatment doses of flucytosine and amphotericin B for invasive fungal infections. *BioMed Res Int*. 2016:1-9.
- Fortwendel JR, Juvvadi PR, Perfect BZ, Rogg LE, Perfect JR, Steinbach WJ. 2010. Transcriptional regulation of chitin synthases by calcineurin controls paradoxical growth of *Aspergillus fumigatus* in response to caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother*. 54(4):1555-63.
- Food and Drug Administration (FDA). 1987. Cosmetic product formulation data for chloroacetamide. FDA Computer Printout.
- Frederiksen K, Guy RH, Petersson P. 2016. The potential of polymeric film-forming systems as sustained delivery platforms for topical drugs. *Expert Opin Drug Deliv* 13(3):349-60.
- Fuentefria AM, Andrade SF, Silveira GP, Kulkamp I, Pippi B, Machado MM, De Oliveira LFS, Cruz L, Frizzo C, Martins AF. 2016. Caracterização do perfil de suscetibilidade a antifúngicos azólicos de uma micoteca como embasamento para estratégias de combate à candidemias. *J Inf Control*. 5(4):1-11.
- Fuentefria AM, Pippi B, Dalla Lana DF, Donato KK, De Andrade SF. 2018. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. *Lett Appl Microbiol*. 66(1):2–13.
- Fukuda EK, Vasconcelos AFD, Matias AC, Barbosa ADM, Dekker RF, Da Silva MLC. 2009. Fungal cell wall polysaccharides: purification and characterization. *Semina: Ciênc Agrar*. 30(1):117-34.
- Fuller LC, Barton RC, Mustapa MFM, Proudfoot LE, Punjabi SP, Higgins EM. 2014. British Association of Dermatologists' guidelines for the management of *tinea capitis* 2014. *Br J Dermatol*. 171(3):454–63.

Gaba B, Fazil M, Khan S, Ali A, Baboota S, Ali J. 2015. Nanostructured lipid carrier system for topical delivery of terbinafine hydrochloride. *Bull Fac Pharm Cairo Univ.* 53(2):147–59.

Galletti J, Negri M, Grassi FL, Kioshima-Cotica ÉS, Svidzinski TI. 2015. *Fusarium* spp. is able to grow and invade healthy human nails as a single source of nutrients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 34(9):1767-72.

Garces HG, Hrycyk MF, Giacobino J, Machado GC, Arantes TD, Theodoro RC, Bosco SMG, Bagagli E. 2016. Molecular identification and phylogenetical analysis of dermatophyte fungi from Latin America. *Mycoses.* 59(12):787–97.

Garcia-Cuesta C, Sarrion-Pérez MG, Bagán JV. 2014. Current treatment of oral candidiasis: a literature review. *J Clin Exp Dent.* 6(5):e576–82.

Garnica M da Cunha MO, Portugal R, Maiolino A, Colombo AL, Nucci M. Risk factors for invasive fusariosis in patients with acute myeloid leukemia and in hematopoietic cell transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 60(6):875–80.

Georgiadou SP, Velegraki A, Arabatzis M, Neonakis I, Chatzipanagiotou S, Dalekos GN, Petinaki E. 2014. Cluster of *Fusarium verticillioides* bloodstream infections among immunocompetent patients in an internal medicine department after reconstruction works in Larissa, central Greece. *J Hosp Infect.* 86(4):267–71.

Ghannoum M. 2015. Azole resistance in dermatophytes: prevalence and mechanism of action. *J Am Podiatr Med Assoc.* 106(1):79-6.

Ghasemiyeh P, Mohammadi-Samani S. 2018. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages. *Res Pharm Sci.* 13(4): 288–03.

Giavini E, Menegola E. 2010. Are azole fungicides a teratogenic risk for human conceptus? *Toxicol Lett.* 198(2):106–11.

Giolo MP, Svidzinski TIE. 2010. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da Candidemia. *J Bras Patol Med Lab.* 46(3):225-34.

Global Action Fund for Fungal Infection. Improving outcomes for patients with fungal infections across the world: a roadmap for the next decade. Março, 2019. http://gaffi.org/wp-content/uploads/GAFFI_Road_Map_interactive-final0415.

Glynn M, Joa W, Minowa K, Sanada H, Nejishima H, Matsuuchi H, Okamura H, Pillaia R, Mutter L. 2015. Efinaconazole: developmental and reproductive toxicity potential of a novel antifungal azole. *Reprod Toxicol.* 52:18–5.

Gobbato AAM, Babadópulos T, Gobbato CARS, Ilha JO, Antunes NJ, Moreno RA, Campos R, De Nucci G. 2019. Comparison of dapaconazole with miconazole in the treatment of *tinea cruris*. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 33(1):e18-20.

- Gonçalves B, Ferreira C, Alves CT, Henriques M, Azeredo J, Silva S. 2015. Vulvovaginal candidiasis: epidemiology, microbiology and risk factors. *Crit Rev Microbiol.* 42(6):905–27.
- 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.
- Goyal R, Macri LK, Kaplan HM, Kohn J. 2016. Nanoparticles and nanofibers for topical drug delivery. *Journal of Controlled Release.* v. 240, p. 77–92.
- Graser Y, Monod M, Bouchara JP, Dukik K, Nenoff P, Kargl A, Kupsch C, Zhan P, Packeu A, Chaturvedi V, De Hoog S. 2018. New insights in dermatophyte research. *Med. Mycol.* 56(1):S2–9.
- Guarro J. 2013. Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 32(12):1491–00.
- Guerreiro ICK, Bianchin MD, Poletto F, Prebianca G, Immich MF. 2018. Nanocarreador, composição, processo de obtenção e uso do mesmo para a preparação de uma composição farmacêutica, nutracêutica, cosmética ou com aplicação em agropecuária. BR 10 2018 067690 3, 2018.
- Gupta AK, Paquet M, Simpson FC. 2013. Therapies for the treatment of onychomycosis. *Clin Dermatol,* 31(5):544-54.
- Gupta AK, Mays RR, Versteeg SG, Piraccini BM, Takwale A, Shemer A, Babaev M, Grover C, Di Chiacchio NG, Taborda PRO, Taborda VBA, Shear NH, Piguet V, Tosti A. 2018. Global perspectives for the management of onychomycosis. *Int J Dermatol.* doi.org/10.1111/ijd.14346.
- Gupta C, Jongman M, Das S, Sneha K, Bhattacharya SN, Seyedmousavi S, Van Diepeningen AD. 2016. Genotyping and *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Fusarium* Isolates from onychomycosis in India. *Mycopathologia.* 181(7-8):497–04.
- Gyarmati P, Kjellander C, Aust C, Song Y, Öhrmalm L, Giske CG. 2016. Metagenomic analysis of bloodstream infections in patients with acute leukemia and therapy-induced neutropenia. *Sci. Rep.* 6(1):23532.
- Hani U, Shivakumar HG, Vaghela R, Osmani RA, Shrivastava A, 2015. Candidiasis: a fungal infection - current challenges and progress in prevention and treatment. *Infect Disord Drug Targets.* 15(1):42-2.
- Harte AJ, Gunnlaugsson T. 2006. Synthesis of α -chloroamides in water. *Tetrahedron Lett.* 47(35):6321-24.
- Hassan AS, Al-Hatmi AMS, Shobana CS, Van Diepeningen AD, Kredics L, Vágvölgyi C, Homa M, Meis JF, De Hoog GS, Narendran V, Manikandan P, IHFK Working Group. 2015. Antifungal susceptibility and phylogeny of opportunistic members of the genus *Fusarium* causing human keratomycosis in south India. *Med Mycol* 54(3): 287–94.

