

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

Paula Reginatto

**NOVAS ESTRATÉGIAS DE COMBATE AOS BIOFILMES DE *CANDIDA*  
ADERIDOS A DISPOSITIVOS DE ACESSO VENOSO**

Porto Alegre

2019



Paula Reginatto

**NOVAS ESTRATÉGIAS DE COMBATE AOS BIOFILMES DE *CANDIDA*  
ADERIDOS A DISPOSITIVOS DE ACESSO VENOSO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre (a) em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello  
Fuentefria

Coorientador: Prof. Dr. Saulo Fernandes de  
Andrade

Porto Alegre

2019

### CIP - Catalogação na Publicação

Reginatto, Paula  
NOVAS ESTRATÉGIAS DE COMBATE AOS BIOFILMES DE  
CANDIDA ADERIDOS A DISPOSITIVOS DE ACESSO VENOSO /  
Paula Reginatto. -- 2019.  
140 f.  
Orientador: Alexandre Meneghello Fuentefria.

Coorientador: Saulo Fernandes de Andrade.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Biofilme. 2. Candida spp.. I. Meneghello  
Fuentefria, Alexandre, orient. II. Fernandes de  
Andrade, Saulo, coorient. III. Título.

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

Para ser grande, sê inteiro: nada  
Teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és  
No mínimo que fazes.  
Assim em cada lago a lua toda  
Brilha, porque alta vive.

Ricardo Reis  
Heterônimo de Fernando Pessoa

## AGRADECIMENTOS

Um trabalho de mestrado é como uma longa estrada... Enquanto caminhamos por ela, encontramos muitas pedras que desafiam nossa caminhada... É um caminho difícil! São dúvidas, medos, cansaço... Foram muitos finais de semana no laboratório ao longo destes dois anos, a maioria deles. Mas tudo isso é recompensado pelo aprendizado, conhecimento e crescimento pessoal. O caminho se torna mais alegre e grandioso por reunir contributos de várias pessoas. Esta jornada só foi possível devido ao apoio e força de várias pessoas, a quem dedico este trabalho.

Primeiramente, quero agradecer ao meu orientador, o Prof. Alexandre Meneghello Fuentesfria, que sempre acreditou em mim. Agradecer pela orientação, pelas sugestões e pelo conhecimento transmitido. Tuas palavras de incentivo, conselhos e apoio foram (e são) muito importantes, além da cordialidade com que nos recebe e nos atende sempre que precisamos. Agradeço imensamente pela liberdade de ação que me permitiu, foi de extrema importância para meu crescimento pessoal. Tens meu carinho e admiração!

Quero agradecer carinhosamente meu coorientador, Prof. Saulo Fernandes de Andrade, que tem grande parcela de responsabilidade por este momento. Foi a primeira pessoa a acreditar em mim, ainda lá na graduação, quando me fez um convite para trabalhar com ele e fazer meu TCC. Desde as aulas de síntese conquistou meu carinho, respeito e admiração.

Aos membros da banca examinadora, Prof<sup>a</sup> Patrícia Valente, Marcela Lopes, Prof. Régis Zanette e Laura Bedin Denardi, que tão gentilmente aceitaram participar e contribuir com este trabalho. Agradeço pelo tempo desprendido! Saibam que a escolha da banca foi carinhosamente pensada, pelos excelentes profissionais que são e pelos quais tenho grande admiração.

Agradecer ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, professores, secretaria e colegas. Agradecer ao Núcleo de Apoio Estatístico da UFRGS, especialmente ao estatístico Gilberto Pereira Mesquita. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) pela concessão da bolsa.

Banca à parte, novamente quero agradecer à Prof<sup>a</sup> Patrícia Valente, com quem tive a incrível chance de cursar algumas disciplinas durante o mestrado e

aprender muito. Também à Marcela pelo tempo e atenção dedicados quando a ela recorri.

Agradecer aos alunos do Prof. Saulo, especialmente a Débora Rocha e a Angélica Joaquim, que foram muito importantes para a realização deste trabalho, as “proprietárias” das moléculas. À Mairique Waszczuk e à Vanessa Pittol do LDG pela grande ajuda, muitas vezes me salvando nas urgências. Ao William Lopes, que mesmo na correria do seu dia a dia, me atendeu. À Simone Berlitz pela imensa ajuda, inclusive pelo feriado que abdicou pra me ajudar.

Aos colegas do laboratório, aos que passaram e aos que lá se encontram, são ótimas companhias pra compartilhar conhecimentos, dúvidas, risadas, ajudas e ideias (para cantar e comer, principalmente): Leti Danielli, Bárbara, Robson, Magda, Luana, Anderson, Bruna Batista, Nailí, Vivi e Taís. À Dai por tantos momentos de descontração e por aturar meus “interrogatórios” sedentos por conhecimento, pelo humor sem igual, parceria ímpar e ajuda. À Pri por tantas trocas de ideias, papos “furados”, troca de experiências familiares, RUs e companhia de todas as horas. À Gabi que está sempre disposta e muito determinada a ajudar, apoiar, incentivar e acolher, tem um “coração de ouro”. À Bruna Pippi que foi o meu primeiro contato dentro do grupo, minha mestre, minha coorientadora do TCC, com quem aprendi muito e que veio a ocupar um espaço ainda mais especial na minha vida: como amiga. Agradeço por tantas vezes que me ajudou e pelas inúmeras discussões científicas, filosóficas, psicológicas e sociais. Juntamente com a Vanessa Bergamo Zafanelli foram as maiores incentivadoras para que eu iniciasse esta jornada e ainda seguraram minha mão em momento de desespero, lá no início desta caminhada. A Vavá sempre irradiando alegria e empatia dentro do laboratório, foi fundamental dentro deste trabalho, era colega, foi promovida a amiga e ainda assumiu o papel de minha IC por um período. Sempre com o coração cheio de carinho por todos e tornando os dias no laboratório cheios de vida e alegria (e comida).

Obrigada às amigas, de dentro e de fora da UFRGS, o apoio e carinho de vocês é muito importante pra mim. Quero agradecer a minha família, avós, tios e primos, sem os vídeos motivacionais no grupo do WhatsApp, eu não teria superado alguns momentos.

Por fim, meu infinito agradecimento aos meus pais, principalmente minha mãe, pela minha formação, que me proporcionou chegar até aqui. Sempre

acreditaram na minha capacidade, o que fez com que eu desse o melhor de mim sempre. Agradeço pelo apoio, amor incondicional e abnegação! Pelo companheirismo, amizade, caridade, dedicação e compreensão a cada novo dia e por me ensinarem o caminho do bem. Quero agradecer carinhosamente ao meu namorado pelo apoio incondicional, enorme compreensão, amor, generosidade e companheirismo. Sempre prontos a me ajudar em tudo nesta vida, me apoiaram e compreenderam a minha ausência constante, momentos de lazer, feriados e datas especiais perdidas. Todo meu amor e gratidão por vocês!

O meu profundo agradecimento a todas as pessoas que contribuíram intelectual e emocionalmente, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação. Como diria Clarice Lispector: “Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe”.

Ninguém vence sozinho... OBRIGADA A TODOS!

# NOVAS ESTRATÉGIAS DE COMBATE AOS BIOFILMES DE *CANDIDA* ADERIDOS A DISPOSITIVOS DE ACESSO VENOSO

Autor: Paula Reginatto

Orientador (a): Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Coorientador (a): Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade

Atualmente, ainda não existe um consenso sobre a terapia mais adequada para o combate de infecções relacionadas a biofilmes fúngicos, sendo necessária a remoção dos dispositivos infectados quando há suspeita de contaminação da sua superfície. Porém nem sempre isso é viável e o tratamento antimicrobiano se faz necessário. Nestes casos, uma estratégia racional é o uso de terapias combinadas de antimicrobianos ou a aplicação da tecnologia farmacêutica para o desenvolvimento de novas formulações, com o intuito de superar os desafios relacionados aos agentes antifúngicos atualmente disponíveis. Em vista disso, o objetivo geral deste estudo foi avaliar novas estratégias de prevenção à formação e de erradicação de biofilmes de diferentes espécies de *Candida* que podem estar associados a dispositivos médicos de acesso venoso. Cinco antifúngicos (anidulafungina - AND, fluconazol - FLZ, voriconazol - VRZ, cetoconazol - KTZ, anfotericina B - AMB), uma molécula derivada da quinazolina (PH100) e uma molécula derivada da 8-hidroxiquinolina (PH157) foram testadas frente a biofilmes de *Candida* em microplacas de poliestireno e em cateter venoso central de poliuretano, de forma isolada e em combinação, através do método de *checkerboard*. A AND seguida pela AMB tiveram atividade superior frente aos biofilmes em relação aos demais agentes antifúngicos, porém, em altas concentrações. No entanto, a associação de ambas demonstrou ação sinérgica em menores concentrações, o que proporciona um menor risco à aquisição da resistência. A partir desta associação mais efetiva, desenvolveu-se formulações de filmes poliméricos do tipo hidrogel com intuito de prevenir a formação do biofilme fúngico em dispositivos médicos, através do princípio do revestimento de superfície. As formulações contendo AND (1 µg/mL) e a associação de AND/AMB demonstraram ser bastante promissoras para utilização na rotina da clínica médica, uma vez que apresentaram inibição da formação do biofilme sobre o dispositivo de 90,5-98,26% e 93,41-98,26% respectivamente, sendo capazes de prevenir a formação do biofilme na superfície do dispositivo de acesso venoso frente a todas as espécies de *Candida*.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (124 p.) Fevereiro, 2019.

# NEW STRATEGIES FOR COMBATING *CANDIDA* BIOFILMS ADHERED TO VENOUS ACCESS DEVICES

Author: Paula Reginatto

Advisor: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Co-advisor: Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade

Currently, there is no consensus on the most appropriate therapy to combat infections related to fungal biofilms, requiring the removal of infected devices when surface contamination is suspected. However, this is not always feasible and antimicrobial treatment is necessary. In these cases, a rational strategy is the use of combined antimicrobial therapies or the application of pharmaceutical technology to the development of new formulations, in order to overcome the challenges related to antifungal agents currently available. In view of this, the overall objective of this study was to evaluate new strategies to prevent the formation and eradication of biofilms of different *Candida* species that may be associated with venous access medical devices. Five antifungals (anidulafungin - AND, fluconazole - FLZ, voriconazole - VRZ, ketoconazole - KTZ, amphotericin B - AMB), a molecule derived from quinazoline (PH100) and a molecule derived from 8-hydroxyquinoline (PH157) were tested against biofilms of *Candida* in polystyrene microplates and in central venous catheter of polyurethane, in isolation and in combination, through the *checkerboard* method. AND followed by AMB showed superior activity against biofilms in relation to the other antifungal agents, but at high concentrations. However, the association of both showed synergistic action at lower concentrations, which provides a lower risk of resistance acquisition. From this more effective association, formulations of polymer films of the hydrogel type were developed in order to prevent the formation of fungal biofilms in medical devices, through the principle of surface coating. The formulations containing AND (1 µg/mL) and the association of AND/AMB were shown to be very promising for use in routine medical practice, since they showed inhibition of biofilm formation on the device of 90.5-98.26% and 93.41-98.26% respectively, being able to prevent biofilm formation on the surface of the venous access device across all *Candida* species.

<sup>1</sup>Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (124 p.) February, 2019.

## Sumário

1.	INTRODUÇÃO .....	1
2.	OBJETIVOS .....	3
2.1.	Objetivo Geral.....	3
2.2.	Objetivos específicos.....	3
3.	REVISÃO DA LITERATURA .....	5
3.1.	Infecções Fúngicas.....	5
3.1.1.	Infecções por <i>Candida</i> spp. e epidemiologia .....	6
3.2.	Fatores de virulência .....	14
3.2.1.	Biofilmes .....	15
3.3.	Resposta Imunológica .....	31
3.4.	Agentes antifúngicos .....	35
3.4.1.	Polienos .....	36
3.4.2.	Azóis .....	37
3.4.3.	Equinocandinas.....	39
3.4.4.	Análogos de pirimidina.....	39
3.4.5.	Alilaminas.....	40
3.4.6.	Outros fármacos.....	41
3.5.	A problemática e os desafios da terapia antifúngica atual .....	42
3.5.1.	Resistência aos antifúngicos.....	43
3.5.2.	Recalcitrância dos biofilmes aos agentes antifúngicos .....	46
3.6.	Perspectivas para superação dos desafios na terapia fúngica ....	50
3.6.1.	Associação de fármacos .....	50
3.6.2.	Novas formulações .....	52
3.6.3.	Estratégias de combate imunológico .....	56
3.6.4.	Desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos .....	57
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	71

4.1. Local de trabalho .....	71
4.2. Cepas Fúngicas.....	71
4.3. Agentes antifúngicos .....	72
4.4. Suscetibilidade de células planctônicas e sésseis.....	72
4.5. Inibição da formação do biofilme (IBF) .....	73
4.6. Remoção de biofilme (BR).....	75
4.7. Suscetibilidade de Biofilmes (BMIC).....	76
4.8. <i>Checkerboard</i> test .....	77
4.9. Prevenção da formação de biofilme de <i>Candida</i> em cateter venoso central de poliuretano.....	78
4.10. Avaliação da capacidade de erradicação do biofilme de <i>Candida</i> em cateter venoso central de poliuretano.....	79
4.11. Preparação de um sistema de revestimento (Sistema Formador de Filme) para a prevenção da formação do biofilme de <i>Candida</i> spp.....	80
4.12. Determinação das características físico-químicas.....	81
4.13. Tratamento estatístico dos dados.....	81
5. RESULTADOS.....	82
6. DISCUSSÃO .....	87
7. CONCLUSÃO .....	100
8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	101
9. REFERÊNCIAS.....	102
10. APÊNDICES .....	115

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> .....	80
<b>Tabela 2</b> .....	114
<b>Tabela 3</b> .....	117
<b>Tabela 4</b> .....	119
<b>Tabela 5</b> .....	121
<b>Tabela 6</b> .....	122

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Micromorfologia de <i>C. albicans</i> .....	9
<b>Figura 2.</b> Adesão de células planctônicas a uma superfície .....	17
<b>Figura 3.</b> Proliferação celular e formação de matriz extracelular .....	18
<b>Figura 4.</b> Biofilme formado maduro, com espessamento da matriz extracelular, maior diferenciação celular e sistema quórum-sensing desenvolvido .....	19
<b>Figura 5.</b> Biofilme em fase de dispersão, liberando células que poderão aderir-se a outras superfícies e formar novos biofilmes, dando continuidade ao ciclo .....	19
<b>Figura 6.</b> Biofilme de <i>C. albicans</i> em 48 horas de crescimento em discos de poliestireno, compostos por blastoconídios, pseudo-hifas e hifas .....	22
<b>Figura 7.</b> Biofilme formado por <i>C. parapsilosis</i> , formado em sua maioria por agregados de blastoconídios, com presença de pseudo-hifas .....	22
<b>Figura 8.</b> Biofilme de <i>C. tropicalis</i> composto por blastoconídios, pseudo-hifas e hifas, formando um estrutura densa .....	23
<b>Figura 9.</b> Biofilme de <i>C. glabrata</i> , formado em dispositivo intrauterino, composto apenas por agregados de blastoconídios .....	24
<b>Figura 10.</b> O ciclo de desenvolvimento de infecção por biofilme relacionada a cateter mais comum, o local de inserção do cateter como porta de entrada e consequente liberação de células na corrente sanguínea do hospedeiro .....	28
<b>Figura 11.</b> Sistema imunológico tentando combater, sem sucesso, o biofilme formado em cateter venoso .....	34
<b>Figura 12.</b> Representação dos principais alvos dos agentes antifúngicos .....	35
<b>Figura 13.</b> Representação da estrutura química do núcleo quinazolina .....	67
<b>Figura 14.</b> Representação da estrutura química: A) núcleo quinolínico; B) 8-hidroxiquinolina .....	69
<b>Figura 15.</b> Concentração inibitória mínima dos compostos frente a células planctônicas e sésseis das cepas de <i>Candida</i> spp. ....	83
<b>Figura 16.</b> Média do percentual da inibição e da erradicação do biofilme formado em cateter venoso central de poliuretano referente a cada composto, com seus respectivos coeficientes de variação .....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

8-HQ	8-hidroxiquinolina
ABLCL	Complexo Lipídico de Anfotericina B
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALT	Antibiotic Lock Therapy
AMB	Anfotericina B
AND	Anidulafungina
ATCC	“American Type Culture Collection”
BMIC	Redução da Atividade Metabólica do Biofilme
BR	Remoção do Biofilme
CD	Célula Dendrítica
CDC	Centro de Controle de Doenças
CFG	Caspofungina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	“Clinical Laboratory Standards Institute”
CNA	<i>Candida não-albicans</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EPS	Substâncias Poliméricas Extracelulares
ESCMID	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
EU	União Européia
EUA	Estados Unidos da América
FDA	“Food and Drug Administration”
FDASIA	Food and Drug Administration Safety and Innovation Act
FLZ	Fluconazol
GAIN	“Generating Antibiotic Incentives Now”
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IBF	Inibição da Formação do Biofilme
IDSA	Infectious Diseases Society of America
IL-17A	Interleucina 17A
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionária
ITS	Internal Transcribed Spacer (Espaçador Interno Transcrito)
ITZ	Itraconazol
KTZ	Cetoconazol

L-AmB	Anfotericina B lipossomal
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight (Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz - Tempo de Voo)
MFG	Micafungina
MOPS	Ácido morfolinopropanossulfônico
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio
NET	Armadilha Extracelular de Neutrófilo
PAMP	Padrão Molecular Associado a Patógeno
PBMC	Célula Mononuclear do Sangue Periférico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	Poliétilenoglicol
PEO	Polióxido de etileno
PMIC	Concentração Inibitória Mínima de Células Planctônicas
PRR	Receptor de Reconhecimento de Padrão
PSA	Área de Superfície Polar
PSZ	Posaconazol
RNA	Ácido Ribonucleico
RoF	Roles of Five
RPMI	“Roswell Park Memorial Institute”
RS	Rio Grande do Sul
SDA	Ágar Sabouraud Dextrose
SFF	Sistema Formador de Filme
SMIC	Concentração Inibitória Mínima de Células Sésseis
SMON	Neuropatia Mielo-Óptica Subaguda
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UMP	Uridina Monofosfato
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VRZ	Voriconazol

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, dois grandes problemas vêm desafiando as autoridades de saúde pública no Brasil e no mundo: a alta taxa de resistência aos antimicrobianos e a emergência de espécies patogênicas oportunistas. Nos últimos 10 anos, a incidência e gravidade de doenças fúngicas têm crescido de forma considerável, o que está intimamente relacionado com o aumento da sobrevivência de pacientes críticos (ex.: indivíduos com sistema imunológico debilitado) e aos avanços da medicina de uma maneira geral.

