

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Tarcieli Pozzebon Venturini

**QUIMIOSENSIBILIZANTES SINTÉTICOS E NATURAIS
ASSOCIADOS A ANTIFÚNGICOS CONVENCIONAIS FRENTE A
Fusarium spp.**

Santa Maria, RS, Brasil
2016

Tarcieli Pozzebon Venturini

**QUIMIOSENSIBILIZANTES SINTÉTICOS E NATURAIS ASSOCIADOS A
ANTIFÚNGICOS CONVENCIONAIS FRENTE A *Fusarium* spp.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof Dr. Sydney Hartz Alves

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Pozzebon Venturini, Tarcieli
Quimiossensibilizantes sintéticos e naturais
associados a antifúngicos convencionais frente a
Fusarium spp. / Tarcieli Pozzebon Venturini.-2016.
159 p.; 30cm

Orientador: Sydney Hartz Alves
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2016

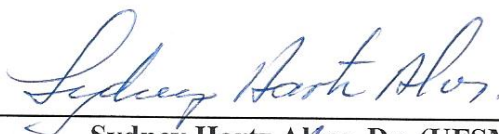
1. Suscetibilidade 2. Fusarium spp. 3.
Quimiossensibilizantes 4. Antifúngicos 5. Sinergismo I.
Hartz Alves, Sydney II. Título.

Tarcieli Pozzebon Venturini

**QUIMIOSENSIBILIZANTES SINTÉTICOS E NATURAIS ASSOCIADOS A
ANTIFÚNGICOS CONVENCIONAIS FRENTE A *Fusarium* spp.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas, da Universidade
Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como
requisito parcial para obtenção do título de
Doutor em Ciências Farmacêuticas.


Aprovado em 24 de março de 2016:



Sydney Hartz Alves, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



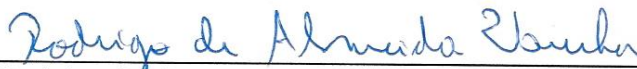
Alexandre Meneghelo Euentefria, Dr. (UFRGS)



Paulo Guilherme Markus Lopes, Dr. (UCSPA)



Priscila de Arruda Trindade, Dra. (UFSM)



Rodrigo de Almeida Vaucher, Dr. (UNIFRA)

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista aos meus pais, Tarcisio Luiz e Rita Helena, e a minha irmã Talita.
Obrigada por todo apoio, amor e compreensão!
Amo vocês!!!

*“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes.”
(Isaac Newton)*

AGRADECIMENTOS

Acredito que ninguém chega a algum lugar sozinho, e nem constrói nada sem apoio. Gostaria de agradecer a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta Tese de Doutorado. Com carinho, agradeço:

- a Deus, meu fiel amigo, por sempre iluminar meu caminho e me dar saúde e coragem para enfrentar os obstáculos.

- aos meus amados pais, Rita Helena e Tarcisio Luiz, meus primeiros mestres, que me ensinaram que a honestidade não tem preço, e que a educação sempre será o caminho mais correto a ser seguido. Vocês se sacrificaram por toda a vida para que eu pudesse realizar meus sonhos. Cada conquista realizada é de vocês, é para vocês. Minha eterna gratidão e amor.

- a minha amada irmã, Talita, por todo seu amor, cumplicidade e compreensão durante esta jornada e todos os momentos da minha vida. Obrigada por me dar força sempre. Meu porto seguro! Amo-te!

- ao meu orientador, Prof. Dr. Sydney Hartz Alves, exemplo de professor e pesquisador, que ainda na graduação apresentou-me a micologia, despertando meu interesse por esta área tão fascinante. Meu sincero agradecimento, pela orientação, pelos ensinamentos, pela amizade e pela confiança.

- ao meu querido cunhado e amigo, Carlos Eduardo, pela cumplicidade, amizade e incentivo nos momentos que mais precisei de apoio.

- às amigas, Luana, Francieli, Patrícia e Rosieli, obrigada por acreditarem na minha capacidade e me apoiarem nos momentos mais difíceis.

- ao Prof. Dr. Janio Morais Santurio, pelo incentivo, amizade e ensinamentos, que muito me ajudaram nesta trajetória.

- a minha estagiária Jéssica, pela dedicação, amizade e seriedade na execução dos experimentos.

- aos colegas e amigos do LAPEMI, pela amizade e companheirismo. Em especial a Bel, Carlinha, Dani, Tati e Vanessa, muito obrigada pela amizade, apoio e pelos ensinamentos em biologia molecular.

- à Universidade Federal de Santa Maria, pelo ensino público e gratuito de qualidade.

- à FAPERGS, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, pela bolsa de doutorado concedida.

Meus sinceros agradecimentos a todos!

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.”

(São Francisco de Assis)

RESUMO

QUIMIOSENSIBILIZANTES SINTÉTICOS E NATURAIS ASSOCIADOS A ANTIFÚNGICOS CONVENCIONAIS FRENTE A *Fusarium* spp.

AUTORA: Tarcieli Pozzebon Venturini
ORIENTADOR: Sydney Hartz Alves

O gênero *Fusarium* é caracterizado por fungos filamentosos hialinos que causam um amplo espectro de infecções predominantemente em pacientes imunocomprometidos. A fusariose disseminada resulta em elevados índices de morbidade e mortalidade, sendo uma infecção de difícil prevenção e tratamento. A marcante resistência primária deste gênero aos antifúngicos convencionais impõe a busca por novas possibilidades terapêuticas. Uma alternativa é a combinação entre agentes antifúngicos e quimiossensibilizantes com diferentes mecanismos de ação. Este estudo objetivou avaliar a suscetibilidade *in vitro* de espécies de *Fusarium* a antifúngicos convencionais (anfotericina B, itraconazol, voriconazol e caspofungina), compostos orgânicos de selênio (disseleneto de difenila e ebselen), fármacos não antifúngicos (amiodarona, doxiciclina, moxifloxacina, pentamidina, polimixina B, tigeciclina e tobramicina) e fitocompostos (cinamaldeído, carvacrol e timol), através do método de microdiluição em caldo (M38-A2, CLSI). As combinações entre os agentes antifúngicos e quimiossensibilizantes foram avaliadas através da técnica de *checkerboard*. Entre os antifúngicos testados, a anfotericina B demonstrou maior atividade *in vitro* (0,25-8 µg/ml); seguida pelo voriconazol (1-16 µg/ml), itraconazol (>16 µg/ml) e caspofungina (>32 µg/ml). O disseleneto de difenila (4-32 µg/ml), ebselen (2-8 µg/ml), pentamidina (4-32 µg/ml) e polimixina B (4-16 µg/ml) também demonstraram atividade antifúngica contra *Fusarium* spp. Ebselen e disseleneto de difenila apresentaram altas taxas de sinergismos em combinação com anfotericina B (88% e 72%, respectivamente) ou voriconazol (80% e 64%, respectivamente). As combinações com fármacos não antifúngicos também resultaram em sinergismos, destacando-se as seguintes associações (% de sinergismo): tobramicina + anfotericina B (80%) ou voriconazol (76%); polimixina B + anfotericina B (76%) ou voriconazol (64%); pentamidina + anfotericina B (72%) ou voriconazol (68%); amiodarona + anfotericina B (64%) ou voriconazol (76%); e moxifloxacina + anfotericina B (72%) ou voriconazol (60%). Além disso, os fitocompostos, timol e carvacrol demonstraram potente atividade quimiossensibilizante em associação com caspofungina (96% e 88%, respectivamente). Entre todas as combinações testadas não foram observadas interações antagônicas. Em conclusão, as combinações mais relevantes merecem uma futura investigação em modelos experimentais *in vivo*, pois estas associações apontam novos candidatos potenciais para a terapia combinada da fusariose.

Palavras-chave: Suscetibilidade. Quimiossensibilizantes. Associações. Antifúngicos. Sinergismo. *Fusarium* spp.

ABSTRACT

SYNTHETIC AND NATURAL CHEMOSENSITIZERS ASSOCIATED WITH CONVENTIONAL ANTIFUNGALS AGAINST *Fusarium* spp.

AUTHOR: Tarcieli Pozzebon Venturini

ADVISOR: Sydney Hartz Alves

The genus *Fusarium* is characterized by hyaline filamentous fungi that cause a wide spectrum of infections predominantly in immunocompromised patients. Disseminated fusariosis results in high rates of morbidity and mortality, since it is of difficult prevention and treatment. The remarkable primary resistance to conventional antifungals of this genus requires the search for new therapeutic possibilities. A possible attempt is the combination of antifungals and chemosensitizing agents with different mechanisms of action. This study aimed to evaluate the *in vitro* susceptibility of *Fusarium* to conventional antifungal agents (amphotericin B, itraconazole, voriconazole and caspofungin); organoselenium compounds (diphenyl diselenide and ebselen), nonantifungal drugs (amiodarone, doxycycline, moxifloxacin, pentamidine, polymyxin B, tigecycline and tobramycin), and phytochemicals (cinnamaldehyde, carvacrol and thymol), through broth microdilution method (M38-A2, CLSI). The combinations between the antifungal agents and chemosensitizers were assessed through the *checkerboard* technique. Among the antifungals tested amphotericin B showed greater activity *in vitro* (0.25-8 µg/ml); followed by voriconazole (1-16 µg/ml), itraconazole (>16 µg/ml) and caspofungin (>32 µg/ml). Diphenyl diselenide (4-32 µg/ml), ebselen (2-8 µg/ml), pentamidine (4-32 µg/ml) and polymyxin B (4-16 µg/ml) also showed antifungal activity against *Fusarium* spp. Ebselen and diphenyl diselenide presented high rates of synergism in combination with amphotericin B (88% and 72%, respectively) or voriconazole (80% e 64%, respectively). Combinations with nonantifungal drugs have also resulted in synergism, highlighting the following associations (% of synergism): tobramycin + amphotericin B (80%) or voriconazole (76%); polymyxin B + amphotericin B (76%) or voriconazole (64%); pentamidine + amphotericin B (72%) or voriconazole (68%); amiodarone + amphotericin B (64%) or voriconazole (76%); and moxifloxacin + amphotericin B (72%) or voriconazole (60%). Furthermore, the phytochemicals thymol and carvacrol have showed potent chemosensitizer activity in association to caspofungin (96% e 88%, respectively). Among all the tested combinations, no antagonistic interactions were observed. In conclusion, the most relevant combinations deserve a future investigation *in vivo* experimental models, since these associations suggest new potential candidates for combined therapy against fusariosis.

Keywords: Susceptibility. Chemosensitizers. Associations. Antifungals. Synergism. *Fusarium* spp.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1 APRESENTAÇÃO

Figura 1 - Micromorfologia.....	25
Figura 2 - Estrutura química do disseleneto de difenila.....	37
Figura 3 - Estrutura química do ebselen.....	38
Figura 4 - Estrutura química do cinamaldeído.....	47
Figura 5 - Estrutura química do timol e carvacrol.....	49
Figura 6 - Representação da técnica de <i>checkerboard</i>	56

LISTA DE TABELAS

1 APRESENTAÇÃO

Tabela 1 - Espécies de <i>Fusarium</i> envolvidas em infecções humanas agrupadas em complexos de espécies	24
Tabela 2 - Identificação molecular dos isolados clínicos de <i>Fusarium</i>	52
Tabela 3 - Faixa de concentração testada e solventes utilizados para cada agente	54

2 ARTIGO 1

Table 1 - <i>In vitro</i> susceptibility of <i>Fusarium</i> spp. to antifungal agents and organoselenium compounds	69
Table 2 - <i>In vitro</i> combinations of antifungal agents and organoselenium compounds against <i>Fusarium</i> spp.	70

3 MANUSCRITO 1

Table 1 - <i>In vitro</i> susceptibility of <i>Fusarium</i> spp. to antifungal and antimicrobial agents	86
Table 2 - <i>In vitro</i> combinations of antifungal and antimicrobial agents against the <i>Fusarium</i> isolates	87

4 MANUSCRITO 2

Table 1 - <i>In vitro</i> combinations of nonantifungal agents and amphotericin B or caspofungin against <i>Fusarium</i> spp.	107
Table 2 - <i>In vitro</i> combinations of nonantifungal agents and itraconazole or voriconazole against <i>Fusarium</i> spp.	108

5 MANUSCRITO 3

Tabela 1 - Combinações <i>in vitro</i> entre fitocompostos e anfotericina B ou caspofungina contra <i>Fusarium</i> spp.	124
Tabela 2 - Combinações <i>in vitro</i> entre fitocompostos e itraconazol ou voriconazol contra <i>Fusarium</i> spp.	125

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	21
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO.....	23
1.1.1 O gênero <i>Fusarium</i>	23
1.1.1.1 Classificação	23
1.1.1.2 Morfologia	24
1.1.1.3 Manifestações clínicas e epidemiologia da fusariose	25
1.1.1.4 Tratamento	27
1.1.2 Agentes antifúngicos	28
1.1.2.1 Suscetibilidade de <i>Fusarium spp.</i> aos agentes antifúngicos	29
1.1.2.2 Mecanismos de resistência do gênero <i>Fusarium</i>	30
1.1.3 Combinações entre agentes antifúngicos	31
1.1.4 Combinações entre agentes antifúngicos e quimiossensibilizantes	33
1.1.4.1 Compostos orgânicos de selênio	35
1.1.4.1.1 Disseleneto de difenila.....	36
1.1.4.1.2 Ebselen	37
1.1.4.2 Fármacos não antifúngicos	38
1.1.4.2.1 Amiodarona	39
1.1.4.2.2 Doxiciclina	40
1.1.4.2.3 Moxifloxacina.....	40
1.1.4.2.4 Pentamidina	42
1.1.4.2.5 Polimixina B	43
1.1.4.2.6 Tigeciclina	44
1.1.4.2.7 Tobramicina.....	45
1.1.4.3 Fitocompostos.....	46
1.1.4.3.1 Cinamaldeído.....	46
1.1.4.3.2 Carvacrol	48
1.1.4.3.3 Timol	49
1.2 PROPOSIÇÃO	50
1.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
1.3.1 Micro-organismos	51
1.3.2 Agentes antifúngicos e quimiossensibilizantes	53
1.3.3 Testes de suscetibilidade	54
1.3.3.1 Preparação do inóculo	54
1.3.3.2 Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações efetivas mínimas (CEMs).....	55
1.3.4 Avaliação das combinações	55
2 ARTIGO 1 - Antifungal activities of diphenyl diselenide and ebselen alone and in combination with antifungal agents against <i>Fusarium spp.</i>	57
Abstract	61
1. Introduction	61
2. Material and methods	62
2.1 Clinical isolates and molecular identification	62
2.2 Chemicals	63
2.3 <i>In vitro</i> susceptibility and drug combinations tests	63
3. Results	64
4. Discussion	64
Acknowledgements	66
Declaration of interest	66

References	66
3 MANUSCRITO 1 - In vitro synergistic combinations of pentamidine, polymyxin B, tigecycline and tobramycin with antifungal agents against <i>Fusarium</i> spp.	71
Summary	75
INTRODUCTION	77
MATERIAL AND METHODS	77
<i>Fusarium</i> isolates	77
Drugs.....	78
<i>In vitro</i> susceptibility and drug interaction tests	78
RESULTS	79
DISCUSSION	80
ACKNOWLEDGEMENTS	82
CONFLICT OF INTEREST	82
REFERENCES	82
4 MANUSCRITO 2 - In vitro synergism obtained by amiodarone, doxycycline or moxifloxacin combined with antifungal agents against <i>Fusarium</i> spp.	89
Abstract.....	93
1. Introduction	95
2. Material and methods	96
3. Results	97
4. Discussion	98
Acknowledgements.....	101
Declaration of interest	101
References	102
5 MANUSCRITO 3 - Atividade quimiossensibilizante do cinamaldeído, carvacrol e timol combinados com agentes antifúngicos contra isolados clínicos de <i>Fusarium</i> spp.	109
5.1 RESUMO	113
5.2 INTRODUÇÃO	113
5.3 MATERIAIS E MÉTODOS	115
5.4 RESULTADOS.....	116
5.5 DISCUSSÃO	117
AGRADECIMENTOS.....	120
DECLARAÇÃO DE INTERESSE.....	120
REFERÊNCIAS	120
6 DISCUSSÃO	127
7 CONCLUSÃO	133
REFERÊNCIAS	135
ANEXO A – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DO DNA	155
ANEXO B – PUBLICAÇÃO DO ARTIGO 1	157
ANEXO C – SUBMISSÃO DO MANUSCRITO 1	159

1 APRESENTAÇÃO

Devido aos progressos realizados nas áreas de terapias intensivas, hemato-oncologia e em particular, transplantes, o número de pacientes imunocomprometidos têm aumentado constantemente. Embora os agentes antibacterianos de última geração tenham contribuído amplamente para a melhoria do prognóstico destes pacientes, houve um aumento do número de pacientes imunocomprometidos com risco de infecção fúngica sistêmica (KULLBERG; OUDE LASHOF, 2002; PÉMAN; SALAVERT, 2014; PFALLER; PAPPAS; WINGARD, 2006).

O espectro de patógenos fúngicos envolvidos em infecções humanas sofreu alterações significativas desde 1980. *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus* representavam os principais agentes causadores de infecções fúngicas. Nos últimos anos, outros fungos, tais como *Candida não-albicans*, *Aspergillus não-fumigatus*, *Fusarium* sp., zigomicetos e agentes de feohifomicoses, têm emergido como agentes de infecções fúngicas oportunistas (GARNICA; NUCCI, 2009; PÉMAN; SALAVERT, 2014). As infecções causadas por estes fungos costumam ser mais graves e de difícil tratamento devido a resistência a maioria dos fármacos antifúngicos disponíveis (PÉMAN; SALAVERT, 2014).

Fusarium sp. é um fungo filamentosso hialino, amplamente distribuído no solo, em plantas e diferentes substratos orgânicos. Além de ser considerado um importante patógeno de plantas, também é capaz de causar uma gama de manifestações clínicas em humanos, incluindo infecções superficiais localizadas, subcutâneas ou disseminadas. A fusariose disseminada é mais frequentemente observada em imunocomprometidos, especialmente, pacientes com malignidades hematológicas, transplantados de células-tronco hematopoiéticas (HSCT) e órgãos sólidos, e pacientes sob tratamento quimioterápico (NUCCI et al., 2003; NUCCI et al., 2004). Apesar de ser considerada uma infecção rara, a fusariose disseminada é, depois da aspergilose, a segunda causa mais prevalente de infecções invasivas por fungos filamentosos neste grupo de pacientes (MUHAMMED et al., 2011; NUCCI; ANAISSIE, 2007).

O gênero *Fusarium* destaca-se pela sua resistência a maioria dos agentes antifúngicos, sendo as espécies do complexo *Fusarium solani* as mais resistentes, e também, as espécies mais isoladas no contexto clínico (CUENCA-ESTRELLA et al., 2006; NUCCI; ANAISSIE, 2007).

A terapia recomendada para fusariose é anfotericina B desoxicolato, ou suas formulações lipídicas, e voriconazol. O posaconazol tem sido utilizado em casos refratários

(TORTORANO et al., 2014). No entanto, o uso da monoterapia para o tratamento da fusariose sistêmica não tem sido completamente satisfatória (NUCCI; ANAISSIE, 2007). Na prática clínica, a fusariose disseminada resulta em altas taxas de mortalidade, atingindo índices de aproximadamente 80% (TORRES; KONTOYIANNIS, 2003, p. 252).

Considerando que a terapia ideal para a fusariose disseminada não está estabelecida, outras estratégias de tratamento mais eficazes devem ser desenvolvidas. A combinação entre duas classes distintas de antifúngicos, sobretudo com diferentes mecanismos de ação, tem sido explorada a fim de superar a resistência fúngica e as altas taxas de morbidade e mortalidade causada por infecções fúngicas oportunistas (JOHNSON et al., 2004).

Alguns autores introduziram o termo “quimiossensibilização” para denominar uma estratégia terapêutica para controle de fungos patogênicos, em que um agente quimiossensibilizante (ou seja, um agente sintético ou natural) torna a célula fúngica mais suscetível ao ataque do agente antifúngico convencional (CAMPBELL; CHAN; KIM, 2012). Neste cenário, ocorre o sinergismo entre dois agentes, o qual resulta em grandes vantagens para o tratamento clínico, como a redução da toxicidade e superação da resistência fúngica (JOHNSON et al., 2004).

Esta abordagem tem despertado um crescente interesse na terapia combinada pelo fato de possuímos um limitado número de antifúngicos disponíveis no mercado atual, e também, pelo problema da emergência da resistência aos agentes antifúngicos (WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009). Embora a terapia combinada tenha demonstrado alguma eficácia na prática clínica, ainda não existem dados suficientes disponíveis para recomendar essa abordagem no tratamento da fusariose (GUARRO, 2013). A atividade combinada de agentes antifúngicos e quimiossensibilizantes sobre o gênero *Fusarium* é ainda pouco conhecida, requerendo, portanto, urgente avaliação.

Neste contexto, o presente estudo avaliou a atividade quimiossensibilizante *in vitro* de compostos orgânicos de selênio, fármacos não antifúngicos amplamente utilizados na prática clínica e fitocompostos, em combinação com agentes antimicóticos clássicos frente a espécies de *Fusarium*.

1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1.1 O gênero *Fusarium*

1.1.1.1 Classificação

O gênero *Fusarium* tem ampla distribuição geográfica, ocorrendo em praticamente todos os ambientes, em decorrência da sua capacidade de desenvolvimento em diversos substratos orgânicos e de seus mecanismos de dispersão (NELSON; DIGNANI; ANAISSIE, 1994). De Hoog e colaboradores classificaram *Fusarium* como pertencente ao Reino *Eumycota*, Divisão *Ascomycota*, Classe *Euascomycetes*, Ordem *Hipocreales*, Família *Hypocreaceae*, Gênero *Fusarium*, devido à capacidade deste fungo em produzir estruturas sexuadas e assexuadas que caracterizam esta classificação (DE HOOG et al., 2000).

Este gênero compreende a pelo menos 200 espécies, agrupadas em aproximadamente 10 complexos de espécies filogenéticas (O'DONNELL et al., 2010). A maioria destas espécies são saprófitas do solo ou patógenos de plantas. Cerca de 70 espécies têm sido envolvidas em infecções humanas ou animais, sendo que a maioria delas foi agrupada em complexos (Tabela 1). As espécies de *Fusarium* (forma anamórfica) têm sido relacionadas com suas formas teleomórficas (*Haemonectria* e *Gibberella*). Duas denominações diferentes têm sido utilizadas para se referir ao anamorfo ou teleomorfo de uma única espécie. No entanto, em 2013, o Código Internacional de Nomenclaturas para algas, fungos e plantas extinguiu o uso destas duas nomenclaturas (HAWKSWORTH, 2011). Portanto, para fungos pleomórficos, isto é, aqueles que apresentam estágios assexuados e sexuados, apenas um nome deve ser utilizado. Assim, a nomenclatura *Fusarium* sobrepõe as suas nomenclaturas teleomórficas (GEISER et al., 2013).

Tabela 1 - Espécies de *Fusarium* envolvidas em infecções humanas agrupadas em complexos de espécies

Complexo de espécies <i>F. incarnatum</i> - <i>F. equiseti</i> (FIESC)
<i>F. lacertarum</i>
<i>F. equiseti</i>
18 espécies não nomeadas
Complexo de espécies <i>F. sambucinum</i> (FSAMSC)
<i>F. armeniacum</i>
<i>F. brachygibbosum</i>
<i>F. sporotrichioides</i>
Complexo de espécies <i>F. tricinctum</i> (FTSC)
<i>F. acuminatum</i>
<i>F. flocciferum</i>
2 espécies não nomeadas
Complexo de espécies <i>F. fujikuroi</i> (FFSC)
<i>F. napiforme</i>
<i>F. guttiforme</i>
<i>F. verticillioides</i>
<i>F. thapsinum</i>
<i>F. nygamai</i>
<i>F. acutatum</i>
<i>F. fujikuroi</i>
<i>F. proliferatum</i>
<i>F. sacchari</i>
<i>F. ananatum</i>
<i>F. subglutinans</i>
<i>F. napiforme</i>
Complexo de espécies <i>F. oxysporum</i> (FOSC)
3 espécies não nomeadas
Complexo de espécies <i>F. chlamydosporum</i> (FCSC)
3 espécies não nomeadas
<i>F. concolor</i>
<i>F. cf. Lateritium</i>
Complexo de espécies <i>F. solani</i> (FSSC)
<i>F. falciforme</i>
<i>F. lichenicola</i>
<i>F. keratoplasticum</i>
<i>F. petroliphilum</i>
17 espécies não nomeadas
Complexo de espécies <i>F. dimerum</i> (FDSC)
<i>F. delphinoides</i>
<i>F. penzigii</i>
<i>F. dimerum</i>
2 espécies não nomeadas

Fonte: (adaptado de GUARRO et al., 2013)

1.1.1.2 Morfologia

As espécies de *Fusarium* crescem em muitos meios de cultura, sem cicloheximida, pois este é inibitório. O micélio apresenta aspecto aveludado ou levemente cotonoso, opaco ou levemente brilhante. Após 7 a 10 dias de incubação (25°C), estas espécies podem apresentar diferentes pigmentações, de coloração rosa, púrpura, cinza ou amarela (DIGNANI;

KIWAN; ANAISSIE, 2003, p. 313; GUARRO; GENÉ, 1992). Os meios de cultivo mais utilizados para o isolamento são o ágar batata dextrose (PDA) e ágar aveia (OAT). Sendo que, o ágar folha de cravo (AFC) e o ágar suco de tomate (V8) também podem ser utilizados para estimular a conidiogênese (FISCHER et al., 1982; ST-GERMAIN; SUMMERBELL, 1996).

Microscopicamente, as hifas de *Fusarium* spp. nos tecidos, são semelhantes as de *Aspergillus* spp. Os filamentos são hialinos, septados e possuem de 3 a 8 μm de diâmetro (ST-GERMAIN; SUMMERBELL, 1996). A principal característica de identificação deste gênero são os conídios em forma de foice (fusiformes) com extremidades afiladas (levemente curvos ou inclinados), os quais são chamados de macroconídios. Algumas espécies apresentam macroconídios com uma estrutura pronunciada designada como célula pé. Os macroconídios geralmente estão unidos por material mucilaginoso formando massas e podem apresentar de um ou até dez septos transversais. Os microconídios são pequenos, podendo ter forma elipsóide, piriforme ou ovóide, e às vezes, podendo apresentar um septo (GUARRO; GENÉ, 1995). Em situações adversas, algumas espécies podem apresentar clamidoconídios (estruturas de resistência) isolados ou agrupados em cadeias de parede grossa e de localização apical, intercalar ou terminal (Figura 1) (SAMSON; VON REENEN-HOEKSTRA, 1995).

Figura 1 - Micromorfologia



A. Macroconídios; B. Microconídios; C. Clamidoconídios (Fonte: Doctorfungus Coporation, 2003)

1.1.1.3 Manifestações clínicas e epidemiologia da fusariose

As espécies de *Fusarium* são agentes de hialohifomicoses juntamente com outros fungos, tais como, *Aspergillus* sp., *Scedosporium* sp., *Penicillium* sp., entre outros. Hialohifomicose é um termo empregado para designar infecções fúngicas muito heterogêneas, caracterizadas pela presença de hifas hialinas em tecidos (AJELLO, 1996; DIGNANI; KIWAN; ANAISSIE, 2003, p. 313).

As espécies de *Fusarium* mais prevalentes em infecções humanas são membros do complexo *Fusarium solani* (FSSC) [60%], seguido pelas espécies do complexo *Fusarium oxysporum* (FOSC) [20%] (SHORT, et al., 2011). O terceiro mais frequente é complexo *Fusarium fujikuroi*, e menos frequentemente, espécies dos complexos *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIESC), *Fusarium dimerum* (FDSC) e *Fusarium chlamydosporum* (FCSC) (LORTHOLARY et al., 2010; MIGHELI et al., 2010; O'DONNELL et al., 2010; SHORT et al., 2011).

As manifestações clínicas da fusariose dependem do estado imunológico do paciente, bem como, da porta de entrada da infecção, que incluem seios paranasais, pulmões e pele. As apresentações clínicas são muito variadas, desde infecções superficiais localizadas, subcutâneas, até infecções disseminadas (NUCCI; ANAISSIE, 2007). Em pacientes imunocompetentes, as formas localizadas são mais comuns, tais como, onicomicoses, infecções de pele e ceratites. Ocasionalmente, micetomas foram relatados, especialmente em áreas de clima quente e seco (NUCCI; ANAISSIE, 2007; KREDICS et al., 2015). Porém, com menor frequência, outras manifestações podem acometer este grupo. Alguns estudos relataram sinusites (KURIEN et al., 1992), endoftalmites (GABRIELE; HUTCHINS, 1996), peritonites (FLYNN et al., 1996), pneumonias (SANDER; BEYER; AMBERG, 1998), tromboflebitas (MURRAY; BECKIUS; MCALLISTER, 2003), artrite séptica (JAKLE et al., 1983), osteomelites (BOURGUIGNON et al., 1976), e raramente, fungemias com ou sem envolvimento de órgãos (NUCCI; ANAISSIE, 2002). Peterson e colaboradores relataram o primeiro caso de abscesso cerebral em paciente imunocompetente causado por *Fusarium* spp. (PETERSON et al., 2014).

Um dos principais fatores de risco à fusariose é a neutropenia persistente (WALSH et al., 2004). Desta maneira, infecções invasivas e disseminadas são diagnosticadas em imunocomprometidos, principalmente em pacientes hematológicos (NUCCI et al., 2013; NUCCI et al., 2014). A infecção invasiva, comumente envolve a pele, bem como, pulmões e seios paranasais (BROZEK et al., 2011). Geralmente este fungo pode ser isolado de culturas de sangue (40-60%) (NUCCI; ANAISSIE, 2006; BOUTATI; ANAISSIE, 1997). As lesões cutâneas aparecem em 60-80% dos pacientes. Em geral, estas lesões caracterizam-se por uma mácula eritematosa ou pápula, são geralmente endurecidas e dolorosas, com uma área central de necrose. As taxas de mortalidade em pacientes imunocomprometidos variam entre 50 a 80% (BOUTATI; ANAISSIE, 1997; CAMPO; LEWIS; KONTOYIANNIS, 2010; LORTHOLARY et al., 2010; NUCCI; ANAISSIE, 2007; TORRES; KONTOYIANNIS,

2003, p. 252). A neutropenia persistente é uns dos principais fatores associados ao prognóstico desfavorável (NUCCI et al., 2004).

Este fungo tem emergido como o segundo fungo filamentoso oportunista mais comum, depois de *Aspergillus* spp., com alto risco para pacientes com malignidades hematológicas, receptores de órgãos sólidos e transplantados de medula óssea (AVELINO-SILVA et al., 2015; MUHAMMED et al., 2011; NUCCI; ANAISSIE, 2007; SAMPATHKUMAR; PAYA, 2001). Em um estudo realizado em 2000, mais de 90% das infecções causadas por *Fusarium* spp. ocorreram nesta população, sendo que 50% deste grupo eram pacientes leucêmicos (PÓTON et al., 2000). Em outro estudo mais recente, Nucci e colaboradores realizaram uma análise retrospectiva de 233 casos de fusariose invasiva, de 11 países, e concluíram que 92% destes pacientes apresentaram distúrbios hematológicos (NUCCI et al., 2014).

Alguns autores observaram alta incidência e mortalidade da fusariose invasiva no Brasil. Um estudo prospectivo realizado em oito grandes centros, no período de maio de 2007 a julho de 2009, acompanhou 700 pacientes transplantados de células hematopoiéticas e 237 pacientes com leucemia mieloide aguda ou mielodisplasias, durante um ano. Neste período, foram diagnosticados 23 casos de fusariose invasiva, 20 de aspergilose invasiva e 11 casos de candidemias neste grupo de pacientes. Tal estudo concluiu que a incidência da fusariose e aspergilose invasiva foi maior que as candidemias. Além disso, a sobrevivência dos pacientes com fusariose (41%) foi menor que para as outras duas micoses (53%). Este estudo alerta para a alta incidência e mortalidade da fusariose no Brasil em pacientes hematológicos (NUCCI et al., 2013).

1.1.1.4 Tratamento

A fusariose invasiva está associada ao prognóstico desfavorável. A estratégia ideal de tratamento para pacientes com infecção grave por *Fusarium* spp. permanece indefinida devido a resistência deste gênero, a ausência de ensaios clínicos e o papel crítico da imunossupressão.

A Sociedade Européia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas (ESCMID) e a Confederação Européia de Micologia Médica (ECMM) aprovaram uma recente diretriz para o tratamento de hialohifomicoses. Segundo esta convenção, a terapia recomendada para a fusariose é anfotericina B e suas formulações lipídicas e voriconazol. Além disso, o posaconazol é recomendado como terapia de resgate (TORTORANO et al., 2014). Preparações lipídicas de anfotericina B apresentam menos efeitos colaterais e parecem apresentar resposta clínica mais eficaz quando comparado com a anfotericina B desoxicolato

(NUCCI et al., 2003). Os dados sobre terapias combinadas para fusariose estão limitados a alguns relatos de casos: caspofungina e anfotericina B (MAKOWSKY; WARKENTIN; SAVOIE, 2005); anfotericina B e voriconazol (GUZMAN-COTTRILL; ZHENG; CHADWICK, 2004; DURAND-JOLY et al., 2003; HO et al., 2007); e anfotericina B e terbinafina (ROTHER et al., 2004).

Além da terapia antifúngica sistêmica, outras intervenções podem ser realizadas, como o tratamento precoce da doença localizada, o qual é importante para evitar a progressão para uma infecção mais agressiva ou disseminada. Também pode ser realizado o desbridamento cirúrgico de tecidos infectados (ANAISSIE; RINALDI, 1990; BOUTATI; ANAISSIE, 1997; NUCCI; ANAISSIE, 2006) e remoção de cateteres venosos quando há confirmação que esta é a causa da infecção. Além disso, a reversão da imunossupressão é recomendada sempre que possível (NUCCI et al., 2013; NUCCI et al., 2004).

O papel do tratamento adjuvante com fatores estimuladores de colônias de granulócitos (G-CSF) e granulócitos e macrófagos (GM-CSF) não foi estabelecida. Poucos casos relatam sucesso no tratamento da fusariose invasiva com uma combinação de antifúngico e tal tratamento adjuvante (DIGNANI et al., 1997; HELM et al., 1990; RODRIGUEZ et al., 2003; SPIELBERGER et al., 1993).

Devido ao risco de recaídas em pacientes imunossuprimidos que apresentaram infecções prévias, a profilaxia secundária deve ser considerada (voriconazol, posaconazol, anfotericina B e formulações lipídicas) (NUCCI et al., 2003).

1.1.2 Agentes antifúngicos

Apesar da necessidade de terapias antifúngicas mais eficazes, o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos é um desafio, visto que são poucos os alvos potenciais de ação que não são compartilhados pelas células fúngicas e mamíferas. Por esse motivo, a descoberta de agentes antibacterianos tem alcançado êxito em comparação ao avanço dos antifúngicos, uma vez que, muitos sítios de ação presentes na célula bacteriana não estão presentes nas células de mamíferos. Basicamente, há três diferentes alvos para a ação antifúngica: esteróis na membrana citoplasmática, síntese de ácidos nucléicos e constituintes da parede celular. As seis principais classes de fármacos antifúngicos são: poliênicos, azóis, alilaminas, morfolina, antimetabólitos e equinocandinas (KHAN; JAIN, 2000; GUBBINS; ANAISSIE, 2009).

Três classes de agentes antifúngicos atuam sobre o ergosterol da membrana plasmática. Os antifúngicos poliênicos (anfotericina B e nistatina) ligam-se ao ergosterol

formando poros na membrana, aumentando a permeabilidade celular e, posteriormente, ocorre extravasamento de material citoplasmático e morte celular. Os agentes azólicos (imidazólicos e triazólicos) inibem a síntese de ergosterol pela inibição da enzima C-14- α -demetilase bloqueando uma etapa fundamental para a biossíntese do ergosterol. Assim como os antifúngicos azólicos, as alilaminas (terbinafina) bloqueiam a síntese de ergosterol, porém através da inibição da enzima esqualeno epoxidase (ASHLEY, 2010; RYDER, 1992). O uso prolongado de antifúngicos que atuam sobre o ergosterol, como o fluconazol ou a anfotericina B, podem ocasionar hepato e nefrotoxicidade (DIXON; WALSH, 1996). Porém, os triazólicos, especialmente o voriconazol, posaconazol e ravuconazol, representam um novo grupo de azólicos com maior eficiência e menor toxicidade que os imidazólicos (GUPTA; KOHU; BATRA, 2005; QUINDÓS et al., 2007).

A 5-fluorocitosina atua sobre a síntese de ácidos nucleicos. No interior da célula, este antifúngico é convertido a 5-fluorouracil, que inibe a timidilato sintetase, bloqueando a síntese de DNA fúngica (DREW, 2010). Porém, este fármaco pode causar depressão da medula óssea e hepatotoxicidade (DIXON; WALSH, 1996; VERMES; GUCHELAAR; DANKERT, 2000).

A mais nova classe de agentes antifúngicos são as equinocandinas, representadas pela caspofungina, anidulafungina e micafungina. Estas agem na β -(1,3)-D-glucano sintase, a qual é responsável pela síntese de parede celular dos fungos, que é composta de um complexo de proteínas e polícarboidratos, como, glucana, manana e quitina. Assim, o bloqueio desta enzima provoca uma instabilidade osmótica comprometendo a integridade da célula fúngica causando sua lise. Estes fármacos têm demonstrado poucos efeitos colaterais na prática clínica (JOHNSON; MOHR, 2010).

*1.1.2.1 Suscetibilidade de *Fusarium* spp. aos agentes antifúngicos*

O perfil típico de suscetibilidade antifúngica de *Fusarium* spp. é a resistência em relação à maioria dos agentes antifúngicos. Em geral, as espécies de *Fusarium* spp. são resistentes aos antifúngicos azólicos mais antigos, como o itraconazol e fluconazol, e às equinocandinas. Em relação ao voriconazol e a anfotericina B, a resistência é bastante variada (MUHAMMED et al., 2011). Posaconazol e terbinafina também têm demonstrado atividade para algumas espécies (AL-HATMI et al., 2015; AZOR et al., 2008).

Embora, até o momento, não haja valores de *breakpoints* para *Fusarium* spp., a anfotericina B tem demonstrado maior eficácia *in vitro*, ou seja, apresenta menores

concentrações inibitórias mínimas (CIMs) que outros agentes antifúngicos (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2008; AL-HATMI et al., 2015; TORTORANO et al., 2008).

No entanto, diferentes espécies podem ter diferentes padrões de suscetibilidade. A atividade antifúngica *in vitro* frente a espécies dos complexos *F. solani* e *F. oxysporum* são mais conhecidas do que de outras espécies de *Fusarium*, pois estas são mais prevalentes em pacientes imunocomprometidos (CÓRDOBA et al., 2008; NUCCI; ANAISSIE, 2007). Outras espécies são relatadas com menor frequência em infecções humanas, por isso, sua suscetibilidade é menos conhecida (NUCCI; ANAISSIE, 2007; SPADER et al., 2011).