- Hay RJ. 2017. *Tinea Capitis*: current status. *Mycopathologia*. 182(1-2):87–3.
- Hayette MP, Sacheli R. 2015. Dermatophytosis, trends in epidemiology and diagnostic approach. *Curr Fungal Infect Rep*. 9(3):164–79.
- Hayette MP, Seidel L, Adjetey C, Darfouf R, Wéry M, Boreux R, Sacheli R, Melin P, Arrese J. 2019. Clinical evaluation of the DermaGenius® Nail real-time PCR assay for the detection of dermatophytes and *Candida albicans* in nails. *Med Mycol*. 57(3):277-83.
- Hope WW, Taberner L, Denning DW, Anderson MJ. Molecular mechanisms of primary resistance to flucytosine in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 48(11):4377–86.
- Hoversten P, Otaki F, Katzka DA. 2019. Course of esophageal candidiasis and outcomes of patients at a single center. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 17(1):200-02.
- Ingham CJ, Schneeberger PM. 2012. Microcolony Imaging of *Aspergillus fumigatus* treated with echinocandins reveals both fungistatic and fungicidal activities. *PLoS One*. 7(4): e35478.
- Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM). 2010. The hen's egg test–chorioallantoic membrane (HET-CAM) test method. Research Triangle Park: National Toxicology Program.
- Ishida K, Rodrigues JCF, Cammerer S, Urbina J, Gilbert I, de Souza W, Rozental S. 2011. Synthetic arylquinuclidine derivatives exhibit antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilopsis*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 10(3): 1-10.
- Jablonkai I. 2003. Alkylating reactivity and herbicidal activity of chloroacetamides. *Pest Manag Sci*. 59(4):443-50.
- Jain NP, Upasani CD, Kalkotwar RS, Jain UN. 2013. Synthesis and anti-inflammatory activity of N-(Alkyl or Aryl)-2-(1H-benzotriazol-1-yl)acetamide derivatives. *Res J Pharm Biol Chem Sci*. 4:1470-80.
- Jampilek J. 2016. Potential of agricultural fungicides for antifungal drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 11(1):1-9.
- Jensen RH, Astvad KMT, Silva LV, Sanglard D, Jørgensen R, Nielsen KF, Mathiasen EG, Doroudian G, Perlin DS, Arendrup MC. 2015. Stepwise emergence of azole, echinocandin and amphotericin B multidrug resistance *in vivo* in *Candida albicans* orchestrated by multiple genetic alterations. *J Antimicrob Chemother*. 70(9):2551–55.
- John AM, Schwartz RA, Janniger CK. 2018. The kerion: an angry *tinea capitis*. *Int J Dermatol*. 57(1)3–9.

Joubert LM, Ferreira JAG, Stevens DA, Cegelski L. 2015. *Aspergillus fumigates* biofilms: a comparison of processing techniques for scanning electron microscopy of fungal mycelium and extracellular matrix. *Microsc. Microanal.* 21(S3):935-36.

Junior JAO, Shiota LM, Chiavacci LA. 2014. Development of organic-inorganic polymeric film formers for controlled drug release and wound care. *Matéria.* 19(1):24-2.

Kadri D, Crater AK, Lee H, Solomon VR, Ananvoranich S. 2014. The potential of quinoline derivatives for the treatment of *Toxoplasma gondii* infection. *Exp Parasitol.* 145:135-44.

Kano R, Hsiao YH, Han HS, Atsuhiko CC, Hasegawa A, Kamata H. Resistance mechanism in a terbinafine-resistant strain of *Microsporum canis*. *Mycopathologia.* 183(3):623–27.

Karier P, Kraus G, Kolbe I. 2017. Metazachlor traces in the main drinking water reservoir in Luxembourg: a scientific and political discussion. *Environ Sci Eur.* 29(1):25.

Kathe K, Kathpalia H. 2017. Film forming systems for topical and transdermal drug delivery. *Asian J Pharm Sci.* 12(6):487-97.

Katke SA, Amrutkar SV, Bhor RJ, Khairnar MV. 2011. Synthesis of biologically active 2-chloro-N-alkyl/arylacetamide derivatives. *Int J Pharm Sci Res.* 2(7):148-56.

Kaufman DA, Coggins SA, Zanelli SA, Weitkamp JH. 2017. Congenital cutaneous candidiasis: prompt systemic treatment is associated with improved outcomes in neonates. *Clin Infect Dis.* 64(10):1387–95.

Kaushik N, Pujalte GGA, Reese ST. 2015. Superficial fungal infections. *Prim Care Clin Office Pract.* 42(4):501–16.

Keri RS, Patil SA. 2014. Quinoline: a promising antitubercular target. *Biomed Pharmacother.* 68(8):1161–75.

Khatri PK, Kachhawa D, Maurya V, Meena S, Bora A, Rathore L, Seervi KL, Khullar S. 2017. Antifungal resistance pattern among dermatophytes in western Rajasthan. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 6(7):499-09.