*Candida* spp. é um dos microrganismos oportunistas mais importantes da clínica médica humana. Historicamente, *Candida albicans* é considerada a espécie mais frequente, entretanto, espécies de *Candida* não-*albicans* (CNA) vêm emergindo nos últimos 20 anos, destacando-se principalmente as espécies de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*, as quais expressam maior virulência e maior resistência aos tradicionais antifúngicos de escolha. Estas espécies possuem uma estreita relação com infecções hospitalares de alto grau de severidade, quase sempre conexas a um tempo prolongado de hospitalização e gerando um alto custo ao sistema de saúde. Além disso, as CNA são associadas com altas taxas de morbidade e mortalidade, o que se deve principalmente à crescente resistência aos agentes antifúngicos. Entre as principais características, destacam-se seus fatores diferenciados de virulência, como a produção de enzimas hidrolíticas específicas, intensa formação de biofilme e as abundantes proteínas antigênicas de superfícies.

Biofilmes de *Candida* estão fortemente associados com a sobrevivência das espécies de maior virulência sob condições fortemente adversas. Como essas comunidades proporcionam um ambiente autossuficiente e protegido, que atua como um foco de disseminação de clones com alta virulência, mesmo após o término do tratamento, e o sistema imunológico raramente consegue resolver as infecções. Em dispositivos médicos colonizados por biofilmes de CNA, o risco da disseminação generalizada do patógeno é sempre um iminente perigo, principalmente em imunodeprimidos, pois a resposta imunitária celular está quase sempre fortemente suprimida.

Em paralelo a esse contexto, o arsenal de agentes antifúngicos tipicamente de escolha para o combate a infecções oportunistas oriundas de dispositivos médicos colonizados é muito limitado, reduzindo-se a apenas três

classes: polienos, azóis e equinocandinas. Apesar de existir uma extensa pesquisa para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, os medicamentos disponíveis para tratar e prevenir infecções fúngicas sistêmicas oriundas de contaminações por biofilmes ainda são limitados. Dessa forma, a resistência dos biofilmes de *Candida* spp. é um fator de grande preocupação mundial, sendo na atualidade um dos principais temas de pesquisa científica na infectologia.

Nesse contexto, derivados de quinazolina e de 8-hidroxiquinolina, com enorme variedade e versatilidade de sua estrutura química, demonstraram grande diversidade nas suas atividades biológicas. Em vista desse perfil diferenciado, esses derivados representam opções muito promissoras no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. É muito provável que as propriedades físico-químicas das substâncias estejam relacionadas com a habilidade da substância de transpor a matriz, que é uma grande barreira, e transpô-la pode representar uma estratégia importante. A “Regra dos Cinco” (Rules of Five – RoF) de Lipinski propõe limites de valores de quatro propriedades físico-químicas, importantes para a capacidade de absorção oral de fármacos.

Dessa forma, além da busca por novos fármacos antifúngicos, que é um processo longo e necessário, nesse entretanto, também é importante que se aperfeiçoe a terapia com os fármacos já existentes. Alternativas importantes a serem usadas são as associações e o desenvolvimento de novas formulações, que auxiliem em relação a perfis farmacocinéticos/farmacodinâmicos e de toxicidade.

Resumidamente, as opções atualmente disponíveis para contornar o problema relacionado às infecções fúngicas baseiam-se na síntese racional para desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, o desenvolvimento de novas formulações e a associação, usando compostos já conhecidos, o que pode melhorar seus perfis. Dentro destas circunstâncias, este trabalho busca determinar a atividade antifúngica e frente a biofilmes de *Candida* spp. de cinco agentes antifúngicos, um derivado de 8-hidroxiquinolina, um derivado de quinazolina e da associação dos dois compostos que apresentarem o melhor perfil de atividade, definir a melhor terapia no tratamento *in vitro* de infecções por biofilmes de *Candida* spp. em cateter venoso central de poliuretano para desenvolver uma formulação. Ainda determinar a existência de correlação dessa atividade em biofilmes com as características físico-químicas destes compostos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Estudar a performance de cinco agentes antifúngicos de uso sistêmico, um derivado de quinazolina e um derivado de 8-hidroxiquinolina na prevenção e eliminação de biofilmes que tipicamente colonizam dispositivos médicos hospitalares, com o propósito de definir um novo protocolo de tratamento antibiofilme de *Candida*.

### 2.2. Objetivos específicos

**2.2.1.** Determinar atividade antifúngica da anidulafungina, fluconazol, voriconazol, cetoconazol, anfotericina B, PH100 (derivado quinazolina) e PH157 (derivado 8-hidroxiquinolina) sobre células planctônicas e sésseis de *Candida* spp., com o intuito de avaliar o perfil antifúngico frente as células provenientes do biofilme.

**2.2.2.** Determinar a atividade dos sete compostos sobre a inibição da formação, remoção e redução de atividade metabólica de biofilmes de *Candida* spp. formados em materiais de poliestireno;

**2.2.3.** Determinar a capacidade dos compostos em inibir a formação e erradicar o biofilme de *Candida* spp. formado sobre cateter venoso central de poliuretano;

**2.2.4.** Avaliar o desempenho antibiofilme (inibição, remoção e redução da atividade metabólica) da associação dos dois compostos que obtiverem os melhores resultados nos ensaios anteriores sobre biofilmes de *Candida* spp. em ensaios com microplacas de poliestireno;

**2.2.5.** Avaliar a capacidade da associação dos dois compostos mais ativos sobre a inibição e erradicação *in vitro* de biofilmes *Candida* spp. formado em cateter venoso central de poliuretano;

**2.2.6.** Definir a melhor terapia *in vitro* sobre biofilmes de *Candida* spp. e, a partir dela, desenvolver uma formulação de sistema formador de filme, com posterior avaliação *in vitro* da sua eficácia de inibição da formação do biofilme sobre cateter de poliuretano;

**2.2.7.** Avaliar a correlação das propriedades físico-químicas dos compostos testados com a sua atividade frente aos biofilmes de *Candida* spp., como

uma maneira de definir e nortear futuramente o desenvolvimento direcionado de novos compostos nesta área.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. Infecções Fúngicas

No passado, as epidemias bacterianas eram globalmente uma importante causa de morte, enquanto infecções fúngicas não eram consideradas relevantes. No entanto, como inúmeras terapias antibacterianas foram desenvolvidas até o final da década de 60, observou-se um aumento da incidência das infecções fúngicas, despertando a atenção para a emergência de casos sem opções de tratamento (Enoch et al., 2006; Vandeputte et al., 2012).

As infecções fúngicas, em sua grande maioria, são sub-documentadas, ou seja, têm uma incidência maior do que aquela relatada (Calderone et al., 2014). Associadas com altas taxas de morbidade e mortalidade, a estimativa é de que acometam aproximadamente um bilhão de indivíduos em todo o mundo (Fuentefria et al., 2017; González-Lara et al., 2017 A).

Essas infecções vão de superficiais, afetando unhas, membranas mucosas, pele e cabelos, até sistêmicas, atingindo inúmeros órgãos, inclusive órgãos vitais (Silva et al., 2012). Ao menos um milhão de mortes anuais são atribuídas a infecções invasivas, que, mesmo apresentando incidência menor, atingem níveis de mortalidade maiores que malária e semelhantes a *Mycobacterium tuberculosis* resistente a medicamentos (Calderone et al., 2014; González-Lara et al., 2017 A). Nos últimos anos, a incidência e gravidade dessas infecções têm crescido de forma considerável, principalmente devido ao aumento da sobrevivência de pacientes críticos e pacientes imunocomprometidos, como pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) ou com câncer, transplantados, portadores de doença autoimune ou que requerem terapia imunossupressora (Vandeputte et al., 2012; Morace et al., 2014; Chang et al., 2017 A).

O crescente número de casos de fungos envolvidos na sepse é uma tendência consistente e, dessa forma, tornaram-se um problema de saúde pública (Kathiravan et al., 2012). Entre os gêneros mais frequentes em infecções invasivas, encontram-se: *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Mucor*, com menor frequência encontram-se *Coccidioides*, *Blastomyces* e *Histoplasma* (Silva et al., 2012; Chang et al., 2017 A; González-Lara et al., 2017 A). Neste contexto, as leveduras do gênero *Candida* constituem agentes etiológicos de grande importância.

### 3.1.1. Infecções por *Candida* spp. e epidemiologia

O gênero fúngico *Candida* é composto por mais de 150 espécies heterogêneas de leveduras, mais de 20 delas são comensais humanos (Silva et al., 2012; Bujdáková, 2016; Girardot e Imbert, 2016; Pappas et al., 2018). Possuem capacidade de colonizar diversos locais do corpo humano, como a pele, as membranas mucosas da boca, a garganta, o trato respiratório superior e o trato gastrointestinal, sem causar danos quando em condições de equilíbrio, como parte da microbiota do indivíduo (Bujdáková, 2016). No entanto, em situações de desequilíbrio, podem tornar-se patogênicas, causando infecções oportunistas, que vão desde micoses superficiais até profundas (Bujdáková, 2016; Silva et al., 2017).

De maneira ampla, emprega-se o termo “candidíase” para todos os tipos de infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*, desde infecções cutâneas e mucosas, como para infecções invasivas, profundas (peritonite, abscesso intra-abdominal, osteomielite) e candidemia (que é a infecção da corrente sanguínea) (Lamoth et al., 2018; Pappas et al., 2018). Associadas ao aumento do número de pacientes de risco, como transplantados de órgãos sólidos e medula óssea, imunossuprimidos iatrogênicos, portadores de doenças imunogênicas, distúrbios endócrinos, pós cirurgia invasiva, em uso de cateter venoso central e dispositivos médicos internos, com idade avançada, desnutrição, em uso de nutrição parenteral, portadores de doenças neoplásicas, com uso disseminado de antibacterianos de amplo espectro (que conferem a *Candida* spp. uma vantagem seletiva sobre as bactérias, uma vez que espécies comensais da microbiota intestinal liberam fatores de proteção da mucosa, que inibem o supercrescimento de *Candida* spp.), em permanência prolongada na Unidade de Terapia Intensiva (em UTIs as taxas podem ser cinco vezes superiores aos pacientes fora das UTIs) e bebês prematuros (Ramage et al., 2012; González-Lara et al., 2017 A; Silva et al., 2017; Mantadakis et al., 2018; Pappas et al., 2018; Peng et al., 2018).

O gênero *Candida* está entre os principais agentes de infecção nosocomial, sendo a terceira ou quarta mais comum em todo o mundo, após bacteremia por estafilococos coagulase-negativos, *Staphylococcus aureus* e/ou *Enterococcus* (Cavalheiro e Teixeira, 2018; Lamoth et al., 2018; Pappas et al., 2018). Este gênero é amplamente reconhecido como um dos principais agentes causais de morbidade e mortalidade nos cuidados de saúde, com grande aumento

das infecções invasivas por *Candida* spp. nas últimas décadas (González-Lara et al., 2017 A; Hernández-Chávez et al., 2017; Lamothe et al., 2018; Pappas et al., 2018; Peng et al., 2018).

A taxa bruta de mortalidade destas infecções é em torno de 10%, porém pode chegar a aproximadamente 50% (González-Lara et al., 2017 A; Hernández-Chávez et al., 2017; Cavalheiro e Teixeira, 2018; Lamothe et al., 2018; Pappas et al., 2018; Peng et al., 2018). Na Europa, a candidemia é a doença infecciosa com o segundo maior índice de mortalidade entre crianças hospitalizadas, em torno de 20%, principalmente em crianças com idade inferior a um ano e recém-nascidos (Pappas et al., 2018). Nos Estados Unidos da América (EUA), a mortalidade geral é estimada em 29% e na Espanha é de 31%. No entanto, a mortalidade pode ser muito maior em outros locais, como no Brasil, onde já foi indicado um índice local de mortalidade de até 54% (Lamothe et al., 2018).

Nos casos atribuídos à candidemia, o custo estimado por paciente é de aproximadamente US \$ 40.000, levando em consideração a utilização de recursos e o tempo de internação hospitalar (Pappas et al., 2018). Algumas características ou condições médicas subjacentes, além de fatores de risco para desenvolvimento da infecção, são fatores associados ao desfecho de fatalidade, como o aumento da idade, o uso de agentes imunossupressores, disfunção renal preexistente, retenção de dispositivo médico, bem como o tratamento antifúngico e a espécie de *Candida* (exemplo: *C. parapsilosis* é menos virulenta que as demais e geralmente associada a menor mortalidade) (Pappas et al., 2018).

A maioria das infecções invasivas por *Candida* spp. é causada por cinco espécies: *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*, que, juntas, são responsáveis por mais de 90% de todos os casos de candidemia, tanto em pacientes adultos como pediátricos (Mantadakis et al., 2018; Pappas et al., 2018). Até a década de 1990, *C. albicans* era responsável quase que majoritariamente pelos casos de candidemia. Desde então, uma mudança mundial vem sendo observada (Mantadakis et al., 2018). Globalmente, *C. albicans* é o patógeno mais comum e problemático na maioria das situações clínicas, mas espécies de *Candida* não-*albicans* (CNA), coletivamente, podem representar mais de 50% dos casos de candidemia em algumas regiões geográficas (Silva et al., 2017; Lamothe et al., 2018; Pappas et al., 2018).

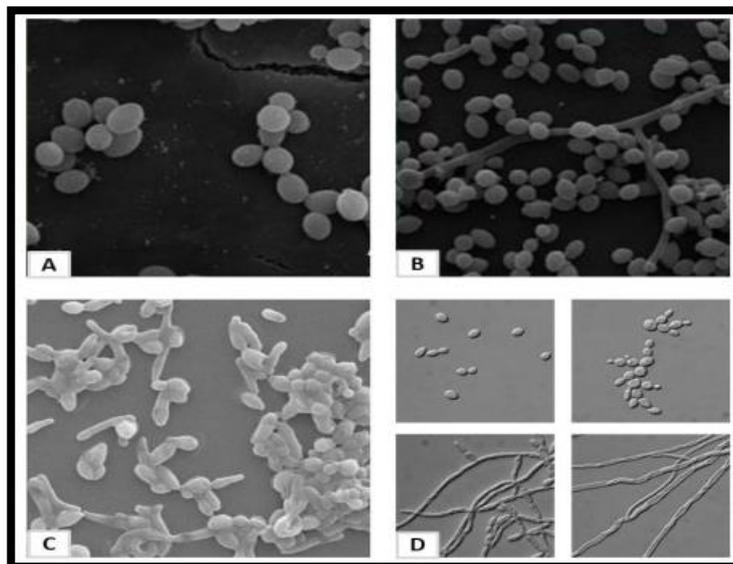
Assim como as taxas de candidemia, a distribuição geral das espécies está relacionada com a localização geográfica e com a população de pacientes. Geralmente é determinado por fatores como padrões de uso antifúngico, fatores individuais de risco do paciente e surtos clonais (Lamoth et al., 2018; Pappas et al., 2018). Dessa forma, o aumento na prevalência de CNA está relacionado ao aumento da exposição aos azóis, bem como pode ser um reflexo do nível inerentemente maior de resistência a certos antifúngicos em comparação com *C. albicans*, bem como as melhorias em métodos diagnósticos (Silva et al., 2012; Lamoth et al., 2018; Mantadakis et al., 2018). Este fenômeno também está, paralelamente, relacionado aos avanços médicos, onde há crescente número de pacientes gravemente enfermos que têm melhores perspectivas de sobrevivência (Bujdaková, 2016).

Nos Estados Unidos, a segunda espécie mais comum é geralmente *C. glabrata*, podendo atingir até um terço ou mais de todos os isolados de candidemia, assim como no noroeste da Europa e Austrália. Já na América Latina, sul da Europa, Índia, Paquistão, África do Sul e alguns países da Ásia, *C. parapsilosis* e/ou *C. tropicalis* são mais frequentemente encontrados depois da *C. albicans*. *C. krusei* é o menos comum das cinco principais *Candida* spp. (Silva et al., 2012; Lamoth et al., 2018; Pappas et al., 2018). Em várias regiões do mundo, um microrganismo, anteriormente desconhecido, *Candida auris*, vem emergindo como um patógeno muito importante (Lamoth et al., 2018; Pappas et al., 2018).

