

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

TESE DE DOUTORADO

Bárbara Souza da Costa

***DROSOPHILA MELANOGASTER* COMO MODELO ALTERNATIVO PARA  
DERMATOFITOSE SISTÊMICA E AVALIAÇÃO DE ANÁLOGOS DA 8-  
HIDROXIQUINOLINA COMBINADOS COM ANTIFÚNGICOS NO COMBATE DE  
MICOSES DE DIFÍCIL TRATAMENTO**

Orientador: Prof. Dr. Alexandre M. Fuentefria  
Coorientadora: Dra. Bruna Pippi

Porto Alegre  
2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

***DROSOPHILA MELANOGASTER* COMO MODELO  
ALTERNATIVO PARA DERMATOFITOSE SISTÊMICA E AVALIAÇÃO DE  
ANÁLOGOS DA 8-HIDROXIQUINOLINA COMBINADOS COM  
ANTIFÚNGICOS NO COMBATE DE MICOSES DE DIFÍCIL TRATAMENTO**

Tese apresentada por Bárbara Souza da  
Costa para obtenção do TÍTULO DE  
DOUTOR (A) em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Alexandre M. Fuentefria  
Coorientadora: Dra. Bruna Pippi

Porto Alegre, 2024

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Faculdade de Farmácia aprovada em Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 12 de julho de 2024, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Cheila Denise Ottonelli Stopiglia  
Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

Profa. Dra. Lucélia Santi  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS

Prof. Dra. Melissa Orzechowski Xavier  
Universidade Federal de Rio Grande - FURG

#### CIP - Catalogação na Publicação

DA COSTA, BARBARA  
DROSOPHILA MELANOGASTER COMO MODELO ALTERNATIVO  
PARA DERMATOFITOSE SISTÊMICA E AVALIAÇÃO DE ANÁLOGOS  
DA 8-HIDROXIQUINOLINA COMBINADOS COM ANTIFÚNGICOS NO  
COMBATE DE MICOSES DE DIFÍCIL TRATAMENTO / BARBARA DA  
COSTA. -- 2024.  
96 f.  
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Fuentefria.  
  
Coorientadora: Dra. Bruna Pippi.  
  
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,  
BR-RS, 2024.  
  
1. 8-Hidroxiquinolina. 2. Antifúngicos. 3.  
Sinergismo. 4. Drosophila Melanogaster. 5.  
Dermatofitose sistêmica. I. Fuentefria, Prof. Dr.  
Alexandre, orient. II. Pippi, Dra. Bruna, coorient.  
III. Título.

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

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Aplicada, sob orientação do Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria, da Faculdade de Farmácia pertencente à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); no Laboratório de experimentação em *Drosophila* (DROSOLAB) da UFRGS, em colaboração com o Prof. Dr. Régis Adriel Zanette; no Laboratório Pharmaceutical Synthesis Group (PHARSG) em colaboração com o Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade.

**Agradecemos muito aos professores mencionados e Instituições parceiras pela importante colaboração e à CAPES pelo suporte financeiro recebido durante o desenvolvimento deste trabalho**



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu querido orientador Prof. Dr. Alexandre Fuentefria pela oportunidade de realizar este trabalho. Agradecer pela oportunidade de desenvolver minha trajetória na pesquisa em seu laboratório. Agradecer a confiança desde o início, em 2017, onde tudo começou no universo da Micologia, como bolsista voluntária de Iniciação Científica, depois pude me tornar Mestre pelo PPGMAA e por fim me consagrar Doutora pelo PPGCF. Obrigada por toda compreensão de sempre, por confiar e acreditar na minha capacidade me dando total liberdade para conseguir conduzir esse trabalho.

Também gostaria de agradecer à melhor coorientadora que eu poderia ter, Dra. Bruna Pippi. Obrigada Bru, por todo carinho, por ter sido meu braço direito, por nunca ter me deixado na mão e por estar sempre me orientando. Sempre te disse e continuo afirmando que és uma inspiração pra mim.

Não posso deixar de agradecer a todos os colegas do laboratório LPMA, por terem me acolhido tão bem desde quando ingressei ao grupo como bolsista voluntária de Iniciação Científica em 2017. Pude crescer, evoluir, aprimorar, me tornar Mestre e por fim Doutora, obrigada pelos momentos compartilhados. Gostaria de agradecer primeiramente à Paula, uma pessoa tão doce, meiga e amiga sempre se colocando à disposição para ajudar sem medir esforços. Meu muito obrigada também à Magda, embarcando comigo na loucura dos experimentos gigantescos. Obrigada também à Giovanna, minha IC querida, por toda ajuda e dedicação. Vocês transformaram os exaustivos experimentos e a convivência diária em momentos leves e tranquilos.

Meu agradecimento ao Prof. Dr. Régis Zanette por abrir as portas do seu laboratório DrosoLab, onde pude realizar os ensaios com as lindas *Drosophilas*. E da mesma maneira, agradecer à Simone por todo carinho e paciência em me ensinar e me ajudar a realizar os experimentos com as moscas.

Obrigada ao Prof. Dr. Saulo Andrade, juntamente com o seu grupo de pesquisa pela parceria com as moléculas sintetizadas e que compõem grande parte deste

estudo. Meu agradecimento em especial ao Maycon De Cesare que realizou os experimentos e obteve as moléculas deste trabalho

Deixo aqui o meu agradecimento à Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, por possibilitar a realização deste estudo. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) e a todos os professores e colegas do PPGCF, muito obrigada por todo aprendizado e convívio. E, à CAPES (Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo essencial apoio financeiro fornecido através da bolsa de estudos.

Meu muito obrigada às minhas amigas do coração, todas vocês fizeram parte dessa caminhada. Não poderia deixar de agradecer à Ingrid e Bruna, minhas farmas prediletas, amigas que a UFRGS me deu. Obrigada por serem maravilhosas e estarem sempre presente. Gostaria de agradecer à minha prima/irmã Manuella, por todos momentos de lazer compartilhados.

Agradecer à minha amiga/irmã Lethícia, que mesmo distante esteve sempre presente em cada conquista, me motivando em cada etapa desta trajetória, amo você. Gostaria de agradecer a Danielle e Renata, as tardes de mate e brincadeiras com minha pispirica Luzia foram fundamentais para deixar tudo mais leve. Agradecer também à Ana Carolina por todas as conversas. Voltar para Alegrete me deu certeza que posso contar com vocês em qualquer momento.

Gostaria de agradecer ao meu amor e companheiro de vida Felipe, por todo amor, carinho e compreensão durante esses longos anos. Obrigada por sempre estar presente e acompanhar cada passo e conquista nessa minha trajetória nesses anos. Agradeço por ser paciente e escutar todas as minhas angústias. E, acima de tudo, te agradeço por estar sempre torcendo por mim e desejando um futuro maravilhoso pra nós.

O meu agradecimento mais importante, minha família, minha base. Agradecer aos meus irmãos Arthur e Nicolás. E, um agradecimento especial aos meus avós, Eber e Eny e Zaroni e João (*in memoriam*) o meu eterno muito obrigada

por tudo que me ensinaram, fizeram e fazem por mim. Saibam que toda minha dedicação a vocês hoje é o reflexo do amor e carinho que sempre recebi.

Aos meus queridos pais, Elizabeth e Flávio, meus maiores incentivadores. Meu muito obrigada por todo apoio e incentivo, por me proporcionar a oportunidade de correr atrás dos meus sonhos e por me mostrarem a importância da dedicação em tudo o que se faz. Obrigada por me dar a certeza de que sempre terei alguém torcendo por mim. Obrigada por todo amor incondicional. Palavras não são suficientes para agradecer todo o amor de vocês. Esta conquista é dedicada a vocês. Amo muito vocês

Por fim, meus sinceros agradecimentos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, obrigada. Palavras não são suficientes para expressar a minha gratidão a todos por tornarem possível a concretização deste sonho.



