Vol. 15(2):44-61; Decembrie 2021

Abordări terapeutice alternative în terapia antifungică în contextul rezistenței la antifungicele convenționale
Alternative therapeutic approaches in antifungal therapy in the context of resistance to conventional antifungals

Răzvan F. Moruzi[1,2], Eugenia Dumitrescu[1], Florin Muselin[1], Alexandru O. Doma[1], Corina Kracunovic[1], Erieg A. Mohamed[1], Sergiu A. Orășan-Alic[1], Romeo T. Cristina[1,*]

[1]Facultatea de Medicină Veterinară Timisoara
[2]Unitatea de Management Proiecte USAMVB Timișoara

moruzirazvanflorin@yahoo.com

Cuvinte cheie: abordări terapeutice alternative, compuși naturali, nanoparticule, hidrogel cu plasmă rece, rezistență la antifungice;
Key words: alternative therapeutic approaches, natural compounds, nanoparticles, plasma activated hydrogel, antifungal resistance;

Rezumat

Prin acestă sinteză se dorește evidențierea posibilelor alternative în terapia antifungică, în contextul rezistenței la antifungice. Există tot mai multe studii referitoare la rezistența antifungicelor clasice folosite în medicina veterinară. Astfel, ne-am propus o prezentare a cazurilor de rezistență din literatură a unor antifungice clasice, la care dacă adaugăm numărul limitat de antifungice convenționale folosite, se observă necesitatea îndreptării atenției către alte grupe de substanțe cu eficacitate împotriva fungilor. Principalele substanțe și produse alternative cu efect antifungic descrise în această lucrare de sinteză sunt compușii naturali precum: principii activi din plante, propolisul și spirulina, dar și nanoparticulele conjugate și hidrogelul cu plasmă rece.

Abstract

This review aims to highlight possible alternatives in antifungal therapy, in the context of antifungal resistance. There are more and more studies on the resistance of classical antifungals used in veterinary medicine. Thus, we proposed a description of cases of resistance to some classic antifungals from the literature, to which if we add the limited number of conventional antifungals used, there is a need to focus on other groups of substances effective against fungi. The main alternative substances and products with antifungal effect described in this review are natural compounds such as active ingredients from plants, propolis and spirulina, but also conjugated nanoparticles and plasma activated hydrogel.

1. Introducere

Infecțiile fungice reprezintă o problemă din ce în ce mai dificil de gestionat în medicina veterinară, mai ales la la animalele de companie, unde apar o serie de dificultăți de diagnostic și de tratament, datorită fenomenului de rezistență la antifungice.

Rezistența la antifungicele convenționale apare de cele mai multe ori secundar mecanismelor dobândite, în urma utilizării neraționale ale acestora [13, 14, 77]. În mod clar, sunt necesare noi strategii de tratament pentru a rezolva această problemă, deoarece după cum s-a observat, rezistența la antifungice reprezintă o provocare clinică majoră pentru practicieni în special în tratarea infecțiilor fungice invazive, o cauza fiind numărul limitat de substanțe antifungice sistemice disponibile.

În plus, medicamentele actuale sunt limitate prin interacțiunile legate de medicament și efectele adverse / toxicitățile care împiedică utilizarea lor prelungită sau creșterea dozelor [8, 10, 77]. Un pas important pentru limitarea problemelor legate de

rezistența la antifungice s-a făcut în anul 2010, când s-a înființat *The ISHAM Veterinary Mycology Working Group (ISHAM-VMWG*).

Acesta reprezintă un grup de lucru specializat în micologia veterinară și care face parte din *Societatea Internațională de Micologie Umană și Animală*.

A fost creat de către un grup de experți pentru a sprijini toate aspectele științifice care se ocupă cu micologia și științele veterinare, inclusiv: *diagnosticul și identificarea agenților patogeni fungici de importanță veterinară, fiziopatologia și imunologia în bolile fungice la animale, epidemiologia, prevenirea, controlul și eradicarea micozelor și micotoxicozelor animale* [65].

În continuare vor fi prezentate date referitoare la rezistența antifungicelor convenționale în practică, dar și posibilele alternative și noile direcții de cercetare în terapia antifungică.

2. Importanța mijloacelor antifungice alternative: Rezistența la antifungicele clasice

Agenții fungici dezvoltă mecanisme pentru a contracara efectele fungicide sau fungistatice ale tuturor claselor de antifungice.

În general, fungii se bazează pe trei mecanisme majore, vezi Fig. 1, și anume:

- *reducerea acumulării medicamentului în celula fungică,*
- *scăderea afinității medicamentului pentru țintă și*
- *modificări ale metabolismului pentru a contrabalansa efectul medicamentului* [16, 58, 74].

În prezent sunt publicate tot mai multe date referitoare la rezistenţa fungilor, astfel, sunt descrise tendințe crescute referitoare la rezistența antifungică dobândită care include rezistența crescută la azoli a speciilor *non-Candida albicans*, rezistența la azoli a *Aspergillus fumigatus* și rezistența la echinocandină la *C. glabrata*.

Unele specii fungice sunt rezistente intrinsec la anumite medicamente (de exemplu *C. krusei* la fluconazol sau *C. lusitaniae* la amfotericină B), în timp ce altele demonstrează rezistență microbiologică la toate antifungicele disponibile clinic.

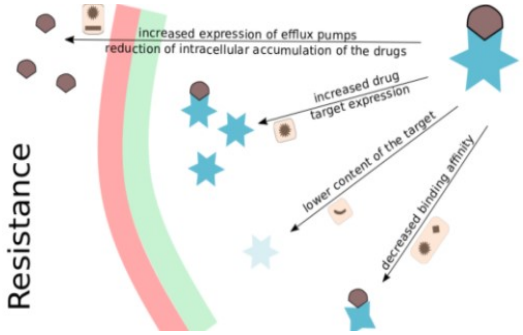


Figura 1. Mecanismele generale de rezistență la antifungice [32]

De asemenea, apar noi specii care pot avea rezistență la mai multe clase de agenți disponibili (de exemplu, *Candida auris*) [16, 28, 77].

Cele mai importante mecanisme de rezistenţă la acţiunea preparatelor antifungice sunt procesul mutagen ori supraexpresia enzimelor implicate în biosinteza ergosterolului: enzima lanosterol 14a-demetilaza citocrom P450-dependentă (cunoscută ca Erg11 la levuri, de ex. la *Candida albicans* şi *Cryptococcus neoformans*, şi ca Cyp51A la fungii filamentoși, ca de ex. *Aspergillus fumigatus*). Azolii se leagă cu fragmentele ferice ale site-urile de legare a hemului şi blochează substratul natural al enzimei - lanosterolul, perturbând astfel procesul de biosinteză [16, 28].

Mecanismele de producere a rezistenței la azoli au fost asociate cu susceptibilitatea redusă la *Candida albicans* și sunt asociate cu rezistența la alte specii de Candida.

Modificările enzimei țintă (lanosterol 14-α-demetilază) datorită mutațiilor genei de codificare ERG11 determină scăderea susceptibilității la azoli.

Supraexprimarea genelor CDR1, CDR2 și MDR1 care codifică pompele de eflux duc de asemenea la rezistența la azoli.

Rezistența la triazoli este cea mai semnificativă problemă, deoarece acești agenți antifungici sunt folosiți în mod obișnuit pentru tratarea Candida spp., care reprezintă cele mai abundente micoze fungice.

Medicamentele triazolice (fluconazol, voriconazol, itraconazol și posaconazol) interferează cu biosinteza ergosterolului prin blocarea lanosterolul 14-alfa-demetilază (Erg11p).

Aplicarea pe scară largă a medicamentelor antifungice triazole promovează colonizarea cu specii mai puțin sensibile, cum ar fi *C. glabrata sau C. krusei*, dar ajută, de asemenea, la selectarea pentru sub-populații rezistente ale organismelor normal sensibile, precum *C. albicans*.

Apariția tulpinilor rezistente la azoli a avut loc în paralel cu utilizarea lor. Deoarece toți membrii familiei azolilor acționează asupra aceleiași ținte, rezistența încrucișată cu mai mulți azoli este comună [21, 47, 65].

S-au efectuat o serie de studii care au analizat diferite izolate fungice de la animale cu privire la rezistența agenților antifungici și în multe dintre ele s-au raportat niveluri surprinzător de mari de rezistență la azoli a levurilor.

Într-un studiu retrospectiv, Beltaire și colab. [4] au analizat tulpinile fungice izolate din uterul ecvin, recoltate între 1999 și 2011 și au prezentat o rată de rezistență de 19% pentru itraconazol și 2% pentru fluconazol. Cordeiro et al. [12] au investigat 59 de izolate de *C. tropicalis* obținute de la animale sănătoase și au găsit rezistență la fluconazol și / sau itraconazol în proporție de 50% din izolate, în timp ce toate izolatele erau susceptibile la caspofungină și amfotericină B.

Folosind același test de diluare ca în studiul precedent, Brilhante și colab. [7] au analizat izolate de Candida din canalul nazolacrimal al cailor sănătoși și au constatat că 40% dintre izolatele de *C. tropicalis* erau rezistente la fluconazol și itraconazol.