#### **3.1.1.1. *Candida albicans***

*C. albicans* encontra-se entre as principais espécies fúngicas patogênicas oportunistas, a terceira causa mais comum de infecções nosocomiais e o agente etiológico mais comum em infecções fúngicas relacionadas ao biofilme (Ramage et al., 2012; Cui et al., 2015). No mundo ocorrem, anualmente, mais de 400.000 infecções invasivas graves por esta espécie, com alta taxa de mortalidade relacionada, podendo chegar a 40% (Cui et al., 2015; De Cremer et al., 2015). Fatores de riscos mais associados a *C. albicans* são imunocomprometimento, transplantes, cirurgias, quimioterapia e uso dispositivos médicos implantáveis (Cui et al., 2015). São microrganismos verdadeiramente polimórficos, possuem a capacidade de formar hifas e/ou pseudo-hifas e também apresentam blastoconídios

(4-6  $\mu\text{m}$ ) (**Figura 1**), são também referidas como positivas para o tubo germinativo (característica de diagnóstico) (Silva et al., 2012).



**Figura 1.** Micromorfologia de *C. albicans* (Fonte: **A-B:** Filho, J. R. N. C. Dissertação, 2014; **C:** Ferreira et al., 2010; **D:** Watanabe et al., 2006).

Esta espécie possui um amplo espectro de fatores de virulência que são parte integrante de sua capacidade de causar infecções oportunistas em níveis superficiais e sistêmicos (Lu et al., 2014; Fuentefria et al., 2017). A espécie secreta enzimas hidrolíticas, tais como proteases, lipases, fosfolipases e hidrolases, que são importantes no processo de colonização, invasão de tecidos e danos a órgãos (De Cremer et al., 2015; Fuentefria et al., 2017; Pappas et al., 2018). A troca fenotípica (tipo conjugante sexuado, fenômeno de switching, entre outras alterações, envolve a morfologia da colônia) e formação de biofilme são fatores muito importantes (De Cremer et al., 2015). A plasticidade morfológica, ou seja, transição entre leveduras, pseudo-hifas e hifas é considerada essencial para a patogenicidade, além ser um indicativo de mudança do comensalismo para a forma patogênica (Lu et al., 2014; Sakita et al., 2017). Grande parte destas características de virulência pode ser utilizada no desenvolvimento de vacinas e agentes antifúngicos, pois representam alvos promissores (Pappas et al., 2018).

### 3.1.1.2. *Candida glabrata*

*C. glabrata* não é polimórfica, crescendo apenas como blastoconídios (1-4  $\mu\text{m}$ ), como uma causa emergente e importante de candidíase invasiva, demonstra

que essa transição morfogênica não é necessária para a virulência da espécie (Silva et al., 2012; Pappas et al., 2018). Foi, durante anos, considerada saprófita da microbiota normal e de baixa capacidade patogênica (Silva et al., 2012). No entanto, sua incidência vem aumentando, como nos EUA onde é a segunda espécie de *Candida* mais prevalente no ambiente clínico, bem como vem apresentando uma taxa crescente de isolamento no Brasil e na América Latina (Silva et al., 2012; Lockart, 2014).

Comumente relacionada à idade avançada, dessa forma, sua incidência é maior em pacientes idosos (Silva et al., 2012; González-Lara et al., 2017 A; Treviño-Rangel et al., 2017; Mantadakis et al., 2018). Contudo, fatores que também estão associados são fatores geográficos e comorbidades subjacentes de pacientes, como câncer, receptores de transplante de órgãos sólidos e de células-tronco hematopoéticas (González-Lara et al., 2017 A; Mantadakis et al., 2018; Pappas et al., 2018). De acordo com um inquérito da Confederação Europeia de Micologia Médica, os índices de mortalidade associados a *C. glabrata* estão em torno de 14% (Silva et al., 2012).

Característica importante da espécie, *C. glabrata* tem suscetibilidade reduzida intrínseca ao fluconazol, com frequência evoluindo para resistência de alto nível, muitas vezes devido à terapia e profilaxia com este agente antifúngico (Silva et al., 2012; Chang et al., 2017 A). Novos triazóis, como voriconazol e posaconazol são ativos contra essa espécie, embora tenha sido observada resistência cruzada com o fluconazol, com aumento cada vez mais constante (Silva et al., 2012; Kathiravan et al., 2012; Chang et al., 2017 A). Como alternativa tem-se o uso de equinocandinas, no entanto, o recente surgimento de resistência à esta classe é particularmente preocupante. Não obstante, isolados resistentes a ambas as classes de antifúngicos têm sido descritos (Lockart, 2014; Chang et al., 2017 A; Chang et al., 2017 B).

### **3.1.1.3. *Candida parapsilosis***

*C. parapsilosis* não produz hifas, mas pode formar pseudo-hifas, caracteristicamente grandes e curvadas, bem como blastoconídios (2,5-4 µm). A espécie está intimamente relacionada a pacientes pediátricos, principalmente recém-nascidos e prematuros, em pacientes com uso de cateteres e pacientes que recebem nutrição parenteral (Silva et al., 2012; Treviño-Rangel et al., 2017;

Mantadakis et al., 2018). Possui alta capacidade de formação de biofilme nestes dispositivos, devido à composição da nutrição parenteral e sua capacidade de crescimento seletivo em soluções de hiperalimentação. Além da alta capacidade de colonizar dispositivos intravasculares e materiais protéticos, cateter venoso central ou dispositivos de demora (Silva et al., 2012; Bujdáková, 2016; González-Lara et al., 2017 A; Cavalheiro e Teixeira, 2018).

Além disso, na última década, sua incidência em infecções aumentou drasticamente, frequentemente a segunda espécie de *Candida* mais isolada em hemoculturas (Silva et al., 2012). Um dos fungos mais frequentemente isolados de mãos humanas e de locais do corpo de pacientes hospitalizados que normalmente são estéreis. Dessa forma, mais comumente associada à transmissão nosocomial, transferidas de forma vertical aos pacientes, por meio das mãos de profissionais de saúde ou material contaminado, que podem causar surtos (Silva et al., 2012; Cavalheiro e Teixeira, 2018; Pappas et al., 2018).

Segundo a Confederação Europeia de Micologia Médica, a taxa de mortalidade associada às infecções por *C. parapsilosis* varia de 4% a 14%, no entanto, em recém-nascidos, principalmente prematuros, pode chegar a uma taxa de mortalidade semelhante à de *C. albicans* (até 40%) (Silva et al., 2012; Cui et al., 2015). Apesar de demonstrar pouca capacidade invasiva dos tecidos, pode induzir danos significativos (Silva et al., 2012)..

Seu perfil de suscetibilidade representa um fator de grande preocupação, uma vez que a espécie demonstra ser menos suscetível às equinocandinas (Arendrup, 2013).

#### **3.1.1.4. *Candida tropicalis***

*C. tropicalis* forma hifas, pseudo-hifas e blastoconídios (4-8 µm). Associada à candidemia em pacientes com idade avançada internados em UTIs, pacientes com comorbidades respiratórias e com maior potencial de disseminação em indivíduos neutropênicos, mas importante associada a pacientes com neoplasias hematológicas (Silva et al., 2012; Fernández-Ruiz et al., 2014; González-Lara et al., 2017 A; Mantadakis et al., 2018). Sendo particularmente relevante em casos de infecções do trato urinário (Cavalheiro e Teixeira, 2018).

No Brasil, *C. tropicalis* foi a segunda espécie de *Candida* mais prevalente, respondendo de 33% a 48% dos casos de candidemia. Segundo dados da Confederação Europeia de Micologia Médica a taxa de mortalidade associada às infecções por *C. tropicalis* é em torno de 7% (Silva et al., 2012).

A patogenicidade das infecções por *C. tropicalis* está relacionada a fatores de virulência, como a secreção de enzimas tais como coagulase, proteinase e principalmente fosfolipase, além da secreção de hemolisina, produção de biofilmes e transição morfológica (produção de hifas e pseudo-hifas) (Deorukhkar et al., 2014). As proteinases, por exemplo, desempenham importante papel na penetração de tecidos do hospedeiro e evasão de macrófagos (Silva et al., 2012).

*C. tropicalis* é normalmente suscetível a todos os antifúngicos utilizados para fungemia, no entanto, resistência aos azóis foram relatadas, bem como relatos esparsos de resistência a anfotericina B (Arendrup, 2013; Deorukhkar et al., 2014; Zuza-Alves et al., 2016).

#### **3.1.1.5. *Candida krusei***

*C. krusei* é usualmente encontrada em duas formas morfológicas básicas: balstoconídio, geralmente alongadas, e pseudo-hifa (Samaranayake e Samaranayake, 1994). É, evidentemente, menos virulenta, mas apesar de possuir capacidade de formar biofilme demonstra menor invasividade em relação a *C. albicans* ou *C. tropicalis* e, *in vitro*, demonstrou menor adesão que *C. albicans* e demais *Candida* não-*albicans*. Além disso, não possui a capacidade de produzir fosfolipases e proteinases (Samaranayake e Samaranayake, 1994).

A espécie possui considerável diversidade geográfica e é clinicamente importante, sendo isolada de uma grande variedade de habitats. A princípio relatada como um isolado com pouca relevância clínica, no entanto, vem emergindo como importante patógeno (Samaranayake e Samaranayake, 1994; Pfaller et al., 2007).

Este microrganismo está associado com idade avançada, cirurgia e é mais comumente encontrado em pacientes com malignidades hematológicas com exposição prévia ao fluconazol (Pappas et al., 2018).

Quanto ao seu perfil de suscetibilidade, possui conhecida resistência intrínseca ao fluconazol e exibe suscetibilidade diminuída à anfotericina B e flucitosina (Pfaller et al., 2007; Kathiravan et al., 2012; Chang et al., 2017 A). Novos

triazóis, como voriconazol e posaconazol e as equinocandinas, de modo geral, são ativos. Contudo, relatos de variável atividade do voriconazol e de resistência adquirida às equinocandinas são encontrados, o que torna o tratamento das infecções relacionadas a esta espécie extremamente delicado e difícil (Pfaller et al., 2007; Kathiravan et al., 2012).

### **3.1.1.6. *Candida auris***

Descoberta pela primeira vez no Japão em 2009, houve um surgimento simultâneo de *C. auris* em diferentes localizações geográficas: leste asiático, sul-asiáticos, sul-americanos e sul-africanos. Cabe ressaltar também que já foi encontrada nos cinco continentes e tem recebido considerável atenção (Kean et al., 2018; Lamoth et al., 2018). Filogeneticamente, é semelhante a *C. lusitaniae* e *C. haemulonii*, mas há diferenças notáveis em comparação com outras espécies do gênero (Kean et al., 2018).

Colonizador predominantemente da pele, porém com perfil de resistência, dificuldade para identificação precisa e capacidade de contaminar fortemente o ambiente hospitalar, bem como persistir com sucesso em plásticos e aço por períodos prolongados, tem sido responsável por vários surtos em curso (Kean et al., 2018; Lamoth et al., 2018; Pappas et al., 2018).

Além do mais, *C. auris* é frequentemente resistente aos fármacos antifúngicos e o recente surgimento de isolados multirresistentes em surtos nosocomiais é preocupante e representa uma grave ameaça, devido as suas características (Lamoth et al., 2018; Pappas et al., 2018). A estimativa futura é de que esta espécie tenha uma forte influência no quadro de candidemias e, devido a isso, ocorrerão mudanças nas recomendações de tratamento atuais (Lamoth et al., 2018; Pappas et al., 2018).

A espécie é altamente virulenta, comparável com *C. albicans*. É capaz de formar biofilmes, que demonstram um perfil de suscetibilidade altamente resistente a todas as classes de antifúngicos, inclusive equinocandinas e polienos (Kean et al., 2018). Além disso, é um microrganismo de difícil remoção dos ambientes, uma vez que estudos relativos a isso demonstraram resultados variáveis, mas que constataram a necessidade de um grande esforço para eliminar com sucesso o microrganismo (Kean et al., 2018).

### 3.2. Fatores de virulência

Fatores de virulência são características fundamentais no estabelecimento da doença, no entanto, usualmente considerados não cruciais na sobrevivência *in vitro* dos microrganismos. Dessa forma, a transição entre comensalismo e oportunismo está diretamente ligada a estes fatores de virulência, além de estarem associados a uma redução da suscetibilidade (Cui et al., 2015; Bujdáková, 2016; Silva et al., 2017).

A versatilidade de adaptação e os fatores de virulência, como a aderência e a formação de biofilme, secreção de enzimas hidrolíticas (como lipases, proteases, fosfolipases e hemolisinas) e as alterações morfológicas, medeiam a patogenicidade da infecção, ou seja, a capacidade do microrganismo infectar (Silva et al., 2012; Cui et al., 2015; Sakita et al., 2017; Silva et al., 2017). Apesar de escassos estudos acerca destes fatores de virulência em espécies de *Candida* não-*albicans*, ainda assim é possível dividi-los em três grupos, de acordo com o potencial patogênico decrescente, baseado na sua virulência: I) *C. albicans* e *C. tropicalis*; II) *C. glabrata*, *C. lusitaniae* e *C. kefyr* e III) *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii* (Silva et al., 2012; Arendrup, 2013).

A aderência do microrganismo é o passo inicial na colonização e contribui para a persistência no hospedeiro, essencial para o subsequente estabelecimento do processo infeccioso. A aderência com posterior invasão possibilita a disseminação para a corrente sanguínea. Essa adesão se dá no tecido do hospedeiro, mas também pode ocorrer nas superfícies de dispositivos médicos e, dessa forma, ocorrer o desenvolvimento de biofilmes (Silva et al., 2012; Sakita et al., 2017; Pappas et al., 2018).

A secreção de proteínas hidrolíticas faz parte do processo inicial do estabelecimento da doença, uma vez que facilitam a destruição de tecidos do hospedeiro, com posterior invasão destes tecidos pelo microrganismo. As enzimas mais comumente relatadas são proteinases, fosfolipases, lipases e hemolisinas, sendo as proteinases as mais estudadas (Silva et al., 2012; Kean et al., 2018). Proteinases estão relacionadas à ruptura de membranas mucosas e degradação de proteínas imunológicas de defesa e estruturais, o que facilita a invasão e colonização dos tecidos (Silva et al., 2012; Kean et al., 2018). Já as fosfolipases, que hidrolisam fosfolípidios, estão associadas ao dano na membrana das células do

hospedeiro, facilitando a adesão e colonização. Enquanto as hemolisinas liberam o ferro da hemoglobina, através da degradação desta, o que é essencial para a sobrevivência e persistência do patógeno (Silva et al., 2012).

A transição morfológica, como a formação de hifas, desempenha uma importante função durante o processo de infecção, promovendo adesão, invasão e penetração tecidual e evasão do sistema imunológico. A evasão imune ocorre devido à composição e ao fato de que em diferentes morfologias, diferentes componentes superficiais são expostos, o que dificulta sua detecção e também evita que sejam englobadas por macrófagos e neutrófilos (Lu et al., 2014; Pappas et al., 2018). Além disso, a capacidade adesiva das hifas lhes permite formar biofilmes altamente entrelaçados (Lagree et al., 2018).

### **3.2.1. Biofilmes**

Antonie van Leeuwenhoek, na Royal Society de Londres, em 1683, escreveu o primeiro relatório científico documentando sobre um biofilme (Silva et al., 2017). Na natureza, os microrganismos encontram-se, basicamente, em duas formas de crescimento: planctônico e biofilme, este último representa cerca de 80%, pois proporciona vantagens de sobrevivência, principalmente sob fortes condições adversas (Iñigo et al., 2012; Cavalheiro e Teixeira, 2018).

O biofilme é descrito como uma comunidade altamente estruturada, coordenada e funcional de células aderentes à superfície e associadas umas as outras (com propriedades distintas das respectivas células planctônicas), que são embebidas em uma matriz extracelular protetora autoproduzida, resultando em um extraordinário grau de organização (Ramage et al., 2012; Silva et al., 2017). São responsáveis, direta ou indiretamente, por aproximadamente 80% das infecções microbianas em seres humanos e estão relacionados à maioria das infecções por *Candida* spp. (Ramage et al., 2012; De Cremer et al., 2015; Lohse et al., 2017; Silva et al., 2017). Estes biofilmes são formados por microrganismos provenientes da microbiota normal do indivíduo ou do ambiente (Seghir et al., 2017).

Ao longo dos anos, inúmeras espécies já demonstraram capacidade de formação de biofilmes: *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, dermatófitos (como *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*), *Aspergillus fumigatus*, bem como fungos do gênero *Fusarium* (Costa-Orlandi et al., 2017;

Fuentefria et al., 2017; Kernien et al., 2018). No entanto, *C. albicans*, seguido por *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e/ou *C. tropicalis*, são as espécies mais relacionadas a este tipo de infecção (Bujdáková, 2016; Girardot e Imbert, 2016; Fuentefria et al., 2017).

Dentro do cenário dos biofilmes, *Candida* spp. são as leveduras mais estudadas. Podem ocorrer principalmente na mucosa ou no endotélio, envolvidos em infecções mais comuns e recorrentes, como no trato urinário, candidíase vulvovaginal e oral, e em infecções menos habituais, como aquelas de feridas crônicas, incluindo úlceras de pressão, úlceras do pé diabético, feridas cirúrgicas sem cicatrização e úlceras venosas (Ramage et al., 2014; Costa-Orlandi et al., 2017; Cavalheiro e Teixeira, 2018). Contudo, o gênero é muito associado a dispositivos médicos, como cateteres e próteses (Cavalheiro e Teixeira, 2018).

O papel significativo dos biofilmes dentro do ambiente hospitalar é evidenciado através das taxas de mortalidade, tempo de permanência e custos, que são significativamente maiores em pacientes com candidemia por isolados formadores de biofilme quando comparados a infecções por isolados não formadores de biofilme (Ramage et al., 2014; De Cremer et al., 2015). Além disso, as infecções por biofilme representam um grave problema de saúde pública, com um impacto econômico elevado. Nos EUA, estima-se que estas infecções causem, anualmente, cerca de 100.000 mortes, enquanto os gastos com o tratamento podem chegar a US \$ 6.5 bilhões por ano (Silva et al., 2017).