*“Você pode sonhar, criar, desenhar e  
construir o lugar mais maravilhoso do  
mundo, mas é necessário ter pessoas para  
transformar seu sonho em realidade!”*

- Walt Disney



# NOVOS ANÁLOGOS DA 8-HIDROXIQUINOLINA PARA O COMBATE DE FUNGOS DE DIFÍCIL TRATAMENTO

Autor: Bárbara Souza da Costa

Orientador: Prof. Dr. Alexandre M. Fuentefria

Coorientadora: Prof<sup>(a)</sup>. Dr<sup>(a)</sup>. Bruna Pippi

## RESUMO

O número de pacientes acometidos por alguma infecção fúngica tem crescido nos últimos anos e afetam cerca de 1,2 bilhões de indivíduos no mundo. Dermatófitos, *Candida* spp. e *Fusarium* spp. são fungos oportunistas relacionados a infecções que apresentam difícil tratamento devido à resistência, uma vez que poucos medicamentos em uma quantidade limitada de classes estão disponíveis no mercado. Novas alternativas terapêuticas vêm sendo exploradas para combater a resistência e a recidiva dessas infecções fúngicas. Neste sentido, a 8-hidroxiquinolina destaca-se como importante alternativa por possuir ampla possibilidade de modificações em várias posições na sua estrutura. Estudos já realizados pelo grupo de pesquisa mostraram que a 8-hidroxiquinolina e seus análogos inibem efetivamente o crescimento de *Candida* spp. e dermatófitos com raros relatos de resistência. Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar novos análogos da 8-hidroxiquinolina com potencial efeito antifúngico frente às espécies de fungos dermatófitos, *Candida* e *Fusarium*. A triagem contra um painel de fungos demonstrou que o composto PH192 apresentou o melhor efeito inibitório com faixa de MIC de 2 - 32 µg/mL. Além disso, o estudo do mecanismo de ação demonstrou que o análogo apresenta o mesmo mecanismo de ação que o clioquinol, atividade quelante de metal. Ao associar os antifúngicos, a combinação nitroxolina + clioquinol + ciclopirox demonstrou um efeito sinérgico em 75% dos isolados testados, demonstrando que o efeito pode estar associado à potencialização da ação do clioquinol e nitroxolina por apresentarem o mesmo mecanismo de ação. A utilização das moscas *D. melanogaster* como modelo alternativo de infecção demonstrou que a utilização de moscas Toll-deficiente pode ser um modelo adequado para estudos comparativos de dermatofitoses causadas por diferentes espécies, além de avaliar novas terapias para o combate deste tipo de infecção.

**Palavras-chaves:** 8-hidroxiquinolina, sinergismo, antifúngicos

NOVEL 8-HYDROXYQUINOLINE ANALOGUES FOR CONTROL OF  
DIFFICULT-TO-TREAT FUNGI

Author: Bárbara Souza da Costa

Advisor: Prof. Dr. Alexandre M. Fuentefria

Co Advisor: Prof. Dr. Bruna Pippi

**ABSTRACT**

The number of patients affected by a fungal infection has grown in recent years and affects around 1.2 billion people worldwide. Dermatophytes, *Candida* spp., and *Fusarium* spp. are opportunistic fungi related to infections that are difficult to treat due to resistance since few drugs in a limited number of classes are available on the market. New therapeutic alternatives are being explored to combat resistance and recurrence of these fungal infections. In this sense, 8-hydroxyquinoline stands out as an important alternative because it has ample scope for modification at various positions in its structure. Studies already carried out by the research group have shown that 8-hydroxyquinoline and its analogs effectively inhibit the growth of *Candida* spp. and dermatophytes, with rare reports of resistance. Therefore, the aim of this study was to evaluate new analogs of 8-hydroxyquinoline with potential antifungal effects against dermatophyte fungi, *Candida*, and *Fusarium* species. Screening against a panel of fungi showed that compound PH192 had the best inhibitory effect with an MIC range of 2 - 32 µg/mL. In addition, the study of the mechanism of action showed that the analog has the same mechanism of action as the clioquinol, metal chelating activity. When combining the antifungals, the combination of nitroxoline + clioquinol + ciclopirox showed a synergistic effect on 75% of the isolates tested, demonstrating that the effect may be associated with the potentiation of the action of clioquinol and nitroxoline as they have the same mechanism of action. The use of *D. melanogaster* flies as an alternative infection model demonstrated that the use of Toll-deficient flies may be a suitable model for comparative studies of dermatophytoses caused by different species, as well as evaluating new therapies to combat this type of infection.

**Keywords:** 8-hydroxyquinoline, synergism, antifungals

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
2.	<b>OBJETIVOS</b> .....	19
2.1	Objetivo Geral.....	19
2.2	Objetivos Específicos .....	19
3.	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	21
3.1	Infecções fúngicas.....	21
3.2	Terapia antifúngica.....	22
3.3	Classe das 8- hidroxiquinolinas.....	23
3.4	Associação de antifúngicos.....	25
4.	<b>CAPÍTULO I: Ion-chelating activity of novel 8-hydroxyquinoline analogs to control difficult-to-treat fungi</b> .....	27
5.	<b>CAPÍTULO II: Replacement of nitroxoline in triple combination to combat dermatophyte resistance</b> .....	49
6.	<b>CAPÍTULO III: <i>In vitro</i> determination of the combination of ciclopirox and terbinafine in the treatment of dermatophytosis</b> .....	63
7.	<b>CAPÍTULO IV: <i>Drosophila melanogaster</i> as a model of systemic dermatophytosis</b> .....	73
8.	<b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....	79
9.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	89
10.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	91



## 1. INTRODUÇÃO

O número de pacientes acometidos por alguma infecção fúngica tem crescido nos últimos anos e afetam cerca de 1,2 bilhões de indivíduos no mundo. As micoses cutâneas, causadas principalmente por fungos dermatófitos, estão entre as infecções fúngicas mais comuns em todo o mundo, afetando várias faixas etárias e afetam negativamente a qualidade de vida dos pacientes infectados.

A crescente resistência dos agentes antifúngicos associada à alta toxicidade dos antifúngicos disponíveis no mercado dificulta o tratamento das infecções causadas por agentes infecciosos, tais como a *Candida* sp., *Fusarium* sp. e dermatófitos. Diante deste cenário, com altas taxas de resistência e recidiva no tratamento antifúngico, novas alternativas merecem destaque para combater estes agentes infecciosos como reintrodução de fármacos em desuso no mercado com novo objetivo terapêutico, terapia combinada e síntese planejada de novas moléculas.

Clioquinol e Nitroxolina (Fig.1), dois medicamentos derivados da 8-hidroxiquinolina, apresentam inúmeras propriedades farmacológicas que caíram em desuso por muitas décadas. O clioquinol (5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina) é um dihalogenado 8-hidroxiquinolina dihalogenada que foi amplamente usada na medicina entre as décadas de 1950 e 1970. Na década de 1970, o clioquinol oral foi retirado do mercado devido a relatos de neurotoxicidade em pacientes japoneses. Propriedades como agente antifúngico, bactericida e antiproliferativo foram relatadas para o clioquinol e outros derivados da 8-hidroxiquinolina. No entanto, a nitroxolina tem sido usada em países da Europa para combater infecções do trato genito urinário causadas por bactérias Gram-negativas, como a *Escherichia coli.*, e tem demonstrado potencial atividade antifúngica.

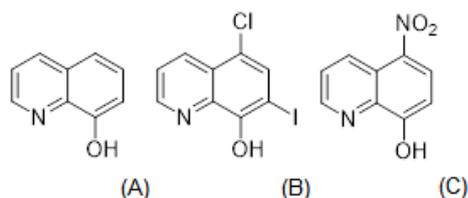


Figura 1. Estrutura da 8-hidroxiquinolina (A), da 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina (Clioquinol) (B) e da 8-hidroxi-5-nitroquinolina (nitroxolina) (C).

A proteção de grupos funcionais é uma importante estratégia na síntese orgânica. Estudos relataram que a realização do processo de adição de uma metila e/ou uma metoximetila pode levar a derivados mais estáveis e modificar o perfil de toxicidade. Assim, baseado na literatura atual, este trabalho visou encontrar novas alternativas para combater infecções fúngicas através da síntese planejada de análogos da 8-hidroxiquinolina. Para tal finalidade o processo de metilação e adição do metoximetil (MOM) foi realizado nas moléculas de clioquinol e nitroxolina.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Determinar a atividade antifúngica, mecanismo de ação e toxicidade de análogos de 8-hidroxiquinolina sobre espécies fúngicas de interesse clínico e de difícil tratamento.

