



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
CURSO DE FARMÁCIA

LARA ELLOYSE ALMEIDA MOREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DO SULFATO DE ZINCO
ISOLADO E ASSOCIADO AO FLUCONAZOL FRENTE A *Candida* spp.**

FORTALEZA
2022

LARA ELLOYSE ALMEIDA MOREIRA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DO SULFATO DE ZINCO
ISOLADO E ASSOCIADO AO FLUCONAZOL FRENTE *Candida spp.*

Monografia apresentada ao curso de Farmácia
da Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profª. Dra. Cecília Rocha da
Silva

Coorientador: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre
Júnior.

.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M837a Moreira, Lara Elloyse Almeida.

Avaliação da atividade antifúngica in vitro do sulfato de zinco isolado e associado ao fluconazol frente a *Candida* spp. / Lara Elloyse Almeida Moreira. – 2022.
59 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Cecília Rocha da Silva.

Coorientação: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.

1. Infecções fúngicas. 2. Resistência fúngica.. 3. Candidíase. 4. Sulfato de zinco. I. Título.

CDD 615

LARA ELLOYSE ALMEIDA MOREIRA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DO SULFATO DE ZINCO
ISOLADO E ASSOCIADO AO FLUCONAZOL FRENTE *Candida* spp.

Monografia apresentada ao curso de Farmácia
da Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharela em Farmácia.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior (Coorientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ma. Fátima Daiana Dias Barroso
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/CE)

Aos meus pais, Luiz Carlos e Tânia

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, por me guiar nas diversas circunstâncias e por toda luz e sabedoria concedida durante esta caminhada.

Aos meus pais, Luiz Carlos e Tânia, por todo o carinho, dedicação, apoio e esforços para me proporcionarem sempre a melhor vida e educação. Sou eternamente grata pela enorme bênção que é ser filha de vocês.

À minha avó, Elza Almeida, pela sabedoria, conselhos, apoio e palavras de incentivo durante a minha jornada. Obrigada por tanto amor e carinho.

À minha orientadora, profa. Cecília Rocha, por tantos ensinamentos, paciência, dedicação, doçura, conselhos e apoio durante a construção deste trabalho e durante minha trajetória universitária. Sou grata pela confiança depositada e pelas oportunidades.

Ao meu coorientador, prof. Hélio Vitoriano, pelas oportunidades concedidas e pela confiança em mim. Agradeço as palavras de sabedoria, conversas, compreensão e conselhos que tanto me incentivam.

Aos membros desta banca, pela disponibilidade e colaboração neste trabalho.

Aos meus amigos, em especial aos feitos durante a Graduação. Muito obrigada pelo companheirismo, torcida, horas de estudos compartilhadas, alegrias e bons momentos. Um agradecimento mais que especial a Gabrielle, Jonas, Hugo, Amanda, Octavio, Ellen, Joslaine e Pedro. Foi incrível compartilhar momentos dessa jornada com vocês.

Ao Thierry Mendes, por todo o apoio, amor e carinho durante essa trajetória, assim como em todos os momentos que precisei.

Aos professores e funcionários do curso de Farmácia, assim como os preceptores de estágios, sou grata pelos aprendizados e construção de vínculos.

Ao Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN) e seus integrantes: professores, alunos de pós graduação e iniciação científica, por todo os aprendizados, colaborações neste trabalho e na minha jornada profissional.

Aos projetos que participei durante minha jornada acadêmica, especialmente ao CEABA, Ipharma Jr. e LAAC.

À UFC, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro durante a graduação.

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.”

Albert Einstein

RESUMO

As infecções fúngicas estão se tornando cada vez mais frequentes, principalmente em ambientes hospitalares. Nesse contexto, o gênero fúngico *Candida* spp. caracteriza-se como um gênero oportunista responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade. Com o crescente uso de antifúngicos e da resistência clínica aos mesmos, uma mudança na epidemiologia das infecções por *Candida* está ocorrendo, destacando a emergência de novas estratégias terapêuticas. Portanto, o presente estudo teve como finalidade avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do sulfato de zinco, isolada e associada ao fluconazol, frente a cepas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol. A técnica de microdiluição em caldo foi utilizada para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), segundo o protocolo M27-A3 do CLSI e a avaliação da resistência ao fluconazol foi executada utilizando o documento M27-S4 do CLSI. Na análise do efeito isolado do sulfato de zinco foi realizada a interpretação do efeito antifúngico com base nas CIMs obtidas. Em relação a avaliação da associação entre sulfato de zinco e fluconazol, foi utilizada a técnica do *checkerboard*, em que foi determinada a interação farmacológica entre as drogas de acordo com o Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF). O sulfato de zinco apresentou CIM que variou entre 16 a 64 µg/mL para as cepas testadas no estudo, em que 100% das cepas obteve atividade antimicrobiana boa. Acerca da combinação do sulfato de zinco com o fluconazol, 62,5% das interações avaliadas entre sulfato de zinco e fluconazol foram classificadas como indiferente e 37,5% como aditiva para as cepas analisadas. Considerando-se o limitado arsenal antifúngico disponível, o sulfato de zinco destaca-se devido à sua atividade antifúngica *in vitro*. Contudo, para seu uso, são necessários mais estudos para torná-lo uma possível alternativa terapêutica.

Palavras-chave: Infecções fúngicas. Resistência fúngica. Candidíase. Sulfato de zinco

ABSTRACT

Fungal infections are becoming more and more frequent, especially in hospital settings. In this context, the fungal genus *Candida* spp. is characterized as an opportunistic genus responsible for high rates of morbidity and mortality. With the increasing use of antifungals and clinical resistance to them, a change in the epidemiology of *Candida* infections is taking place, highlighting the emergence of new therapeutic strategies. Therefore, the present study aimed to evaluate the in vitro antifungal activity of zinc sulfate, isolated and associated with fluconazole, against *Candida* spp. sensitive and resistant to fluconazole. The broth microdilution technique was used to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), according to the CLSI M27-A3 protocol, and the fluconazole resistance assessment was performed using the CLSI document M27-S4. In the analysis of the isolated effect of zinc sulfate, the interpretation of the antifungal effect was performed based on the MICs obtained. Regarding the evaluation of the association between zinc sulfate and fluconazole, the checkerboard technique was used, in which the pharmacological interaction between the drugs was determined according to the Fractional Inhibitory Concentration Index (CIIF). Zinc sulfate had a MIC that ranged from 16 to 64 µg/mL for the strains tested in the study, in which 100% of the strains had good antimicrobial activity. Regarding the combination of zinc sulfate with fluconazole, 62.5% of the interactions evaluated between zinc sulfate and fluconazole were classified as indifferent and 37.5% as additive for the analyzed strains. Considering the limited antifungal arsenal available, zinc sulfate stands out due to its in vitro antifungal activity. However, for its use, further studies are needed to make it a possible therapeutic alternative.

Keywords: Fungal infections. Fungal resistance. Candidiasis. Zinc sulfate

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mecanismos dos principais antifúngicos utilizados em infecções de <i>Candida</i> spp.	25
Figura 2 – Mecanismos moleculares de resistência a drogas antifúngicas	28
Figura 3 – Determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF).	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais complicações da candidíase invasiva em diferentes sítios do organismo	21
Tabela 2 – Concentração Inibitória Mínima isolada do sulfato de zinco e do fluconazol, frente a cepas de <i>Candida</i> spp.....	28
Tabela 3 – Avaliação do efeito associado do sulfato de zinco e fluconazol frente a <i>Candida</i> spp.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5FC	5-flucitosina
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BrCAST	<i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionária
ISRS	Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina
LABIMAN	Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistentes à Meticilina
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfônico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
Sars-CoV-2	Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
μL	Microlitro
%	Porcentagem
®	Marca registrada
US	Dólar
R\$	Real
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
°C	Graus Celsius
mL	Mililitro
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônias por mililitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	Infecções fúngicas	17
2.2	<i>Candida spp.</i>	19
2.2.1	<i>Infecções causadas por Candida spp.</i>	20
2.2.2	<i>Epidemiologia das infecções causadas por Candida spp.</i>	23
2.3	Tratamentos antifúngicos	24
2.4	Resistência fúngica	27
2.4.1	<i>Estratégias para combater a resistência fúngica</i>	30
2.5.	Compostos metálicos com atividade antimicrobiana	32
2.5.1	<i>Sulfato de zinco</i>	33
3	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo geral	37
3.2	Objetivos específicos	37
4	METODOLOGIA	38
4.1	Obtenção das cepas	38
4.2	Ativos utilizados	38
4.3	Determinação da Concentração Inibitória Mínima	38
4.4	Avaliação da interação farmacológica	39
4.5	Análise de dados	40
5	RESULTADOS	41
5.1	Determinação da Concentração Inibitória Mínima	41
5.2	Avaliação do efeito associado do sulfato de zinco e fluconazol	42
6	DISCUSSÃO	44
7	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos eucariotas constituintes do Reino *Fungi* e representam um diverso grupo de organismos ubíquos que possuem como principal objetivo degradar a matéria orgânica. Estes organismos, contudo, emergiram nas últimas décadas como uma importante causa de doenças em humanos, especialmente entre indivíduos imunossuprimidos ou hospitalizados com doenças de base grave. Entre estes pacientes, os fungos atuam como patógenos oportunistas, causando infecções de alta morbidade e mortalidade (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

As doenças fúngicas matam mais de 1,5 milhões de indivíduos e afetam mais de um bilhão de pessoas ao redor do mundo (BONGOMIN *et al.*, 2017). No Brasil, mais de 3,8 milhões de indivíduos podem estar sofrendo de infecções fúngicas graves (GIACOMAZZI *et al.*, 2016) e as taxas brutas de mortalidade por candidemia variam de 21% a 80% nas unidades hospitalares do país, sendo as espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* as espécies mais comumente isoladas (ROSA, 2021).

Neste contexto, *Candida* spp. se caracteriza como um gênero comensal, que no entanto, com o crescente uso de antifúngicos e da resistência clínica aos mesmos, uma mudança na epidemiologia das infecções por *Candida* está ocorrendo, com a consequência do aumento da incidência de infecções causadas por espécies com sensibilidade antifúngica menos previsível (FRIEDMAN; SCWARTZ, 2019), em que tais espécies são motivos de infecções fatais, principalmente em hospedeiros hospitalizados, em que neutropenia, disfunção de neutrófilos, nutrição parenteral e rompimento das barreiras da mucosa são os principais fatores de risco para infecções disseminadas (LIM *et al.*, 2012; d'ENFERT; BOUGNOUX, 2014; PAPPAS *et al.*, 2018).

Além disso, a incidência de infecções por *Candida* está ligada à crescente resistência clínica, a qual é definida como a falha em erradicar uma infecção fúngica, apesar da administração de um agente antifúngico com atividade *in vitro* contra o organismo. Embora a resistência clínica nem sempre possa ser prevista, ela destaca a importância de individualizar as estratégias de tratamento com base na situação clínica do paciente (PAI *et al.*, 2018).

Neste panorama, considerando as questões críticas do aumento da resistência fúngica, há uma necessidade urgente de identificação, de desenvolvimento, de validação e de progressão de novas estratégias e abordagens que possam ser facilmente utilizadas para superar essa problemática (QADRI; SHAH ; MIR, 2021).

Dentre tais alternativas, o reposicionamento farmacológico, o qual, de acordo com a definição de ASHBURN e THOR (2004) é o processo de descoberta de novos usos fora do escopo da indicação médica original para medicamentos existentes; e a associação de compostos, em que a técnica mais empregada é o método *checkerboard*, com o objetivo de determinar o ICIF (Índice de Concentração Inibitória Fracionária) e averiguar a interação entre tais agentes (BIDAUD *et al.*, 2021).