Același grup au găsit proporții ridicate de rezistență la fluconazol și itraconazol tot pentru izolate de Candida de la papagalul nimfă, iar mecanismul major de rezistență au fost pompele de eflux. A fost descrisă o rezistență dobândită a speciilor de *Candida tropicalis* multi rezistente în cazul infecțiilor urinare la câini [1, 65].

Utilizând un kit comercial care acoperă 11 agenți antifungici utilizați frecvent, Lord si col. [36] au testat 144 izolate de Candida, Cryptococcus, Rhodotorula și Trichosporon din fecale de păsăre pentru rezistența antifungică. Aceștia au raportat că 45,8% din tulpini erau rezistente la cel puțin patru dintre cele 11 medicamente și 18,1% erau rezistente la toate antifungicele testate [65].

Un studiu recent a descoperit niveluri de rezistență similare pentru 111 izolate de *C. glabrata* din fecalele pescărușilor și 79 izolate de *C. glabrata* de la pacienții umani [2]. Aceste studii indică faptul că rezistența la anumite antifungice din clasa azolilor este un fenomen comun pentru levurile patogene izolate de la unele animale. În mod surprinzător, rata de rezistență la azoli ale *C. albicans și C. tropicalis* izolate de la animale sănătoase sunt mai mari decât cele raportate în unele studii de la om [22, 50].

Acest lucru indică faptul că nivelurile ridicate de rezistență găsite la animale pot să nu reflecte pur și simplu o rezistență naturală a respectivelor specii. Cu toate acestea, diferențele de metodologie, precum și numărul limitat de izolate incluse în mai multe studii asupra animalelor fac dificilă o comparație directă a datelor obținute pentru izolatele de la animale și de la om [65].

Într-un studiu care a implicat peste 140.000 de izolate de *Candida spp*. colectate pe o perioadă de 8,5 ani, rezistența totală la fluconazol și voriconazol a fost de 6,2%, respectiv 3,1%. Nivelul de rezistență pentru toate speciile de Candida a rămas relativ constant peste un deceniu [49]. Studiile de supraveghere globală indică faptul că nu a existat nicio schimbare epidemiologică semnificativă în sensibilitatea la *Candida spp*. a echinocandinelor, care sugerează faptul că deocamdată rezistența la acestea nu este o problemă majoră [47, 48].

Rezistența azolilor a fost descrisă și pentru Aspergillus [75], dar până în prezent rar au fost raportate tulpini rezistente derivate de la animale. Infecțiile invazive cauzate de *A. fumigatus* rezistent la azoli sunt dificil de tratat din cauza lipsei de opțiuni terapeutice. La om, pot fi utilizate formulări lipidice de amfotericină B, iar 5-flucitozină a fost recomandată la pacienții cu infecții ale sistemului nervos

central cauzate de izolate rezistente. Cu toate acestea, ambele antifungice sunt limitate, prezintă toxicitate care poate interzice utilizarea lor pe termen lung, atât la oameni cât și la animale.

În funcție de mecanismul de rezistență, se pot încerca doze mai mari de triazoli și există un raport recent al tratamentului cu posaconazol, care a avut succes în aspergiloza invazivă, cauzată de un izolat de *A. fumigatus* cu o mutație TR46/Y121F/T289A la un delfin. Soluția orală de posaconazol a fost încorporată în capsulele de gelatină și administrată cu scopul de a atinge concentrații >3 mg/l, ceea ce a fost obținut după administrarea prelungită și a dus la o îmbunătățire clinică.

Rezistența azolilor a fost documentată pentru *A. fumigatus* și se datorează mutațiilor din cadrul genei CYP51A care codifică enzima responsabilă pentru transformarea lanosterolului în ergosterol [47, 65].

Flucitozina după pătrundere în celula fungică este convertită în 5-fluorouracil (forma metabolic activă), care inhibă replicarea ADN-ului şi sinteza proteinelor.

Mecanismele moleculare de rezistenţă la flucitozină se datorează mutaţiilor în enzima permeaza purin-citozinică (codificată de gena FCY2), care este responsabilă pentru gradul de utilizare a medicamentului în celulă [15].

Aproximativ 10-20% din speciile de Candida și numai 1-2% *C. neoformans* prezintă rezistență la flucitozină. Cu toate acestea, rezistența se dezvoltă ușor *in vitro* și *in vivo*, astfel flucitozina nu trebuie niciodată folosită ca un singur agent, ci mai degrabă, întotdeauna în combinație cu alți agenți antifungici [21].

Levurile din genul Malassezia sunt foarte susceptibile la itraconazol și posaconazol și mai puțin la fluconazol, indiferent de specie și de sursă. Toți derivații azolici, cu excepția fluconazolului, au prezentat o bună activitate antifungică in vitro împotriva *M. furfur* și *M. pachydermatis* [9].

Totuși, posibilitatea ca *M. pachydermatis* să dezvolte rezistență la antifungicele din clasa azoli a fost adesea indicată în literatura de specialitate pe baza testelor *in vitro*, de exemplu în studiile lui Nijima și col. [45] și Jesus și col. [30], dar in *vivo* au fost raportate puține cazuri de rezistență la câine.

Un astfel caz de rezistență *in vivo* la compuși azolici a *M. pachydermatis* a fost la o femelă de Poodle de 5 ani, diagnosticată cu dermatită și otită recurentă dată de Malassezia, tratată cu azoli sistemici și topici dar a cărui eficacitate a fost scăzută.

Concentrațiile minime inhibitorii (MIC) obținute *in vitro* pentru diferite antifungice din clasa azoli (în special itraconazol și ketoconazol) împotriva tulpinilor de Malassezia izolate de la câine au crescut de câteva ori, comparativ cu MIC obținute de la izolatele de control. Aceste rezultate au întărit ipoteza bazată pe observația clinică, și anume dezvoltarea rezistenței la azoli [3].

Acest caz confirmă ceea ce sa raportat recent [31], și anume că rezistența la azoli poate fi cauza eșecului tratamentului la câini infectați cu *Malassezia spp*.

Un caz precedent de rezistență [31] a fost la un câine de 15 ani, în Japonia, unde rezistența a fost suspectată din cauza lipsei de răspuns la tratament, care a constat în administrarea pe cale orală cu itraconazol (8 mg/kgc) timp de 23 de zile și samponare săptămânală cu șampon ce conține miconazol 2% / clorhexidină 2% [3, 31].

Se cunosc foarte puține date despre mecanismele de rezistență la azoli ale lui *M. pachydermatis*, dar latta și colab. [27] au raportat că rezistența poate să datorată creșterii numărului de pompe de eflux.

O altă variantă ar fi datorită mutațiilor genei care codifică enzima 14α-sterol-demetilază. Aceste mutații au fost găsite la tulpina rezistentă izolată în Japonia [3, 31].

Rezistența dobândită la terbinafină nu a fost raportată pentru dermatofiți chiar și după expunerea prelungită. La amfotericina B s-a observat rezistență la izolate de *Candida spp., C. immitis și Mucor spp*. [21].

3. Substanțe și produse alternative cu efect antifungic

În ceea ce privește dezvoltarea de agenți antifungici noi, progresul a fost lent comparativ

cu cercetarea antibacteriană, fapt justificat de incidența scăzută în trecut a infecțiilor fungice dar și de relația evolutivă strânsă cu gazda umană sau animală, ceea ce complică obținerea unor antifungice eficiente și fără toxicitate

Au existat multe progrese în dezvoltarea de medicamente antifungice veterinare în ultimii 20 de ani, dar din păcate nu a fost destul, deoarece există doar câteva medicamente antifungice care sunt aprobate pentru medicina veterinară (exceptând produsele topice) [15, 59, 63].

Pe măsură ce rezistența la antimicrobienele convenționale crește, sunt cercetate diferite alternative la antimicrobiene, în această sinteză s-au ales spre descriere compușii naturali cum ar fi produse din plante, spirulina și propolisul, dar și alte structuri cum ar fi nanoparticulele conjugate și hidrogelul cu plasmă rece.

3.1. Plantele

Din cele mai vechi timpuri plantele au fost o sursă esențială de substanțe terapeutice atât pentru om cât și pentru animale [71].

Medicul naturalist francez Virey F.F a considerat că animalele au fost primii doctori în medicină, dar și Pliniu cel Bătrân care scria în celebra *"Historia Naturalis"* despre animale care folosesc plante în anumite situații, cum ar fi: porumbeii sălbatici folosesc drept purgativ frunzele de *Daphne blagayana*, tot în acest scop gâinile folosesc păpadia (*Taraxacum officinale*); câinele mănâncă iarbă în cazul problemelor gastrice; nevăstuicile se imunizează împotriva muscăturii șerpilor veninoși mâncând rută (*Ruta graveolens*) [18].

Până în prezent, se estimează că peste 10.000 de specii de plante sunt utilizate în scopuri terapeutice și mai mult de 100.000 de produse vegetale au fost descrise pentru proprietățile lor farmacologice. Interesul pentru activitatea antifungică a plantelor și a compușilor derivați din plante a crescut, reprezentând o posibilă abordare în acest domeniu, fiind un concept reînoit cu informații științifice apărute tot mai mult în ultimele decenii [71].