### 2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Sintetizar novos análogos de 8-hidroxiquinolina através da metilação e adição do metoximetil nas moléculas de clioquinol e nitroxolina;
- 2.2.2 Caracterizar e avaliar a atividade e anti-dermatofítica, anti-*Candida* e anti-*Fusarium* dos novos análogos da 8-hidroxiquinolina sintetizados;
- 2.2.3 Identificar o mecanismo de ação do melhor análogo sintetizado sobre as células fúngicas;
- 2.2.4 Avaliar o perfil de toxicidade usando previsões de ensaios *in sílico* do melhor análogo sintetizado;
- 2.2.5 Avaliar o efeito antifúngico da associação dupla e tripla da nitroxolina em combinação com clioquinol, ciclopirox e terbinafina;
- 2.2.6 Verificar o potencial toxicológico das combinações sinérgicas dos agentes antifúngicos;
- 2.2.7 Avaliar o efeito antifúngico da associação dupla do ciclopirox e terbinafina;
- 2.2.8 Estabelecer um modelo *in vivo* de dermatofitose, avaliando a patogenicidade em moscas *Drosophilas melanogaster*;
- 2.2.9 Avaliar o efeito protetor dos medicamentos antifúngicos itraconazol, terbinafina e clioquinol em *D. melanogaster* infectadas sistemicamente por dermatófitos.



### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Infecções fúngicas

O número de pacientes acometidos por alguma infecção fúngica tem crescido nos últimos anos e afetam cerca de 1,2 bilhões de indivíduos no mundo (Fuentefria et al., 2017; Chang et al., 2017; Deaguero et al. 2020). Os casos que levam a altas taxas de mortalidade estão frequentemente relacionados com infecções fúngicas invasivas de difícil tratamento, acometidas por fungos leveduriformes (como *Candida* sp. e *Cryptococcus* sp.) e fungos filamentosos, como *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. ou *Mucor* sp. (Chang et al. 2017; Azanza et al. 2021).

As micoses cutâneas, causadas principalmente por fungos dermatófitos, estão entre as infecções fúngicas mais comuns em todo o mundo, afetando diversas faixas etárias e afetando negativamente a qualidade de vida dos pacientes infectados. Embora essas dermatofitoses não sejam graves em termos de mortalidade e morbidade, causam desconforto substancial aos pacientes. Estima-se que as infecções fúngicas superficiais afetam cerca de 20 a 25% da população mundial (Peres et al 2010; Pires et al 2014; Zhang et al. 2021). Dermatófitos são fungos que invadem e se multiplicam nos tecidos queratinizados (pele, cabelos e unhas) causando infecção muitas vezes com lesões que incluem combinações de alopecia, eritema e pápulas (Bond, 2010; Sahoo and Mahajan et al 2016; Weitzman and Summerbell, 1995), porém em estado de imunossupressão do hospedeiro, há relatos de dermatofitoses sistêmicas (Lanternier, et al 2013; Marconi et al 2010; Wu et al, 2013).

*Candida* é um gênero fúngico que faz parte da microbiota normal do ser humano. Entretanto, através de um desequilíbrio podem se tornar patogênicas e, desta forma, ocasionar infecções na mucosa ou mesmo sistêmicas. As candidemias, causadas principalmente por *C. albicans*, e estão relacionadas com 10 – 47% de mortalidade (Bujdáková, 2016; Azanza et. al 2021; Ganeshkumar A, et al. 2023).

O gênero *Fusarium* é um importante fungo do ambiente e é capaz de ocasionar infecções oportunistas em humanos e animais. Quando acometem pacientes imunocompetentes, apresentam manifestações clínicas como onicomicoses e ceratites. Em pacientes imunossuprimidos, doenças invasivas e

disseminadas podem ser observadas, sendo quase sempre de difícil tratamento (Diepeningen et al., 2015; Rosa et al., 2017; Rosa et al., 2019).

### 3.2 Terapia antifúngica

O tratamento antifúngico para as infecções oportunistas pode ser realizado através do uso sistêmico, utilizada no combate de infecções mais graves e de difícil tratamento; e do uso tópico, em casos mais simples e auxiliando a terapia sistêmica. Atualmente, cinco principais classes estão disponíveis no mercado para uso no tratamento das infecções fúngicas e são classificados de acordo com seu mecanismo de ação (Fuentefria et al. 2018). A classe das alilaminas, dos poliênicos e dos azóis atuam inibindo a rota de síntese do ergosterol, um dos principais esteróis da membrana celular fúngica e responsável por funções celulares fundamentais como estrutura, fluidez, integridade da membrana e controle de eventos fisiológicos (Campoy e Adrio 2017; Scorzoni et al. 2017).

A classe de análogos da pirimidina atua inibindo a síntese de DNA, RNA e proteínas (Campoy e Adrio 2017; Scorzoni et al. 2017). A classe das equinocandinas foi a última classe descoberta de antifúngicos. Elas têm como alvo a parede celular fúngica, inibindo não competitivamente a  $\beta$ -1,3-D-glicana sintase, principal componente que garante a estrutura da parede celular. Uma vez inibida leva à desestabilização da parede celular, com instabilidade osmótica, perda da integridade da parede celular e lise das células fúngicas (Campoy e Adrio 2017).

Alguns fatores estão associados aos termos “resistência” e “recidiva” no tratamento antifúngico e podem contribuir para o desfecho da resposta clínica. A adaptabilidade do patógeno de sobreviver no organismo, variação na suscetibilidade frente aos agentes antifúngicos e a resposta imune do hospedeiro (Khurana, Sardana e Chowdhary 2019). Além disso, uma característica importante relacionada a resistência nas infecções fúngicas é a capacidade de formação de biofilme. Essa característica fúngica já está bem estabelecida e relatada em leveduras como *Candida albicans*, a mais comumente encontrada em infecções hospitalares (Nett e Andes 2015; Ramage et al. 2012). Alguns fungos filamentosos, como *Aspergillus* e *Fusarium*, também

tem sido estudados, uma vez que evidências sugerem que a formação do biofilme interfere na resposta terapêutica (Beauvais e Latgé 2015; Nett e Andes 2015; Ramage et al. 2012).

O biofilme fúngico fornece vários benefícios para o patógeno, como resistência a estresses físicos e químicos, comunicação microbiana, aumento da virulência e disponibilidade de nutrientes (Ramage et al. 2012; Scorzoni et al. 2017). Além disso, alguns fatores associados à formação do biofilme contribuem para o aumento dos casos de resistência e falha na terapia antifúngica, tais como: aumento da densidade celular, uma vez que a suscetibilidade ao agente antifúngico diminuiu conforme aumenta a densidade das células fúngicas; e a MEC (matriz extracelular polimérica), que funciona como uma barreira, diminuindo a quantidade de antifúngico em interação com as células que pertencem ao biofilme, além de fornecer estabilidade mecânica e nutrição (Scorzoni et al. 2017).

A falha terapêutica é um problema para a terapia antifúngica, uma vez que poucos medicamentos em uma quantidade limitada de classes estão disponíveis no mercado farmacêutico. Além disso, as dermatofitoses estão frequentemente associadas a recidivas após interrupção da terapia antifúngica (Campoy e Adrio 2017; Chang et al. 2017; Fuentesfria et al. 2018; Zhang et al. 2021). Novas alternativas terapêuticas vêm sendo exploradas para combater a resistência e a recidiva dessas infecções fúngicas, tais como reintrodução de fármacos em desuso no mercado com novo objetivo terapêutico, terapia combinada e síntese planejada de novas moléculas (Campoy e Adrio 2017; Fuentesfria et al. 2018).