O combate a estas infecções associadas a biofilmes é uma necessidade urgente e atual, mas para isso, é preciso conhecer os processos envolvidos na sua formação e manutenção. Começando pelo seu desenvolvimento, que pode ser dividido em quatro etapas gerais:

**Fase inicial ou de aderência:** o período correspondente a esta fase, *in vitro*, é de 0-11 horas, enquanto *in vivo* pode corresponder a até 8 horas (Chandra et al., 2015; Cavalheiro e Teixeira, 2018). A adesão inicial de células de levedura a uma superfície, tecido do hospedeiro ou biomaterial, é um processo mediado por várias proteínas da parede celular, as adesinas (conforme ilustrado pela **Figura 2**). A adesão se dá através de interações químicas com moléculas dessas superfícies, ligação a outras células, tanto epiteliais como microbianas, ou a superfícies abióticas, por ligação a aminoácidos específicos ou resíduos de açúcar (Bouza et al., 2015; Bujdáková, 2016; Costa-Orlandi et al., 2017; Cavalheiro e Teixeira, 2018).

Diferentes da maioria das superfícies inertes com as quais interagem, as superfícies das células microbianas são quimicamente e estruturalmente mais complexas e heterogêneas, como as diferenças no caráter ácido-base, que originam diferenças de hidrofobicidade superficiais entre linhagens. Dessa forma, a abordagem das propriedades físico-químicas nas interações adesivas microbianas torna-se bastante complexa, uma vez que não se pode generalizar essas propriedades (Van der Mei 1998; Bos et al., 1999). Mudanças na superfície celular, como a formação de tubos germinativos, têm sido associadas à heterogeneidade na hidrofobicidade (Samaranayake et al., 1995).

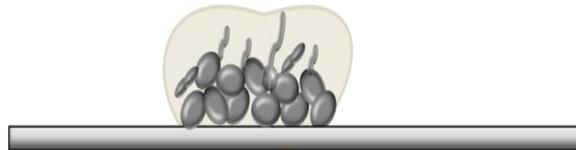
No caso de dispositivos médicos, em contato direto com a corrente sanguínea, ocorre um revestimento da superfície deste material com componentes sanguíneos, que irão atuar de forma condicionante, ou seja, fornecem ligantes específicos ao microrganismo, mais especificamente, para as proteínas adesinas (Yousif et al., 2014). Este processo inicial é fortemente influenciado por interações hidrofóbicas, interações eletrostáticas de Lifshitz-Van der Waals e seu decaimento com a distância de separação entre a parede celular fúngica e a superfície sobre a qual o microrganismo está se aderindo, frequentemente condicionado pelo meio ao qual está exposto e condições relacionadas a ele (Nikawa et al., 1989; Bos et al., 1999; Yousif et al., 2014).

A hidrofobicidade de superfície celular de leveduras e aderência às células epiteliais possui significativa correlação positiva, contudo, a hierarquia relativa de sua virulência é determinada por um conjunto de atributos virulentos (como hifas e enzimas extracelulares), que agem simultaneamente com essa hidrofobicidade (Samaranayake et al., 1995). Esta etapa inicial é seguida pela formação de uma colônia discreta (Cavalheiro e Teixeira, 2018).



**Figura 2.** Adesão de células planctônicas a uma superfície (Fonte: Elaborada pelo autor).

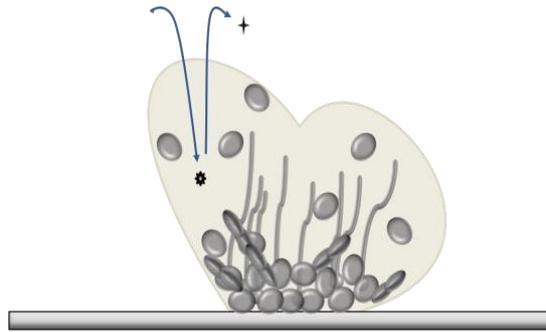
**Fase intermediária ou proliferação:** *in vitro*, o período correspondente a esta fase é de ~12-30 horas (Chandra et al., 2015; Cavalheiro e Teixeira, 2018). Esta fase é caracterizada pela formação de camadas de estruturas fúngicas, de acordo com a espécie, além da matriz extracelular (como demonstrado na **Figura 3**) (Cavalheiro e Teixeira, 2018).



**Figura 3.** Proliferação celular e formação de matriz extracelular (Fonte: Elaborada pelo autor).

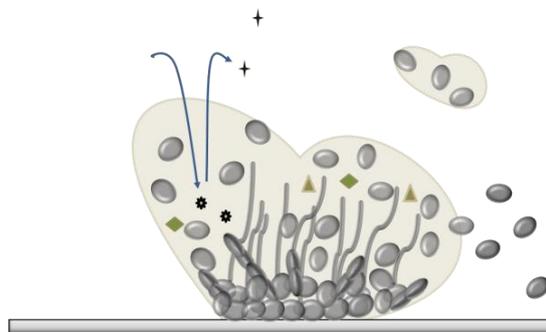
As células aderidas à superfície proliferam e, posteriormente, formam-se pseudo-hifas e hifas. Este processo continua, com a formação de camadas basais e matriz extracelular, gerando uma estrutura tridimensional, a qual está intimamente relacionada às condições sob as quais ocorre (como a superfície de adesão), até a conclusão da formação do biofilme (Bouza et al., 2015; Bujdáková, 2016; Costa-Orlandi et al., 2017; Lohse et al., 2017). Cabe-se ressaltar que substâncias poliméricas extracelulares são produzidas e secretadas após a organização das células, formando uma matriz extracelular composta de polissacarídeos, carboidratos, proteínas, DNA e produção de moléculas de sinalização (Bujdáková, 2016; Cavalheiro e Teixeira, 2018).

**Fase final ou maturação:** o período correspondente a esta fase, *in vitro*, é de ~24-72 horas, enquanto *in vivo* este período corresponde a ~38/48-72 horas (Chandra et al., 2015; Cavalheiro e Teixeira, 2018). O biofilme já contendo uma estrutura tridimensional, com camadas celulares circundadas por matriz extracelular, então entra em um processo de maturação onde a organização final para manutenção da estrutura é desenvolvida. Ocorre o espessamento da matriz extracelular (formando uma rede densa), canais de água (troca de nutrientes) e desenvolvimento do sistema quórum-sensing da estrutura (Iñigo et al., 2012; Costa-Orlandi et al., 2017; Lohse et al., 2017; Cavalheiro e Teixeira, 2018). Dessa forma, o biofilme maduro possui uma estrutura complexa, com camadas distintas: células leveduriformes a partir da superfície, com hifas e pseudo-hifas estendendo-se no sentido externo, resumidamente, estruturas tridimensionais altamente diferenciadas (conforme demonstrado na **Figura 4**) (Yousif et al., 2014; Lohse et al., 2017).



**Figura 4.** Biofilme formado maduro, com espessamento da matriz extracelular, maior diferenciação celular e sistema quórum-sensing desenvolvido (Fonte: Elaborada pelo autor).

**Fase de dispersão:** já ocorre ao longo da formação do biofilme, no entanto, o auge da dispersão celular ocorre nos biofilmes maduros, que liberam células leveduriformes não aderentes, propagando a infecção (**Figura 5**) (Iñigo et al., 2012; Lohse et al., 2017; Cavalheiro e Teixeira, 2018). Neste estágio final de desenvolvimento as células dispersas irão alocar-se em novos locais e iniciar outro biofilme (Yousif et al., 2014).



**Figura 5.** Biofilme em fase de dispersão, liberando células que poderão aderir-se a outras superfícies e formar novos biofilmes, dando continuidade ao ciclo (Fonte: Elaborada pelo autor).

A formação de biofilme é influenciada por diversas variáveis relacionadas ao hospedeiro, à espécie de *Candida* e a fatores ambientais. O fluxo do meio circundante (urina, sangue, saliva e muco), o pH, a temperatura, disponibilidade de oxigênio e condições nutricionais do meio, além das condições imunológicas do hospedeiro, alteram a formação e arquitetura do biofilme e, possivelmente, a suscetibilidade antifúngica (Ramage et al., 2012; Chandra et al., 2015; Costa-Orlandi et al., 2017). Abaixo, alguns dos fatores mais importantes:

**Condições de fluxo:** os biofilmes podem formar-se sob diferentes condições de fluxo ou mesmo em condições estáticas. No entanto, modulam a troca de nutrientes com o meio e a integridade da estrutura como um todo. Além de influenciar na produção da matriz extracelular, uma vez que esta aumenta significativamente sob condições de fluxo dinâmico, o que, por consequência, reflete em uma suscetibilidade antifúngica diminuída (Chandra et al., 2015; Costa-Orlandi et al., 2017; Silva et al., 2017; Cavalheiro e Teixeira, 2018).

**Substrato:** o crescimento do biofilme se dá aderido a uma superfície, biótica ou abiótica, podendo variar de mucosas, pele a dispositivos médicos, de composições variadas (De Cremer et al., 2015; Hernández-Chávez et al., 2017; Silva et al., 2017). Assim como o perfil das adesinas possuem influência sobre a adesão, outros fatores também são implicados neste processo, tais como interações físico-químicas das células fúngicas com o substrato, a hidrofobicidade da superfície celular (reconhecidamente um fator crítico no processo) e a hidrofobicidade, condições de topografia, carga superficial e configuração das superfícies (substratos) (Silva et al., 2012; Yousif et al., 2014; Costa-Orlandi et al., 2017).

Os diferentes substratos possuem enorme influência na arquitetura, morfologia e espessura do biofilme formado, o que destaca a importância de selecionar os biomateriais a serem utilizados de acordo com as necessidades relacionadas a cada situação (Chandra et al., 2015; Cavalheiro e Teixeira, 2018). Cateteres de látex ou elastômero de silicone demonstraram propiciar maior formação de biofilme, além de diferenças na composição morfológica, quando comparados com cloreto de polivinila, poliuretano e silicone (Chandra et al., 2015; Cavalheiro e Teixeira, 2018). Assim, dispositivos médicos vêm sendo cuidadosamente projetados e escolhidos para resistir à adesão dos microrganismos (Costa-Orlandi et al., 2017).

**Condições nutricionais:** a disponibilidade de carboidratos, lipídios, soro, proteínas e íons metálicos são determinantes cruciais da capacidade de formação do biofilme e impactam em suas características morfológicas e de arquitetura (Chandra et al., 2015; Costa-Orlandi et al., 2017).

**Variabilidade de espécies:** a formação de biofilme é variável entre as espécies de *Candida*, diferenças em termos de capacidade de formação, morfologia, arquitetura, propriedades de adesão, características referentes à matriz extracelular

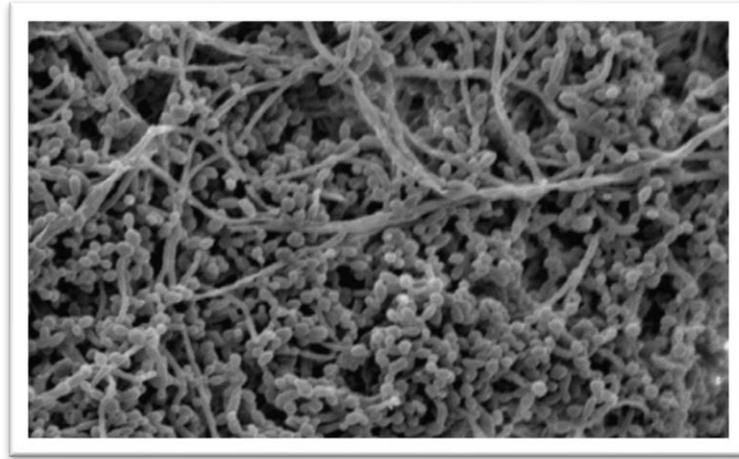
e perfil de suscetibilidade antifúngica, exibindo comportamentos patogênicos distintos (Chandra et al., 2015; De Cremer et al., 2015; Cavalheiro e Teixeira, 2018).

O biofilme é usualmente composto por 10-25% de células e 75-90% de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). A EPS geralmente contém polissacarídeos (em torno de 40%), proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e outras substâncias poliméricas, além de outras moléculas que podem interagir entre si e com a superfície celular fúngica, formando uma rede robusta e protetora, hidratadas a 85-95% de água (Yousif et al., 2014; Costa-Orlandi et al., 2017; Cavalheiro e Teixeira, 2018).

Em geral, *C. albicans* produz biofilmes quantitativamente maiores e qualitativamente mais complexos do que as demais espécies (Chandra et al., 2015). Contudo, é de grande interesse salientar que *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* também são formadoras de biofilme, no entanto mais lentos em comparação com *C. albicans* (Bujdáková, 2016).

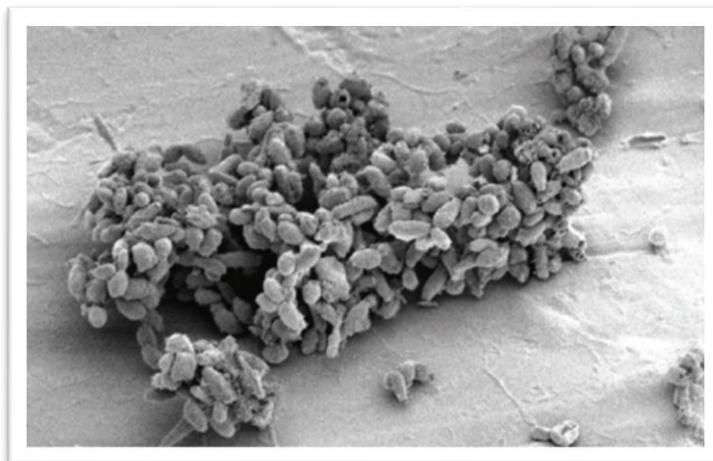
*C. albicans* é considerado o maior produtor de biofilme entre as espécies de *Candida*, com uma estrutura mais concentrada (Cavalheiro e Teixeira, 2018). A formação de biofilme por esta espécie está associada à sua plasticidade morfológica, exibindo diversidade morfológica: brotação, hifas, pseudo-hifas e células leveduriformes, com uma estrutura genérica composta por uma camada basal fina de levedura, responsável pela retenção do biofilme na superfície, e uma camada mais espessa contendo as hifas (assim como demonstrado na **Figura 6**) (Silva et al., 2017; Cavalheiro e Teixeira, 2018). Esta camada mais externa fornece uma armação para as células e a matriz extracelular, resultando em uma estrutura resiliente, que torna o biofilme mais consistente, refletindo em aumento da resistência antifúngica (Bujdáková, 2016; Lohse et al., 2017).

Em relação à composição da matriz extracelular de biofilmes de *C. albicans*: 55% de proteínas e suas contrapartes glicosiladas, 25% de carboidratos (em grande parte, polissacarídeos de  $\alpha$ -manana e  $\beta$ -1,6-glucano e, em menor extensão,  $\beta$ -1,3-glucano), 15% de lipídios e 5% de ácidos nucleicos, bem como fósforo e ácido urônico em pequenas quantidades (De Cremer et al., 2015; Lohse et al., 2017; Silva et al., 2017; Cavalheiro e Teixeira, 2018). Dentre os lipídeos identificados, grande parte foram glicerolipídios neutros, glicerolipídeos polares e esfingolipídios (De Cremer et al., 2015; Cavalheiro e Teixeira, 2018).



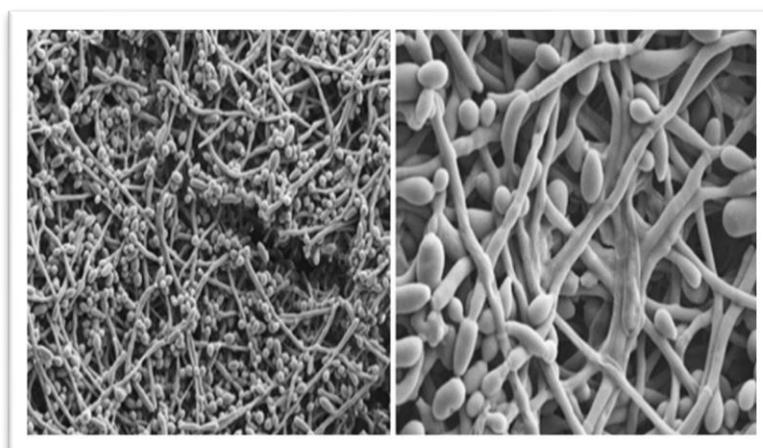
**Figura 6.** Biofilme de *C. albicans* em 48 horas de crescimento em discos de poliestireno, compostos por blastoconídios, pseudo-hifas e hifas (Fonte: Rasteiro et al., 2014).

*C. parapsilosis* não forma hifas, dessa forma, o biofilme é menos robusto, composto geralmente por aglomerados de células leveduriformes aderidas à superfície e pseudo-hifas, em menor quantidade que *C. albicans*, na forma de agregados compactos e em multicamada, com pequena quantidade de matriz extracelular (Bujdáková, 2016; Costa-Orlandi et al., 2017; Cavalheiro e Teixeira, 2018). Dessa forma, biofilmes formados por esta espécie tendem a ser menos espessos e estruturados, consistindo basicamente por esses agregados (conforme se observa na **Figura 7**) (Silva et al., 2017). A matriz extracelular destes biofilmes é composta predominantemente por carboidratos, com baixas quantidades de proteínas (Silva et al., 2012; Silva et al., 2017; Cavalheiro e Teixeira, 2018; Kean et al., 2018).