Fungii sunt capabili să dezvolte rapid rezistența împotriva medicamentelor convenționale, determinând necesitatea constantă de a identifica noi agenți antifungici. Dintre sursele naturale de substanțe terapeutice, plantele au jucat întotdeauna un rol important în astfel de scopuri încă din antichitate [55].

Plantele reprezintă o sursă primară pentru obținerea de produse medicinale noi. Principii activi ai plantelor prezintă activitatea antifungică, pe lângă alte numeroase acțiuni farmacodinamice, cum ar fi antiinflamatoare, anticarcinogene și anti-aterosclerotice, antibacteriene, antivirale, antimutagene și antialergice [39, 41].

Fitoterapia în bolile micotice a debutat prin observaţii empirice, surprinzânduse efectul benefic al unor infuzii sau extracte în tratamentul unor candidoze ale mucoaselor. S-au izolat apoi numeroase principii active cu rol antilevuric, în special faţă de tulpinile de *Candida albicans*. De aici s-au realizat numeroase acţiuni de screening pentru decelarea acţiunii lor antifungice şi faţă de alţi fungi levuriformi şi filamentoşi [41].

Ca urmare a acestor studii, s-au observat mai multe plante ce conţin principii activi cu acțiune antifungică, care vor fi prezentate în continuare, de asemenea o sinteză a acestora este realizată în Tabelul 1. [41, 51].

Caryophyllus aromaticus (arborele ce produce cunoscutele „cuișoare") este renumit pentru uleiul volatil bogat în eugenol cu certe proprietăți antibacteriene și antifungice. Există deja pe piață produsul Sporyl (Richter Pharma AG, Austria), destinat tratamentului dermatofitozelor la animale. Uleiul de cuișoare poate fi util în managementul candidozei, în special în formele mucocutanate, cum ar fi candidoza vulvovaginală [41, 51].

Malaleuca alternifolia *produce un ulei volatil (tea tree oil) bogat în terpineol, terpinen și cineol, cu spectru larg de acțiune incluzând următorii fungi:*

- Alternaria spp.,
- Aspergillus flavus,
- fumigatus,
- niger,
- Blastoschizomyces capitatus,

- Candida albicans,
- glabrata,
- parapsilosis,
- tropicalis,
- Cladosporium spp.,
- Cryptococcus neoformans,
- Epidermophyton flocossum,
- Fusarium spp.,
- Malassezia furfur,
- M. sympodialis,
- Microsporum canis,
- M. gypseum,
- Penicillium spp.,
- Rhodotorula rubra,
- Saccharomyces cerevisiae,
- Trichophyton mentagrophytes,
- T. rubrum,
- T. tonsurans.

Există pe piață un gel ce conține ulei volatil de Malaleuca alternifolia (Tea Tree Anti-Fungal Gel) destinat tratamentului topic al dermatofitozelor [41].

Componentele care prezintă cea mai mare activitate, cu concentrații inhibitorii minime și concentrații fungicide minime ≤ 0.25%, sunt terpinen-4-ol, α-terpineol, linalool, α-pinen și β-pinen, urmate de 1,8-cineol [23].

Într-un studiu realizat în anul 2016, s-au observat beneficiile unor plante cum sunt

- *Calendula officinalis* (Gălbenele),
- *Hypericum perforatum* (Sunătoare),
- *Matricaria chamomilla* (Mușețel) și
- *Salvia officinalis* (Salvie),

toate cu efecte antibacteriene și antifungice dovedite. Ele ar putea reprezenta o opțiune alternativă pentru tratamentul dermatofitozei, precum și a dermatitelor și otitelor produse de *M. pachydermatis*. Aceste plante pot fi utilizate într-o gamă largă de afecțiuni ale pielii la câine, care implică componenta inflamatorie. Pentru tratamentul otitei externe și al altor afecțiuni dureroase ale pielii, poate fi luat în considerare și tratamentul topic cu sunătoare și mușețel [72].

Sunătoarea (Hypericum perforatum) prezintă activitate antifungică împotriva dermatofiților *Trichophyton mentagrophytes, Microsporum gypseum, Microsporum canis și Trichophyton rubrum*, precum și efecte inhibitoare împotriva *Malassezia furfur și C. albicans* [57].

Prin utilizarea metodei de difuzie în agar s-a observat potențialul antifungic al ***Centella asiatica***, astfel extractul alcoolic a demonstrat o activitate considerabilă împotriva diferitelor specii de fungi precum *Candida albicans, Aspergillus flavus și Aspergillus niger* [5, 29].

Într-un alt studiu realizat de Hassan et al. [24] (2004) s-a demonstrat activitatea antifungică a gelului de ***Aloe vera*** asupra dermatofiților, respectiv *Tricophyton verrucosum*, prin aplicări topice zilnice, rezultatele fiind comparate cu efectele aplicării unui unguent cu 10% iod pentru 20 de zile.

După 6 zile de tratament cu gelul de *Aloe vera* activitatea dermatofiților a fost redusă semnificativ.

Leziunile au început să scadă treptat și, în două săptămâni, părul a început să crească. În grupul tratat cu iod, leziunile s-au retras după zece zile de tratament și regresia părului a început după două săptămâni.

După o lună s-a observat o recuperare completă în ambele grupuri tratate [24].

Usturoiul (Allium sativum) prezintă activitate antibacteriană și antifungică, uleiurile esențiale, extractele în apă și etanol inhibă creșterea *in vitro* a speciilor de *Bacillus spp., Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pasteurella multocida, Proteus, Pseudomonas aeruginosa, Candida spp. și Cryptococococcus spp* [78].

În ceea ce privește activitatea antifungică a ***Curcuma longa* (Turmeric),** cel mai semnificativ efect a fost găsit împotriva speciilor de Candida și *Paracoccidioides brasiliensis*, deși curcumina a evidențiat un efect fungicid și împotriva altor specii de fungi [42].

Cimbrul (Thymus vulgaris)

Componentele majore din compoziția chimică a *Thymus vulgaris* determinată prin GC / MS sunt p-cimen (8,41%), γ-terpinen (30,90%) și timolul (47,59%), în timp ce alte specii de cimbru conțin de asemenea cantități mari de carvacrol, a-terpinil acetat și cis-myrtanol [6, 68].

Tulpinile / izolatele de *Candida albicans, Escherichia coli, Kocuria varians* și *Micrococcus luteus* s-au dovedit a fi sensibile la extractele de cimbru.

Într-un studiu realizat pe izolate de *Candida albicans*, s-a observat că extractul de cimbru, folosind ca solvent metanolul, a avut o activitate pronunțată comparativ cu extracte unde s-au folosit alți solvenți [61].

Oregano (Oreganum vulgare)

Carvacolul și timolul sunt principalii compuși din compoziția chimică a oregano, aceștia fiind asociați cu activitatea antimicrobiană a acestuia. A fost studiată activitatea antifungică a *O. vulgare* pe 27 de izolate clinice de *Malassezia furfur*, unde s-a observat o eficiență ridicată împotriva tulpinilor de *M. furfur* cu rezistență la fluconazol. Potențialul său ca agent antifungic împotriva Malassezia poate fi luat în considerare, mai ales în afecțiunile cronice și recurente ale pielii asociate cu Malassezia [76].

Dafinul (Laurus nobilus)

În compoziția uleiului esențial din *Laurus nobilus*, 1,8-cineol, sabinen și linalool sunt principalele componente, alți compuși fiind prezenți în procente destul de mici. Zona de inhibiție (mm) pentru diferite concentrații de ulei esențial de *L. nobilis* și de 1,8-cineol împotriva diferitelor specii fungice: *Aspergillus niger, A. versicolor, Penicillium citrinum și P. expansum*. În general, tulpinile fungice au fost sensibile atât la uleiul esențial de *L. nobilis* cât și la 1,8-cineol [37].

Scortisoara (Cinnamomum verum)

Principalii constituenți ai uleiului esențial de scorțișoară sunt cinamaldehida (65-80%) și eugenolul (5-10%). Activitatea antifungică a scorțișoarei se poate datora denaturării peretelui fungic cu apariția unor modificări morfologice, cu o reducere în formarea de conidii, scurgerea citoplasmei, pierderea pigmentării și perturbarea structurii celulare care indică degenerarea peretelui fungic [52].

Pau D'arco (Lapacho sau *Tabebuia avellanedae* sau *Handroanthus spp*)

Principalii constituenți din Pau D arco sunt 16 chinone, reprezentate atât de naftochinone: (lapachol 2-7%, menaquinonă-I, deoxilapachol, beta-lapachona, alfa-lapacjona și dehidro-alfa-lapachona) cât și de antrachinone [38].

Proprietățile antimicrobiene ale compușilor activi din Pau D'arco au fost demonstrate în mai multe studii clinice, în care au prezentat o activitate puternică *in vitro* pe lângă cea asupra diferitelor bacterii gram-pozitive și gram-negative și împotriva fungilor și levurilor (inclusiv *Candida albicans, Aspergillus spp.*). S-a raportat că lapacholul are un efect relevant împotriva *Candida albicans, Candida tropicalis și a Criptococcus neoformans*, efect similar cu amfotericina B.