Muito se discute na literatura acerca da atividade antifúngica de compostos contendo metais, tais como paládio, prata e ferro (ALMEIDA *et al.* 2018; ZHANG *et al.*, 2020; RUBBIANI *et al.*, 2020). Nesse contexto, o zinco em sua forma combinada ao sulfato é classificado pela legislação brasileira como um suplemento alimentar, bastante empregado para adequar os níveis do metal zinco no organismo, visto que este elemento é de suma importância no correto funcionamento do sistema imunológico, em que sua deficiência está associada a fatores como produção reduzida de anticorpos, baixa atividade das células NK (*natural killer*), atrofia tímica, produção alterada de hormônios tímicos, linfopenia e respostas defeituosas mediadas por células e anticorpos (READ *et al.*, 2019; KUMAR, *et al.* 2020).

Nesse contexto, a literatura aponta a atividade antimicrobiana do sulfato de zinco contra bactérias, (RAMDAS; DEVI, 2020) vírus, (ARENS; TRAVIS, 2000) parasitas (BAFGHI *et al.*, 2014) e fungos causadores de micoses superficiais (SHARQUIE *et al.*, 2004). Contudo, pouco é relatada a atividade anti-*Candida* deste composto. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade anti-*Candida* do sulfato de zinco e sua interação farmacológica com o fluconazol, visto que este suplemento alimentar foi pouco explorado como candidato para estudo de atividade antifúngica.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Infecções fúngicas

Os fungos são organismos eucariotas constituintes do Reino *Fungi*, os quais dentre suas características morfológicas, apresentam uma parede celular rígida composta de quitina, glicana e uma membrana plasmática, em que o ergosterol é o principal componente que substitui o colesterol. Representam um diverso grupo de organismos ubíquos que possuem como principal objetivo degradar a matéria orgânica (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017). A origem destes organismos data de cerca de 1,5 milhões de anos e são descritas mais de 1,5 milhão de espécies, das quais em torno de 300 são conhecidas por causar infecções humanas (PAI *et al.*, 2018).

Os fungos emergiram nas últimas décadas como a principal causa de doenças em humanos, especialmente entre indivíduos imunossuprimidos ou hospitalizados com doenças de base grave. Entre estes pacientes, os fungos atuam como patógenos oportunistas, causando infecções de alta morbidade e mortalidade. Este aumento das infecções fúngicas pode ser atribuído ao crescente aumento do número de pacientes imunossuprimidos, incluindo transplantados, portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), pacientes com câncer sob uso de quimioterapia e aqueles com doença de base grave submetidos a procedimentos invasivos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017). Embora possam causar significativa morbidade e mortalidade em populações suscetíveis, os fungos muitas vezes são negligenciados como causa de infecção (LOCKHART; GUARNER, 2019).

A epidemiologia das doenças fúngicas é dinâmica e difícil de prever. Além disso, as opções terapêuticas são restritas a poucas classes de fármacos pouco eficazes, tóxicos e caros (RODRIGUES, 2019). As infecções fúngicas geralmente começam no pulmão (por inalação de ar contaminado) ou na pele, nas unhas e na mucosa (como vagina, boca e seios da face), por contato direto (por exemplo, através de feridas), e raramente também no trato gastrointestinal, pela ingestão de comida ou água (GISI, 2021). Estas infecções são denominadas micoses, e podem ser classificadas a partir do sítio de infecção. As micoses superficiais são aquelas limitadas às superfícies da pele e dos pelos, não são destrutivas, possuem apenas importância cosmética e incluem organismos como *Malassezia* spp., *Hortaea werneckii*, *Piedraia hortae* e *Trichosporon* spp (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

As micoses cutâneas são infecções da camada queratinizada da pele, pelos e unhas. Estas podem provocar uma resposta do hospedeiro em que os sintomas incluem: prurido, descamação, pelos tonsurados, lesões arredondadas na pele e unhas espessas e opacas. As micoses subcutâneas envolvem as camadas mais profundas da pele, incluindo a córnea, os músculos e o tecido conjuntivo, e são causadas por um largo espectro de fungos, em que estes ganham acesso aos tecidos mais profundos, normalmente por inoculação traumática e permanecem localizados, causando a formação de abscessos e úlceras que não cicatrizam (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

Embora a epidemiologia das doenças fúngicas tenha modificado nas últimas décadas, os gêneros *Aspergillus*, *Candida* e *Cryptococcus*, a espécie *Pneumocystis jirovecii*, e os fungos dimórficos endêmicos, como *Histoplasma capsulatum* e *Mucormycetes*, permanecem como os principais responsáveis pela maioria dos casos de doenças fúngicas graves. Ademais, *Candida albicans* é o principal agente responsável por doenças da mucosa, *Aspergillus fumigatus* para a maioria das doenças fúngicas alérgicas e *Trichophyton* spp., especialmente *T. rubrum*, para infecções de pele (BONGOMIN *et al.*, 2017).

As doenças fúngicas matam mais de 1,5 milhões de indivíduos e afetam mais de um bilhão de pessoas ao redor do mundo (BONGOMIN *et al.*, 2017). No Brasil, mais de 3,8 milhões de indivíduos podem estar sofrendo de infecções fúngicas graves, entretanto a ausência de dados precisos sobre a incidência destas pode levar as autoridades governamentais a excluir tais doenças de seu plano de prioridades de assistência à saúde, abandonando um grande número de populações de risco que apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade associadas (GIACOMAZZI *et al.*, 2016).

Os custos de tratamento das infecções fúngicas são bastante elevados. Nos Estados Unidos, os custos estimados com os gastos de tratamento das doenças fúngicas foram maiores que US \$7,2 bilhões em 2017, incluindo US \$4,5 de pacientes hospitalizados e US \$2,6 bilhões de pacientes ambulatoriais. Hospitalizações por infecções por *Candida* tiveram um custo de US \$1,4 bilhão e por *Aspergillus* US \$1,2 bilhão, representando os maiores custos totais de hospitalização (BENEDICT *et al.*, 2019). No Brasil, por sua vez, as micoses sistêmicas não são doenças de notificação, portanto não se dispõem de dados precisos. A incidência, a prevalência, e a morbidade destas micoses baseia-se em análises retrospectivas de séries de casos, ou estudo de isolados e linhagens de coleções de apoio à pesquisa, sem registro regular de dados clínicos e epidemiológicos (BRASIL, 2022).

No contexto de pandemia do SARS-CoV-2, o trabalho de Sharma *et al.*, (2021) demonstrou que a Covid-19 pode estar relacionada com um aumento de infecções fúngicas, visto que a infecção por SARS-CoV-2 leva a uma diminuição das células TCD4 e TCD8, resultando em um sistema imunológico debilitado que torna os pacientes mais suscetíveis a contraírem infecções fúngicas. Além disso, a pandemia de COVID-19 pode ter aumentado a transmissão de outras infecções fúngicas nosocomiais, como as causadas por *Candida auris*, que é considerada uma séria ameaça à saúde global, devido a multirresistência e a transmissibilidade, causando surtos de infecções profundas de alta mortalidade (GARCIA-BUSTOS *et al.*, 2021; MENDONÇA, *et al.*, 2021).

2.2. *Candida* spp.

Candida spp. são membros da família *Cryptococcaceae* e são *Deuteromycota* (sem uma forma sexual reconhecida). Os membros deste gênero são bastante heterogêneos, crescendo como leveduras (blastosporos), com a maioria dos membros também produzindo crescimento filamentoso (como pseudohifas e pseudomicélio). Em cultura, as espécies de *Candida* spp. formam colônias brancas, lisas e convexas. Podem também sofrer alterações de fenótipo, em que uma única cepa de *Candida* pode se alterar de forma reversível entre diversos tipos morfológicos. Todas as espécies do gênero *Candida* apresentam-se sob a forma de células leveduriformes ovais que produzem brotamentos ou blastoconídios. As espécies de *Candida*, exceto *C. glabrata*, produzem hifas verdadeiras e pseudo-hifas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

Existem em torno de 150 espécies de *Candida*, mas destas, cerca de 15 espécies podem causar doenças em humanos. Podem ser encontradas comumente como comensais, fazendo parte do microbioma da pele humana, membranas mucosas, trato genital feminino e trato gastrointestinal (AHMAD; ALFOUZAN, 2021). A prevalência de infecções mais graves tende a ser menor em indivíduos saudáveis do que em pacientes hospitalares (LIM *et al.*, 2012; PAPPAS *et al.*, 2018).

O gênero *Candida* produz diversos fatores de virulência, dentre os quais se destacam proteases e lipases, que contribuem para a invasão do hospedeiro; contudo, normalmente o desenvolvimento das infecções é favorecido por uma combinação de fatores ligados ao hospedeiro e ao microrganismo, e não somente por um fator de virulência isolado (SIDRIM,

2004). A produção de fatores de virulência também é importante para o estabelecimento de doenças causadas por *Candida*. Enzimas hidrolíticas extracelulares, como fosfolipase e proteinase, podem facilitar a adesão e o escape do microrganismo ao sistema imunológico do hospedeiro, podendo causar também danos aos tecidos. A hemolisina é outro fator de virulência que facilita a infecção disseminada, tanto em *C. albicans* quanto espécies não-*albicans* (CANELA *et al.*, 2018).

A capacidade de *Candida* de se converter de levedura para fase de hifa ou de hifa para fase de levedura é denominada dimorfismo, em que cada uma dessas fases de crescimento é vital para a virulência e patogenicidade. Além disso, as espécies de *Candida* são capazes de se adaptarem a variadas condições externas, como temperatura, oxigênio, pH, dióxido de carbono, disponibilidade de nutrientes, compostos do sistema imunológico e outras bactérias coexistentes (MBA; NWEZE, 2020).

Também é capaz de formar biofilmes, estruturas microbianas tridimensionais que se desenvolvem em superfícies bióticas ou abióticas. As células do biofilme são envoltas em uma matriz extracelular e são altamente tolerantes a insultos antimicrobianos e imunológicos (DONLAN; COSTERTON, 2002). Estes biofilmes são formados principalmente em cateteres e dispositivos protéticos, constituindo um importante fator de infecções disseminadas por *Candida*, principalmente por tolerância intrínseca a quase todos os antifúngicos em uso clínico, como os azólicos e a anfotericina B. Além disso, a formação de biofilme é regulada por vários fatores de transcrição, incluindo aqueles envolvidos na adesão, formação de hifas e produção de EPS (substâncias poliméricas extracelulares) (d'ENFERT; BOUGNOUX, 2014; CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018).

2.2.1 Infecções causadas por *Candida* spp.

Candidíase é um termo amplo que se refere a infecções cutâneas, de mucosas e de órgãos profundos causadas por fungos do gênero *Candida*. A candidíase invasiva refere-se a infecções da corrente sanguínea por *Candida* spp. (candidemia) e infecções profundas, como abscesso intra-abdominal, peritonite ou osteomielite (PAPPAS *et al.*, 2018).

Enquanto *C. albicans* é responsável por cerca de 50% das candidíases, espécies de *Candida* não *albicans* são responsáveis pelo restante das infecções deste gênero. Infecções

causadas por *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* e *C. auris* são de grande preocupação emergente (MBA; NWEZE, 2020).

Fungos do gênero *Candida* podem causar infecções potencialmente fatais, principalmente em hospedeiros hospitalizados, em que neutropenia, disfunção de neutrófilos, nutrição parenteral e rompimento das barreiras da mucosa são os principais fatores de risco para infecções disseminadas. Além disso, a translocação do trato gastrointestinal e o uso de cateteres intravasculares são os dois principais portais de entrada para a infecção disseminada por *Candida* (d'ENFERT; BOUGNOUX, 2014; LI *et al.*, 2021).

Tais infecções surgiram como uma das principais causas de complicações infecciosas em pacientes hospitalizados com graves doenças subjacentes, bem como aquelas com complicações cirúrgicas, procedimentos abdominais ou doenças crônicas que precisam de procedimentos invasivos de diagnóstico ou tratamento, representando, portanto, um grande desafio para unidades hospitalares devido ao seu difícil manejo e diagnóstico terapêutico (d'ENFERT; BOUGNOUX, 2014; LI *et al.*, 2021).