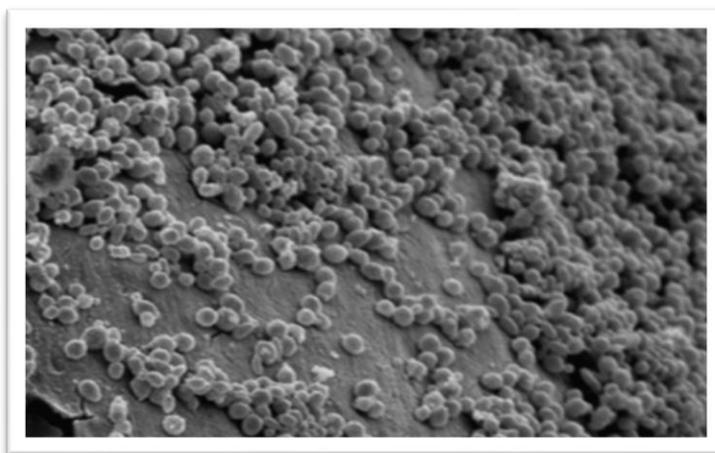
**Figura 7.** Biofilme formado por *C. parapsilosis*, formado em sua maioria por agregados de blastoconídios, com presença de pseudohifas (Fonte: Costa et al., 2018).

*C. tropicalis* apresenta estrutura de biofilmes muito variável, em geral composta principalmente por células leveduriformes. Contudo, podem formar biofilmes com uma densa rede de células leveduriformes em monocamada descontínua, que se encontram aderidas à superfície, pseudo-hifas e hifas (conforme demonstrado na **Figura 8**) (Silva et al., 2017; Cavalheiro e Teixeira, 2018). No entanto, aderem-se mais firmemente à superfície do que aqueles formados por *C. albicans* (Cavalheiro e Teixeira, 2018). *C. tropicalis* apresenta razoável produção de matriz extracelular, sendo esta composta por baixo teor de carboidratos e proteínas, além de quantidades pequenas de fósforo e ácido urônico (Silva et al., 2017; Cavalheiro e Teixeira, 2018; Kean et al., 2018).



**Figura 8.** Biofilme de *C. tropicalis* composto por blastoconídios, pseudo-hifas e hifas, formando um estrutura densa (Fonte: Souza et al., 2016).

Biofilmes de *C. glabrata* são compostos exclusivamente por células leveduriformes, estruturadas em multicamadas intimamente compactadas ou em aglomerados de células com alta coesão entre elas (conforme demonstra a **Figura 9**) (Costa-Orlandi et al., 2017; Silva et al., 2017; Cavalheiro e Teixeira, 2018). Possui uma espessura que corresponde a aproximadamente metade da espessura do biofilme formado por *C. albicans* (Cavalheiro e Teixeira, 2018).



**Figura 9.** Biofilme de *C. glabrata*, formado em dispositivo intrauterino, composto apenas por agregados de blastoconídios (Fonte: Zahran et al., 2015).

A matriz extracelular desses biofilmes compõe-se de altos níveis de carboidratos e proteínas (Silva et al., 2017; Cavalheiro e Teixeira, 2018; Kean et al., 2018). Pobres e escassos, os relatos acerca de biofilmes formados por *C. krusei* o indicam com certa semelhança aos formados por *C. glabrata*, com uma estrutura estratificada composta apenas por células leveduriformes agrupadas (Bujdáková, 2016).

**Sistema imunológico:** no caso de algum corpo estranho, mesmo uma resposta tecidual leve altera as defesas imunológicas no local de implantação de dispositivos, como cateteres, com aumento da vulnerabilidade à colonização por microrganismos, mesmo aqueles fracamente virulentos (Arciola et al., 2018). Outra variável associada, positivamente, com o aumento da capacidade de formação de biofilmes por espécies de *Candida* é a presença de interleucina 17A (IL-17A), uma citocina pró-inflamatória, bem como a interação entre leucócitos e células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) com o biofilme. Isso acarreta em inibição de alguns mecanismos de ação destas células sobre o biofilme, o que não é encontrado para células planctônicas (Costa-Orlandi et al., 2017; Hernández-Chávez et al., 2017).

Leveduras do gênero *Candida* podem causar infecções polimicrobianas, com formação de biofilmes mistos, combinações entre espécies de *Candida* ou associadas a bactérias. Estes microrganismos interagem uns com os outros, de maneira a refletir em um impacto na patogênese e na saúde do paciente, uma vez que essas interações polimicrobianas podem ocorrer de maneira sinérgica ou

antagônica (Seghir et al., 2017; Cavalheiro e Teixeira, 2018). Os mecanismos pelo qual essas interações ocorrem são os mais variados. No caso de interações sinérgicas, podem envolver a cooperação metabólica, enquanto as interações antagônicas incluem a competição por nutrientes e a formação de compostos com ação inibitória (Cavalheiro e Teixeira, 2018).

Um exemplo de interação sinérgica bem conhecida é de *Staphylococcus epidermis* e *C. albicans*, que formam um biofilme no qual o primeiro consegue proteção contra vancomicina, já o segundo, contra fluconazol e anfotericina B (Cavalheiro e Teixeira, 2018). Em contraste, *C. albicans* e *Aspergillus nidulans* apresentam interação antagônica, uma vez que a levedura ativa a apoptose em células de *A. nidulans* (Cavalheiro e Teixeira, 2018). De maneira geral, o biofilme de espécies mistas é significativamente mais invasivo, de difícil diagnóstico, bem como a infecção é mais grave e recalcitrante ao tratamento, muitas vezes exigindo estratégias complexas politerapêuticas (Costa-Orlandi et al., 2017; Seghir et al., 2017; Cavalheiro e Teixeira, 2018).

Embora seja difícil o diagnóstico da presença de biofilme e ainda que, no caso de *Candida* spp., possua forte relação com candidemia, alguns fatores devem ser considerados: i) presença de sinais e sintomas clínicos de infecção fúngica; ii) fatores de risco que são predisponentes ao desenvolvimento de biofilme (como dispositivos médicos); iii) evidência que correlacione a infecção com o dispositivo; iv) evidências a nível microscópico (presença de agregados contendo hifas e leveduras); v) histórico recente de infecção recorrente; vi) marcadores imunológicos; vii) recalcitrância da terapia antifúngica (Ramage et al., 2014).

### **3.2.1.1. Dispositivos médicos**

Os biomateriais utilizados na fabricação de próteses (válvulas cardíacas e próteses de joelho), cardioversores-desfibriladores, implantes (cocleares, lentes intraoculares, dentários), tubos endotraqueais, dispositivos cardíacos (como marca-passos), substituições de articulações, hemodiálise e cateteres de diálise peritoneal, implantes mamários, *shunts* neurocirúrgicos, *stents*, próteses vocais, implantes penianos, implantes cirúrgicos de malha da uroginecologia, cateteres urinários e venosos centrais e periféricos, são superfícies adequadas para colonização e posterior formação de biofilmes por espécies de *Candida* (Bujdáková, 2016; Giles et

al., 2018; Arciola et al., 2018; Cavalheiro e Teixeira, 2018). Sobre esses biomateriais, como cateteres, o biofilme tem a capacidade de se desenvolver aderentes intra e extraluminalmente (Ramage et al., 2014).

A situação é ainda mais complicada pelo fato de que, frequentemente levam à falha do dispositivo protético, exigem a substituição do implante e, muitas vezes, causam doença crônica e/ou recidivante. Em casos de dispositivos implantáveis, a detecção geralmente ocorre apenas quando um biofilme infeccioso maduro já está formado, muitas vezes, a única terapia viável compreende a substituição do dispositivo (Giles et al., 2018; Arciola et al., 2018).

A FDA e a Medtech Europe estimam que mais de 500.000 tipos de dispositivos médicos entraram atualmente no mercado, como os dispositivos invasivos – internos e implantáveis. Para que se possa ter uma dimensão do tema, no mundo, cerca de 10 milhões de implantes dentários são realizados anualmente e são implantados mais de um milhão de dispositivos eletrônicos cardiovasculares. Procedimentos de artroplastia de joelho e quadril, só nos EUA, são superiores a 1 milhão por ano (Arciola et al., 2018).

Nos EUA, das infecções associadas aos cuidados de saúde, 25,6% estão associadas a dispositivos (Arciola et al., 2018). Dos casos de candidemia em crianças, cerca de 70% são atribuídos ao uso de cateter vascular, para neonatos a taxa diminui, em torno de 58%, e quando avaliada a população adulta, cai para 44%. Ainda assim, são dados de alto impacto se avaliarmos, por exemplo, que nos EUA, a cada ano, mais de cinco milhões de cateteres venosos centrais são colocados. Apesar das diretrizes orientando sobre boas práticas de segurança clínica, até 50% desses dispositivos apresentam algum tipo de infecção associado a biofilme (Silva et al., 2017; Mantadakis et al., 2018). Transformando esses dados em impacto econômico, a estimativa de custo atribuível é cerca de US \$ 34.508 a US \$ 56.000 por infecção e, anualmente, este custo pode ter um cumulativo que varia de US \$ 296 milhões a US \$ 2,3 bilhões (Yousif et al., 2014). Em infecções do trato urinário relacionadas a cateter e passíveis de serem evitadas, o custo estimado, anualmente, varia entre US \$ 115 milhões a US \$ 1,82 bilhão (Peng et al., 2018).

Implantes e dispositivos médicos de longo prazo ou permanentes, aplicados a pacientes críticos, com função de sustentação da vida ou que atinjam órgãos vitais, são aqueles que apresentam os efeitos adversos mais críticos em

termos de morbidade e mortalidade, embora qualquer dispositivo que tenha contato com a corrente sanguínea apresente potencial em causar sepse (Arciola et al., 2018).

### 3.2.1.2. Abordagens do biofilme em cateter

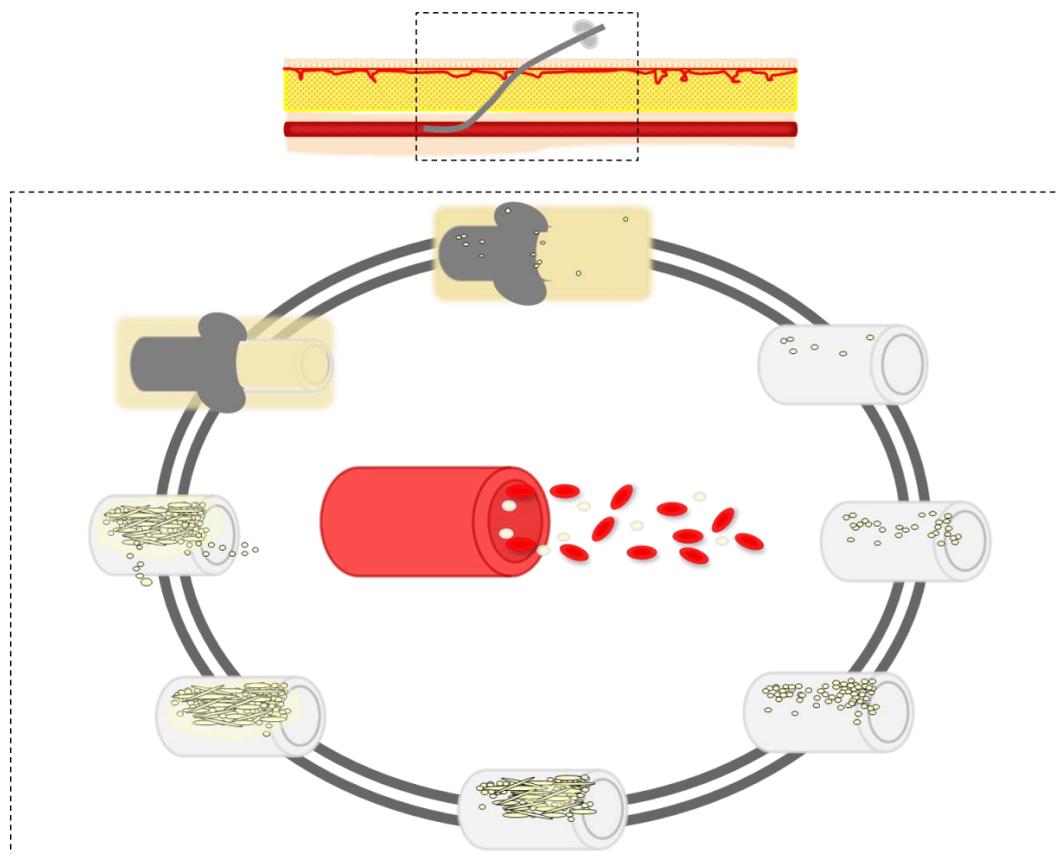
O CDC recomenda algumas diretrizes, baseadas em técnicas assépticas, semelhantes a um guia de “boas práticas clínicas”, no intuito de prevenir a contaminação de cateteres venosos centrais durante seu manuseio (Yousif et al., 2014; Mantadakis et al., 2018). As diretrizes atuais, produzidas pela European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), recomendam a remoção de cateteres infectados, especialmente quando há suspeita de infecção por biofilme. No entanto, nem sempre isso é viável e, atualmente, não há medicamentos específicos aprovados pela FDA nos EUA para este tipo de infecção (Ramage et al., 2014; De Cremer et al., 2015; Girardot e Imbert, 2016).

A abordagem que envolve remoção é problemática no caso de cateteres de demora ou portas de acesso venoso totalmente implantáveis, pois a substituição desses cateteres requer cirurgia e é cara. Além disso, estes pacientes podem não possuir outro acesso vascular disponível, bem como há o risco de complicações iatrogênicas decorrentes do procedimento de remoção (Yousif et al., 2014; Bouza et al., 2015).

O protocolo terapêutico a ser seguido deve ser determinado depois de considerar cuidadosamente os riscos e benefícios da remoção do dispositivo e a terapia antifúngica mais adequada, por meio de uma decisão individualizada (Bouza et al., 2015; Mantadakis et al., 2018). Além disso, a substituição de um cateter em pacientes gravemente debilitados é acompanhada por um risco aumentado de morbidade e mortalidade (Bujdáková, 2016).

O maior problema relacionado a infecções por biofilmes em cateter é a sua formação intraluminalmente, que os torna ainda mais difíceis de tratar, uma vez que as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para biofilmes são drasticamente elevadas e ainda são responsáveis pela liberação de células na corrente sanguínea, que são altamente capazes de construir novos biofilmes (conforme ilustrado na **Figura 10**, onde é mostrado uma das vias de infecção de cateter por biofilme).

Devido a essa dificuldade no tratamento e complicações que apresentam, novas estratégias são propostas (Walraven e Lee, 2012; Bujáková, 2016).



**Figura 10.** O ciclo mais comum de desenvolvimento de infecção por biofilme relacionada a cateter, o local de inserção do cateter como porta de entrada, formação da estrutura do biofilme, maturação da mesma e consequente liberação de células na corrente sanguínea do hospedeiro (Fonte: Elaborada pelo autor).

Alguns dos métodos mais eficazes para o manejo de biofilmes fúngicos clinicamente importantes são: inibir o desenvolvimento do biofilme ou perturbá-lo mecanicamente (Ramage et al., 2014). As estratégias desenvolvidas nos últimos anos para seu manejo incluem:

**Modificação da superfície do biomaterial para conferir propriedades antiadesivas:** é uma abordagem amplamente estudada e que demonstrou resultados muito promissores, por meio das mais variadas estratégias (Arciola et al., 2012; Iñigo et al., 2012).

Uma maneira de fazer isto é através da inclusão de moléculas, que ocorre através da sua ligação a esta superfície de alguma maneira. Baseado nesta abordagem, anidulafungina e miconazol foram incorporados a ciclodextrinas e estas enxertadas na superfície de biomateriais, apresentando desfechos satisfatórios de inibição da formação do biofilme fúngico (Girardot e Imbert, 2016).

Outro modo de executar esta abordagem é através da ligação covalente de agentes antifúngicos às superfícies de dispositivos médicos. Dessa forma, ficam imobilizados permanentemente, sendo incapazes de lixiviar para a solução (ou tecidos adjacentes). Os agentes antifúngicos mais adequados para este tipo de técnica são aqueles com mecanismos de ação mais externa, como a classe das equinocandinas, dos polienos ou de agentes que desempenhem sua ação na bicamada lipídica (como polímeros catiônicos ou peptídeos antimicrobianos). A alta concentração local do agente antifúngico desempenha uma boa atividade, no entanto, possui a desvantagem de não conseguir agir no tecido circundante que não está em contato direto (Giles et al., 2018). Revestimentos com polímeros hidrofílicos à base de polietilenoglicol (PEG) e/ou polióxido de etileno (PEO) e biosurfactantes também são opções (Arciola et al., 2012).

**Impregnar o material com substâncias antimicrobianas:** a impregnação de agentes antifúngicos diretamente no dispositivo médico é um método relativamente simples e modifica a maneira como os microrganismos irão interagir com a superfície do material (Arciola et al., 2012; Giles et al., 2018). Os biomateriais podem ser impregnados com antimicrobianos, como desinfetantes, substâncias antissépticas ou fármacos (exemplos: NO, Ag, Zn, Cu, clorexidina, lisozima, nanopartículas metálicas) (Arciola et al., 2012).

Nos EUA, dois tipos de impregnação são amplamente utilizados: a minociclina-rifampina (impregnados na face intra/extraluminal) e clorexidina-sulfadiazina de prata (impregnados na face extraluminal) (Yousif et al., 2014). Abordagens semelhantes comparam, *in vitro*, clorexidina-sulfadiazina de prata, considerada “padrão ouro”, com a associação de rifampicina e miconazol, com resultados superiores, além da estabilidade desta impregnação, que manteve mais de 90% do fármaco após 12 meses de armazenamento (Giles et al., 2018). O etanol se mostra uma opção muito bem embasada, com vários relatórios clínicos sugerindo seu uso sozinho e em combinação com agentes antifúngicos (Ramage et al., 2014). O nitrato de cério é uma opção promissora, além de não apresentar toxicidade, mostrou prevenir eficientemente *in vitro* e *in vivo* a formação de biofilme de *Candida* spp. em cateteres de poliuretano (Girardot e Imbert, 2016).