### **3.3 Classe das 8-hidroxiquinolinas**

A 8-hidroxiquinolina e seus análogos representam importantes alternativas, uma vez que possuem uma grande variedade de propriedades biológicas, entre elas, atividade antifúngica e bactericida (Oliveri et al., 2016). Essa atividade biológica pode ser atribuída pela capacidade quelante de íons metálicos pela 8-hidroxiquinolina, uma vez que estes metais exibem função muito importante nos processos biológicos (Prachayasittikul et al., 2013; Oliveri

et al., 2016).

A 8-hidroxiquinolina possui ampla possibilidade de modificações em várias posições na sua estrutura, provando ser uma molécula de grande valor para muitos compostos biologicamente ativos. O clioquinol (5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina) e a nitroxolina (8-hidroxi-5-nitroquinolina) são exemplos de fármacos análogos deste composto (Hof, H. 2016; Oliveri et al., 2016).

Nesse contexto, o clioquinol é um derivado que foi amplamente utilizado entre os anos de 1950 e 1970 como agente antiparasitário sistêmico no tratamento de doenças intestinais, anti-inflamatória, atenuante de doenças neurodegenerativas, antineoplásica e agente antibacteriano usado topicamente para tratar infecções de pele (Kuru, S. 2021 Mao and Schimmer, 2008). Ainda, estudos atuais mostraram que esse grupo de moléculas inibe efetivamente o crescimento de *Candida* spp. e dermatófitos (Pippi et al, 2017; Joaquim et al, 2018, Kuru, S. 2021).

Nos anos 70, a apresentação oral foi retirada do mercado devido a relatos de neurotoxicidade em pacientes japoneses, a Neuropatia Mielo-Óptica Subaguda (SMON). Os pacientes japoneses que foram tratados com clioquinol apresentaram diarreia, dores abdominais e no corpo, progredindo para cegueira e paralisia da musculatura, bem como mancha verde na língua, urina verde e fezes verdes (Kuru, S. 2021).

Anos depois, os pesquisadores seguiram utilizando o clioquinol em testes para o tratamento da doença de Alzheimer por causa de suas propriedades quelantes de metais na redução de placas amilóides no cérebro, uma vez que a doença poderia ser causada pelo acúmulo e deposição de metais pesados no cérebro especialmente cobre e zinco (Kuru, S. 2021; Wykowski R et al, 2022).

Com o avanço da tecnologia, foi descoberto que os sintomas da neurotoxicidade desencadeada pelo uso do medicamento foram mais graves ou desenvolvida em pacientes que apresentavam uma deficiência natural de zinco e vitamina B12 e em pacientes anêmicos considerando a propriedade quelante do clioquinol. Da mesma forma descobriram que, o SMON foi desenvolvido principalmente na população japonesa causando a deposição de AMPc na célula neuronal e a consequente morte dos neurônios por apoptose devido ao polimorfismo nos receptores neuronais ABCC4 e ABCC14 nessa população. (You et al 2021; Perez et al. 2019). Portanto, a reintrodução do medicamento

poderia ser um ganho no combate de algumas doenças, bem como no tratamento de espécies fúngicas (Pippi et 2019).

Já a nitroxolina, é um agente antibacteriano utilizado no tratamento de infecções urinárias, disponível em países da Europa Oriental, assim como na Alemanha, onde a resistência entre *Escherichia coli* ainda parece raro. É ativo contra organismos gram-positivos e gram-negativos sensíveis, comumente encontrados em infecções do trato urinário (Wijma et al, 2018; Puértolas-Balint et al, 2020). Também já foi verificado que a nitroxolina possui atividade antibiofilme em diferentes patógenos, sendo uma importante característica da molécula (Puértolas-Balint et al, 2020). Estudos anteriores demonstraram um potencial efeito contra candidúria, alcançando altas concentrações na urina. Ainda, apresentou eficácia contra *Candida spp.* nos biofilmes, um grande problema atual (Medić-Šarić et al, 1980; Hof et al, 2016).

Diante deste cenário, a proteção de grupos funcionais é uma importante estratégia na síntese orgânica. Estudos relataram que a realização do processo de adição de uma metila e/ou uma metoximetila pode levar a derivados mais estáveis e modificar o perfil de toxicidade (Zai et al, 2009; Pandurangan, 2017).

### **3.4 Associação de antifúngicos**

Novas alternativas terapêuticas vêm sendo adotadas para o combate da resistência e recidiva dessas infecções fúngicas, como a terapia combinada (Fuentefria et al. 2018).

Com a ausência da monoterapia antifúngica efetiva, as terapias combinadas estão sendo usadas clinicamente como estratégia terapêutica (Fuentefria et al. 2018; Jacobuz Berlitz, et al. 2023). A combinação dupla de itraconazol e terbinafina foi descrita como efetiva para fungos dermatófitos (Sharma et al. 2019). Tamura et al (2014) relataram combinações sinérgicas para dermatófitos quando combinado amorolfina e itraconazol. Da mesma forma, Laurent e Monod (2017) também relataram efeito sinérgico de amorolfina com derivados azólicos. Estudos mostram o potencial da combinação tripla em tratamentos como descrito por Tascini et al (2003), onde é relatado a efetividade de caspofungina, terbinafina e anfotericina no tratamento de aspergilose invasiva. Da Costa et. al (2020) demonstraram que o clioquinol em combinação

com a terbinafina ou em combinação com o ciclopirox tem um grande efeito sinérgico no tratamento de dermatofitoses.

Os potenciais benefícios da terapia combinada com antifúngicos incluem: superação da resistência fúngica, expansão do espectro de ação, melhora da eficácia clínica dos medicamentos e redução das doses administradas, o que resulta em menor toxicidade e diminuição dos efeitos colaterais no hospedeiro (Fuentefria et al. 2018; Hatipoglu e Hatipoglu 2013; Shrestha, Fosso, e Garneau-Tsodikova 2015).

**4. CAPÍTULO I: Ion-chelating activity of novel 8-hydroxyquinoline analogs to control difficult-to-treat fungi**

Artigo submetido na revista "Journal of Medical Microbiology" no formato de artigo original

**Title:** Ion-chelating activity of novel 8-hydroxyquinoline analogs to control difficult-to-treat fungi

Bárbara da Costa<sup>1,2\*</sup>, Bruna Pippi<sup>2</sup>, Maycon de Cesare<sup>1</sup>, Maxwell Adriano Abegg<sup>3</sup>, Saulo de Andrade<sup>1</sup>, Alexandre M. Fuentefria<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

<sup>2</sup>Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

<sup>3</sup>Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Itacoatiara, AM, Brazil

**\*Address for correspondence:**

Bárbara da Costa

Laboratory of Applied Mycology, School of Pharmacy, Annex II, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, São Luís, 154, Santana, 90620-170, Porto Alegre – RS, Brazil;

Telephone: +55 51 3308 2194; E-mail address: [basdacosta@hotmail.com](mailto:basdacosta@hotmail.com)

**5. CAPÍTULO II:** Replacement of nitroxoline in triple combination to combat dermatophyte resistance

Artigo submetido na revista "Journal of Medical Mycology" no formato de artigo original

**Title:** Replacement of nitroxoline in triple combination to combat dermatophyte resistance

Bárbara da Costa<sup>1,2\*</sup>, Bruna Pippi<sup>2</sup>, Magda Antunes<sup>2,3</sup>, Lavínia Veiga<sup>1,2</sup>, Alexandre M. Fuentefria<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

<sup>2</sup>Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

**\*Address for correspondence:**

Bárbara da Costa

Laboratory of Applied Mycology, School of Pharmacy, Annex II, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, São Luís, 154, Santana, 90620-170, Porto Alegre – RS, Brazil;

Telephone: +55 51 3308 2194; E-mail address: [basdacosta@hotmail.com](mailto:basdacosta@hotmail.com)

6. **CAPÍTULO III:** *In vitro* determination of the combination of ciclopirox and terbinafine in the treatment of dermatophytosis

Artigo publicado na revista “Journal of Medical Mycology” no formato de short communication



Journal of Medical Mycology

Volume 34, Issue 1, March 2024, 101464



---

Short communication

*In vitro* determination of the combination of ciclopirox and terbinafine in the treatment of dermatophytosis