Khosravi AR, Shokri H, Vahedi G. 2016. Factors in etiology and predisposition of adult *tinea capitis* and review of published literature. *Mycopathologia.* 181(5-6):371–78.

Kim JH, Williams K. 2014. Posaconazole salvage treatment for invasive fungal infection. *Mycopathologia.* 178(3-4):259-65.

Kneale M, Bartholomew JS, Davies E, Denning DW. 2016. Global access to antifungal therapy and its variable cost. *J Antimicrob Chemother.* 71(12):3599-06.

- Kolachana P, Smith MT. 1994. Induction of kinetochore-positive micronuclei in human lymphocytes by the anti-fungal drug griseofulvin. *Mutat Res.* 322(3):151-59.
- Kouznetsov VV, Ruíza FAJ., Méndeza LYV, Gupta MP. 2012. Simple C-2-substituted quinolines and their anticancer activity. *Lett Drug Des Discov.* 9(7): 680.
- Kovacic P, Cooksy A. 2012. Novel, unifying mechanism for amphotericin B and other polyene drugs: electron affinity, radicals, electron transfer, autoxidation, toxicity, and antifungal action. *Med Chem Commun.* 2012(3):274-80.
- Kumar S, Bawa S, Drabu S, Gupta H, Machwal L, Kumar R. 2011. Synthesis, antidepressant and antifungal evaluation of novel 2-chloro-8-methylquinoline amine derivatives. *Eur J Med Chem.* 46(2):670–75.
- Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heinz-Vaccari EM, Melo NT. 2002. **Tratado de Micologia Médica.** 9^a ed. Rio de Janeiro: Sarvier.
- LaFleur MD, Lucumi E, Napper AD, Diamond SL, Lewis K. 2011. Novel high-throughput screen against *Candida albicans* identifies antifungal potentiators and agents effective against biofilms. *J Antimicrob Chemother.* 66(4):820–26.
- Lainhart W. 2018. *Fusarium* spp., a genus of common plant pathogens that can cause devastating, opportunistic human disease. *Clin Microbiol Newsl.* 40(1):1-5.
- Lane ME. 2013. Skin penetration enhancers. *Int J Pharm.* 447(1-2):12-21.
- Laurence MH, Walsh JL, Shuttleworth LA, Robinson DM, Johansen RM, Petrovic T, VuL TTH, Burgess LW, Summerell BA, Liew ECY. 2015. Six novel species of *Fusarium* from natural ecosystems in Australia. *Fungal Divers.* 77(1):349–66.
- Lavorato SN, Duarte MC, De Andrade PHR, Coelho EAF, Alves RJ. 2017. Synthesis, antileishmanial activity and QSAR studies of 2-chloro-*N*-arylacetamides. *Braz J Pharm Sci.* 53(1):e16067.
- Lee W, Lee DG. 2018. A novel mechanism of fluconazole: fungicidal activity through dose-dependent apoptotic responses in *Candida albicans*. *Microbiology.* 164(2):194-04.
- Leslie JF, Summerell BA. 2006. **The *Fusarium* laboratory manual.** Nova Jersey. Blackwell Press.
- Lewis RE. 2011. Current concepts in antifungal pharmacology. *Mayo Clin Proc.* 86(8):805–17.
- Liberato NA, Simões JB, Silva PS, Da Silva CJ, Modolo LV, De Fátima A, Fernandes SA. 2017. Quinolines: microwave-assisted synthesis and their antifungal, anticancer and radical scavenger properties. *Bioorg Med Chem.* 25(3):1153–62.
- Liebert MA. 1991. Final report on the safety assessment of chloroacetamide. *J Am Coll Toxicol.* 10(1):21-2.

- Lipinski CA. 2004. Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. *Drug Discov Today Technol.* 1(4):337-41.
- Liu J, Warshaw EM. 2014. Allergic contact dermatitis from ketoconazole. *Cutis.* 94(3):112-4.
- Liu K, Yan J, Sachar M, Zhang X, Guan M, Xie W, Ma X. 2015. A metabolomic perspective of griseofulvin-induced liver injury in mice. *Biochem Pharmacol.* 98(3):493–01.
- Liu X, Testa B, Fahr A. 2011. Lipophilicity and its relationship with passive drug permeation. *Pharm Res.* 28(5):962–77.
- Lombard L, Van der Merwe NA, Groenewald JZ, Crous PW. 2015. Generic concepts in *Nectriaceae*. *Stud Mycol.* 80, 189–245.
- Lopalco A, Denora N. (2018). Nanoformulations for Drug Delivery: Safety, Toxicity, and Efficacy. In: Nicolotti O. (eds) *Computational Toxicology. Methods in Molecular Biology*, vol 1800. Human Press, New York, p. 347-365.
- Lourenço AG, Ribeiro AERA, Nakao C, Motta ACF, Antonio LGL, Machado AA, Komesu MC. 2017. Oral *Candida* spp. carriage and periodontal diseases in HIV-infected patients in Ribeirão Preto, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 59:e29.
- Lubke J, Auw-Hadrach C, Meyer-Ter-Vehn T, Emrani E, Reinhard T. 2016. *Fusarium* 530 keratitis with dramatic outcome. *Ophthalmologe.* doi:10.1007/s00347-016-0303-z.
- Lurati M, Baudraz-Rosselet F, Vernez M, Spring P, Bontems O, Fratti M, Monod M. 2012. Efficacious treatment of non-dermatophyte mould onychomycosis with topical amphotericin B. *Dermatology.* 223(4):289–92.
- Lusiana Reichl S, Muller-Goymann CC. 2013. Infected nail plate model made of human hair keratin for evaluating the efficacy of different topical antifungal formulations against *Trichophyton rubrum* *in vitro*. *Eur J Pharm Biopharm.* 84(3): 599–05.
- Lyu X, Zhao C, Hua H, Yan, Z. 2016. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Des Devel Ther.* 16(10):1161-71
- Machado GRM, Pippi B, Dalla Lana DF, Amaral AP, Teixeira ML, Souza KC, Fuentefria AM. 2016. Reversal of fluconazole resistance induced by a synergistic effect with *Acca sellowiana* in *Candida glabrata* strains. *Pharm Biol.* 54(11):2410-19.
- Maertens JA. History of the development of azole derivatives. 2004. *Clin Microbiol Infect.* 10(1):1-10.
- Mao L, Zhang L, Li H, Chen W, Wang H, Wu S, Guo C, Lu A, Yang G, An L, Abliz P, Meng G. 2014. Pathogenic fungus *Microsporium canis* activates the NLRP3 inflammasome. *Infect Immun.* 82(2):882–92.