A “Antibiotic Lock Therapy” (ALT) ou Terapia de “bloqueio” é uma técnica que vem ganhando destaque e é extensivamente estudada. Consiste em difundir

uma alta concentração (de 100 a 1000 vezes a CIM) de solução antifúngica isoladamente ou em combinação com outros componentes no lúmen do cateter, deixando-o agir durante um período que pode variar de horas a dias. Uma das maiores vantagens desta abordagem se encontra na minimização da toxicidade sistêmica, uma vez que o antimicrobiano age apenas no cateter. Ainda assim, a liberação de concentrações tóxicas desses agentes não é uma possibilidade descartada e deve-se tomar cuidados (Bouza et al., 2015; Bujdáková, 2016; Cavalheiro e Teixeira, 2018).

A monoterapia não atinge a erradicação global do biofilme, portanto, a terapêutica ALT deve ser combinada com tratamento sistêmico, o que está relacionado à taxa de sucesso (Bujdáková, 2016). Devido a sua variabilidade, a taxa de sucesso desta técnica altera de acordo com os fármacos utilizados (Bouza et al., 2015).

Baseado em dados *in vitro* e *in vivo* disponíveis, a administração de anfotericina B, equinocandinas e etanol na ALT, em combinação com o tratamento sistêmico por micafungina, caspofungina, anfotericina B, fluconazol, voriconazol ou posaconazol, demonstram ser as estratégias mais promissoras (Walraven e Lee, 2012; Ramage et al., 2014; Bouza et al., 2015; Bujdáková, 2016; Cavalheiro e Teixeira, 2018). O etanol é um agente com ação antimicrobiana de grande interesse e muito vantajoso, dado seu baixo custo e sua eficácia contra as espécies de *Candida*. No entanto, deve-se ter atenção devido a suas inúmeras interações, principalmente na incompatibilidade potencial com cateteres de poliuretano, que são comumente usados para acesso venoso central, o que limita seu uso (Walraven e Lee, 2012; Alonso et al., 2018; Cavalheiro e Teixeira, 2018).

É importante que esta abordagem seja estudada mais a fundo, uma vez que os dados *in vivo* são limitados a relatos de casos, além disso, algumas falhas clínicas podem ocorrer devido à formação de biofilme extraluminal (Nett, 2014; Bouza et al., 2015). Fazem-se necessários ensaios clínicos randomizados utilizando as combinações de ALT e terapia sistêmica mais promissora, de forma a se avaliar definitivamente a segurança e a eficácia desta abordagem (Walraven e Lee, 2012).

**Material capaz de se opor à formação de biofilme e, ao mesmo tempo, apoiar a integração tecidual:** é uma abordagem adotada principalmente na

ortopedia, para auxiliar na reparação óssea. São utilizados revestimentos de hidroxiapatita com prata, Poli (L-lisina)-polietilenoglicol (Arciola et al., 2012).

**Revestimento combinando propriedades antiadesivas e antimicrobianas:** o revestimento com agentes antifúngicos torna a superfície resistente a infecções, pois, além de agir no microrganismo, pode reduzir muito a aderência de *Candida* spp. a esta superfície (Iñigo et al., 2012; Giles et al., 2018). O desenvolvimento de revestimentos finos, que possam ser aplicados a dispositivos médicos para prevenir o estabelecimento de biofilmes representa uma abordagem bastante interessante. Contudo, é importante que este revestimento não afete as propriedades do material e nem cause efeitos adversos no hospedeiro (Giles et al., 2018). Esta perspectiva demonstra, *in vitro*, um alto potencial, inclusive, uma formulação de hidrogel contendo anfotericina B demonstrou uma alta eficácia no revestimento e erradicação do biofilme (Giles et al., 2018). Ainda, podem ser utilizados filmes, como por exemplo filmes multicamadas de heparina e quitosana, bem como peptídeos antimicrobianos imobilizados em polímeros hidrofílicos (Arciola et al., 2012).

Dentre as perspectivas para inibir a fase de adesão de microrganismos sobre dispositivos médicos, a modificação das superfícies através do enxerto, impregnação ou revestimento com agentes antimicrobianos são alternativas potenciais (Girardot e Imbert, 2016). A ciência de biomateriais, em um de seus campos de pesquisa, tem voltado-se às necessidades clínicas de dispositivos biomédicos, desempenhando um grande impacto sobre o desafio que as infecções por biofilmes associadas a dispositivos representam, através do aprimoramento de materiais e dispositivos. No entanto, a ciência ainda é desafiada neste sentido, uma vez que os microrganismos parecem capazes de crescer e formar biofilmes em praticamente qualquer material (Giles et al., 2018). A pesquisa de métodos alternativos é necessária para melhorar nosso arsenal contra biofilmes fúngicos (Ramage et al., 2014).

### 3.3. Resposta Imunológica

O sucesso no estabelecimento da infecção depende da capacidade do patógeno oportunista evadir ao sistema imunológico. Além de sua sobrevivência no hospedeiro, sua capacidade de reproduzir-se neste ambiente e, se for o caso,

disseminar-se para outros tecidos também são muito importantes neste processo (Silva et al., 2012). Em infecções invasivas por *Candida* spp., a imunidade atuante depende de fagócitos, como neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas (CDs) (Pappas et al., 2018).

Após a entrada do fungo, os mecanismos de defesa do sistema imunológico do hospedeiro iniciam-se através das células fagocíticas, neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. O reconhecimento fúngico se dá especialmente pela parede celular fúngica, que contém moléculas não encontradas nas células do hospedeiro, dessa forma, são reconhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por diferentes receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (Hernández-Chávez et al., 2017; Pappas et al., 2018). Posteriormente, ocorre a apresentação de antígenos fúngicos aos linfócitos T, e então, ainda mais específicos, macrófagos realizam um segundo ciclo de ataque às células fúngicas. Além disso, monócitos e macrófagos, independente de linfócitos, também conferem capacidade ao sistema imunológico inato de aumentar a resistência à reinfecção através de reprogramação epigenética (Hernández-Chávez et al., 2017; Pappas et al., 2018).

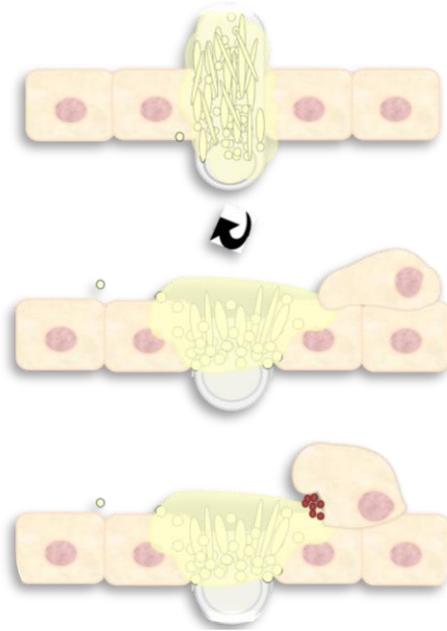
Os fungos desenvolveram inúmeros artifícios para escapar da ação do sistema imunológico do hospedeiro. A expansão volumétrica celular é uma delas, usada para livrar-se do processo de fagocitose e pode ser alcançada de duas formas distintas: pelo aumento de tamanho ou pela transição morfológica (Hernández-Chávez et al., 2017; Pappas et al., 2018). Uma vez que os polissacarídeos são os componentes mais abundantes e também os principais PAMPs, para evadir do sistema imunológico, os fungos têm a capacidade de “proteger” esses PAMPs, alterando a composição e arquitetura da parede celular sob influência do ambiente e suas condições. Tanto a quantidade como a acessibilidade a alguns destes componentes na superfície podem ser diminuídas. Embora ainda conserve componentes básicos, a composição e estrutura finais determinam a sobrevivência do fungo (Hernández-Chávez et al., 2017).

O  $\beta$ -1,3-glucano e a quitina são ambos componentes da parede celular e demonstram perfis de imunogenicidade distintos. O  $\beta$ -1,3-glucano é um polissacarídeo com alta capacidade imunogênica e possui um PRR próprio altamente específico, chamado dectina-1, que medeia inúmeras repostas celulares

antifúngicas, como fagocitose e produção de citocinas e quimiocinas, relacionadas a uma forte resposta imune inflamatória (Hernández-Chávez et al., 2017; Pappas et al., 2018). A quitina interage com diferentes PRRs, uma interação dependente do tamanho. Enquanto partículas de tamanho intermediário induzem uma resposta pró-inflamatória, partículas grandes e pequenas não desencadeiam reação imunológica, contudo, pequenos fragmentos podem induzir resposta antiinflamatória (Hernández-Chávez et al., 2017).

No caso de dispositivos médicos inseridos, eles possuem porosidade, que não são acessíveis às células fagocíticas, além disso, este biomaterial interage com componentes sanguíneos, intra e extracelulares, alterando a superfície do mesmo, através da troca de proteínas, influenciando a posterior interação com plaquetas e leucócitos. Os neutrófilos são predominantes na resposta aguda após implantação do dispositivo, seguidos, posteriormente, pelo recrutamento de monócitos e macrófagos em uma fase de reparação tecidual. Resumidamente, ocorre, inicialmente, uma reação de corpo estranho, formação de tecido de granulação e, finalmente, encapsulação fibrosa (Arciola et al., 2018). Este processo gera uma depressão imunológica local, também chamada de “locus minoris resistentiae”, que propicia a colonização por *Candida* spp. e estabelecimento de infecção, dessa forma, o supercrescimento do microrganismo pode levar a formação de biofilme com posterior desenvolvimento de uma infecção sistêmica (Bujdaková, 2016; Arciola et al., 2018).

Nas infecções relacionadas ao biofilme, em um primeiro contato, as células do sistema imunológico deparam-se com a matriz extracelular que circunda esta comunidade fúngica. A estrutura intacta da comunidade biofílica é necessária à resistência ao ataque do sistema imunológico (demonstrado na **Figura 11**), em partes devido aos  $\beta$ -glucanos presentes na matriz extracelular, que medeiam as características dessa evasão, resistindo ao ataque de neutrófilos (primeiros leucócitos recrutados) e impedindo a formação de espécies reativas de oxigênio (Hernández-Chávez et al., 2017; Lohse et al., 2017; Kernien et al., 2018).



**Figura 11.** Sistema imunológico tentando combater, sem sucesso, o biofilme formado em cateter venoso (Fonte: Elaborada pelo autor).

Nos casos de infecção com ausência de biofilme, os neutrófilos liberam armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), de composição variada, incluindo substâncias antimicrobianas, que agem, principalmente sobre estruturas grandes, como as hifas de *C. albicans*. No entanto, em presença de biofilmes a produção de NETs é inibida e atribui-se este fato à ocultação de ligantes pela matriz extracelular presente no biofilme (Lohse et al., 2017; Kernien et al., 2018).

A resistência dos biofilmes a ação de PBMCs se dá, inicialmente pela falha no processo de fagocitose, posteriormente, pela alteração no perfil de liberação de citocinas por estas células do sistema imunológico, inclusive, fornecendo estímulo para a proliferação do biofilme. Responsável pela ativação de células fagocíticas, bem como pela ação de inibição sobre a formação de biofilmes, o Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) tem sua produção diminuída na presença de biofilmes, inversamente ao que ocorre com células planctônicas (Kernien et al., 2018).

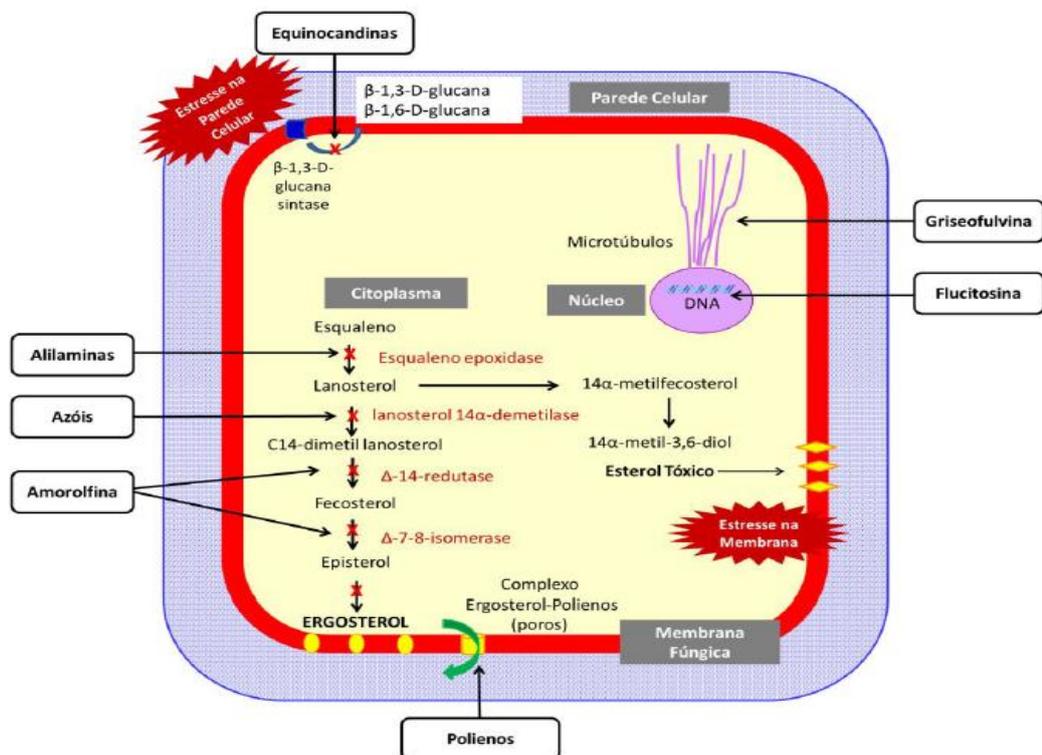
A capacidade de resposta de evasão ao sistema imunológico dos biofilmes de *Candida* varia de acordo com a espécie. Para *C. albicans*, essa capacidade foi de duas a cinco vezes em comparação com células planctônicas, no caso de *C. parapsilosis* houve uma tendência semelhante, embora essa diferença não tenha sido identificada em relação aos neutrófilos. Biofilmes de *C. glabrata*

exibem resistência três vezes maior a ação dos neutrófilos em relação às células planctônicas (Kernien et al., 2018).

Além da alta recalcitrância aos tratamentos disponíveis, as inúmeras estratégias de evasão ao sistema imunológico tornam o tratamento ainda mais difícil, e, devido ao aumento crescente de pacientes de risco, estratégias antifúngicas específicas ao biofilme se fazem necessárias (Kernien et al., 2018).

### 3.4. Agentes antifúngicos

Atualmente, apenas três classes principais de antifúngicos estão disponíveis para tratamento: polienos, azóis e equinocandinas. Esses agentes têm como alvo o ergosterol da membrana, as enzimas lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase e 1,3- $\beta$ -D-glucana sintase, respectivamente (Chang et al., 2017 A). No entanto, ainda há outras duas classes de agentes antifúngicos disponíveis: alilaminas e análogos de pirimidina, além de outros fármacos que não estão elencados em nenhuma das classes anteriormente citadas, como o ciclopirox e a amorolfina (os alvos destes fármacos estão representados na **Figura 12**) (Campoy e Adrio, 2017; Fuentesfria et al., 2017). Os agentes antifúngicos encontram-se disponíveis em formas farmacêuticas orais, tópicas e intravenosas (Fuentesfria et al., 2017).



**Figura 12.** Representação dos principais alvos dos agentes antifúngicos (Fonte: Pippi, B. Tese. 2018).

### 3.4.1. Polienos

Os polienos são fungicidas e possuem um espectro mais amplo de atividade antifúngica em relação aos demais agentes clinicamente disponíveis (Kathiravan et al., 2012; Robbins et al., 2016; Chang et al., 2017 A). A ação desta classe ocorre pela interação direta com o ergosterol, componente essencial da membrana celular fúngica, resultando na formação de poros, que causam permeabilização da membrana e vazamento do conteúdo citoplasmático, com consequente morte da célula fúngica (Silva et al., 2012; Kathiravan et al., 2012; De Cremer et al., 2015). O mecanismo de ação também se dá pela atuação dos fármacos desta classe como uma “esponja de ergosterol”, formando grandes agregados extramembranosos que extraem o ergosterol das bicamadas lipídicas. Visto que o ergosterol está envolvido em muitos processos celulares vitais, a causa final da morte da célula fúngica é, provavelmente, multifatorial, inclusive relacionado com a formação de espécies reativas de oxigênio (Silva et al., 2012; De Cremer et al., 2015; Robbins et al., 2016).

Nistatina, natamicina e anfotericina B são os três polienos em uso clínico, sendo produtos de culturas de *Streptomyces noursei*, *S. natalensis* e *S. nodosum*, respectivamente (Campoy e Adrio, 2017). Apresentam, entretanto, afinidade pelo colesterol, o esterol da membrana celular de mamíferos, o que explica sua toxicidade, mesmo possuindo maior afinidade pelo ergosterol fúngico e ligando-se a ele com maior avidéz (Kathiravan et al., 2012; Robbins et al., 2016).

A anfotericina B é administrada por via intravenosa (Campoy e Adrio, 2017). Os efeitos adversos associados a ela são toxicidade por infusão, baixo nível de potássio no sangue e nefrotoxicidade. Em vista disso, especialmente da nefrotoxicidade, e devido à excelente eficácia, novas formulações foram desenvolvidas. Combinações do fármaco com lipídios, como o complexo lipídico de anfotericina B (ABLC) e anfotericina B lipossomal (L-AmB), melhoram seu perfil de segurança (Robbins et al., 2016; Chang et al., 2017 A). Entretanto, a toxicidade renal e relacionada à infusão ainda permanecem como preocupações na clínica (Chang et al., 2017 A).