Alguns estudos relatam que *F. solani* e *F. verticillioides* são geralmente resistentes aos azóis e exibem altas CIMs para anfotericina B que as outras espécies. Em contraste, *F. oxysporum* pode ser mais suscetível ao voriconazol e posaconazol (CUENCA-ESTRELLA et al., 2006; ESPINEL-INGROFF et al., 2002; PFALLER; DIEKEMA, 2004). A relevância destes dados *in vitro* não é clara, pois não há dados suficientes que documentam uma correlação entre CIMs e resultados clínicos (NUCCI; ANAISSIE, 2007). Cuenca-Estrella e colaboradores concluíram que a variabilidade na suscetibilidade pode ser espécie ou cepa dependente (CUENCA-ESTRELLA et al., 2006), similar ao perfil de suscetibilidade de *Scedosporium* (LACKNER et al., 2012).

Em recente estudo, Al-Hatmi e colaboradores avaliaram a suscetibilidade de uma gama de antifúngicos frente ao complexo *F. fujikuroi*, o qual abrange as espécies *F. verticillioides* e *F. proliferatum*. Estes autores observaram que a anfotericina B apresentou menores CIMs para a maioria das cepas testadas, seguido pelo voriconazol e posaconazol (AL-HATMI et al., 2015).

1.1.2.2 Mecanismos de resistência do gênero *Fusarium*

Resistência primária (ou intrínseca) é observada naturalmente entre algumas espécies de *Fusarium* sem exposição prévia ao fármaco (AL-HATMI et al., 2015). Por outro lado, a resistência secundária (ou adquirida) aos azólicos é previamente desenvolvida entre cepas sensíveis após a exposição ao agente antifúngico, como observado, por exemplo, em *Aspergillus fumigatus*, e é geralmente dependente da alteração da expressão do CYP51, gene que codifica a enzima esterol 14- α -demetilase (HEYN et al., 2005). Recentemente, Fan e colaboradores demonstraram que CYP51 em *Fusarium* apresenta três parálogos (CYP51A, -B e -C), sendo CYP51C, único para este gênero (FAN et al., 2013). A deleção do CYP51A geralmente provoca resistência secundária em fungos, tais como, *A. fumigatus*

(CHOWDHARY et al., 2013). Entretanto, o oposto foi observado em *Fusarium graminearum*, pois a deleção do CYP51A aumentou a sensibilidade desta espécie aos antifúngicos azólicos (FAN et al., 2013). Os exatos mecanismos de resistência do gênero *Fusarium* não estão totalmente esclarecidos, porém, alterações de aminoácidos CYP51A e a sobre-expressão deste gene podem estar envolvidos (AL-HATMI; MEIS; DE HOOG, 2016).

Um estudo demonstrou que uma mutação no gene FKS1 pode contribuir para a resistência intrínseca de *Fusarium* spp. às equinocandinas. Estes autores evidenciaram que alterações na região *hot spot 1* (P647A e F639Y), no gene FKS1, contribuem para a resistência de *Fusarium solani* às equinocandinas (KATIYAR; EDLIND, 2009). Além disso, *Fusarium* spp. possui um mecanismo de efluxo eficaz para remover xenobióticos de suas células (BERTHILLER et al., 2013). Este mecanismo também pode reduzir a sua sensibilidade aos azólicos (AL-HATMI; MEIS; DE HOOG, 2016).

1.1.3 Combinações entre agentes antifúngicos

A resposta terapêutica, ineficiente ou moderada, apresentada pelo uso da monoterapia em pacientes com fusariose invasiva ou disseminada, impulsionou a busca pela terapia de combinação entre agentes antifúngicos convencionais (GUARRO, 2013). No entanto, a experiência clínica da terapia combinada é baseada apenas em relatos de casos. Sendo assim, são necessários mais estudos com um número superior de pacientes para a indicação desta proposta terapêutica (CAMPO; LEWIS; KONTOYIANNIS, 2010).

Vários casos clínicos de regimes combinados foram relatados para o tratamento da fusariose, tais como: equinocandinas e poliênicos; azóis e poliênicos; poliênicos ou azóis e terbinafina. No entanto, nenhum estudo estatístico comparando a terapia combinada e a monoterapia foi publicado (GUARRO, 2013).

Embora o uso da combinação de anfotericina B e voriconazol não seja recomendado por estudos de suscetibilidade *in vitro* e modelos experimentais, esta é a combinação mais utilizada na clínica, porém tem apresentado, geralmente, pouca eficácia (CARNEIRO et al., 2011). A interação *in vitro* desta combinação tem demonstrado diferentes resultados: efeito aditivo (ORTONEDA et al., 2004); sinérgico ou indiferente (SPADER et al., 2011); e sinérgico, indiferente ou antagônico (CÓRDOBA et al., 2008).

O controverso antagonismo verificado nas combinações entre anfotericina B e azólicos pode ser a consequência das ações das duas classes de antifúngicos no mesmo sítio de ação. Os azóis bloqueiam a síntese do ergosterol, e assim reduzem os sítios de ação para

anfotericina B na membrana citoplasmática (SCHEVEN; SCHEVEN, 1996; SUGAR; LIU, 1998). Além disso, os azóis lipofílicos podem ainda ficar adsorvidos na célula fúngica e impedir a ligação da anfotericina B com os esteróis da membrana (SCHEVEN et al., 1995).

Alguns autores observaram baixa eficácia desta combinação em camundongos infectados por *F. oxysporum* (RUÍZ-CENDOYA et al., 2009). Por outro lado, esta terapia prolongou a sobrevivência de ratos infectados por *F. solani* quando comparada com a monoterapia com anfotericina B ou voriconazol (RUÍZ-CENDOYA; MARINÉ; GUARRO, 2008).

Um estudo relatou 20 casos de fusariose disseminada tratados com terapias de combinação. Entre estes, 14 pacientes responderam positivamente, e em sete destes casos, a resposta clínica foi alcançada antes da resolução da neutropenia. Os melhores resultados foram observados para a combinação de anfotericina B e voriconazol [7 casos], seguido pela combinação da anfotericina B lipossomal e terbinafina [2 casos] (LIU et al., 2011).

Outro estudo avaliou a terapia de combinação em 6 pacientes transplantados de pulmão com fusariose. Estes pacientes foram tratados com diferentes terapias: anfotericina B lipossomal e caspofungina ou voriconazol; monoterapia com voriconazol; e anfotericina B e voriconazol. Dentre estes, apenas um paciente sobreviveu, o qual foi tratado com a última combinação (CARNEIRO et al., 2011). No entanto, a combinação entre anfotericina B e voriconazol permanece controversa (GUARRO, 2013).

Há poucos dados clínicos sobre a terapia de combinação entre anfotericina B e posaconazol. Um estudo descreveu falha terapêutica desta combinação. Estes autores não recomendam seu uso para o tratamento da fusariose disseminada devido a possíveis falhas terapêuticas. Porém, este mesmo estudo relata que as concentrações do posaconazol foram subterapêuticas devido à má alimentação do paciente (LEWIS et al., 2008). Esta combinação provavelmente merece ser melhor investigada, pois tem demonstrado sucesso terapêutico em modelo experimental murino (RUÍZ-CENDOYA et al., 2009).

A combinação *in vitro* entre anfotericina B e caspofungina tem demonstrado interações sinérgicas ou aditivas contra isolados de *Fusarium* (ARIKAN et al., 2002; SHALIT et al., 2009; SPADER et al., 2011). No cenário clínico, dois casos de fusariose disseminada resultaram em resposta significativa com o uso desta combinação. Porém em ambos os casos, o tratamento foi continuado com voriconazol, sendo que um paciente evoluiu para cura clínica (VAGACE et al., 2007), e o outro, para o óbito (MAKOWSKY; WARKENTIN; SAVOIE, 2005). Em dois casos clínicos de infecções invasivas, a caspofungina demonstrou bons resultados quando somada ao tratamento com anfotericina B como terapia de resgate, pois a

monoterapia com anfotericina B foi falha (APOSTOLIDIS et al., 2003; VAGACE et al., 2007). Em estudo experimental, a combinação de anfotericina lipossomal e caspofungina não demonstrou melhores resultados que as respectivas monoterapias (SPELLBERG et al., 2006).

O mecanismo proposto para a combinação de anfotericina B e caspofungina baseia-se no ataque a diferentes alvos da célula fúngica, pois a caspofungina atua na biossíntese de parede celular e a anfotericina B no ergosterol da membrana. Este mecanismo de ataque a diferentes sítios também fundamenta a combinação entre caspofungina e azólicos (JOHNSON et al, 2004).

Poucos estudos de combinações entre equinocandinas e voriconazol foram realizados. As combinações *in vitro* entre caspofungina e voriconazol evidenciaram interações sinérgicas para isolados de *Fusarium* spp. (SHALIT et al, 2009). Porém, a combinação de micafungina e voriconazol resultou em indiferença frente a *F. solani* (HEYN et al., 2005).

Alguns autores descreveram que um paciente com infecção por *F. solani* refratário ao tratamento com caspofungina, apresentou melhora clínica quando o voriconazol foi adicionado ao tratamento (LABOIS; GRAY; LEPRETE, 2011). Um paciente neutropênico com leucemia linfoblástica apresentou sucesso terapêutico com a terapia combinada de micafungina e voriconazol, após falha do tratamento prévio com posaconazol e anfotericina B (LEWIS et al., 2008).

Além disso, associações *in vitro* de terbinafina e caspofungina (SHALIT et al., 2009) ou anfotericina B (LI et al., 2008) têm demonstrado potente sinergismo frente a *Fusarium* spp. Por outro lado, Spader e colaboradores evidenciaram pequenas taxas de sinergismos *in vitro* para esta última (SPADER et al., 2011).

1.1.4 Combinações entre agentes antifúngicos e quimiossensibilizantes

O termo “quimiossensibilização” foi originalmente introduzido como uma estratégia para combater o desenvolvimento da resistência de células tumorais a agentes antineoplásicos. Neste cenário, a quimiossensibilização envolve a utilização de um agente que torna as células cancerígenas mais sensíveis a um quimioterápico (SHABBITS; HU; MAYER, 2003).

O desenvolvimento de resistência pelas células cancerígenas a agentes antineoplásicos envolve mutações em genes-alvo, aumento da expressão de genes codificadores de bombas de efluxo, aumento da produção de enzimas detoxificadoras e reparadoras de DNA (ácido desoxirribonucleico), entre outros mecanismos (SHABBITS; HU; MAYER, 2003). O emprego dos quimiossensibilizantes resulta na redução da dose de fármacos antineoplásicos

citotóxicos, superando a resistência das células cancerígenas a estes fármacos. Isto evita a toxicidade para as células não alvo e diminui os efeitos colaterais associados aos fármacos antineoplásicos (CAMPBELL; CHAN; KIM, 2012).

Os mecanismos de resistência aos agentes antineoplásicos são quase que paralelos aos desenvolvidos por fungos patogênicos frente aos agentes antifúngicos. De modo geral, os mecanismos de ação dos quimiossensibilizantes incluem a desestabilização da integridade da membrana celular e membranas vacuolares do fungo, a inibição de bombas de efluxo, indução do estresse oxidativo e alteração da estrutura da parede celular (CAMPBELL; CHAN; KIM, 2012).

Os agentes quimiossensibilizantes, quando utilizados como monoterapia, podem apresentar uma atividade antifúngica insignificante. Por outro lado, quando estes são empregados conjuntamente com agentes antifúngicos, funcionam como agentes sinérgicos, os quais afetam o patógeno alvo tornando-o mais vulnerável ao agente antifúngico. Com a quimiossensibilização, a dose efetiva do agente antifúngico pode ser significativamente reduzida. Além disso, quimiossensibilizantes podem causar a reversão de cepas resistentes a determinado antifúngico, em cepas sensíveis (CAMPBELL; CHAN; KIM, 2012).

Segundo Campbell e colaboradores, desde a década passada, esta estratégia terapêutica tem sido investigada frente a fungos patogênicos resistentes aos antifúngicos disponíveis. Estes autores realizaram uma extensa revisão sobre a atividade de agentes quimiossensibilizantes combinados a antifúngicos frente a diversos patógenos fúngicos como, *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Cryptococcus neoformans*, entre outros. Em tal estudo, são relatados quimiossensibilizantes de origem natural, como óleos essenciais e seus derivados, bem como, fármacos e uma diversidade de outros compostos sintéticos (CAMPBELL; CHAN; KIM, 2012).

Fármacos de diversas classes, tais como, agentes imunossupressores (DENARDI et al., 2015), antipsicóticos (ROSSATO et al., 2016), antineoplásicos (GHANNOUM et al., 1990), antiarrítmicos (BAGAR; BENCINA, 2012) e uma diversidade de agentes antibacterianos (CLANCY et al., 1998; NAKAJIMA et al., 1995; STERGIPOULOU et al., 2008), têm apresentado atividade quimiossensibilizante em combinação com antifúngicos através de diferentes mecanismos de ação, frente a leveduras e fungos filamentosos (AFELTRA; VERWEIJ, 2003). De modo geral, os principais alvos fúngicos desses fármacos são a inibição de bombas de prótons na membrana plasmática e retículo endoplasmático, que regulam a homeostase celular; alteração da regulação intracelular de cálcio; e inibição da síntese de

ácidos nucleicos e proteínas. Por outro lado, a eficácia clínica destes medicamentos em associação com agentes antifúngicos não está estabelecida (AFELTRA; VERWEIJ, 2003).

No entanto, outros agentes sintéticos, não farmacológicos, podem exibir atividade quimiossensibilizante em combinação com agentes antifúngicos. Compostos orgânicos de selênio, tais como, disseleneto de difenila e ebselen, têm demonstrado atividade antifúngica isoladamente ou em combinação com antifúngicos (BILLACK; SANTORO; LAU-CAM, 2009; DENARDI et al., 2013; LORETO et al., 2011 a). A descoberta da atividade antifúngica dos compostos orgânicos de selênio pode desempenhar um papel complementar no tratamento de infecções fúngicas (LORETO et al., 2011 a).

Os óleos essenciais e seus constituintes também são considerados uma fonte promissora para a produção de novos medicamentos antimicrobianos (GIAMPERI; FRATERNALE; RICCI, 2002). Os fitocompostos cinamaldeído, carvacrol e timol têm demonstrado atividade antifúngica contra uma variedade de fungos patogênicos (ABBASZADEH et al., 2014; AHMAD et al., 2011; OOI et al., 2006; RAO et al., 2010). Apesar da sua atividade antimicrobiana, óleos essenciais e seus compostos ativos em combinação com fármacos antifúngicos tem sido pouco investigada (KHAN; AHMAD, 2012).

A atividade quimiossensibilizante de fármacos não antifúngicos, compostos sintéticos ou naturais em combinação com agentes antifúngicos utilizados na prática clínica, tem sido pouco investigada frente a isolados clínicos de *Fusarium*.

1.1.4.1 Compostos orgânicos de selênio

O elemento selênio foi descoberto em 1818 pelo químico sueco Berzelius. Este é um oligoelemento essencial para diversas funções fisiológicas e é obtido através da dieta. As primeiras informações foram relacionadas à sua toxicidade. A importância biológica do selênio, e as suas formas inorgânicas, levaram ao desenvolvimento de compostos orgânicos de selênio farmacologicamente ativos e com baixa toxicidade. Embora o primeiro composto orgânico sintético de selênio, o disseleneto de dietila, produzido por Lowig em 1836, tenha apresentado a natureza fétida dos compostos de selênio, dificuldades de purificação e a instabilidade de muitos derivados, outros compostos foram descobertos posteriormente (MUGESH; DU MONT; SIES, 2001).

O interesse na utilização destas moléculas em bioquímica começou a partir de achados que revelaram que esses compostos são muito menos tóxicos do que espécies inorgânicas de

selênio (MUGESH; DU MONT; SIES, 2001). Além disso, os compostos orgânicos de selênio possuem muitas propriedades farmacológicas, tais como: antioxidantes, inibidores enzimáticos, neuroprotetores, anti-tumorais, anti-infecciosos, indutores de citocinas e imunomoduladores (NARAJJI; KARVEKAR; DAS, 2007; NOGUEIRA; ROCHA, 2010; NOGUEIRA; ZENI; ROCHA, 2004). O disseleneto de difenila e o ebselen são compostos orgânicos de selênio que têm demonstrado atividade antimicrobiana (BILLACK; SANTORO; LAU-CAM, 2009; WOJTOWICZ et al., 2003) e são considerados bons candidatos a agentes terapêuticos (NOGUEIRA; ROCHA, 2010; NOGUEIRA; ZENI; ROCHA, 2004).

1.1.4.1.1 Disseleneto de difenila

O disseleneto de difenila [(PhSe)₂] (Figura 2) é um composto orgânico de selênio, simples, estável e altamente lipofílico, amplamente utilizado como intermediário em sínteses orgânicas (WIRTH, 2000) que reage de forma muito eficaz com hidroperóxidos e peróxidos orgânicos. Muitas propriedades farmacológicas do disseleneto de difenila foram relatadas, entre as principais, destacam-se as atividades: antioxidante, antinociceptiva, anti-inflamatória, antiulcerosa e hepatoprotetora (NOGUEIRA et al., 2003; PRIGOL; LUCHESE; NOGUEIRA, 2009; SAVEGNAGO et al., 2003; WILHELM et al., 2009).

Pouca atenção tem sido dada a atividade e relação estrutura-atividade do disseleneto de difenila e seus análogos contra vírus patogênicos, bactérias e fungos (WÓJTOWICZ et al., 2003).

Loreto e colaboradores avaliaram a atividade antifúngica *in vitro* e a relação estrutura-atividade do disseleneto de difenila e seus análogos sintéticos, *p*-cloro-difenil disseleneto, *m*-trifluormetil-difenil disseleneto e *p*-metoxil-difenil disseleneto, contra 116 isolados de fungos patogênicos. O disseleneto de difenila apresentou potente atividade frente a *C. albicans* (4-32 µg/mL), *C. dubliniensis* (2-16 µg/mL), *Aspergillus* spp. (0,5-64 µg/mL) e *Fusarium* spp. (2-16 µg/mL). Neste estudo, também foi observado que a introdução de grupos funcionais a molécula de disseleneto de difenila, reduziu a sua atividade antifúngica (LORETO et al., 2011 a).

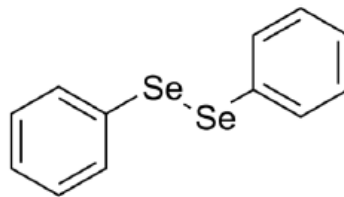
O estudo descrito acima foi o primeiro relato de avaliação da atividade antifúngica do disseleneto de difenila e seus análogos contra fungos patógenos humanos. O significado deste estudo não está apenas na descoberta da atividade deste composto, mas também, no potencial papel complementar no tratamento de infecções fúngicas (LORETO et al., 2011 a). Outros estudos relataram a atividade do disseleneto de difenila contra biofilmes de *C. albicans*

(ROSSETI; ROCHA; COSTA, 2015) e contra o oomiceto *Pythium insidiosum* (LORETO et al., 2012).

Um estudo prévio demonstrou atividade sinérgica do disseleneto de difenila em associação com anfotericina B (76,66%) frente a isolados de *C. glabrata* pelo método de *checkerboard*. Este mesmo estudo evidenciou pequenas taxas de sinergismo (10%) para a associação com fluconazol (DENARDI et al., 2013).

Uma hipótese para o mecanismo biológico da atividade antifúngica do disseleneto de difenila é a sua interação com grupos sulfidrila de biomoléculas presentes na célula fúngica (MUGESH; DU MONT; SIES, 2001). A redução da atividade antifúngica observada para os compostos análogos pode ser devido às diferenças nas interações com células fúngicas causadas por efeitos eletrodinâmicos e estéricos destes compostos (LORETO et al., 2011 a).

Figura 2 - Estrutura química do disseleneto de difenila



1.1.4.1.2 Ebselen

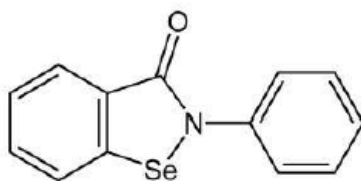
O ebselen (2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one) (Figura 3) é um composto orgânico de selênio, de baixa toxicidade, que compartilha muitas atividades farmacológicas com o disseleneto de difenila (NOGUEIRA; ZENI; ROCHA, 2004). Este composto foi descrito pela primeira vez em 1984 como um mimético da glutathione peroxidase (MULLER et al., 1984).

Assim como o disseleneto de difenila, o ebselen possui muitas propriedades farmacológicas, tais como, atividade antioxidante, anti-inflamatória, antinociceptiva, neuroprotetora, antiulcerosa e hepatoprotetora (MAIORINO; ROVER; URSINI, 1992; NOGUEIRA; ZENI; ROCHA, 2004; WASSER et al., 2001). Além disso, o ebselen também foi administrado com sucesso em humanos, diminuindo os déficits neurológicos provocados por aneurisma subaracnóide hemorrágico (SAITO et al., 1998).

Alguns estudos têm relatado a atividade antimicrobiana do ebselen contra bactérias Gram positivas (CHAN et al., 2007), *Saccharomyces cerevisiae* (CHAN et al., 2007), *Candida* spp. (BILLACK et al., 2009; WÓJTOWICZ et al., 2003; WÓJTOWICZ et al., 2004), *C. neoformans* (SOTEROPOULOS et al., 2000), *Microsporium gypseum* (WÓJTOWICZ et al., 2003), *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. (WÓJTOWICZ et al., 2004).

O mecanismo proposto para sua atividade antifúngica está relacionada a inibição da H⁺-ATPase na membrana celular fúngica. Segundo Soteropoulos e colaboradores, a bomba de prótons (H⁺-ATPase) na membrana plasmática fúngica possui propriedades bem definidas que facilitam a descoberta de fármacos. Esta bomba de prótons é fundamental para o crescimento e manutenção da estabilidade celular (SOTEROPOULOS et al., 2000). No entanto, estudos sobre combinações do ebselen com agentes antifúngicos não foram relatados, bem como, seus mecanismos de interação com tais agentes.

Figura 3 - Estrutura química do ebselen



1.1.4.2 Fármacos não antifúngicos

O termo “fármacos não antifúngicos” foi adotado para denominar um extenso grupo de fármacos utilizados no tratamento de infecções não fúngicas ou fármacos empregados no tratamento de patologias de etiologia não infecciosa, que apresentam atividade contra fungos (AFELTRA; VERWEIJ, 2003).

Algumas combinações sinérgicas *in vitro* entre agentes não antifúngicos e antifúngicos frente as espécies de *Fusarium* spp. têm sido relatadas, tais como: azitromicina e anfotericina B (CLANCY; NGUYEN, 1998), rifampicina e anfotericina B ou natamicina (SPADER et al., 2011; STERN, 1978), rifabutina e anfotericina B (CLANCY et al., 1998), gentamicina e natamicina (STERN, 1978), ciprofloxacina ou metronidazol e voriconazol, ibuprofeno e anfotericina B (VENTURINI et al., 2011), tacrolimus e caspofungina (SHALIT et al., 2009). No entanto, esta abordagem ainda é pouco investigada para *Fusarium* spp.

Neste contexto, e com base em estudos prévios de combinações sinérgicas frente a fungos patogênicos, este estudo buscou evidenciar novas opções de agentes quimiossensibilizantes, com diferentes alvos na célula fúngica, tais como, agentes antimicrobianos e um agente antiarrítmico.

1.1.4.2.1 Amiodarona

A amiodarona, um benzofurano complexo, foi originalmente identificado para uso clínico no tratamento de arritmia cardíaca (SINGH; VAUGHAN WILLIAMS, 1970). Este fármaco antiarrítmico de classe III bloqueia os canais de potássio que atuam na repolarização cardíaca (RANG et al., 2004, p. 314). No entanto, foi relatado que a amiodarona possui atividade antifúngica contra *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Fusarium* spp. e *Saccharomyces* spp. (COURCHESNE, 2002; COURCHESNE; OZTURK, 2003; GUPTA et al., 2003).

Um estudo *in vitro* frente a isolados de *A. fumigatus* suscetíveis e resistentes ao itraconazol, observou que a amiodarona combinada ao itraconazol resultou em sinergismos, principalmente para os isolados resistentes (AFELTRA et al., 2004). Bagar e Bencina também observaram interações sinérgicas para a combinação de amiodarona e azólicos; e além disso, efeito aditivo para a combinação com anfotericina B frente a *A. niger* (BAGAR; BENCINA, 2012).

As interações sinérgicas entre amiodarona e antifúngicos azólicos podem ser resultados do bloqueio do transporte de íons sódio. A amiodarona também evidenciou sinergismo combinada ao fluconazol, itraconazol ou voriconazol frente a isolados de *C. albicans* resistentes aos azólicos (GUO et al., 2008), ou combinada ao fluconazol frente a *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol (SILVA et al., 2013). No entanto, a combinação entre amiodarona e azólicos frente a isolados sensíveis aos azólicos, têm demonstrado efeitos indiferentes, e em poucos casos, antagônicos (GAMARRA et al., 2010).

Outra hipótese para o mecanismo de ação antifúngica da amiodarona é a disfunção da homeostase do cálcio (GAMARRA et al., 2010). Segundo Courchesne, a amiodarona induz rapidamente ao efluxo de cálcio celular (COURCHESNE, 2002). A combinação entre amiodarona e fluconazol em um modelo murino de candidíase resultou em redução da carga fúngica nos rins dos cobaias infectados por *C. albicans* resistente ao fluconazol (GAMARRA et al., 2010).

1.1.4.2.2 Doxiciclina

A doxiciclina é um antibacteriano que pertence à classe das tetraciclinas. Esta classe de antibióticos possui amplo espectro, sendo ativa contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, *Mycoplasma*, *Rickettsia*, *Chlamydia* spp., espiroquetas e alguns protozoários (RANG et al., 2004, p. 731).

Miceli e colaboradores relataram a atividade *in vitro* da doxiciclina contra biofilmes de *C. albicans* em concentrações muito elevadas (512-2048 µg/ml) (MICELI; BERNARDO; LEE, 2009). Por outro lado, Loreto e colaboradores reportaram menores CIMs (0,5-8 µg/ml) frente ao oomiceto *Pythium insidiosum* (LORETO et al., 2011 b).

Um estudo observou efeito sinérgico *in vitro* para a doxiciclina combinada ao fluconazol frente a *C. albicans*. Além disso, constatou-se que a combinação com doxiciclina converteu a atividade do fluconazol, de fungistático, para fungicida. Outro achado importante, é que a doxiciclina impede o surgimento de resistência ao fluconazol. O mesmo estudo sugere que a doxiciclina altera a homeostase do ferro, agindo como um agente quelante (FIORI; VAN DIJCK, 2012). A depleção do ferro diminui o conteúdo de ergosterol na membrana celular de *C. albicans*, conferindo mais fluidez e permitindo a difusão passiva do fluconazol pela membrana plasmática (PRASAD et al., 2006).

Gao e colaboradores também observaram que a doxiciclina potencializa a atividade antifúngica do fluconazol frente a biofilmes de *C. albicans*. Estes autores demonstraram que a interação sinérgica destes agentes está associada ao bloqueio de genes codificadores de bombas de efluxo (CDR1, CDR2 e MDR1), e ao aumento dos níveis de cálcio intracelular (GAO et al., 2014).

A doxiciclina também aumentou a atividade fungicida da anfotericina B frente a isolados de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* formadoras de biofilmes (EL-AZIZI, 2007; MICELI; BERNARDO; LEE, 2009). Outro estudo relatou interações sinérgicas entre a tetraciclina, ou seus análogos, e anfotericina B frente a *Aspergillus* spp. A minociclina foi mais eficaz quando combinada a anfotericina B, seguida pelas combinações com doxiciclina e tetraciclina (HUGHES et al., 1984).

1.1.4.2.3 Moxifloxacina

A moxifloxacina é um antibiótico da classe das fluoroquinolonas. Essa classe possui um largo espectro de atividade contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, assim

como, contra micro-organismos anaeróbios, sendo que sua ação terapêutica é fundamental, sobretudo em infecções causadas por micro-organismos resistentes a outras classes de fármacos (SOUZA, 2005).

No entanto, além de ser um potente agente bactericida, estudos *in vitro* têm observado a atividade da moxifloxacina contra espécies de *Candida* e *Fusarium* (ALFONSO; MILLER, 2005; DAY et al., 2009; MUNIR et al., 2007; OZDEK et al., 2006). Em recente estudo, foram relatadas altas CIMs para gatifloxacina, levofloxacina e moxifloxacina contra espécies de *Fusarium* (KAWAKAMI et al., 2015).

Munir e colaboradores relataram quatro casos de ceratites associadas a lentes de contato causadas por *Fusarium* spp. Em dois casos, dos quais um foi tratado com moxifloxacina tópica 0,5%, a ceratite foi completamente resolvida com o uso de fluoroquinolonas tópicas. Um paciente foi tratado com ofloxacina 0,3%, seguida de tobramicina (14 mg/ml) e cefazolina (50 mg/ml). O último caso demonstrou melhora significativa com moxifloxacina, mas foi posteriormente tratado com natamicina 5% (MUNIR et al., 2007).

O mecanismo de ação antibacteriano das fluoroquinolonas deve-se a inibição da topoisomerase II (uma DNA girase) e topoisomerase IV. As topoisomerases desempenham importante papel na replicação e empacotamento do DNA (DALHOFF; SHALIT, 2003). A quarta geração das quinolonas, como moxifloxacina e gatifloxacina, demonstram aumento da atividade sobre a DNA girase (PESTOVA et al., 2000). As fluoroquinolonas também inibem a topoisomerase II de células eucarióticas. No entanto, as quinolonas são muito mais seletivas para topoisomerases bacterianas, do que para as enzimas das células de mamíferos (DALHOFF; SHALIT, 2003).

Já foi confirmada a presença das topoisomerases I e II em *C. albicans* e *A. niger* em altos níveis. Desta forma, uma quinolona mostrou ter maior efeito de clivagem sobre *Candida* spp. do que sobre células mamíferas (SHEN et al., 1992). Segundo Munir e colaboradores, a moxifloxacina e gatifloxacina reduzem significativamente *in vitro* e *in vivo*, a contagem de colônias de *C. albicans* e *F. oxysporum* (MUNIR et al., 2007).

Nakagima e colaboradores relataram interações sinérgicas *in vitro* para a combinação entre anfotericina B e uma fluorquinolona (DU-6859a) frente a *Candida* spp., *C. neoformans* e *A. fumigatus* (NAKAGIMA et al., 1995). Interações sinérgicas, *in vitro* e *in vivo*, também foram observadas para a associação entre ofloxacina e fluconazol frente a *C. albicans* resistente a azóis (SASAKI et al., 2000). Dois estudos de suscetibilidade *in vitro* observaram que a moxifloxacina isolada não possui atividade contra espécies de *Candida*, porém, em

combinação, potencializou atividade antifúngica da anfotericina B (DEREN et al., 2010; YALÇIN et al., 2010).

A atividade das combinações de ciprofloxacina e antifúngicos (anfotericina B, voriconazol ou caspofungina) resultaram em atividade sinérgica *in vitro* para *C. albicans* e *A. fumigatus* (STERGIOPOULOU et al., 2008). Para *Fusarium* spp., esta fluoroquinolona associada a anfotericina B ou voriconazol também demonstrou atividade sinérgica (VENTURINI et al., 2011). Também foi relatado que a moxifloxacina potencializou a atividade da caspofungina frente a *C. albicans* (STERGIOPOULOU et al., 2009).

Em um modelo murino de candidíase invasiva foi observado que a combinação entre fluconazol (baixas doses) e ciprofloxacina foi equivalentemente eficaz ao tratamento com altas doses de fluconazol. No mesmo estudo demonstrou-se que a combinação entre ciprofloxacina ou trovafloxacina e anfotericina B foi mais eficaz do que os tratamentos isolados (SUGAR; LIU; CHEN, 1997).

Outro modelo *in vivo* avaliou a terapia combinada entre fluconazol e quinolonas. Tal estudo observou que esta combinação prolongou a sobrevivência de camundongos infectados por *Rhizopus oryzae* (SUGAR; LIU, 2000).

1.1.4.2.4 Pentamidina

A pentamidina é um membro da classe das diaminas aromáticas e possui atividade contra diferentes bactérias, protozoários e fungos (SANDS; KRON; BROWN, 1985; TRACY; WEBSTER, 1996). Sendo que este fármaco é usado na clínica para a profilaxia e tratamento da pneumonia causada por *Pneumocystis jirovecii*, um micro-organismo que foi taxonomicamente classificado como fungo (MORRIS-JONES; EASTERBROOK, 1997).

Estudos *in vitro* demonstraram atividade antifúngica da pentamidina frente a *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *C. neoformans*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. nidulans* e *A. ustus* (AFELTRA et al., 2002 b; BARCHIESI et al., 1994; LUDEWING et al., 1994; MILETTI; LEIBOWITZ, 2000).

A pentamidina também mostrou ser ativa *in vivo* contra *Candida* spp., visto que, pacientes HIV positivos que foram nebulizados com pentamidina como tratamento profilático, apresentaram menores concentrações de *Candida* spp. intraoralmente do que aqueles que não receberam esta profilaxia (NOLAN et al., 1994).

Análogos da pentamidina demonstraram atividade *in vitro* contra *Candida* spp., incluindo *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* resistentes aos azóis, e também, *A. fumigatus*, *A. flavus* e *Fusarium* spp. (DEL POETA et al., 1998).

Lionakis e colaboradores testaram a atividade *in vitro* da pentamidina frente a dez isolados de *Fusarium* spp. (cinco *F. solani* e cinco não *F. solani*). Este estudo observou notável atividade antifúngica contra *Fusarium* spp., sendo que a pentamidina demonstrou ser fungicida frente as espécies não *F. solani* e fungistática para *F. solani* (LIONAKIS et al., 2003). Diversos estudos relataram que *F. solani* é a espécie mais resistente aos antifúngicos (ARIKAN et al., 1999; GUARRO; PUJOL; MAYAYO, 1999; TORRES; KONTOYIANNIS, 2003).

Um estudo *in vivo* avaliou a eficácia da pentamidina na profilaxia e tratamento precoce da fusariose causada por *F. oxysporum*. Este estudo utilizou um modelo de fusariose pulmonar aguda em camundongos neutropênicos. Os camundongos pré-expostos a pentamidina apresentaram um aumento na sobrevivência e diminuição da carga fúngica pulmonar, em comparação aos camundongos pré-expostos a anfotericina B e aos não tratados. Já os camundongos tratados com pentamidina demonstraram um aumento na sobrevivência, mas não houve redução da carga fúngica (LIONAKIS et al., 2006). Os autores concluíram que a pentamidina é mais eficaz na profilaxia, do que no tratamento da fusariose pulmonar aguda. Logo, esta possui maior atividade contra conídios de *Fusarium* spp., do que contra hifas (LIONAKIS et al., 2003; LIONAKIS et al., 2006).

Interações sinérgicas foram relatadas para a combinação entre pentamidina e cetoconazol frente a *C. albicans* (ST-GERMAIN, 1990). Sinergismo também foi relatado para a combinação *in vitro* entre pentamidina e anfotericina B frente a 30 isolados de *Scedosporium prolificans* (AFELTRA et al., 2002 a).

Apesar da pentamidina ser usada na clínica por mais de duas décadas, seus mecanismos de ação ainda não estão totalmente esclarecidos. Muitos mecanismos têm sido propostos, como a inibição de DNA, RNA, fosfolipídios e síntese protéica (SANDS; KRON; BROWN, 1985). Segundo Lionakis e colaboradores, a pentamidina foi mais ativa contra *Fusarium* spp. em baixas condições de oxigênio, portanto, esta observação *in vitro* pode ter importância clínica, tendo em vista que a fusariose invasiva gera uma condição semi-anaeróbica nos tecidos (LIONAKIS et al., 2003).

1.1.4.2.5 Polimixina B

A polimixina B é um agente antibacteriano anfipático tensoativo que interage fortemente com os fosfolipídios e desorganizam a estrutura das membranas celulares. A permeabilidade da membrana bacteriana modifica-se imediatamente em contato com o fármaco. A sensibilidade à polimixina B está aparentemente relacionada com o conteúdo de fosfolipídio do complexo parede celular-membrana. A polimixina B liga-se à porção lipídica A da endotoxina (o lipopolissacarídeo da membrana externa das bactérias Gram negativas) e inativa essa molécula (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012, p. 1539).

Além de possuir atividade antibacteriana, a polimixina B também tem demonstrado atividade contra fungos (NICHOLLS, 1970; SCHWARTZ et al., 1972; FALLA; KARUNARATNE; HANCOCK, 1996).

Em combinação com fluconazol ou itraconazol, a polimixina B, em baixas concentrações, possui efeito fungicida contra *A. fumigatus*, *Rhizopus oryzae*, *C. albicans* e não *albicans*; e *C. neoformans* (ZHAI et al., 2010). A combinação de polimixina B e fluconazol pode ser um tratamento efetivo para a forma cerebral de criptococose, pois a polimixina B penetra no tecido cerebral com significativa eficiência (JIMÉNEZ-MEJÍAS et al., 2002).

Com base no mecanismo de ação da polimixina B para bactérias, Zhai e colaboradores hipotetizaram que a sua ação contra fungos ocorre através da ligação com lipídios aniônicos da membrana fúngica resultando na sua ruptura (ZHAI et al., 2010).

Moneib e colaboradores relataram sinergismos para as combinações entre polimixina B e anfotericina B, cetoconazol ou miconazol frente a *C. albicans* (MONEIB, 1995).

Segundo Pietschmann e colaboradores, a associação *in vitro* entre polimixina B e miconazol demonstrou interações sinérgicas para *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Malassezia pachydermatis*, sugerindo potente ação bactericida contra Gram negativos e fungicida para leveduras. Este estudo concluiu que a polimixina B possibilita o aumento da penetração de antimicrobianos hidrofóbicos na célula fúngica, como o miconazol, permitindo que este desempenhe sua ação letal (PIETSCHMANN et al., 2009).

1.1.4.2.6 Tigeciclina

A tigeciclina é o primeiro de uma nova classe de antibióticos bacteriostáticos, as gliciliclinas. Esta classe possui um esqueleto central de quatro anéis carbocíclicos, semelhante a estrutura das tetraciclinas. Assim, este antibacteriano possui um mecanismo de ação similar as tetraciclinas, ou seja, se ligam as subunidades ribossomais 30S das bactérias, o

que impede a ligação do RNA transportador (t-RNA) aos ribossomos, inibindo a síntese protéica. Em contraste com as tetraciclina, as gliciliclinas possuem um grupo glicilamido na posição C-9. Esta substituição permite um amplo espectro de ação e atividade contra bactérias resistentes às tetraciclina (PANKEY, 2005; NOSKIN, 2005).

A tigeciclina apresentou potente atividade antifúngica contra biofilmes produzidos por *C. albicans*. Em concentrações de 128 µg/mL, a tigeciclina inibiu a formação de biofilmes. Também foi observado que a tigeciclina associada a anfotericina B, caspofungina ou fluconazol, não potencializou a ação destes frente a *C. albicans* produtoras de biofilmes. Além disso, a adição de tigeciclina diminuiu a atividade antifúngica da caspofungina (KU; PALANISAMY; LEE, 2010).