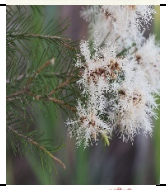
Se presupune că activitatea antifungică a lapacholului se datorează interacțiunii sale cu membrana celulară [25].

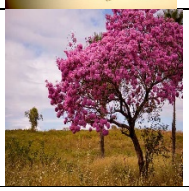
Într-un studiu *in vitro* s-a observat că extractul apos de Pau D'arco a determinat inhibarea totală a speciilor de *Penicillium*, și o inhibare parțială a *A. niger* [38].

Alte plante cu efecte antifungice asupra dermatofiților sunt:

- *Azadirachta indica,*
- *Capparis spinosa,*
- *Anagallis avensis,*
- *Juglans regia,*
- *Inula viscosa,*
- *Phagnalon rupestre,*
- *Plumbago europaea,*
- *Ruscus aculeatus,*
- *Ruta chalepensis,*
- *Salvia fruticosa,*
- *Artemisia judaica,*
- *Ballota undulate,*
- *Cleome amblyocarpa,*
- *Peganum harmala,*
- *Teucrium polium,*
- *Aegle marmelos,*
- *Artemisia sieberi,*
- *Cuminum cyminum,*
- *Foeniculum vulgare,*
- *Heracleum persicum,*
- *Mentha spicata,*
- *Nigella sativa,*
- *Rosmarinus officinalis,*
- *Uncaria tomentosa* [60, 64, 78].

Tabel 1.
Sinteză - plante cu activitate antifungică, principalii constituenți și fungii afectați [64, 71].

Plante		Principalii constituenți	Fungi
Nigella sativa [92]		*Terpene*	*Dermatofiți*
Alium sativum (Usturoi) [93]		*Alicină*	*Candida spp., Cryptococoxcus spp*
Melaleuca alternifolia (arbore de ceai) [87]		*Terpineol, terpinen și cineol*	*Aspergillus spp., Dermatofiți, Candida albicans*
Caryophyllus aromaticus [83]		*Eugenol*	*Dermatofiți, Candidoze*
Curcuma ionga [84]		*Curcumina*	*Candida, Paracoccidioides brasiliensis*
Centella asiatica [81]		*Sesquiterpene: humulene cariofilene germacren*	*Candida albicans, Aspergillus flavus, Aspergillus niger*
Cimbru (Thymus vulgaris) [90]		*p-cimen, γ-terpinen, timolul, carvacrol*	*Candida albicans*
Oregano (Oreganum vulgare) [88]		*Carvacolul și timolul*	*Malassezia furfur*
Dafin (Laurus nobilus) [86]		*Cineol, sabinen, linalool*	*Aspergillus niger, A. versicolor, Penicillium citrinum și P. expansum*

Scortisoara (Cinnamomum verum) [82]		*Cinamaldehida, eugenolul*	*A. flavus, Candida spp.*
Aloe vera [80]		*Antraquinone: aloină și aloe-emodină*	*Trichophyton verrucosum*
Hypericum perforatum (Sunătoare) [85]		*Xantone*	*Dermatofiți, Malassezia furfur, Candida albicans*
Mentha spicata [91]		*Carvon, limonen*	*T. rubrum M. gypseum*
Rosmarinus officinalis [89]		*p-cimen, linalol, terpinen eucaliptol*	*Microsporum canis*
Pau D'arco [94]		*Naftochinone (lapachol) antrachinone*	*Candida albicans, Candida tropicalis, Criptococcus neoformans, Aspergillus spp.*

3.2. Propolisul

Propolisul este apreciat încă din cele mai vechi timpuri, activitatea biologică a acestuia fiind direct legată de conținutul de fenoli și flavonoide, acesta este utilizat pe scară largă în industria farmaceutică, cosmetică, veterinară și alimentară. Acest material complex este folosit de albine ca agent de etanşeizare a stupilor,
dar rolul cel mai important al propolisului este prevenirea descompunerii diverşilor dăunători uciși după pătrunderea lor în stupi [11, 41].

Propolisul este un produs cu peste 70 de proprietăți farmacologice dovedite, fiind folosit cu success de către medicii veterinari în: stomatite, otite, rinite, afecțiuni micotice și plăgi. Compoziţia propolisului depinde de locul şi timpul recoltării. Clasele de substanţe chimice întâlnite în propolis sunt:

- aldehide,
- alcooli,
- acizi şi esteri alifatici,
- aminoacizi, acizi şi
- esteri aromatici,
- flavone şi flavonoizi,
- acizi graşi,
- cetone,
- substanţe terpenoidice,
- steroizi,
- zaharuri,
- vitamine,
- elemente minerale [18, 41].

Pe lângă activitatea fungicidă, propolisul prezintă activitate antibacteriană, antivirală, citotoxică, imunomodulatoare. Proprietăţile antifungice sunt manifestate mai ales faţă de speciile genului Candida şi dermatofiţi, deși inhibă și dezvoltarea altor specii fungice la concentrații destul de mici. Pe lângă dermatofiți și speciile din genul Candida,

activitatea antifungică a fost demonstrată și asupra Trichosporon spp. și Rhodotorula spp. În general, s-a observat că propolisul potenţează substanţele medicamentoase antifungice, acţionând sinergic cu acestea [11, 41].

Efectul propolisului asupra diferiților agenți bacterieni și micotici diferă în funcție de solvenții folosiți la preparare. Astfel s-a observat că în forma uleioasă propolisul prezintă activitate antimicrobiană largă, în timp ce în soluția de glicerină a acționat în măsură asupra bacteriilor gram-pozitive, iar în soluțiile de etanol și propilenglicol s-a observat o activitate antifungică mai bună împotriva levurilor [70].

Activitatea fungicidă a propolisului a fost demonstrată de Ota et al. [46] asupra 80 de tulpini din speciile Candida. Lindenfelser [34] a observat activitatea inhibitoare asupra a 20 de tulpini de la 39 de specii de fungi, dintre care două s-au dovedit a fi rezistente. Activitatea antifungică in vitro a propolisului Turcesc (diferite regiuni și diferite rase de albine) asupra micozelor superficiale a fost cea mai ridicată la probele de propolis colectat de la Apis mellifera caucasica [67].

Într-un studiu comparativ s-a observat că extractul etanolic de propolis obținut de la albinele Melipona beecheii (Mexic, Yucatan) au prezentat o activitate antifungică mai ridicată împotriva Candida albicans, decât extractul etanolic de propolis obținut de la albinele Apis mellifera (vezi Fig. 2).

Conținutul total de polifenoli a fost mai mare în cazul extractului în etanol a propolisului de la A. mellifera [56].

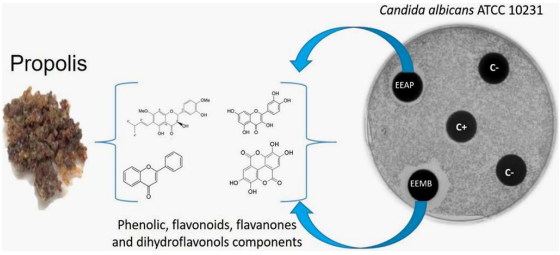


Figura 2. Compoziția a două extracte etanolice de propolis și activitatea antifungică evaluate prin metoda discului asupra Candida albicans ATCC 10231 (EEAP - A. mellifera; EEMB - M. beecheii; C+ - control pozitiv nistatină; C−, control negativ DMSO 1% [56]

2.3. Spirulina

Spirulina platensis sau *Arthrospira platensis* (vezi Fig. 3) este o cianobacterie filamentoasă, nediferențiată, netoxigenică, care a fost folosită ca aliment încă din cele mai vechi timpuri [19].

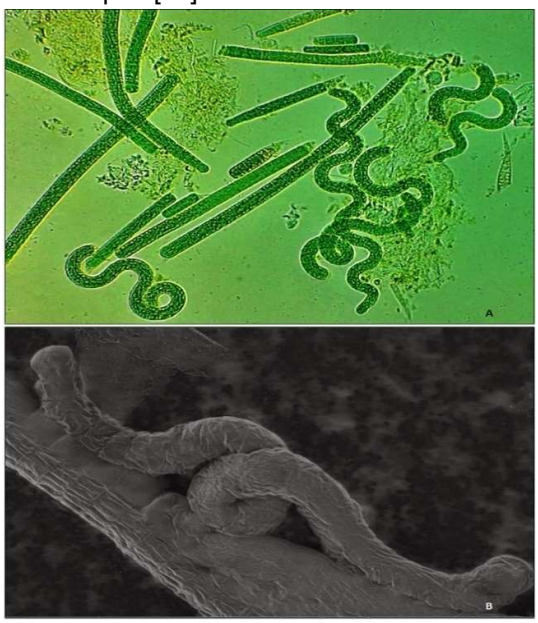


Figura 3. Imagine microscopică (A) și electronomicroscopică (B) a microalgelor de *Spirulina platensis* Fotografie de N. Seyidoglu [66]

Au existat numeroase studii privind acțiunile sale antioxidante și antimicrobiene.

Într-un studiu realizat de El-Baz [19] în 2013 s-au testat efectele împotriva Candida ale extractului în etanol de *Spirulina platensis*, astfel s-a confirmat activitatea biologică a extractului de etanol de *Spirulina platensis* împotriva *Candida albicans*.