Nistatina e natamicina são usadas como agentes tópicos. Estes fármacos são ativos contra *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* e *Fusarium*. A nistatina é usada, principalmente para o tratamento de candidíase cutânea, vaginal e esofágica,

e a natamicina para o tratamento de ceratite fúngica (Kathiravan et al., 2012; Campoy e Adrio, 2017).

### 3.4.2. Azóis

Os fármacos desta classe interferem na biossíntese do ergosterol, um dos principais constituintes da membrana fúngica, pela inibição da enzima lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase. Como resultado, há a depleção do ergosterol, com inibição do crescimento e concomitante acúmulo de seus precursores, esteróis 14-metilados, que levam a formação de compostos tóxicos e ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio nas células fúngicas (Silva et al., 2012; Kathiravan et al., 2012; De Cremer et al., 2015).

Os azóis podem ser classificados em dois grupos: imidazóis e triazóis. Os imidazóis (clotrimazol, miconazol e cetoconazol) foram os primeiros a serem descobertos. Dentre eles, o cetoconazol foi o primeiro biodisponível por via oral, com um amplo espectro de ação, revolucionou alguns tratamentos, como o da candidíase oral (Kathiravan et al., 2012). No entanto, devido à sua alta toxicidade, efeitos colaterais graves e inúmeras interações com outros fármacos, os imidazóis foram substituídos pelos triazóis de primeira geração (itraconazol e fluconazol) (Kathiravan et al., 2012; Campoy e Adrio, 2017). Apresentando um espectro mais amplo de atividade antifúngica em comparação com os imidazóis, também apresentam perfis de segurança significativamente melhorados. O fluconazol foi aprovado para uso em dose única oral no tratamento de candidíase vaginal e foi tratamento de escolha em casos de candidemia, até que, em 2003, as equinocandinas se tornaram disponíveis e agora é um agente de segunda linha para a terapia inicial na maioria das circunstâncias (Kathiravan et al., 2012; Campoy e Adrio, 2017; Pappas et al., 2018). O itraconazol foi o primeiro agente oralmente biodisponível com atividade frente a *Aspergillus* spp., com atividade moderada frente a maioria das espécies de *Candida* (Silva et al., 2012; Kathiravan et al., 2012). No entanto, ambos apresentam certas limitações clínicas, como a inefetividade contra *Scedosporium*, *Fusarium* e *Mucorales*, patógenos atualmente emergentes (Campoy e Adrio, 2017).

Devido a essas limitações, uma segunda geração de triazóis foi desenvolvida (voriconazol e posaconazol) e tiveram sua aprovação pela FDA dos EUA em 2002 e 2006, respectivamente. São fármacos considerados fungicidas e

possuem amplo espectro de atividade (Campoy e Adrio, 2017). O voriconazol está disponível nas formas intravenosa e oral (Chang et al., 2017 A). Este fármaco exerce atividade fungicida contra a maioria das leveduras e caracteriza-se como uma possibilidade eficaz no tratamento de candidíase invasiva. Contudo, nem sempre oferece vantagens substanciais em relação à terapia com fluconazol, apesar de representar uma alternativa terapêutica contra *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* resistentes ou menos suscetíveis ao fluconazol (Silva et al., 2012; Kathiravan et al., 2012; Pappas et al., 2018). Já o posaconazol, exerce atividade fungistática contra algumas espécies de *Candida* não-*albicans*, incluindo *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (Silva et al., 2012; Pappas et al., 2018). Originalmente disponível apenas na forma de suspensão oral, entretanto, em 2013, uma nova formulação oral foi introduzida, comprimidos de liberação retardada. Além disso, a formulação intravenosa foi desenvolvida e aprovada pelo FDA em 2014 para pacientes impossibilitados de usar o medicamento pela via oral (Chang et al., 2017 A).

O isavuconazol é um novo triazol de espectro estendido, com atividade *in vitro* contra espécies de *Candida*, demonstrando excelente ação contra *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. glabrata*, para a maioria das espécies de *Aspergillus*, *Cryptococcus neoformans*, leveduras não-*Candida*, *Scedosporium apiospermium*, fungos dimórficos e patógenos emergentes como *Exserohilum rostratum*. No entanto, existem poucos dados clínicos que apoiem seu uso na rotina clínica (Gonzalez-Lara et al., 2017 B; Pappas et al., 2018).

Em 2014, a FDA aprovou o efinaconazol para o tratamento de onicomicoses, mais recentemente, em março de 2015, obteve aprovação do FDA e na União Europeia (EU) para o tratamento oral e intravenoso da mucormicose e da aspergilose invasiva. Em comparação com outros azóis aprovados, o efinaconazol tem como vantagem a abrangência dos zigomicetos, como espécies de *Rhizopus*, *Mucor* e *Cunninghamella* (Campoy e Adrio, 2017; Gonzalez-Lara et al., 2017 B).

Os azóis são uma classe antifúngica amplamente utilizada na clínica, devido as suas características, como a vasta atividade contra a maioria das espécies de *Candida*, perfil de segurança, com interações medicamentosas normalmente bem previsíveis, e disponibilidade em formulações orais, intravenosas e tópicas (Robbins et al., 2016; Pappas et al., 2018). Consequentemente, talvez não seja surpreendente

que a resistência a esses agentes, particularmente o fluconazol, vem sendo cada vez mais relatada (Silva et al., 2012).

### 3.4.3. Equinocandinas

A classe mais recentemente introduzida é a das equinocandinas, que incluem a caspofungina, a micafungina e a anidulafungina, que são hexalipopeptídeos cíclicos de origem semissintética (De Cremer et al., 2015; Perea, 2016). Seu mecanismo de ação ocorre sobre uma das principais enzimas envolvidas na biossíntese da parede celular fúngica, a inibição não competitiva da enzima 1,3- $\beta$ -D-glucana sintase. A ação destes fármacos compromete a síntese de 1,3- $\beta$ -D-glucano, um importante polissacarídeo componente estrutural da parede celular fúngica, culminando em perda da integridade e estresse severo da parede celular, que acarreta a lise celular fúngica (De Cremer et al., 2015; Robbins et al., 2016; Campoy e Adrio, 2017).

As equinocandinas apresentam ação fungicida sobre espécies de *Candida*, todavia, em espécies de *Aspergillus* este efeito é fungistático (Chang et al., 2017 A). Porém, não são ativas contra *Cryptococcus*, *Fusarium* spp., fungos dimórficos ou *Zygomycetes* (Perlin, 2014; Chang et al., 2017 A).

Os fármacos desta classe apresentam baixo potencial de toxicidade ou de interações medicamentosas graves no hospedeiro, além da baixa biodisponibilidade oral, sendo administradas por via intravenosa (Perlin, 2014; De Cremer et al., 2015; Perea, 2016). Além disso, possuem alto custo e, apesar de bons perfis de segurança, há alguns relatos de preocupações acerca de toxicidade hepática e cardíaca (Campoy e Adrio, 2017; Chang et al., 2017 A; Chang et al., 2017 B).

### 3.4.4. Análogos de pirimidina

Flucitosina (5-fluorocitosina), um análogo da pirimidina fluorada com atividade fungistática, foi inicialmente desenvolvido como agente anticancerígeno, mas posteriormente foi rastreado para agente antifúngico (Kathiravan et al., 2012; Campoy e Adrio, 2017).

A flucitosina interfere com o metabolismo da pirimidina, RNA/DNA e síntese proteica (Kathiravan et al., 2012; Campoy e Adrio, 2017). A entrada na célula fúngica ocorre por meio de uma citosina permease, então é convertida, por uma

citossina desaminase, em 5-fluorouracil e, posteriormente, por uridina monofosfato pirofosforilase (UMP pirofosforilase), em 5-fluorouridina monofosfato. Em seguida, é fosforilada e incorporada ao RNA, resultando na inibição da síntese proteica. A 5-fluorouracil também é convertida em 5-fluorodeoxiuridina monofosfato, um potente inibidor da timidilato sintase, enzima envolvida na síntese de DNA e no processo de divisão nuclear (Silva et al., 2012; Kathiravan et al., 2012; Campoy e Adrio, 2017).

O fármaco é seletivamente tóxico para fungos, pois há pouca ou nenhuma atividade de citossina desaminase em células de mamíferos, indicando baixos efeitos colaterais (Campoy e Adrio, 2017). Concentrações mais baixas deste fármaco apresentam efeito fungistático sobre o fungo e, embora em altas concentrações apresentem ação fungicida, nestas condições ocorrem efeitos colaterais depressivos da medula óssea (Arendrup, 2013). A flucitosina tem um espectro estreito de atividade, é restrita a leveduras patogênicas (*Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans*) (Silva et al., 2012; Kathiravan et al., 2012). A resistência é comumente vista, logo, não é usada como monoterapia, somente em combinação com outros antifúngicos, incluindo anfotericina B e fluconazol (Robbins et al., 2016; Campoy e Adrio, 2017). Atualmente não está disponível na maioria dos países em desenvolvimento (Fuentefria et al., 2017).

#### 3.4.5. Alilaminas

Alilaminas são agentes fungicidas sintéticos que bloqueiam a biossíntese do ergosterol através da inibição reversível e não competitiva da esqualeno epoxidase. Esta enzima catalisa a conversão do esqualeno em epóxido de 2,3-esqualeno, levando ao acúmulo de esqualeno e ausência de ergosterol, ocasionando o aumento da permeabilidade e ruptura da organização celular (Campoy e Adrio, 2017).

Os representantes desta classe são a terbinafina e a naftifina (Campoy e Adrio, 2017). A terbinafina foi isolada de culturas de *Streptomyces* sp., apresenta boa atividade contra *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Sporothrix schenckii*, fungos dimórficos, *Scopulariopsis brevicaulis* e espécies de *Herdersonula* e *Acremonium*, mas tem atividade variável contra leveduras. É amplamente utilizada no tratamento de onicomicoses, por via tópica e oral. Já a naftifina é ativa contra *Trichophyton* spp.,

*Epidermophyton* spp. e *Microsporum* spp. e possui atividade fungicida contra espécies de *Candida* (Kathiravan et al., 2012; Campoy e Adrio, 2017).

#### 3.4.6. Outros fármacos

O ciclopirox é um derivado da hidroxipiridona e seu uso vem sendo investigado desde 1973 (Tabara et al., 2015). Embora ainda não totalmente esclarecido, exerce seu mecanismo de ação por quelação de íons trivalentes, como  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Al}^{3+}$ , o que resulta na inibição de enzimas dependentes de metais, tais como citocromos, catalases e peroxidases, enzimas que agem na minimização de danos oxidativos na célula. Além disso, o ciclopirox reduz a absorção de nutrientes, inibe a permeabilidade de aminoácidos, causa perda de íons  $\text{K}^+$  e inibe a cascata de ácido araquidônico (Tabara et al., 2015; Lipner e Scher, 2018).

Possui ampla atividade antifúngica: dermatófitos (*Trichophyton* spp., *Microsporum* spp., *Epidermophyton floccosum*), leveduras (*Candida* spp., *Malassezia furfur*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*), *Aspergillus* spp., *Scopulariopsis brevicaulis* e *Fusarium solani* (Tabara et al., 2015; Lipner e Scher, 2018). O fármaco é usado na forma tópica, para o tratamento de infecções na pele, couro cabeludo, onicomicose, dermatite seborreica e pitíriase versicolor, sendo comercializado na forma de creme, suspensão, xampu, gel, solução e esmalte (Tabara et al., 2015).

Amorolfina é um derivado de morfolina sintética, introduzida em 1981, atua na inibição de duas enzimas envolvidas na biossíntese de ergosterol, a  $\Delta$ -7-8-isomerase e a  $\Delta$ -14-redutase, inibindo a síntese da membrana celular fúngica (Kathiravan et al., 2012; Tabara et al., 2015; Campoy e Adrio, 2017). Além disso, leva à hiperfluidez da membrana, com alterações na permeabilidade da membrana e deposição anormal de quitina, levando a anormalidades de crescimento (Kathiravan et al., 2012; Tabara et al., 2015). A amorolfina é eficaz contra dermatófitos (*Trichophyton* spp., *Microsporum* spp., *Epidermophyton* spp.), leveduras (*Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Malassezia* spp.), *Alternaria* spp., *Hendersonula* spp., *Sporothrix* spp. e outros (Tabara et al., 2015). A amorolfina é utilizada como tratamento tópico de micoses superficiais, como onicomicoses, pois apresenta boa penetração na unha (Kathiravan et al., 2012; Tabara et al., 2015; Campoy e Adrio, 2017).

Griseofulvina foi o primeiro agente antifúngico, é um produto natural isolado de *Penicillium griseofulvin*. Seu mecanismo de ação se dá pela sua ligação à tubulina, dessa forma, interfere na produção de microtúbulos intracelulares, inibindo a mitose fúngica (Kathiravan et al., 2012; Campoy e Adrio, 2017). Seu espectro de ação é restrito aos fungos dermatófitos, além disso, apresenta hepatotoxicidade (Kathiravan et al., 2012; Campoy e Adrio, 2017).

### **3.5. A problemática e os desafios da terapia antifúngica atual**

Mesmo com uma extensa pesquisa para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, os medicamentos disponíveis para tratar infecções fúngicas sistêmicas são limitados (Vandeputte et al., 2012; Izquierdo et al., 2015; Chang et al., 2017 A). Além disso, desde 2006, quando a Agência Europeia de Medicamentos (AEM) e a FDA aprovaram a anidulafungina, nenhuma outra classe de antifúngicos foi introduzida (Fuentefria et al., 2017).

Os antifúngicos atualmente disponíveis apresentam várias limitações relacionadas a problemas com perfis de segurança, propriedades farmacocinéticas, efeitos colaterais, interações medicamentosas, espectro de atividade e limitado número de alvos (Chang et al., 2017 A; Fuentefria et al., 2017; Gonzalez-Lara et al., 2017 B; Pappas et al., 2018). Outra questão problemática acerca da terapia, são os tratamentos a longo prazo, dispendiosos e inconvenientes, que podem ser associados à baixa adesão do paciente (Pappas et al., 2018). Além disso, a maioria destes efeitos adversos ocasionados pelos fármacos, por exemplo, alterações de função hepática associados ao uso de alguns azóis, são reversíveis após a descontinuação do uso. Contudo, o efeito pode ser irreversível, como o comprometimento renal proveniente do tratamento a longo prazo com anfotericina B (Pappas et al., 2018).

De um modo geral, durante a última década, um aumento do uso de fármacos antifúngicos vem sendo universalmente relatado e está associado às mudanças na epidemiologia e nos perfis de suscetibilidade antifúngica de *Candida* spp. (Lamoth et al., 2018). Como forma de minimizar estas mudanças, programas de manejo antifúngico se fazem necessários (Lamoth et al., 2018).

A resistência a antifúngicos é um problema emergente em todo o mundo, o que complica ainda mais a escolha da terapia antifúngica apropriada (Pappas et

al., 2018). O surgimento de novas espécies patogênicas, muitas vezes com padrões de multirresistência, como *C. auris*, representa uma grande ameaça e argumenta a favor do desenvolvimento de um sistema sentinela mundial, com intuito de detectar e relatar rapidamente o surgimento dessas espécies, mesmo de espécies já conhecidas anteriormente suscetíveis (Lamoth et al., 2018; Pappas et al., 2018).

### **3.5.1. Resistência aos antifúngicos**

Os principais determinantes de sobrevida de um paciente são o rápido controle da fonte e o início precoce da terapia antifúngica apropriada (Pappas et al., 2018). A mortalidade é significativamente maior em pacientes com candidemia em que a terapia antifúngica foi inadequada ou tardia (por exemplo: a escolha da terapia não foi feita com base em dados de suscetibilidade ou a dosagem administrada foi insuficiente) e/ou quando houve demora no controle da fonte (Pappas et al., 2018).

Em casos de candidíase invasiva, uma vez confirmado o diagnóstico, é importante estabelecer o perfil de suscetibilidade das espécies identificadas, em pacientes de alto risco há a possibilidade de tratamento antifúngico profilático, mas este é bastante controverso (Pappas et al., 2018). A exposição prévia a antifúngicos, como no caso do tratamento profilático com antifúngico, poderia, teoricamente, favorecer o surgimento de resistência adquirida, além de levar à seleção de espécies menos suscetíveis (Goemaere et al., 2017; Pappas et al., 2018).

Devido ao uso crescente dos compostos antifúngicos, a emergência de resistência tem sido cada vez mais relatada. A maioria destes casos é devida à seleção de espécies com resistência intrínseca, que é diagnosticada por uma identificação correta das espécies. Entretanto, para a identificação da resistência adquirida é necessário que sejam realizados testes de suscetibilidade corretos e aplicação de pontos de corte clínicos para o isolado específico (Arendrup, 2013; Pappas et al., 2018). O objetivo do teste de suscetibilidade é estabelecer um ponto de corte *in vitro* com o intuito de caracterizar os isolados como "suscetíveis" a um fármaco, provavelmente capazes de responder à terapia, ou "resistente", com elevada probabilidade de falha terapêutica (Perlin, 2014).

Além disso, dois conceitos específicos são extremamente importantes quando se estuda resistência e desfecho clínico: o primeiro é a resistência microbiológica e o segundo é a resistência clínica.

A resistência microbiológica é definida nos casos em que não há suscetibilidade de um fungo a um agente antifúngico por testes de suscetibilidade *in vitro*, nos quais a concentração inibitória mínima (CIM) da substância testada supera os pontos de corte de suscetibilidade definidos para aquele microrganismo. Logo é associada a aspectos do microrganismo, podendo ser intrínseca ou extrínseca (Kanafani e Perfect, 2008; Chang et al., 2017 A).