- Marco-Contelles J, Gomez-Sanchez E. 2005. New agents with antimycobacterial activity. *Archiv der Pharmazie*. 338(11):562-63.
- Martínez E, Ameen M, Tejada D, Arenas R. 2014. *Microsporium* spp. onychomycosis: disease presentation, risk factors and treatment responses in an urban population. *Braz J Infect Dis*. 8(2):181–86.
- Martinez L, Falson P. 2014. Multidrug resistance ATP-binding cassette membrane transporters as targets for improving oropharyngeal candidiasis treatment. *Adv Cell Mol Otolaryngol*. 2:239-55
- 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.
- Masri SN, Noor SM, Nor LA, Osman M, Rahman MM. 2015. *Candida* isolates from pregnant women and their antifungal susceptibility in a Malaysian tertiary-care hospital. *Pakistan J Med Sci*. 31(3):658–61.
- McAuley WJ, Jones SA, Traynor MJ, Guesné S, Murdan S, Brown MB. 2106. An investigation of how fungal infection influences drug penetration through onychomycosis patient's nail plates. *Eur J Pharm Biopharm* 102:178–84.
- McCarthy MW, Denning DW, Walsh TJ. 2017. Future research priorities in fungal resistance. *J Infect Dis*. 216(3):S485.
- Mcmanus BA, Coleman DC. 2014. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. *Infect Genet Evol*. 21:166-78.
- Meira HC, De Oliveira BM, Pereira IF, Naves MD, Mesquita RA, Santos VR. 2017. Oral candidiasis: a retrospective study of 276 brazilian patients. *J Oral Maxillofac Pathol*. 21(3):351–55.
- Millsop JW, Fazel N. 2016. Oral candidiasis. *Clin Dermatol*. 34(4):487-94.
- Morace G, Perdoni F, Borghi E. 2014. Antifungal drug resistance in *Candida* species. *J Glob Antimicrob Resist*. 2(4):254-59.
- Muadcheingka T, Tantivitayakul P. 2015. Distribution of *Candida albicans* and non-albicans *Candida* species in oral candidiasis patients: correlation between cell surface hydrophobicity and biofilm forming activities. *Arch. Oral Biol*. 60(6):894–01.
- 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.
- Muraosa Y, Oguchi M, Yahiro M, Watanabe A, Yaguchi T, Kamei K. 2017. Epidemical study of *Fusarium* species causing invasive and superficial fusariosis in Japan. *Med Mycol J*. 58(1):e5-13.

Musiol R. 2017. An overview of quinoline as a privileged scaffold in cancer drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 12(6):583–97.

Muzyka BC, Epifanio RN. 2013. Update on oral fungal infections. *Dent Clin North Am.* 57(4):561–81.

Nenoff P, Krüger C, Ginter-Hanselmayer G, Tietz HJ. 2014a. Mycology – an update. part 1: dermatomycoses: causative agents, epidemiology and pathogenesis. *J Dtsch Dermatol Ges.* 12(3):188-09.

Nenoff P, Krüger C, Schaller J, Ginter-Hanselmayer G, Schulte-Beerbühl R, Tietz, HJ. 2014. Mycology - an update part 2: dermatomycoses: clinical picture and diagnostics. *J Der Deutsc.* 12(9):749–77.

Nett JE, Andes DR. 2016. Antifungal agents spectrum of activity, pharmacology, and clinical indications. *Infect Dis Clin N Am* 30(1):51–3.

Nicola AM, Albuquerque P, Paes HC, Fernandes L, Costa FF, Kioshima ES, Abadio AKR, Bocca AL, Felipe MS. 2019. Antifungal drugs: new insights in research & development. *Pharmacol Ther.* 195:21-38.

Nijenhuis-Rosien L, Kleefstra N, Wolfhagen MJ, Groenier KH, Bilo HJ, Landman GW. Laser therapy for onychomycosis in patients with diabetes at risk for foot complications: study protocol for a randomized, double-blind, controlled trial (LASER-1). *Trials.* 16:108.

Nucci F, Nouér SA, Capone D, Anaissie E, Nucci M. 2015. Fusariosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 36(5):706-14.

Nucci F, Nouér SA, Capone D, Nucci M. 2018. Invasive mould disease in haematologic patients: comparison between fusariosis and aspergillosis. *Clin Microbiol Infect.* 24(10):1105.e1-1105.e4.

Oechsler RA, Yamanaka TM, Bispo PJ, Sartori J, Yu MCZ, Melo ASA, Miller D, Hofling-Lima AL. 2013. *Fusarium* keratitis in Brazil: genotyping, in vitro susceptibilities, and clinical outcomes. *Clin Ophthalmol.* 7:1693–01.

Okuyan H, Altin C. 2013. Heart failure induced by itraconazole. *Indian J Pharmacol.* 45(5):524–35.

Onishi A, Iwasaku M, Sato A, Furukawa TA. 2015. Interventions for the management of esophageal candidiasis in immunocompromised patients. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015(11):1-15.

Ortasevic S, Barac A, Pekmezovic M, Tasic S, Ignjatović A, Momčilović S, Stojanović P, Arsenijević VA, Hay R. 2016. The prevalence of *Candida* onychomycosis in southeastern Serbia from 2011 to 2015. *Mycoses.* 59(3):167–72.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Schuster MG, Vazquez JA, Walsh TJ, Zaoutis TE, Sobel JD. 2016. Clinical

practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis* 62(4):e1–50.

Parhizgar AR, Tahghigh A. 2017. Introducing new antimalarial analogues of chloroquine and amodiaquine: a narrative review. *Iran J Med Sci.* 42(2):115–28.

Patel SR, Gangwal R, Sangamwar AT, Jain R. 2015. Synthesis, biological evaluation and 3D QSAR study of 2,4-disubstituted quinolines as anti-tuberculosis agents. *Eur J Med Chem.* 93:511-22.

Patil A, Lakhani P, Majumdar S. 2017. Current perspectives on natamycin in ocular fungal infections. *J Drug Deliv Sci Technol.* 41:e206-12.