Por outro lado, a atividade da tigeciclina contra o oomiceto *P. insidiosum* foi relatada em dois estudos realizados pela metodologia de microdiluição em caldo, sendo que as CIMs observadas foram de 0,25 a 2 µg/mL (MAHL et al., 2012), e 0,25 a 4 µg/mL (JESUS et al., 2014). Jesus e colaboradores relataram atividade sinérgica para as combinações de tigeciclina e anfotericina B (56,67%), itraconazol (46,67%), voriconazol (40%), micafungina (73,33%), caspofungina (46,67%) ou anidulafungina (43,34%) frente a este oomiceto (JESUS et al., 2014). Até o momento, os mecanismos de interação entre a tigeciclina e agentes antifúngicos não foram estabelecidos.

1.1.4.2.7 Tobramicina

A tobramicina pertence à classe dos antibióticos aminoglicosídeos, os quais se ligam à subunidade ribossômica 30S e interferem na iniciação da síntese de proteínas bacterianas resultando na produção de proteínas anormais ou não funcionais. Este mecanismo promove rápida atividade bactericida (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012, p. 1507). Além de possuir atividade contra bactérias Gram negativas aeróbias, a tobramicina também tem demonstrado atividade antifúngica contra *Fusarium* spp. (CHODOSH et al, 2000; DAY et al., 2009).

Chodosh e colaboradores relataram um caso de ceratite fúngica causada por *F. oxysporum* em um paciente de 14 anos de idade. Este apresentou melhora após tratamento com tobramicina tópica, e posteriormente, foi adicionado ao tratamento a natamicina tópica. Após sete meses, o paciente recuperou a acuidade visual, restando apenas leve cicatriz na córnea. A suscetibilidade *in vitro* deste isolado revelou CIM = 450 µg/mL observada pelo método de microdiluição em caldo (CHODOSH et al, 2000).

Outro estudo demonstrou atividade *in vitro* da tobramicina para 10 isolados de *Fusarium* spp. pelo mesmo método. Estes autores descreveram $CIM_{50} = 500$ e $CIM_{90} = 700$ $\mu\text{g/mL}$ (DAY et al., 2009). Esses relatos explicam o sucesso de terapias iniciais com antibióticos para ceratites fúngicas.

Segundo Dalhoff e colaboradores, os aminoglicosídeos podem exercer atividade contra fungos através da alteração na permeabilidade de parede celular e membrana citoplasmática fúngica, explicando assim a atividade antifúngica da tobramicina (DALHOFF et al., 1987).

A atividade antifúngica *in vitro* de combinações de tobramicina e antifúngicos convencionais ainda não foram abordadas.

1.1.4.3 Fitocompostos

Produtos naturais, ou seus derivados semi-sintéticos, têm sido uma fonte de agentes terapêuticos para o tratamento de doenças infecciosas (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003). Por séculos, as plantas medicinais têm sido utilizadas na medicina popular para o tratamento infecções bacterianas ou fúngicas (KALEMBA; KUNICKA, 2003). Os óleos essenciais de plantas oferecem uma diversidade de compostos que apresentam atividade antimicrobiana, tais como fenilpropanóides e terpenóides,. Estes fitocompostos possuem grande potencial para a utilização como agentes antifúngicos (DEANS; SUBOTA; KENNEDY, 1989; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003; WINK, 2008). A atividade antifúngica de óleos essenciais, ou de seus constituintes, têm sido pouco investigada frente a isolados clínicos de *Fusarium* spp., bem como, a atividade quimiossensibilizante destes em combinação com antifúngicos (HOMA et al., 2015).

1.1.4.3.1 Cinamaldeído

O óleo essencial de canela é obtido das folhas e casca de *Cinnamomum cassia* ou da casca de *Cinnamomum zeylanicum* (CALIXTO et al., 2005). O principal constituinte deste óleo é o cinamaldeído (Figura 4), um fenilpropanóide que tem sido identificado como o principal componente com atividade antimicrobiana (SINGH et al., 1995).

O cinamaldeído possui atividade contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (INOUE; YAMAGUCHI; TAKIZAWA, 2001; OOI et al., 2006), dermatófitos (KHAN; AHMAD, 2011; OOI et al., 2006), *Aspergillus* spp. (KHAN; AHMAD, 2011; LI et al., 2015; OOI et al., 2006; SUN et al., 2016) e *Candida* spp. (KHAN; AHMAD, 2012; OOI et al.,

2006; RAJPUT; KARUPPAYIL, 2013; SHREAZ et al., 2011; SHREAZ et al., 2013).

Um estudo relatou a atividade do óleo de *Cinnamomum zeylanicum* e do cinamaldeído contra isolados de ceratites causadas por *Fusarium*. A metodologia utilizada neste estudo foi a microdiluição em caldo e as CIMs observadas foram de 31,25 a 500 µg/mL para o óleo; e 32,8 a 262,5 µg/mL para o cinamaldeído (HOMA et al., 2015). Ooi e colaboradores relataram CIM = 138 µg/mL para *F. solani* através do método de ágar diluição (OOI et al., 2006).

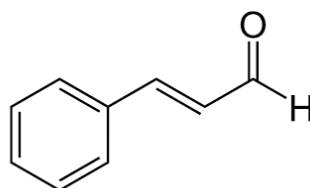
Os óleos de *Cinnamomum zeylanicum* e *Cinnamomum cassia*, com altos teores de cinamaldeído, apresentaram atividade sinérgica *in vitro* em combinação com anfotericina B frente a isolados de *C. albicans* (EL-AHMADY; EL-SHAZLY; MILAD, 2013; GIORDANI et al., 2006). O cinamaldeído associado a anfotericina B também tem apresentado interações sinérgicas contra *C. albicans* (KHAN; MALIK; AHMAD, 2012). Por outro lado, esta associação resultou em interações indiferentes frente a biofilmes de *C. albicans* (KHAN; AHMAD, 2012), ou efeito aditivo frente a espécies de *Candida* e *C. neoformans* (KIM et al., 2012).

Efeito sinérgico *in vitro* foi observado na associação de cinamaldeído e fluconazol frente a *A. fumigatus* e *Trichophyton rubrum* (KHAN; AHMAD, 2011). Esta associação também foi sinérgica para biofilmes de *C. albicans* (KHAN; AHMAD, 2012).

Shreaz e colaboradores observaram que o cinamaldeído inibe a biossíntese de ergosterol e a bomba de prótons (H⁺-ATPase) na membrana plasmática de *Candida* spp. (SHREAZ et al., 2011). Por outro lado, outros autores sugerem que a sua ação antifúngica deve-se a inibição da síntese de parede celular fúngica (BANG et al., 2000).

Em relação ao gênero *Fusarium* spp., Homa e colaboradores observaram que o cinamaldeído potencializou o efeito antifúngico da natamicina contra isolados clínicos de *Fusarium* obtidos a partir de ceratites fúngicas. Estes autores sugerem que esta associação é promissora para o desenvolvimento de uma nova estratégia de tratamento para ceratites causadas por *Fusarium* spp. (HOMA et al., 2015).

Figura 4 - Estrutura química do cinamaldeído



1.1.4.3.2 Carvacrol

O carvacrol (Figura 5B) é um fenol monoterpênóide componente majoritário do óleo essencial de orégano (*Origanum* spp.) e tomilho (*Thymus* spp.) (SELL et al., 2010, p. 121), o qual possui largo espectro de atividade contra bactérias e fungos, incluindo micro-organismos resistentes e formadores de biofilmes (NOSTRO et al., 2012).

Ahmad e colaboradores demonstraram que o carvacrol apresentou atividade fungicida contra espécies de *Candida* sensíveis e resistentes ao fluconazol. Neste estudo também foi observado que concentrações sub-inibitórias de carvacrol resultaram em diminuição do teor total de ergosterol celular (AHMAD et al., 2011). Além disso, o carvacrol demonstrou atividade antifúngica contra biofilmes de *C. albicans* (DALLEAU et al., 2008).

Em um modelo experimental de candidíase vaginal em ratas imunossuprimidas, observou-se que o carvacrol foi eficaz, tanto na profilaxia, quanto no tratamento de candidíase causada por *C. albicans*. Estes resultados foram confirmados por técnicas microbiológicas e histopatológicas (CHAMI et al., 2004). Outro estudo *in vivo* demonstrou atividade fungicida deste composto em um modelo de candidíase oral utilizando ratos imunossuprimidos (CHAMI et al., 2005). Também foram obtidos resultados satisfatórios em um modelo de candidíase sistêmica em camundongos tratados oralmente com carvacrol (MANOHAR et al., 2001).

Além disso, o carvacrol também demonstrou potente atividade *in vitro* frente a *C. neoformans* (VIOLLON; CHAUMONT, 1994), *A. flavus* (LÓPEZ-MALO et al., 2006), *A. fumigatus* (ZABKA; PAVELA, 2013), *A. parasiticus* (PILLAI; RAMASWAMY, 2012), *Penicillium* sp. (PÉREZ-ALFONSO et al., 2012; ZABKA; PAVELA, 2013) e contra o oomiceto *P. insidiosum* (JESUS et al., 2015).

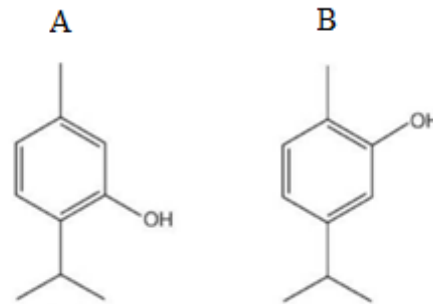
Alguns autores descreveram a atividade do carvacrol contra *F.verticillioides* pelo método de diluição em ágar, e evidenciaram CIM = 0,32 mM (DAMBOLENA et al., 2012) e 208 µg/mL (ZABKA; PAVELA, 2013). Também foi observada atividade *in vitro* contra *F. oxysporum* pelo mesmo método, com CIM = 159 µg/mL (ZABKA; PAVELA, 2013), e pelo método de microdiluição em caldo, CIM = 125 µg/mL (ABBASZADEH et al., 2014).

Ahmad e colaboradores propuseram que a atividade antifúngica do carvacrol segue um padrão semelhante a do timol. Estes possuem um caráter lipofílico e são capazes de causar danos a membrana celular fúngica (AHMAD et al., 2011). No entanto, foram propostos outros mecanismos para sua atividade antifúngica, que podem estar diretamente relacionados com a disfunção da homeostase do cálcio e estresse celular devido à incapacidade de regular a

acidificação vacuolar (RAO et al., 2010).

Alguns estudos relataram a potencialização da atividade antifúngica do fluconazol quando combinado ao carvacrol contra espécies de *Candida* sensíveis e resistentes ao fluconazol (AHMAD; KHAN; MANZOOR, 2013) e biofilmes de *C. albicans* (DOKE et al., 2014). Associações entre carvacrol ou timol e agentes antifúngicos (anfotericina B, capofungina, itraconazol ou terbinafina) resultaram em potente atividade *in vitro* contra o oomiceto *P. insidiosum*. Este estudo concluiu que estas associações podem proporcionar um tratamento alternativo eficaz para a pitiose cutânea (JESUS et al., 2015).

Figura 5 - Estrutura química do timol e carvacrol



A. Timol; B. Carvacrol

1.1.4.3.3 Timol

Assim como o carvacrol, o timol (Figura 5A) é um monoterpénio encontrado principalmente no óleo de tomilho (*Thymus* spp.) e orégano (*Origanum* spp.) (BI et al., 2010; SELL et al., 2010, p. 121). Alguns estudos demonstraram que óleos essenciais contendo timol são amplamente utilizados na medicina por suas propriedades antimicrobiana e desinfetante (DIDRY; DUBREUIL; PINKAS, 1994).

Este monoterpéno demonstrou atividade fungicida contra *Candida* spp., *C. neoformans* e dermatófitos (PAULI, 2001; VIOLLON; CHAUMONT, 1994). Outros estudos também evidenciaram inibição do crescimento de *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp. e uma variedade de fungos filamentosos patogênicos (KLARIC et al., 2007; PÉREZ-ALFONSO et al., 2012; PILLAI; RAMASWAMY, 2012; ZABKA; PAVELA, 2013).

Através dos métodos de disco-difusão, microdiluição em caldo e curva de morte, Ahmad e colaboradores demonstraram a atividade fungicida do timol frente a *C. albicans*, *C.*

glabrata, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, sensíveis e resistentes ao fluconazol. Estes autores também relataram que o timol apresenta menor toxicidade quando comparado a anfotericina B ou fluconazol, para eritrócitos humanos *in vitro* (AHMAD et al., 2011).

Dambolena e colaboradores relataram significativo efeito inibidor do timol frente a *Fusarium verticillioides* através do método de diluição em ágar. Além disso, constataram inibição da biossíntese de fumonisina B1 (DAMBOLENA et al., 2008). Zabka e colaboradores também constataram elevada eficácia antifúngica do timol frente a *F. verticillioides* e *F. oxysporum*, evidenciando CIMs = 108 e 115 µg/mL, respectivamente (ZABKA; PAVELA, 2013). Outros autores relataram CIM = 300 µg/mL para *F. oxysprum* pelo método de microdiluição em caldo (ABBASZADEH et al., 2014).

O timol foi avaliado como um potente agente quimissensibilizante em associação com cetoconazol, fluconazol ou anfotericina B frente a *Aspergillus* spp. (KIM et al., 2008; KIM et al., 2010). Este composto também potencializou a atividade de antifúngicos azólicos (fluconazol ou itraconazol) (AHMAD; KHAN; MANZOOR, 2013; FARIA et al., 2011; GUO et al., 2009) e da anfotericina B (FARIA et al., 2011; GIORDANI et al., 2006; GUO et al., 2009) contra isolados de *Candida* spp. sensíveis ou resistentes ao fluconazol. Combinações de timol e agentes antifúngicos (anfotericina B, capofungina, itraconazol ou terbinafina) demonstraram altas taxas de sinergismos frente a *P. insidiosum* (JESUS et al., 2015).

O timol e o carvacrol são isômeros de posição (Figura 5), e a presença de um grupo hidroxila e de um sistema de deslocalização de elétrons, são importantes para a atividade antimicrobiana de compostos fenólicos (ULTEE et al., 2002). Assim como o carvacrol, o timol é capaz de causar a inibição da H⁺-ATPase na membrana citoplasmática e causar acidificação intracelular e morte celular (AHMAD et al., 2010). A redução do conteúdo de ergosterol também é um alvo antifúngico destes compostos, assim como, a síntese de parede celular (KIM et al., 2008).

1.2 PROPOSIÇÃO

Este estudo propôs a avaliação *in vitro* das atividades quimiossensibilizantes de compostos sintéticos e naturais em combinação com agentes antifúngicos convencionais contra isolados clínicos de *Fusarium*. Para tal, objetivou-se:

- avaliar a suscetibilidade de *Fusarium* spp. frente a antifúngicos convencionais (anfotericina B, caspofungina, itraconazol e voriconazol);

- avaliar a suscetibilidade de *Fusarium* spp. frente a compostos orgânicos de selênio (disseleneto de difenila e ebselen), fármacos não antifúngicos (amiodarona, doxiciclina, moxifloxacina, pentamidina, polimixina B, tigeciclina e tobramicina) e fitocompostos (cinamaldeído, carvacrol e timol);
- avaliar as interações entre compostos orgânicos de selênio (disseleneto de difenila e ebselen) e agentes antifúngicos;
- avaliar as interações entre fármacos não antifúngicos (amiodarona, doxiciclina, moxifloxacina, pentamidina, polimixina B, tigeciclina e tobramicina) e agentes antifúngicos;
- avaliar as interações entre fitocompostos (cinamaldeído, carvacrol e timol) e agentes antifúngicos.

1.3 MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1 Micro-organismos

Foram utilizados 25 isolados clínicos de *Fusarium* spp. incluindo as espécies [n, complexo de espécies]: *F. chlamyosporum* [3, complexo *F. chlamyosporum*], *F. oxysporum* [5, complexo *F. oxysporum*], *F. proliferatum* [3, complexo *F. fujikuroi*], *F. solani* [10, complexo *F. solani*], *F. verticillioides* [2, complexo *F. fujikuroi*], *F. sporotrichioides* [1, complexo *F. sambucinum*]. A origem destes isolados está descrita na Tabela 2. Também foram incluídas no estudo duas cepas padrão: *F. solani* ATCC 36031 e *F. sporotrichioides* CBS 41286. Todos os isolados pertencem a micoteca do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Maria.

A identificação dos isolados foi realizada através do método fenotípico padrão. Após, a identidade dos isolados foi confirmada por método molecular. Para obtenção do DNA, os isolados foram cultivados em caldo YEPD (extrato de levedura, peptona e dextrose) por 48 horas no shaker a 26°C. O DNA foi extraído a partir do micélio de acordo com Möller e colaboradores (MÖLLER et al., 1992) com modificações (KLASSEN; BALCERZAK; DE COCK, 1996) (Anexo A). A amplificação de um fragmento de DNA abrangendo a região espaçadora interna ITS (Internal Transcribed Spacer) foi realizada por PCR (reação em cadeia da polimerase) utilizando os *primers* universais ITS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') e ITS4 (5'-CTTCCGTCAATTCCTTTAAG-3') (WHITE et al., 1990).

Todas as reações foram realizadas em um volume total de 50 µL contendo: 20 pmol de cada *primer* (ITS1 e ITS4) (Invitrogen); 1,25 unidades da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen); 200 nM de deoxinucleotídeo (dNTP) (Invitrogen); tampão de reação 10x; 1,5 mM de MgCl₂; e 200 ng de amostra de DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador programável (PTC-100, MJ Research) sob as seguintes condições: 94°C durante 5 minutos e 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C durante 1 minuto e 72°C durante 2 minutos, terminando com 72°C durante 10 minutos e 4°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram separados em 1,2% de agarose, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. Depois da verificação, os produtos amplificados foram purificados pelo kit PureLink (Invitrogen), e os fragmentos de DNA foram sequenciados em um sequenciador automático MegaBACE 500 utilizando o kit DYEnamic ET (Amersham) com os mesmos *primers* das reações de PCR. As sequências obtidas foram depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Tabela 2).

Tabela 2 - Identificação molecular dos isolados clínicos de *Fusarium*

Isolados clínicos de <i>Fusarium</i> spp.	Número de acesso (GenBank)	Origem
<i>F. chlamydosporum</i>	HQ696899	córnea
<i>F. chlamydosporum</i>	HQ696900	sangue
<i>F. chlamydosporum</i>	HQ696908	sedimento de DPAC
<i>F. proliferatum</i>	HQ696886	sangue
<i>F. proliferatum</i>	HQ696887	sangue
<i>F. proliferatum</i>	HQ149771	sangue
<i>F. oxysporum</i>	HQ696888	sangue
<i>F. oxysporum</i>	HQ696889	sedimento de DPAC
<i>F. oxysporum</i>	HQ696890	biópsia de tecido
<i>F. oxysporum</i>	HQ696893	biópsia de tecido
<i>F. oxysporum</i>	HQ696895	biópsia de tecido
<i>F. solani</i>	HQ696874	sangue
<i>F. solani</i>	HQ696875	sangue
<i>F. solani</i>	HQ696876	biópsia de tecido
<i>F. solani</i>	HQ696877	biópsia de tecido
<i>F. solani</i>	HQ696878	sangue
<i>F. solani</i>	HQ696879	sangue
<i>F. solani</i>	HQ696880	sangue
<i>F. solani</i>	HQ696881	córnea
<i>F. solani</i>	HQ696882	biópsia de tecido
<i>F. solani</i>	HQ696883	biópsia de tecido
<i>F. verticillioides</i>	KR020684	córnea
<i>F. verticillioides</i>	KR052812	sangue

DPAC (diálise peritoneal ambulatorial contínua)

1.3.2 Agentes antifúngicos e quimiossensibilizantes

Para a obtenção das soluções estoque, os agentes anfotericina B (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), caspofungina (Merck, Darmstadt, Alemanha), itraconazol (Frangon do Brasil, Farmacêutica Ltda, São Paulo, Brasil), voriconazol (Pfizer, New York, USA), amiodarona (Sigma Aldrich), doxiciclina (Sigma Aldrich), moxifloxacina (Bayer AG, Leverkusen, Alemanha), pentamidina (Sigma Aldrich), polimixina B (Sigma Aldrich), tigeciclina (Pfizer), tobramicina (Sigma Aldrich), cinamaldeído (Sigma Aldrich), carvacrol (Sigma Aldrich) e timol (Sigma Aldrich) foram obtidos comercialmente e diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), água destilada estéril ou etanol, conforme a solubilidade de cada agente (Tabela 3).

Os compostos orgânicos de selênio, disseleneto de difenila [(PhSe)₂] e ebselen [2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-one], foram sintetizados de acordo com os métodos de Paulmier (PAULMIER, 1986) e Engman (ENGMAN; HALLBERG, 1989), respectivamente. As análises dos espectros de ¹H NMR (Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio) e ¹³C NMR (Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13) demonstraram que os compostos apresentaram dados analíticos e espectroscópicos de acordo com sua estrutura original. A pureza química dos compostos (99,9%) foi determinada por cromatografia em fase gasosa/cromatografia líquida de alta eficiência (GC/HPLC). As sínteses e análises destes compostos foram realizadas pelo Laboratório de Síntese, Reatividade, Avaliação Toxicológica e Farmacológica de Organocalcogênios da Universidade Federal de Santa Maria, RS. As faixas de concentração testadas e solventes utilizados para a obtenção das soluções estoques destes compostos estão descritos na Tabela 3.

As soluções intermediárias foram preparadas conforme o documento M38-A2 (CLSI, 2008). As soluções finais foram diluídas em meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich) previamente ajustado a pH 7.0 com tampão ácido morfolino propanosulfônico (MOPS, Sigma Aldrich).

Tabela 3 - Faixa de concentração testada e solventes utilizados para cada agente

Agentes	Faixa de concentração testada ($\mu\text{g/mL}$)	Solvente
Antifúngicos		
Anfotericina B	0,06-8	DMSO
Caspofungina	0,25-32	Água destilada estéril
Itraconazol	0,12-16	DMSO
Voriconazol	0,12-16	DMSO
Quimiossensibilizantes		
Disseleneto de difenila	0,5-64	DMSO
Ebselen	0,25-32	DMSO
Amiodarona	0,06-8	DMSO
Doxiciclina	0,12-16	Água destilada estéril
Moxifloxacina	0,12-16	Água destilada estéril
Pentamidina	0,25-32	Água destilada estéril
Polimixina B	0,12-16	Água destilada estéril
Tigeciclina	0,12-16	DMSO
Tobramicina	0,5-64	Água destilada estéril
Cinamaldeído	1,25-320	Etanol
Carvacrol	1,25-320	Etanol
Timol	1,25-320	Etanol

1.3.3 Testes de suscetibilidade

A suscetibilidade dos isolados de *Fusarium* foi determinada pelo método de microdiluição em caldo RPMI 1640, de acordo com o protocolo aprovado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute [M38-A2] (CLSI, 2008).

1.3.3.1 Preparação do inóculo

Os isolados foram subcultivados em tubos contendo ágar batata dextrose (PDA) e incubados a 35°C por 48 horas, e a 25°C até completar o sétimo dia, conforme a M38-A2 (CLSI, 2008).

Para a preparação dos inóculos, as colônias de sete dias foram cobertas com aproximadamente 1mL de solução salina estéril a 0,85%. Também foi adicionado às colônias uma gota (aproximadamente 0,01 mL) de Tween 20 para facilitar a remoção dos conídios. As suspensões foram obtidas através de movimentos delicados com auxílio de uma pipeta de Pasteur estéril. A mistura de conídios e fragmentos de hifas foi transferida para um novo tubo estéril e mantida em repouso por cinco minutos. O sobrenadante foi removido por aspiração e

transferido para um novo tubo também estéril. As densidades das suspensões de conídios foram ajustadas para uma densidade óptica (DO) variável entre 0,15 a 0,17 (transmitância de 68 a 70%) em 530 nm por espectrofotometria. O inóculo assim padronizado foi diluído 1:50 em caldo RPMI 1640 para se obter a concentração final de 1×10^4 UFC/mL (CLSI, 2008).

1.3.3.2 Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações efetivas mínimas (CEMs)

Para o ensaio da determinação das CIMs ou CEMs foram utilizadas microplacas de poliestireno contendo 96 poços com fundo chato. Primeiramente foi adicionado 100 μ L do agente nas diferentes concentrações, distribuídos de forma seriada nos poços de 1 a 8 das microplacas. Posteriormente, foi adicionado 100 μ L do inóculo previamente ajustado e diluído em RPMI. Visto que há uma diluição 1:2 do agente quando combinado com o inóculo, a concentração inicial do agente foi preparada duas vezes mais concentrada para corrigir o fator de diluição. *Aspergillus flavus* ATCC 204304, *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foram incluídas nos testes para controle de qualidade.

As CIMs ou CEMs foram determinadas após 48 horas de incubação em estufa a 35°C. Para todos os agentes (exceto para a caspofungina), as CIMs foram determinadas visualmente, considerando a menor concentração do agente capaz de causar uma inibição de 100% do crescimento do micélio quando comparado ao controle de crescimento. Para a caspofungina a leitura foi realizada através da determinação da CEM, ou seja, a menor concentração do agente que resulta no crescimento de hifas pequenas, arredondadas e compactas, em comparação com as hifas observadas no controle de crescimento (CLSI, 2008).

1.3.4 Avaliação das combinações

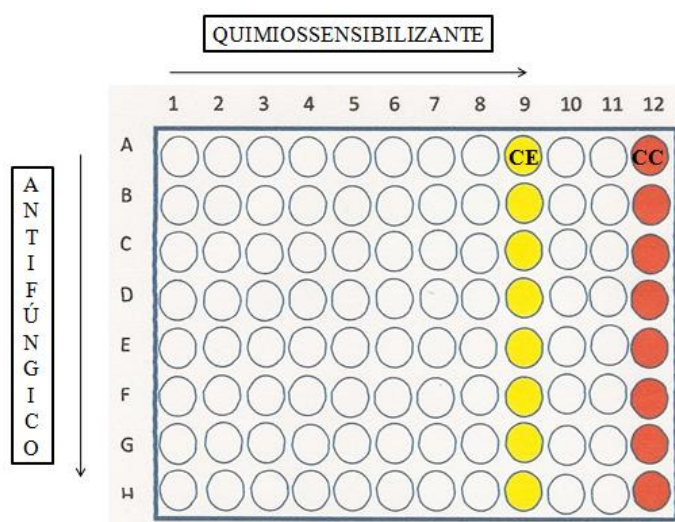
A avaliação da atividade antifúngica, quando dois agentes são combinados, foi realizada pelo método de *checkerboard*, através da determinação do índice de concentração inibitória fracionária (ICIF) (MOODY, 2007). Os testes foram realizados em caldo RPMI 1640 tamponado em pH 7,0 com ácido morfolino propanossulfônico (MOPS).

Primeiramente, foram depositados 100 μ L do quimiossensibilizante na coluna 1 da microplaca. Posteriormente, foram diluídos 50 μ L deste agente em caldo RPMI até o poço 8 (sentido horizontal da placa). Em seguida, foram depositados 50 μ L do antifúngico, em

diferentes concentrações, nas linhas A, B, C, D, E, F, G e H (sentido vertical da placa) (Figura 6).

A concentração inicial de cada agente foi preparada em uma concentração quatro vezes maior que a concentração final desejada. Isto se deve ao fato de que 50 µL de cada diluição de um determinado agente foi combinada a outros 50 µL de cada diluição do segundo agente; e a este volume foi somado 100 µL de inóculo em caldo RPMI 1640 depositados em cada poço da microplaca. As faixas de concentração dos agentes antifúngicos e quimiossensibilizantes foram as mesmas utilizadas para o teste de suscetibilidade.

Figura 6 - Representação da técnica de *checkerboard*



CE, controle de esterilidade; CC, controle de crescimento.

Após 48 horas de incubação das placas, a 35°C, foram realizadas as leituras. Para avaliar a interação entre os agentes, a concentração inibitória fracionária (CIF) foi calculada para cada agente em combinação. As CIFs foram calculadas pela divisão da concentração inibitória (ou efetiva) de cada agente na combinação, pela concentração inibitória (ou efetiva) do agente sozinho. Os valores de CIF foram então somados para definir o índice de concentração inibitória fracionária (ICIF) resultante da combinação, como mostra a fórmula abaixo. Sinergismo foi definido como $ICIF \leq 0,5$. A indiferença foi considerada quando $0,5 < ICIF \leq 4$, enquanto que antagonismo foi definido quando $ICIF > 4$ (MOODY, 2007).

$$ICIF = \frac{CIM \text{ ou } CEM \text{ agente A em combinação}}{CIM \text{ ou } CEM \text{ agente A sozinho}} + \frac{CIM \text{ ou } CEM \text{ agente B em combinação}}{CIM \text{ ou } CEM \text{ agente B sozinho}}$$

2 ARTIGO 1**Antifungal activities of diphenyl diselenide and ebselen alone and in combination with antifungal agents against *Fusarium* spp.**

Organoselenium compounds against *Fusarium* spp.

Tarcieli Pozzebon Venturini¹, Francieli Chassot¹, Érico Silva Loreto², Jéssica Tairine Keller³,
Maria Izabel Azevedo², Gilson Zeni⁴, Janio Morais Santurio^{2,3}, Sydney Hartz Alves^{1,3*}

Full title: Antifungal activities of diphenyl diselenide and ebselen alone and in combination with antifungal agents against *Fusarium* spp.

Short title: Organoselenium compounds against *Fusarium* spp.

Authors: Tarcieli Pozzebon Venturini¹, Francieli Chassot¹, Érico Silva Loreto², Jéssica Tairine Keller³, Maria Izabel Azevedo², Gilson Zeni⁴, Janio Morais Santurio^{2,3}, Sydney Hartz Alves^{1,3*}

Affiliations:

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

³Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

⁴Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

***Address for correspondence:**

Sydney Hartz Alves

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Av. Roraima n° 1000, Prédio 20, sala 4139, Santa Maria- CEP 97105-900, RS, Brazil. Tel./fax: +55 55 3220-8906. E-mail: sydneyalves.ufsm@gmail.com

Keywords: susceptibility; combinations; diphenyl diselenide; ebselen; *Fusarium* spp.

Abstract

Herein, we describe the *in vitro* activity of a combination of the organoselenium compounds diphenyl diselenide and ebselen alone and in combination with amphotericin B, caspofungin, itraconazole, and voriconazole against 25 clinical isolates of *Fusarium* spp. For this analysis, we used the broth microdilution method based on the M38-A2 technique and checkerboard microdilution method. Diphenyl diselenide (MIC range = 4-32 µg/mL) and ebselen (MIC range = 2-8 µg/mL) showed *in vitro* activity against the isolates tested. The most effective combinations were (synergism rates): ebselen + amphotericin B (88%), ebselen + voriconazole (80%), diphenyl diselenide + amphotericin B (72%), and diphenyl diselenide + voriconazole (64%). Combination with caspofungin resulted in low rates of synergism: ebselen + caspofungin, 36%, and diphenyl diselenide + caspofungin, 28%; combination with itraconazole demonstrated indifferent interactions. Antagonistic effects were not observed for any of the combinations tested. Our findings suggest that the antifungal potential of diphenyl diselenide and ebselen deserves further investigation in *in vivo* experimental models, especially in combination with amphotericin B and voriconazole.

1. Introduction

Fusarium species are common saprobitics present in soil. They are important plant pathogens but may also cause a wide range of infections in humans.¹ Moreover, this emerging opportunistic fungus causes deep and disseminated infections in immunocompromised patients.² Despite the considerable variability in susceptibility, most species are relatively resistant to currently available antifungal agents.^{1,3} According to guidelines for the treatment of hyalohyphomycoses, amphotericin B and voriconazole are the recommended antifungal agents for the treatment of systemic fusariosis.⁴ However, high rates of mortality resulting from treatment failure underscore the need for new treatment options.^{1,5,6}

Diphenyl diselenide (DPDS) and ebselen (EBS) are organoselenium derivatives that have several pharmacological properties,⁷⁻⁹ including antimicrobial activity against bacteria, fungi (including *Fusarium* spp.) and the oomycete *Pythium insidiosum*.¹⁰⁻¹⁸ Moreover, synthetic and natural compounds have been used as chemosensitizers, i.e., they may increase the susceptibility of microorganisms to an antifungal agent, providing greater drug efficacy when administered as a combination therapy.¹⁹

Therefore, the aim of the present study was to evaluate the *in vitro* susceptibility of *Fusarium* isolates to two organoselenium compounds, DPDS and EBS, and to combinations of DPDS and EBS with conventional antifungal agents.

2. Material and methods

2.1 Clinical isolates and molecular identification

Twenty-five clinical isolates of *Fusarium* spp. (species complex, n) were used in the present study: *Fusarium chlamydosporum* (*F.chlamydosporum* species complex, n = 3), *F. oxysporum* (*F. oxysporum* species complex, n = 5), *F. proliferatum* (*F. fujikuroi* species complex, n = 3), *F. solani* (*F. solani* species complex, n = 11), *F. verticillioides* (*F. fujikuroi* species complex, n = 2), and *F. sporotrichioides* (*F. sambucinum* species complex, n = 1). The standard strains *F. solani* ATCC 36031 and *F. sporotrichioides* CBS 41286 were also included in the study. The strains were isolated from blood cultures, tissue biopsies, cornea, bronchoalveolar lavage, and sediment of dialysate obtained from continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). These samples were obtained from the Department of Microbiology and Parasitology at the Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

The identity of the isolates was confirmed using standard microbiological and molecular methods. Total DNA extraction was performed according to the method described by Moller et al²⁰ as modified by Klassen et al²¹. Amplification of a DNA fragment spanning the internal transcribed spacer (ITS) region was performed by PCR using the universal primers ITS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') and ITS4 (5'-CTTCCGTC AATTCCTTTAAG-3').²² The PCR products were purified and sequenced. These sequences have been deposited in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) with the following accession numbers: HQ696899, HQ696900, and HQ696908 for *F. chlamydosporum*; HQ696888, HQ696889, HQ696890, HQ696893, and HQ696894 for *F. oxysporum*; HQ696886, HQ696887, and GQ149771 for *F. proliferatum*; HQ696874, HQ696875, HQ696876, HQ696877, HQ696878, HQ696879, HQ696880, HQ696881, HQ696882, and HQ696883 for *F. solani*; and KR020684 and KR052812 for *F. verticillioides*.

2.2 Chemicals

Amphotericin B (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), caspofungin (Merck, Darmstadt, Germany), itraconazole (Frangon of Brazil Pharmaceutical Ltd., São Paulo, Brazil), and voriconazole (Pfizer, New York, USA) were obtained commercially.

Diphenyl diselenide [(PhSe)₂] was synthesized according to the method of Paulmier²³. Ebselen [2-phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2*H*)-one] was synthesized according to the method of Engman & Hallberg²⁴. ¹H and ¹³C NMR spectra of the synthesized compounds were obtained to confirm the correct molecular structure. The chemical purity of the compounds was found to be 99.9%, as determined by gas chromatography/high-performance liquid chromatography (GC/HPLC).

Stock solutions of amphotericin B (AMB), itraconazole (ITC), voriconazole (VRC), diphenyl diselenide (DPDS), and ebselen (EBS) were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma Chemical Co.), while caspofungin (CAS) was diluted in sterile distilled water. Working solutions were prepared according to the M38-A2 document (CLSI, 2008).²⁵ The final solutions were diluted in RPMI 1640 medium (Sigma Chemical Co.), whose pH was preadjusted to 7.0 with morpholinepropanesulfonic acid (MOPS) buffer (Sigma Chemical Co.).

2.3 *In vitro* susceptibility and drug combination tests

Fusarium spp. susceptibility tests for antifungal agents and organoselenium compounds were carried out by broth microdilution in RPMI 1640 broth, as described in the M38-A2 document of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008).²⁵ *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, and *Aspergillus flavus* ATCC 204304 were included in the tests as quality controls. The concentrations tested were 0.06–8 µg/mL for AMB, 0.125–16 µg/mL for ITC and VRC, 0.25–32 µg/mL for CAS and EBS, and 0.5–64 µg/mL for DPDS.

In vitro combinations of antifungal agents and organoselenium compounds were evaluated by the microdilution checkerboard method.²⁶ For the calculation of the fractional inhibitory concentration index (FICI) when the MIC or MEC resulted in an off-scale value, the value was converted to the next higher concentration (e.g., >16 = 32 µg/mL). The FICI values were interpreted as follows: FICI ≤ 0.5, synergism; 0.5 < FICI ≤ 4, indifference; and FICI > 4, antagonism.²⁶

3. Results

The results of the *in vitro* susceptibility tests are shown in Table 1. The MIC values at which 90% of the strains were inhibited (MIC₉₀) were 4 µg/mL for AMB, 8 µg/mL for EBS, and 16 µg/mL for VRC and DPDS. All isolates showed MIC >16 µg/mL and MEC >32 µg/mL for ITC and CAS, respectively.

The MICs/MECs of the antifungal drugs in combination with the organoselenium compounds are presented in Table 2. The MICs or MECs (geometric mean [GM] in µg/mL) values of the combinations were 0.5–8 (1.79)/0.06–4 (0.53) for DPDS/AMB, 2–64 (7.16)/16 (16) for DPDS/ITC, 0.5–16 (2)/0.125–8 (1.69) for DPDS/VRC, 0.5–32 (3.68)/8–32 (22.32) for DPDS/CAS, 0.25–2 (0.46)/0.06–2 (0.21) for EBS/AMB, 0.5–8 (2.23)/8–16 (14.32) for EBS/ITC, 0.25–4 (0.5)/0.125–8 (1.06) for EBS/VRC, and 0.5–4 (1.56)/8–32 (19.97) for EBS/CAS.

Synergy was seen for EBS + AMB (88%), EBS + VRC (80%), DPDS + AMB (72%), DPDS + VRC (64%), EBS + CAS (36%), and DPDS + CAS (28%). There was no evidence for synergy for either compound in combination with ITC. Antagonistic effects were not observed for any of the combinations tested.

4. Discussion

The discovery of the antifungal activity of organoselenium compounds can play a complementary role in the chemotherapy of fungal infections.¹¹ From the antifungals tested, AMB showed the highest antifungal activity. We therefore tested combinations of DPDS or EBS with AMB, ITC, VRC, or CAS against *Fusarium* spp; to our knowledge, this study is the first to test these combinations against *Fusarium* spp. Among all the combinations tested, the greatest synergy was obtained for the combinations of EBS + AMB (88%) or VRC (80%), and for DPDS + AMB (72%) or VRC (64%).