Usharani et al. [73] au investigat în anul 2015 activitatea antifungică a extractelor brute de alge marine din *Spirulina platensis* împotriva unor agenți fungici (*Aspergillus niger, Aspergillus flavus, Aspergillus fumigatus, Candida tropicalis, Candida albicans și Candida glabrata*).

Zona de inhibare a extractelor de *Spirulina platensis* împotriva agenților patogeni fungici a fost cuprinsă între 10 mm și 16 mm la o concentrație de 10 mg/ml.

Extractul de Spirulina platensis în metanol (10 mg / ml) a avut cea mai mare zonă de inhibare (16 ±0,6 mm) împotriva *Aspergillus*

flavus urmată de *Aspergillus fumigatus* (16 ±0,5 mm), *Aspergillus niger* (15 ± 0,7 mm), *Candida albicans* (14 ±0,8 mm), *Candida glabrata* (14 ±0,5 mm) și *Candida tropicalis* (13 ±0,6 mm) [73].

2.4. Nanoparticulele și conjugarea lor cu diferite substanțe antifungice

Se cunoaște faptul că nanoparticulele de argint (NA) au fost dezvoltate ca o nouă clasă de agenți antimicrobieni, fiind de asemenea utilizate ca sisteme eficiente de administrare a medicamentelor ce conduc la creșterea potenței medicamentelor [26, 43].

A fost acordat un interes tot mai mare pentru nanoparticulele de argint de-a lungul anilor datorită potențialelor aplicații în medicina umană și animală, în tratarea infecțiilor cutanate, inclusiv dermato-micozelor [20, 53].

Aceste particule, fie singure, fie în combinație cu alte medicamente, pot reprezinta o alternativă terapeutică împotriva microorganismelor rezistente, precum și în cazuri de complicații asociate cu utilizarea de antifungice [43, 53, 54].

Activitatea antimicrobiană a nanoparticulelor de argint a fost demonstrată în diferite studii, inclusiv asupra agenților fungici ai infecțiilor oportuniste, ca de exemplu:

- *Candida albicans,*
- *C. tropicalis,*
- *C. parapsilosis,*
- *C. glabrata,*
- *Trichophyton rubrum,*
- *Trichosporon asahii,*
- *Aspergillus niger,*
- *Rhizoctonia solani,*
- *Curvularia lunata,*
- *Colletotrichum sp. și*
- *Fusarium spp*.

Cu toate acestea, trebuie luat în considerare faptul că metodele de sinteză utilizate sunt diferite, precum și dimensiunea și structura nanoparticulelor [43].

În anul 2014 s-a studiat acțiunea nistatinului conjugat cu nanocompozite magnetice asupra *Candida albicans*, observând o eficacitate crescută a acestui conjugat, în comparație cu administrarea singulară de nistatin.

În anul 2017, într-un alt studiu s-a observat o eficiență crescută a nistatinului conjugat cu nanoparticule de acid polilactic și acid poliglicolic, comparativ cu administrarea nistatinului pur.

Pe lângă nistatin s-au efectuat studii și pe fluconazol, care a fost acoperit cu nanoparticule de argint, și care a prezentat de asemnea o eficacitate sporită asupra dermatofiților [26].

Eficacitatea medicamentelor antifungice este îmbunătățită prin conjugarea acestora cu nanoparticule de argint.

Aceasta a fost demonstrată prin studiile arătate mai sus precum și de un alt sudiu din anul 2018 [26], unde la o concentrație de 300 µg /ml, efectele fungistatice asupra *Candida albicans* ale nistatinului și flucitozinei au fost de numai 30% pentru nistatin, respectiv 33% pentru flucitozină, comparativ cu un procent de 50%, respectiv 62% când cele două substanțe antifungice au fost conjugate cu nanoparticule de argint, la aceeași concentrație.

Asupra *Aspergillus brasiliensis*, nistatinul singur, a avut o proporție de inhibare de 80% în concentrație de 400 µg / ml, iar flucitozina singură nu a prezentat eficacitate terapeutică, fiind rezistentă.

Totuși, această tulpina de *A. brasiliensis* s-a dovedit a fi clar sensibilă față de conjugatul flucitozina-nanoparticule de argint, cu o inhibare de 100% la o concentrație de 400 µg / ml, iar complexul nistatin-nanoparticule de argint a prezentat un procent de inhibare crescut, de la 80% la 95% [26].

Ca alternative, mai pot fi utilizați și compușii vegetali fie pentru conjugarea cu nanoparticule de argint, fie pentru o sinteză verde de nanoparticule de argint.

Studiile au arătat că uleiul esențial de oregano (*Origanum vulgare*) și nanoparticulele de argint au o activitate antibacteriană puternică.

S-a studiat efectul antibacterian al unei combinații de nanoparticule de argint sintetizate biologic produse de *Fusarium oxysporum* și a uleiului esențial de oregano împotriva bacteriilor Gram-pozitive și Gram-

negative, inclusiv a tulpinilor multirezistente [62].

Într-un studiu efectuat în Turcia, s-a realizat o sinteză verde de nanoparticule de argint, care prezintă avantaje precum eliminarea utilizării substanțelor chimice scumpe, consumul de energie mai mic și generarea de produse ecologice.

În acest scop, nanoparticulele de argint utilizate în experimentele acestui studiu au fost sintetizate folosind eugenolul (din extract de cuișoare).

Rezultatele au arătat că eugenolul ca material biologic a adus o potențare a efectului în comparație cu celelalte materiale găsite în literature, cu un diametru al zonelor de inhibare a nanoparticulelor de argint de 10,8 ± 0,8 mm pentru *C. albicans* [69].

Eugenolul este o hidroxifenil-propilenă, care se găsește în mod natural în uleiurile esențiale ale mai multor plante aparținând familiilor *Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae și Myristicaceae*.

Este unul dintre principalii constituenți ai uleiului de cuisoare (*Syzygium aromaticum* (L.).

S-a descoperit că eugenolul inhibă activitatea ATP-azei la *Candida spp*. la o concentrație de 500 l /ml (valoarea concentrației minime inhibitoare).

Khan și colab. (2011) au sugerat, pe baza studiului lor, că tratamentul cu eugenol și metil eugenol asupra *C. albicans* a indus un răspuns la stres oxidativ caracterizat prin niveluri crescute de superoxid dismutază și, în consecință, speciile reactive de oxigen crescute care au cauzat peroxidarea lipidică a membranelor citoplasmatice și moartea celulară [40].

Într-un studiu din anul 2020, s-a realizat o sinteză verde de nanoparticule de aur (Au NP) de această dată, folosind doar un extract de spirulină (S. maxima) ca agent reducător.

Rezultatele studiului au indicat că AuNP obținute prin această sinteză verde posedă o bună biocompatibilitate și o activitate anticandida ridicată atât *in vitro* cât și *in vivo* (vezi Fig. 4) [17].

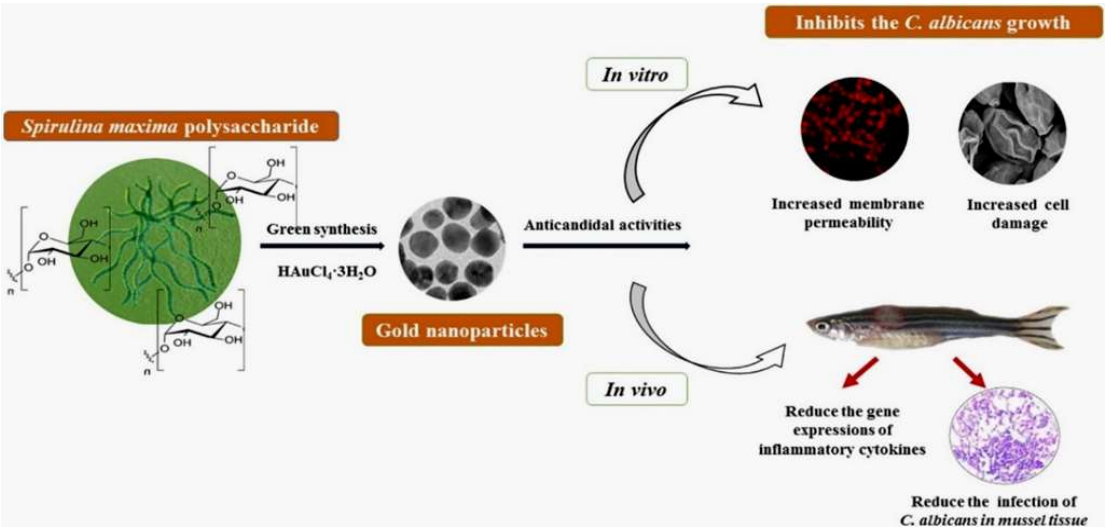


Figura 4. Sinteza verde de nanoparticule de aur folosind *Spirulina maxima* și activitatea împotriva *C. albicans* [17].

2.5. Hidrogelul activat cu plasmă (PAH)

Apa activată cu plasmă non-termică (PAW) face parte din o nouă generație de dezinfectanți / decontaminanți așa-numiți "neconvenționali" extrem de eficienți împotriva microorganismelor de interes medical [35].