Perfect JR. 2016. Is there an emerging need for new antifungals?" *Expert Opin Emerg Drugs.* 21(2):129–31.

Perfect JR. 2017. The antifungal pipeline: a reality check. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16(9):603–16.

Perlin DS. 2015. Echinocandin Resistance in *Candida*. *Clinical Infectious Diseases.* 61(6):S612-17.

Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. 2017. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis.* 17(12):e383-92.

Petersen AB, Konotop G, Hanafiah NHM, Hammershøj P, Raab MS., Krämer A, Clausen MH. 2016. Strategies for improving the solubility and metabolic stability of griseofulvin analogues. *Eur J Med Chem.* 116:210-15.

Pfaller MA, Castanheira M. 2016. Nosocomial candidiasis: antifungal stewardship and the importance of rapid diagnosis. *Med Mycol.* 54, p. 1–2.

Pianalto KM, Alspaugh JA. 2016. New horizons in antifungal therapy. *J Fungi.* 2(4): 1-6.

Pichardo-Geisinger R, Mora DC, Newman JC, Arcury TA, Feldman SR, Quandt SA. 2014. Comorbidity of *tinea pedis* and onychomycosis and evaluation of risk factors in Latino immigrant poultry processing and other manual laborers. *South Med J.* 107(6): 374–9.

Pinheiro AC, Bispo MLF, Souza MVN. 2010. Importance of quinoline nucleus and its derivatives in drug discovery. *Rer Fitos.* 5(3):53-3.

Pippi B, Reginatto P, Machado GRM, Bergamo VZ, Dalla Lana DF, Teixeira ML, Franco LL, Alves RJ, Andrade FA, Fuentefria AM. 2017. Evaluation of 8-hydroxyquinoline derivatives as hits for antifungal drug design. *Med Mycol.* 55(7) :763-73.

- Piraccini, B., Alessandrini, A. 2015. Onychomycosis: A Review. *Journal of Fungi*, 1(1), 30–43.
- Polvi EJ, Li XR, D, Cowen LE. 2015. Opportunistic yeast pathogens: reservoirs, virulence mechanisms, and therapeutic strategies. *Cell Mol Life Sci.* 72(12):2261-87.
- Powell, AM, Gracely E, Nyirjesy P. 2016. Non-*albicans* *Candida* vulvovaginitis: treatment experience at a tertiary care vaginitis center. *J Low Genit Tract Dis.* 20(1):85–9.
- Powers-fletcher MV, Kendall BA, Griffin AT, Hanson KE. 2016. Filamentous fungi. *Microbiol Spectr.*4(3).
- Qiu S, Zhao GQ, Lin J, Wang X, Hu LT, Du ZD, Wang Q, Zhu CC. Natamycin in the treatment of fungal keratitis: a systematic review and Meta-analysis. *Int J Ophthalmol.* 8(3):597–02.
- Rabjohns JLA, Park YD, Dehdashti J, Henderson C, Zelazny A, Metallo SJ, Zheng W, Williamson PR. 2014. A high-throughput screening assay for fungicidal compounds against: *Cryptococcus neoformans*. *J Biomol Screen.* 19(2):270–77.
- Ramos LDS, Barbedo LS, Braga-Silva LA, Dos Santos AL, Pinto MR, Sgarbi DB, 2015. Protease and phospholipase activities of *Candida* spp. isolated from cutaneous candidiasis. *Rev Iberoam Micol.* 32(2):122-25.
- Ray R, Ghosh M, Chatterjee M, Chatterjee N, Banerjee M. 2016. Onychomycosis caused by *Fusarium dimerum*. *J Clin Sci Res.* 5:44-48.
- Revie NM, Iyer KR, Robbins N, Cowen LE. 2018. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Curr Opin Microbiol.* 45:70 076.
- Reyes-Montes MR, Duarte-Escalante E, Martínez-Herrera E, Acosta-Altamirano G, Frías-De León MG. 2017. Current status of the etiology of candidiasis in Mexico. *Rev Iberoam Micol.* 34(4):203–10.
- Richardson JP, Ho J, Naglik Jr. 2018. *Candida*–epithelial interactions. *J Fungi.* 4(1):22.
- Rigopoulos D. (2015) Candidiasis. In: Katsambas AD., Lotti TM, Dessinioti C, D’Erme AM. (eds) *European Handbook of Dermatological Treatments*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Rolston K. 2017. Letter to the editor-chronic disseminated candidiasis. *Support Care Cancer.* 25 (4)1043–44.
- Rosa PD, Nunes A, Borges R, Batista B, Fuentefria AM, Goldani LZ. 2018. *In vitro* susceptibility and multilocus sequence typing of *Fusarium* isolates causing keratitis. *J Mycol Med.* 28(3):482-85.

Rosa PD, Heidrich D, Corrêa C, Scroferneker ML, Vettorato G, Fuentefria AM, Goldani LZ. 2017. Genetic diversity and antifungal susceptibility of *Fusarium* isolates in onychomycosis. *Mycoses*. 60(9):616–22.

Rosanova MT, Brizuela M, Villasboas M, Guarracino F, Alvarez V, Santos P, Finquelievich J. 2016. *Fusarium* spp infections in a pediatric burn unit: nine years of experience. *Braz J Infect Dis*. 20(4):389–92.

Rouzaud C, Lanternier F, Puel A. 2017. Primary immunodeficiencies and dermatophytosis. In: Carvalho A, eds. *Immunogenetics of Fungal Diseases*. (ed) Springer, p.121-133.

Rouzaud C, Hay R, Chosidow O, Dupin N, Puel A, Lortholary O, Lanternier F. 2016. Severe dermatophytosis and acquired or innate immunodeficiency: a review. *J Fungi*. 2(1):4.

Rueda C, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O. 2014. Paradoxical Growth of *Candida albicans* in the presence of caspofungin is associated with multiple cell wall rearrangements and decreased virulence. *Antimicrob Agents Chemother*. 58(2):1071-83.

Rueda C, Puig-Asensio M, Guinea J, Almirante B, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O. 2017. Evaluation of the possible influence of trailing and paradoxical effects on the clinical outcome of patients with candidemia clinical microbiology and infection. *Clin Microbiol Infect*. 23(1):49.e1-8.

Sagatova AA, Keniya MV, Wilson RK, Sabherwal M, Tyndall JDA, Monk BC. 2016. Triazole resistance mediated by mutations of a conserved active site tyrosine in fungal lanosterol 14 α -demethylase. *Sci Rep*. 6:262-13.