Bárbara da Costa<sup>a b</sup>  , Bruna Pippi<sup>b</sup>, Magda Chaves<sup>b c</sup>, Giovanna Agostineto<sup>b</sup>, Alexandre Meneghello Fuentefria<sup>a b c</sup>

**Title:** *In vitro* determination of the combination of ciclopirox and terbinafine in the treatment of dermatophytosis

Bárbara da Costa<sup>1,2\*</sup>, Bruna Pippi<sup>2</sup>, Magda Chaves<sup>2,3</sup>, Giovanna Agostineto<sup>2</sup>, Alexandre Meneghello Fuentefria<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup>Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

**\*Address for correspondence:**

Bárbara da Costa

Laboratory of Applied Mycology, School of Pharmacy, Annex II, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, São Luís, 154, Santana, 90620-170, Porto Alegre – RS, Brazil; Telephone: +55 51 3308 2194; E-mail address: basdacosta@hotmail.com

**Keywords:** terbinafine, ciclopirox, checkerboard, dermatophyte, antifungal

## 7. CAPÍTULO IV: *Drosophila melanogaster* as a model of systemic dermatophytosis

Artigo publicado na revista “Mycoses” no formato de artigo original

Received: 12 April 2023 | Revised: 15 June 2023 | Accepted: 29 June 2023

DOI: 10.1111/myc.13630

ORIGINAL ARTICLE

 WILEY

### *Drosophila melanogaster* as a model of systemic dermatophytosis

Bárbara da Costa<sup>1,2</sup> | Bruna Pippi<sup>2</sup>  | Simone Merkel<sup>3</sup> | Giovanna Agostinetto<sup>2</sup> | Régis A. Zanette<sup>3</sup>  | Alexandre M. Fuentefria<sup>1,2</sup>

## 8. DISCUSSÃO GERAL

Com poucas opções antifúngicas no mercado, a síntese de novos análogos com atividade antifúngica tem sido amplamente utilizada (Campoy e Adrio 2017; Chang et al. 2017; Fuentefria et al. 2018). Os mecanismos para modificar pontos específicos na estrutura de medicamentos comerciais, como a proteção de grupos funcionais, são uma estratégia importante na síntese orgânica (Zai et al., 2009; Pandurangan, 2017). Assim, modificações estruturais, como o grupo 8-hidroxi, podem levar a mudanças significativas nas propriedades químicas desses compostos para melhorar o perfil de toxicidade (Zai et al, 2009; Pandurangan, 2017).

O reposicionamento de fármacos pode trazer muitas vantagens e segurança na escolha da terapia, uma vez que seu perfil toxicológico já está bem esclarecido, assim como seus efeitos adversos. O uso de derivados de 8-hidroxiquinolina como potenciais agentes antifúngicos tem sido demonstrado por alguns autores (Pippi et al 2017, Da silva et al 2020). Pippi et al. (2017) conseguiram demonstrar que o uso de clioquinol e seus derivados tem potencial atividade anti-*Candida* e anti-dermatófito. Outros autores demonstraram a atividade antifúngica da nitroxolina, que se mostrou uma grande aliada no combate à *Candida* sp. e aos fungos filamentosos, como dermatófitos e *Fusarium* sp. (Magda, dados não publicados; Fuchs et al. 2021). Assim, os resultados encontrados aqui frente a dermatófitos corroboram com os encontrados na literatura.

A substituição do grupo 8-hidroxi por 8-metoxi e 8-metoximetoxi remove o hidrogênio lábil e introduz alterações na polaridade do composto, na propriedade de doação de elétrons e na capacidade de participar de ligações de hidrogênio. Essas alterações têm um impacto profundo nas propriedades químicas do anel de quinolina, incluindo o átomo de nitrogênio funcional que é conhecido por participar de uma interação química importante (referência de colocação de quelação de íons). Além disso, esses grupos, especialmente o grupo metoxi-metoxi, podem introduzir um efeito estérico nesses compostos, levando a interações seletivas.

A triagem das 8-hidroxiquinolinas contra um painel de *Candida* spp. e 15 fungos filamentosos mostra que os compostos têm um amplo espectro de ação contra leveduras e fungos filamentosos dos gêneros *Microsporium*, *Trichophyton*, *Nannizzia* e *Fusarium*. Entre os compostos testados, o PH192 e o PH193 apresentaram o melhor efeito inibitório com faixa de MIC de 2 - 32 µg/mL e 8 - 32 µg/mL, respectivamente.

A relação estrutura-atividade (SAR) mostra que a substituição do grupo 8-hidroxi pelo grupo 8-metoxi elimina a atividade antifúngica, uma vez que os derivados metoxi (PH605, PH668 e PH184) apresentaram valores de MIC > 64 µg/mL para a maioria dos fungos testados. No entanto, ao introduzir outro grupo metoxi a esses derivados, produzindo os derivados MOM (PH193, PH669 e PH192), a atividade é parcialmente restaurada. Portanto, esses dados mostram que o grupo hidroxila livre é importante para a atividade e sua substituição modifica a atividade antifúngica dos compostos.

Além disso, os estudos de SAR mostram que, entre os derivados de MOM, os substituintes adicionais do anel de quinolina desempenham um papel importante na atividade antifúngica. O PH668 sem substituição adicional apresenta baixa atividade antifúngica. No entanto, a atividade aumenta com o grupo de retirada de elétrons (EWG) na posição 5 (PH193), e um aumento predominante na atividade é observado com o grupo de retirada de elétrons (EWG) leve nas posições 5 e 7 (PH192).

Os resultados do mecanismo de ação do PH192 mostraram que, assim como o clioquinol, seu análogo mantém o mesmo mecanismo demonstrado pelo fármaco original, uma vez que ambos têm uma atividade quelante de metal (Alsterholm et al, 2010; Pippi et al, 2018).

A associação de medicamentos é uma excelente estratégia para combater a resistência fúngica. Vários autores demonstraram a eficácia do uso de associações no tratamento de dermatofitoses (Chang et al. 2017; Fuentesfria et al. 2018; Hill e Cowen 2015; De Chaves et al. 2020). Gupta e Kohli 2003 constataram que a combinação de terbinafina + ciclopirox apresentou resultados promissores em casos de infecções fúngicas por dermatófitos. Da mesma forma, Sugiura et al. (2021) mostraram resultados sinérgicos no controle de dermatófitos com a combinação de efinaconazol + terbinafina. Da Costa et al. (2021) mostraram que o clioquinol em combinação com a terbinafina ou em combinação com o ciclopirox tem um grande efeito sinérgico no tratamento de dermatofitoses. Em contrapartida, a nitroxolina apresenta efeitos sinérgicos em combinação com a ciprofloxacina no controle de infecções bacterianas (patógenos diarreagênicos). Não há relatos na literatura sobre o uso de combinações de nitroxolina para controlar infecções fúngicas (Hayford Osei-Owusu et al.,2022).

A combinação tripla de medicamentos antifúngicos é uma estratégia que tem sido pouco explorada. A combinação de três medicamentos antifúngicos com diferentes mecanismos de ação pode ter efeitos benéficos no combate à resistência antifúngica e na redução da toxicidade dos medicamentos. Resultados anteriores publicados por Da Costa et al. (2020) mostraram que a combinação tripla de clioquinol + terbinafina + ciclopirox apresentou excelentes resultados contra dermatófitos (interação sinérgica para 75% dos isolados) sem danos citotóxicos. Os resultados encontrados aqui mostram que todas as combinações triplas demonstraram ter um efeito antifúngico potencial mais alto quando comparadas às combinações duplas testadas. A combinação nitroxolina + clioquinol + ciclopirox apresentou o maior efeito sinérgico, cobrindo 75% dos isolados de dermatófitos. No entanto, ao analisar o mecanismo de ação desses medicamentos, a nitroxolina e o clioquinol apresentam o mesmo mecanismo de ação: são quelantes de íons metálicos (dados não publicados de Magda; Wijma et al. 2018; Pippi et al. 2018). Assim, a explicação para o maior efeito sinérgico pode ser devido à potencialização da ação desses medicamentos associada ao uso do ciclopirox, que atua intracelularmente com alta afinidade pelo  $Fe^{3+}$  (Gupta et al, 2013).