Datorită capacității sale antifungice și de biosiguranță, PAW a fost investigată în ultimul timp în mai multe domenii, în special cu

aplicații medicale și chiar cu o potențială utilizare ca apă de gură.

Cu toate acestea, deoarece PAW este lichid, la aplicare acesta va curge sau se va volatiliza după ce a fost aplicat într-o anumită regiune, astfel forma de aplicare fiind o provocare [33].

Astfel, într-un studiu publicat în 2019 [79], s-a încercat o formulare care să încorporeze PAW sub formă de hidrogel (pe bază de acrilamidă) și s-a urmărit eficacitatea acestui hidrogel și posibilitatea folosirii acestuia ca un nou produs cu activitate antifungică.

În acest studiu, capacitatea antifungică a PAH au fost evaluată prin măsurarea zonelor de inhibare.

Fungul tip folosit pentru testarea capacității antifungice a fost *Candida albicans*.

De asemenea, pe lângă lotul de control, în hidrogeluri s-a încorporat și 100 μM de fluconazol, formând un grup de control pozitiv.

Rezultatele au demonstrate că eficacitatea terapeutică a hidrogelului a fost mai bună decât cea a grupului de control (fluconazol) iar din punct de vedere al timpului, PAH prezintă o activitate antifungică mai îndelungată decât PAW [79].

Activitatea antifungică a PAH este determinată de prezența radicalilor hidroxil (OH) și azotat (NO3) [79], vezi Fig. 5.

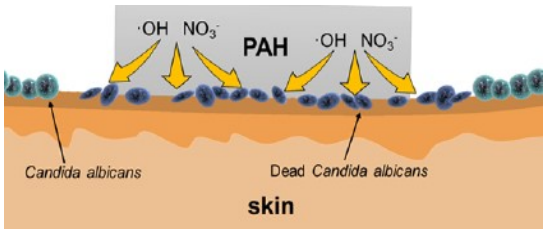


Figura 5. Activitatea radicalilor liberi asupra *Candida albicans*, preluată după [79]

6. Alte direcții de abordare a problemei rezistenței

Pe lângă cele prezentate anterior există și alte preocupări, mult mai recente, pentru rezolvarea problemei rezistenței la antifungice, și anume prin obținerea de structuri noi cu activitate antifungică, pe baza unor **noi ținte de la nivelul celulei fungice**, precum și folosirea unor **produse biofarmaceutice.**

Produsele biofarmaceutice

Sunt studiate o serie de produse biofarmaceutice care sunt considerate terapii noi, care pot fi utilizate în terapia antifungică [44]:

- Anticorpii monoclonali
- Imunoterapia cu citokine
- Vaccinuri
- Peptide antifungice

Posibile noi ținte în terapia antifungică

Dezvoltarea instrumentelor pentru studiile genetice funcționale în asociere cu noile tehnologii moleculare de mare performanță a fost esențială pentru generarea unei noi liste de potențiale ținte ale antifungicelor [44].

Cu siguranță în următorii ani această listă va crește și mai mult, datorită nevoii urgente de a găsi variante de tratament, aceste noi ținte reprezentând un nou orizont pentru dezvoltarea unui arsenal terapeutic mai larg împotriva infecțiilor fungice din ce în ce mai frecvente.

Din categoria funcțiilor celulare care pot reprezenta o țintă pentru antifungice putem enumera:

- biosinteza glucosfingolipidelor,
- proteina de ancorare GPI,
- calea pirimidinei,
- biosinteza aminoacizilor,
- ciclul glioxilatului,
- sideroforul,
- căile de semnalizare,
- factorii transcripționali și
- deacetilarea histonelor.

Principalele strategii care ar putea fi utilizate pentru identificarea de noi molecule, inclusiv biofarmaceutice, pentru cercetarea și dezvoltarea de noi medicamente antifungice sunt prezentate în Figura 6 [44].

O bună parte din cele prezentate se află deja în studii preclinice sau clinice [44].

Glucosfingolipidele sunt componente ale membranei plasmatice care reglează replicarea și patogenitatea mai multor fungi.

Proteinele manozilate sunt atașate de peretele fungic prin **ancore de Glicozil-fosfatidil-inozitolul (GPI)** pentru menținerea integrității și homeostaziei peretelui celular fungic.

Ciclul glioxilatului permite celulelor fungice să se adapteze și să supraviețuiască în gazdă în condiții limitate de nutrienți [44].

Deoarece **factorii transcripționali** sunt principalii reglatori ai mai multor gene implicate într-o varietate de funcții celulare, studii recente au arătat că inhibarea acestor molecule provoacă o perturbare a expresiei genetice a celulelor fungice, culminând cu moartea celulară. Folosirea inhibitorilor epigenetici pentru a modula expresia genică a agenților patogeni fungici este o altă metodă, deja aplicată în terapia cancerului, pentru a ținti **deacetilazele histonelor**, care sunt responsabile pentru îndepărtarea grupărilor acetil din histone și din alte proteine, în general reducând transcripția și expresia genelor. Aceste proteine joacă un rol esențial în modularea virulenței, a rezistenței la medicamente și morfogeneza agenților patogeni fungici [44].

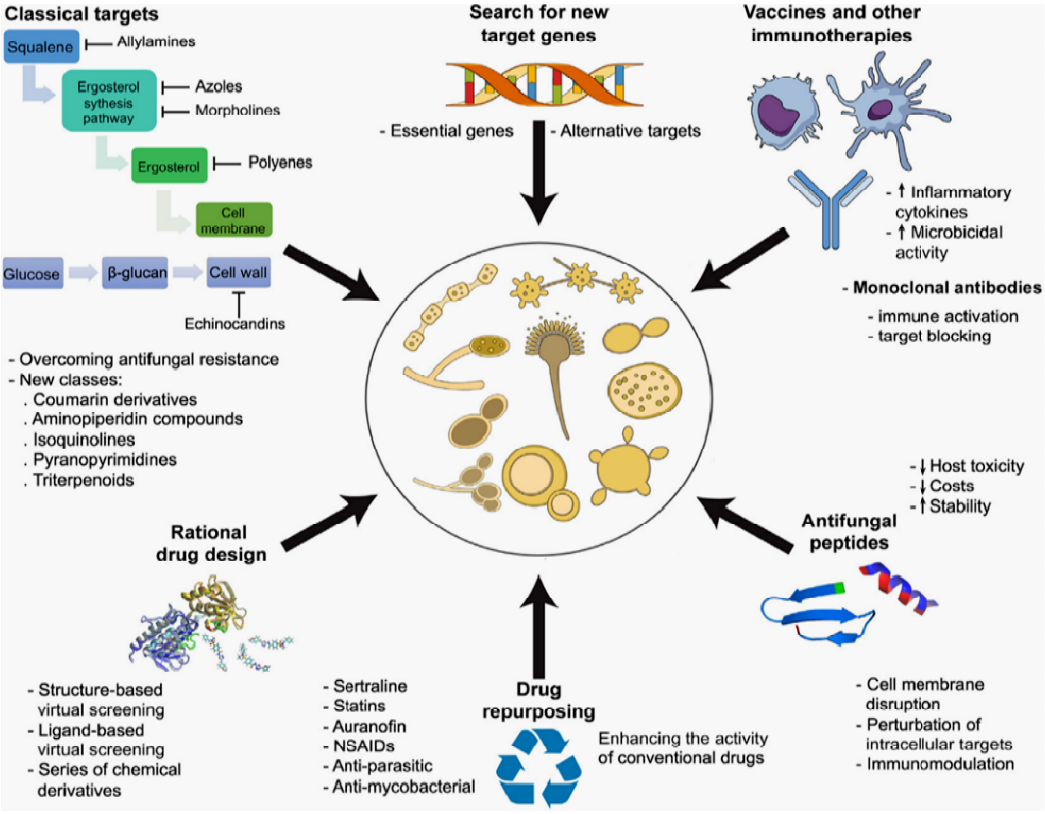


Figura 6. Principalele strategii pentru cercetarea și dezvoltarea de noi medicamente antifungice[44]

Bibliografie

1. **Alvarez-Perez S, Garcia ME, Cutuli MT et al., 2016**, *Acquired multi-azole resistance in Candida tropicalis during persistent urinary tract infection in a dog*, Med Mycol Case Rep, 11: 9–12.
2. **Al-Yasiri MH, Normand AC, L'Ollivier C, 2016**, *Opportunistic fungal pathogen Candida glabrata circulates between humans and yellow-legged gulls*. Sci Rep.; 6: 36157.
3. **Angileri, M., 2019**, *Azole resistance of Malassezia pachydermatis causing treatment failure in a dog*, Med. Mycol. Case Rep., 23: 58–61.
4. **Beltaire KA, Cheong SH, Coutinho da Silva MA., 2012,** *Retrospective study on equine uterine fungal isolates and antifungal susceptibility patterns (1999–2011).* Equine Vet J Suppl.; 43: 84–87.
5. **Bobbarala, V., Katikala, P.K., Naidu, K.C., Penumajji, S., 2009**, *Antifungal activity of*

selected plant extracts against phytopathogenic fungi Aspergillus niger F2723, Indian J of Sci and Tech 2(4): 87-90