Sahni K, Singh S, Dogra S. 2018. Newer topical treatments in skin and nail dermatophyte infections. *Indian Dermatol Online J*. 9(3):149–58.

Sahu JK, Ganguly S, Kaushik A. 2013. Triazoles: a valuable insight into recent developments and biological activities. *Chin J Nat Med*. 11(5):456-65.

Salah HAMS, Al-Hatmi B, Theelen M, Abukamar S, Hashim AD, Van Diepeningen C, Lass-Flörl T, Boekhout M, Almaslamani SJ, Taj- Aldeen. 2015. Phylogenetic diversity of human pathogenic *Fusarium* and emergence of uncommon virulent species. *J Infect*. 71(6):658-66.

Sanglard D. 2016. Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. *Front Med*. 3(11):10.

Sanitá PV, Pavarina AC, Machado AL. 2013. Susceptibility profile of a Brazilian yeast stock collection of *Candida* species isolated from subjects with *Candida*-associated denture stomatitis with or without diabetes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 116(5):562-69.

Sant DG, Tupe SG, Ramana CV, Deshpande MV. 2016. Fungal cell membrane-promising drug target for antifungal therapy. *J Appl Microbiol.* 121(6):1498-10.

Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Giannini MJS. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol.* 62(1):10-4.

Sassi C, Stanzani M, Lewis RE, Vianelli N, Tarsi A, Poerio A., Cavo M, Battista G. 2017. Radiologic 194 findings of *Fusarium* pneumonia in neutropenic patients. *Mycoses.* 60(2):73-8.

Sav H, Baris A, Turan D, Altinbas R, Sen S. 2018. The frequency, antifungal susceptibility and enzymatic profiles of *Candida* species in cases of onychomycosis infection. *Microb Pathog.* 116:257–62.

Saxena P, Sharma R, Hooda M. 2017. A review on superficial fungal infections: clinical symptoms and treatment. *World J Pharm Pharm Sci.* 6(8)646-58.

Schaller M, Friedrich M, Papini M, Pujol RM, Veraldi S. 2016. Topical antifungal-corticosteroid combination therapy for the treatment of superficial mycoses: conclusions of an expert panel meeting. *Mycoses.* 59(6):365–73.

Schmid W. 1975. The Micronucleus Test. *Mut. Res.* v. 31, p. 09-15.

Schneider P, Schneide G. 2017. Privileged Structures Revisited. *Angew Chem Int Ed Engl.* 56(27):7971-74.

Scorzoni L, De Paula e Silva ACA, Marcos CM, Assato PA, De Melo CAM, De Oliveira HC, Costa-Orlandi CB. 2017. Antifungal therapy: new advances in the understanding and treatment of mycosis. *Front Microbiol.* 8:36.

Seidl HP, Jäckel A, Müller J, Schaller M, Borelli C, Polak A. 2015. Sporidial effect of amorolfine and other antimycotics used in the therapy of fungal nail infections. *Mycoses.* 58(10):610–19.

Serefhanoglu K, Timurkaynak F, Can F, Cagir U, Arslan H, Ozdemir FN. 2012. Risk factors for candidemia with non-*albicans* *Candida* spp. in intensive care unit patients with end-stage renal disease on chronic hemodialysis. *J Formos Med Assoc.* 111(6):325-32.

Shemer A, Babaev M. 2018. Fungal infections (*onychomycosis*, *tinea pedis*, *tinea cruris*, *tinea capitis*, *tinea manuum*, *tinea corporis*, different *Candida* infections, and *pityriasis versicolor*) and mycological laboratory analyses. In: Tur E., Maibach H. (eds) *Gender and Dermatology*. Springer, Cham 18, p.235-242.

Shemer A, Daniel R, Rigopoulos D, Farhi R. Babaev M. 2017. Variability in systemic treatment efficacy for onychomycosis: information that clinical studies do not impart to the office dermatologist. *Skin Appendage Disord.* 4(3):141–44.

- Shen T, Huang S. 2016. Repositioning the old fungicide ciclopirox for new medical uses. *Curr Pharm Des.* 22(28):4443-50.
- Sheng C, Zhang W. 2011. New lead structures in antifungal drug discovery. *Curr Med Chem.* 18(5):733–66.
- Shibata Y, Hagihara M, Kato H, Kawasumi N, Hirai J, Nishiyama N, Asai N, Koizumi Y, Yamagishi Y, Matsuura K, Mikamo H. 2017. Caspofungin versus micafungin in the incidence of hepatotoxicity in patients with normal to moderate liver failure. *J Inf Chemother.* 23(6):349-53.
- Siddiqui N, Shaquiquzzaman, Rahman MUR, Arshad MF, Ahsan W, Alam MS, Ahmed. 2010. S. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of some new 1,3-thiazole-2,4-diamine derivatives. *Acta Pol Pharm.* 67(3):239-246.
- Sidrim JJC, Rocha MFG. 2004. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.21, 266.
- Sigurgeirsson B. (2016). Onychomycosis. In: Ólafsson JH., Hay Rj. (eds). Antibiotic and antifungal therapies in dermatology. Springer, Capítulo 10. p. 203-289.
- Singh DCP, Hashim SR, Singhal RG. 2011. Synthesis and antimicrobial activity of some new thioether derivatives of quinoxaline. *E-J Chem.* 8(2):635-42.
- Singh S, Kaur G, Mangla V, Gupta MK. 2015. Quinoline and quinolones: promising scaffolds for future antimycobacterial agents. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 30(3):492-04.
- Singh S, Sondhi P, Yadav S, Ali F. 2017. *Tinea barbae* presenting as kerion. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 83(6):741.
- Sleven R, Lanckacker E, Boulet G, Delputte P, Maes L, Cos P. 2015. Development of a novel *in vitro* onychomycosis model for the evaluation of topical antifungal activity. *J Microbiol Methods.* 112:73–5.
- Sleven R., Lanckacker E., Delputte P., Maes L., Paul Cos. 2016. Evaluation of topical antifungal products in an *in vitro* onychomycosis model. *Mycoses.* 59, p. 327–330.
- Soliman MG. 2017. Nanoparticles as safe and effective delivery systems of antifungal agents: achievements and challenges. *Int J Pharm.* 523(1):15–2.
- Solomon VR, Lee H. 2011. Quinoline as a privileged scaffold in cancer drug discovery. *Curr Med Chem.* 18(10):1488-08.
- Song X, Wei W, Lai K, He Zhen-Dan, Zhang Hong-Jie. 2018. *In vivo* antifungal activity of dipyrithione against *Trichophyton rubrum* on guinea pig dermatophytosis models. *Biomed Pharmacother.* 108:558–64.