Ao analisar os resultados, pode-se observar que as moscas *Toll*-deficientes foram suscetíveis aos dermatófitos testados e esse achado corrobora com o encontrado na literatura, quando testaram a padronização de *Malassezia pachydermatis* (Merkel et al. 2018), *A. fumigatus* (Lionakis et al. 2005), *C. albicans* (Chamilos et al. 2006), *Scedosporium* sp., *F. moniliforme* (Lamaris et al. 2007) e *C. neoformans* (Apidianakis et al. 2004) utilizando moscas *Toll* – deficientes obtendo-se curva de sobrevivência dependente da concentração do inóculo. Os achados de células fúngicas nas secções histológicas também corroboram com os achados de Merkel et al. 2018, em que após a padronização da infecção por *M. pachydermatis*, encontrou as células fúngicas no interior das moscas *Toll*- deficientes.

Ao serem infectadas, as moscas *D. melanogaster* necessitam da ativação da via *Toll* de defesa para sobreviver às infecções fúngicas. Desta forma, as moscas *Toll*- deficientes, por não apresentarem essa via de sinalização, ficam susceptíveis aos patógenos (Lemaitre e Hoffmann 2007; Lionakis et al. 2005). Por isso, quando infectadas por dermatófitos, as moscas *Toll* - deficiente vão à morte rapidamente, ao contrário das moscas WT, que tem essa via de sinalização bem conservada.

Para os fungos dermatófitos sobreviverem em um organismo, é preciso que tenha disponível tecido queratinizado do estrato córneo (Bond 2010; Sahoo e Mahajan 2016; Weitzman, Corporis, e Favosa 1995). Através de lesões iniciais (nas unhas ou na pele, por exemplo), a infecção fúngica se estabelece e dependendo do estado imunológico do paciente, é possível que haja migração pelos tecidos até chegar na corrente circulatória e, desta forma, pode ser desenvolvida uma infecção sistêmica (Wu, Sun, e Chang 2013). Assim, a utilização das moscas *D. melanogaster* simula um modelo de infecção sistêmica através de uma pequena lesão inicial onde o fungo é inoculado. *D. melanogaster* possuem enócitos (células de origem ectodérmica, que apresentam uma estreita associação com a epiderme do inseto) e, possivelmente, os fungos dermatofíticos conseguem ali se desenvolver (Galenza e Foley 2019; Makki, Cinnamon, e Gould 2014). Estudos genéticos em *D. melanogaster* mostraram que os enócitos em moscas adultas são capazes de produzir hidrocarbonetos cuticulares necessários para evitar a desidratação (Makki, Cinnamon, e Gould 2014). Esses hidrocarbonetos cuticulares poderiam servir de nutrição para esses fungos e, desta forma, a infecção poderia se estabelecer.

O inóculo ideal para promover dermatofitose sistêmica foi determinado através da observação da curva de sobrevivência (Figura 1) estabelecendo a concentração capaz de matar as moscas *Toll*-deficiente (Da Costa et al. 2023). Para os dermatófitos, a concentração ideal foi de  $10^6$  cels/mL para TRU47 e TME32, de  $10^7$  cels/mL para MCA01 e de  $10^8$  cels/mL para NGY50, concentração esta também relatada como ideal para a *C. albicans* (Chamilos et al. 2006). Outros estudos com *M. pachydermatis* (Merkel et al. 2018) e com *Pythium insidiosum* (Zanette et al. 2013) relataram que a concentração ideal para promover a infecção nas moscas foi  $10^7$  cel/mL e  $10^5$  cels/mL, respectivamente.

Foi possível observar que a infecção em *D. melanogaster* com diferentes espécies de dermatófitos resultou em diferenças na mortalidade, sendo *N. gypsea* (NGY50) a espécie menos virulenta. Entretanto, foi a espécie que não apresentou nenhuma diferença significativa quando comparamos o grupo controle sem tratamento com os grupos tratados com os antifúngicos.

Esses achados podem demonstrar que a utilização de moscas *Toll*-deficiente pode ser um modelo adequado para estudos comparativos de dermatofitoses causadas por diferentes espécies, além de avaliar novas terapias para

o combate deste tipo de infecção.

O presente estudo está de acordo com os achados da literatura encontrados em outros modelos de infecção utilizando *C. albicans* (Chamilos et al. 2006), *M. pachydermatis* (Merkel et al. 2018) e *P. insidiosum* (Zanette et al. 2013), uma vez que a curva de sobrevivência das moscas WT também diferiu estatisticamente da curva de sobrevivência das *Toll*- deficientes. Apesar dos casos de dermatofitoses ocorrerem principalmente em pessoas imunocompetentes, os casos de infecções sistêmicas foram relatados predominantemente em pacientes imunocomprometidos, o que corrobora com os resultados aqui encontrados (Marconi et al. 2010; Wu, Sun, e Chang 2013). Vale ressaltar que até o momento não há nenhum estudo na literatura com utilização de experimentos *in vivo* relatando infecção sistêmica causada por dermatófitos.

## 9. CONCLUSÕES

- Seis novos análogos de 8-hidroxiquinolina foram sintetizados usando 8-hidroxiquinolina (8HQ), nitroxolina (NX) e clioquinol (CQ) como material de partida.
- Entre os análogos sintetizados, o derivado PH192 apresentou o melhor perfil inibitório contra os diferentes gêneros de fungos estudados.
- Usando o ensaio de proteção com sorbitol, observou-se que o PH192 não apresentou atividade na parede celular do fungo nem atividade sobre a membrana celular fúngica no ensaio do efeito do ergosterol exógeno.
- Quando se trata do efeito quelante de metais, assim como o clioquinol, seu análogo mantém o mesmo mecanismo demonstrado pelo fármaco original, tem um efeito quelante dependente de metal.
- O relatório de toxicidade *in silico* sugere um perfil de baixa toxicidade para o PH192 assim como, sensibilização da pele e toxicidade respiratória para o clioquinol e o PH192.
- O derivado PH192 apresenta modificações químicas que levam a uma possível melhora nos perfis de absorção e distribuição.
- As associações duplas de nitroxolina em combinação com clioquinol, ciclopirox e terbinafina não mostraram atividade sinérgica.
- Entretanto, a combinação de nitroxolina, clioquinol e ciclopirox mostrou 75% de efeito sinérgico.
- As combinações triplas não apresentaram efeitos citotóxicos e carcinogênicos nas plataformas de dados utilizadas. No entanto, a combinação nitroxolina + clioquinol + ciclopirox apresentou um perfil de mutagenicidade, enquanto nenhuma combinação apresentou corrosão ocular, irritação ocular e sensibilização da pele.
- Podemos observar que os fármacos combinados alcançam uma melhora na atividade antifúngica em comparação com os fármacos separados, tornando-se uma opção mais segura, uma vez que são usadas concentrações menores de fármacos do que as usadas isoladamente para alcançar o mesmo resultado.
- Outra característica importante é que as combinações não apresentam

uma piora no perfil de toxicidade e podem até melhorar propriedades como sensibilização da pele, carcinogenicidade e irritação ocular quando combinadas.