A candidíase invasiva é uma infecção grave que afeta principalmente pacientes críticos e imunocomprometidos. *Candida albicans*, geralmente sensível ao fluconazol, tem sido a espécie mais prevalente implicada em infecções invasivas e mucocutâneas. No entanto, com o crescente uso de antifúngicos e novas técnicas de diagnóstico, uma mudança na epidemiologia das infecções por *Candida* está ocorrendo, com a consequência do aumento da incidência de infecções causadas por espécies com sensibilidade antifúngica menos previsível (FRIEDMAN; SCWARTZ, 2019).

De acordo com o trabalho de Pappas *et al.* (2018), microrganismos do gênero *Candida* spp. podem ser detectados nas superfícies mucosas de 50 a 70% de humanos saudáveis. Em condições normais, o agente fúngico se comporta como um organismo comensal sem causar doença. Contudo, na presença de fatores como o comprometimento da resposta imune, *Candida* spp. pode disseminar-se e invadir a corrente sanguínea, promovendo o crescimento excessivo dos fungos, levando a graves infecções oportunistas profundas, apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais complicações da candidíase invasiva em diferentes sítios do organismo.

Sítio do organismo	Principais complicações associadas à candidíase invasiva
Cavidade abdominal	· Abscesso abdominal · Pancreatite · Peritonite
Ossos	· Osteomielite · espondilodiscite
Cérebro	· Abscesso cerebral · Meningoencefalite
Olhos	· Coroidite · Retinite · Endoftalmite
Coração	· Endocardite
Rins	· Candidúria · Pielonefrite · Pionefrose · Abscesso renal
Fígado e baço	· Candidíase disseminada crônica · Abscesso focal
Pulmões	· Abscesso focal

Fonte: :Adaptada de PAPPAS *et al.*, 2018.

2.2.2 Epidemiologia das infecções causadas por *Candida* spp.

A nível mundial, microrganismos do gênero *Candida* spp. tornaram-se a terceira causa mais comum de infecções da corrente sanguínea, incluindo a candidemia. A candidíase invasiva tem sido atribuída a uma mortalidade de 40% a 50% em unidades de terapia intensiva (UTIs), sendo atualmente a quarta infecção nosocomial da corrente sanguínea mais comum nos Estados Unidos (CHEN *et al.*, 2021).

Na Europa, por sua vez, a incidência de candidemia foi estimada em aproximadamente 79 casos por dia, dos quais 29 pacientes tiveram um desfecho fatal em um mês de infecção (KOEHLER *et al.*, 2019). Além disso, observa-se o aumento da incidência de infecções por *C. auris*, em que esta espécie se tornou um importante patógeno da corrente sanguínea e suas infecções já são relatadas em 45 países no Extremo Oriente da Ásia, Oriente Médio, África, Europa, América do Norte e América do Sul (AHMAD; ALFOUZAN, 2021; BANDARA; SAMARANAYAKE, 2022).

A candidemia no Brasil, por sua vez, apresenta taxas de incidência que variam de 0,58 até um total cumulativo de 42,59 por 1.000 admissões hospitalares, a depender da região. As taxas brutas de mortalidade por candidemia continuam em um nível alto e alarmante nos hospitais brasileiros, que variam de 21% a 80%, sendo as espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* as mais comumente isoladas causando infecções de corrente sanguínea por *Candida* no Brasil (ROSA, 2021).

O estudo de Riche, Cassol e Pasqualotto (2020), demonstrou que no contexto de pandemia da COVID-19, o uso de corticosteróides no manejo terapêutico pode ter um impacto direto no aumento da frequência de candidemias. No estudo, a frequência de candidemias entre os pacientes não infectados pelo SARS-CoV-2 foi de 1,43 e 1,15 a cada 1000 pacientes de hospitais do Rio Grande do Sul, enquanto entre os pacientes com COVID-19, as taxas de incidência de candidemia foram cerca de dez vezes maiores.

Na região Nordeste, o estudo de da Silva, *et al.* (2019), demonstrou que a incidência cumulativa de candidemia foi de 42,59 casos por 1.000 internações em uma UTI de um hospital terciário em Pernambuco. Dentre os casos avaliados, 60% foram causados por espécies não-*albicans*, 38,4% por *C. albicans* e 1,6% foram identificadas nas amostras duas espécies de *Candida* spp.

Além disso, o estudo de Almeida *et al.* (2021) aponta que entre dezembro de 2020 e fevereiro de 2021, nove pacientes de um hospital de Salvador, Bahia, estavam colonizados pela levedura multirresistente *C. auris*, sendo esta a causa de óbito de dois pacientes, em que o primeiro óbito foi de um paciente acometido pela COVID-19, o que indica mudança na epidemiologia das infecções causadas por *Candida spp.*

Acerca dos custos necessários ao tratamento de infecções por *Candida spp.*, o estudo de Ismail *et al.* (2020) realizou uma revisão de literatura com os valores de gastos hospitalares com candidemias nos Estados Unidos, Austrália, Reino Unido e Alemanha, demonstrando que os custos por paciente variam entre \$48.487 a \$157.574 e os custos de hospitalização variam entre e \$10.216 a \$37.715. No Brasil, contudo, há escassez de dados sobre etiologia e perfil de sensibilidade das espécies causadoras de candidemia, associada à pouca quantidade de estudos que empregaram técnicas moleculares para determinação exata das espécies (RODRIGUES, 2020).

2.3. Tratamentos antifúngicos

As atuais classes de antifúngicos compreendem: (I) azólicos, como fluconazol, cetoconazol, itraconazol, voriconazol e econazol; (II) polienos, por exemplo, anfotericina B, nistatina e natamicina; (III) alilaminas, por exemplo, terbinafina e naftifina; (IV) análogos de pirimidina, como 5-fluorocitosina e 5-fluorouracil (V) e equinocandinas, por exemplo, caspofungina, anidulafungina e micafungina (ASSRESS *et al.*, 2021).

Porém, no contexto das infecções causadas por *Candida*, o arsenal de medicamentos para o tratamento da candidíase, compreende atualmente três grandes classes de medicamentos: polienos, azólicos e equinocandinas (BEN-AMI, 2018). No Brasil, os azólicos, especialmente o fluconazol, são os antifúngicos de escolha para a terapia da candidíase, principalmente por serem relativamente baratos e bem tolerados. No entanto, o que se observa é que nas últimas décadas, o Brasil teve um aumento de espécies de *Candida* com sensibilidade reduzida ou resistência intrínseca aos compostos azólicos (DE ANDRADE NETO *et al.*, 2020).

Os azóis inibem o crescimento fúngico ligando-se e inibindo a lanosterol 14 α desmetilase, uma enzima do citocromo P450 codificada pelo gene ERG11. A inibição da lanosterol 14 α desmetilase causa depleção de ergosterol, o principal esterol da membrana

plasmática em fungos e acúmulo de metil esteróis C14 α tóxicos. O efeito antifúngico é fungistático e não fungicida (BEN-AMI, 2018).

Os tratamentos orais mais usados para candidíase são o fluconazol e o itraconazol, em que as doses diárias usuais de itraconazol são 100-200 mg e de fluconazol 100-400 mg (HAY, 2018). O fluconazol, por sua vez, é o principal fármaco azólico utilizado no tratamento da candidíase. Este tem excelente biodisponibilidade e pode ser administrado por via intravenosa ou oral em doses idênticas. (BEN-AMI, 2018). Acerca do itraconazol, este possui espectro mais amplo que o fluconazol (ZHOU *et al.*, 2018). É importante ressaltar que o itraconazol exibe melhor ação antifúngica e menor resistência fúngica do que outros azólicos. Entretanto, a administração oral de itraconazol é associada a efeitos colaterais significativos, incluindo danos colestáticos e hepatocelulares (PERMANA *et al.* 2020).

Os azólicos, de forma geral, são amplamente utilizados como antifúngicos de primeira linha para o manejo de infecções sistêmicas e tópicas em todo o mundo devido ao seu preço relativamente baixo e eficácia para a maioria das infecções fúngicas (ASSRESS *et al.*, 2021).

Os poliênicos são fármacos que interagem com o ergosterol para formar poros que geram vazamento de íons na membrana fúngica. O ergosterol desempenha um papel essencial em muitos processos celulares de fungos, incluindo regulação de proteínas de membrana, endocitose, divisão celular, fluidez de membrana e sinalização celular. Neste sentido, a ligação do polieno com o ergosterol é fundamental para o seu efeito antifúngico, pois estes interagem para formar um complexo semelhante a um canal iônico que libera íons e pequenas moléculas orgânicas da célula, eventualmente levando à morte celular (KRISTANC *et al.*, 2019).

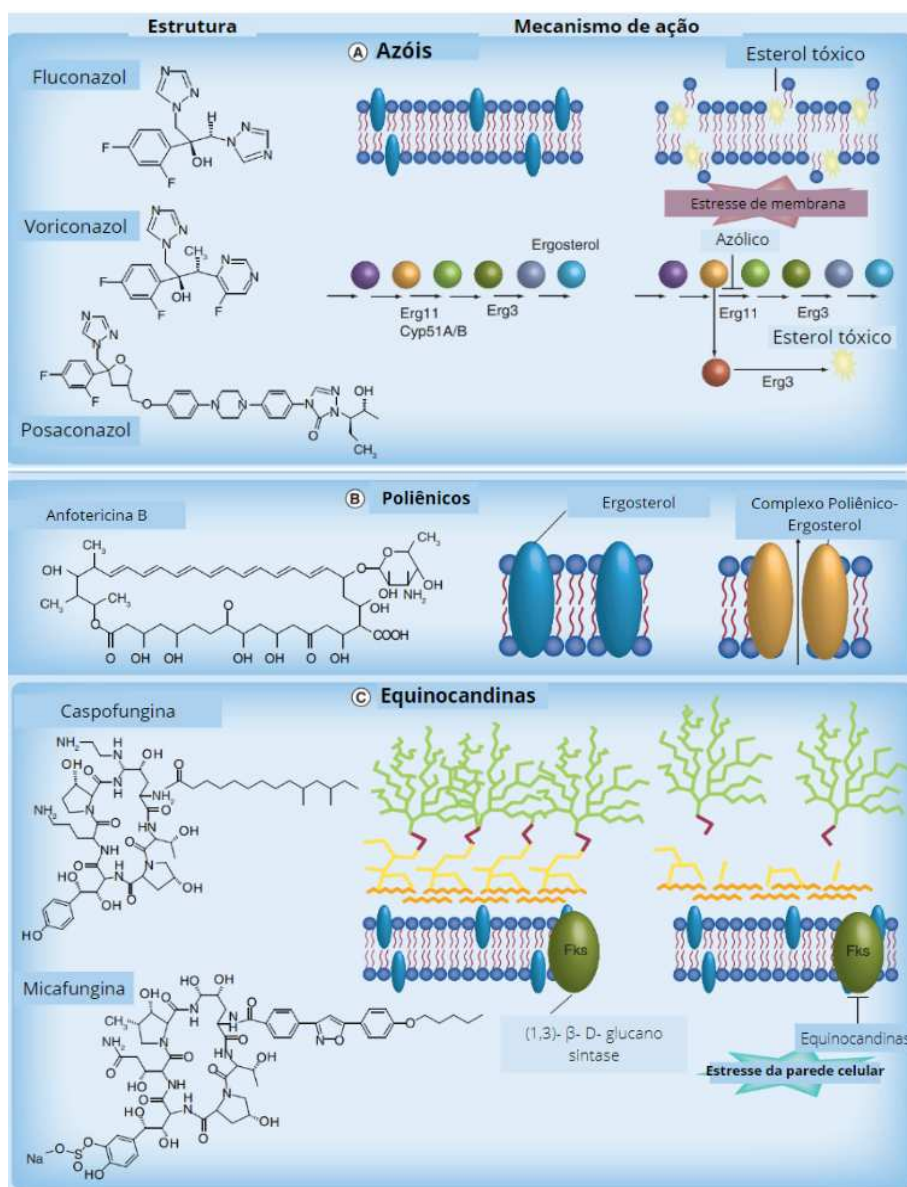
Com base nas propriedades anfipáticas dos polienos, estes se orientam na membrana plasmática com sua cauda hidrofóbica, interagindo com o ergosterol, direcionado para o ambiente lipídico interno da membrana, enquanto a porção hidrofílica formaria um canal aquoso (CAROLUS *et al.*, 2020). A nistatina possui um espectro de atividade antifúngica ainda mais amplo do que a anfotericina B e é mais frequentemente utilizada para o tratamento tópico de micoses superficiais da mucosa e cutâneas, especialmente aquelas causadas por patógenos oportunistas do gênero *Candida* (KRISTANC *et al.*, 2019).