There are only a few published studies on the *in vitro* susceptibility of *Fusarium* spp. to antifungal agents; moreover, these show variable results.^{1-3,5,6,27} In the present study, *F. verticillioides* and *F. solani* had higher MICs for AMB and VRC. These findings are consistent with those of other studies.^{1,3}

Previous studies have reported the *in vitro* antifungal activity of DPDS against *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, and *Aspergillus* spp.,^{11,12,15} as well as antimicrobial activity against the oomycete *Pythium insidiosum*.¹⁶ Loreto et al¹¹

reported the *in vitro* activity of DPDS against *Fusarium* spp. to be in the MIC range of 2–16 µg/mL, as observed in the present study. Similar to DPDS, EBS has also shown potential antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Microsporium gypseum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum*, and *A. niger*.^{10,13,14,18}

In a previously published study, the combination of DPDS with fluconazole or AMB was evaluated by the checkerboard method against clinical isolates of *C. glabrata*.¹⁵ These authors observed 76.66% synergistic interactions using DPDS + AMB and 23.34% indifferent interactions. The DPDS + fluconazole combination demonstrated indifferent (50%), antagonistic (40%), and synergistic (10%) interactions.¹⁵

Organoselenium compounds behave differently according to their dosage. These compounds have beneficial effects at low doses, but are toxic at high doses. However, the threshold doses for these opposing effects have not been determined.^{8,9} Quantification of the plasma levels of DPDS after oral administration of 500 mg/kg in mice and rats showed peak levels to be approximately 10 and 13 µg/mL, respectively.²⁸ The EBS plasma concentration in rats after administration of a bolus infusion of 1 µg/mL combined with a 1 µg/ (mL · h) intravenous infusion revealed an initial spike concentration of 12 µg/mL, which stabilized after 1 h at 4–6 µg/mL.²⁹ In the present study, the geometric means of the MICs of DPDS in combination with AMB or VRC were 1.79 and 2 µg/mL, respectively, while the geometric means of the MICs of EBS in combination with AMB or VRC were 0.46 and 0.5 µg/mL, respectively. Thus, the concentrations of these compounds as determined in the present study are lesser than the plasma concentrations demonstrated in previous studies.

According to Mugesh et al⁷ and Wójtowicz et al¹⁴, the biological mechanism underlying the antifungal activity of DPDS and EBS involves their interactions with the sulfhydryl groups of the biomolecules present in fungal cells. Rosa et al¹⁷ demonstrated that DPDS can act as a pro-oxidant in yeast by reducing the levels of cellular glutathione (GSH), which plays an important role in the antioxidant defense of the cell. This reduction of intracellular GSH sensitizes the cell to the damaging effects of reactive oxygen species (ROS). Soteropoulos et al¹³ demonstrated that EBS inhibits H⁺-ATPase in the plasma membrane of *C. neoformans*, thereby acting as a fungicidal agent. This proton pump is required for growth and cell maintenance, and its inhibition results in cell death. Therefore, these authors validated H⁺-ATPase as an antifungal target of EBS.

In this context, further studies are required to investigate the mechanisms by which these organoselenium compounds are able to promote chemosensitization to antifungal

agents. Combination therapy is an important alternative when monotherapy is not effective,¹ as synergism between two agents may reduce treatment toxicity through the administration of lower doses and may reduce antimicrobial resistance.

In conclusion, our findings demonstrate that DPDS and EBS exhibit *in vitro* antifungal activity towards *Fusarium* spp. Combination of each of these compounds with AMB or VRC leads to high rates of synergism *in vitro*. Although *in vivo* experimental studies are required to confirm these findings, these data provide evidence of new potential antifungal agents or adjuvants for the antifungal treatment of fusariosis.

Acknowledgements

This study was funded by the National Council for Scientific and Technological Development – (CNPq; process #470229/2012-8) and by CAPES (Higher Education Personnel Training Coordination, Brazil). É.S.L are financially supported by fellowships from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (CAPES).

Declaration of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Nucci M, Anaissie E. *Fusarium* infections in Immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(4):695-704.
2. Cilo BD, Al-Hatmi AMS, Seyedmousavi S, et al. Emergence of fusarioses in a university hospital in Turkey during a 20-year period. *Eur J Clin Microbiol.* 2015;34(8):1683-1691.
3. Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzon A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(4):805-809.
4. Tortorano AM, Richardson M, Roilides E, et al. ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. *Clin Microbiol Infec.* 2014;20(3):27-46.
5. Guarro J. Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. *Eur J Clin Microbiol.* 2013;32(12):1491-1500.
6. Muhammed M, Coleman JJ, Carneiro HA, Mylonakis E. The challenge of managing fusariosis. *Virulence.* 2011;2(2):91-96.
7. Mughesh G, du Mont WW, Sies H. Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. *Chem Rev.* 2001;101(7):2125-2179.
8. Nogueira CW, Rocha JBT. Diphenyl Diselenide a Janus-Faced Molecule. *J Brazil Chem Soc.* 2010;21(11):2055-2071.

9. Nogueira CW, Zeni G, Rocha JBT. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev.* 2004;104(12):6255-6285.
10. Billack B, Santoro M, Lau-Cam C. Growth inhibitory action of ebselen on fluconazole-resistant *Candida albicans*: role of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Microb Drug Resist.* 2009;15(2):77-83.
11. Loreto ES, Mario DAN, Santurio JM, Alves SH, Nogueira CW, Zeni G. *In vitro* antifungal evaluation and structure-activity relationship of diphenyl diselenide and synthetic analogues. *Mycoses.* 2011;54(5):E572-E576.
12. Rosseti IB, Rocha JBT, Costa MS. Diphenyl diselenide (PhSe)₂ inhibits biofilm formation by *Candida albicans*, increasing both ROS production and membrane permeability. *J Trace Elem Med Bio.* 2015;29:289-295.
13. Soteropoulos P, Vaz T, Santangelo R, et al. Molecular characterization of the plasma membrane H⁺-ATPase, an antifungal target in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(9):2349-2355.
14. Wójtowicz H, Kloc K, Maliszewska I, Młochowski J, Piętka M, Piasecki E. Azaanalogues of ebselen as antimicrobial and antiviral agents: synthesis and properties. *II Farmaco.* 2004;59(11):863-868.
15. Denardi LB, Mario DAN, de Loreto ES, Nogueira CW, Santurio JM, Alves SH. Antifungal activities of diphenyl diselenide alone and in combination with fluconazole or amphotericin B against *Candida glabrata*. *Mycopathologia.* 2013;176(1-2):165-169.
16. Loreto ES, Alves SH, Santurio JM, Nogueira CW, Zeni G. Diphenyl diselenide *in vitro* and *in vivo* activity against the oomycete *Pythium insidiosum*. *Vet Microbiol.* 2012;156(1-2):222-226.
17. Rosa RM, de Oliveira RB, Saffi J, et al. Pro-oxidant action of diphenyl diselenide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ROS-generating conditions. *Life Sci.* 2005;77(19):2398-2411.
18. Wójtowicz H, Chojnacka M, Młochowski J, et al. Functionalized alkyl and aryl diselenides as antimicrobial and antiviral agents: synthesis and properties. *II Farmaco.* 2003;58(12):1235-1242.
19. Campbell BC, Chan KL, Kim JH. Chemosensitization as a means to augment commercial antifungal agents. *Front Microbiol.* 2012;3:79.
20. Moller EM, Bahnweg G, Sandermann H, Geiger HH. A simple and efficient protocol for isolation of high-molecular-weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected-plant tissues. *Nucleic Acids Res.* 1992;20(22):6115-6116.
21. Klassen GR, Balcerzak M, deCock AWAM. 5S ribosomal RNA gene spacers as species-specific probes for eight species of *Pythium*. *Phytopathology.* 1996;86(6):581-587.
22. White TJ, Bruns T, Lee SJWT, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR protocols : a guide to methods and applications*. New York: Academic Press, 1990:315-322.
23. Paulmier C. Selenoorganic functional groups. In: Paulmier C, ed. *Selenium reagents and intermediates in organic synthesis*. 1st edn. Oxford: Pergamon Press, 1986:25-27.
24. Engman L, Hallberg A. Expedient synthesis of ebselen and related-compounds. *J Org Chem.* 1989;54(12):2964-2966.
25. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard*. 2nd edn. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
26. Moody J. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: Garcia LS, Isenberg HD, eds. *Clinical microbiology procedures handbook*. 2nd edn. Washington, DC: ASM Press, 2007:1-23.
27. Al-Hatmi AMS, van Diepeningen AD, Curfs-Breuker I, de Hoog GS, Meis JF. Specific antifungal susceptibility profiles of opportunists in the *Fusarium fujikuroi* complex. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(4):1068-1071.

28. Prigol M, Schumacher RF, WayneNogueira C, Zeni G. Convulsant effect of diphenyl diselenide in rats and mice and its relationship to plasma levels. *Toxicol Lett.* 2009;189(1):35-39.
29. Imai H, Masayasu H, Dewar D, Graham DI, Macrae IM. Ebselen protects both gray matter and white matter in a rodent cerebral ischemia. *Stroke.* 2001;32(9):2149-2156.

Table 1. *In vitro* susceptibility of *Fusarium* spp. to antifungal agents and organoselenium compounds.

Species (n)	MIC/MEC range (GM) ($\mu\text{g/mL}$)					
	Antifungal agents				Organoselenium compounds	
	AMB	ITC	VRC	CAS	DPDS	EBS
<i>F. chlamydosporum</i> (3)	0.25-0.5 (0.4)	>16 (>16)	2-8 (4)	>32 (>32)	4-8 (5.0)	2-4 (2.5)
<i>F. oxysporum</i> (5)	0.5-4 (2)	>16 (>16)	4-8 (5.3)	>32 (>32)	4-16 (9.2)	2-8 (4.6)
<i>F. proliferatum</i> (3)	1-2 (1.6)	>16 (>16)	1-8 (3.2)	>32 (>32)	4-8 (5.0)	2-4 (3.2)
<i>F. solani</i> (11)	1-8 (2.7)	>16 (>16)	4-16 (8)	>32 (>32)	8-32 (15.0)	4-8 (6.6)
<i>F. sporotrichioides</i> (1)	4	>16	2	>32	4	2
<i>F. verticillioides</i> (2)	4-8 (5.7)	>16 (>16)	8-16 (11.3)	>32 (>32)	8-16 (11.3)	4-8 (5.6)
All species (25)	0.25-8 (2.1)	>16 (>16)	1- 16 (5.9)	>32 (>32)	4-32 (9.7)	2-8 (4.7)

MIC range, minimal inhibitory concentration range ($\mu\text{g/mL}$); MEC range, minimum effective concentration range ($\mu\text{g/mL}$); GM, geometric mean; AMB, amphotericin B; ITC, itraconazole; VRC, voriconazole; CAS, caspofungin; DPDS, diphenyl diselenide; EBS, ebselen.

Table 2. *In vitro* combinations of antifungal agents and organoselenium compounds against *Fusarium* spp.

Isolate	Drugs in combination															
	DPDS/AMB		DPDS/ITC		DPDS/VRC		DPDS/CAS		EBS/AMB		EBS/ITC		EBS/VRC		EBS/CAS	
	MICs	FICI (X)	MICs	FICI (X)	MICs	FICI (X)	MECs	FICI (X)	MICs	FICI (X)	MICs	FICI (X)	MICs	FICI (X)	MECs	FICI (X)
Fc1	0.50/0.06	0.24 (S)	2.00/16.00	1.00 (I)	0.50/0.50	0.25 (S)	0.50/8.00	0.25 (S)	0.50/0.06	0.24 (S)	2.00/16.00	1.00 (I)	0.25/0.50	0.19 (S)	1.00/8.00	0.25 (S)
Fc2	0.50/0.12	0.38 (S)	2.00/16.00	1.00 (I)	0.50/2.00	0.38 (S)	1.00/16.00	0.50 (S)	0.50/0.06	0.24 (S)	0.50/16.00	0.75 (I)	0.25/1.00	0.25 (S)	0.50/8.00	0.38 (S)
Fc3	1.00/0.06	0.36 (S)	4.00/16.00	1.00 (I)	1.00/0.50	0.38 (S)	1.00/16.00	0.38 (S)	0.25/0.06	0.36 (S)	0.50/16.00	0.75 (I)	0.25/0.25	0.25 (S)	0.50/8.00	0.38 (S)
Fo1	1.00/0.12	0.38 (S)	4.00/16.00	1.00 (I)	1.00/1.00	0.31 (S)	1.00/16.00	0.38 (S)	1.00/0.12	0.38 (S)	2.00/16.00	0.75 (I)	0.50/0.50	0.19 (S)	2.00/8.00	0.38 (S)
Fo2	2.00/1.00	0.62 (I)	8.00/16.00	1.00 (I)	4.00/1.00	0.50 (S)	4.00/16.00	0.50 (S)	1.00/0.50	0.38 (S)	4.00/16.00	1.00 (I)	1.00/0.50	0.25 (S)	2.00/8.00	0.38 (S)
Fo3	2.00/1.00	0.38 (S)	8.00/16.00	1.00 (I)	2.00/1.00	0.38 (S)	4.00/16.00	0.50 (S)	0.50/0.50	0.38 (S)	1.00/8.00	0.75 (I)	0.25/1.00	0.38 (S)	0.50/32.00	0.75 (I)
Fo4	1.00/0.50	0.50 (S)	4.00/16.00	1.50 (I)	1.00/4.00	0.75 (I)	2.00/16.00	0.75 (I)	0.50/0.50	0.38 (S)	2.00/8.00	0.75 (I)	0.25/1.00	0.19 (S)	1.00/16.00	0.50 (S)
Fo5	4.00/2.00	0.75 (I)	4.00/16.00	1.00 (I)	2.00/4.00	0.75 (I)	4.00/16.00	0.75 (I)	2.00/1.00	0.75 (I)	1.00/16.00	0.75 (I)	0.25/1.00	0.19 (S)	1.00/32.00	0.75 (I)
Fp1	0.50/0.25	0.25 (S)	2.00/16.00	1.00 (I)	0.50/0.12	0.25 (S)	2.00/16.00	0.75 (I)	0.25/0.06	0.09 (S)	1.00/16.00	0.75 (I)	0.25/0.12	0.19 (S)	0.50/16.00	0.38 (S)
Fp2	0.50/0.25	0.25 (S)	2.00/16.00	1.00 (I)	0.50/0.50	0.25 (S)	0.50/8.00	0.25 (S)	0.25/0.06	0.16 (S)	0.50/16.00	0.75 (I)	0.25/0.50	0.25 (S)	0.50/32.00	0.75 (I)
Fp3	1.00/0.12	0.25 (S)	4.00/16.00	1.00 (I)	1.00/2.00	0.38 (S)	4.00/16.00	0.75 (I)	0.25/0.06	0.12 (S)	1.00/16.00	0.75 (I)	0.50/1.00	0.25 (S)	0.50/16.00	0.38 (S)
Fs1	2.00/0.25	0.38 (S)	8.00/16.00	1.50 (I)	1.00/2.00	0.38 (S)	4.00/32.00	1.00 (I)	0.25/0.06	0.06 (S)	4.00/16.00	1.00 (I)	1.00/1.00	0.25 (S)	4.00/32.00	1.00 (I)
Fs2	2.00/0.50	0.38 (S)	8.00/16.00	1.00 (I)	4.00/2.00	0.50 (S)	8.00/32.00	1.00 (I)	0.25/0.06	0.09 (S)	2.00/16.00	1.00 (I)	0.50/1.00	0.25 (S)	2.00/16.00	0.75 (I)
Fs3	1.00/0.25	0.38 (S)	8.00/16.00	1.50 (I)	2.00/1.00	0.50 (S)	4.00/32.00	1.00 (I)	0.50/0.06	0.12 (S)	8.00/16.00	1.50 (I)	1.00/0.50	0.25 (S)	4.00/32.00	1.00 (I)
Fs4	4.00/0.50	0.38 (S)	64.00/16.00	2.50 (I)	16.00/4.00	1.00 (I)	32.00/32.00	1.50 (I)	0.50/0.25	0.19 (S)	4.00/16.00	1.00 (I)	0.25/2.00	0.28 (S)	4.00/32.00	1.00 (I)
Fs5	8.00/2.00	0.75 (I)	64.00/16.00	2.50 (I)	16.00/8.00	1.00 (I)	32.00/32.00	1.50 (I)	2.00/2.00	0.75 (I)	8.00/16.00	1.50 (I)	4.00/4.00	0.75 (I)	4.00/16.00	0.75 (I)
Fs6	4.00/2.00	0.75 (I)	8.00/16.00	1.50 (I)	2.00/2.00	0.50 (S)	4.00/32.00	1.00 (I)	0.50/0.50	0.19 (S)	8.00/16.00	1.50 (I)	0.25/2.00	0.28 (S)	4.00/32.00	1.00 (I)
Fs7	4.00/1.00	0.50 (S)	8.00/16.00	1.00 (I)	4.00/4.00	0.75 (I)	8.00/32.00	1.00 (I)	0.25/0.50	0.16 (S)	4.00/16.00	1.00 (I)	2.00/4.00	0.75 (I)	4.00/32.00	1.00 (I)
Fs8	8.00/2.00	1.00 (I)	16.00/16.00	1.50 (I)	8.00/8.00	1.00 (I)	8.00/32.00	1.00 (I)	1.00/2.00	0.75 (I)	2.00/16.00	1.00 (I)	2.00/4.00	0.75 (I)	2.00/16.00	0.75 (I)
Fs9	2.00/0.25	0.38 (S)	16.00/16.00	1.50 (I)	2.00/1.00	0.38 (S)	4.00/32.00	0.75 (I)	0.50/0.12	0.19 (S)	8.00/8.00	1.25 (I)	1.00/0.50	0.25 (S)	4.00/32.00	1.00 (I)
Fs10	8.00/2.00	1.00 (I)	8.00/16.00	1.00 (I)	4.00/4.00	0.75 (I)	8.00/32.00	1.00 (I)	0.25/0.50	0.19 (S)	2.00/16.00	1.00 (I)	0.50/2.00	0.38 (S)	2.00/32.00	1.00 (I)
Fs11	8.00/4.00	1.00 (I)	16.00/16.00	1.50 (I)	8.00/4.00	1.00 (I)	8.00/32.00	1.00 (I)	0.25/0.50	0.09 (S)	8.00/8.00	1.25 (I)	0.25/4.00	0.75 (I)	4.00/32.00	1.00 (I)
Fv1	1.00/1.00	0.25 (S)	8.00/16.00	1.50 (I)	2.00/8.00	0.75 (I)	4.00/32.00	1.00 (I)	0.50/0.50	0.19 (S)	2.00/16.00	1.00 (I)	0.50/8.00	0.62 (I)	1.00/16.00	0.50 (S)
Fv2	2.00/1.00	0.38 (S)	16.00/16.00	1.50 (I)	4.00/2.00	0.50 (S)	8.00/32.00	1.00 (I)	0.50/0.12	0.09 (S)	4.00/16.00	1.00 (I)	1.00/2.00	0.38 (S)	4.00/32.00	1.00 (I)
Fst1	0.50/1.00	0.38 (S)	4.00/16.00	1.50 (I)	0.50/0.25	0.25 (S)	2.00/32.00	1.00 (I)	0.25/0.25	0.19 (S)	1.00/16.00	1.00 (I)	0.25/0.25	0.25 (S)	0.50/32.00	0.75 (I)

DPDS, diphenyl diselenide; EBS, ebselen; AMB, amphotericin B; ITC, itraconazole; VRC, voriconazole; CAS, caspofungin; MIC, minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g/mL}$); MEC, minimum effective concentration ($\mu\text{g/mL}$); FICI, fractional inhibitory concentration index; X, FICI interpretation; S, synergism; I, indifference; Fc, *F. chlamydosporum*; Fo, *F. oxysporum*; Fp, *F. proliferatum*; Fs, *F. solani*; Fv, *F. verticillioides*; Fst, *F. sporotrichioides*.

3 MANUSCRITO 1

In vitro synergistic combinations of pentamidine, polymyxin B, tigecycline and tobramycin with antifungal agents against *Fusarium* spp.

Drug synergism against *Fusarium* spp.

Tarcieli Pozzebon Venturini^{1,2/+}, Francieli Chassot^{1,2}, Luana Rossato¹, Jéssica Tairine Keller¹,
Fernanda Baldissera Piasentin¹, Janio Morais Santurio^{1,3}, Sydney Hartz Alves^{1,2}

Running Title: Drug synergism against *Fusarium* spp.

Title: In vitro synergistic combinations of pentamidine, polymyxin B, tigecycline and tobramycin with antifungal agents against *Fusarium* spp.

Authors: Tarcieli Pozzebon Venturini^{1,2/+}, Francieli Chassot^{1,2}, Luana Rossato¹, Jéssica Tairine Keller¹, Fernanda Baldissera Piasentin¹, Janio Morais Santurio^{1,3}, Sydney Hartz Alves^{1,2}

Institutional affiliations:

¹Departamento de Microbiologia e Parasitologia

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

³Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

+ **Corresponding author:** Tarcieli Pozzebon Venturini, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Campus UFSM, Prédio 20, sala 4139, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. Tel.: +55 55 9623 7848. E-mail: tarcieliventurini@gmail.com.

Summary

The genus *Fusarium* is characterized by hyaline filamentous fungi that cause infections predominantly in immunocompromised patients. The remarkable primary resistance to antifungal agents of this genus requires the search for new therapeutic possibilities. This study assessed the in vitro susceptibility of 25 *Fusarium* isolates against antifungal agents (amphotericin B, caspofungin, itraconazole, and voriconazole) and antimicrobials (pentamidine, polymyxin B, tigecycline, and tobramycin) according to the broth microdilution method (M38-A2). The interactions between antifungal and antimicrobial agents were evaluated by the microdilution checkerboard method. Pentamidine and polymyxin B were active against *Fusarium* spp. (MIC ranges = 4-32 and 4-16 µg/mL, respectively). The highest rates of synergism were observed when amphotericin B or voriconazole were combined with tobramycin (80% and 76%, respectively), polymyxin B (76% and 64%), and pentamidine (72% and 68%). The most significant combinations deserve in vivo evaluations in order to verify their potential in the treatment of fusariosis.

Key words: susceptibility; combinations; antimicrobial; antifungal; *Fusarium*.

Financial support: CNPq, CAPES, FAPERGS

INTRODUCTION

Fusarium is an emerging opportunistic fungal pathogen, with a significant increase in cases among immunocompromised patients (Muhammed et al. 2011). Invasive fusariosis is the second most common form of mold mycosis after invasive aspergillosis, and primarily affects patients with hematological malignancies, transplant recipients and those with prolonged neutropenia (Muhammed et al. 2011; Nucci & Anaissie 2007). Furthermore, this infection has high mortality rates (>80%) (Torres & Kontoyiannis 2003). The recommended treatment is amphotericin B deoxycholate, or its lipid formulations. Other options include voriconazole and posaconazole (Muhammed et al. 2011). Nonetheless, the usage of monotherapy for treatment of systemic fusariosis is unsatisfactory due to high rates of resistance against antifungal agents (Nucci & Anaissie 2007). In this regard, combination therapies have been designed in an attempt to overcome antifungal resistance (Johnson et al. 2004). Combinations of antifungal and antibacterial agents have been explored for more prevalent fungi, such as *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., and *Aspergillus* spp.; however, such studies are still limited with respect to therapies against *Fusarium* spp. (Nucci & Anaissie 2007).

Therefore, the aim of this study was to evaluate in vitro combinations of antimicrobial agents (pentamidine, polymyxin B, tigecycline, or tobramycin) with antifungal agents (amphotericin B, caspofungin, itraconazole, or voriconazole) against *Fusarium* spp. The antimicrobial agents were selected according to previous reports of synergism when such drugs were combined with antifungal agents against other fungal genera and the oomycete *Pythium insidiosum* (Afeltra et al. 2002, Chodosh et al. 2000, Jesus et al. 2014, Ku et al. 2010, St-Germain 1990, Zhai et al. 2010).

MATERIALS AND METHODS

Fusarium isolates

Twenty-five clinical isolates of *Fusarium* spp. were tested, including (number of isolates): *F. chlamydosporum* (3), *F. oxysporum* (5), *F. proliferatum* (3), *F. solani* (10), *F. verticillioides* (2), and 2 reference strains *F. solani* ATCC 36031 and *F. sporotrichioides* CBS 41286. The strains were identified by amplifying a DNA fragment encompassing the internal transcribed spacer (ITS) region with the primers ITS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') and ITS4 (5'-CTTCCGTCAATTCCTTTAAG-3') (White et al. 1990). The amplified

fragments were analyzed on a 0.8% agarose gel, followed by purification, and sequencing. These sequences were deposited in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) under the following accession numbers: HQ696899, HQ696900 and HQ696908 for *F. chlamydosporum*; HQ696888, HQ696889, HQ696890, HQ696893 and HQ696894 for *F. oxysporum*; HQ696886, HQ696887 and GQ149771 for *F. proliferatum*; HQ696874, HQ696875, HQ696876, HQ696877, HQ696878, HQ696879, HQ696880, HQ696881, HQ696882, and HQ696883 for *F. solani*; and KR020684 and KR052812 for *F. verticillioides*.

Drugs

The drugs amphotericin B (AMB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), itraconazole (ITC; Frangon of Brazil, Pharmaceutical, Ltd., São Paulo, Brazil), voriconazole (VRC; Pfizer, New York, USA), and tigecycline (TGC; Pfizer) were diluted in dimethylsulfoxide to create stock solutions. Caspofungin (CAS; Merck, Darmstadt, Germany), pentamidine (PNT; Sigma-Aldrich), polymyxin B (PMB; Sigma-Aldrich), and tobramycin (TOB; Sigma-Aldrich) were diluted in sterile distilled water to prepare stock solutions. The tested concentration ($\mu\text{g/mL}$) ranged from 0.06 to 8 for AMB; 0.25 to 32 for CAS and PNT; 0.125 to 16 for ITC, VRC, PMB, and TGC; and 0.5 to 64 for TOB.

In vitro susceptibility and drug interaction tests

The minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimal effective concentrations (MECs) were determined using the broth microdilution technique in RPMI 1640 medium according to the protocol outlined in document M38-A2 (CLSI 2008). For all the drugs except for CAS, visual reading of the MICs was performed when there was a 100% growth inhibition compared to positive control following 48 h of incubation at 35°C. For CAS, the readings were determined in MECs, i.e., the minimal drug concentrations producing small, stubby, highly branched hyphae (CLSI 2008). *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258, and *Aspergillus flavus* ATCC 204304 were used as quality control strains. The effects of interactions between antifungal and antimicrobial drugs were evaluated using the microdilution checkerboard method by determination of the fractional inhibitory concentration index (FICI) (Moody 2007). The concentrations of antifungal and antimicrobial agents used in combination tests were obtained from single-agent susceptibility testing performed previously. The inoculum was prepared according to M38-A2 (CLSI 2008). To interpret the synergism between tested drugs, we used the lowest FICI from all non-turbid wells along the turbidity/non-turbidity interface after 48 h incubation at 35°C (Moody 2007).

Interpretations for FICI values were defined as follows: ≤ 0.5 synergism, > 0.5 and ≤ 4 indifference, and > 4 antagonism (Moody 2007). All tests were performed in triplicates.

RESULTS

In vitro susceptibility of the 25 *Fusarium* isolates to the antifungal and antimicrobial agents is shown in Table 1. AMB showed greater activity against *Fusarium* spp. compared to the other antifungals. Considering the susceptibility of the 25 isolates to AMB, 28% showed MIC ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$, 28% displayed MIC = 2 $\mu\text{g/mL}$, and 44% presented MIC ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$. With VRC, was observed that 4% of the isolates showed MIC ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$, 8% showed MIC = 2 $\mu\text{g/mL}$, and 88% exhibited MIC ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$. The highest MICs for AMB and VRC were observed for *F. verticillioides* and *F. solani*, and lower MICs were observed for the other species (*F. chlamydosporum*, *F. proliferatum*, and *F. sporotrichioides*). Moreover, ITC and CAS exhibited no activity to 100% of the isolates (Table 1).

Among the antimicrobial agents, PNT and PMB were active against *Fusarium* spp. in MICs ranging from 4 to 32 $\mu\text{g/mL}$, and from 4 to 16 $\mu\text{g/mL}$, respectively. *F. solani* required the greatest MICs for both antimicrobials, while other species (*F. chlamydosporum*, *F. proliferatum*, and *F. sporotrichioides*) required the lowest MICs. In contrast, TGC and TOB showed no activity against *Fusarium* spp. at the tested concentrations (Table 1).

All combinations of antimicrobials with AMB or VRC resulted in synergistic interactions. The most synergistic combinations were (percentage of synergisms): AMB + TOB (80%), VRC + TOB (76%), AMB + PMB (76%), VRC + PMB (64%), AMB + PNT (72%) and VRC + PNT (68%). Combinations with TGC resulted in lower rates of synergisms (Table 2).

Combinations with CAS demonstrated the lowest rates of synergism: CAS + PMB (24%), CAS + TOB (20%), and CAS + PNT (12%). All combinations with ITC resulted in indifferent interactions for 100% of the isolates. Antagonistic interactions were not observed for any of the combinations (Table 2).

The concentrations of antimicrobial agents in synergistic combinations showed the following variations: 0.25 to 8 $\mu\text{g/mL}$ for PNT, 0.25 to 4 $\mu\text{g/mL}$ for PMB, 2 to 8 $\mu\text{g/mL}$ for TGC, and 4 to 32 $\mu\text{g/mL}$ for TOB.

DISCUSSION

These findings confirmed previously described resistance profile of *Fusarium* towards antifungal agents (Guarro 2013, Muhammed et al. 2011, Nucci & Anaissie 2007). The document M38-A2 (CLSI 2008) reports the MIC or MEC breakpoints for in vitro susceptibility testing of mold species against AMB, CAS, ITC, and VRC. Based on these findings, isolates are classified as susceptible (MEC or MIC \leq 1 $\mu\text{g/mL}$), intermediate (MIC or MEC = 2 $\mu\text{g/mL}$) and resistant (MIC or MEC \geq 4 $\mu\text{g/mL}$). In the present study, we observed that most of the isolates showed intermediate or complete resistance to AMB and VRC. In addition, remarkable resistance was shown against ITC and CAS. Despite those breakpoints, the clinical relevance remains uncertain. On the other hand, clinical resistance to AMB has been associated with MIC $>$ 2 $\mu\text{g/mL}$ (Espinel-Ingroff 2008).

In addition, we observed that the highest MICs for AMB and VRC were required for *F. verticillioides* and *F. solani*, while *F. oxysporum* isolates required lower MICs for VRC. These data are in agreement with other studies reporting that *F. solani* and *F. verticillioides* are generally resistant to azoles and exhibit greater MICs for AMB than other species. In contrast, *F. oxysporum* may be more susceptible to VRC (Nucci & Anaissie 2007).

Among the antimicrobial agents studied, PNT demonstrated activity against *Fusarium* spp. Lionakis et al. (2003) evaluated the activity of PNT against *Fusarium* spp. and reported similar MIC ranges: 8-32 $\mu\text{g/mL}$ for *F. solani*, and 4-8 $\mu\text{g/mL}$ for non-*F. solani*. This drug reached plasma concentrations from 0.5 to 3.2 $\mu\text{g/mL}$, but its concentrations in peripheral tissues were higher: 56 $\mu\text{g/g}$ in lungs, 123 $\mu\text{g/g}$ in kidneys, 300 $\mu\text{g/g}$ in the liver and 368 $\mu\text{g/g}$ in the spleen (Bernard et al. 1985). Here, we report MICs for PNT, which are smaller than the tissue concentration of the drug.

PMB also showed activity against *Fusarium* spp., and the observed MIC range was compatible with their serum concentrations (6.25 to 50 $\mu\text{g/mL}$) (Sarria et al. 2004). Other authors have reported the in vitro activity of PMB to *Cryptococcus neoformans* (8 $\mu\text{g/mL}$), *Candida* spp. (32 to 256 $\mu\text{g/mL}$) and *Rhizopus oryzae* (32 $\mu\text{g/mL}$) (Zhai et al. 2010). However, this activity has not been described for *Fusarium* spp.

TOB and TGC did not show activity in the concentration range tested. Some authors have reported potent activity of TGC against biofilms of *C. albicans* (128 $\mu\text{g/mL}$) (Ku et al. 2010) and *Pythium insidiosum* (0.25 to 4 $\mu\text{g/mL}$) (Jesus et al. 2014). Against *Fusarium* spp, TOB was classified by others as being active, showing MICs of \sim 500 $\mu\text{g/mL}$ (Chodosh et al. 2000, Day et al. 2009). In this study, we tested lower concentrations of this drug, i.e., closer to

the plasma concentrations (Beringer et al. 2000, Rodvold et al. 2006), and no antifungal activity was detected.

The combinations with PNT showed strong synergism with AMB and VRC. Other studies also demonstrated synergism when PNT was combined with ketoconazole or AMB against *Candida albicans* (St-Germain 1990) or *Scedosporium prolificans* (Afeltra et al. 2002). Several mechanisms of action have been proposed, such as inhibition of DNA, RNA, phospholipids, and protein synthesis (Sands et al. 1985). Synergistic relations were also observed for AMB + TGC and VRC + TGC. TGC is a glycylycylcline with a structure similar to that of tetracyclines, and acts to inhibit protein synthesis (Pankey 2005). Synergistic interactions were reported for AMB + TGC and azoles + TGC against *Pythium insidiosum* (Jesus et al. 2014). The synergism that we observed between AMB or VRC combined with PNT or TGC can be explained by the same mechanism that underlies the synergism between AMB + azithromycin, i.e., antifungal agent can damage fungal cell membrane, allowing for the entrance of antibacterial agents, thus leading to inhibition of protein synthesis (Clancy & Nguyen 1998).

PMB also showed synergistic interactions with AMB and VRC. This antimicrobial agent is a cationic heptapeptide with a hydrophobic tail, and has bactericidal activity (Zhai et al. 2010). Based on the activity of PMB against bacteria, Zhai et al. (2010) hypothesized that its antifungal effect is mediated by its attachment to anionic lipids of the fungal membrane, and facilitating membrane, rupture. The presence of sterols in the eukaryotic membrane inhibits the insertion of cationic peptides into anionic structures on the fungal membrane, minimizing the formation of pores (Mason et al. 2007). Due to the previous ergosterol reduction promoted by azoles, the action of PMB potentiates antifungal activity (Zhai et al. 2010). We hypothesize that PMB could also act in a similar manner when combined with AMB, as it can also interact with the ergosterol membrane.

Furthermore, TOB demonstrated potent antifungal activity when combined with AMB or VRC. A patient *F. oxysporum*-induced keratitis showed clinical improvement after treatment with TOB and topical natamycin (Chodosh et al. 2000). According to Dalhoff (1987), aminoglycosides can increase permeability of the cell wall and cell membrane of fungi. This observation may explain the synergistic interactions observed in our study.

As it has been already discussed, different species of *Fusarium* may have different patterns of susceptibility. Since *F. solani*, *F. oxysporum*, and *F. verticillioides* are the most prevalent species in immunocompromised patients (Nucci M, Anaissie, 2007), it is important to emphasize that the most effective combinations for these species were VRC + TOB for *F.*

solani and *F. oxysporum*; AMB or VRC + PNT or PMB or TOB for *F. verticillioides*. In these combinations, the concentrations of the antimicrobials agents were consistent with the clinically achievable serum or tissue concentrations.

Our results suggest that combinations of AMB or VRC with the antimicrobials agents tested here warrants further studies in vivo. Our in vitro results are a preview of the effects of antifungal and antimicrobial drugs when used in combination against a pathogen. Although in vitro studies have limitations, they are necessary for the development of valid hypotheses regarding new treatments. The antimicrobials that we tested in this study are frequently used as a prophylactics well as a treatment for immunocompromised patients, and have a strong record of clinical safety. Therefore, they are promising candidates for new studies on combination treatments of fusariosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by the National Council for Scientific and Technological Development – (CNPq; process #470229/2012-8) and by CAPES (Higher Education Personnel Training Coordination, Brazil).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

Afeltra J, Dannaoui E, Meis JFGM, Rodriguez-Tudela JL, Verweij PE, Eurofung Network 2002. In vitro synergistic interaction between amphotericin B and pentamidine against *Scedosporium prolificans*. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 3323-3326.

Beringer PM, Vinks AATMM, Jelliffe RW, Shapiro BJ 2000. Pharmacokinetics of tobramycin in adults with cystic fibrosis: implications for once-daily administration. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 809-813.

Bernard EM, Donnelly HJ, Maher MP, Armstrong D 1985. Use of a new bioassay to study pentamidine pharmacokinetics. *J Infect Dis* 152: 750-754.

Chodosh J, Miller D, Tu EY, Culbertson WW 2000. Tobramycin-responsive *Fusarium oxysporum* keratitis. *Can J Ophthalmol* 35: 29-30.

Clancy CJ, Nguyen MH 1998. The combination of amphotericin B and azithromycin as a potential new therapeutic approach to fusariosis. *J Antimicrob Chemother* 41: 127-130.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute 2008. M38-A2. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A2*, 2nd ed., Wayne.

Dalhoff A 1987. Pleiotropic actions of aminoglycosides. *Antibiot Chemother* 39: 182-204.

Day S, Lalitha P, Haug S, Fothergill AW, Cevallos V, Vijayakumar R, Prajna NV, Acharya NR, McLeod SD, Lietman TM 2009. Activity of antibiotics against *Fusarium* and *Aspergillus*. *Br J Ophthalmol* 93: 116-119.

Espinel-Ingroff A 2008. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. *Rev Iberoam Micol* 25: 101-106.

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: 1491-1500.

Jesus FP, Ferreiro L, Loreto ÉS, Pilotto MB, Ludwig A, Bizzi K, Tondolo JS, Zanette RA, Alves SH, Santurio JM 2014. In vitro synergism obtained by azithromycin, clarithromycin, minocycline or tigecycline associates with antifungal agents against *Pythium insidiosum*. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 5621-5625.

Johnson MD, Macdougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH 2004. Combination Antifungal Therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 693-715.

Ku TSN, Palanisamy SKA, Lee SA 2010. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms to azithromycin, tigecycline and vancomycin and the interaction between tigecycline and antifungals. *Int J Antimicrob Agents* 36: 441-446.

Lionakis MS, Lewis RE, Samonis G, Kontoyiannis DP 2003. Pentamidine is active in vitro against *Fusarium* species. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 3252-3259.

Mason AJ, Marquette A, Bechinger B 2007. Zwitterionic phospholipids and sterols modulate antimicrobial peptide-induced membrane destabilization. *Biophys J* 93: 4289-4299.

Moody J 2007. Synergism Testing: Broth Microdilution Checkerboard and Broth Macrodilution Methods. In LS Garcia, HD Isenberg (eds), *Clinical microbiology procedures handbook*, ASM Press, Washington, p. 1-23.

Muhammed M, Coleman JJ, Carneiro HA, Mylonakis E 2011. The challenge of managing fusariosis. *Virulence* 2: 91-96.

Nucci M, Anaissie E 2007. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 20: 695-704.

Pankey GA 2005. Tigecycline. *J Antimicrob Chemother* 56: 470-480.

Rodvold KA, Gotfried MH, Cwik M, Korth-Bradley JM, Dukart G, Ellis-Grosse EJ 2006. Serum, tissue and body fluid concentrations of tigecycline after a single 100 mg dose. *J Antimicrob Chemother* 58: 1221-1229.

Sands M, Kron MA, Brown RB 1985. Pentamidine: a review. *Rev Infect Dis* 7: 625-634.

Sarria JC, Angulo-Pernett F, Kimbrough RC, McVay CS, Vidal AM 2004. Use of intravenous polymyxin B during continuous venovenous hemodialysis. *Eur J Clin Microbiol Infec Dis* 23: 340-341.

St-Germain G 1990. Effects of pentamidine alone and in combination with ketoconazole or itraconazole on the growth of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 2304-2306.