6. **Borugă O, Jianu C, Mişcă C, Goleţ I, Gruia AT, Horhat FG, 2014**, *Thymus vulgaris essential oil: chemical composition and antimicrobial activity*, Journal of Medicine and Life Volume 7, Issue 3
7. **Brilhante RS, Bittencourt PV, Castelo-Branco D., 2016**, *Trends in antifungal susceptibility and virulence of Candida spp. from the nasolacrimal duct of horses*. Med Mycol. 54: 147–154.
8. **Byrnes E.J., Bartlett H.K., Perfect J.R., Heitman J., 2011**, *Cryptococcus gattii: an emerging fungal pathogen infecting humans and animals*, Microbes and Infection, Volume 13, Issue 11, Pages 895-907
9. **Cafarchia, C., Iatta, R., Immediato, D., 2015**, *Azole susceptibility of Malassezia pachydermatis and Malassezia furfur and tentative epidemiological cut-off values*, Med. Mycol., 53(7):743-8.
10. **Case T.N., Heitman J., Cowen L., 2020**, *The Rise of Fungi: A Report on the CIFAR Program Fungal Kingdom: Threats & Opportunities Inaugural Meeting*, Genes-Genomes-Genetics, Volume 10, 1837-1842.
11. **Cibanal, L., Fernández, G., Krepper, C., Pellegrini, L., Gallez, A., 2019**, *Advances in the Development of a Biofungicide: Physical-Chemical Characterization and Antifungal Activity of Propolis* Uruguay vol.23 no.2 Montevideo.
12. **Cordeiro R, de Oliveira JS, Castelo-Branco D, 2015**., *Candida tropicalis isolates obtained from veterinary sources show resistance to azoles and produce virulence factors*. Med Mycol.; 53: 145–152.
13. **Corneli, O., Călin, M., 2016**, *Antibiotice antifungice: clasificare, mecanisme de acţiune și mecanisme de rezistenţă*, Ed. Medichub Media, București
14. **Cristina, R.T., Moruzi R.F., Dumitrescu, E., Muselin, F., Doma, A.O., 2020**, *Modalități de instalare a rezistenței la antimicrobiene și studierea eficacităţii antimicrobienelor*, Medicamentul Veterinar / Veterinary Drug, Vol. 14(1).
15. **Cristina, R.T., Teusdea V. 2008**, *Ghid de farmacie și terapeutică veterinară* Editura Brumar, Timisoara
16. **Cristina, R.T., Moruzi, R.F., Dumitrescu, E., Muselin, F., Doma, A.O., 2020**, *Răspunsul microorganismelor la tratamentele antimicrobiene*, Medicamentul Veterinar / Veterinary Drug Vol. 14(1) Iunie
17. **Dananjaya, S.H.S., Thu Thao, N.T., Wijerathna, H.M.S.M, Lee Jisoo, M. Edussuriya, Dongrack Choi, Saravana, R.K., 2020**, *In vitro and in vivo anticandidal efficacy of green synthesized gold nanoparticles using Spirulina maxima polysaccharide*, Process Biochemistry, Volume 92, Pages 138-148,
18. **Dumitrescu, E., Cristina, R.T., 2015**, *Elemente de terapie alternativă și complemetară în medicina veterinară*, Ed. Solness, Timișoara
19. **El-Baz F.K., 2013**, *In vitro antiviral and antimicrobial activities of Spirulina platensis extract*. În: J Appl Pharm Sci. 3(12), p.52–56.
20. **Ge L, Li Q, Wang M, Ouyang J, Li X, Xing MM, 2014**, *Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity*, Int J Nanomedicine. 9():2399-407.
21. **Giguere S., Prescott J.F., Dowling P., 2013,** *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* Fifth Edition, Ed. Wiley Blackwell
22. **Goncalves SS, Souza AC, Chowdhary A., 2016**, *Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in Candida and Aspergillus*. Mycoses. 59: 198–219.
23. **Hammer K. A., Carson C.F., Riley T. V., 2003**, *Antifungal activity of the components of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil*, Journal of Applied Microbiology, 95, 853–860
24. **Hassan, Y.H., El-Sayed, M., Salah, M., Ahmed, Z., 2004**, *Efficacy of aloe vera gel leaves for treatment of skin affection amonge animals. treatment trial of calves Dermatophytosis*, 1rst Ann. Confr., FVM., Moshtohor
25. **Hidayat H., Karsten K., Viqar U.A, Ghulam A., Green I**, **2007**, *Lapachol: an overview*, ARKIVOC(ii) 145-171 Page 145 ©ARKAT USA, Inc.
26. **Hussain, A.M., Ahmed, D., Ayaz, A., Perveen, S., Shakil, A., Anis, I., Shah, M.R., Khan, N.A., 2018**, *Combination Therapy of Clinically Approved Antifungal*

Drugs Is Enhanced by Conjugation with Silver Nanoparticles, International Microbiology

27. **Iatta, R., Puttilli, M., Immediato, D., Otranto, D., Cafarchia, C., 2016**, *The role of drug efflux pumps in Malassezia pachydermatis and Malassezia furfur defence against azoles*, Mycoses 60 (3)178–182.
28. **Iulian, O., 2015**, *Abordări contemporane în sensibilitatea şi rezistenţa antifungică*, Buletinul AŞM. Ştiinţele vieţii. Nr. 3(327).
29. **Jagtap, N.S., Khadabadi, S.S., Ghorpade, D.S., Banarase, N.B., Naphade, S.S., 2009**, *Antimicrobial and antifungal activity of Centella asiatica* (L.) Urban, Umbeliferae, Res J. Pharm. and Tech 2 (2): 328-330
30. **Jesus, F., 2011**, *In vitro susceptibility of fluconazole-susceptible and -resistant isolates of Malassezia pachydermatis against azoles*, Vet. Microbiol. 152(1-2):161-4.
31. **Kano R., Yokoi S., Kariya N., Oshimo K., Kamata H., 2018**, *Multi-azole-resistant strain of Malassezia pachydermatis isolated from a canine Malassezia dermatitis*. Med. Mycol.
32. **Ksiezopolska, E.; Gabaldón**, T., **2018**, *Evolutionary Emergence of Drug Resistance in Candida Opportunistic Pathogens*. Genes, 9, 461.
33. **Li, Y.; Pan, J.; Ye, G.; Zhang, Q.; Wang, J.; Zhang, J.; Fang, J., 2017**, *In Vitro Studies of the Antimicrobial Effect of Non-Thermal Plasma- Activated Water as a Novel Mouthwash*. Eur. J. Oral Sci. 125, 463−470.
34. **Lindenfelser AL**., **1967**, *Antimicrobial activity of propolis. AmericanBee* J.,107:90–92.
35. **Lipovan, I., Andra, Bostănaru, A., Năstasă, V., 2015**, *Assessment of the Antimicrobial Effect of Non-Thermal Plasma Activated Water Against Coagulase-Positive Staphylococci*, Napoca. Veterinary Medicine, vol.72, nr.2.
36. **Lord AT, Mohandas K, Somanath S, 2010**, *Multidrug resistant yeasts in synanthropic wild birds*. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 9: 11.
37. **Lucia C, Nazzaro F, Fatima S, Aliberti L, DeMartino L, Fratianni F, Coppola R, De Feo V, 2017**, *Laurus nobilis: Composition of Essential Oil and Its Biological Activities*, Molecules, 22, 930.
38. **Magro, A., Bastos, M., Carolino, M., Mexia, A., 2007**, *Antifungal activity of plant extracts*, Integrated Protection of Stored Products, IOBC/wprs Bulletin Vol. 30 (2) , 291-295
39. **Mahlo, S.M., Chauke, H.R., McGaw, L., Eloff, J., 2016**, *Antioxidant and antifungal activity of selected medicinal plant extracts against phytopathogenic fungi*, Afr J Tradit Complement Altern Med 3;13(4):216-222
40. **Marchese, A, Barbieri, R, Coppo, Orhan, I, Daglia, M, Nabavi, S, Izadi, M, Abdollahi, M, Seyed Mohammad Nabavi, Marjan Ajami, 2017**, *Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint*, Critical Reviews in Microbiology.
41. **Mareș, M., Năstasă, V., Moraru, R., 2013**, *Terapia antifungică în medicina veterinară*, Ed. PIM, Iași
42. **Moghadamtousi, Z.S., Kadir, A.H, Hassandarvish, P., Tajik, H., Abubakar, S., Zandi, K., 2014**, *A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin*, Biomed Res Int. 186864.
43. **Mussin, J.E., Roldán, M.V., Rojas, F., Pellegri, N., 2019**, *Antifungal activity of silver nanoparticles in combination with ketoconazole against Malassezia furfur* AMB Expr 9:131
44. **Nicola A.M, Albuquerque P., Paes H.C., Fernandes L., Costa F.F., Kioshima E.S., Abadio A.K.R., Bocca A.L., Felipe MS., 2019,** Antifungal drugs: new insights in research & development. Pharmacol Ther. 195:21-38.
45. **Nijima, M., Kano, R., 2011**, *An azole-resistant isolate of Malassezia pachydermatis*, Vet. Microbiol. 149(1-2):288-90.
46. **Ota C, Unterkircher C, Fantinato V, Shimuzu MT.,** 2001, *Antifungal activity of propolis on different species of Candida*. Mycoses.;44:375–378.
47. **Perlin S. David, 2014**, *Antifungal drug resistance: do molecular methods provide a way forward?* Curr Opin Infect Dis. 22(6): 568–573.