Acerca das equinocandinas (como a caspofungina e a micafungina), estas perturbam as células fúngicas através da inibição da biossíntese de β -1,3-D-glucano, um componente

essencial da parede celular fúngica (ZHAO; PERLIN *et al.*, 2020). Suas maiores desvantagens são a baixa biodisponibilidade quando administradas por via oral, devido à absorção muito fraca no trato gastrointestinal e à alta toxicidade aos rins, ao coração, ao fígado e aos glóbulos vermelhos (KRISTANC *et al.*, 2019). Fármacos dessa classe são fungicidas contra *Candida* spp., incluindo as cepas resistentes aos triazóis, como *C. glabrata* e *C. krusei* (CARMONA; LIMPER, 2017).

Os mecanismos de ação dos principais antifúngicos utilizados em infecções de *Candida* spp. estão descritos na Figura 1.

Figura 1 - Mecanismos dos principais antifúngicos utilizados em infecções de *Candida* spp.



2.4. Resistência fúngica

A resistência clínica é definida como a falha em erradicar uma infecção fúngica apesar da administração de um agente antifúngico com atividade *in vitro* contra o organismo. Embora a resistência clínica nem sempre possa ser prevista, ela destaca a importância de individualizar as estratégias de tratamento com base na situação clínica do paciente (PAI *et al.*, 2018). Diversas espécies de fungos patogênicos são intrinsecamente tolerantes a um subconjunto de antifúngicos, em que a resistência primária ou intrínseca é aquela em que os fungos são resistentes a um fármaco antes da exposição. Por exemplo, *Candida krusei* ao fluconazol; *Cryptococcus neoformans* a equinocandinas e *Candida não-albicans* a 5-flucitosina (5FC) (PAI *et al.*, 2018).

Embora os primeiros estudos de resistência estivessem focados em torno daquelas causadas por *Candida albicans*, em grande parte devido a doenças da mucosa e associadas ao vírus da imunodeficiência humana (HIV), houve um aumento nas infecções fúngicas resistentes causadas por *Candida não albicans* (por exemplo, *C. glabrata*) e *Aspergillus* (BEN-AMI; KONTOYIANNIS, 2021).

Por muitos anos, infecções causadas por *Candida* têm sido tratadas com azólicos, a maior família de medicamentos antifúngicos. Entretanto, a resistência a estes fármacos aumentou nas últimas décadas, o que é um reflexo da mudança na epidemiologia das infecções por espécies de *Candida*. No início da década de 1990, as infecções fúngicas eram causadas principalmente por *C. albicans*. Contudo, a incidência de candidíase invasiva, ocorre atualmente também devido a espécies, como *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Essa mudança na epidemiologia das infecções por *Candida* tem sido uma correlação direta com o aumento na resistência a azóis entre espécies não *albicans* observadas em todo o mundo (PERFECT; GHANNOUM, 2020).

Com este panorama, as equinocandinas pareciam ser a resposta para as leveduras que eram resistentes aos azólicos, e contudo, houve o surgimento de espécies de *Candida* que são resistentes a equinocandinas, principalmente em situações em que ocorre a exposição prolongada ao fármaco em pacientes imunocomprometidos com candidemia recorrente (PRISTOV; GHANNOUM, 2019). Taxas variáveis de resistência adquirida às equinocandinas entre *Candida spp.* foram registradas em ambientes onde essas classes de antifúngicos são cada vez mais usadas. A resistência adquirida é relatada para a maioria das *Candida spp.*

cl clinicamente importantes, permanecendo incomum em *C. albicans* (<1%), *C. tropicalis* (<5%) e *C. krusei* (<7%), com exceção de *C. glabrata*, responsável por taxas de resistência mais altas (cerca de 13% em alguns centros) (CORTEGIANI et al, 2019).

Cepas de *Candida* spp. resistentes a antifúngicos de primeira linha (como equinocandinas e fluconazol) estão sendo cada vez mais reconhecidas, e o aparecimento destas, geralmente, se correlaciona com o uso de base de azóis e/ou equinocandinas em hospitais ou unidades hospitalares específicas.

Nesse contexto, o estudo de Yao *et al* (2020) realizado com cepas hospitalares de *C. glabrata* resistentes ao fluconazol demonstrou que tal resistência ocorre principalmente por mecanismos de bombas de efluxo. Além disso, um estudo realizado em um hospital terciário do sul da Itália demonstrou um aumento significativo de resistência ao fluconazol, de 7,4% em 2015 para 17,4% em 2018, em espécies de *Candida* spp. (BAVARO *et al.*, 2022). Ademais, outro estudo com cepas hospitalares de *C. parapsilosis* resistentes ao fluconazol demonstrou que 55,5% dos pacientes de UTI tal isolado resistente desenvolveram candidíase invasiva (FEKKAR *et al.*, 2021).

No que concerne a resistência adquirida aos azóis, esta é bastante complexa e envolve diversos mecanismos. Pode ocorrer por meio de substituições ao alvo azólico, ERG11, o que leva a uma menor afinidade de ligação da droga pela enzima lanosterol desmetilase. A superexpressão do alvo da droga pode ocorrer através de mutações de ganho de função no ativador transcricional, UPC2, ou através da formação de aneuploidias que aumentam diretamente o número de cópias de ERG11. Além disso, a resistência ao azol é adquirida através da regulação positiva de transportadores e pela ativação de mutações em fatores de transcrição específicos, como a superexpressão do transportador MF, Mdr1, por meio de mutações ativadoras no fator de transcrição e por bombas de efluxo (PAPPAS *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2020).

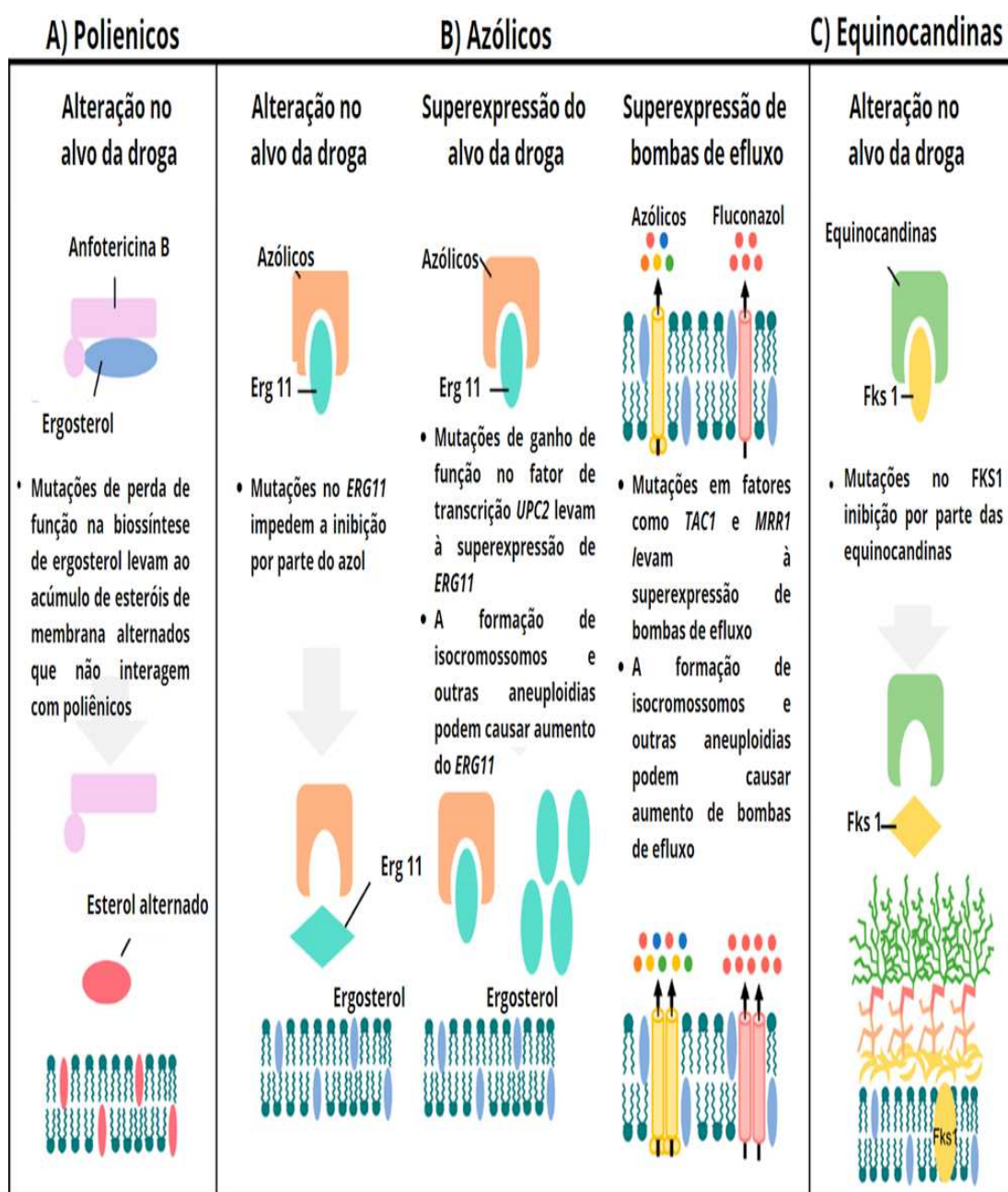
A resistência aos polienos é principalmente mediada pela depleção do ergosterol alvo através de mutações de perda de função em genes de biossíntese de ergosterol. Isso leva à produção de esteróis alternados, que não interagem efetivamente com os polienos e, portanto, não são extraídos da membrana celular do fungo.

A resistência às equinocandinas em *Candida* spp. está emergindo, principalmente, em *C. glabrata*. O alvo para as equinocandinas é a enzima β -D-glucano sintase, importante para a

síntese da parede celular. Esta enzima é codificada por FKS1 em *Candida* spp. e também é codificada por FKS2 em *C. glabrata*. Mutações nas regiões HS1 e HS2 desses genes foram identificadas como o mecanismo subjacente para a resistência às equinocandinas, onde o nível de resistência depende de fatores como a posição do códon mutado (LEE et al., 2020).

Os principais mecanismos moleculares de resistência descritos aos antifúngicos majoritariamente utilizados na prática clínica estão descritos na Figura 2.

Figura 2: Mecanismos moleculares de resistência a drogas antifúngicas



Fonte: Adaptado de LEE et al., 2020.

2.4.1 Estratégias para combater a resistência fúngica

Considerando as questões críticas do aumento da resistência antimicrobiana, há uma necessidade urgente de identificação, de desenvolvimento, de validação e de progressão de novas estratégias e abordagens que possam ser facilmente utilizadas para superar essa problemática (QADRI; SHAH ; MIR, 2021).

No que concerne à crescente resistência fúngica, uma das alternativas para reverter esse problema é o reposicionamento de fármacos, o qual, de acordo com a definição de ASHBURN e THOR (2004) é o processo de descoberta de novos usos fora do escopo da indicação médica original para medicamentos existentes. Diante disso, esta estratégia desempenha um papel importante na otimização do processo pré-clínico de desenvolvimento de novos medicamentos, economizando tempo e custo em comparação com os processos tradicionais de descoberta de novos medicamentos (JARADA; ROKNE; ALHAJJ, 2020).

Esta estratégia oferece várias vantagens em relação ao desenvolvimento de um novo medicamento para uma determinada indicação. Primeiramente, o risco de falhas é menor; pois a droga reaproveitada já foi considerada suficientemente segura em modelos pré-clínicos e humanos. Em segundo lugar, o prazo para o desenvolvimento de medicamentos pode ser reduzido, porque a maioria dos testes pré-clínicos, de segurança, de avaliação e, em alguns casos, de desenvolvimento de formulação já teria sido concluído (PUSHPAKOM *et al.*, 2019).