Torres HA, Kontoyiannis DP 2003. Hyalohyphomycoses. In WE Dismukes, PG Pappas, JD Sobel (eds), *Oxford textbook of clinical mycology*, Oxford University Press, New York, p. 252-270.

White TJ, Burns T, Lee S, Taylor JW 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky, TJ White (eds.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, p. 315-322.

Zhai B, Zhou H, Yang L, Zhang J, Jung K, Giam CZ, Xiang X, Lin X 2010. Polymyxin B, in combination with fluconazole, exerts a potent fungicidal effect. *J Antimicrob Chemother* 65: 931-938.

Table 1. In vitro susceptibility of *Fusarium* spp. to antifungal and antimicrobial agents.

<i>Fusarium</i> spp. (n)	Antimicrobial agents				Antifungal agents			
	MIC range (GM) MIC 90				MEC			
	PNT	PMB	TGC	TOB	AMB	ITC	VRC	CAS
<i>F. oxysporum</i> (n= 5)	8 (8) 8	8-16 (12.1) 16	>16	>64	0.5-4 (2) 4	>16	4-8 (5.3) 8	>32
<i>F. solani</i> (n= 11)	16-32 (24.9) 32	8-16 (13.2) 16	>16	>64	1-8 (2.7) 4	>16	4-16 (8) 16	>32
<i>F. verticillioides</i> (n= 2)	16 (16) 16	8-16 (11.3) 16	>16	>64	4-8 (5.7) 8	>16	8-16 (11.3) 16	>32
Other species (n= 7)	4-8 (5.4) 8	4-16 (8.8) 16	>16	>64	0.25-4 (1) 2	>16	1-8 (3.3) 8	>32
Total (n= 25)	4-32(12.5) 32	4-16(11.5)16	>16	>64	0.25-8(2.06) 4	>16	1-16(5.9)16	>32

PNT, pentamidine; PMB, polymyxin B; TGC, tigecycline; TOB, tobramycin; AMB, amphotericin B; ITC, itraconazole; VRC, voriconazole; CAS, caspofungin; MIC range, minimal inhibitory concentration range ($\mu\text{g/mL}$); MEC range, minimum effective concentration range ($\mu\text{g/mL}$); GM, geometric mean; MIC90, minimal inhibitory concentration to inhibit the growth of 90% of isolates.

Table 2. In vitro combinations of antifungal and antimicrobial agents against the 25 *Fusarium* isolates.

<i>Fusarium</i> spp. (n)	Antifungal agents	Antimicrobial agents											
		PNT			PMB			TGC			TOB		
		%S	%I	FICI range	%S	%I	FICI range	%S	%I	FICI range	%S	%I	FICI range
<i>F. oxysporum</i> (5)	AMB	80.0	20.0	0.28-1.25	80.0	20.0	0.25-0.75	40.0	60.0	0.38-1.00	80.0	20.0	0.13-0.75
<i>F. solani</i> (11)	AMB	54.5	45.5	0.16-1.02	63.6	36.4	0.16-0.75	18.2	81.8	0.38-4.00	63.6	36.4	0.16-0.75
<i>F. verticillioides</i> (2)	AMB	100	0	0.27-0.50	100	0	0.25-0.38	0	100	1.25	100	0	0.25-0.38
Other species (7)	AMB	85.7	14.3	0.19-0.53	85.7	14.3	0.12-0.75	57.1	42.9	0.38-4.00	100	0	0.16-0.38
Total (25)	AMB	72.0	28.0	0.16-1.25	76.0	24.0	0.12-0.75	32.0	68.0	0.38-4.00	80.0	20.0	0.13-0.75
<i>F. oxysporum</i> (5)	CAS	0	100	1.50	0	100	1.00-1.50	0	100	2.00	0	100	2.00
<i>F. solani</i> (11)	CAS	0	100	1.50-2.50	0	100	1.00-1.50	0	100	2.00	0	100	2.00
<i>F. verticillioides</i> (2)	CAS	0	100	1.50	0	100	1.50-2.00	0	100	2.00	0	100	2.00
Other species (7)	CAS	42.8	57.2	0.50-1.50	85.7	14.3	0.38-1.50	0	100	1.50-2.00	71.4	28.6	0.38-2.00
Total (25)	CAS	12.0	88.0	0.50-2.50	24.0	76.0	0.38-2.00	0	100	1.50-2.00	20.0	80.0	0.38-2.00
<i>F. oxysporum</i> (5)	ITC	0	100	1.50-2.50	0	100	1.00-1.50	0	100	2.00	0	100	2.00
<i>F. solani</i> (11)	ITC	0	100	1.50-2.50	0	100	1.00-1.50	0	100	2.50	0	100	2.00
<i>F. verticillioides</i> (2)	ITC	0	100	1.50	0	100	1.50-2.50	0	100	2.00	0	100	2.00
Other species (7)	ITC	0	100	1.50-2.50	0	100	1.00-1.50	0	100	2.00	0	100	2.00
Total (25)	ITC	0	100	1.50-2.50	0	100	1.00-2.50	0	100	2.00-2.50	0	100	2.00
<i>F. oxysporum</i> (5)	VRC	40.0	60.0	0.28-1.03	80.0	20.0	0.38-0.62	60.0	40.0	0.31-0.75	100	0	0.25-0.50
<i>F. solani</i> (11)	VRC	63.6	36.4	0.19-1.12	54.5	45.5	0.25-1.50	45.4	54.6	0.19-1.00	72.7	27.3	0.19-0.75
<i>F. verticillioides</i> (2)	VRC	100	0	0.27	100	0	0.38	0	100	0.75	100	0	0.25-0.38
Other species (7)	VRC	85.7	14.3	0.13-0.56	57.1	42.9	0.25-1.00	71.4	28.6	0.25-0.75	57.1	42.9	0.31-0.75
Total (25)	VRC	68.0	32.0	0.13-1.12	64.0	36.0	0.25-1.50	52.0	48.0	0.19-1.00	76.0	24.0	0.19-0.75

AMB, amphotericin B; CAS, caspofungin; ITC, itraconazole; VRC, voriconazole; PNT, pentamidine; PMB, polymyxin B; TGC, tigecycline; TOB, tobramycin; %S, percentage of synergisms; %I, percentage of indifference; FICI range, fractional inhibitory concentration index range.

4 MANUSCRITO 2

***In vitro* synergism obtained by amiodarone, doxycycline or moxifloxacin
combined with antifungal agents against *Fusarium* spp.**

Synergisms between nonantifungal and antifungal agents against *Fusarium* spp.

Tarcieli Pozzebon Venturini¹, Francieli Chassot¹, Luana Rossato¹, Jéssica Tairine Keller³,
Carla Weiblen², Janio Morais Santurio^{2,3}, Sydney Hartz Alves^{1,3}

Full title: *In vitro* synergism obtained by amiodarone, doxycycline or moxifloxacin combined with antifungal agents against *Fusarium* spp.

Running Title: Synergisms between nonantifungal and antifungal agents against *Fusarium* spp.

Authors: Tarcieli Pozzebon Venturini¹, Francieli Chassot¹, Luana Rossato¹, Jéssica Tairine Keller³, Carla Weiblen², Janio Morais Santurio^{2,3}, Sydney Hartz Alves^{1,3}

Affiliations:

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

³Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

***Address for correspondence:** Tarcieli Pozzebon Venturini, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Campus UFSM, Prédio 20, sala 4139, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. Tel.: +55 55 9623 7848. E-mail: tarcieliventurini@gmail.com.

Abstract

The remarkable resistance of *Fusarium* spp. to most antifungal agents results in high mortality rates in immunocompromised patients. In order to overcome the problem of fungal resistance, new antifungal agents or more effective antifungal combinations are required. In this study, we evaluated the susceptibility of 25 clinical isolates of *Fusarium* spp. to classic antifungals (amphotericin B [AMB], itraconazole [ITC], voriconazole [VRC] and caspofungin [CAS]) and to nonantifungal agents (amiodarone [AMD], doxycycline [DOX] and moxifloxacin [MXF]) through broth microdilution method (M38-A2, CLSI 2008). The combinations between these antifungal plus nonantifungal agents were also evaluated for the determination of FICI (fractional inhibitory concentration index) through the checkerboard technique. The MIC ranges ($\mu\text{g/ml}$) observed were: 0.25 to 8 for AMB; 1 to 16 for VRC; >16 for ITC, DOX and MXF; and >8 for AMD. We observed MECs >32 $\mu\text{g/ml}$ for CAS. Synergistic interactions were observed for the following combinations (% of synergisms): AMD + VRC (76%), MXF + AMB (72%), AMD + AMB (64%), MXF + VRC (60%), DOX + VRC (52%), DOX + AMB (48%) e AMD + CAS (24%). Synergisms were not observed for associations with itraconazole and antagonistic interactions were not evident to any combination either. Our findings suggest that the combinations of AMD, DOX or MXF with AMB or VRC showed potential for future *in vivo* investigations through experimental models for treatment of fusariosis.

Keywords: synergisms; amiodarone; doxycycline; moxifloxacin; antifungal agents; *Fusarium* spp.

1. Introduction

Fusarium species are ubiquitous fungi that cause a wide range of infections in humans, including superficial, locally invasive, and disseminated infections (Nucci and Anaissie, 2007). Although it is considered a rare infection, disseminated fusariosis is the second most prevalent cause of invasive infections by filamentous fungi, after aspergillosis, in immunocompromised patients (Muhammed et al., 2011; Nucci and Anaissie, 2007). According to a recent guideline, amphotericin B and voriconazole are the agents of choice for the treatment of fusariosis (Tortorano et al., 2014). Nevertheless, disseminated fusariosis remains a severe infection, refractory to treatment with a high mortality rate (Guarro, 2013). In this context, new treatment options should be investigated in order to overcome the *Fusarium* genus resistance to most conventional antifungal agents (Al-Hatmi et al., 2015).

According to Afeltra and Verweij (2003), the term "nonantifungal" is taken to include a variety of compounds used in the treatment of nonfungal infections, or other noninfectious pathological conditions, but which have demonstrated activity against fungi. The potential of these drugs for the treatment of fungal infections has been investigated, using the drugs alone or in combination with classic antifungal agents. Accordingly, many classes of nonantifungal drugs have been explored, such as the antibacterial and antiarrhythmics agents (Afeltra and Verweij, 2003). Many studies have reported the antifungal activity of doxycycline (Miceli et al., 2009), moxifloxacin (Day et al., 2009; Kawakami et al., 2015; Ozdek et al., 2006) or amiodarone (Courchesne, 2002; Peña et al., 2009), or their synergistic interactions with antifungal agents against yeast and filamentous fungi (Afeltra et al., 2004; Bagar and Bencina, 2012; Courchesne et al., 2009; Deren et al., 2010; El-Azizi, 2007; Fiori and Van Dijck, 2012; Gamarra et al., 2010; Guo et al., 2008; Hughes et al., 1984; Miceli et al., 2009; Oliver et al., 2008; Stergiopoulou et al., 2009; Yalçın et al., 2010).

Different mechanisms of action of antifungal drugs are important for their synergistic action in combating fungal drug resistance (Bagar and Bencina, 2012). Tetracyclines, such as doxycycline, have antibacterial activity through changes in protein synthesis. Moreover, these antibiotics may also change the protein synthesis of eukaryotic cells (Chopra and Roberts, 2001). The fluoroquinolones interfere with bacterial DNA synthesis by acting on topoisomerase II and IV (Van Bambeke et al., 2005). Shen et al. (1992) reported that pathogenic fungi have high levels of topoisomerase I and II. Meanwhile, amiodarone exerts its antifungal effect mainly for causing a massive increase in cytoplasmic calcium levels (Bagar and Bencina, 2012). In this line of thought, we elected nonantifungal drugs (amiodarone, doxycycline and moxifloxacin) with different mechanisms of action and

evaluated the antifungal activity of these drugs against *Fusarium* spp., through the broth microdilution method. In addition, we tested the combinations of these nonantifungal agents with amphotericin B, itraconazole, voriconazole or caspofungin, through the checkerboard technique.

2. Material and methods

The 25 clinical isolates of *Fusarium* spp. used in this study belong to the Department of Microbiology and Parasitology at the Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. They were isolated from blood cultures, tissue biopsies, cornea, bronchoalveolar lavage, and sediment of dialysate obtained from continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). Molecular analyses were performed to confirm the identity of the isolates. DNA extraction was performed according to the methodology described by Möller et al. (1992) and modified by Klassen et al. (1996). A DNA fragment covering an internal transcribed spacer (ITS) was amplified through PCR using the primers ITS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') and ITS4 (5'-CTTCCGTCAATTCCTTTAAG-3') (White et al., 1990). The PCR products were purified and sequenced. These sequences were registered in the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) with the following access numbers: HQ696899, HQ696900, and HQ696908 for *F. chlamydosporum*; HQ696888, HQ696889, HQ696890, HQ696893, and HQ696894 for *F. oxysporum*; HQ696886, HQ696887, and GQ149771 for *F. proliferatum*; HQ696874, HQ696875, HQ696876, HQ696877, HQ696878, HQ696879, HQ696880, HQ696881, HQ696882, and HQ696883 for *F. solani*; and KR020684 and KR052812 for *F. verticillioides*. *F. solani* ATCC 36031 and *F. sporotrichioides* CBS41286 were also included in the study.

Amphotericin B (AMB; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), itraconazole (ITC; Frangon of Brazil Pharmaceutical Ltd., São Paulo, Brazil), voriconazole (VRC; Pfizer, New York, USA) and amiodarone (AMD; Sigma-Aldrich) were obtained commercially and diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich) to get the stock solutions, while caspofungin (CAS; Merck, Darmstadt, Germany), doxycycline (DOX; Sigma-Aldrich) and moxifloxacin (MXF; Bayer AG, Leverkusen, Germany) were diluted in sterile distilled water. The working solutions were prepared in RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) broth according to the document M38-A2 (CLSI, 2008). The concentrations tested for the agents were: 0.06 to 8 µg/ml for AMB and AMD; 0.12 to 16 µg/ml for ITC, VRC, DOX and MXF; and 0.25 to 32 µg/ml for CAS. The concentration ranges tested for nonantifungal agents were selected according to

their plasmatic concentrations based on previous studies (Esposito et al., 2006; Kowey et al., 1997; Perdue and Standiford, 1999).

The determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) or minimum effective concentrations (MECs) for the agents alone was carried out through the broth microdilution technique, according to the document M38-A2 for non-dermatophyte species (CLSI, 2008). *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, and *Aspergillus flavus* ATCC 204304 were included in the tests as quality controls. The inocula of *Fusarium* spp. were prepared to obtain a final concentration of 0.4×10^4 to 5×10^4 colony forming units (CFU)/ml. These conidial suspensions were measured with a spectrophotometer ($\lambda = 530$ nm, optical density = 0.15 to 0.17) and diluted in RPMI 1640 broth (1:50) (CLSI, 2008).

The interaction between the agents was evaluated through the microdilution checkerboard method (Moody, 2007). The evaluated combinations were: AMD + AMB, AMD + CAS, AMD + ITC, AMD + VRC, DOX + AMB, DOX + CAS, DOX + ITC, DOX + VRC, MXF + AMB, MXF + CAS, MXF + ITC, and MXF + VRC. The fractional inhibitory concentration (FIC) was calculated for each agent, dividing the MIC or MEC of the agent in combination by the MIC or MEC of the isolate agent. The FIC values were summed to determine the resulting fractional inhibitory concentration index (FICI). All readings were performed after 48 hours of incubation at 35°C. Off-scale MICs were converted to the next higher dilution for calculation purposes (e.g., >32 = 64 µg/ml). The interpretation of the FICI values was: $FICI \leq 0.5$, synergism; $0.5 < FICI \leq 4$, indifferent; and $FICI > 4$, antagonism (Moody, 2007).

3. Results

MIC ranges (geometric means, in µg/ml) for the agents alone were: 0.25 to 8 (2.1) for AMB; 1 to 16 (5.9) for VRC; >16 (>16) for ITC, DOX and MFX; and >8 (>8) for AMD. For CAS we observed MECs >32 µg/ml. The values of MIC₉₀ (minimal inhibitory concentration to inhibit the growth of 90% of isolates) for AMB and VRC were 4 and 16 µg/ml, respectively. *F. verticillioides* and *F. solani* had higher MICs for AMB and VRC.

MICs or MECs of the nonantifungal agents in combination with AMB, CAS, ITC or VRC, as well as the FICI values, are presented in Tables 1 and 2. MIC or MEC ranges (geometric means, in µg/ml) in combinations were: 0.12-2 (0.44)/0.06-2 (0.57) for AMD/AMB, 0.5-8 (4.11)/8-32 (24.93) for AMD/CAS, 4-16 (12.82)/16-32 (26.35) for AMD/ITC, 0.06-2 (0.26)/0.12-4 (1.25) for AMD/VRC, 1-8 (3.39)/0.06-4 (0.70) for DOX/

AMB, 4-32 (15.56)/32-64 (43.41) for DOX/CAS, 8-32 (27.10)/16-32 (27.86) for DOX/ITC, 0.5-8 (5.28)/0.25-8 (1.84) for DOX/VRC, 0.5-4 (1.25)/0.06-4 (0.48) for MXF/AMB, 8-32 (27.86)/ 32-64 (57.28) for MXF/CAS, 8-32 (27.10)/8-32 (27.10) for MXF/ITC, and 0.5-4 (1.74)/ 0.25-8 (1.69) for MXF/VRC.

Synergistic interactions (% of synergisms) were observed for the following combinations: AMD + VRC (76%), MXF + AMB (72%), AMD + AMB (64%), MXF + VRC (60%), DOX + VRC (52%), DOX + AMB (48%) and AMD + CAS (24%). All the combinations with itraconazole resulted in indifferent interactions. Antagonistic interactions were not observed for none of the combinations tested.

4. Discussion

The genus *Fusarium* shows a typical profile of resistance to most antifungal agents (Muhammed et al., 2011; Nucci and Anaissie, 2007). In general, *Fusarium* species are resistant to echinocandins and to older azole antifungals, and have variable resistance to triazoles and AMB (Muhammed et al., 2011). Here, AMB showed the highest antifungal activity against *Fusarium* spp., followed by VRC. However, high MIC values for these antifungal were observed. AMB and VRC are the drugs of choice for the treatment of fusariosis (Tortorano et al., 2014), although the treatment of disseminated fusariosis in immunocompromised patients remains a challenge due to treatment failure (Guarro, 2013; Muhammed et al., 2011).

In this context, new antifungal agents targeting different molecular pathways are necessary (Bagar and Bencina, 2012). Many nonantifungal agents have activity against fungal pathogens, or yet, they may interact synergistically with classic antifungal agents (Afeltra and Verweij, 2003). In this sense, we evaluated the combinations between AMD, DOX or MXF with AMB, ITC, VRC and CAS against *Fusarium* spp. The greatest synergy was obtained for the combinations of: AMD + VRC (76%), MXF + AMB (72%), AMD + AMB (64%), MXF + VRC (60%), DOX + VRC (52%), DOX + AMB (48%). To the best of our knowledge, this is the first study to test these combinations against *Fusarium* spp.

AMD, a potent antiarrhythmic drug, has shown antifungal activity against a range of fungi, including *Candida*, *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* and *Fusarium* (Courchesne, 2002). No antifungal activity of AMD alone was observed at the concentrations tested. We elected concentrations near the plasmatic concentrations, since in general, drugs that inhibit fungal growth in high concentrations *in vitro*, are considered ineffective *in vivo* (Afeltra and Verweij, 2003). Peña et al. (2009) observed that at very low concentrations,

AMD produced a K^+ efflux in *Saccharomyces cerevisiae*, while at higher concentrations, it also produced an influx of protons, resulting in an increase of external pH and decrease of internal pH. The efflux of K^+ resulted in increased plasma membrane potential difference, which is responsible for the entry of Ca^{2+} e H^+ , for the efflux of anions and for the subsequent changes resulted from the increased cytoplasmic Ca^{2+} concentration, as well as the decrease in internal pH. Similarly, Bagar and Bencina (2012) proposed that AMD binds to plasma membrane of *A. niger*, disrupting Ca^{2+} homeostasis and intracellular acidification.

Previous studies have reported synergistic interactions *in vitro* for AMD combinations and azole antifungals against *C. albicans* resistant to fluconazole, *A. fumigatus* and *A. niger* (Afeltra et al., 2004; Bagar and Bencina, 2012; Gamarra et al., 2010, Guo et al., 2008). Here, we observed high rates of synergism for AMD + VRC (76%). According to Afeltra et al. (2004), drugs that interfere with Ca^{2+} homeostasis result in synergistic interactions with azoles. The main target of azole antifungal agents is the synthesis of ergosterol. The activity of V-ATPase depends on ergosterol. Once the V-ATPase is inhibited, the action of AMD is intensified, ie, there is influx of cytosolic Ca^{2+} and proton sequestration into organelles. Bagar and Bencina (2012) observed an additive effect for the combination of AMD + AMB against *A. niger*. According to these authors, cationic amphiphilic drugs such as AMD and AMB, preferably interact with membranes to exert their biological effects, and both affect the Ca^{2+} homeostasis. AMB raises the cytosolic Ca^{2+} and, when in combination with AMD, the effect is additive. In this study, the combination of AMD + AMB resulted in 64% of synergistic interactions against *Fusarium* spp. Courchesne et al. (2009) showed that AMD targets the fungal cell wall, which in turn leads to Ca^{2+} influx. The proposed mechanism for the combination of CAS + AMB is based on attacking different targets of the fungal cell. Meanwhile, CAS acts on the cell wall, AMB acts in the fungal plasma membrane (Johnson et al., 2004). Thus, the same mechanism could occur for the association between AMD + AMB.

DOX is an antibacterial agent belonging to the class of tetracyclines acting on the inhibition of bacterial protein synthesis by binding to the 30S ribosomal subunit. However, the tetracyclines may also alter protein synthesis in mitochondria of eukaryotic cells (Chopra and Roberts, 2001). Miceli et al. (2009) reported the *in vitro* activity of DOX against *C. albicans* biofilms at very high concentrations (512-2048 $\mu\text{g/ml}$), while Loreto et al. (2011) reported low MICs (0.5-8 $\mu\text{g/ml}$) against oomycetous *Pythium insidiosum*. This study did not observe activity of DOX alone against *Fusarium* spp., but synergistic interactions were showed for combinations of DOX + AMB (48%) or VRC (52%). Other studies have reported *in vitro* synergism for the association of DOX + AMB against *C. albicans*, *C. glabrata*, *C.*

krusei, *C. parapsilosis*, *A. flavus*, *A. fumigatus* and *A. niger* (El-Azizi, 2007; Hughes et al., 1984; Miceli et al., 2009; Oliver et al., 2008), and DOX + fluconazole against *C. albicans* (Fiori and Van Dijck, 2012; Miceli et al., 2009). In general, the synergy mechanism between the AMB plus tetracyclines can be explained by the ability of AMB in forming pores in the fungal plasma membrane, allowing the entry of the antimicrobial agent that can inhibit protein synthesis (Kwan et al., 1972). Oliver et al. (2008) hypothesized that tetracyclines inhibit fungal mitochondrial function. The lack of functional mitochondria alters the sterol metabolism resulting in decreased ergosterol levels. The decrease in ergosterol levels makes the fungal cell more susceptible to AMB. Regarding to mechanism of interaction with azole antifungals, Fiori and Van Dijck (2012) showed that DOX alters iron homeostasis by acting as a chelating agent. Iron deprivation decreases ergosterol content in the cell membrane, providing greater fluidity and allowing passive diffusion of fluconazole through the plasma membrane (Prasad et al., 2006).

Topoisomerase enzyme subtypes are also targets for research on new antifungal agents (Li and Calderone, 2004). The fluoroquinolones carry out their bactericidal activity by acting on DNA gyrase (topoisomerase II) and topoisomerase IV, resulting in inhibition of DNA replication, recombination and transcription (Van Bambeke et al., 2005). Although the fluoroquinolones have no intrinsic antifungal activity, it has been reported that pathogenic fungi have high levels of topoisomerase I and II (Shen et al., 1992). In addition, the fourth-generation fluoroquinolones (such as MXF) shows increased activity on topoisomerase II (Pestova et al., 2000), which enables a potential mechanism of interaction with antifungal agents (Stergiopoulou et al., 2008). Some studies have reported the antifungal activity of MXF or its commercial preparations against *Fusarium* spp. (Ozdek et al., 2006; Kawakami et al., 2015; Day et al., 2009). These studies reported high MICs to MXF against *Fusarium* spp. In the present study, there was no antifungal activity of MXF at the concentrations tested. Previous studies reported that various fluoroquinolones powered *in vitro* antifungal activity against *Candida* spp., *C. neoformans*, *Aspergillus* spp. and *Fusarium* spp. (Deren et al., 2010; Nakajima et al., 1995; Stergiopoulou et al., 2008; Stergiopoulou et al., 2009; Venturini et al., 2011; Yalçın et al., 2010) and also in experimental models of candidiasis and aspergillosis (Nakajima et al., 1995). In this study, combinations of MXF + AMB (72%) or VRC (60%) resulted in high rates of synergisms. Previously, the combinations of ciprofloxacin + AMB (39.1%) or VRC (30.4%) demonstrated lower rates of synergism against *Fusarium* spp. than the combinations with MXF in this study (Venturini et al., 2011). Moreover, Stergiopoulou et al. (2009) observed that ciprofloxacin in combination with antifungal agents was more potent

than the combinations with levofloxacin or MXF against *C. albicans* and *A. fumigatus*. According to Stergiopoulou et al. (2008), it is possible that the antifungal agents alter the fungal cell membrane permeability and thereby increase the intracellular fluoroquinolone levels, which in turn binds to fungal topoisomerase II. But this hypothesis deserves further study (Stergiopoulou et al., 2008). The same authors also observed that low ciprofloxacin concentrations associated with AMB result in synergism, whereas higher ciprofloxacin concentrations result in antagonism (Stergiopoulou et al., 2008). Similarly, we found that low concentrations of MXF power the effects of AMB or VRC in similar concentrations to the study of Stergiopoulou et al. (2008).

Oral systemic doses and peak serum concentrations in humans for each nonantifungal agent are as it follows: AMD, 200 mg and 0.5 to 2.5 µg/ml; DOX, 200 mg and 1.5 to 7 µg/ml; and MFX, 400 mg and 3.2 µg/ml (Esposito et al., 2006; Kowey et al., 1997; Perdue and Standiford, 1999). In this study, the geometric means of the MICs for the nonantifungal agents in combination were: AMD in combination with AMB or VRC, 0.44 and 0.26 µg/ml; DOX in combination with AMB or VRC, 3.39 and 5.28 µg/ml; and MXF in combination with AMB or VRC, 1.25 and 1.74 µg/ml. Therefore, the concentrations observed in this study are compatible with the therapeutic plasma concentrations.

In conclusion, our findings show that AMD, DOX or MXF do not have *in vitro* antifungal activity when tested alone. Moreover, *in vitro* combinations of these agents with AMB or VRC resulted in synergistic interactions against *Fusarium* spp. Based on these findings and previous studies, it is possible that the observed synergisms are the result of the action of AMB or VRC in fungal plasma membrane, which facilitates the entry of nonantifungals, so they can act on a given target of the fungal cell. However, *in vivo* experimental studies are necessary to confirm these findings. Given the clinical safety and the known pharmacology of these agents, we consider that the combinations of AMD, DOX or MXF with AMB or VRC are promising candidates for the treatment of fusariosis.

Acknowledgements

This study was funded by the National Council for Scientific and Technological Development – (CNPq; process #470229/2012-8) and by CAPES (Higher Education Personnel Training Coordination, Brazil).

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest.

References

Afeltra J, Verweij PE. Antifungal activity of nonantifungal drugs. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22:397-407.

Afeltra J, Vitale RG, Mouton JW, Verweij PE. Potent synergistic *in vitro* interaction between nonantimicrobial membrane-active compounds and itraconazole against clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* resistant to itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:1335-43.

Al-Hatmi AM, Meletiadis J, Curfs-Breuker I, Bonifaz A, Meis JF, De Hoog GS. *In vitro* combinations of natamycin with voriconazole, itraconazole and micafungin against clinical *Fusarium* strains causing keratitis. *J Antimicrob Chemother* 2015; doi:10.1093/jac/dkv421.

Bagar T, Bencina M. Antiarrhythmic drug amiodarone displays antifungal activity, induces irregular calcium response and intracellular acidification of *Aspergillus niger* – Amiodarone targets calcium and pH homeostasis of *A. niger*. *Fungal Genet Biol* 2012; 49:779-91.

Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001; 65:232-60.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M38-A2. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi, second ed. Wayne, PA: CLSI; 2008.

Courchesne WE. Characterization of a novel, broad-based fungicidal activity for the antiarrhythmic drug amiodarone. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 300:195-9.

Courchesne WE, Tunc M, Liao S. Amiodarone induces stress responses and calcium flux mediated by the cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can J Microbiol* 2009; 55:288-303.

Day S, Lalitha P, Haug S, Fothergill AW, Cevallos V, Vijayakumar R, et al. Activity of antibiotics against *Fusarium* and *Aspergillus*. *Br J Ophthalmol* 2009; 93:116-9.

Deren YT, S, Ozdek S, Kalkanci A, Akyurek N, Hasanreisoglu B. Comparison of antifungal efficacies of moxifloxacin, liposomal amphotericin B, and combination treatment in experimental *Candida albicans* endophthalmitis in rabbits. *Can J Microbiol* 2010; 56:1-7.

El-Azizi M. Enhancement of the *in vitro* activity of amphotericin B against the biofilms of non-albicans *Candida* spp. by rifampicin and doxycycline. *J Med Microbiol* 2007; 56:645-9.

Esposito S, Noviello S, D'Errico G, Motta G, Passali D, Aimoni C, et al. Concentration of moxifloxacin in plasma and tonsillar tissue after multiple administration in adult patients. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:789-92.

Fiori A, Van Dijck P. Potent synergistic effect of doxycycline with fluconazole against *Candida albicans* is mediated by interference with iron homeostasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:3785-96.

Guarro, J. Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32:1491-500.

Hughes CE, Harris C, Peterson LR, Gerding DN. Enhancement of the *in vitro* activity of amphotericin B against *Aspergillus* spp. by tetracycline analogs. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 26:837-40.

Johnson MD, Macdougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination Antifungal Therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:693-715.

Kawakami H, Inuzuka H, Hori N, Takahashi N, Ishida K, Mochizuki K, et al. Inhibitory effects of antimicrobial agents against *Fusarium* species. *Med Mycol* 2015; 53:603-11.

Klassen GR, Balcerzak M, De Cock AWAM. 5S ribosomal RNA gene spacer as species specific probes for eight species of *Pythium*. *Phytopathol* 1996; 86:581-7.

Kowey PR, Marinchak RA, Rials SJ, Bharucha D. Pharmacologic and pharmacokinetic profile of class III antiarrhythmic drugs. *Am J Cardiol* 1997; 80:16G-23G.

Kwan CN, Medoff G, Kobayashi GS, Schlessinger D, Raskas HJ. Potentiation of the antifungal effects of antibiotics by amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother* 1972; 2:61-5.

Li D, Calderone RA. Antifungal drugs, targets and target discovery. In: San-Blas G, Calderone RA, editors. *Pathogenic fungi: host interactions and emerging strategies for control*. Wymondham, UK: Caister Academic Press; 2004. p. 335-55.

Loreto ES, Mario DA, Denardi LB, Alves SH, Santurio JM. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to macrolides and tetracycline antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother* 2011; 55:3588-90.

Miceli MH, Bernardo SM, Lee AS. *In vitro* analyses of the combination of high-dose doxycycline and antifungal agents against *Candida albicans* biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34:326-32.

Moller EM, Bahnweg G, Sandemann H, Geiger HH. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Res* 1992; 20:6115-6.

Moody J. Synergism Testing: Broth Microdilution Checkerboard and Broth Macrodilution Methods. In: Garcia LS, Isenberg HD, editors. *Clinical microbiology procedures handbook*. Washington: ASM Press; 2007. p. 1-23.

Muhammed M, Coleman JJ, Carneiro HA, Mylonakis E. The challenge of managing fusariosis. *Virulence* 2011; 2:91-6.

Nakajima R, Kitamura A, Someya K, Tanaka M, Sato K. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of DU-6859a, a fluoroquinolone, in combination with amphotericin B and fluconazole against pathogenic fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1517-21.

Nucci M, Anaissie E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20:695-704.

Ozdek SC, Miller D, Flynn PM, Flynn HW. *In vitro* antifungal activity of the fourth generation fluoroquinolones against *Candida* isolates from human ocular infections. *Ocul Immunol Inflamm* 2006; 14:347-51.

Oliver BG, Silver PM, Marie C, Hoot SJ, Leyde SE, White TC. Tetracycline alters drug susceptibility in *Candida albicans* and other pathogenic fungi. *Microbiology* 2008; 154:960-70.

Peña A, Calahorra M, Michel B, Ramirez J, Sanchez NS. Effects of amiodarone on K⁺, internal pH and Ca²⁺ homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 2009; 9:832-48.

Perdue BE, Standiford HC. Tetracyclines. In: Yu VL, Merigan Jr. TC, Barriere SL, editors. *Antimicrobial therapy and vaccines*. Baltimore, Md: Williams & Wilkins; 1999. p. 981-95.

Pestova E, Millichap JJ, Noskin GA, Peterson LR. Intracellular targets of moxifloxacin: a comparison with other fluoroquinolones. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45:583-90.

Prasad T, Chandra A, Mukhopadhyay CK, Prasad R. Unexpected link between iron and drug resistance of *Candida* spp.: iron depletion enhances membrane fluidity and drug diffusion, leading to drug susceptible cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:3597-606.

Shen LL, Baranowski J, Fostel J, Montgomery DA, Lartey PA. DNA topoisomerases from pathogenic fungi: targets for the discovery of antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:2778-84.

Stergiopoulou T, Meletiadiis J, Sein T, Papaioannidou P, Tsiouris I, Roilides E, et al. Isobolographic analysis of pharmacodynamic interactions between antifungal agents and ciprofloxacin against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:2196-204.

Stergiopoulou T, Meletiadiis J, Sein T, Papaioannidou P, Tsiouris I, Roilides E, et al. Comparative pharmacodynamic interaction analysis between ciprofloxacin, moxifloxacin and

levofloxacin and antifungal agents against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. J Antimicrob Chemother 2009; 63:343-8.

Tortorano AM, Richardson M, Roilides E, van Diepeningen A, Caira M, Munoz P, et al. ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. Clin Microbiol Infect 2014; 20:27-46.

Van Bambeke F, Michot JM, Van Eldere J, Tulkens PM. Quinolones in 2005: an update. Clin Microbiol Infect 2005; 11:256-80. (Erratum, 11:513).

Venturini TP, Rossato L, Spader TB, Tronco-Alves GR, Azevedo MI, Weiler CB, et al. *In vitro* synergisms obtained by amphotericin B and voriconazole associated with non-antifungal agents against *Fusarium* spp. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 71:126-30.

White TJ, Burns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York: Academic Press; 1990. p. 315-22.

Yalçın B, Kalkancı A, Gürelik F, Fidan I, Kustimur S, Ozdek S. *In vitro* synergistic effect of moxifloxacin and amphotericin B combination against *Candida* strains. Mikrobiyol Bul 2010; 44:65-70.

Table 1. *In vitro* combinations of nonantifungal agents and amphotericin B or caspofungin against *Fusarium* spp.

Isolate	Combinations											
	AMD/AMB		DOX/AMB		MXF/AMB		AMD/CAS		DOX/CAS		MXF/CAS	
	MICs	FICI (X)	MICs	FICI (X)	MICs	FICI (X)	MECs	FICI (X)	MECs	FICI (X)	MECs	FICI (X)
Fc1	0.12/0.12	0.26 (S)	1.00/0.12	0.28 (S)	1.00/0.06	0.15 (S)	1.00/8.00	0.19 (S)	4.00/32.00	0.62 (I)	16.00/32.00	1.00 (I)
Fc2	0.12/0.12	0.26 (S)	1.00/0.12	0.28 (S)	0.50/0.12	0.27 (S)	1.00/16.00	0.31 (S)	4.00/32.00	0.62 (I)	16.00/32.00	1.00 (I)
Fc3	0.12/0.06	0.25 (S)	1.00/0.06	0.27 (S)	1.00/0.06	0.27 (S)	1.00/8.00	0.19 (S)	8.00/32.00	0.75 (I)	8.00/32.00	0.75 (I)
Fo1	0.50/0.12	0.53 (I)	4.00/0.25	0.63 (I)	0.50/0.06	0.14 (S)	4.00/32.00	0.75 (I)	8.00/32.00	0.75 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)
Fo2	1.00/1.00	0.56 (I)	8.00/1.00	0.75 (I)	0.50/0.25	0.14 (S)	4.00/32.00	0.75 (I)	8.00/32.00	0.75 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)
Fo3	1.00/2.00	0.56 (I)	8.00/2.00	0.75 (I)	1.00/1.00	0.28 (S)	8.00/32.00	1.00 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)
Fo4	0.25/0.50	0.27 (S)	4.00/1.00	0.62 (I)	1.00/0.50	0.28 (S)	8.00/32.00	1.00 (I)	16.00/32.00	1.00 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)
Fo5	0.50/1.00	0.28 (S)	4.00/1.00	0.38 (S)	2.00/0.50	0.19 (S)	4.00/32.00	0.75 (I)	16.00/32.00	1.00 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)
Fp1	0.12/0.50	0.26 (S)	4.00/0.12	0.19 (S)	1.00/0.50	0.28 (S)	2.00/16.00	0.38 (S)	4.00/32.00	0.62 (I)	16.00/32.00	1.00 (I)
Fp2	0.50/0.25	0.16 (S)	4.00/0.25	0.25 (S)	1.00/0.50	0.28 (S)	1.00/16.00	0.31 (S)	4.00/32.00	0.62 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)
Fp3	0.25/0.25	0.27 (S)	2.00/0.25	0.31 (S)	0.50/0.06	0.08 (S)	0.50/8.00	0.16 (S)	8.00/32.00	0.75 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)
Fs1	0.25/0.25	0.14 (S)	4.00/0.50	0.38 (S)	1.00/0.50	0.28 (S)	8.00/32.00	1.00 (I)	16.00/32.00	1.00 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)
Fs2	0.25/0.50	0.27 (S)	8.00/1.00	0.75 (I)	2.00/0.50	0.31 (S)	8.00/32.00	1.00 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)
Fs3	1.00/0.50	0.56 (I)	4.00/0.50	0.62 (I)	1.00/0.25	0.28 (S)	8.00/32.00	1.00 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)
Fs4	1.00/1.00	0.56 (I)	4.00/0.50	0.38 (S)	4.00/1.00	0.62 (I)	4.00/32.00	0.75 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)
Fs5	1.00/2.00	0.56 (I)	4.00/4.00	1.12 (I)	4.00/2.00	0.62 (I)	8.00/32.00	1.00 (I)	16.00/32.00	1.00 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)
Fs6	0.50/1.00	0.28 (S)	8.00/2.00	0.75 (I)	2.00/0.50	0.19 (S)	8.00/32.00	1.00 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)
Fs7	0.50/1.00	0.28 (S)	4.00/2.00	0.62 (I)	1.00/1.00	0.28 (S)	8.00/32.00	1.00 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)
Fs8	2.00/2.00	0.63 (I)	4.00/2.00	0.62 (I)	2.00/2.00	0.56 (I)	4.00/32.00	0.75 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)
Fs9	1.00/0.50	0.56 (I)	2.00/0.50	0.56 (I)	1.00/0.50	0.53 (I)	8.00/32.00	1.00 (I)	16.00/32.00	1.00 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)
Fs10	0.50/1.00	0.28 (S)	4.00/2.00	0.62 (I)	2.00/2.00	0.56 (I)	8.00/32.00	1.00 (I)	16.00/32.00	1.00 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)
Fs11	1.00/1.00	0.19 (S)	8.00/4.00	0.75 (I)	4.00/4.00	0.62 (I)	8.00/32.00	1.00 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)
Fst1	1.00/2.00	0.56 (I)	4.00/1.00	0.38 (S)	2.00/2.00	0.56 (I)	4.00/32.00	0.75 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)
Fv1	0.25/1.00	0.14 (S)	2.00/2.00	0.31 (S)	1.00/1.00	0.16 (S)	8.00/32.00	1.00 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)
Fv2	0.12/1.00	0.26 (S)	1.00/1.00	0.28 (S)	1.00/0.50	0.16 (S)	8.00/32.00	1.00 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)	32.00/64.00	2.00 (I)

AMD, amiodarone; DOX, doxycycline; MXF, moxifloxacin; AMB, amphotericin B; CAS, caspofungin; MIC, minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g/mL}$); MEC, minimum effective concentration ($\mu\text{g/mL}$); FICI, fractional inhibitory concentration index; X, FICI interpretation; S, synergism; I, indifference; Fc, *F. chlamydosporum*; Fo, *F. oxysporum*; Fp, *F. proliferatum*; Fs, *F. solani*; Fst, *F. sporotrichioides*; Fv, *F. verticillioides*.