- A combinação de ciclopirox e terbinafina tem sido usada com frequência na medicina clínica. Entretanto, nosso estudo mostra que essa associação deve ser usada com mais cuidado uma vez que, não apresentou resposta positiva *in vitro* e, portanto, pode não trazer benefícios clínicos.
- O estudo piloto confirma que a *D. melanogaster* é um modelo adequado para estudar a virulência e a eficácia de medicamentos antifúngicos em espécies de dermatófitos.
- As moscas WT foram resistentes à infecção por dermatófitos. Por outro lado, as moscas *Toll* deficientes apresentaram uma mortalidade dependente da concentração

## 10. REFERÊNCIAS

- Alsterholm, M., Karami, N., & Faergemann, J. (2010). Antimicrobial Activity of Topical Skin Pharmaceuticals – An In vitro Study. *Acta Dermato Venereologica*, 90(3), 239–245.
- Apidianakis Y, Rahme LG, Heitman J, Ausubel FM, Calderwood SB, Mylonakis E. Challenge of *Drosophila melanogaster* with *Cryptococcus neoformans* and role of the innate immune response. *Eukaryot Cell*. 2004;3:413-419.
- Azanza, J.R.; Grau, S.; Vázquez, L.; Rebollo, P.; Peral, C.; López-Ibáñez de Aldecoa, A.; López-Gómez, V. The cost-effectiveness of isavuconazole compared to voriconazole, the standard of care in the treatment of patients with invasive mould diseases, prior to differential pathogen diagnosis in Spain. *Mycoses* 2021, 64, 66–77
- Beauvais, Anne, and Jean-paul Latgé. 2015. “Aspergillus Biofilm In Vitro and In Vivo.” *Microbiology spectrum*.
- Bond, Ross. 2010. “Superficial Veterinary Mycoses.” *Clinics in Dermatology* 28(2): 226–36.
- Bujdaková H. (2016). Management of *Candida* biofilms - state of knowledge and new options for prevention and eradication. *Future Microbiology*. 11(22):235-251.
- Campoy, Sonia, and José L. Adrio. 2017. “Antifungals.” *Biochemical Pharmacology* 133: 86–96.
- Chamilos G, Lionakis MS, Lewis RE, et al. *Drosophila melanogaster* as a facile model for large-scale studies of virulence mechanisms and antifungal drug efficacy in *Candida* species. *J Infect Dis*. 2006;193:1014-1022.
- Chang, Ya Lin et al. 2017. “New Facets of Antifungal Therapy.” *Virulence* 8(2): 222–36.
- Da Costa B, Pippi B, Andrzejewski Kaminski TF, Andrade SF, Fuentefria AM. In vitro antidermatophytic synergism of double and triple combination of clioquinol with ciclopirox and terbinafine. *Mycoses*. 2020;00:1–9.
- Da Silva, N. M., Gentz, C. de B., Reginatto, P., Fernandes, T. H. M., Kaminski, T. F. A., Lopes, W., ... de Andrade, S. F. (2020). 8-Hydroxyquinoline 1,2,3-triazole derivatives with promising and selective antifungal activity. *Medical Mycology*
- Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*. 2017 Mar 3;7:42717.
- de Chaves MA, da Costa BS, de Souza JA, Batista MA, de Andrade SF, Hage-Melim LIDS, Abegg M, Lopes MS, Fuentefria AM. In silico and in vitro analysis of the mechanisms

- of action of nitroxoline against some medically important opportunistic fungi. *J Mycol Med.* 2023 Aug;33(3):101411
- De Chaves MA, da Costa BS, de Souza JA, Batista MA, de Andrade SF, Hage-Melim LIDS, Abegg M, Lopes MS, Fuentefria AM. In silico and in vitro analysis of the mechanisms of action of nitroxoline against some medically important opportunistic fungi. *J Mycol Med.* 2023 Aug;33(3):101411.
- De Chaves, M. A., do Amaral, T. F., Coutinho, N. M. da S. R., Andrzejewski Kaminski, T. F., Teixeira, M. L., de Oliveira, L. F. S., ... Fuentefria, A. M. (2020). Synergistic association of clioquinol with antifungal drugs against biofilm forms of clinical *Fusarium* isolates. *Mycoses.*
- Deaguero IG, Huda MN, Rodriguez V, Zicari J, Al-Hilal TA, Badruddoza AZM, Nurunnabi M (2020) Nano-vesicle based antifungal formulation shows higher stability, skin diffusion, biosafety and anti-fungal efficacy in vitro. *Pharmaceutics* 12(6):516
- Diepeningen AD, Brankovics B, Iltes J, van der Lee TAJ, Waalwijk C. (2015). Diagnosis of *Fusarium* Infections: Approaches to Identification by the Clinical Mycology Laboratory. *Current Fungal Infect Rep.* 9:135-143.
- Fuchs F, Hof H, Hofmann S, Kurzai O, Meis JF, Hamprecht A. Antifungal activity of nitroxoline against *Candida auris* isolates. *Clin Microbiol Infect* 2021;27:1–4
- Fuentefria, A. M. et al. 2018. "Antifungals Discovery: An Insight into New Strategies to Combat Antifungal Resistance." *Letters in Applied Microbiology* 66(1): 2–13.
- Galenza, Anthony, and Edan Foley. 2019. "Immunometabolism : Insights from the *Drosophila* Model." 94(January): 22–34.
- Ganeshkumar A, Gonçale JC, Rajaram R, Junqueira JC. Anti-Candidal Marine Natural Products: A Review. *J Fungi (Basel).* 2023 Jul 28;9(8):800.
- Gupta AK, Kohli Y. In vitro susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and in vitro evaluation of combination antifungal activity. *Br J Dermatol.* 2003;149(2):296-305.
- Gupta AK, Paquet M, Simpson FC. Therapies for the treatment of onychomycosis. *Clin Dermatol.* 2013;31:544-554.
- Hatipoglu, Nevin, and Husem Hatipoglu. 2013. "Combination Antifungal Therapy for Invasive Fungal Infections in Children and Adults." *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 11(5): 523–35.
- Hill JA, Cowen LE. Using combination therapy to thwart drug resistance. *Future Microbiol.* 2015;10(11):1719-26

- Hof H, Juretschke C (2019) Nitroxoline: an option for the treatment of urinary tract infection with multi-resistant uropathogenic bacteria. *Infection* 47:493–495
- Hof, H. Candidurie! Was nun?. *Urologe* 56, 172–179 (2017).
- Jacobus Berlitz S, Reginatto P, Machado GDRM, Fuentefria AM, Morisso FDP, Contri RV, Kùlkamp-Guerreiro IC. Development of a Clioquinol Nanocarrier as a New, Promising Option for the Treatment of Dermatophytosis. *Pharmaceutics*. 2023 Feb 4;15(2):531.
- Joaquim, A. R., Pippi, B., de Cesare, M. A., Rocha, D. A., Boff, R. T., Staudt, K. J., de Andrade, S. F. (2018). Rapid tools to gain insights into the interaction dynamics of new 8-hydroxyquinolines with few fungal lines. *Chemical Biology & Drug Design*.
- Khurana, Ananta, Kabir Sardana, and Anuradha Chowdhary. 2019. "Antifungal Resistance in Dermatophytes : Recent Trends and Therapeutic Implications." *Fungal Genetics and Biology* 132(July): 103255.
- Kuru S (2021) Fifty years after the identification of the cause of SMON. *Clin Neurol* 61:109-114.
- Lamaris GA, Chamilos G, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Virulence studies of *Scedosporium* and *Fusarium* species in *Drosophila melanogaster*. *J Infect Dis*. 2007;196:1860-1864.
- Lanternier, Fanny et al. 2013. "Deep Dermatophytosis and Inherited CARD9 Deficiency." *New England Journal of Medicine* 369(18): 1704–14.
- Laurent, Alexis, and Michel Monod. 2017. "Production of *Trichophyton Rubrum* Microspores in Large Quantities and Its Application to Evaluate Amorolfine/Azole Compound Interactions in Vitro." *Mycoses* 60(9): 581–86.
- Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:697-743.
- Lionakis MS, Lewis RE, May GS, et al. Toll-deficient drosophila flies as a fast, high-throughput model for the study of antifungal drug efficacy against invasive aspergillosis and aspergillus virulence. *J Infect Dis*. 2005;191:1188-1195.
- Makki, Rami, Einat Cinnamon, and Alex P Gould. 2014. "The Development and Functions of Oenocytes." *Annual Review of Entomology* 59(1): 405–25.
- Mao, X., & Schimmer, A. The toxicology of Clioquinol. *Toxicology Letters*, 2008, 182(1-3), 1–6.
- Marconi, Vincent C. et al. 2010a. "Disseminated Dermatophytosis in a Patient with Hereditary Hemochromatosis and Hepatic Cirrhosis: Case Report and Review of the Literature." *Medical Mycology* 48(3): 518–27.
- Marconi, Vincent C. et al. 2010a. "Disseminated Dermatophytosis in a Patient with Hereditary Hemochromatosis and Hepatic Cirrhosis: Case Report and Review of the