Ademais, seria necessário menores investimentos, apresentando vantagens de resultar em um retorno do investimento menos arriscado e mais rápido no desenvolvimento de medicamentos reaproveitados, visto que os custos de trazer um medicamento reposicionado ao mercado foram estimados em US\$ 300 milhões, em comparação com cerca de US\$ 2 a 3 bilhões para o desenvolvimento de um composto inovador (PUSHPAKOM *et al.*, 2019).

Nesse contexto, há enorme interesse no reposicionamento fomentado de biotecnologia e empreendedorismo farmacêutico, que resultou na criação de várias *startups* com foco no reposicionamento (NOVAC, 2013) e no desenvolvimento de metodologias computacionais que envolvem a análise sistemática de dados (como expressão gênica, estrutura química, genótipo ou dados proteômicos ou registros eletrônicos de saúde) que podem então levar à formulação de hipóteses de reposicionamento (PUSHPAKOM *et al.*, 2019).

Exemplos de fármacos com histórico de sucesso no reposicionamento são o sildenafil (Viagra®), reposicionado da angina para a disfunção erétil, a talidomida reposicionada do enjoo matinal para o mieloma múltiplo (NOVAC, 2013) e a aspirina, reposicionada do combate à dor e inflamação para o combate a derrames e infartos do miocárdio (POLAMREDDY; GATTU, 2019).

Na última década, progressos substanciais foram feitos no desenvolvimento de drogas reaproveitadas para o tratamento de infecções bacterianas e fúngicas (MIRÓ-CANTURRI; AYERBE-ALGARBA; SMANI, 2019). Trabalhos demonstram que classes farmacológicas como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) possuem potencial atividade contra cepas de *Candida* spp. (SILVA et al, 2017) e MRSA (*S. aureus* resistentes à meticilina) (NETO et al., 2019), assim como hipnóticos, como o etomidato (SÁ et al., 2020).

Além disso, outra estratégia para superar a resistência é o uso de combinações antifúngicas. Dentre as vantagens apresentadas por essa técnica, é possível mencionar que as combinações de medicamentos expandem o espectro de antibióticos para uma cobertura mais ampla de patógenos, fator este importante principalmente para infecções graves. Além disso, a combinação de drogas pode reduzir o desenvolvimento de resistência a antibióticos, pois podem levar a um efeito sinérgico, que é alcançado por diferentes mecanismos de ação (ZHENG ; SUN; SIMEONOV, 2018).

Atualmente, a técnica mais utilizada é o método *checkerboard*, com o objetivo de determinar o ICIF (Índice de Concentração Inibitória Fracionária) para averiguar a interação entre tais agentes antifúngicos (BIDAUD et al., 2021).

Nesse contexto, para a avaliação da sensibilidade de dado patógeno fúngico a um fármaco, realiza-se a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), através de testes padronizados, e correlacionam-se os resultados com os pontos de corte disponibilizados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), uma organização de desenvolvimento de padrões sem fins lucrativos reconhecida mundialmente e que tem como função desenvolver procedimentos técnicos de referência (CLSI, 2022).

No Brasil, o órgão que cumpre esta função é o BrCast (*Brazilian Comittee on Antimicrobial Suscetibility Testing*), um comitê designado conjuntamente pela Sociedade

Brasileira de Análises Clínicas, Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Brasileira de Microbiologia e Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial, que tem como principais objetivos determinar e rever periodicamente pontos de corte para interpretação dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos para uso clínico e com finalidade epidemiológica (BrCast, 2022).

2.5. Compostos metálicos com atividade antimicrobiana

Os metais são essenciais para a existência e indispensáveis para quase todos os aspectos do metabolismo. De fato, muitos processos bioenergéticos e biogeoquímicos centrais na Terra, incluindo respiração, fotossíntese e fixação de nitrogênio, são inteiramente dependentes de íons e cofatores metálicos (CHANDRANGSU; RENSING; HELMANN, 2017).

No que concerne ao metabolismo de fungos, os metais desempenham um papel central em processos infecciosos, pois servem como cofatores de enzimas a estes microrganismos, incluindo muitas com papéis diretos e indiretos na virulência, como superóxido dismutases, metaloproteases, lacases produtoras de melanina, dentre outros. Especialmente os metais de transição de primeira linha – manganês (Mn), ferro (Fe), cobalto (Co), níquel (Ni) e cobre (Cu) fornecem a atividade redox e catalítica necessária para muitos processos biológicos importantes aos fungos (GERWIEN *et al.*, 2018).

Desta forma, devido a relevância de compostos metálicos para o metabolismo de microrganismos, muito se discute acerca da atividade antimicrobiana dos metais. Nesse viés, o estudo de Saranya *et al.* (2020) observou que complexos de base de Schiff e os metais de transição cobre, cobalto e níquel apresentaram boa atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella* sp., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e atividade antifúngica contra *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Cryptococcus neoformans* e *Penicillium chrysogenum*.

O estudo de Zhang *et al.* (2020), por sua vez, demonstrou que complexos de prata apresentaram valores de concentração inibitória mínima entre 2-32 µg/mL para as espécies de *Candida* testadas *in vitro*.

O trabalho de Rubbiani *et al.* (2020) demonstrou que compostos contendo o composto organometálico ferroceno mostraram atividade antifúngica melhorada contra *C. robusta* em relação ao fluconazol. Além disso, foi demonstrado que tais derivados podem inibir efetivamente a lanosterol 14 α -desmetilase, a mesma enzima que é alvo do fluconazol.

O trabalho de Frei *et al.* (2020) concluiu que os complexos metálicos tiveram eficácia contra patógenos bacterianos do grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp) e leveduras, em comparação com compostos orgânicos. A análise identificou 88 complexos metálicos ativos sem citotoxicidade ou atividade hemolítica, e destes, 71 apresentaram atividade contra pelo menos uma das duas leveduras testadas, *C. albicans* e *C. neoformans*.

Ademais, Almeida *et al.* (2018) concluíram que complexos de paládio (II) demonstram potenciais atividades comprovadas com a inibição do crescimento de *C. krusei* ATCC 6258, *C. glabrata* ATCC 90030 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. Além disso, o estudo de Dantas *et al.* (2018) demonstrou que complexos de cobre (II) sintetizados laboratorialmente apresentaram atividade antifúngica e antibiofilme contra *Candida* spp, principalmente contra as espécies *C. krusei* e *C. glabrata*.

Nesse viés, tais estudos corroboram com a hipótese de que determinados compostos metálicos possuem atividade antimicrobiana, portanto sendo de suma importância a ampliação de pesquisas no que concerne a contornar a crescente resistência antifúngica.

2.5.1 Sulfato de zinco (ZnSO₄)

O zinco é um oligoelemento essencial envolvido em uma ampla variedade de processos metabólicos, tais como aqueles responsáveis pelo crescimento corporal, pela herança reprodutiva e pelo bom funcionamento do sistema endócrino. Além disso, o zinco atua como um fator importante para a cicatrização de feridas e como estabilizador de organelas, da estrutura do DNA, RNA e ribossomos (RAMBOD; PASYAR; RAMZI; 2018; QI *et al.*, 2020).

O transporte desse metal em eucariotos pode ser mediado por membros das famílias de proteínas Zip, implicados na captação de zinco e no transporte do metal para o citoplasma,

seja de fora da célula ou de um compartimento intracelular, como vacúolo ou retículo endoplasmático, e ZnT, o qual é responsável por mediar o transporte de zinco do citosol para os compartimentos extracelulares ou outros compartimentos intracelulares (EIDE, 2006; SILVA-BAILÃO *et al.*, 2018; GLUTSCH; HAMM; GOEBELER, 2019).

Acerca da homeostase do zinco em fungos, o estudo de Eide (2020) demonstrou que a regulação deste metal é realizada por genes de transcrição, como Zap 1 em espécies como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus gattii* e *Eremothecium gossypii*.

Ademais, estudo de Crawford *et al.* (2016) identificou a relevância deste metal e que o funcionamento do transporte de zinco em *C. albicans* inclui transportadores, como proteínas de membrana plasmática. Além disso, a análise demonstrou que diferentes subclasses de transportadores contribuem diferencialmente para o crescimento *in vivo* de diferentes espécies patogênicas humanas e que no caso de candidíases invasivas, a absorção do zinco pelos microrganismos é fundamentalmente necessária.

Na espécie humana, um dos papéis mais estudados e estabelecidos acerca do zinco é no correto funcionamento do sistema imunológico. Compreende-se que a deficiência de zinco está associada à produção reduzida de anticorpos, baixa atividade das células NK (*natural killer*), diminuição da produção de citocinas por monócitos, da quimiotaxia e da explosão oxidativa de neutrófilos. A deficiência deste elemento também resulta em atrofia tímica, produção alterada de hormônios tímicos, linfopenia e respostas defeituosas mediadas por células e anticorpos que levam ao aumento das taxas e de duração da infecção (READ *et al.*, 2019; KUMAR, *et al.* 2020).

Por tais características, o zinco é utilizado como suplemento alimentar para auxiliar principalmente na resposta imunológica. No contexto de pandemia do SARS-CoV-2, o estudo de Al Sulaiman *et al.* (2021) demonstrou que a utilização do sulfato de zinco como terapia adjuvante em pacientes críticos com COVID-19 pode aumentar as taxas de sobrevivência desses indivíduos.

Neste sentido, suplementos alimentares podem ser definidos como produtos para ingestão oral, apresentados em formas farmacêuticas, destinados a suplementar a alimentação de indivíduos saudáveis com nutrientes, substâncias bioativas, enzimas e probióticos, estando estes componentes isolados ou combinados (ANVISA, 2018). Essa categoria foi criada em

2018, através da RDC N° 243, a qual dispõe sobre os requisitos para composição, qualidade, segurança e rotulagem dos suplementos alimentares e para atualização das listas de nutrientes, substâncias bioativas, enzimas e probióticos, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar destes produtos.

Suplementos alimentares, portanto, não são medicamentos e, por isso, em nenhuma hipótese, podem apresentar indicação de prevenção, tratamento ou cura de doenças, visto que esse tipo de alegação é restrita a medicamentos e precisam de adequadas comprovações científicas (ANVISA, 2020).

Desta forma, é relevante que os íons metálicos como o zinco sejam associados a sais para a produção de suplementos, visto que os sais têm propriedades físicas diferentes de suas formas livres e podem ser usados para alterar a higroscopicidade, a estabilidade, a solubilidade e a taxa de dissolução de um ingrediente farmacêutico ativo. O aumento da solubilidade e da taxa de dissolução pode melhorar a absorção de diversos componentes enquanto a diminuição da higroscopicidade e o aumento da estabilidade podem facilitar ou até mesmo permitir sua produção comercial (GLANZNER; SILVA, 2010). Em especial, o sulfato de zinco pode ser melhor absorvido devido à sua maior solubilidade em pH neutro quando comparado ao Zn livre, desta forma, sendo comercialmente produzido (DE ROMANA; LÖNNERDAL; BROWN; 2003).

No que concerne à atividade antimicrobiana do zinco, Bafghi *et al.* (2014) demonstraram que o sulfato de zinco apresentou atividade *in vitro* contra espécies de *Leishmania*. Os achados revelaram que todas as culturas contendo sulfato de zinco apresentaram crescimento mais lento em comparação ao grupo controle.

Além disso, estudos *in vitro* mostraram que a produção de cepas de herpes vírus foi inibida em 99% na presença de sulfato de zinco 0,1 mM. Estudos de microscopia eletrônica demonstraram deposição maciça de zinco na superfície viral, o que aparentemente interferirem no bom funcionamento das glicoproteínas virais, resultando no bloqueio do mecanismo normal de penetração por fusão de membranas (ARENS; TRAVIS, 2000).