Table 2. *In vitro* combinations of nonantifungal agents and itraconazole or voriconazole against *Fusarium* spp.

Isolate	Combinations											
	AMD/ITC		DOX/ITC		MXF/ITC		AMD/VRC		DOX/VRC		MXF/VRC	
	MICs	FICI (X)	MICs	FICI (X)	MICs	FICI (X)	MICs	FICI (X)	MICs	FICI (X)	MICs	FICI (X)
Fc1	8.00/16.00	1.00 (I)	8.00/16.00	0.75 (I)	16.00/8.00	0.75 (I)	0.06/0.50	0.13 (S)	1.00/1.00	0.28 (S)	1.00/1.00	0.28 (S)
Fc2	4.00/16.00	0.75 (I)	16.00/16.00	1.00 (I)	16.00/16.00	1.00 (I)	0.12/1.00	0.13 (S)	2.00/1.00	0.19 (S)	2.00/2.00	0.31 (S)
Fc3	8.00/16.00	1.00 (I)	16.00/16.00	1.00 (I)	8.00/16.00	0.75 (I)	0.06/0.25	0.13 (S)	0.50/0.25	0.14 (S)	2.00/0.25	0.19 (S)
Fo1	16.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	1.00/2.00	0.56 (I)	8.00/1.00	0.50 (S)	2.00/0.50	0.19 (S)
Fo2	8.00/16.00	1.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	16.00/16.00	1.00 (I)	0.25/1.00	0.27 (S)	8.00/2.00	0.75 (I)	2.00/0.50	0.19 (S)
Fo3	16.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	0.25/1.00	0.27 (S)	8.00/2.00	0.75 (I)	1.00/1.00	0.28 (S)
Fo4	16.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	1.00/4.00	0.56 (I)	8.00/4.00	0.75 (I)	2.00/1.00	0.19 (S)
Fo5	16.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	0.12/1.00	0.13 (S)	4.00/4.00	0.62 (I)	4.00/1.00	0.25 (S)
Fp1	8.00/16.00	1.00 (I)	16.00/16.00	1.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	0.12/0.12	0.13 (S)	4.00/0.25	0.38 (S)	4.00/0.50	0.62 (I)
Fp2	16.00/32.00	2.00 (I)	16.00/16.00	1.00 (I)	16.00/16.00	1.00 (I)	0.25/0.50	0.14 (S)	4.00/0.50	0.25 (S)	2.00/2.00	0.56 (I)
Fp3	16.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	0.25/2.00	0.27 (S)	8.00/2.00	0.50 (S)	1.00/1.00	0.16 (S)
Fs1	16.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	0.50/1.00	0.16 (S)	8.00/4.00	0.75 (I)	1.00/2.00	0.28 (S)
Fs2	16.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	2.00/4.00	0.62 (I)	8.00/4.00	0.75 (I)	4.00/4.00	0.62 (I)
Fs3	16.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	0.12/0.50	0.13 (S)	8.00/1.00	0.50 (S)	2.00/4.00	1.06 (I)
Fs4	16.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	0.25/2.00	0.27 (S)	8.00/4.00	0.75 (I)	0.50/2.00	0.27 (S)
Fs5	16.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	0.25/4.00	0.27 (S)	4.00/2.00	0.25 (S)	4.00/8.00	0.62 (I)
Fs6	16.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	0.12/2.00	0.26 (S)	8.00/4.00	0.75 (I)	4.00/4.00	0.62 (I)
Fs7	16.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	1.00/4.00	0.56 (I)	8.00/2.00	0.50 (S)	2.00/4.00	0.56 (I)
Fs8	8.00/16.00	1.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	0.12/2.00	0.13 (S)	8.00/8.00	0.75 (I)	1.00/4.00	0.28 (S)
Fs9	16.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	0.12/1.00	0.26 (S)	8.00/2.00	0.75 (I)	4.00/2.00	0.62 (I)
Fs10	16.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	1.00/4.00	0.56 (I)	8.00/4.00	0.75 (I)	2.00/4.00	0.56 (I)
Fs11	16.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	1.00/4.00	0.56 (I)	8.00/4.00	0.75 (I)	1.00/8.00	1.03 (I)
Fst1	16.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	0.25/0.50	0.27 (S)	8.00/0.50	0.50 (S)	0.50/0.50	0.27 (S)
Fv1	8.00/16.00	1.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	0.25/2.00	0.14 (S)	4.00/4.00	0.38 (S)	2.00/4.00	0.31 (S)
Fv2	16.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	32.00/32.00	2.00 (I)	0.12/0.50	0.07 (S)	4.00/2.00	0.38 (S)	1.00/1.00	0.16 (S)

AMD, amiodarone; DOX, doxycycline; MXF, moxifloxacin; ITC, itraconazole; VRC, voriconazole; MIC, minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g/mL}$); FICI, fractional inhibitory concentration index; X, FICI interpretation; S, synergism; I, indifference; Fc, *F. chlamydosporum*; Fo, *F. oxysporum*; Fp, *F. proliferatum*; Fs, *F. solani*; Fst, *F. sporotrichioides*; Fv, *F. verticillioides*.

5 MANUSCRITO 3

Atividade quimiossensibilizante do cinamaldeído, carvacrol e timol combinados com agentes antifúngicos contra isolados clínicos de *Fusarium* spp.

Combinações de fitocompostos com antifúngicos contra *Fusarium* spp.

Tarcieli Pozzebon Venturini¹, Francieli Chassot¹, Luana Rossato¹, Jéssica Tairine Keller³,
Fernanda Baldissera Piasentin¹, Janio Morais Santurio^{2,3}, Sydney Hartz Alves^{1,3}

Título: Atividade quimiossensibilizante do cinamaldeído, carvacrol e timol combinados com agentes antifúngicos contra isolados clínicos de *Fusarium*

Título resumido: Combinações de fitocompostos com antifúngicos contra *Fusarium* spp.

Autores: Tarcieli Pozzebon Venturini¹, Francieli Chassot¹, Luana Rossato¹, Jéssica Tairine Keller³, Fernanda Baldissera Piasentin¹, Janio Morais Santurio^{2,3}, Sydney Hartz Alves^{1,3}

Afiliações:

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

³Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

***Endereço para correspondência:** Tarcieli Pozzebon Venturini, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Campus UFSM, Prédio 20, sala 4139, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. Tel.: +55 55 9623 7848. E-mail: tarcieliventurini@gmail.com.

Palavras-chave: quimiossensibilização; cinamaldeído; carvacrol; timol; agentes antifúngicos; *Fusarium* spp.

5.1 RESUMO

As espécies de *Fusarium* são capazes de causar uma ampla gama de infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos. A fusariose disseminada causa altas taxas de mortalidade em decorrência da resistência deste gênero a maioria dos agentes antifúngicos. Assim, novas opções terapêuticas devem ser consideradas. As plantas e seus metabólitos secundários são importantes fontes para a pesquisa de novos agentes antimicrobianos. Neste estudo, avaliou-se a atividade antifúngica de três fitocompostos (cinamaldeído, CIN; carvacrol, CRV; e timol, THY), bem como, suas atividades quimiossensibilizantes quando combinados com anfotericina B (AMB), caspofungina (CAS), itraconazol (ITC) e voriconazol (VRC), frente a 25 isolados clínicos de *Fusarium*. Utilizou-se as metodologias de microdiluição em caldo (M38-A2) e *checkerboard* para a obtenção das CIMs e ICIFs (índice de concentração inibitória fracionária), respectivamente. As CIMs ($\mu\text{g/mL}$) observadas para os fitocompostos foram: 20-80 para CIN, 40->320 para CRV e 40-320 para THY. De acordo com os ICIFs, as combinações mais eficazes (taxas de sinergismos) foram: THY + CAS (96%), CRV + CAS (88%), THY + AMB (76%), CRV + AMB (68%), THY + VRC (68%) e CRV + VRC (60%). O quimiossensibilizante menos eficaz foi o CIN. Interações antagônicas não foram observadas. Nossos achados sugerem que CRV e THY possuem potente atividade quimiossensibilizante quando combinados com CAS, AMB ou VRC. Entretanto, estes resultados requerem confirmação em estudos experimentais *in vivo* para tratamento de infecções causadas por *Fusarium* spp.

5.2 INTRODUÇÃO

Fusarium spp. são fungos filamentosos hialinos amplamente distribuídos no solo, em plantas e em diferentes substratos orgânicos. Estas espécies são importantes patógenos de plantas, mas também podem causar uma gama de infecções em humanos (NUCCI; ANAÏSSIE, 2007). As manifestações clínicas mais comuns em pacientes imunocompetentes são as onicomicoses, infecções de pele, ceratites, e ocasionalmente, micetomas (KREDICS et al., 2015). Infecções invasivas e disseminadas acometem pacientes imunocomprometidos, sendo que, a forma disseminada parece estar relacionada principalmente a desordens hematológicas (AVELINO-SILVA et al., 2015).

Aproximadamente 70 espécies de *Fusarium* causam infecções em humanos, sendo que, as espécies do complexo *Fusarium solani* (FSSC) são responsáveis por

aproximadamente 60% dos casos de fusariose, enquanto que, espécies do complexo *Fusarium oxysporum* (FOSC) são responsáveis por aproximadamente 20% dos casos (GUARRO, 2013). Este gênero é relativamente resistente a maioria dos antifúngicos, embora diferentes espécies apresentem distintos perfis de suscetibilidade (DALYAN CILO et al., 2015; NUCCI; ANAISSIE, 2007). Atualmente, o tratamento indicado para pacientes imunocomprometidos são a anfotericina B e suas formulações lipídicas ou voriconazol. O posaconazol pode ser recomendado como terapia de resgate. A reversão da imunossupressão é recomendada quando possível. Apesar disso, a terapêutica ideal para pacientes com fusariose disseminada ainda não está estabelecida (TORTORANO et al., 2014).

A fim de superar a resistência fúngica e altas taxas de mortalidade desencadeadas pela fusariose, novas estratégias terapêuticas devem ser desenvolvidas. Produtos naturais bioativos e seus derivados semi-sintéticos têm sido uma fonte de agentes terapêuticos para o tratamento de doenças infecciosas. Aproximadamente 80% dos antibióticos utilizados na clínica médica são provenientes, direta ou indiretamente, de produtos naturais (NEWMAN et al., 2003). Em geral, os óleos essenciais de plantas têm demonstrado atividade antifúngica contra patógenos fúngicos cutâneos e sistêmicos (ZUZARTE et al., 2011). Os constituintes dos óleos essenciais pertencem principalmente a duas classes químicas: terpenóides e fenilpropanóides (SELL, 2010). O cinamaldeído é um fenilpropanóide isolado da casca das árvores da canela e de outras espécies do gênero *Cinnamomum* (SHREAZ et al., 2013), e tem sido identificado como o principal componente com atividade antimicrobiana (KHAN et al., 2012; OOI et al., 2006; SHREAZ et al., 2011; SHREAZ et al., 2013; SINGH et al., 1995). Compostos fenólicos monoterpênóides, como o carvacrol e timol, encontrados principalmente nos óleos essenciais de tomilho [*Thymus* spp.] e orégano [*Origanum* spp.], têm demonstrado atividade contra vários fungos patogênicos (ABBASZADEH et al. 2014; AHMAD et al., 2011; AHMAD et al., 2013; GALLUCCI et al. 2014; KHAN et al., 2015; ZABKA; PAVELA, 2015).

Combinações de óleos essenciais de plantas, ou de seus compostos majoritários, com antimicóticos comerciais têm demonstrado atividade antifúngica sinérgica frente a numerosos gêneros fúngicos (CAMPBELL et al., 2012). Estes fitocompostos podem agir como agentes quimiossensibilizantes, ou seja, funcionam como agentes sinérgicos, tornando a célula fúngica mais sensível ao agente antifúngico convencional (CAMPBELL et al., 2012). Neste contexto, este estudo objetivou avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do cinamaldeído, carvacrol e timol frente a isolados clínicos de *Fusarium* spp., e suas combinações com agentes antifúngicos convencionais.

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Vinte e cinco isolados clínicos de *Fusarium* spp. (complexo de espécies, n) foram incluídos neste estudo: *F. chlamydosporum* (complexo *F. chlamydosporum*, n=3), *F. oxysporum* (complexo *F. oxysporum*, n=5), *F. proliferatum* (complexo *F. fujikuroi*, n=3), *F. solani* (complexo *F. solani*, n=11), *F. sporotrichioides* (complexo *F. sambucinum*, n=1) e *F. verticillioides* (complexo *F. fujikuroi*, n=2). Estas cepas foram obtidas de culturas de sangue (n=11), biópsias de tecidos (n=6), córnea (n=4), lavado broncoalveolar (n=1) e sedimento de diálise peritoneal ambulatorial contínua (CAPD) (n=3). Esta coleção pertence ao Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

Primeiramente, as cepas foram identificadas por métodos fenotípicos clássicos. A análise molecular foi realizada para a confirmação da identidade dos isolados. O DNA total foi extraído de acordo com a técnica descrita por Möller e colaboradores (1992) com modificações (KLASSEN; BALCERZAK; DE COCK, 1996). A amplificação de um fragmento de DNA abrangendo a região espaçadora transcrita interna (ITS) foi realizada por PCR utilizando os primers ITS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') e ITS4 (5'-CTTCCGTCAATTCCTTTAAG-3') (WHITE et al., 1990). Os produtos de PCR purificados foram sequenciados e depositados no GenBank com os seguintes números de acesso: HQ696899, HQ696900 e HQ696908 para *F. chlamydosporum*; HQ696888, HQ696889, HQ696890, HQ696893 e HQ696894 para *F. oxysporum*; HQ696886, HQ696887 e GQ149771 para *F. proliferatum*; HQ696874, HQ696875, HQ696876, HQ696877, HQ696878, HQ696879, HQ696880, HQ696881, HQ696882 e HQ696883 para *F. solani*; e KR020684 e KR052812 para *F. verticillioides*. Além disso, duas cepas padrão, *F. solani* ATCC 36031 e *F. sporotrichioides* CBS41286, foram incluídas neste estudo.

Cinamaldeído (CIN, Sigma Aldrich, St. Louis, USA), carvacrol (CRV, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) e timol (THY, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) foram diluídos em etanol para a preparação das soluções estoque ($3,2 \times 10^4$ µg/ml). Enquanto que, anfotericina B (AMB; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), itraconazol (ITC; Frangon of Brazil Pharmaceutical Ltd., São Paulo, Brazil) e voriconazol (VRC; Pfizer, New York, USA) foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma Aldrich). Somente a caspofungina (CAS; Merck, Darmstadt, Germany) foi diluída em água destilada estéril. As soluções de trabalho, para todos os agentes, foram preparadas em caldo RPMI 1640 (Sigma Aldrich) de acordo com o documento M38-A2 (CLSI, 2008). As faixas de concentrações testadas para cada agente foram: 1,25-320

µg/ml para CIN, CRV e THY; 0,06-8 µg/ml para AMB; 0,12-16 µg/ml para ITC e VRC; e 0,25-32 µg/ml para CAS.

Os testes de suscetibilidade *in vitro* foram realizados através da técnica de microdiluição em caldo, conforme preconiza o documento M38-A2 (CLSI, 2008). Os valores de CIM (concentração inibitória mínima) foram determinados para todos os agentes após 48h de incubação das placas a 35°C, exceto para a caspofungina, pois a leitura para equinocandinas é determinada em CEM (concentração efetiva mínima) (CLSI, 2008). *Aspergillus flavus* ATCC 204304, *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foram incluídas nos testes para controle de qualidade. Os inóculos de *Fusarium* spp. foram preparados conforme o protocolo M38-A2 (CLSI, 2008), a fim de se obter uma concentração final de $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 unidades formadoras de colônias (CFU)/mL.

A atividade antifúngica das combinações entre os fitocompostos (CIN, CRV ou THY) e agentes antifúngicos (AMB, ITC, VRC ou CAS) foi avaliada pelo método de microdiluição *checkerboard* (MOODY, 2007). As interações foram avaliadas pela determinação do ICIF (índice de concentração inibitória fracionária). O ICIF é o resultado da CIF A (CIM ou CEM agente A em combinação/ CIM ou CEM agente A sozinho) + CIF B (CIM ou CEM agente B em combinação/ CIM ou CEM agente B sozinho). A interpretação dos valores de ICIF foi considerada como segue: ICIF $\leq 0,5$ (sinergismo); $0,5 < \text{ICIF} \leq 4$ (indiferente); e ICIF > 4 (antagonismo) (MOODY, 2007).

5.4 RESULTADOS

As faixas de CIM ou CEM obtidos para os agentes antifúngicos (média geométrica e CIM₉₀, em µg/mL) foram: 0,25-8 (2,1 e 4) para AMB; >16 para ITC; 1-16 (5,9 e 16) para VRC e >32 para CAS. Os fitocompostos apresentaram as seguintes faixas de CIM (média geométrica e CIM₉₀, em µg/mL): 20-80 (45,9 e 80) para CIN, 40->320 (194,3 e 320) para CRV e 40-320 (178,8 e 320) para THY.

As Tabelas 1 e 2 demonstram as CIMs ou CEMs dos fitocompostos em combinação com AMB, CAS, ITC ou VRC, bem como os valores de ICIF. As faixas de CIM ou CEM (médias geométricas, em µg/mL) dos agentes em combinação foram: 5-40 (10,87) + 0,12-4 (0,76) para CIN + AMB; 2,5-20 (6,97) + 8-32 (19,97) para CIN + CAS; 10-80 (22,97) + 8-16 (10,56) para CIN + ITC; 10-40 (16,02) + 0,25-8 (1,89) para CIN + VRC; 2,5-40 (13,95) + 0,06-4 (0,51) para CRV + AMB; 1,25-40 (13,57) + 4-32 (12,82) para CRV + CAS; 5-80 (31,17) + 4-16 (10,27) para CRV + ITC; 2,5-40 (11,17) + 0,25-8 (1,52) para CRV + VRC; 1,25-40 (10,00) + 0,06-4 (0,41) para THY + AMB; 1,25-20 (7,17) + 4-32 (8,00) para THY +

CAS; 5-80 (37,84) + 4-16 (11,47) para THY + ITC; e 1,25-40 (6,60) + 0,25-8 (1,84) para THY + VRC.

Interações sinérgicas ou indiferentes foram observadas para todas as combinações testadas. Interações antagônicas não foram observadas. Os percentuais de sinergismos observados para cada combinação foram: THY + CAS (96%), CRV + CAS (88%), THY + AMB (76%), CRV + AMB ou THY + VRC (68%), CRV + VRC (60%), CRV + ITC (48%), THY + ITC ou CIN + CAS (40%), CIN + AMB (32%), CIN + VRC (20%) e CIN + ITC (12%).

Em relação as espécies, as melhores combinações *in vitro* para *F. chlamydosporum*, *F. proliferatum* e *F. solani* foram CRV ou THY + CAS, para *F. oxysporum* THY + AMB ou CAS, para *F. sporotrichioides* CRV + AMB ou CAS e para *F. verticillioides* CIN, CRV ou THY + AMB ou CAS.

5.5 DISCUSSÃO

Ao longo das últimas décadas, os casos de fusariose invasiva e disseminada têm aumentado significativamente. Isto se deve a vários fatores: o crescente número de pacientes imunocomprometidos; as estratégias profiláticas contra infecções fúngicas oportunistas, as quais têm pouco impacto sobre *Fusarium* spp.; e também, pela capacidade melhorada de identificar agentes infecciosos (DALYAN CILO et al., 2015; NUCCI et al., 2014). Nucci e colaboradores observaram que na última década houve uma melhora significativa na resposta terapêutica com o uso de voriconazol e terapias combinadas. Apesar disso, o prognóstico da fusariose disseminada é insatisfatório, e o tratamento ideal não está estabelecido (GUARRO, 2013; NUCCI et al., 2014).

Até o momento, os *breakpoints* para o gênero *Fusarium* ainda não foram definidos. Porém, os antifúngicos disponíveis demonstram altas CIMs para estas espécies (GUARRO, 2013; NUCCI; ANAISSIE, 2007), sendo que a AMB apresenta a melhor atividade *in vitro* (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2008; GUARRO, 2013; TORTORANO et al., 2008). Estes dados concordam com nossos achados. Neste estudo, a AMB apresentou maior atividade *in vitro* para *Fusarium* spp., seguida pelo VRC.

O número relativamente pequeno de agentes antifúngicos disponíveis, em conjunto com a resistência emergente de vários patógenos fúngicos, impõe a investigação de novas estratégias de tratamento. As plantas e seus metabólitos secundários são importantes fontes para a pesquisa de novos agentes antimicrobianos, devido a presença de compostos bioativos

com ampla diversidade estrutural e biológica (AHMAD et al., 2013). Além disso, a terapia de combinação com antifúngicos clássicos foi recomendada e utilizada no tratamento de várias micoses (CUENCA-ESTRELLA, 2004). No entanto, as combinações de agentes antifúngicos com óleos essenciais ou seus metabólitos secundários ainda é pouco explorada (KHAN; AHMAD, 2012). No presente estudo, não observamos atividade antifúngica significativa *in vitro* dos fitocompostos CIN, CRV e THY contra isolados clínicos de *Fusarium* spp. Por outro lado, altas taxas de sinergismos foram observadas para as seguintes combinações: THY ou CRV + CAS (96% e 88%, respectivamente); THY ou CRV + AMB (76% e 68%, respectivamente); THY ou CRV + VRC (68% e 60%, respectivamente). As combinações entre THY ou CRV + ITC e CIN + CAS, AMB, VRC ou ITC, resultaram em pequenas taxas de sinergismos. Com base em exaustiva revisão da literatura, estas combinações ainda não foram relatadas frente a isolados clínicos de *Fusarium* spp.

O CIN tem demonstrado atividade *in vitro* contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (OOI et al., 2006), *Candida* spp. (OOI et al., 2006; SHREAZ et al., 2013), dermatófitos (OOI et al., 2006) e *Aspergillus* spp. (OOI et al., 2006; SUN et al., 2016). Além disso, dois estudos relataram a atividade antifúngica do CIN contra isolados clínicos de *Fusarium* através de dos métodos de diluição em ágar [CIM = 138 µg/mL] (OOI et al., 2006) e microdiluição em caldo [CIM = 32,8 a 262,5 µg/mL] (HOMA et al., 2015). Aqui, observamos menores CIMs (CIM₉₀ = 80 µg/mL) para o CIN. Segundo alguns autores, há muitas hipóteses para o seu mecanismo de ação antifúngica, tais como: inibição da biossíntese do ergosterol (SHREAZ et al., 2011); inibição da bomba de prótons (H⁺-ATPase) na membrana plasmática, que produz acidificação e morte celular (SHREAZ et al., 2011; SHREAZ et al., 2013); e inibição não competitiva da β-(1,3)-D-glucana sintase, responsável pela síntese de parede celular fúngica (BANG et al., 2000). Alguns estudos utilizaram o CIN como quimiossensibilizante associado a antifúngicos pelo método de *checkerboard*. O CIN foi capaz de potencializar a atividade *in vitro* da AMB contra *C.albicans* (KHAN et al., 2012), ou do fluconazol contra *C. albicans*, *A. fumigatus* e *T. rubrum* (KHAN; AHMAD, 2011; KHAN; AHMAD, 2012). Por outro lado, também foi relatado que a combinação de CIN + AMB resultou em interações indiferentes frente a *Candida* spp. e *C. neoformans* (KHAN; AHMAD, 2012; KIM et al., 2012). No presente estudo, observamos pequenas taxas de sinergismos para as associações entre CIN + antifúngicos contra *Fusarium* spp.

Os compostos fenólicos monoterpênicos CRV e THY têm demonstrado atividade antifúngica *in vitro* contra *Candida* spp. (AHMAD et al., 2011; AHMAD et al., 2013; GALLUCCI et al., 2014; KHAN et al., 2015;), fungos filamentosos (ABBASZADEH et al.,

2014; ZABKA; PAVELA, 2013) e o oomiceto *Pythium insidiosum* (JESUS et al., 2015). Também foi relatada a atividade *in vitro* destes fitocompostos contra *Fusarium* spp. através dos métodos de diluição em ágar [CIM = 159-208 µg/mL para CRV e 108-115 µg/mL para THY] (ZABKA; PAVELA, 2013) e microdiluição em caldo [CIM = 125 µg/mL para CRV e 300 µg/mL para THY] (ABBASZADEH et al., 2014). Nossos resultados demonstraram CIMs semelhantes (médias geométricas da CIMs = 194.3 µg/mL para o CRV e 178.8 µg/mL para o THY).

Estudos de combinação com estes compostos são menos explorados. Alguns autores relataram atividade sinérgica entre CRV ou THY e fluconazol frente a *Candida* spp. (AHMAD et al., 2013; DOKE et al., 2014; GUO et al., 2009; CHAILLOT et al. 2015), ou com AMB (GUO et al., 2009; KIM et al., 2008) frente a *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. Por outro lado, interações indiferentes também foram observadas para estas combinações (CHAILLOT et al. 2015; DOKE et al.; 2014). Jesus e colaboradores relataram interações sinérgicas entre CRV ou THY + AMB, CAS, ITC ou terbinafina pelo método de *checkerboard* frente a *P. insidiosum*, sendo que, todas as combinações resultaram em 100% de sinergismo (JESUS et al., 2015). O presente estudo, demonstrou altas taxas de sinergismo para as combinações destes compostos com CAS, AMB ou VRC. Outros autores também evidenciaram atividade sinérgica para a combinação entre CRV + CAS frente a *C. albicans* (CHAILLOT et al., 2015).

CRV e THY são isômeros de posição e possuem caráter lipofílico. Estes apresentam um grupo hidroxila e um sistema de deslocalização de elétrons que provocam a desestabilização da membrana celular fúngica (ULTEE et al., 2002). Por outro lado, muitos estudos têm apontado diferentes alvos antifúngicos para tais compostos. Além de interferirem na integridade da membrana plasmática e síntese de ergosterol (AHMAD et al., 2011), estes compostos também promovem a ruptura da parede celular por alterações no sistema MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno), que possui papel fundamental na manutenção da integridade desta (KIM et al., 2008). Além disso, outros autores observaram que estes compostos agem como oxidantes, provocando o estresse oxidativo na célula fúngica (KHAN et al. 2015); inibem a bomba de prótons [H⁺-ATPase] na membrana celular (AHMAD et al., 2010), alteram a homeostase do cálcio (RAO et al., 2010) e o funcionamento de organelas, como mitocôndria (GALLUCCI et al., 2004) e retículo endoplasmático (CHAILLOT et al., 2015). Baseados nestes estudos prévios, podemos sugerir que as interações sinérgicas resultantes das combinações de CRV ou THY com agentes antifúngicos aqui testados, são o resultado da inibição de diferentes alvos da célula fúngica. Segundo Campbell e

colaboradores, um dos principais mecanismos para que o sinergismo entre dois agentes ocorra, é a inibição simultânea de diferentes alvos celulares (CAMPBELL et al., 2012).

Em conclusão, nossos resultados demonstram que os fitocompostos CIN, CRV ou THY, não possuem atividade antifúngica significativa *in vitro* frente a *Fusarium* spp. Entretanto, CRV e THY demonstraram potente atividade quimiossensibilizante quando combinados aos antifúngicos CAS, AMB ou VRC. Geralmente, o agente quimiossensibilizante sozinho não apresenta potente atividade antifúngica, porém, quando em combinação com um antimicótico, não apenas aumenta a eficácia antifúngica, como também, supera a resistência do patógeno a antifúngicos convencionais e reduz sua toxicidade (CAMPBELL et al., 2012). Nossos achados sugerem que os fitocompostos, CRV e THY, detêm potencial para emprego na terapia combinada contra fusariose após desenvolvimento de formulações farmacêuticas adequadas. Além disso, outros autores têm sugerido estes quimiossensibilizantes como candidatos para o tratamento de infecções causadas por *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. em combinação com antifúngicos (AHMAD et al., 2013; KIM et al., 2008). Estudos experimentais *in vivo* são necessários para a confirmação da atividade antifúngica e segurança destas associações contra a fusariose.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – (CNPq; process #470229/2012-8) e pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil).

DECLARAÇÃO DE INTERESSE

Os autores informam que não há conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- ABBASZADEH, S. et al. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. **J Mycol Med**, v. 24, n. 2, p. e51-56, 2014.
- AHMAD, A. et al. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 30, n. 1, p. 41-50, 2011.
- AHMAD, A.; KHAN, A.; MANZOOR, N. Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. **Eur J Pharm Sci**, v. 48, n. 1-2, p. 80-86, 2013.

- AHMAD, A. et al. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1157-1162, 2010.
- ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. et al. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. **J Antimicrob Chemother**, v. 61, n. 4, p. 805-809, 2008.
- AVELINO-SILVA, V. I. et al. Disseminated *Fusarium* infection in autologous stem cell transplant recipient. **Braz J Infect Dis**, v. 19, n. 1, p. 90-93, 2015.
- BANG, K. H. et al. Inhibition of fungal cell wall synthesizing enzymes by trans-cinnamaldehyde. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 64, n. 5, p. 1061-1063, 2000.
- CAMPBELL, B. C.; CHAN, K. L.; KIM, J. H. Chemosensitization as a means to augment commercial antifungal agents. **Front Microbiol**, v. 3, p. 79, 2012.
- CHAILLOT, J. et al. The monoterpene carvacrol generates endoplasmic reticulum stress in the pathogenic fungus *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 8, p. 4584-4592, 2015.
- CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi**; Approved standard-second edition, M38-A2. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA, 2008.
- CUENCA-ESTRELLA, M. Combinations of antifungal agents in therapy-what value are they? **J Antimicrob Chemother**, v. 54, n. 5, p. 854-860, 2004.
- DALYAN CILO, B. et al. Emergence of fusarioses in a university hospital in Turkey during a 20-year period. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 34, n. 8, p. 1683-1691, 2015.
- DOKE, SK. et al. Sensitization of *Candida albicans* biofilms to fluconazole by terpenoids of plant origin. **J Gen Appl Microbiol**, v. 60, n. 5, p. 163-168, 2014.
- GALLUCCI, M. N. et al. *In vitro* activity of natural phenolic compounds against fluconazole-resistant *Candida* species: a quantitative structure-activity relationship analysis. **J Appl Microbiol**, v. 116, n. 4, p. 795-804, 2014.
- GUARRO, J. Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 32, n. 12, p. 1491-1500, 2013.
- GUO, N. et al. Antifungal activity of thymol against clinical isolates of fluconazole-sensitive and -resistant *Candida albicans*. **J Med Microbiol**, v. 58, n. 8, p. 1074-1079, 2009.
- HOMA, M. et al. Antifungal effect of essential oils against *Fusarium* keratitis isolates. **Planta Med**, v. 81, n. 14, p. 1277-1284, 2015.
- JESUS, F. P. et al. *In vitro* activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. **J Mycol Med**, v. 25, n. 2, p. 89-93, 2015.

KHAN, M. S.; AHMAD, I. Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 90, n. 3, p. 1083-1094, 2011.

KHAN, M. S.; AHMAD, I. Antibiofilm activity of certain phytochemicals and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 3, p. 618-621, 2012.

KHAN, A. et al. Effect of two monoterpene phenols on antioxidant defense system in *Candida albicans*. **Microb Pathog**, v. 80, p. 50-56, 2015.

KHAN, M. S.; MALIK, A.; AHMAD, I. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. **Med Mycol**, v. 50, n. 1, p. 33-42, 2012.

KIM, J. et al. Chemosensitization prevents tolerance of *Aspergillus fumigatus* to antimycotic drugs. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 372, n. 1, p. 266-271, 2008.

KIM, J. H. et al. Enhancement of antimycotic activity of amphotericin B by targeting the oxidative stress response of *Candida* and *Cryptococcus* with natural dihydroxybenzaldehydes. **Front Microbiol**, v. 3, p. 261, 2012.

KLASSEN, G. R.; BALCERZAK, M.; DE COCK, A. W. A. M. 5 S ribosomal RNA gene spacer as species specific probes for eight species of *Pythium*. **Phytopathol**, v. 86, n. 6, p. 581-587, 1996.

KREDICS, L. et al. Filamentous fungal infections of the cornea: a global overview of epidemiology and drug sensitivity. **Mycoses**, v. 58, n. 4, p. 243-260, 2015.

MÖLLER, E. M. et al. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Res**, v. 20, n. 22, p. 6115-6116, 1992.

MOODY, J. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: GARCIA, L. S.; ISENBERG, H. D. (Coord.). **Clinical microbiology procedures handbook**. 2. ed. Washington: ASM Press, 2007. p. 1-23.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J Nat Prod**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NUCCI, M.; ANAÏSSIE, E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 4, p. 695-704, 2007.

NUCCI, M. et al. Improvement in the outcome of invasive fusariosis in the last decade. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 6, p. 580-585, 2014.

OOI, L. S. et al. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. **Am J Chin Med**, v. 34, n. 3, p. 511-522, 2006.

- RAO, A. et al. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 12, p. 5062-5069, 2010.
- SELL, C. Chemistry of essential oils. In: BASER, K. H.; BUCHBAUER, G. (Coord.). **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2010. cap. 5, p. 121.
- SHREAZ, S. et al. Spice oil cinnamaldehyde exhibits potent anticandidal activity against fluconazole resistant clinical isolates. **Fitoterapia**, v. 82, n. 7, p. 1012-1020, 2011.
- SHREAZ, S. et al. Influences of cinnamic aldehydes on H⁺ extrusion activity and ultrastructure of *Candida*. **J Med Microbiol**, v. 62, n. 2, p. 232-240, 2013.
- SINGH, H. B. et al. Cinnamon bark oil, a potent fungitoxicant against fungi causing respiratory tract mycoses. **Allergy**, v. 50, n. 12, p. 995-999, 1995.
- SUN, Q. et al. Cinnamaldehyde inhibits fungal growth and aflatoxin B1 biosynthesis by modulating the oxidative stress response of *Aspergillus flavus*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 100, n. 3, p. 1355-1364, 2016.
- TORTORANO, A. M. et al. Species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility patterns of 75 clinical isolates of *Fusarium* spp. from Northern Italy. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 7, p. 2683-2685, 2008.
- TORTORANO, A. M. et al. ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 3, p. 27-46, 2014.
- ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food borne pathogen *Bacillus cereus*. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 4, p. 1561-1568, 2002.
- WHITE, T. J.; BURNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Coord.). **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. 1. ed. San Diego: Academic Press, 1990. cap. 38, p. 315-322.
- ZABKA, M.; PAVELA, R. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. **Chemosphere**, v. 93, n. 6, p. 1051-1056, 2013.
- ZUZARTE, M. et al. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Lavandula viridis* L'Her. **J Med Microbiol**, v. 60, n. 5, p. 612-618, 2011.

Tabela 1 - Combinações *in vitro* entre fitocompostos e anfotericina B ou caspofungina contra *Fusarium* spp.