- Souissi Y, Bouchonnet S, Bourcier S, Kusk KO, Sablier M, Andersen HR. 2013. Identification and ecotoxicity of degradation products of chloroacetamide herbicides from UV-treatment of water. *Sci Total Environ.* 458–460:527–34.
- Stempel JM, Hammond SP, Sutton DA, Weiser LM, Marty FM. 2015. Invasive fusariosis in the voriconazole era: single-center 13-year experience. *Open Forum Infect Dis.* 2(3):ofv099.
- Subissi A, Monti D, Togni G, Mailland. 2010. Ciclopirox: recent nonclinical and clinical data relevant to its use as a topical antimycotic agent. *Drugs.* 70(16):2133-52.
- Supong K, Thawai C, Supothina S, Auncharoen P, Pittayakhajonwut P. 2016. Antimicrobial and anti-oxidant activities of quinoline alkaloids from *Pseudomonas aeruginosa* BCC76810. *Phytochem Lett.* 17:100–06.
- Suzuki T, Takeshita K, Saeki K, Kadoi M, Hayashi M, Sofuni T. 2007. Clastogenicity of quinoline and monofluorinated quinolines in chinese hamster lung cells. *J. Health Sci.* 53(3):325-28.
- Tabara K, Szewczyk AE, Bienias W, Wojciechowska A, Pastuszka M, Oszukowska M, Kaszuba A. 2015. Amorolfine vs. ciclopirox – lacquers for the treatment of onychomycosis. *Postepy Dermatol Alergol.* 32(1):40–5.
- Taj-Aldeen SJ. 2017 Reduced multidrug susceptibility profile is a common feature of opportunistic *Fusarium* species: *Fusarium* multi-drug resistant pattern. *J. Fungi.* 3(2):18.
- Taj-Aldeen SJ, Salah H, Al-Hatmi AM, Hamed M, Theelen B, Van Diepeningen AD, Boekhout T, Lass-Flörl C. 2016. C. *In vitro* resistance of clinical *Fusarium* species to amphotericin B and voriconazole using the Eucast antifungal susceptibility method. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 85(4):438–43.
- Takahashi Y, Nagata N, Shimbo T, Nishijima T, Watanabe K, Aoki T, Sekine K, Okubo H, Watanabe K, Sakurai T, Yokoi C, Kobayakawa M, Yazaki H, Teruya K, Gatanaga H, Kikuchi Y, Mine S, Igari T, Takahashi Y, Mimori A, Oka S, Akiyama J, Uemura, N. 2015. Long-term trends in esophageal candidiasis prevalence and associated risk factors with or without HIV Infection: lessons from an endoscopic study of 80,219 patients. *Plos One.* 10(7):e0133589.
- Tauber A, Müller-Goymann CC. 2014. Comparison of the antifungal efficacy of terbinafine hydrochloride and ciclopirox olamine containing formulations against the dermatophyte *Trichophyton rubrum* in an infected nail plate model. *Mol Pharm.* 11(7):1991-96.
- Tauber A, Müller-Goymann. CC. 2015. *In vitro* permeation and penetration of ciclopirox olamine from poloxamer 407- based formulations – comparison of isolated human stratum corneum, bovine hoof plates and keratin films. *Int J Pharm* 489(1-2):73–2.

- Teng P, Li C, Peng Z, Vanderschouw AM, Nimmagadda A, Su M, Li Y, Sun X, Cai J. 2018. Facilely accessible quinoline derivatives as potent antibacterial agents. *Bioorg Med Chem*. 26(12):3573–79.
- Thatai P, Sapra B. 2014. Transungual delivery: deliberations and creeds. *Int J Cosmet Sci*. 36(5):398–11.
- Thomé R, Lopes SCP, Costa FTM, Verinaud L. 2013. Chloroquine: modes of action of an undervalued drug. *Immunol Lett*. 153(1-2):50-7.
- Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. 2011. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell*. 10(9):1173–82.
- Tortorano AM, Richardson M, Roilides E, Van Diepeningen A, Caira M, Munoz P, Johnson E, Meletiadis J, Pana ZD, Lackner M, Verweij P, Freiburger T, Cornely OA, Arikani-Akdagli S, Dannaoui E, Groll AH, Lagrou K, Chakrabarti A, Lanternier F, Pagano L, Skiada A, Akova M, Arendrup MC, Boekhout T, Chowdhary A, Cuenca-Estrella M, Guinea J, Guarro J, de Hoog S, Hope W, Kathuria S, Lortholary O, Meis JF, Ullmann AJ, Petrikos G, Lass-Flörl C, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Fungal Infection Study Group; European Confederation of Medical Mycology. 2014. ESCMID & ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp, *Scedosporium* spp, and others. *Clin Microbiol Infect*. 20:s3:27–46.
- Tudela JLR, Denning DW. 2017. Recovery from serious fungal infections should be realisable for everyone. *Lancet Infect Dis*. 17(11):1111–13.
- Tupaki-Sreepurna A, Al-Hatmi, AMS, Kindo AJ, Sundaram M, de Hoog GS. 2017. Multidrug-resistant *Fusarium* keratitis: a clinico-mycological study of keratitis infections in Chennai, India. *Mycoses*, 60(4):230–33.
- Tverdek FP, Kofteridis D, Kontoyiannis DP. 2016. Antifungal agents and liver toxicity: a complex interaction. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 14(8):765–77.
- Uno F, Tanaka J, Ueda M, Nagai M, Fukumuro M, Natsume M, Oba M, Akahori A, Masumori S, Takami S, Wako Y, Kawasaki K, Kougo Y, Ohyama W, Narumi K, Fujiishi Y, Okada E, Hayashi M. 2015. Repeated-dose liver and gastrointestinal tract micronucleus assays for quinoline in rats. *Mutat Res Genet Toxicol Environ. Mutagen*. 780-781:51–5
- Uppuluri P, Khan A, Edwards JE. 2017. Current Trends in Candidiasis. In: Prasad R. (eds) *Candida albicans: Cellular and Molecular Biology*. Springer, Capítulo 2:5-23.
- Vallabhaneni S, Mod RK, Walker T, Chille T. 2106. The global burden of fungal diseases. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* v. 30, p. 1–116