No trabalho de Cohrt *et al.* (2018) demonstrou-se que compostos contendo zinco exibiram atividade antifúngica *in vitro* de amplo espectro e eficácia *in vivo* em um modelo de candidíase renal. Wang et al (2020) demonstraram que o sulfato de zinco na concentração testada de 0,1 g/L, diminuiu a biomassa da espécie fúngica *Aureobasidium pullulans* em

16,9%. Ademais, Sharquie *et al.* (2004) demonstraram que a solução tópica de sulfato de zinco a 15% é uma terapia *in vivo* promissora para a infecção fúngica Pitíriase versicolor (popularmente conhecida como pano branco) com efeitos colaterais insignificantes.

Entretanto, apesar da existência de relatos de literatura sobre a atividade antifúngica do sulfato de zinco, estes são escassos e pouco realizados com espécies de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol. Neste sentido, estudos acerca dessa temática necessitam ser amplamente realizados a fim de determinar sua eficácia, mecanismo de ação e possíveis aplicações em formas farmacêuticas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Investigar a ação antifúngica do sulfato de zinco frente a cepas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol.

3.2 Objetivos específicos:

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do Fluconazol das cepas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol em estudo (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. auris*, *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019);
- Determinar a CIM do sulfato de zinco das cepas sensíveis e resistentes ao fluconazol em estudo;
- Avaliar e determinar o tipo de interação farmacológica que ocorre entre o sulfato de zinco e o fluconazol para as cepas de *Candida* spp. em estudo;

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção das cepas

No presente estudo, foram utilizadas 8 cepas de *Candida* spp. pertencentes ao Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN - UFC), em que cinco destas são classificadas como resistentes ao fluconazol (2 *C. albicans*, 2 *C. tropicalis*, 1 *C. glabrata*), uma é sensível ao fluconazol (*C. auris*) e duas são do banco ATCC, (*Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019) sendo estas últimas, portanto, utilizadas como controle nos ensaios.

As cepas armazenadas em caldo Sabouraud dextrose (HiMedia, Mumbai, Índia) acrescido de glicerol (Dinâmica, São Paulo, Brasil) a uma temperatura de -20°C, foram recuperadas com a utilização de 1 mL do meio de cultura caldo Sabouraud dextrose (HiMedia, Mumbai, Índia) e 100 µL da suspensão de leveduras. As cepas ressuspendidas foram incubadas por 24h a 35°C em estufa e o repique das mesmas para a utilização nos ensaios foi realizado em ágar Sabouraud, por 24h a 35°C em estufa.

4.2 Ativos utilizados

O sulfato de zinco e o fluconazol foram utilizados neste estudo, ambos obtidos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, USA). As diluições das substâncias foram realizadas em água destilada estéril. O sulfato de zinco foi testado na faixa de 1024 - 2 µg/mL e o fluconazol na faixa de 128 - 0,25 µg/mL.

4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima dos ativos

O teste de sensibilidade foi realizado com adaptações da metodologia de Microdiluição em Caldo, a qual é descrita pela norma M27-A3 do CLSI (CLSI, 2008). Utilizou-se o meio de cultura RPMI 1640 (Vitrocell Embriolife, São Paulo, Brasil) com pH 7,0 tamponado com 0,165 M de ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma, USA).

Após a recuperação, as cepas a serem utilizadas nos testes foram repicadas em meio de cultura Sabouraud Dextrose e incubadas em estufa, 24h antes da realização do teste. Posterior a incubação, as colônias foram retiradas e inoculadas em solução salina estéril, a 0,85% e ajustada sua densidade celular para a escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Desta suspensão, 20 µL são transferidos para 1 mL de meio RPMI para ser realizada a primeira

diluição do inóculo. A partir desta primeira diluição, 100 µL foram retirados e inoculados em um novo tubo com RPMI 1640 q.s.p 2 mL, para diluição adequada à requerida no teste (CLSI, 2008).

Os testes de Microdiluição em Caldo foram realizados em placas de 96 poços, estéreis e de formato em U. Para a preparação das placas, 100 µL de meio RPMI foram adicionados em cada fileira da mesma, com o auxílio de uma pipeta multicanal, exceto na fileira correspondente ao poço 2. Nesse poço, foram adicionados 200 µL das drogas diluídas nas concentrações desejadas, as quais passaram por diluições seriadas de 100 µL entre os poços correspondentes às colunas 2 a 11.

A concentração inibitória mínima foi definida como a menor concentração de droga que impede o crescimento de 50% do microrganismo em análise visual, comparando-se os crescimentos obtidos no controle positivo (poço 12) com os poços das diferentes concentrações de droga da diluição seriada (CLSI, 2008).

Os testes foram realizados em triplicata, em que as cepas *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foram utilizadas como controle. As cepas consideradas resistentes ao fluconazol foram aquelas com ponto de corte da CIM ≥ 8 µg/mL (CLSI, 2012).

A atividade antimicrobiana foi classificada de acordo com os critérios de Morales *et al.* (2008): se CIM inferior a 100 µg/mL, a atividade antimicrobiana é considerada boa; de 100 µg/mL a 500 µg/mL a atividade antimicrobiana é moderada; de 500 µg/mL a 1000 µg/mL a atividade antimicrobiana é fraca; acima de 1000 µg/mL a atividade antimicrobiana é inativa.

4.4 Avaliação da interação farmacológica

A avaliação da interação farmacológica foi realizada por meio do Método de *Checkerboard* adaptado por Da Silva *et al.*, (2013), através da determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF). Esse índice foi determinado pela seguinte equação, apresentada na Figura 3:

Figura 3: Determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF).

$$ICIF = \frac{C_A^{COMBINADO}}{CIM_A^{ISOLADO}} + \frac{C_B^{COMBINADO}}{CIM_B^{ISOLADO}}$$

Fonte: elaborada pela autora

Onde CIM_A e CIM_B ISOLADO correspondem às concentrações inibitórias das drogas isoladas e C_A e C_B COMBINADO às concentrações das drogas combinadas. A CIM utilizada para cada ativo foi aquela encontrada no teste para cada cepa utilizada de espécies de *Candida*.

Foram adicionados 100 µL do meio RPMI em cada poço, exceto no poço 2, que continha apenas 200 µL da combinação de concentrações das substâncias testadas, em conformidade com as concentrações referentes ao CIM de cada cepa. Posteriormente, foi realizada a diluição seriada na ordem 2 do poço 2 ao 11, adicionando em seguida 100 µL do inóculo final. O poço 1 é o controle negativo do teste, contendo apenas meio de cultura e o poço 12, o controle positivo (CLSI, 2008).

A classificação da interação das drogas é considerada sinérgica, se $ICIF \leq 0,5$; parcialmente sinérgica, se $0,5 < ICIF < 1$; aditiva, se $ICIF = 1$; indiferente, se $1 < ICIF < 4$ ou antagonista, se $ICIF > 4,0$ (JI *et al.*, 2013 ; JORGE *et al.*, 2017).

4.5. Análise de dados

Os testes foram realizados em triplicata, em dias diferentes, de modo a obter as médias aritméticas correspondentes aos resultados de CIMs e ICIFs.

5. RESULTADOS

5.1 Determinação da concentração inibitória mínima

Segundo o documento M27-S4 do CLSI (2012), 5 cepas clínicas foram consideradas resistentes ao fluconazol e uma cepa foi considerada sensível. Duas cepas da coleção ATCC foram utilizadas no teste, em que *C. parapsilosis* ATCC 22019 foi considerada sensível ao fluconazol e *C. krusei* ATCC 6258 resistente. Os resultados das CIMs variaram entre 1,3 e 26,66 µg/mL para o fluconazol e com relação ao sulfato de zinco, os valores das CIMs variaram entre 16 e 64 µg/mL. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Concentração Inibitória Mínima isolada do sulfato de zinco e do fluconazol, frente a cepas de *Candida* spp.

Cepa	CIM do sulfato de zinco (µg/mL)	CIM do fluconazol (µg/mL)
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	16	1,3
^r <i>Candida krusei</i> ATCC 6258	21,33	16
<i>Candida auris</i>	21,33	2,66
^r <i>Candida albicans</i> 1	64	21,33
^r <i>Candida albicans</i> 2	53,33	21,33
^r <i>Candida tropicalis</i> 1	42,6	26,66
^r <i>Candida tropicalis</i> 2	53,33	26,66

^r <i>Candida glabrata</i>	32	26,66
--------------------------------------	----	-------

^r Cepa resistente ao fluconazol, com CIM ≥ 8 µg/mL (CLSI, 2012)

5.2 Avaliação do efeito associado do sulfato de zinco e fluconazol

A partir dos resultados obtidos das CIMs isoladas do sulfato de zinco e do fluconazol, realizou-se o teste para determinar a interação entre as substâncias para cada uma das cepas. O ICIF variou entre 1,00 e 2,00 para as espécies de *Candida* spp. em estudo, demonstrando que 62,5% das interações avaliadas entre sulfato de zinco e fluconazol foram classificadas como indiferente e 37,5% como aditiva para as cepas analisadas, segundo Jorge et al., 2017. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3:

Tabela 3: Avaliação do efeito associado do sulfato de zinco e fluconazol frente a *Candida* spp.

Cepa	CIM do sulfato de zinco (µg/mL)	CIM do fluconazol (µg/mL)	ICIF	Interpretação
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	16	1,3	1,98	Indiferente
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	21,33	16	2,00	Indiferente
<i>Candida auris</i>	21,33	2,66	1,33	Indiferente
<i>Candida albicans</i> 1	64	21,33	2,00	Indiferente
<i>Candida albicans</i> 2	53,3	21,33	1,33	Indiferente
<i>Candida tropicalis</i> 1	42,6	26,66	1,00	Aditiva
<i>Candida tropicalis</i> 2	53,33	26,66	1,00	Aditiva

<i>Candida glabrata</i>	32	26,66	1,00	Aditiva
-------------------------	----	-------	------	---------

A classificação da interação das drogas é considerada sinérgica, se $ICIF \leq 0,5$; parcialmente sinérgica, se $0,5 < ICIF < 1$; aditiva, se $ICIF = 1$; indiferente, se $1 < ICIF < 4$ ou antagonista, se $ICIF > 4,0$ (JI *et al.*, 2013 ; JORGE *et al.*, 2017).

6. DISCUSSÃO

As estratégias atualmente disponíveis para limitar a evolução da resistência de patógenos fúngicos humanos incluem o reforço de programas de vigilância sanitária, a administração de antifúngicos de forma direcionada ao diagnóstico correto, minimizar o uso clínico-ambiental de antifúngicos e ampliar o uso de terapias combinadas com fármacos (FISHER *et al.*, 2022).

Nesse viés, muitos compostos metálicos estão atualmente sob investigação clínica para terapia de diversas doenças, como câncer, malária e doenças neurodegenerativas, ajudando a diminuir a percepção de que tais complexos são inerentemente tóxicos. No entanto, as aplicações antimicrobianas dos metais não são amplamente exploradas para aplicações clínicas até o presente momento (FREI *et al.*, 2021).

Acerca dos resultados obtidos na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) deste trabalho, de acordo com os critérios estabelecidos por Morales *et al.* (2008), levando-se em consideração tal classificação, o sulfato de zinco, para 100% das cepas testadas, obteve atividade antimicrobiana boa. Contudo, não há relatos de estudos com metodologias similares na literatura para que possam ser comparados os resultados das CIMs com o presente estudo realizado.

Ademais, para que seja possível ampliar as pesquisas com o sulfato de zinco frente a cepas de *Candida* spp., é de suma importância compreender acerca da homeostase desse metal, assim como os possíveis mecanismos pelos quais os metais exercem sua atividade antifúngica. Nesse contexto, o estudo de He *et al.* (2011) com óxido de zinco, outro composto que contém esse metal, sugeriu que este pode afetar as funções celulares, causando o aumento do teor de ácidos nucleicos e carboidratos do organismo fúngico. O aumento de ácidos nucleicos pode ser devido à resposta ao estresse das hifas fúngicas e o aumento de carboidratos devido a um mecanismo de autoproteção.

Em outro estudo, Kumar *et al.* (2021) demonstraram que o mecanismo de nanopartículas a base de óxido de cobre e óxido de zinco é a partir do rompimento celular e da formação de mais espécies de EROs (espécies reativas de oxigênio), levando ao vazamento e senescência das células fúngicas.