- Literature." *Medical Mycology* 48(3): 518–27.
- Medić-Sarić M, Maysinger D, Movrin M, Dvorzak I (1980). Antibacterial and antifungal activities of nitroxoline Mannich bases. *Chemotherapy*. 1980;26(4):263-267.
- Merkel S, Heidrich D, Danilevicz CK, Scroferneker ML, Zanette RA. *Drosophila melanogaster* as a model for the study of *Malassezia pachydermatis* infections. *Vet Microbiol*. 2018;224:31-33.
- Nett, Jeniel E, and David R Andes. 2015. "Fungal Biofilms : In Vivo Models for Discovery of Anti-Biofilm Drugs." *Microbiology spectrum* 3(4): 1–13.
- Oliveri, Valentina, and Graziella Vecchio. 2016. "8-Hydroxyquinolines in Medicinal Chemistry: A Structural Perspective." *European Journal of Medicinal Chemistry* 120: 252–74.
- Osei-Owusu H, Kudera T, Strakova M, Rondevaldova J, Skrivanova E, Novy P, Kokoska L. In Vitro Selective Combinatory Effect of Ciprofloxacin with Nitroxoline, Sanguinarine, and Zinc Pyrithione against Diarrhea-Causing and Gut Beneficial Bacteria. *Microbiol Spectr*. 2022 Oct 26;10(5):e0106322.
- Pandurangan, Nanjan, "A Rapid, Solvent-Free Deprotection of Methoxymethyl (MOM) Ethers by pTSA; An Eco-Friendly Approach", *Letters in Organic Chemistry* (2017) 14: 231.
- Peres, Nalu Teixeira de Aguiar, Fernanda Cristina Albuquerque Maranhão, Antonio Rossi, and Nilce Maria Martinez-Rossi. 2010. "Dermatophytes: Host-Pathogen Interaction and Antifungal Resistance." *Anais brasileiros de dermatologia* 85(5): 657–67.
- Perez DR, Sklar LA, Chigaev A (2019) Clloquinol: To harm or heal. *Pharmacol Ther* 199:155-163.
- Pippi, Bruna et al. 2017. "Evaluation of 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Hits for Antifungal Drug Design." *Medical Mycology* 55(7): 763–73.
- Pires, Carla Andréa Avelar et al. 2014. "Clinical, Epidemiological, and Therapeutic Profile of Dermatophytosis." *Anais Brasileiros de Dermatologia* 89(2): 259–64.
- Prachayasittikul V, Prachayasittikul S, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. 2013. 8-Hydroxyquinolines: a review of their metal chelating properties and medicinal applications. *Drug Design, Development and Therapy*.7:1157-1178.
- Puértolas-Balint Fabiola, Omar Warsi, Marius Linkevicius, Po-Cheng Tang, Dan I Andersson, Mutations that increase expression of the EmrAB-TolC efflux pump confer increased resistance to nitroxoline in *Escherichia coli*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 75, Issue 2, February 2020, Pages 300–308.
- Ramage, Gordon et al. 2012. "Fungal Biofilm Resistance." *International Journal of*

*Microbiology*: 1–14.

- Rosa PD, Heidrich D, Corrêa C, et al. Genetic diversity and antifungal susceptibility of *Fusarium* isolates in onychomycosis. *Mycoses*. 2017;60(9):616-622.
- Rosa PD, Ramirez-Castrillon M, Borges R, Aquino V, Meneghello Fuentefria A, Zubaran Goldani L. Epidemiological aspects and characterization of the resistance profile of *Fusarium* spp. in patients with invasive fusariosis. *J Med Microbiol*. 2019;68(10):1489-1496.
- Sahoo and Mahajan. Management of tinea corporis, tinea cruris, and tinea pedis: A comprehensive review. *Indian Dermatology Online Journal - March-April 2016 - Volume 7 - Issue 2*
- Sahoo, AlokKumar, and Rahul Mahajan. 2016. "Management of Tinea Corporis, Tinea Cruris, and Tinea Pedis: A Comprehensive Review." *Indian Dermatology Online Journal* 7(2): 77.
- Scorzoni, L. et al. 2017. "Antifungal Therapy : New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis." *Frontiers Microbiology* 8(36): 1–23.
- Scorzoni, Liliana et al. 2016. "Searching New Antifungals: The Use of in Vitro and in Vivo Methods for Evaluation of Natural Compounds." *Journal of Microbiological Methods*.
- Sharma, Priyanka, Mala Bhalla, Gurvinder P Thami, and Jagdish Chander. 2019. "Evaluation of Efficacy and Safety of Oral Terbinafine and Itraconazole Combination Therapy in the Management of Dermatophytosis." *Journal of Dermatological Treatment* 0(0): 1–5.
- Shrestha, Sanjib K., Marina Y. Fosso, and Sylvie Garneau-Tsodikova. 2015. "A Combination Approach to Treating Fungal Infections." *Scientific Reports* 5: 1–11.
- Sugiura K, Masumoto A, Tachibana H, Tatsumi Y. In Vitro Combination Effect of Topical and Oral Anti-Onychomycosis Drugs on *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton interdigitale*. *J Fungi (Basel)*. 2021 Mar 12;7(3):208.
- Tamura, Takashi et al. 2014. "In Vitro Susceptibility of Dermatomyces Agents to Six Antifungal Drugs and Evaluation by Fractional Inhibitory Concentration Index of Combined Effects of Amorolfine and Itraconazole in Dermatophytes." *Microbiology and Immunology* 58(1): 1–8.
- Tascini, C. et al. 2003. "Caspofungin in Combination with Itraconazole and Amphotericin B for the Treatment of Invasive Aspergillosis in Humans, with a Method to Test Ex Vivo Synergism [1]." *Clinical Microbiology and Infection* 9(8): 901–2.
- Weitzman, Irene, and Richard C. Summerbell. 1995. "The Dermatophytes." *American*

*Society for Microbiology* 8(2): 240–59.

Wijma Rixt A, Angela Huttner, Birgit C P Koch, Johan W Mouton, Anouk E Muller, Review of the pharmacokinetic properties of nitrofurantoin and nitroxoline, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 73, Issue 11, November 2018, Pages 2916–2926.

Wu, Lung-Chi, Pei-Lun Sun, and Yun-Ting Chang. 2013. “Extensive Deep Dermatophytosis Cause by *Trichophyton Rubrum* in a Patient with Liver Cirrhosis and Chronic Renal Failure.” *Mycopathologia* 176: 457–62.

Wykowski R, Fuentefria AM, de Andrade SF. Antimicrobial activity of clioquinol and nitroxoline: a scoping review. *Arch Microbiol.* 2022 Jul 30;204(8):535.

Xiong G, Wu Z, Yi J, Fu L, Yang Z, Hsieh C, Yin M, Zeng X, Wu C, Lu A, Chen X, Hou T, Cao D. ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. *Nucleic Acids Res.* 2021 Jul 2;49(W1):W5-W14.

You Z, Zhang C, Ran Y (2020) The effects of clioquinol in morphogenesis, cell membrane and ion homeostasis in *Candida albicans*. *BMC Microbiol* 20(1):165.

Zanette, Régis A, Janio M Santurio, Erico S Loreto, and Sydney H Alves. 2013. “Toll - Deficient *Drosophila* Is Susceptible to *Pythium Insidiosum* Infection.” *Microbiology and Immunology* 57: 732–35.

Zhai S, Yang L, Cui QC, Sun Y, Dou QP, Yan B. Tumor cellular proteasome inhibition and growth suppression by 8-hydroxyquinoline and clioquinol requires their capabilities to bind copper and transport copper into cells. *J Biol Inorg Chem.* 2010;15(2):259-269.

Zhang,Q.;Liu,F.;Zeng,M.;Mao,Y.;Song,Z. Drug Repurposing Strategies in the Development of Potential Antifungal Agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2021, 105, 5259–5279.