- Van Diepeningen AD, Al-Hatmi AMS, Brankovics B, De Hoog GS. 2014. Taxonomy and clinical spectra of *Fusarium* species: where do we stand in 2014? *Curr Clin Microbiol Rep.* 1(1–2),10–8.
- Van Diepeningen AD, De Hoog GS. 2016. Challenges in *Fusarium*, a trans-kingdom pathogen. *Mycopathologia.* 181(3-4):161–63.
- Van Duyn Graham L, Elewski BE. 2011. Recent updates in oral terbinafine: its use in onychomycosis and tinea capitis in the US. *Mycoses.* 54(6):e679-5.
- Vastag G, Apostolov S, Matijević B. 2018. Prediction of lipophilicity and pharmacokinetics of chloroacetamides by chemometric approach. *Iran J Pharm Res* 17(1):100–14.
- Vega-Sánchez DC, Vega-Nava CT, Arenas R. 2016. *Tinea cruris* in 114 patients. A study in a general hospital from 1994 to 2014. *Derma Cosmética y Quirúrgica.* 14(2).
- Verma R, Vasudevan B, Pragasam V. 2013. Severe cutaneous adverse drug reactions. *Med J Armed Forces India.* 69(4):375–83.
- Veiga FF, de Castro-Hoshino LV, Sato F, Bombassaro A, Vicente VA, Mendes V, Baesso ML, Negri M, Svidzinski TI. 2018. *Fusarium oxysporum* is an onychomycosis etiopathogenic agent. *Future Microbiol.* 13:1745-56.
- Voltan AR, Quindós G, Alarcón KPM, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJS, Chorilli M. 2017. Fungal diseases: could nanostructured drug delivery systems be a novel paradigm for therapy? *Int J Nanomed.* 11:3715–30.
- Wagener J, Loiko V. 2018. Recent Insights into the paradoxical effect of echinocandins. *J Fungi* 4:5.
- Wais U, Jackson AW, He T, Zhang H. 2016. Nanoformulation and encapsulation approaches for poorly water-soluble drug nanoparticles. *Nanoscale.* 8(4):1746–69.
- Walther G, Stasch S, Kaerger K, Hamprecht A, Roth M, Cornely OA, Geerling G, Mackenzie CR, Kurzai O, Lilienfeld-Toal, MV. 2017. *Fusarium keratitis* in Germany. *J Clin Microbiol.* 55(10):2983–95.
- Wan R, Zhang JQ, Han F, Wang P, Yu P, He Q. 2011. Synthesis and insecticidal activities of novel 1,3,4-thiadiazole 5-fluorouracil acetamides derivatives: an RNA interference insecticide. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 30(4):280-92.
- Weir SJ, Patton L, Castle K, Rajewski L, Kasper J., Schimmer AD. 2011. The repositioning of the anti-fungal agent ciclopirox olamine as a novel therapeutic agent for the treatment of haematologic malignancy. 36(2):128-34.
- Welsch ME, Snyder SA, Stockwell BR. 2010. Privileged scaffolds for library design and drug discovery. *Curr Opin Chem Biol.* 14(3):347-61.
- Wen X, Wang S, Liu D, Gong G, Quan Z. 2015. Synthesis and evaluation of the anti-inflammatory activity of quinoline derivatives. *Med Chem Res.* 24(6):2591–03.

- 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. *Front Microbiol.* 7:2173.
- Wiederhold NP. 2016. Echinocandin resistance in *Candida* species: a review of recent developments. *Curr Infect Dis Rep.* 18(12):42.
- Wiederhold NP. 2017. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. *Infect Drug Resist.* 29;10:249-59.
- Williams AC, Barry BW. 2004. Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev.* 56(5):603-18.
- Wisplinghoff H, Ebbers J, Geurtz L, Stefanik D, Major Y, Edmond MB, Wenzel RP, Seifert H. 2014. Nosocomial bloodstream infections due to *Candida* spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. *Int J Antimicrob Agents.* 43(1):78–1.
- Wu X, Landfester K, Musyanovych A, Guy RH. 2010. Disposition of Charged Nanoparticles after Their Topical Application to the Skin. *Skin Pharmacol Physiol.* 23(3):117–23.
- Yamada T, Maeda M, Alshahni MM, Tanaka R, Yaguchi T, Bontems O, Salamin K, Fratti M, Monod M. 2017. Terbinafine resistance of *Trichophyton* clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 61(7):e00115-17.
- Yang CL, Tseng CH, Chen YL, Lu CM, Kao CL, Wu MH, Tzeng CC. 2010. Identification of benzofuro[2,3-b]quinoline derivatives as a new class of antituberculosis agents. *Eur J Med Chem.* 45, p. 602-607.
- Yang W, Yan L, Wu C, Zhao X, Tang J. 2014. Fungal invasion of epithelial cells. *Microbiol Res.* 169(11):803–10.
- Yapar N. 2014. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag.* 10:95–05.
- Yuan SM. 2016. Fungal endocarditis. *Braz J Cardiovasc Surg.* 31(3):252–55.
- Yuzbasioglu D, Unal F, Yilmaz S, Aksoy H, Celik M. Genotoxicity testing of fluconazole *in vivo* and *in vitro*. *Mutat Res.* 649(1-2):155–60.
- Zhan P, Dukik K, Li D, Sun J, Stielow JB, Van den Ende GB, Brankovics B, Menken SBJ, Mei H, Bao H, Lv G, Liu W, De Hoog GS. 2018. Phylogeny of dermatophytes with genomic character evaluation of clinically distinct *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum*. *Stud Mycol.* 89:153–75.
- Zhan P, Liu W. 2017. The changing face of dermatophytic infections worldwide. *Mycopathologia.* 182(1-2):77–6.

Zhan P, Li D, Wang C, Sun J, Geng C, Xiong Z, Seyedmousavi S, Liu W, De Hoog GS. 2015. Epidemiological changes in tinea capitis over the sixty years of economic growth in China. *Med Mycol.* 53(7):691–98.