No entanto, compostos contendo componentes à base de metais, como o sulfato de zinco, também podem ser altamente tóxicos para as células do hospedeiro, e a homeostase dos íons metálicos é fundamental para a sobrevivência (CRAWFORD *et al.*, 2018). Nesse viés, alguns exemplos de alternativas para minimizar tal toxicidade seria a aplicação de nanopartículas e a combinação de tais compostos com fármacos antifúngicos.

O efeito antifúngico de nanopartículas de zinco tem recebido gradualmente mais atenção dos pesquisadores. Atualmente, a prevenção e controle da contaminação fúngica com nanotecnologia é foco de inúmeros estudos (SUN; LI; LE, 2018). A literatura apresenta diversos trabalhos com nanopartículas de zinco, as quais visam disseminar substâncias com capacidade terapêutica e aumentar a eficácia dos mesmos no organismo através de sua liberação controlada e direcionamento celular, oferecendo inúmeras vantagens quando contrapostos com as formas farmacêuticas convencionais (SBALQUEIRO *et al.*, 2018).

Recentes estudos demonstram que a atividade antifúngica de nanopartículas de óxido de zinco contra *C. albicans* apresentou concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) entre 64-128 e 256-512 µg/ml, respectivamente (MIRI *et al.*, 2019; KERMANI; SALARI; ALMANI, 2020).

Acerca da combinação de compostos não antimicrobianos com fármacos antimicrobianos, é possível visualizar a ação potencializada de efeito microbiano quando associadas, como demonstrado por da Silva *et al.* (2013) em que foi observada a ação sinérgica do antiarrítmico amiodarona com o fluconazol; e por Liu *et al.* (2016) em que foi atestada a atividade sinérgica entre bloqueadores do canal de cálcio e fluconazol.

No contexto das combinações de antifúngicos com o zinco, Stevanovic *et al.* (2020) realizaram a complexação do fluconazol com íons de Zn(II) para averiguar sua possível atividade antifúngica frente a cepas de *Candida* spp. As concentrações inibitórias mínimas obtidas variaram entre 0,88 e 3,12 µg/mL, contudo tal combinação resultou em um aumento da citotoxicidade.

Todavia, os resultados obtidos entre a combinação dos ativos sulfato de zinco e fluconazol, neste estudo, demonstraram que não houve redução e nem melhoria dos efeitos para cepas de *Candida* spp. *in vitro*. Desta forma, é possível inferir que uma substância não interfere no mecanismo de ação de outra.

Outro estudo feito por Sharma; Jandaik e Kumar (2016) em que foi realizado o sinergismo de nanopartículas de zinco com o fluconazol frente às espécies fúngicas *Trichophyton mentagrophytes* e *Cryptococcus neoformans* demonstraram que tal combinação obteve como resultado apenas efeito aditivo, o que está de acordo com os resultados obtidos neste estudo realizados com o gênero *Candida*.

Entretanto, o estudo de Nazari *et al.* (2020) demonstrou divergência em comparação aos resultados obtidos neste estudo, visto que nanopartículas de zinco estudadas combinadas com fluconazol apresentaram atividade sinérgica frente a cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com candidíase vulvovaginal, em que se observou a diminuição das CIMs quando os ativos estavam em combinação.

Desta forma, compreende-se que há a necessidade de ampliar e direcionar estudos acerca da atividade antifúngica de metais, como o zinco, visto que são oportunidades para novas estratégias terapêuticas. Compreende-se que a descoberta de pequenas moléculas que interferem na homeostase expandirá a diversidade química dos antifúngicos e levará ao aumento da eficácia dos medicamentos antifúngicos atualmente administrados (SIMM; MAY, 2019).

Por fim, os resultados obtidos neste trabalho permitem evidenciar que o sulfato de zinco apresenta atividade antifúngica contra cepas de *Candida* spp. em sua forma isolada, e em combinação com o fluconazol. Futuras pesquisas aumentando o número de cepas testadas, avaliando seus possíveis mecanismos de ação, atividade *in vivo* e possíveis aplicações farmacológicas são de grande relevância no que concerne a ter este suplemento como possível candidato antifúngico.

7. CONCLUSÃO

Considerando-se o limitado arsenal antifúngico disponível, associado à crescente resistência, o sulfato de zinco destaca-se devido à sua atividade antifúngica *in vitro*. Contudo, para a viabilização de seu uso, são necessários mais estudos direcionados que permitam a compreensão do seu mecanismo de ação, avaliação de toxicidade e aplicações farmacológicas para torná-lo uma possível alternativa terapêutica.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, S.; ALFOUZAN, W. *Candida auris*: Epidemiology, diagnosis, pathogenesis, antifungal susceptibility, and infection control measures to combat the spread of infections in healthcare facilities. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, p. 807, 2021.
- AL SULAIMAN, K. *et al.* Evaluation of zinc sulfate as an adjunctive therapy in COVID-19 critically ill patients: a two center propensity-score matched study. **Critical Care**, v. 25, n. 1, p. 1-8, 2021.
- ALMEIDA, E.T. *et al.* Síntese, caracterização e avaliação da atividade biológica de complexos de paládio (II) contendo ligante imínico. 2018.
- ALMEIDA, J.N. de *et al.* Emergence of *Candida auris* in Brazil in a COVID-19 intensive care unit. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 3, p. 220, 2021.
- ASSRESS, H.A *et al.* Antifungal azoles and azole resistance in the environment: current status and future perspectives — a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 20, n. 4, p. 1011-1041, 2021.
- ASHBURN, T.T.; THOR, K.B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature reviews Drug discovery**, v. 3, n. 8, p. 673-683, 2004.
- ARENS, M.; TRAVIS, S. Zinc salts inactivate clinical isolates of herpes simplex virus in vitro. **Journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 5, p. 1758-1762, 2000.
- BAFGHI, A.F. *et al.* Anti Leishmanial effect of zinc sulphate on the viability of *Leishmania tropica* and *L. major* promastigotes. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 7, n. 9, 2014.
- BALKIS, M. *et al.* Mechanisms of Fungal Resistance. **Drugs**. v. 62, p. 1025–1040. 2002
- BANDARA, N.; SAMARANAYAKE, L. Emerging and future strategies in the management of recalcitrant *Candida auris*. **Medical Mycology**, v. 60, n. 4, 2022.
- BAVARO, D. F. *et al.* Emerging issue of fluconazole-resistant candidemia in a tertiary care hospital of southern Italy: Time for antifungal stewardship program. **Journal of Medical Mycology**, v. 32, n. 1, 2022.

BEN-AMI, R. Treatment of invasive candidiasis: A narrative review. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 97, 2018.

BEN-AMI, R; KONTOYIANNIS, D.P. Resistance to antifungal drugs. **Infectious Disease Clinics**. v. 35, n. 2, p. 279-311, 2021.

BENEDICT, K. *et al.* Estimation of Direct Healthcare Costs of Fungal Diseases in the United States. **Clinical Infectious Diseases**. v. 68, n. 11, p. 1791–1797, 2019.

BIDAUD, A. *et al.* Techniques for the assessment of in vitro and in vivo antifungal combinations. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 113, 2021.

BIRD, A.J.; WILSON, S. Zinc homeostasis in the secretory pathway in yeast. **Current opinion in chemical biology**, v. 55, p. 145-150, 2020.

BONGOMIN, F. *et al.* Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases — Estimate Precision. **Journal of Fungi**. v. 3, n. 4, p. 57, 2017.

BR Cast. Disponível em: <<http://brcast.org.br/>> Acesso em 08 de junho de 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia alimentar para a população brasileira. 2. ed., 1. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_alimentar_populacao_brasileira_2ed.pdf Acesso em: 12 maio. 2012.

CANELA, H.M.S. *et al.* Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. **Mycoses**, v. 61, n. 1, p. 11-21, 2018.

CARMONA, E.M.; LIMPER, A.H. Overview of Treatment Approaches for Fungal Infections. *Clinics in Chest Medicine*, v. 38, n. 3, p. 393–402, 2017.

CAROLUS, H. *et al.* Amphotericin B and other polyenes—discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 321, 2020.

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M.C. *Candida* biofilms: threats, challenges, and promising strategies. **Frontiers in medicine**, v. 5, p. 28, 2018.

CHANDRANGSU, P.; RENSING, C.; HELMANN, J.D. Metal homeostasis and resistance in bacteria. **Nat Rev Microbiol**, v. 15, n. 6, p. 338-350, 2017.

CHEN, J. *et al.* Molecular Epidemiology, Antifungal Susceptibility, and Virulence Evaluation of *Candida* Isolates Causing Invasive Infection in a Tertiary Care Teaching Hospital. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, 2021.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth informational supplement. CLSI document M27-S4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2012.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard M27- A3, 3 ed., Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008.

COHRT, K.A.O. *et al.* Novel zinc-attenuating compounds as potent broad-spectrum antifungal agents with in vitro and in vivo efficacy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 5, p. 1-19, 2018.

CRAWFORD, A.C. *et al.* Biphasic zinc compartmentalisation in a human fungal pathogen. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 5, 2018.

CORTEGIANI, A; MISSERI, G. & CHOWDHARY, A. What's new on emerging resistant *Candida* species. **Intensive Care Medicine**.v. 45, p. 512–515, 2019.

D'ENFERT, C.; BOUGNOUX, M.-E. **Human Fungal Infections**. ELSEVIER, 2014.

DA SILVA, C.R *et al.* Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1691-1700, 2013.

DA SILVA, R.B *et al.* Candidemia in a public hospital in Northeastern Brazil: Epidemiological features and risk factors in critically ill patients. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 36, n. 4, p. 181-185, 2019.

DANTAS, F.G.S. *et al.* A Promising Copper (II) Complex as Antifungal and Antibiofilm Drug against Yeast Infection. **Molecules**, v. 23, 2018.

DE ANDRADE NETO, J. B. *et al.* Synergistic effects of ketamine and azole derivatives on *Candida* spp. resistance to fluconazole. **Future Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 177-188, 2020.

DE ROMAÑA, D. L; LÖNNERDAL, B; BROWN, K.H. Absorption of zinc from wheat products fortified with iron and either zinc sulfate or zinc oxide. **The American journal of clinical nutrition**, v. 78, n. 2, p. 279-283, 2003.

DONLAN R.M, COSTERTON J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 15, n.2, p. 167-193, 2002.

EIDE, D.J. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 7, p. 711-722, 2006.

EIDE, D.J. Transcription factors and transporters in zinc homeostasis: lessons learned from fungi. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 55, n. 1, p. 88-110, 2020.

EL-DIASTY, E.M. *et al.* Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against dermatophytic lesions of cattle. **Rom J Biophys**, v. 23, n. 3, p. 191-202, 2013.

FEKKAR, A. *et al.* Hospital outbreak of fluconazole-resistant *Candida parapsilosis*: arguments for clonal transmission and long-term persistence. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 65, n. 5, p. e02036-20, 2021.

FISHER, M.C. *et al.* Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. **Nature Reviews Microbiology**, p. 1-15, 2022.

FREI, A. *et al.* Metal complexes as a promising source for new antibiotics. **Chemical science**, v. 11, n. 10, p. 2627-2639, 2020.

FREI, A. *et al.* Nontoxic Cobalt (III) Schiff Base Complexes with Broad-Spectrum Antifungal Activity. **Chemistry—A European Journal**, v. 27, n. 6, p. 2021-2029, 2021.

FRIEDMAN, D.Z.P; SCHWARTZ, I.S. Emerging fungal infections: new patients, new patterns, and new pathogens. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 3, p. 67, 2019.

GARCIA-BUSTOS, V. *et al.* What Do We Know about *Candida auris*? State of the Art, Knowledge Gaps, and Future Directions. **Microorganisms**, v. 9, n. 10, p. 2177, 2021.

GERWIEN, F. *et al.* Metals in fungal virulence. **FEMS microbiology reviews**, v. 42, n. 1, p. 1-21, 2018.

GIACOMAZZI, J. *et al.* The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, p. 145–150, 2016.