Isolate	Combinações											
	CIN/AMB		CRV/AMB		THY/AMB		CIN/CAS		CRV/CAS		THY/CAS	
	CIM	ICIF (X)	CIM	ICIF (X)	CIM	ICIF (X)	CEM	ICIF (X)	CEM	ICIF (X)	CEM	ICIF (X)
Fc1	20,00/0,25	1,00 (I)	2,50/0,12	0,28 (S)	5,00/0,06	0,24 (S)	10,00/32,00	0,75 (I)	1,25/4,00	0,08 (S)	2,50/8,00	0,19 (S)
Fc2	20,00/0,25	1,00 (I)	10,00/0,25	0,62 (I)	5,00/0,25	0,62 (I)	10,00/32,00	0,75 (I)	1,25/4,00	0,08 (S)	1,25/4,00	0,09 (S)
Fc3	5,00/0,12	0,75 (I)	2,50/0,06	0,27 (S)	2,50/0,06	0,30 (S)	2,50/8,00	0,25 (S)	1,25/8,00	0,14 (S)	1,25/4,00	0,09 (S)
Fo1	5,00/0,25	0,75 (I)	10,00/0,12	0,31 (S)	5,00/0,06	0,14 (S)	10,00/32,00	1,00 (I)	20,00/16,00	0,38 (S)	20,00/16,00	0,31 (S)
Fo2	40,00/1,00	1,00 (I)	40,00/0,25	0,25 (S)	5,00/0,50	0,27 (S)	5,00/16,00	0,31 (S)	40,00/32,00	0,62 (I)	20,00/16,00	0,31 (S)
Fo3	40,00/1,00	0,75 (I)	40,00/1,00	0,31 (S)	2,50/1,00	0,26 (S)	5,00/8,00	0,19 (S)	40,00/16,00	0,31 (S)	20,00/16,00	0,31 (S)
Fo4	10,00/0,50	0,50 (S)	10,00/1,00	0,75 (I)	1,25/0,25	0,16 (S)	10,00/32,00	0,75 (I)	5,00/32,00	0,62 (I)	5,00/8,00	0,25 (S)
Fo5	40,00/2,00	1,00 (I)	20,00/2,00	0,62 (I)	2,50/1,00	0,26 (S)	20,00/32,00	0,75 (I)	40,00/32,00	0,75 (I)	10,00/16,00	0,28 (S)
Fp1	5,00/0,50	0,38 (S)	10,00/1,00	0,62 (I)	20,00/0,06	0,28 (S)	2,50/8,00	0,19 (S)	10,00/8,00	0,25 (S)	2,50/4,00	0,09 (S)
Fp2	10,00/1,00	0,75 (I)	20,00/0,12	0,19 (S)	20,00/0,12	0,19 (S)	10,00/32,00	0,75 (I)	20,00/16,00	0,38 (S)	5,00/8,00	0,16 (S)
Fp3	20,00/0,50	0,75 (I)	5,00/0,25	0,28 (S)	40,00/0,50	0,62 (I)	5,00/8,00	0,19 (S)	20,00/8,00	0,25 (S)	10,00/8,00	0,16 (S)
Fs1	20,00/1,00	0,75 (I)	20,00/1,00	0,62 (I)	10,00/0,50	0,31 (S)	10,00/32,00	0,62 (I)	10,00/16,00	0,31 (S)	5,00/8,00	0,16 (S)
Fs2	20,00/1,00	0,75 (I)	40,00/1,00	0,62 (I)	20,00/1,00	0,62 (I)	10,00/32,00	0,62 (I)	20,00/8,00	0,19 (S)	2,50/8,00	0,14 (S)
Fs3	5,00/0,12	0,38 (S)	20,00/0,25	0,38 (S)	10,00/0,12	0,19 (S)	2,50/8,00	0,25 (S)	5,00/16,00	0,28 (S)	2,50/8,00	0,14 (S)
Fs4	5,00/1,00	0,62 (I)	40,00/1,00	0,62 (I)	20,00/0,25	0,19 (S)	5,00/32,00	0,62 (I)	10,00/16,00	0,28 (S)	10,00/16,00	0,28 (S)
Fs5	10,00/2,00	0,75 (I)	20,00/0,50	0,19 (S)	40,00/0,50	0,25 (S)	20,00/16,00	0,75 (I)	20,00/8,00	0,19 (S)	20,00/8,00	0,19 (S)
Fs6	5,00/1,00	0,50 (S)	40,00/0,50	0,19 (S)	40,00/2,00	0,62 (I)	5,00/32,00	0,75 (I)	40,00/16,00	0,31 (S)	20,00/8,00	0,19 (S)
Fs7	10,00/1,00	0,50 (S)	40,00/1,00	0,31 (S)	20,00/1,00	0,31 (S)	5,00/32,00	0,62 (I)	40,00/16,00	0,31 (S)	10,00/4,00	0,09 (S)
Fs8	10,00/2,00	0,75 (I)	10,00/0,50	0,16 (S)	20,00/0,50	0,19 (S)	2,50/16,00	0,31 (S)	20,00/16,00	0,31 (S)	5,00/8,00	0,14 (S)
Fs9	10,00/0,50	0,75 (I)	5,00/0,12	0,28 (S)	10,00/0,12	0,16 (S)	2,50/16,00	0,31 (S)	40,00/16,00	0,38 (S)	10,00/4,00	0,09 (S)
Fs10	10,00/1,00	0,38 (S)	10,00/1,00	0,28 (S)	40,00/0,50	0,25 (S)	20,00/32,00	0,75 (I)	20,00/16,00	0,31 (S)	20,00/4,00	0,12 (S)
Fs11	10,00/4,00	0,75 (I)	40,00/4,00	0,62 (I)	40,00/4,00	0,62 (I)	10,00/32,00	0,75 (I)	40,00/16,00	0,38 (S)	5,00/4,00	0,08 (S)
Fst1	10,00/2,00	0,75 (I)	10,00/1,00	0,31 (S)	1,25/2,00	0,53 (I)	20,00/32,00	1,00 (I)	10,00/8,00	0,19 (S)	20,00/32,00	0,62 (I)
Fv1	5,00/2,00	0,31 (S)	5,00/1,00	0,19 (S)	10,00/2,00	0,38 (S)	10,00/8,00	0,25 (S)	10,00/16,00	0,38 (S)	5,00/8,00	0,19 (S)
Fv2	5,00/0,50	0,19 (S)	10,00/1,00	0,31 (S)	10,00/1,00	0,28 (S)	5,00/16,00	0,31 (S)	20,00/8,00	0,25 (S)	20,00/8,00	0,19 (S)

CIN, cinamaldeído; CRV, carvacrol; THY, timol; AMB, anfotericina B; CAS, caspofungina; CIM, concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/ml}$); CEM, concentração efetiva mínima ($\mu\text{g/ml}$); ICIF, índice de concentração inibitória fracionária; X, interpretação do ICIF; S, sinergismo; I, indiferença; Fc, *F. chlamyosporum*; Fo, *F. oxysporum*; Fp, *F. proliferatum*; Fs, *F. solani*; Fst, *F. sporotrichioides*; Fv, *F. verticillioides*.

Tabela 2 - Combinações *in vitro* entre fitocompostos e itraconazol ou voriconazol contra *Fusarium* spp.

Isolado	Combinações											
	CIN/ITC		CRV/ITC		THY/ITC		CIN/VRC		CRV/VRC		THY/VRC	
	CIM	ICIF (X)	CIM	ICIF (X)	CIM	ICIF (X)	CIM	ICIF (X)	CIM	ICIF (X)	CIM	ICIF (X)
Fc1	20,00/16,00	1,00 (I)	10,00/8,00	0,38 (S)	5,00/8,00	0,38 (S)	20,00/1,00	0,75 (I)	5,00/0,25	0,19 (S)	1,25/1,00	0,28 (S)
Fc2	10,00/8,00	0,50 (S)	10,00/8,00	0,38 (S)	10,00/16,00	0,75 (I)	20,00/1,00	0,62 (I)	5,00/1,00	0,25 (S)	5,00/1,00	0,62 (I)
Fc3	20,00/8,00	1,25 (I)	20,00/16,00	0,75 (I)	10,00/16,00	0,75 (I)	10,00/0,50	0,75 (I)	5,00/1,00	0,56 (I)	1,25/0,25	0,16 (S)
Fo1	20,00/8,00	1,25 (I)	20,00/4,00	0,25 (S)	80,00/8,00	0,50 (S)	10,00/2,00	1,00 (I)	2,50/0,50	0,14 (S)	5,00/1,00	0,14 (S)
Fo2	40,00/16,00	1,00 (I)	80,00/16,00	0,75 (I)	80,00/16,00	0,75 (I)	20,00/2,00	0,75 (I)	10,00/0,50	0,16 (S)	10,00/2,00	0,28 (S)
Fo3	40,00/16,00	1,00 (I)	80,00/16,00	0,62 (I)	40,00/8,00	0,38 (S)	40,00/2,00	0,75 (I)	40,00/2,00	0,56 (I)	5,00/2,00	0,27 (S)
Fo4	10,00/16,00	0,75 (I)	5,00/4,00	0,25 (S)	10,00/4,00	0,38 (S)	20,00/4,00	1,00 (I)	5,00/8,00	1,12 (I)	2,50/4,00	0,56 (I)
Fo5	80,00/16,00	1,50 (I)	20,00/8,00	0,38 (S)	80,00/16,00	0,75 (I)	40,00/4,00	1,00 (I)	2,50/1,00	0,14 (S)	10,00/4,00	0,53 (I)
Fp1	20,00/8,00	0,75 (I)	10,00/4,00	0,25 (S)	10,00/8,00	0,38 (S)	10,00/0,25	0,50 (S)	5,00/0,50	0,56 (I)	2,50/0,25	0,16 (S)
Fp2	20,00/8,00	0,75 (I)	10,00/8,00	0,31 (S)	20,00/8,00	0,38 (S)	10,00/0,50	0,38 (S)	10,00/0,50	0,19 (S)	10,00/0,50	0,56 (I)
Fp3	20,00/8,00	0,50 (S)	40,00/16,00	0,75 (I)	80,00/16,00	0,75 (I)	40,00/2,00	0,75 (I)	10,00/1,00	0,19 (S)	40,00/2,00	0,38 (S)
Fs1	20,00/16,00	0,75 (I)	20,00/16,00	0,62 (I)	10,00/8,00	0,31 (S)	20,00/4,00	0,75 (I)	10,00/2,00	0,31 (S)	10,00/4,00	0,31 (S)
Fs2	40,00/8,00	0,75 (I)	40,00/4,00	0,25 (S)	40,00/16,00	0,75 (I)	20,00/4,00	0,75 (I)	20,00/4,00	0,56 (I)	5,00/4,00	0,16 (S)
Fs3	20,00/8,00	1,25 (I)	40,00/16,00	0,75 (I)	40,00/16,00	0,75 (I)	10,00/2,00	1,00 (I)	10,00/2,00	0,56 (I)	2,50/1,00	0,52 (I)
Fs4	20,00/8,00	0,75 (I)	40,00/8,00	0,38 (S)	80,00/16,00	0,75 (I)	10,00/1,00	0,50 (S)	20,00/1,00	0,19 (S)	10,00/4,00	0,16 (S)
Fs5	40,00/8,00	1,25 (I)	80,00/16,00	0,75 (I)	80,00/16,00	0,75 (I)	20,00/8,00	1,00 (I)	20,00/4,00	0,31 (S)	5,00/2,00	0,14 (S)
Fs6	20,00/8,00	1,25 (I)	80,00/8,00	0,38 (S)	80,00/4,00	0,38 (S)	10,00/2,00	0,75 (I)	20,00/2,00	0,28 (S)	5,00/4,00	0,08 (S)
Fs7	20,00/16,00	1,00 (I)	80,00/16,00	0,62 (I)	80,00/16,00	0,75 (I)	10,00/4,00	0,75 (I)	40,00/2,00	0,31 (S)	5,00/2,00	0,14 (S)
Fs8	40,00/8,00	1,25 (I)	40,00/16,00	0,62 (I)	80,00/16,00	0,75 (I)	10,00/2,00	0,38 (S)	40,00/4,00	0,50 (S)	10,00/8,00	0,28 (S)
Fs9	20,00/8,00	0,75 (I)	80,00/8,00	0,50 (S)	80,00/16,00	0,75 (I)	20,00/1,00	0,75 (I)	20,00/1,00	0,50 (S)	2,50/2,00	0,53 (I)
Fs10	40,00/16,00	1,00 (I)	40,00/16,00	0,62 (I)	80,00/16,00	0,75 (I)	40,00/2,00	0,75 (I)	20,00/4,00	0,56 (I)	5,00/4,00	0,27 (S)
Fs11	20,00/8,00	0,75 (I)	40,00/16,00	0,62 (I)	8,00/8,00	0,50 (S)	10,00/4,00	0,75 (I)	40,00/4,00	0,62 (I)	10,00/4,00	0,16 (S)
Fst1	20,00/16,00	1,00 (I)	40,00/16,00	0,75 (I)	40,00/16,00	0,75 (I)	10,00/1,00	0,75 (I)	20,00/1,00	0,62 (I)	20,00/0,50	0,62 (I)
Fv1	20,00/16,00	0,75 (I)	40,00/16,00	1,00 (I)	20,00/8,00	0,50 (S)	10,00/4,00	0,38 (S)	2,50/2,00	0,16 (S)	10,00/4,00	0,25 (S)
Fv2	10,00/8,00	0,38 (S)	40,00/8,00	0,50 (S)	80,00/16,00	0,75 (I)	20,00/4,00	0,75 (I)	10,00/4,00	0,56 (I)	40,00/2,00	0,62 (I)

CIN, cinamaldeído; CRV, carvacrol; THY, timol; ITC, itraconazol; VRC, voriconazol; CIM, concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/ml}$); ICIF, índice de concentração inibitória fracionária; X, interpretação do ICIF; S, sinergismo; I, indiferença; Fc, *F. chlamyosporum*; Fo, *F. oxysporum*; Fp, *F. proliferatum*; Fs, *F. solani*; Fst, *F. sporotrichioides*; Fv, *F. verticillioides*.

6 DISCUSSÃO

De modo geral, o tratamento de infecções fúngicas é um importante desafio terapêutico. Apesar da expansão do arsenal antifúngico, este ainda permanece limitado frente a fungos oportunistas emergentes resistentes a maioria dos antifúngicos, tais como *Fusarium* spp. Além disso, a utilização de agentes antifúngicos tem sido limitada devido à toxicidade e perfis farmacocinéticos desfavoráveis (AFELTRA; VERWEIJ, 2003).

A prevalência da fusariose invasiva tem aumentado principalmente em pacientes com distúrbios hematológicos, sendo considerada a segunda micose invasiva causada por fungos filamentosos mais diagnosticada depois da aspergilose (MUHAMMED et al., 2011; NUCCI; ANAÏSSIE, 2007). Além disso, um recente estudo realizado no Brasil, aponta a fusariose como a primeira micose oportunista em pacientes hematológicos, causando altas taxas de morbidade e mortalidade (NUCCI et al., 2013). No entanto, as monoterapias com anfotericina B ou voriconazol, têm apresentado falhas terapêuticas. Neste contexto, a importância da descoberta de novas estratégias de tratamento no combate a fusariose torna-se evidente.

Neste estudo, foi observada a marcante resistência *in vitro* das espécies de *Fusarium* aos agentes antifúngicos. A anfotericina B demonstrou maior atividade *in vitro*. Estes achados concordam com outros estudos (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2008; TORTORANO et al., 2008). Os *breakpoints* para o gênero *Fusarium* ainda não estão definidos, porém, o documento M38-A2 (CLSI, 2008) define os valores de *breakpoints* para testes de suscetibilidade *in vitro* para fungos filamentosos. Considerando tais *breakpoints*, apenas 28% dos isolados demonstraram sensibilidade ($CIM \leq 1 \mu\text{g/mL}$) a anfotericina B, ao passo que, 4% foram sensíveis ao voriconazol. As espécies *F. solani* e *F. verticillioides* apresentaram maior resistência a estes antifúngicos. Além disso, detectou-se resistência ao itraconazol e a caspofungina para 100% dos isolados.

A recente reorganização do gênero *Fusarium* em complexos de espécies e a excepcional diversidade filogenética deste gênero tem dificultado as comparações de dados em relação à suscetibilidade antifúngica (AL-HATMI et al., 2015). Segundo Guarro, a diferenciação entre as espécies pode ser valiosa para estudos epidemiológicos, porém, na prática clínica esta diferenciação parece não ser relevante, de modo que as espécies de *Fusarium* são resistentes a praticamente todos os antifúngicos disponíveis, apenas com diferenças irrelevantes entre as espécies (GUARRO, 2013).

Por outro lado, alguns autores destacam que os testes de suscetibilidade aos antifúngicos são importantes, e devem ser realizados somente para isolados de *Fusarium* a

partir de infecções invasivas. Embora a suscetibilidade não possa prever o resultado clínico, a relação entre altas CIMs e insucesso terapêutico é bem conhecida (ALASTRUEY-IZQUIERDO et al., 2008).

Uma tentativa de superar a resistência aos antifúngicos é a terapia combinada. A combinação de um quimiossensibilizante e um agente antifúngico pode promover o sinergismo entre estes dois agentes. Esta estratégia terapêutica resulta na redução da toxicidade a partir da administração de doses mais baixas, redução do tempo relativo à resposta ao tratamento e diminuição da sua duração, redução do tempo de hospitalização, aumento do espectro de ação e redução da aquisição de resistência fúngica aos antimicrobianos (JOHNSON et al, 2004).

De modo geral, o sinergismo entre dois agentes pode ocorrer devido a alguns mecanismos de interação, tais como: aumento da penetração de um agente na célula fúngica resultante da ação do outro agente na membrana citoplasmática; inibição de diferentes fases de vias intracelulares fúngicas que são essenciais para a sobrevivência celular; inibição de proteínas de transporte; e inibição simultânea de diferentes alvos celulares (JOHNSON et al., 2004; CAMPBELL; CHAN; KIM, 2012).

O presente estudo avaliou as atividades quimiossensibilizantes *in vitro* de agentes sintéticos e naturais em combinação com agentes antifúngicos clássicos frente a isolados clínicos de *Fusarium* spp. A partir de estudos prévios, foram selecionadas 3 vertentes de possíveis compostos quimiossensibilizantes: compostos orgânicos de selênio, fármacos não antifúngicos e fitocompostos.

No artigo 1, foi reportada a atividade antifúngica dos compostos orgânicos de selênio, disseleneto de difenila (CIM = 4-32 µg/mL) e ebselen (CIM = 2-8 µg/mL) contra *Fusarium* spp. Além disso, foi demonstrada pela primeira vez a atividade quimiossensibilizante destes compostos em combinação com antifúngicos. As maiores taxas de sinergismos foram observadas para as combinações entre ebselen + anfotericina B (88%) ou voriconazol (80%), e disseleneto de difenila + anfotericina B (72%) ou voriconazol (64%). Estes compostos possuem atividade antifúngica por interagirem com grupos sulfidríla de biomoléculas presentes na célula fúngica (MUGESH; DU MONT; SIES, 2001; WÓJTOWICZ et al., 2004). Além disso, DPDS pode atuar como um agente pró-oxidante através da redução da glutatona (GSH) celular, a qual constitui o principal sistema de defesa antioxidante em *Saccharomyces cerevisiae* (ROSA et al., 2005). Soteropoulos e colaboradores validaram a H⁺-ATPase como sendo um alvo antifúngico do ebselen (SOTEROPOULOS et al., 2000). Estes agentes

apresentam baixa toxicidade (NOGUEIRA; ZENI; ROCHA, 2004) e podem desempenhar um papel complementar na terapia combinada com agentes antifúngicos contra a fusariose.

Este estudo também demonstrou a atividade da pentamidina contra *Fusarium* spp. (CIM = 4-32 µg/mL), como relatado por Lionakis e colaboradores (LIONAKIS et al., 2003). A atividade antifúngica da polimixina B (CIM = 4-16 µg/mL) contra isolados clínicos de *Fusarium* foi relatada neste estudo pela primeira vez. Tigeciclina e tobramicina não demonstraram atividade nas concentrações testadas. Em combinação, estes antimicrobianos potencializaram a atividade antifúngica da anfotericina B ou voriconazol, sendo que as combinações mais sinérgicas foram: tobramicina + anfotericina B (80%) ou voriconazol (76%); polimixina B + anfotericina B (76%) ou voriconazol (64%); e pentamidina + anfotericina B (72%) ou voriconazol (68%), respectivamente. A tigeciclina demonstrou menor potencial quimiossensibilizante (Manuscrito 1).

Conforme outros estudos, estes antimicrobianos possuem diferentes alvos na célula fúngica. A tobramicina aumenta a permeabilidade da parede celular e membrana citoplasmática fúngica (DALHOFF, 1987). Zhai e colaboradores hipotetizaram que a ação antifúngica da polimixina B ocorre através da ligação com lipídios aniônicos da membrana fúngica causando a sua ruptura (ZHAI et al., 2010). Em relação, a pentamidina, muitos mecanismos de ação têm sido propostos, tais como, a inibição da síntese de ácidos nucleicos, fosfolipídios e síntese protéica (SANDS; KRON; BROWN, 1985). Os mecanismos exatos de quimiossensibilização destes agentes não estão totalmente esclarecidos. Por outro lado, a estratégia de inibição simultânea de diferentes alvos celulares torna a célula fúngica mais suscetível ao agente antifúngico, explicando a interação sinérgica entre estes fármacos.

Amiodarona, doxiciclina e moxifloxacina também demonstraram atividade quimiossensibilizante quando combinados a agentes antifúngicos. As combinações mais sinérgicas foram as seguintes: amiodarona + anfotericina B (64%) ou voriconazol (76%); moxifloxacina + anfotericina B (72%) ou voriconazol (60%); e doxiciclina + anfotericina B (48%) ou voriconazol (52%) (Manuscrito 2).

A amiodarona aumenta os níveis de cálcio citoplasmático por interagir com a parede celular fúngica (COURCHESNE; TUNC; LIAO, 2009). O mecanismo proposto para as suas combinações sinérgicas com anfotericina B ou voriconazol, também se baseia ao ataque a diferentes alvos da célula fúngica.

A moxifloxacina possui alta afinidade pela topoisomerase II (PESTOVA et al., 2000), a qual está presente na célula fúngica, inibindo a síntese de DNA. A doxiciclina possui como alvo a inibição da síntese de proteínas em células procarióticas. No entanto, esta tetraciclina,

também pode alterar a síntese de proteínas na mitocôndria de células eucarióticas (CHOPRA; ROBERTS, 2001). Estes mecanismos viabilizam a potencialização da atividade da anfotericina B ou voriconazol, já que estes antifúngicos possuem como alvo o ergosterol da membrana, facilitando a entrada dos antimicrobianos que podem então alcançar seus sítios de ação.

Outros agentes quimiossensibilizantes testados foram o cinamaldeído, carvacrol e timol. Estes fitocompostos não demonstraram atividade antifúngica significativa quando testados isoladamente. Por outro lado, carvacrol e timol demonstraram potente atividade quimiossensibilizante quando combinados a caspofungina, anfotericina B ou voriconazol. As combinações mais sinérgicas foram observadas para: timol ou carvacrol + caspofungina (96% e 88%, respectivamente); timol ou carvacrol + anfotericina B (76% e 68%, respectivamente); e timol ou carvacrol + voriconazol (68% e 60%, respectivamente) (Manuscrito 3).

O timol e o carvacrol são terpenóides altamente lipofílicos que possuem afinidade pela membrana plasmática fúngica (AHMAD et al., 2011). Além disso, estes compostos podem causar a ruptura da parede celular (KIM et al., 2008), provocar o estresse oxidativo da célula (KHAN et al., 2015) e a alteração da homeostase do cálcio (RAO et al., 2010). Desse modo, estes diferentes mecanismos de ação podem explicar as suas atividades quimiossensibilizantes.

As espécies dos complexos *F. solani* e *F. oxysporum* são responsáveis pela maioria das infecções causadas por *Fusarium*. Desse modo, é importante ressaltar que as combinações mais eficazes para *F. solani* foram as seguintes (porcentagem de sinergismo): carvacrol ou timol + caspofungina (100%); timol + voriconazol (81,8%); ebselen + anfotericina B (81,8%); tobramicina + voriconazol (72,7%); e timol + anfotericina B (72,7%). Enquanto que, para *F. oxysporum* as combinações que resultaram em 100% de sinergismos foram: ebselen + voriconazol; tobramicina + voriconazol; moxifloxacina + anfotericina B ou voriconazol; e timol + anfotericina B ou caspofungina.

Apesar das altas taxas de sinergismos obtidas pelas combinações antifúngicas envolvendo os compostos orgânicos de selênio (disseleneto de difenila e ebselen) ou os fitocompostos (carvacrol e timol), os fármacos não antifúngicos possuem vantagens em relação aos quimiossensibilizantes anteriores, pois apresentam parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos conhecidos. Os agentes antimicrobianos (tobramicina, polimixina B, pentamidina e moxifloxacina) demonstraram potente atividade quimiossensibilizante em combinação com anfotericina B ou voriconazol. Visto que, pacientes imunocomprometidos

são suscetíveis a infecções bacterianas e fúngicas (incluindo a fusariose), a terapia combinada entre agentes antimicrobianos e antifúngicos é uma alternativa atraente a ser investigada.

Considerando que a prevalência da fusariose tem aumentado significativamente, e que a estratégia terapêutica ideal não está estabelecida, este estudo propôs novas opções de atividade antifúngica combinada a serem investigadas. As combinações mais sinérgicas requerem avaliação *in vitro* através de outras metodologias (por exemplo, curvas de morte), e posteriormente, em modelos experimentais *in vivo*, visando aportes para o limitado tratamento da fusariose.

7 CONCLUSÃO

* Através da avaliação da suscetibilidade *in vitro* das espécies de *Fusarium* aos agentes antifúngicos convencionais, concluiu-se que a anfotericina B é o antifúngico mais ativo, seguido pelo voriconazol. *F. solani* e *F. verticillioides* demonstraram as maiores CIMs para estes antifúngicos. Além disso, o itraconazol e a caspofungina foram ineficazes para todas as espécies de *Fusarium*. Estes achados estão em conformidade com outros estudos.

* A suscetibilidade de *Fusarium* spp. frente aos agentes quimiossensibilizantes demonstrou que o disseleneto de difenila, ebselen, pentamidina e polimixina B possuem atividade antifúngica contra este gênero. Os demais agentes não antifúngicos testados (amiodarona, doxiciclina, moxifloxacina, tigeciclina e tobramicina) não possuem atividade nas concentrações testadas. Os fitocompostos (cinamaldeído, carvacrol e timol) demonstraram altas CIMs para estas espécies, portanto, estes não possuem atividade significativa contra *Fusarium* spp., isoladamente.

* Os compostos orgânicos de selênio demonstraram atividade quimiossensibilizante quando combinados a agentes antifúngicos. As combinações mais sinérgicas foram: ebselen + anfotericina B (88%) ou voriconazol (80%), disseleneto de difenila + anfotericina B (72%) ou voriconazol (64%). As combinações com caspofungina resultaram em pequenas taxas de sinergismos, enquanto que, as combinações com itraconazol resultaram em indiferença.

* Todos os fármacos não antifúngicos testados possuem capacidade quimiossensibilizante combinados a anfotericina B ou voriconazol. As maiores taxas de sinergismos foram observadas para as seguintes combinações: tobramicina + anfotericina B (80%) ou voriconazol (76%); polimixina B + anfotericina B (76%) ou voriconazol (64%); pentamidina + anfotericina B (72%) ou voriconazol (68%); amiodarona + anfotericina B (64%) ou voriconazol (76%); e moxifloxacina + anfotericina B (72%) ou voriconazol (60%). A doxiciclina e a tigeciclina apresentaram menor potencial quimiossensibilizante. Amiodarona, pentamidina, polimixina B e tobramicina apresentaram pequenas taxas de sinergismos combinadas a caspofungina. Todas as combinações com itraconazol resultaram em interações indiferentes.

* Os fitocompostos, carvacrol e timol, apresentaram potente atividade quimiossensibilizante em combinação com a caspofungina (88% e 96%, respectivamente). Além disso, estes compostos também apresentaram sinergismos em combinação com anfotericina B ou voriconazol: timol ou carvacrol + anfotericina B (76% e 68%, respectivamente); e timol ou carvacrol + voriconazol (68% e 60%, respectivamente). O cinamaldeído demonstrou menor potencial quimiossensibilizante. As combinações com itraconazol resultaram em menores taxas de sinergismos.

REFERÊNCIAS

- ABBASZADEH, S. et al. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. **J Mycol Med**, v. 24, n. 2, p. e51-56, 2014.
- AFELTRA, J. et al. *In vitro* synergistic interaction between amphotericin B and pentamidine against *Scedosporium prolificans*, **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 10, p. 3323-3326, 2002 a.
- AFELTRA, J. et al. *In vitro* activities of pentamidine, pyrimethamine, trimethoprim, and sulfonamides against *Aspergillus* species. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 6, p. 2029-2031, 2002 b.
- AFELTRA, J. et al. Potent synergistic *in vitro* interaction between nonantimicrobial membrane-active compounds and itraconazole against clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* resistant to itraconazole. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 4, p. 1335-1343, 2004.
- AFELTRA, J.; VERWEIJ, P. E. Antifungal activity of nonantifungal drugs. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 22, n. 7, p. 397-407, 2003.
- AHMAD, A. et al. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1157-1162, 2010.
- AHMAD, A. et al. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 30, n. 1, p. 41-50, 2011.
- AHMAD, A.; KHAN, A.; MANZOOR, N. Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. **Eur J Pharm Sci**, v. 48, n. 1-2, p. 80-86, 2013.
- AJELLO, L. Hyalohyphomycoses and phaeohyphomycosis: two global disease entities of public health importance. **Eur J Epidemiol**, v. 2, n. 4, p. 243-251, 1986.
- ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. et al. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. **J Antimicrob Chemother**, v. 61, n. 4, p. 805-809, 2008.
- ALFONSO, E.; MILLER, D. Impact of 4th generation fluoroquinolones on growth rate and detection time of fungal pathogens. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 46, E-Abstract 2766, 2005.
- AL-HATMI, A. M. S. et al. Specific antifungal susceptibility profiles of opportunists in the *Fusarium fujikuroi* complex. **J Antimicrob Chemother**, v. 70, n. 4, p. 1068-1071, 2015.
- AL-HATMI, A. M. S.; MEIS, J. F.; DE HOOG, G. S. *Fusarium*: molecular diversity and intrinsic drug resistance. **Plos Pathog**, v. 12, n. 4, e1005464, 2016.

ANAÏSSIE, E. J.; RINALDI, M. G. *Fusarium* and the immunocompromised host: liaisons dangereuses. **N Y State J Med**, v. 90, n. 12, p. 586-587, 1990.

APOSTOLIDIS, J. et al. Resolution of fungemia due to *Fusarium* species in a patient with acute leukemia treated with caspofungin. **Clin Infect Dis**, v. 36, n. 10, p.1349-1350, 2003.

ARIKAN, S. et al. Microdilution susceptibility testing of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* and *Fusarium* species. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 12, p.3946-3951, 1999.

ARIKAN, S. et al. *In vitro* synergy of caspofungin and amphotericin B against *Aspergillus* and *Fusarium* spp. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 1, p.245-247, 2002.

ASHLEY, E. S. D. Pharmacology of Azole Antifungal Agents. In: GHANNOUM, M. A.; PERFECT, J. R. (Coord.). **Antifungal Therapy**. 1. ed. New York: Informa Healthcare USA, 2010, cap. 12, p. 199-218.

AVELINO-SILVA, V. I. et al. Disseminated *Fusarium* infection in autologous stem cell transplant recipient. **Braz J Infect Dis**, v. 19, n. 1, p. 90-93, 2015.

AZOR, M. et al. *In vitro* antifungal susceptibility and molecular characterization of clinical isolates of *Fusarium verticillioides* (*F. moliniforme*) and *Fusarium thapsinum*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 6, p. 2228-2231, 2008.

BAGAR, T.; BENCINA, M. Antiarrhythmic drug amiodarone displays antifungal activity, induces irregular calcium response and intracellular acidification of *Aspergillus niger*-Amiodarone targets calcium and pH homeostasis of *A. niger*. **Fungal Genet Biol**, v. 49, n. 10, p. 779-791, 2012.

BANG, K. H. et al. Inhibition of fungal cell wall synthesizing enzymes by trans-cinnamaldehyde. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 64, n. 5, p. 1061-1063, 2000.

BARCHIESI, F. et al. Effect of pentamidine on the growth of *Cryptococcus neoformans*. **J Antimicrob Chemother**, v. 33, n. 6, p. 1229-1232, 1994.

BERTHILLER, F. et al. Masked mycotoxins: a review. **Mol Nutr Food Res**, v. 57, n. 1, p. 165-186, 2013.

BI, X. et al. The global gene expression profile of the model fungus *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol. **J Appl Microbiol**, v. 108, n. 2, p. 712-722, 2010.

BILLACK, B.; SANTORO, M.; LAU-CAM, C. Growth inhibitory action of ebselen on fluconazole-resistant *Candida albicans*: role of the plasma membrane H⁺-ATPase. **Microb Drug Resist**, v. 15, n. 2, p. 77-83, 2009.

BOURGUIGNON, R. L. et al. *Fusarium* species osteomyelitis. Case report. **J Bone Joint Surg Am**, v. 58, n. 5, p. 722-723, 1976.

BOUTATI, E. I.; ANAISSIE, E. J. *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years' experience at a cancer center and implications for management. **Blood**, v. 90, n. 3, p. 999-1008, 1997.

BROZEK, J. L. et al. Grading quality of evidence and strength of recommendations in clinical practice guidelines part 3 of 3. The GRADE approach to developing recommendations. **Allergy**, v. 66, n. 5, p. 588-595, 2011.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

CALIXTO, J. B. et al. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacol Ther**, v. 106, n. 2, p. 179-208, 2005.

CAMPBELL, B. C.; CHAN, K. L.; KIM, J. H. Chemosensitization as a means to augment commercial antifungal agents. **Front Microbiol**, v. 3, p. 79, 2012.

CAMPO, M.; LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. Invasive fusariosis in patients with hematologic malignancies at a cancer center: 1998-2009. **J Infect**, v. 60, n. 5, p. 331-337, 2010.

CARNEIRO, H. A. et al. *Fusarium* infection in lung transplant patients: report of 6 cases and review of the literature. **Medicine**, v. 90, n. 1, p. 69-80, 2011.

CHAMI, F. et al. Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. **J Antimicrob Chemother**, v. 54, n. 5, p. 909-914, 2004.

CHAMI, N. et al. Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol *in vitro* and *in vivo*. **Oral Microbiol Immunol**, v. 20, n. 2, p. 106-111, 2005.

CHAN, G. et al. Evaluation of the antimicrobial activity of ebselen: role of the yeast plasma membrane H⁺-ATPase. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 21, n. 5, p. 252-264, 2007.

CHODOSH, J. et al. Tobramycin-responsive *Fusarium oxysporum* keratitis. **Can J Ophthalmol**, v. 35, n. 1, p. 29-30, 2000.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 65, n. 2, p. 232-260, 2001.

CHOWDHARY, A. et al. Emergence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains due to agricultural azole use creates an increasing threat to human health. **Plos Pathog**, v. 9, n. 10, e1003633, 2013.

CLANCY, C. J.; NGUYEN, M. H. The combination amphotericin B and azithromycin as a potential new therapeutic approach to fusariosis. **J Antimicrob Chemother**, v. 41, n. 1, p. 127-130, 1998.

- CLANCY, C. J. et al. Inhibition of RNA synthesis as a therapeutic strategy against *Aspergillus* and *Fusarium*: demonstration of *in vitro* synergy between rifabutin and amphotericin B. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 3, p. 509-513, 1998.
- CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi**; Approved standard-second edition, M38-A2. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA, 2008.
- CÓRDOBA, S. et al. *In vitro* interactions of antifungal agents against clinical isolates of *Fusarium* spp. **Int J Antimicrob Agents**, v. 31, n. 2, p. 171-174, 2008.
- COURCHESNE, W. E. Characterization of a novel, broad-based fungicidal activity for the antiarrhythmic drug amiodarone. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 300, n. 1, p. 195-199, 2002.
- COURCHESNE, W. E.; OZTURK, S. Amiodarone induces a caffeine-inhibited, MID1-dependent rise in free cytoplasmic calcium in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Microbiol**, v. 47, n. 1, p. 223-234, 2003.
- COURCHESNE, W. E.; TUNC, M.; LIAO, S. Amiodarone induces stress responses and calcium flux mediated by the cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. **Can J Microbiol**, v. 55, n. 3, p. 288-303, 2009.
- CUENCA-ESTRELLA, M. et al. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 3, p. 917-921, 2006.
- DALHOFF, A. Pleiotropic actions of aminoglycosides. **Antibiot Chemother**, v. 39, p. 182-204, 1987.
- DALHOFF, A.; SHALIT, I. Immunomodulatory effects of quinolones. **Lancet Infect Dis**, v. 3, n. 6, p. 359-371, 2003.
- DALLEAU, S. et al. *In vitro* activity of terpenes against *Candida* biofilms. **Int J Antimicrob Agents**, v. 31, n. 6, p. 572-576, 2008.
- DAMBOLENA, J. S. et al. Inhibitory effect of cyclic terpenes (limonene, menthol, menthone and thymol) on *Fusarium verticillioides* MRC 826 growth and fumonisin B1 biosynthesis. **Toxicon**, v. 51, n. 1, p. 37-44, 2008.
- DAMBOLENA, J. S. et al. Inhibitory effect of 10 natural phenolic compounds on *Fusarium verticillioides*. A structure-property-activity relationship study. **Food Control**, v. 28, n. 1, p. 163-170, 2012.
- DAY, S. et al. Activity of antibiotics against *Fusarium* and *Aspergillus*. **Br J Ophthalmol**, v. 93, n. 1, p. 116-119, 2009.
- DEANS, S. G.; SUBOTA, K. P.; KENNEDY, A. I. Biological activity of plant volatile oils and their constituents. **Planta Med**, v. 55, n. 7, p. 588, 1989.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; FIGUERAS, M. J.; GENÉ, J. **Atlas of Clinical Fungi**. 2. ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain, 2000.

DEL POETA, M. et al. Structure-*in vitro* activity relationships of pentamidine analogues and dication-substituted bis-benzimidazoles as new antifungal agents. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 10, p. 2495-2502, 1998.

DENARDI, L. B. et al. Antifungal activities of diphenyl diselenide alone and in combination with fluconazole or amphotericin B against *Candida glabrata*. **Mycopathologia**, v. 176, n. 1-2, p. 165-169, 2013.

DENARDI, L. B. et al. Synergistic effects of tacrolimus and azole antifungal compounds in fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant *Candida glabrata* isolates. **Braz J Microbiol**, v. 46, n. 1, p. 125-129, 2015.

DEREN, Y. T. et al. Comparison of antifungal efficacies of moxifloxacin, liposomal amphotericin B, and combination treatment in experimental *Candida albicans* endophthalmitis in rabbits. **Can J Microbiol**, v. 56, n. 1, p. 1-7, 2010.

DIDRY, N.; DUBREUIL, L.; PINKAS, M. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. **Pharm Acta Helv**, v. 69, n. 1, p. 25-28, 1994.

DIGNANI, M. C. et al. Treatment of neutropenia-related fungal infections with granulocyte colony-stimulating factor-elicited white blood cell transfusions: a pilot study. **Leukemia**, v. 11, n. 10, p. 1621-1630, 1997.

DIGNANI, M. C.; KIWAN, E. N.; ANAISSIE, E. J. Hyalohyphomycoses. In: ANAISSIE, E.; MCGINNIS, M. R.; PFALLER, M. A. (Coord.). **Clinical Mycology**. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2003, p. 309-324.

DIXON, D. M.; WALSH, T. J. Antifungal agents. In: BARON, S. (Coord.). **Medical Microbiology**. 4. ed. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996, cap. 76.

DOKE, S. K. et al. Sensitization of *Candida albicans* biofilms to fluconazole by terpenoids of plant origin. **J Gen Appl Microbiol**, v. 60, n. 5, p. 163-168, 2014.

DREW, R. H. Flucytosine. In: GHANNOUM, M. A.; PERFECT, J. R. (Coord.). **Antifungal Therapy**. 1. ed. New York: Informa Healthcare USA, 2010, cap. 11, p. 184-198.

DURAND-JOLY, I. et al. Successful outcome of disseminated *Fusarium* infection with skin localization treated with voriconazole and amphotericin B lipid complex in a patient with acute leukemia. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 10, p. 4898-4900, 2003.

EL-AHMADY, S.; EL-SHAZLY, M.; MILAD, R. The synergetic efficacy of the combination of amphotericin B and certain essential oils against selected fungal clinical isolates. **J App Pharma Sci**, v. 3, n. 4, p. 26-30, 2013.

EL-AZIZI, M. Enhancement of the *in vitro* activity of amphotericin B against the biofilms of non-albicans *Candida* spp. by rifampicin and doxycycline. **J Med Microbiol**, v. 56, n. 5, p. 645-649, 2007.

ENGMAN, L.; HALLBERG, A. Expedient synthesis of ebselen and related compounds. **J Org Chem**, v. 54, n. 12, p. 2964-2966, 1989.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. Optimal testing conditions for determining MICs and minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborative study. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 10, p. 3776-3781, 2002.

FALLA, T. J.; KARUNARATNE, D. N.; HANCOCK, R. E. Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. **J Biol Chem**, v. 271, n. 32, p. 19298-19303, 1996.

FAN, J. et al. Characterization of the sterol 14 α -demethylases of *Fusarium graminearum* identifies a novel genus-specific CYP51 function. **New Phytol**, v. 198, n. 3, p. 821-835, 2013.