48. **Pfaller MA, Boyken L, Hollis RJ, Kroeger J, Messer SA, Tendolkar S, Diekema DJ, 2008**, *In vitro susceptibility of invasive isolates of Candida spp. to anidulafungin, caspofungin, and micafungin: six years of global surveillance*. J Clin Microbiol. Jan; 46(1):150-6.
49. **Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Meis JF, Gould IM, Fu W, Colombo AL, Rodriguez-Noriega E, 2007**, *Global Antifungal Surveillance Study*. J Clin Microbiol. Jun; 45(6):1735-45.
50. **Pfaller MA, Messer SA, Woosley LN, 2013**, *Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance*. J Clin Microbiol. 51: 2571–2581.
51. **Pinto, E., Vale-Silva, L., Cavaleiro, C., Salgueiro, L., 2009**, *Antifungal activity of the clove essential oil from Syzygium aromaticum on Candida, Aspergillus and dermatophyte species*, J Med Microbiol 58(Pt 11):1454-62
52. **Radwan, I.A., A.H. Abed, M.R. Abeer, M.A. Ibrahim, A.S. Abdallah, 2014**, *Effect of Thyme, Clove and Cinnamon Essential Oils on Candida Albicans and Moulds Isolated from Different Sources*, American Journal of Animal and Veterinary Sciences, 9(4): 303.314
53. **Rai M, Yadav A, Gade A, 2009**, *Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials*, Biotechnol Adv. 27(1):76-83.
54. **Rai M.K., Deshmukh S.D., Ingle A.P., Gade A.K., 2012**, *Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria*, J Appl Microbiol. 112(5):841-52.
55. **Rai, M., Mares, D., 2003**, *Plant-derived antimycotics: Current trends and future prospects*, The Haworth Press, New York
56. **Ramón-Sierra, J., Peraza-López, E., Rodríguez-Borges, R., Yam-Puc, A., Madera-Santana, T., Ortiz-Vázquez, E., 2019**, *Partial characterization of ethanolic extract of Melipona beecheii propolis and in vitro evaluation of its antifungal activity,* Revista Brasileira de Farmacognosia, Volume 29, Issue 3, Pages 319-324.
57. **Rawat, S., Jain, A., Jain, S., 2008**, *Recent Herbal Trends against Fungal Infections: A Review*, Pharmacognosy Reviews 2:257-265.
58. **Revie, N., Iyer, K., Robbins, N., Cowen, L., 2018**, *Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact*, Curr Opin Microbiol. ;45:70-76.
59. **Riviere, J.E., Papich, M.G., 2018**, *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Tenth Edition, Ed. Wiley Blackwel.
60. **Rodino, S., Filder, G., Butu, A., Negoescu, C., 2015**, *Research Regarding the Antimicrobial Activity of Plant Extracts*, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca
61. **Sahin, F.I., Karaman, M. Güllüce, H. Ögütçü, M. ¸ Sengül, A. Adıgüzel S. Öztürk, R. Kotan**, **2003**, *Evaluation of antimicrobial activities of Satureja hortensis L*, Journal of Ethnopharmacology 87:61–65
62. **Sara S, Larissa C. de Camargo, Cesar A. C. Lancheros, Sueli F. Yamada-Ogatta, Celso V. Nakamura, Admilton G. de Oliveira, Célia G. T. J. Andrade, Nelson Duran, Gerson Nakazato, Renata K. T. Kobayashi**, **2016**, *Synergistic and Additive Effect of Oregano Essential Oil and Biological Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacterial Strains*, Front. Microbiol.
63. **Scorzoni L, de Paula e Silva ACA, Marcos CM, Assato PA, de Melo WCMA, de Oliveira HC, Costa-Orlandi CB, Mendes-Giannini MJS, Fusco-Almeida AM**, **2017**, *Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis*. Front. Microbiol. 8:36.
64. **Sepahvand, A., Eliasy, H., Mohammadi, M., Safarzadeh, A., Azarbaijani, K., Shahsavari, S., Alizadeh, M., Beyranvand F., 2018**, *A review of the most effective medicinal plants for dermatophytosis in traditional medicine*, Biomedical Research and Therapy, Vol 5 No 6, 2378-2388
65. **Seyedmojtaba S., Bosco S.M, Hoog S., Ebel F., Elad D., Gomes R., Jacobsen I., Jensen H., Martel A., Mignon B., Pasmans F., Piecková E., Rodrigues**

A.M., Singh K., Vicente V., Wibbelt G., Wiederhold N., Guillot J., 2018, *Fungal infections in animals: a patchwork of different situations*, Med Mycol.; 56(Suppl 1): S165–S187

66. **Seyidoglu, N., Inan S., Aydin, C.,** *A Prominent Superfood: Spirulina platensis, Superfood and Functional Food - The Development of Superfoods and Their Roles as Medicine*, Naofumi Shiomi and Viduranga Waisundara, IntechOpen.
67. **Sibel, Si., Nedret, A., Koç, D., 2005**, *Antifungal Activities of Propolis Collected by Different Races of Honeybees Against Yeasts Isolated From Patients With Superficial Mycoses,* Journal of Pharmacological Sci, Volume 99 Issue 1
68. **Tatjana M, Radnović D, Kitić D, Zlatković B, Ristić M, Branković S, 2009**, *Chemical composition and antimicrobial activity of Satureja hortensis L. essential oil*, Cent. Eur. J. Biol. • 4(3) • 2009 • 411–416
69. **Tekin, V., Guldu, K.O., Dervis, E., Kilcar, A.Y., Uygur, E., Muftuler, Z.B., 2019**, *Green synthesis of silver nanoparticles by using eugenol and evaluation of antimicrobial potential*, Applied Organometallic Chemistry 33
70. **Tosi, B., Donini, A., Romagnoli, C., Bruni, A., 1996**, *Antimicrobial Activity of Some Commercial Extracts of Propolis Prepared with Different Solvents*, Phytotherapy Research, VOL. 10, 335-336
71. **Trakranrungsie, N., 2011**, *Plant derived antifungals- trends and potential applications in veterinary medicine: A mini-review*, Department of Preclinical Sciences, Faculty of Veterinary Science, Mahidol.
72. **Tresch, M., Meike, M., Hannah, A., Matthias, M., Petra, R., Michael, W., 2016**, *Medicinal plants as therapeutic options for topical treatment in canine dermatology? A systematic review,* BMC Vete Res.
73. **Usharani, G. Srinivasan, S. Sivasakthi and P. Saranraj, 2015**, *Antimicrobial Activity of Spirulina platensis Solvent Extracts Against Pathogenic Bacteria and Fungi*, Advances in Biological Research 9 (5): 292-298
74. **Vandeputte, P., Ferrari, S., 2017**, *Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections*, International Journal of Microbiology.
75. **Vermeulen E, Lagrou K, Verweij PE., 2013**, *Azole resistance in Aspergillus fumigatus: a growing public health concern*. Curr Opin Infect Dis.; 26: 493–500.
76. **Vinciguerra, V., Rojas, F., Tedesco, V., Giusiano G., Angiolella, A., 2018**, *Chemical characterization and antifungal activity of Origanum vulgare, Thymus vulgaris essential oils and carvacrol against Malassezia furfur*, Natural Product Research
77. **Wiederhold, N.P., 2017**, *Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat*, Infect Drug Resist., Aug 29;10:249-259.
78. **Wynn, S.G, Fougère, J.B., 2007**, *Veterinary Herbal Medicine*, Ed. Mosby
79. **Zhengxin L., Yongping Z., Jie D., Jiabin Z., Feihong D., Kaile W., Jue Z.,** 2019, *A Novel Antifungal Plasma-Activated Hydrogel*, ACS Appl. Mater. Interfaces, 11, 22941−22949
80. ***https://en.wikipedia.org/wiki/Aloe_vera
81. ***https://en.wikipedia.org/wiki/Centella_asiatica
82. ***https://en.wikipedia.org/wiki/Cinnamomum_verum
83. ***https://en.wikipedia.org/wiki/Clove
84. ***https://en.wikipedia.org/wiki/Curcuma
85. ***https://en.wikipedia.org/wiki/Hypericum_perforatum
86. ***https://en.wikipedia.org/wiki/Laurus_nobilis
87. ***https://en.wikipedia.org/wiki/Melaleuca_alternifolia
88. ***https://en.wikipedia.org/wiki/Oregano
89. ***https://en.wikipedia.org/wiki/Rosemary
90. ***https://en.wikipedia.org/wiki/Thymus_vulgaris
91. ***https://ro.wikipedia.org/wiki/Mentha_spicata
92. ***https://ro.wikipedia.org/wiki/Negrilic%C4%83
93. ***https://ro.wikipedia.org/wiki/Usturoi
94. ***https://www.natmedtalk.com/wiki/File:Paudarco-tree.jpg