GISI, U. Crossover between the control of fungal pathogens in medicine and the wider environment, and the threat of antifungal resistance. **Plant Pathology**. p. 1–19, 2021.

GUANGXU, J; WONG. Toward better drug repositioning: prioritizing and integrating existing methods into efficient pipelines. **Drug Discovery Today**. v. 19, n. 5, p. 637-644, 2014.

GLANZNER, A.L ; SILVA, D;M. A formação de sais no desenvolvimento de fármacos. **Revista Átomo**. n.8. p. 3-16. 2010.

GLUTSCH, V. HAMM, H.; GOEBELER, M. Zinc and skin: an update. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 17, n. 6, p. 589-596, 2019.

HARMA, N.; JANDAIK, S.; KUMAR, S.. Synergistic activity of doped zinc oxide nanoparticles with antibiotics: ciprofloxacin, ampicillin, fluconazole and amphotericin B against pathogenic microorganisms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, p. 1689-1698, 2016.

HAY, R. Therapy of skin, hair and nail fungal infections. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 99, 2018.

HE, L. *et al.* Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. **Microbiological research**, v. 166, n. 3, p. 207-215, 2011.

ISMAIL, W. *et al.* The economic burden of candidemia and invasive candidiasis: a systematic review. **Value in health regional issues**, v. 21, p. 53-58, 2020.

JARADA, N.T; ROKNE, J.G.; ALHAJJ, R. A review of computational drug repositioning: strategies, approaches, opportunities, challenges, and directions. **Journal of Cheminformatics**, v. 12, n. 46. 2020.

Jl, J. *et al.* In vitro activity of sulbactam in combination with imipenem, meropenem, panipenem or cefoperazone against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, n. 4, p. 400–401, 2013.

JORGE, P. *et al.* Searching for new strategies against biofilm infections: Colistin-AMP combinations against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* single-and double-species biofilms. **PLoS One**, v. 12, n. 3. 2017.

KERMANI, A.; S. SALARI; ALMANI, P. Comparison of antifungal and cytotoxicity activities of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles with amphotericin B against different *Candida* species: In vitro evaluation. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 35, n. 1. 2021.

KOEHLER, P. *et al.* Morbidity and mortality of candidaemia in Europe: an epidemiologic meta-analysis. **Clinical microbiology and infection**, v. 25, n. 10, p. 1200-1212, 2019.

KRISTANC, L. *et al.* The pore-forming action of polyenes: From model membranes to living organisms. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1861, n. 2, p. 418-430, 2019.

KUMAR, A. *et al.* Potential role of zinc supplementation in prophylaxis and treatment of COVID-19. **Medical hypotheses**, v. 144, p. 109848, 2020.

KUMAR, P. *et al.* Defects induced Enhancement of Antifungal activities of Zn doped CuO nanostructures. **Applied Surface Science**, v. 560, p. 150026, 2021.

LEE, Y. *et al.* Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. **Chemical reviews**, v. 121, n. 6, p. 3390-3411, 2020.

LI, Y.; LIAO, C.; TJONG, S.C. Recent advances in zinc oxide nanostructures with antimicrobial activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 8836, 2020.

LIM, C.SY., ROSLI, R., SEOW, H.F. *et al.* *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v. 31, p. 21–31, 2012.

LIU, S. *et al.* Synergistic effect of fluconazole and calcium channel blockers against resistant *Candida albicans*. **PloS one**, v. 11, n. 3. p. 1-12.2016.

LOCKHART, S.R.; GUARNER, J. Emerging and reemerging fungal infections. **Seminars in diagnostic pathology**. WB Saunders. p. 177-181, 2019.

LUDWIG, A. *et al.* Suscetibilidade in vitro de *Candida rugosa* frente a antifúngicos e óleos essenciais. 2018.

MBA, I.E., NWEZE, E.I. Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. v. 39, p. 1797–1819 2020.

MENDONÇA, A. *et al.* Fungal Infections Diagnosis – Past, Present and Future. **Research in Microbiology**. 2021.

MIRI, A. *et al.* Zinc oxide nanoparticles: Biosynthesis, characterization, antifungal and cytotoxic activity. **Materials Science and Engineering: C**, v. 104.2019.

MIRÓ-CANTURRI, A; AYERBE-ALGABA, R; SMANI, Y. Drug Repurposing for the Treatment of Bacterial and Fungal Infections. **Frontiers in Microbiology**. v.10, 2019.

MORALES, G. *et al.* Antimicrobial activity of three *Baccharis* species used in the traditional medicine of Northern Chile. **Molecules**, v. 13, n. 4, p. 790-794, 2008.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Microbiologia médica*. 8. ed. Rio de Janeiro (RJ): ELSEVIER, 2017.

NAZARI, R. *et al.* Synergistic antifungal effect of fluconazole combined with ZnO nanoparticles against *Candida albicans* strains from vaginal candidiasis. **Medical Laboratory Journal**, v. 14, n. 3, p. 26-32, 2020.

NETO, J.B.A. *et al.* A mechanistic approach to the in-vitro resistance modulating effects of fluoxetine against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Microbial Pathogenesis**. v. 127, p. 335-340, 2019.

NOVAC, N. Challenges and opportunities of drug repositioning. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 5, p. 267-272, 2013.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1–1, 2003.

OGAWA, M. *et al.* Antiviral activity of zinc sulfate against hepatitis A virus replication. **Future Virology**, v. 14, n. 6, p. 399-406, 2019.

O'NEILL, J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report, and Recommendations **The Review on Antimicrobial Resistance**.

PAI, V. *et al.* Antifungal resistance in dermatology. **Indian Journal of Dermatology**.v. 63, n. 5, p. 361, 2018.

PAPPAS, P.G. *et al.* Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1-20, 2018.

PERFECT, J.R.; GHANNOUM, M. Emerging issues in antifungal resistance. **Infectious Disease Clinics**. v. 34, n. 4, p. 921-943, 2020.

PERMANA, A.D *et al.* Dissolving microneedle-mediated dermal delivery of itraconazole nanocrystals for improved treatment of cutaneous candidiasis. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 154, p. 50-61, 2020.

POLAMREDDY, P.; GATTU, N. The drug repurposing landscape from 2012 to 2017: evolution, challenges, and possible solutions. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 3. p 789-795, 2019.

PUSHPAKOM, S. *et al.* Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, p. 41–58, 2018.

QADRI, H.; SHAH, A.H.; MIR, M. Novel strategies to combat the emerging drug resistance in human pathogenic microbes. **Current Drug Targets**, v. 22, n. 12, p. 1424-1436, 2021.

QI, S. *et al.* Zinc supplementation increased bone mineral density, improves bone histomorphology, and prevents bone loss in diabetic rat. **Biological Trace Element Research**, v. 194, n. 2, p. 493-501, 2020.

RAMBOD, M.; PASYAR, N.; RAMZI, M. The effect of zinc sulfate on prevention, incidence, and severity of mucositis in leukemia patients undergoing chemotherapy. **European Journal of Oncology Nursing**, v. 33, p. 14-21, 2018.

RAMDAS, I.; DEVI, C. Inhibitory effect of zinc sulfate on clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 12, n. 4, 2020.

READ, S.A. *et al.* The role of zinc in antiviral immunity. **Advances in nutrition**, v. 10, n. 4, p. 696-710, 2019.

RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA Nº 243, 2018. ANVISA. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379969/do1-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-243-de-26-de-julho-de-2018-34379917>. Acesso em 24 de maio de 2022.

RICHE, C.; CASSOL, R.; PASQUALOTTO, A.C. Is the frequency of candidemia increasing in COVID-19 patients receiving corticosteroids?. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 286, 2020.

RODRIGUES, D.F.B. Distribuição das espécies de crípticas de *Candida* em isolados de corrente sanguínea: identificação e perfil de sensibilidade antifúngica. 2020.

RODRIGUES, M.L. Negligenciadas entre as negligenciadas: perspectiva de prevenção, controle e diagnóstico de doenças causadas por fungos. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2019.

RODRIGUES, M.L.; NOSANCHUK, J.D. Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. v.14, n. 2, 2020.

ROSA, C. F. *et al.* Candidemia em hospitais de alta complexidade no Brasil: revisão narrativa da literatura. Repositório Institucional da Universidade Federal de Santa Catarina. 2021.

RUBBIANI, R. *et al.* From Design to *in vivo* Active Organometallic-Containing Antimycotic Agents. 2020.

SÁ, L.G.A.V. *et al.* Synergistic anticandidal activity of etomidate and azoles against clinical fluconazole-resistant *Candida* isolates. **Future Microbiology**. v. **14**, n. **17**, p. 1477-1488, 2019.

SÁ, L.G.A.V. *et al.* Etomidate inhibits the growth of MRSA and exhibits synergism with oxacillin. **Future Microbiology**. v. **15**, n. **17**, p. 1611-1619, 2020.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.

SARANYA, J. *et al.* Tetradentate Schiff Base complexes of transition metals for antimicrobial activity. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 45, n. 6, p. 4683-4695, 2020.

SBALQUEIRO, G. *et al.* Uso da nanotecnologia para o desenvolvimento de fármacos. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 12, n. 10, p. 242-252, 2018.

SHARMA, S. *et al.* Post coronavirus disease mucormycosis: A deadly addition to the pandemic spectrum. **The Journal of Laryngology & Otology**. v. 135, n.5, p. 442-447, 2021.

SHARMA, N.; JANDAIK, S.; KUMAR, S. Synergistic activity of doped zinc oxide nanoparticles with antibiotics: ciprofloxacin, ampicillin, fluconazole and amphotericin B against pathogenic microorganisms. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, p. 1689-1698, 2016.

SHARQUIE, K.E. *et al.* Treatment of Pityriasis Versicolour with Topical 15% Zinc Sulfate Solution. **Hospital**, v. 2004, 2004.

SIDRIM, J.J.C ; ROCHA, M.F.G, Micologia Médica à luz de autores contemporâneos. 1. ed. GUANABARA KOOGAN. 2004.

SILVA-BAILAO, M. G *et al.* Mechanisms of copper and zinc homeostasis in pathogenic black fungi. **Fungal biology**, v. 122, n. 6, p. 526-537, 2018.

SILVA, R.A.C *et al.* In vitro anti-*Candida* activity of selective serotonin reuptake inhibitors against fluconazole-resistant strains and their activity against biofilm-forming isolates. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 341-348, 2017.

SIMM, C.; MAY, R.C. Zinc and iron homeostasis: target-based drug screening as new route for antifungal drug development. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, p. 181, 2019.

STEVANOVIĆ, N.L. *et al.* Copper (II) and Zinc (II) Complexes with the Clinically Used Fluconazole: Comparison of Antifungal Activity and Therapeutic Potential. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 1, p. 24, 2020.

SUN, Q.; LI, J.; LE, T. Zinc oxide nanoparticle as a novel class of antifungal agents: current advances and future perspectives. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 43, p. 11209-11220, 2018.

TACCONELLI, E. *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis.

WANG, D. *et al.* Enhanced β -glucan and pullulan production by *Aureobasidium pullulans* with zinc sulfate supplementation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 4, p. 1751-1760, 2020.

XIE, J.L *et al.* Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. **Future microbiology** v. 9, n. 4, p. 523-542, 2014.

YAO, D. *et al.* Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* from two hospitals in China. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 771, 2019.

ZHANG, X. *et al.* In Vitro Antifungal Activity and Mechanism of Ag3PW12O40 Composites against *Candida* Species. **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 6012, 2020.

ZHAO, Y.; PERLIN, D.S. Review of the novel echinocandin antifungal rezafungin: animal studies and clinical data. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 192, 2020.

ZHENG, W.; SUN, W.; SIMEONOV, A. Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases: Drug repurposing for infectious diseases. *British Journal of Pharmacology*, v. 175, n. 2, p. 181–191.2018.

ZHOU, Y. *et al.* Lovastatin synergizes with itraconazole against planktonic cells and biofilms of *Candida albicans* through the regulation on ergosterol biosynthesis pathway. **Applied microbiology and biotechnology**. v. 102, n. 12, p. 5255-5264, 2018.