FARIA, N. C. et al. Enhanced activity of antifungal drugs using natural phenolics against yeast strains of *Candida* and *Cryptococcus*. **Lett Appl Microbiol**, v. 52, n. 5, p. 506-513, 2011.

FIORI, A.; VAN DIJCK, P. Potent synergistic effect of doxycycline with fluconazole against *Candida albicans* is mediated interference with iron homeostasis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 7, p. 3785-3796, 2012.

FISCHER, N. L. et al. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. **Phytopathology**, v. 72, n. 1, p. 151-153, 1982.

FLEMING, R. V.; WALSH, T. J.; ANAISSIE, E. J. Emerging and less common fungal pathogens. **Infect Dis Clin North Am**, v. 16, n. 4, p. 915-933, 2002.

FLYNN, J. T. et al. *Fusarium* peritonitis in a child on peritoneal dialysis: case report and review of the literature. **Perit Dial Int**, v. 16, n. 1, p. 52-57, 1996.

GABRIELE, P.; HUTCHINS, R. K. *Fusarium* endophthalmitis in an intravenous drug abuser. **Am J Ophthalmol**, v. 122, n. 1, p. 119-121, 1996.

GAMARRA, S. et al. Mechanism of the synergistic effect of amiodarone and fluconazole in *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 5, p. 1753-1761, 2010.

GAO, Y. et al. Synergistic effect of fluconazole and doxycycline against *Candida albicans* biofilms resulting from calcium fluctuation and downregulation of fluconazole-inducible efflux pump gene overexpression. **J Med Microbiol**, v. 63, p. 956-961, 2014.

GARNICA, M.; NUCCI, M. Emerging Fungal Infections. **Ann Nestlé**, v. 67, p. 133-139, 2009.

GEISER, D. M. et al. One Fungus, One Name: defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use. **Phytopathology**, v. 103, n. 5, p. 400-408, 2013.

GHANNOUM, M. A. et al. Combinations of antifungal and antineoplastic drugs with interactive effects on inhibition of yeast growth. **Chemotherapy**, v. 36, n. 4, p. 308-320, 1990.

GIAMPERI, L.; FRATERNALE, D.; RICCI, D. The *in vitro* action of essential oils on different organisms. **J Essential Oil Res**, v. 14, n. 4, p. 312-318, 2002.

GIORDANI, R. et al. Potentiation of antifungal activity of amphotericin B by essential oil from *Cinnamomum cassia*. **Phytother Res**, v. 20, n. 1, p. 58-61, 2006.

GUARRO, J. Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 32, n. 12, p. 1491-1500, 2013.

GUARRO, J.; GENÉ, J. *Fusarium* infections. Criteria for the identification of the responsible species. **Mycoses**, v. 35, n. 5-6, p. 109-114, 1992.

GUARRO, J.; GENÉ, J. Opportunistic fusarial infections in humans. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 14, n. 9, p. 741-754, 1995.

GUARRO, J.; PUJOL, I.; MAYAYO, E. *In vitro* and *in vivo* experimental activities of antifungal agents against *Fusarium solani*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 5, p. 1256-1257, 1999.

GUBBINS, P. O.; ANAISSIE, E. J. Antifungal therapy. In: ANAISSIE, E. J.; MCGINNIS, M. R. et al. (Coord.). **Clinical Mycology**. 2. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier, 2009. cap. 7, p. 161-195.

GUO, N. et al. Antifungal activity of thymol against clinical isolates of fluconazole-sensitive and -resistant *Candida albicans*. **J Med Microbiol**, v. 58, n. 8, p. 1074-1079, 2009.

GUO, Q. et al. Synergistic activity of azoles with amiodarone against clinically resistant *Candida albicans* tested by checkerboard and time-kill methods. **J Med Microbiol**, v. 57, n. 4, p. 457-462, 2008.

GUPTA, A. K.; KOHU, Y.; BATRA, R. *In vitro* activities of posaconazole, ravuconazole, terbinafine, itraconazole and fluconazole against dermatophyte, yeast and non-dermatophyte species. **Med Mycol**, v. 43, n. 2, p. 179-185, 2005.

GUPTA, S. S. et al. Antifungal activity of amiodarone is mediated by disruption of calcium homeostasis. **J Biol Chem**, v. 278, n. 31, p. 28831-28839, 2003.

GUZMAN-COTTRILL, J. A.; ZHENG, X.; CHADWICK, E. G. *Fusarium solani* endocarditis successfully treated with liposomal amphotericin B and voriconazole. **Pediatr Infect Dis J**, v. 23, n. 11, p. 1059-1061, 2004.

HAWKSWORTH, D. L. A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names. **IMA Fungus**, v. 2, n. 2, p. 155-162, 2011.

- HELM, T. N. et al. Case report and review of resolved fusariosis. **J Am Acad Dermatol**, v. 23, n. 2, p. 393-398, 1990.
- HEYN, K. et al. Effect of voriconazole combined with micafungin against *Candida*, *Aspergillus*, and *Scedosporium* spp. and *Fusarium solani*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 12, p. 5157-5159, 2005.
- HO, D. Y. et al. Treating disseminated fusariosis: amphotericin B, voriconazole or both? **Mycoses**, v. 50, n. 3, p. 227-231, 2007.
- HOMA, M. et al. Antifungal effect of essential oils against *Fusarium* keratitis isolates. **Planta Med**, v. 81, n. 14, p. 1277-1284, 2015.
- HUGHES, C. E. et al. Enhancement of the *in vitro* activity of amphotericin B against *Aspergillus* spp. by tetracycline analogs. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 26, n. 6, p. 837-840, 1984.
- INOUYE, S.; YAMAGUCHI, H.; TAKIZAWA, T. Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. **J Infect Chemother**, v. 7, n. 4, p. 251-254, 2001.
- JAKLE, C. et al. Septic arthritis due to *Fusarium solani*. **J Rheumatol**, v. 10, n. 1, p. 151-153, 1983.
- JESUS, F. P. et al. *In vitro* synergism observed with azithromycin, clarithromycin, minocycline, or tigecycline in association with antifungal agents against *Pythium insidiosum*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.58, n. 9, p. 5621-5625, 2014.
- JESUS, F. P. et al. *In vitro* activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. **J Mycol Med**, v. 25, n. 2, p. 89-93, 2015.
- JIMÉNEZ-MEJÍAS, M. E. et al. Cerebrospinal fluid penetration and pharmacokinetic/ pharmacodynamic parameters of intravenously administered colistin in a case of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 21, n. 3, p. 212-214, 2002.
- JOHNSON, M. D. et al. Combination antifungal therapy. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, n. 3, p. 693-715, 2004.
- JOHNSON, M. D.; MOHR, J. Echinocandins for Prevention and Treatment of Invasive Fungal Infections. In: GHANNOUM, M. A.; PERFECT, J. R. (Coord.). **Antifungal Therapy**. 1. ed. New York: Informa Healthcare USA, 2010, cap. 13, p. 219-242.
- KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Curr Med Chem**, v. 10, n. 10, p. 813-829, 2003.
- KATIYAR, S. K.; EDLIND, T. D. Role for Fks1 in the intrinsic echinocandin resistance of *Fusarium solani* as evidenced by hybrid expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 5, p. 1772-1778, 2009.

KAWAKAMI, H. et al. Inhibitory effects of antimicrobial agents against *Fusarium* species. **Med Mycol**, v. 53, n. 6, p. 603-611, 2015.

KHAN, M. S.; AHMAD, I. Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 90, n. 3, p. 1083-1094, 2011.

KHAN, M. S.; AHMAD, I. Antibiofilm activity of certain phytochemicals and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 3, p. 618-621, 2012.

KHAN, Z. K.; JAIN, P. Antifungal agents and immunomodulators in systemic mycoses. **Indian J Chest Dis Allied Sci**, v. 42, n. 4, p. 345-355, 2000.

KHAN, M. S.; MALIK, A.; AHMAD, I. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. **Med Mycol**, v. 50, n. 1, p. 33-42, 2012.

KHAN, A. et al. Effect of two monoterpene phenols on antioxidant defense system in *Candida albicans*. **Microb Pathog**, v. 80, p. 50-56, 2015.

KIM, J. et al. Chemosensitization prevents tolerance of *Aspergillus fumigatus* to antimycotic drugs. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 372, n. 1, p. 266-271, 2008.

KIM, J. H. et al. Augmenting the activity of antifungal agents against aspergilli using structural analogues of benzoic acid as chemosensitizing agents. **Fungal Biol**, v. 114, n. 10, p. 817-824, 2010.

KLARIC, M. S. et al. Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. **Lett Appl Microbiol**, v. 44, n. 1, p. 36-42, 2007.

KLASSEN, G. R.; BALCERZAK, M.; DE COCK, A. W. A. M. 5 S ribosomal RNA gene spacer as species specific probes for eight species of *Pythium*. **Phytopathol**, v. 86, n. 6, p. 581-587, 1996.

KREDICS, L. et al. Filamentous fungal infections of the cornea: a global overview of epidemiology and drug sensitivity. **Mycoses**, v. 58, n. 4, p. 243-260, 2015.

KU, T. S.; PALANISAMY, S. K.; LEE, S. A. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms to azithromycin, tigecycline and vancomycin and interaction between tigecycline and antifungals. **Int Journal Antimicrob Agents**, v. 36, n. 5, p. 441-446, 2010.

KULLBERG, B. J.; OUDE LASHOF, A. M. Epidemiology of opportunistic invasive mycoses. **Eur J Med Res**, v. 7, n. 5, p. 183-191, 2002.

KURIEN, M. et al. Maxillary sinus fusariosis in immunocompetent hosts. **J Laryngol Otol**, v. 106, n. 8, p. 733-736, 1992.

LABOIS, A.; GRAY, C.; LEPRETE, S. Successful treatment of disseminated fusariosis with voriconazole in an acute lymphoblastic leukaemia patient. **Mycoses**, v. 54, n. 4, p. 8-11, 2011.

LACKNER, M. Species-specific antifungal susceptibility patterns of *Scedosporium* and *Pseudallescheria* species. **Antimicrob Agents Chemother** v. 56, n. 5, p. 2635-2642, 2012.

LEWIS, R. et al. Progressive fusariosis: unpredictable posaconazole bioavailability, and feasibility of recombinant interferon-gamma plus granulocyte macrophage-colony stimulating factor for refractory disseminated infection. **Leuk Lymphoma**, v. 49, n. 1, p. 163-165, 2008.

LI, H. et al. Nanocapsular dispersion of cinnamaldehyde for enhanced inhibitory activity against aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6022-6032, 2015.

LI, L. et al. *In vitro* evaluation of combination antifungal activity against *Fusarium* species isolated from ocular tissues of keratomycosis patients. **Am J Ophthalmol**, v. 146, n. 5, p.724-728, 2008.

LIONAKIS, M. S. et al. Pentamidine is active *in vitro* against *Fusarium* species. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 10, p. 3252-3259, 2003.

LIONAKIS, M. S. et al. Pentamidine is active in a neutropenic murine model of acute invasive pulmonary fusariosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 1, p. 294-297, 2006.

LIU, J. Y. et al. Combination antifungal therapy for disseminated fusariosis in immunocompromised patients: a case report and literature review. **Med Mycol**, v. 49, n. 8, p. 872-878, 2011.

LÓPEZ-MALO, A. et al. Mixtures of natural and synthetic antifungal agents. **Adv Exp Med Biol**, v. 571, p. 261-286, 2006.

LORETO, E. S. et al. *In vitro* antifungal evaluation and structure-activity relationship of diphenyl diselenide and synthetic analogues. **Mycoses**, v. 54, n. 5, p. 572-576, 2011 a.

LORETO, E. S. et al. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to macrolides and tetracycline antibiotics. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 7, p.3588-3590, 2011 b.

LORETO, E. S. et al. Diphenyl diselenide *in vitro* and *in vivo* activity against the oomycete *Pythium insidiosum*. **Vet Microbiol**, v. 156, n. 1-2, p. 222-226, 2012.

LORTHOLARY, O. et al. International retrospective analysis of 73 cases of invasive fusariosis treated with voriconazole. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 10, p. 4446-4450, 2010.

LUDEWING, G. et al. Effects of pentamidine isethionate on *Saccharomyces cerevisiae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 38, n. 5, p. 1123-1128, 1994.

MAHL, D. L. et al. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* isolates to aminoglycoside antibiotics and tigecycline. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 7, p. 4021-4023, 2012.

MAIORINO, M.; ROVERI, A.; URSINI, F. Antioxidant effect of ebselen (PZ 51): peroxidase mimetic activity on phospholipid and cholesterol hydroperoxides vs free radical scavenger activity. **Arch Biochem Biophys**, v. 295, n. 2, p. 404-409, 1992.

MAKOWSKY, M. J.; WARKENTIN, D. I.; SAVOIE, M. L. Caspofungin and amphotericin B for disseminated *Fusarium verticillioides* in leukemia. **Ann Pharmacother**, v. 39, n. 7-8, p.1365-1366, 2005.

MANOHAR, V. et al. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. **Mol Cell Biochem**, v. 228, n. 1/2, p. 111-117, 2001.

MICELI, M. H.; BERNARDO, S. M.; LEE, S. A. *In vitro* analyses of the combination of high-dose doxycycline and antifungal agents against *Candida albicans* biofilms. **Int J Antimicrob Agents**, v. 34, n. 4, p. 326-332, 2009.

MIGHELI, Q. et al. Molecular phylogenetic diversity of dermatologic and other human pathogenic fusarial isolates from hospitals in northern and central Italy. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 4, p. 1076-1084, 2010.

MILETTI, K. E.; LEIBOWITZ, M. J. Pentamidine inhibition of group I intron splicing in *Candida albicans* correlates with growth inhibition. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 4, p. 958-966, 2000.

MÖLLER, E. M. et al. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Res**, v. 20, n. 22, p. 6115-6116, 1992.

MONEIB, N. A. *In vitro* activity of commonly used antifungal agents in the presence of rifampin, polymyxin B and norfloxacin against *Candida albicans*. **J Chemother**, v. 7, n. 6, p. 525-529, 1995.

MOODY, J. Synergism testing: broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: GARCIA, L. S.; ISENBERG, H. D. (Coord.). **Clinical microbiology procedures handbook**. 2. ed. Washington: ASM Press, 2007. p. 1-23.

MORRIS-JONES, S. D.; EASTERBROOK, P. J. Current issues in the treatment and prophylaxis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV infection. **J Antimicrob Chemother**, v. 40, n. 3, p. 315-318, 1997.

MUGESH, G.; DU MONT, W. W.; SIES, H. Chemistry of biologically importante synthetic organoselenium compounds. **Chem Rev**, v. 101, n. 7, p. 2125-2179, 2001.

MUHAMMED, M. et al. The challenge of managing fusariosis. **Virulence**, v. 2, n. 2, p. 91-96, 2011.

MULLER, A. et al. A novel biologically active selenoorganic compound. I. Glutathione peroxidase-like activity *in vitro* and antioxidant capacity of PZ 51 (ebselen). **Biochem Pharmacol**, v.33, n. 20, p.3235-3239, 1984.

- MUNIR, W. M. et al. Clinical response of contact lens-associated fungal keratitis to topical fluoroquinolone therapy. **Cornea**, v. 26, n. 5, p. 621-624, 2007.
- MURRAY, C. K., BECKIUS, M. L.; MCALLISTER, K. *Fusarium proliferatum* superficial suppurative thrombophlebitis. **Mil Med**, v. 168, n. 5, p.426-427, 2003.
- NAKAJIMA, R. et al. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of DU-6859a, a fluoroquinolone, in combination with amphotericin B and fluconazole against pathogenic fungi. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 7, p. 1517-1521, 1995.
- NARAJI, C.; KARVEKAR, M. D.; DAS, A. K. Biological importance of organoselenium compounds. **Indian J Pharm Sci**, v. 69, n. 3, p. 344-351, 2007.
- NELSON, P. E.; DIGNANI, M. C.; ANAISSIE, E. J. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. **Clin Microbiol Rev**, v. 7, n. 4, p.479-504, 1994.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J Nat Prod**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.
- NICHOLLS, M. W. Polymyxin sensitivity of *Candida tropicalis*. **J Med Microbiol**, v. 3, n. 3, p. 529-538, 1970.
- NOGUEIRA, C. W. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. **Inflamm Res**, v. 52, n. 2, p. 56-63, 2003.
- NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. Diphenyl diselenide a janus-faced molecule. **J Brazil Chem Soc**, v. 21, n. 11, p. 2055-2071, 2010.
- NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chem Rev**, v. 104, n. 12, p. 6255-6285, 2004.
- NOLAN, A. et al. The effect of nebulised pentamidine on the concentration of intra-oral *Candida albicans* in HIV-infected patients. **J Med Microbiol**, v. 41, n. 2, p. 95-97, 1994.
- NOSKIN, G. A. Tigecycline: a new glycycline for treatment of serious infections. **Clin Infect Dis**, v. 41, n. 5, p. S303-314, 2005.
- NOSTRO, A.; PAPALIA, T. Antimicrobial activity of carvacrol: current progress and future prospective. **Recent Pat Antiinfect Drug Discov**, v. 7, n. 1, p. 28-35, 2012.
- NUCCI, M.; ANAISSIE, E. Cutaneous infection by *Fusarium* species in healthy and immunocompromised hosts: implications for diagnosis and management. **Clin Infect Dis**, v. 35, n. 8, p. 909-920, 2002.
- NUCCI, M.; ANAISSIE, E. Emerging fungi. **Infect Dis Clin North Am**, v. 20, n. 3, p. 563-579, 2006.
- NUCCI, M.; ANAISSIE, E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 4, p. 695-704, 2007.

- NUCCI, M. et al. *Fusarium* infection in hematopoietic stem cell transplant recipients. **Clin Infect Dis**, v. 38, n. 9, p. 1237-1242, 2004.
- NUCCI, M. et al. Improvement in the outcome of invasive fusariosis in the last decade. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 6, p. 580-585, 2014.
- NUCCI, M. et al. Invasive fungal diseases in haematopoietic cell transplant recipients and in patients with acute myeloid leukaemia or myelodysplasia in Brazil. **Clin Microbiol Infect**, v. 19, n. 8, p. 745-751, 2013.
- NUCCI, M. et al. Outcome predictor of 84 patients with hematologic malignancies and *Fusarium* infection. **Cancer**, v.98, n. 2, p. 315-319, 2003.
- O'DONNELL, K. et al. Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 10, p. 3708-3718, 2010.
- OOI, L. S. et al. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. **Am J Chin Med**, v. 34, n. 3, p. 511-522, 2006.
- ORTONEDA, M. et al. *In vitro* interactions of licensed and novel antifungal drugs against *Fusarium spp.* **Diag Microbiol Infect Dis**, v. 48, n. 1, p. 69-71, 2004.
- OZDEK, S. C. et al. W. *In vitro* antifungal activity of the fourth generation fluoroquinolones against *Candida* isolates from human ocular infections. **Ocul Immunol Inflamm**, v. 14, n. 6, p. 347-351, 2006.
- PANKEY, G. Tigecycline. **J Antimicrob Chemother**, v. 56, n. 3, p. 470-480, 2005.
- PAULI, A. Antimicrobial properties of essential oil constituents. **Int J Aromather**, v. 11, n. 3, p. 126-133, 2001.
- PAULMIER, C. Selenoorganic functional groups. In: PAULMIER, C. (Coord.). **Selenium reagents and intermediates in organic synthesis**. 1. ed. Oxford: Pergamon Press, 1986, p. 25-57.
- PÉMAN, J.; SALAVERT, M. Enfermedad fúngica invasora por *Scedosporium*, *Fusarium* y *Mucor*. **Rev Iberoam Micol**, v. 31, n. 4, p. 242-248, 2014.
- PÉREZ-ALFONSO, C. O. et al. The effects of essential oils carvacrol and thymol on growth of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* involved in lemon decay. **Int J Food Microbiol**, v. 158, n. 2, p. 101-106, 2012.
- PESTOVA, E. et al. Intracellular targets of moxifloxacin: a comparison with other fluoroquinolones. **J Antimicrob Chemother**, v. 45, n. 5, p. 583-90, 2000.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 10, p. 4419-4431, 2004.

- PFALLER, M. A.; PAPPAS, P. G.; WINGARD, J. R. Invasive fungal pathogens: Current epidemiological trends. **Clin Infect Dis**, v. 43, p. S3-S14, 2006.
- PIETSCHMANN, S. et al. Synergistic effects of miconazole and polymyxin B on microbial pathogens. **Vet Res Commun**, v. 33, n. 6, p. 489-505, 2009.
- PILLAI, P.; RAMASWAMY, K. Effect of naturally occurring antimicrobials and chemical preservatives on the growth of *Aspergillus parasiticus*. **J Food Sci Technol**, v. 49, n. 2, p. 228-233, 2012.
- PONTÓN, J. et al. Emerging pathogens. **Med Mycol**, v. 38, n. 1, p. 225-236, 2000.
- PRASAD, T. et al. Unexpected link between iron and drug resistance of *Candida* spp.: iron depletion enhances membrane fluidity and drug diffusion, leading to drug susceptible cells. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 11, p. 3597-3606, 2006.
- PRIGOL, M.; LUCHESE, C.; NOGUEIRA, C. W. Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative stress caused by acute physical exercise in skeletal muscle and lungs of mice. **Cell Biochem Funct**, v. 27, n. 4, p. 216-222, 2009.
- QUINDÓS, G. et al. Actividad antifúngica *in vitro* de voriconazol: nuevos datos después de los primeros años de experiencia clínica. **Rev Iberoam Micol**, v. 24, n. 3, p. 198-209, 2007.
- RAJPUT, S. B.; KARUPPAYIL, S. M. Small molecules inhibit growth, viability and ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. **Springerplus**, v. 2, n. 1, p. 26, 2013.
- RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. Tradução da 5. ed. americana. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.
- RAO, A. et al. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 12, p. 5062-5069, 2010.
- RODRIGUEZ, C. A. et al. Successful treatment of disseminated fusariosis. **Bone Marrow Transplant**, v. 31, n. 5, p. 411-412, 2003.
- ROSA, R. M. et al. Pro-oxidant action of diphenyl diselenide in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ROS-generating conditions. **Life Sci**, v. 77, n. 19, p. 2398-2411, 2005.
- ROSSATO, L. et al. *In vitro* synergistic effects of chlorpromazine and sertraline in combination with amphotericin B against *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*. **Folia Microbiol**, doi 10.1007/s12223-016-0449-8, 2016.
- ROSSETI, I. B.; ROCHA, J. B.; COSTA, M. S. Diphenyl diselenide (PhSe)₂ inhibits biofilm formation by *Candida albicans*, increasing both ROS production and membrane permeability. **J Trace Elem Med Biol**, v. 29, p. 289-295, 2015.
- ROTHER, A. et al. Combination therapy of disseminated *Fusarium oxysporum* infection with terbinafine and amphotericin B. **Ann Hematol**, v. 83, n. 6, p. 394-397, 2004.

RUÍZ-CENDOYA, M.; MARINÉ, M.; GUARRO, J. Combined therapy in treatment of murine infection by *Fusarium solani*. **J Antimicrob Chemother**, v. 62, n. 3, p. 543-546, 2008.

RUÍZ-CENDOYA, M. et al. Interactions between triazoles and amphotericin B in treatment of disseminated murine infection by *Fusarium oxysporum*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 4, p. 1705-1708, 2009.

RYDER, N. S. Terbinafine: mode of action and properties of the squalene epoxidase inhibition. **Br J Dermatol**, v. 126, p. 2-7, 1992.

SAITO, L., et al. Neuroprotective effect of an antioxidant, ebselen, in patients with delayed neurological deficits after aneurismal subarachnoid hemorrhage. **Neurosurgery**, v.42, n. 2, p. 269-278, 1998.

SAMPATHKUMAR, P.; PAYA, C. V. *Fusarium* infection after solid-organ transplantation. **Clin Infect Dis**, v. 32, n. 8, p. 1237-1240, 2001.

SAMSON, R. A.; VON REENEN-HOEKSTRA, E. S. **Introduction to food borne fungi**. 3. ed. Baarn, Delft: Centraalbureau voor Schimmelculturs, 1995.

SANDER, A.; BEYER, U.; AMBERG, R. Systemic *Fusarium oxysporum* infection in an immunocompetent patient with an adult respiratory distress syndrome (ARDS) and extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). **Mycoses**, v. 41, n. 3-4, p.109-111, 1998.

SANDS, M.; KRON, M. A.; BROWN, R. B. Pentamidine: a review. **Rev Infect Dis**, v. 7, n. 5, p. 625-634, 1985.

SASAKI, E. et al. Synergistic effect of ofloxacin and fluconazole against azole-resistant *Candida albicans*. **J Infect Chemother**, v. 6, n. 3, p. 151-154, 2000.

SAVEGNAGO, L. et al. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 21, n. 1, p. 86-92, 2006.

SCHEVEN, M.; SCHEVEN, C. Quantitative screening for fluconazole-amphotericin B antagonism in several *Candida albicans* strains by a comparative agar diffusion assay. **Mycoses**, v. 39, n. 3-4, p.111-114, 1996.

SCHEVEN, M. et al. Post-antibiotic effect and post-expositional polyene antagonism of azole antifungal agents in *Candida albicans*: dependence on substance lipophilia. **Mycoses**, v. 38, n. 11-12, p.435-442, 1995.

SCHWARTZ, S. N. et al. Antifungal properties of polymyxin B and its potentiation of tetracycline as an antifungal agent. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 2, n. 1, p. 36-40, 1972.

SELL, C. Chemistry of essential oils. In: BASER, K. H.; BUCHBAUER, G. (Coord.). **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2010.

- SHABBITS, J. A.; HU, Y.; MAYER, L.D. Tumor chemosensitization strategies based on apoptosis manipulations. **Mol Cancer Ther**, v. 2, n. 8, p. 805-813, 2003.
- SHALIT, I. et al. *In vitro* synergy of caspofungin with licensed and novel antifungal drugs against clinical isolates of *Fusarium* spp. **Med Mycol**, v. 47, n. 5, p. 457-462, 2009.
- SHEN, L. L. et al. DNA topoisomerases from pathogenic fungi: targets for the discovery of antifungal drugs. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 36, n. 12, p. 2778-2784, 1992.
- SHORT, D. P. G. et al. Widespread occurrence of diverse human pathogenic types of the fungus *Fusarium* detected in plumbing drains. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 12, p. 4264-4272, 2011.
- SHREAZ, S. et al. Influences of cinnamic aldehydes on H⁺ extrusion activity and ultrastructure of *Candida*. **J Med Microbiol**, v. 62, n. 2, p. 232-240, 2013.
- SHREAZ, S. et al. Spice oil cinnamaldehyde exhibits potent anticandidal activity against fluconazole resistant clinical isolates. **Fitoterapia**, v. 82, n. 7, p. 1012-1020, 2011.
- SILVA, C. R. da et al. Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 4, p. 1691-1700, 2013.
- SINGH, B. N.; VAUGHAN WILLIAMS, E. M. The effect of amiodarone, a new anti-anginal drug, on cardiac muscle. **Br J Pharmacol**, v. 39, n. 4, p. 657-667, 1970.
- SINGH, H. B. et al. Cinnamon bark oil, a potent fungitoxicant against fungi causing respiratory tract mycoses. **Allergy**, v. 50, n. 12, p. 995-999, 1995.
- SOTEROPOULOS, P. et al. Molecular characterization of the plasma membrane H⁺-ATPase, an antifungal target in *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 9, p. 2349-2355, 2000.
- SOUZA, M. V. N. New fluoroquinolones: a class of potent antibiotics. **Mini Rev Med Chem**, v.5, n. 11, p. 1019-1017, 2005.
- SPADER, T. B. et al. *In vitro* interactions between amphotericin B and other antifungal agents and rifampin against *Fusarium* spp. **Mycoses**, n. 54, n. 2, p. 131-136, 2011.
- SPELLBERG, B. et al. Comparison of antifungal treatments for murine fusariosis. **J Antimicrob Chemother**, v. 58, n. 5, p. 973-979, 2006.
- SPIELBERGER, R. T. et al. Concomitant amphotericin B therapy, granulocyte transfusions, and GM-CSF administration for disseminated infection with *Fusarium* in a granulocytopenic patient. **Clin Infect Dis**, v. 16, n. 4, p. 528-530, 1993.
- STERGIOPOULOU, T. et al. Comparative pharmacodynamic interaction analysis between ciprofloxacin, moxifloxacin and levofloxacin and antifungal agents against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, n. 2, p. 343-348, 2009.

STERGIOPOULOU, T. et al. Isobolographic analysis of pharmacodynamic interactions between antifungal agents and ciprofloxacin against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 6, p. 2196-2204, 2008.

STERN, G. A. *In vitro* antibiotic synergism against ocular fungal isolates. **Am J Ophthalmol**, v. 86, n. 3, p. 359-367, 1978.

ST-GERMAIN, G. Effects of pentamidine alone and in combination with ketoconazole or itraconazole on the growth of *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 34, n. 12, p. 2304-2306, 1990.

ST-GERMAIN, G.; SUMMERBELL, R. C. *Fusarium*. In: ST-GERMAIN, G.; SUMMERBELL, R. C. (Coord.). **Identifying filamentous fungi**. Blemont, CA: Blackwell Science, 1996, p. 122-123.

SUGAR, A. M.; LIU, X. P. Combination antifungal therapy in treatment of murine pulmonary mucormycosis: roles of quinolones and azoles. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 7, p. 2004-2006, 2000.

SUGAR, A. M.; LIU, X. P. Interactions of itraconazole with amphotericin B in the treatment of murine invasive candidiasis. **J Infect Dis**, v. 177, n. 6, p.1660-1663, 1998.

SUGAR, A. M.; LIU, X. P.; CHEN, R. J. Effectiveness of quinolone antibiotics in modulating the effects of antifungal drugs. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, n. 11, p. 2518-2521, 1997.

SUN, Q. et al. Cinnamaldehyde inhibits fungal growth and aflatoxin B1 biosynthesis by modulating the oxidative stress response of *Aspergillus flavus*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 100, n. 3, p. 1355-1364, 2016.

TORRES, H. A.; KONTOYIANNIS, D. P. Hyalohyphomycoses. In: DISMUKES, W. E.; PAPPAS, P. G.; SOBEL, J. D. (Coord.). **Oxford textbook of clinical mycology**. 1. ed. New York: Oxford University Press, 2003.

TORTORANO, A. M. et al. ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 3, p. 27-46, 2014.

TORTORANO, A. M. et al. Species distribution and *in vitro* antifungal susceptibility patterns of 75 clinical isolates of *Fusarium* spp. from Northern Italy. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 7, p. 2683-2685, 2008.

TRACY, J. W.; WEBSTER, L. T. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections. In: MCCURDY, M. J. W. A. P. (Coord.) Goodman & Gilman's. **The pharmacological basis of therapeutics**. New York: McGraw-Hill Companies, p. 999-1001, 1996.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food borne pathogen *Bacillus cereus*. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, n. 4, p. 1561-1568, 2002.

VAGACE, J. M. et al. Resolution of disseminated fusariosis in a child with acute leukemia treated with combined antifungal therapy: a case report. **BMC Infect Dis**, v.7, p. 40-44, 2007.

VANDEN BOSSCHE, H. et al. Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance. **J Med Vet Mycol**, v. 32, p. 189-202, 1994.

VENTURINI, T. P. et al. *In vitro* synergisms obtained by amphotericin B and voriconazole associated with non-antifungal agents against *Fusarium* spp. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 71, n. 2, p. 126-130, 2011.

VERMES, A.; GUCHELAAR, H. J.; DANKERT, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. **J Antimicrob Chemother**, v. 46, n. 2, p. 171-179, 2000.

VIOLLON, C.; CHAUMONT, J. P. Antifungal properties of essential oils and their main components upon *Cryptococcus neoformans*. **Mycopathologia**, v. 128, n. 3, p. 151-153, 1994.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v.16, n. 2-3, p. 97-110, 2009.

WALSH, T. J. et al. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. **Clin Microbiol Infect**, v. 10, n. 1, p. 48-66, 2004.

WASSER, S. et al. Anti-oxidant ebselen causes the resolution of experimentally induced hepatic fibrosis in rats. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 16, n. 11, p. 1244-1253, 2001.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Coord.). **PCR Protocols: a guide to methods and applications**. 1. ed. San Diego: Academic Press, 1990. cap. 38, p. 315-322.

WILHELM, E. A. et al. Studies on preventive effects of diphenyl diselenide on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. **Pathophysiology**, v. 16, n. 1, p. 31-37, 2009.

WINK, M. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multi-component mixtures used in phytomedicine. **Curr Drug Metab**, v. 9, n. 10, p. 996-1009, 2008.

WIRTH, T. Organoselenium chemistry in stereoselective reactions. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 39, n. 21, p. 3740-3749, 2000.

WÓJTOWICZ, H. et al. Azaanalogues of ebselen as antimicrobial and antiviral agents: synthesis and properties. **Farmaco**, v. 59, n. 11, 863-868, 2004.

WÓJTOWICZ, H. et al. Functionalized alkyl and aryl diselenides and antimicrobial and antiviral agents: synthesis and properties. **Farmaco**, v. 58, n. 12, 1235-1242, 2003.

YALÇIN, B. et al. *In vitro* synergistic effect of moxifloxacin and amphotericin B combination against *Candida* strains. **Mikrobiyol Bul**, v. 44, n. 1, p. 65-70, 2010.

ZABKA, M.; PAVELA, R. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. **Chemosphere**, v. 93, n. 6, p. 1051-1056, 2013.

ZHAI, B. et al. Polymyxin B, in combination with fluconazole, exerts a potent fungicidal effect. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 5, p. 931-938, 2010.

ANEXO A – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DO DNA

- 1- Repicar o fungo em 150 mL de caldo YEPD (extrato de levedura, peptona e dextrose) e deixá-lo por 48h no shaker (26°C).
- 2- Retirar a cultura do meio e lavar com água destilada estéril. Coar em tubo Falcon de 50 mL e armazenar a -20°C *overnight* para posteriormente ser liofilizada, ou depositar em um criotubo e armazenar no freezer de -80°C (sem liofilizar).
- 3- Pesar um eppendorf de 1,5 mL e transferir a cultura liofilizada. Pesar o eppendorf com a cultura.
- 4- Acrescentar 600 µL de tampão de extração, 80 µL de tampão CTAB 10% e 120 µL de NaCl 5N.
- 5- Homogeneizar e colocar a mistura em banho-maria 65°C por 45 minutos.
- 6- Acrescentar 400 µL de fenol tamponado e 400 µL de clorofórmio:isoamilalcool (24:1) e centrifugar a 13500 rpm por 15 minutos.
- 7- Retirar o sobrenadante (300-350 µL) para um novo eppendorf e acrescentar novamente 400 µL de fenol tamponado e 400 µL de clorofórmio:isoamilalcool (24:1) e centrifugar por mais 15 minutos a 13500 rpm.
- 8- Retirar o sobrenadante (200 µL) e colocar em um novo eppendorf.
- 9- Conforme a quantidade de cultura liofilizada pesada, tratá-la com RNase 10 mg/mL e incubar a 37°C por 30 minutos.
- 10- Após 30 minutos, multiplicar o volume do sobrenadante por 0,55 e acrescentar o isopropanol gelado. Centrifugar a 13500 rpm por 10 minutos.
- 11- Após a centrifugação ocorrerá a formação de um pellet (DNA). Retire o álcool com o auxílio de um papel toalha, vertendo o tubo delicadamente. Acrescentar 500 µL de etanol 70% gelado.
- 12- Retire o álcool vertendo como no passo anterior.
- 13- Acrescentar 50 µL de TE (10 mM Tris-HCl; 1mM EDTA; pH 8.0).

ANEXO B - PUBLICAÇÃO DO ARTIGO 1

Medical Mycology Advance Access published January 14, 2016



Medical Mycology, 2016, 0, 1–6

doi: 10.1093/mmy/myv120

Advance Access Publication Date: 0 2016

Short Communication



Short Communication

Antifungal activities of diphenyl diselenide and ebselen alone and in combination with antifungal agents against *Fusarium* spp.

Tarcieli Pozzebon Venturini¹, Francieli Chassot¹, Érico Silva Loreto²,
Jéssica Tairine Keller³, Maria Izabel Azevedo², Gilson Zeni⁴,
Janio Morais Santurio^{2,3} and Sydney Hartz Alves^{1,3,*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil, ²Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil, ³Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil and ⁴Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

*To whom correspondence should be addressed. Sydney Hartz Alves, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Av. Roraima n° 1000, Prédio 20, sala 4139, Santa Maria- CEP 97105–900, RS, Brazil. Tel./Fax: +55 55 3220–8906; E-mail: sydneyalves.ufsm@gmail.com

Received 24 September 2015; Revised 30 November 2015; Accepted 18 December 2015

Abstract

Herein, we describe the *in vitro* activity of a combination of the organoselenium compounds diphenyl diselenide and ebselen alone and in combination with amphotericin B, caspofungin, itraconazole, and voriconazole against 25 clinical isolates of *Fusarium* spp. For this analysis, we used the broth microdilution method based on the M38-A2 technique and checkerboard microdilution method. Diphenyl diselenide (MIC range = 4–32 µg/ml) and ebselen (MIC range = 2–8 µg/ml) showed *in vitro* activity against the isolates tested. The most effective combinations were (synergism rates): ebselen + amphotericin B (88%), ebselen + voriconazole (80%), diphenyl diselenide + amphotericin B (72%), and diphenyl diselenide + voriconazole (64%). Combination with caspofungin resulted in low rates of synergism: ebselen + caspofungin, 36%, and diphenyl diselenide + caspofungin, 28%; combination with itraconazole demonstrated indifferent interactions. Antagonistic effects were not observed for any of the combinations tested. Our findings suggest that the antifungal potential of diphenyl diselenide and ebselen deserves further investigation in *in vivo* experimental models, especially in combination with amphotericin B and voriconazole.

Key words: susceptibility, combinations, diphenyl diselenide, ebselen, *Fusarium* spp.

Introduction

Fusarium species are common saprobitics present in soil. They are important plant pathogens but may also

cause a wide range of infections in humans.¹ Moreover, this emerging opportunistic fungus causes deep and disseminated infections in immunocompromised patients.²

ANEXO C - SUBMISSÃO DO MANUSCRITO 1

25/02/2016

Gmail - NEW SUBMISSION - Memórias - Manuscript ID MIOC-2015-0452



Tarcieli Venturini <tarcieliventurini@gmail.com>

NEW SUBMISSION - Memórias - Manuscript ID MIOC-2015-0452

1 mensagem

memorias@fiocruz.br <memorias@fiocruz.br>
Para: tarcieliventurini@gmail.com
Cc: memoriasonline@fiocruz.br, thaisa.moura@ioc.fiocruz.br

13 de dezembro de 2015 16:32

13-Dec-2015

Dear Dr.(a) Venturini:

Your manuscript entitled "In vitro synergistic combinations of pentamidine, polymyxin B, tigecycline and tobramycin with antifungal agents against *Fusarium* spp." has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Your manuscript ID is MIOC-2015-0452.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/mioc-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/mioc-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Sincerely,
Dra. Claude Pirmez
Memórias do Instituto Oswaldo Cruz
memorias@fiocruz.br