Já a resistência clínica é definida como a incapacidade do agente antifúngico em erradicar uma infecção fúngica, mesmo que este tenha atividade *in vitro* contra o microrganismo. Ou seja, é quando um agente antimicrobiano está associado a uma alta probabilidade de falha, pois o agente patogênico é inibido por uma concentração antimicrobiana que é maior do que poderia ser conseguida com esquemas de dosagem de segurança (Kanafani e Perfect, 2008; Pfaller, 2012; Chang et al., 2017 A). Estas falhas podem ser atribuídas a uma combinação de fatores, relacionados principalmente com o hospedeiro e com o agente antifúngico, mas também ao agente patogênico. Nem sempre poderão ser previstas e, por isso, a individualização de estratégias de tratamento é importante, com a realização de uma avaliação da situação clínica do paciente (Kanafani e Perfect, 2008).

Resistência adquirida em espécies de *Candida* tem sido descrita e mecanismos relacionados têm sido caracterizados no caso de azóis e equinocandinas (Arendrup, 2013). Três mecanismos são encontrados para a classe dos azóis, incluindo; i) mutação do gene alvo (perda de afinidade do fármaco e da enzima); ii) regulação do gene alvo (modificação quantitativa do alvo, que é superexpresso, levando a menor eficácia do fármaco simplesmente devido à competição entre o fármaco e o alvo); iii) superexpressão de bombas de efluxo (redução da concentração intracelular do fármaco) (Silva et al., 2012; Arendrup, 2013). Estes mecanismos são frequentemente encontrados agindo em conjunto, com aumentos graduais das CIMs (Arendrup, 2013). A resistência aos azóis tem sido amplamente relatada, especialmente ao fluconazol, e isso se deve, principalmente, à sua natureza fungistática (Campoy e Adrio, 2017).

No caso das equinocandinas, até agora, apenas mutações no gene alvo foram descritas como mecanismos em isolados resistentes. A enzima 1,3- $\beta$ -D-glucana sintase é um complexo enzimático com pelo menos duas subunidades: uma subunidade catalítica codificada por três genes relacionados (FKS1, FKS2 e FKS3) e

uma subunidade reguladora, Rho1p (Arendrup, 2013; Perlin, 2014). Enquanto o gene FKS1 é essencial em *C. albicans* e outras *Candida* spp., em *C. glabrata*, FKS1 e FKS2 são funcionalmente redundantes. Já o gene FKS3, em relação aos outros genes, é expresso em um nível muito baixo. Logo, substituições de aminoácidos em FKS1 de *C. albicans* conferem uma aptidão reduzida, uma vez que acarretam na diminuição da taxa de reação catalítica máxima da biossíntese de glucana, alterando a morfologia da parede celular (Perlin, 2014). Os microrganismos que demonstram resistência inerente às equinocandinas geram enzima-alvo insuficiente ou produzem uma forma alternativa da enzima com ligação reduzida às equinocandinas (Silva et al., 2012).

A ação das equinocandinas resulta em aumentos compensatórios na síntese de quitina, que serve para manter a integridade estrutural da parede celular, já que a quitina substitui os mutantes  $\beta$ -1,3-glucana. Assim, a parede celular terá conteúdo de quitina melhorado e menor suscetibilidade às equinocandinas. Efeito de tolerância dose-dependente em resposta ao estresse da parede celular, como a síntese compensatória de quitina e respostas adaptativas, têm sido associadas ao crescimento paradoxal, que se caracteriza pelo efeito de reversão da inibição do crescimento em células suscetíveis em níveis muito altos do fármaco (Perlin, 2014; Chang et al., 2017 B). Este tipo de crescimento ocorre em concentrações de fármaco acima da concentração inibitória mínima, desta forma, ocorre mais frequentemente para biofilmes em comparação com células planctônicas, devido às elevadas concentrações que este tipo de crescimento exige (Chandra et al., 2015).

Isolados de *Candida* spp. resistentes aos antifúngicos de primeira linha (como equinocandinas e fluconazol) estão sendo cada vez mais reconhecidos e geralmente se correlacionam com o uso elevado desses fármacos em hospitais ou unidades hospitalares específicas (Pappas et al., 2018).

A resistência aos antifúngicos poliênicos ainda é bastante rara na clínica, principalmente porque o custo de adaptação das modificações para a sobrevivência é alto, mas relatos de isolados exibindo CIMs elevadas tornaram-se mais frequentes. Crê-se que a resistência aos polienos resulta da alteração do teor ou composição de ergosterol na membrana celular e aumento da atividade da catalase (Silva et al., 2012; Chang et al., 2017 A). Entre as espécies de *Candida*, a resistência ao polieno foi geralmente devida à biossíntese defeituosa do ergosterol. Provavelmente é

resultado de mutação no gene ERG3 que produz uma atividade  $\delta$ 5,6-esterol dessaturase alterada, o que pode levar ao acúmulo de outros esteróis e, assim, reduzir a afinidade da anfotericina B ao ergosterol da membrana da célula fúngica. Além do gene ERG3, a mutação em ERG11 (o gene que produz a lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase) e em ERG6 (um gene que é necessário para a função normal da membrana, mas não é essencial para a biossíntese do ergosterol) podem gerar resistência aos polienos (Silva et al., 2012; Chang et al., 2017 A).

A flucitosina tem vários mecanismos de resistência possíveis devido aos múltiplos passos enzimáticos intracelulares requeridos para a sua ação, como alterações nas enzimas alvo, UMP pirofosforilase, citosina permease e citosina desaminase, ou aumento da produção de pirimidinas. Por isso é usualmente utilizada como adjuvante à terapia com anfotericina B e fluconazol (Silva et al., 2012; Campoy e Adrio, 2017).

Em relação à resistência às alilaminas, mais especificamente, terbinafina, embora menos comum, uma mutação relacionada à resistência a este fármaco foi identificada. Ocorre principalmente em *T. interdigitale* e *T. rubrum*. Esta mutação leva à mudança de um aminoácido, fenilalanina para leucina, na enzima esqualeno epoxidase (Rudramurthy et al., 2018).

### **3.5.2. Recalcitrância dos biofilmes aos agentes antifúngicos**

As infecções recalcitrantes estão, sistematicamente, associadas com a formação de biofilme, devido à matriz extracelular, que confere proteção do ambiente, resistência ao estresse físico e químico, cooperação metabólica e também atua como um sistema digestivo externo, fornecendo nutrientes e energia às células (Ramage et al., 2012; De Cremer et al., 2015; Fuentesfria et al., 2017; Silva et al., 2017). Ademais, biofilmes apresentam aumento da tolerância ao sistema imunológico do hospedeiro, bem como uma diminuição dramática na suscetibilidade aos agentes antifúngicos convencionais, apresentando-se recalcitrantes a altas concentrações, inclusive centenas de vezes maiores em relação àquelas necessárias para as suas respectivas células planctônicas (Nett, 2014; De Cremer et al., 2015; Fuentesfria et al., 2017).

As células sésseis (presentes no biofilme) apresentam alterações em seu fenótipo de expressão gênica e de taxa de crescimento em relação a células

planctônicas, de maneira funcionalmente significativa (Iñigo et al., 2012; Yousif et al., 2014). Da mesma forma, as células sésseis apresentam-se mais citotóxicas, mais virulentas e possuem maior capacidade de aderência às superfícies, de modo a formar novos biofilmes (Ramage et al., 2014; Bouza et al., 2015; Lohse et al., 2017). Devido a isso, possuem maior correlação com o desfecho de mortalidade (Ramage et al., 2012). Outra vantagem está relacionada ao fato de que células planctônicas geralmente dependem de mudanças genéticas irreversíveis para um fenótipo de resistência. Já a persistência dos biofilmes correlaciona-se à sua presença física e alta densidade celular, dificultando a penetração do agente antifúngico, ocasionando penetração irregular e seleção de células resistentes. Estas, por sua vez, podem ser liberadas do biofilme e, posteriormente, ocasionar infecções sistêmicas (Perlin, 2014; Costa-Orlandi et al., 2017; Silva et al., 2017).

As células persistentes são um importante mecanismo de resistência em infecções, são estimuladas sob condições que ativam a sinalização de estresse, como em infecções por crescimento de biofilmes em implantes e em concentrações subinibitórias de antimicrobianos, e contribuem no estabelecimento das formas crônicas de infecções (Arciola et al., 2018). Representam uma pequena subpopulação das células sésseis normais (0,01-10% da população total), são “variantes latentes”, em um estado espontâneo de dormência e não-divisório (metabolicamente inativas), com alta resistência aos agentes antifúngicos. Dessa forma, após o tratamento antifúngico inadequado e, muitas vezes, repetidamente, as células normais morrem, contudo, as células persistentes podem permanecer. Então, após o término da terapia, pode ocorrer a restauração do biofilme ou reinfecções (Ramage et al., 2012; De Cremer et al., 2015; Costa-Orlandi et al., 2017; Capote-Bonato et al., 2018). Terapias que tenham como um de seus alvos essas células persistentes podem ser alternativas que auxiliem na prevenção de recidivas destas infecções (Arciola et al., 2018).

Na fase inicial de formação do biofilme, as bombas de efluxo são importantes contribuintes à resistência aos azóis, bem como a composição de esterol na membrana nas fases intermediária e madura (Costa-Orlandi et al., 2017). Uma vez que inúmeros agentes antifúngicos podem ser substratos para as bombas de efluxo, a superexpressão resulta em resistência cruzada, especialmente os azóis, exceto as equinocandinas (Ramage et al., 2012). Apesar de muito importantes, não

são mecanismos exclusivos relacionados à resistência dos biofilmes aos azóis, após a produção da matriz extracelular, esta passa a ser um dos principais mecanismos de resistência do biofilme (Ramage et al., 2012).

O aumento da matriz extracelular e da atividade metabólica, maturação do biofilme, correlaciona-se fortemente com um decréscimo considerável na suscetibilidade desse biofilme (Capote-Bonato et al., 2018). Um dos principais mecanismos de resistência associados à matriz extracelular consiste em sua capacidade de neutralização ou ligação aos agentes antifúngicos, dessa forma, impedindo o acesso ao alvo, na superfície ou na célula fúngica, bem como impedindo a ação direta do sistema imunológico do hospedeiro sobre as células sésseis, ainda protegendo de danos radioativos, oxidativos e físicos (De Cremer et al., 2015; Costa-Orlandi et al., 2017; Silva et al., 2017; Kernien et al., 2018).

O polissacarídeo extracelular  $\beta$ -1,3-glucano, presente na matriz extracelular, sequestra azóis, atuando como um “filtro” e impedindo que atinjam as células do biofilme, da mesma forma, age sobre equinocandinas, pirimidinas e polienos. Além disso, confere espessura ao biofilme e maior proteção, dessa forma, terapias que atuem sobre a produção ou composição da matriz extracelular representam estratégias promissoras contra estas infecções (Ramage et al., 2012; De Cremer et al., 2015; Capote-Bonato et al., 2018; Cavalheiro e Teixeira, 2018).

O farnesol é responsável pela regulação das diferentes etapas do desenvolvimento do biofilme, incluindo ativação de genes envolvidos na resistência aos agentes antifúngicos, controle de superpopulação desnecessária e gerenciamento da competição por nutrientes. Dessa forma, auxilia na manutenção da integridade da parede celular, interferindo, inclusive, no processo infeccioso, como na disseminação (Iñigo et al., 2012; Costa-Orlandi et al., 2017; Seghir et al., 2017).

Os biofilmes de *Candida* spp. são, genericamente, resistentes aos agentes antifúngicos clinicamente importantes, incluindo anfotericina B, fluconazol, flucitosina, itraconazol e cetoconazol, inclusive azóis mais recentes, como voriconazol e ravuconazol, mesmo em altas concentrações (Iñigo et al., 2012; Bouza et al., 2015; Girardot e Imbert, 2016; Silva et al., 2017). A anfotericina B e as equinocandinas (caspofungina, micafungina, anidulafungina) são indicadas como os fármacos mais ativos frente aos biofilmes (Iñigo et al., 2012; Bouza et al., 2015;

Bujdáková, 2016; Girardot e Imbert, 2016). Referente à atividade de anfotericina B não há um consenso, inúmeros estudos demonstram boa atividade, em contraparte, a baixa atividade deste agente antifúngico também é relatada, embora em menor grau (Silva et al., 2012; Girardot e Imbert, 2016).

Embora os biofilmes apresentem resistência a grande parte dos antifúngicos comumente usados, o grau em que essa resistência se apresenta varia significativamente. Como no caso do fluconazol, o fármaco azólico mais comumente usado, para o qual os biofilmes podem apresentar-se resistentes a concentrações até 2000 vezes acima da CIM das respectivas células planctônicas. No caso da formulação lipossomal de anfotericina B e equinocandinas, foram ativas em concentrações de 2 a 25 vezes acima das concentrações inibitórias mínimas de suas contrapartes planctônicas (Nett, 2014). Isto tem uma implicância extrema na clínica e representa um grande problema, uma vez que a dose necessária para tratar a infecção e erradicar o biofilme corre o risco de exceder as concentrações mais altas de antimicrobiano que podem ser atingidas terapêuticamente (Ramage et al., 2012).

Ainda que se observe resistência em concentrações seguras e possíveis em pacientes, alguns fármacos podem apresentar atividade em concentrações possíveis de serem alcançadas terapêuticamente, incluindo anfotericina B e equinocandinas, no entanto, essas terapias podem apresentar alguns problemas (Iñigo et al., 2012; Nett, 2014).

No caso das equinocandinas, pode ocorrer o efeito paradoxal da atividade sobre estes biofilmes de *Candida* spp., além de apresentarem maior custo de aquisição e forma de administração restrita a via intravenosa (Iñigo et al., 2012; Nett, 2014; Ou et al., 2017). Embora estudos regionais indiquem boa relação custo-efetividade para espécies de *C. albicans* e não-*albicans*, o uso de doses mais altas ainda pode resultar na persistência do biofilme e a remoção física do biofilme ainda seja necessária (Nett, 2014; Ou et al., 2017).

Em se tratando da anfotericina B, efeitos adversos graves são associados ao seu uso, particularmente nefrotoxicidade. Mesmo com o uso de formulações lipídicas de anfotericina B, que demonstram maior eficácia, menor incidência de efeitos adversos relacionados à infusão e nefrotoxicidade, altas doses são

necessárias no tratamento de infecções por biofilme (Nett, 2014; Pappas et al., 2018).

O tratamento antifúngico destas infecções fúngicas associadas ao biofilme apresenta-se, usualmente, ineficaz, levando a complicações graves ao paciente, como as infecções persistentes e crônicas. Dessa forma, uma causa significativa de morbidade e mortalidade, associadas a um expressivo aumento dos custos relacionados a este paciente (De Cremer et al., 2015; Fuentesfria et al., 2017). Logo, as opções de tratamento atualmente disponíveis são limitadas, com uma urgente necessidade de desenvolvimento de novas terapias e/ou compostos para o combate dessas infecções (De Cremer et al., 2015).

### **3.6. Perspectivas para superação dos desafios na terapia fúngica**

Diante do quadro fúngico atual, novas abordagens e estratégias de tratamento são necessárias no combate às infecções fúngicas, especialmente aquelas com alto índice de persistência.

#### **3.6.1. Associação de fármacos**

As pesquisas que visam a descoberta de novos fármacos, como os agentes antifúngicos, são longas, de alto custo e elaboradas. Isso se deve, em grande parte, aos pré-requisitos necessários para aprovação (De Cremer et al., 2015). Neste período, novas abordagens devem ser estudadas. A terapia de associação inclui inúmeros benefícios potenciais: i) diferentes mecanismos de ação, que, atuando juntos, têm sua ação ampliada sobre as células fúngicas; ii) ampliação do espectro de ação; iii) atividade fungicida pode ocorrer através da associação de dois agentes antifúngicos fungistáticos; iv) minimização da toxicidade pelo uso de uma dosagem menor; v) redução dos microrganismos resistentes; vi) redução nos custos da terapia e vii) reutilização de compostos (Cui et al., 2015; Robbins et al., 2016; Fuentesfria et al., 2017).

A terapia associada eficaz pode ser o resultado da ação sinérgica de dois compostos. O sinergismo ocorre quando a associação de compostos demonstra um efeito de ação maior do que a soma de seus efeitos isolados, enquanto o efeito aditivo ocorre quando a soma da ação dos compostos isolados é igual à ação deles

em combinação. Porém, a associação pode apresentar efeito antagônico, que ocorre quando a atividade em associação é menor que o efeito de cada agente antifúngico sozinho. Pode ser observado quando se combinam dois compostos que competem pelo mesmo alvo. Os compostos associados podem agir independentemente entre si, não havendo interferência de um sobre a ação do outro, em nenhum aspecto, sendo o efeito da associação denominado como indiferente (Oliveira, 1986; De Cremer et al., 2015).

Assim, a identificação de interações sinérgicas, usadas tanto no meio acadêmico de pesquisa como na própria indústria, pode ser feita através da triagem em coleções existentes, de compostos com mecanismos de ação parcial ou totalmente conhecidos, buscando mecanismos complementares, que aumentem a eficácia dos tratamentos antifúngicos disponíveis. Mesmo as associações de agentes antifúngicos com compostos, a princípio, sem atividades farmacológicas podem apresentar efeito de associação sinérgico (Cui et al., 2015; Robbins et al., 2016). Enormes coleções de moléculas aprovadas pela FDA estão disponíveis para pesquisa e podem ser reaproveitadas. Neste grupo encontram-se os fármacos já comercializados, com ou sem patente, que são utilizados para tratamento das mais diversas doenças (De Cremer et al., 2015).

Os benefícios da associação de agentes antifúngicos atualmente disponíveis com novas moléculas ou fitocompostos vêm sendo amplamente avaliados e geralmente são explorados como estratégias de combate à resistência (Robbins et al., 2016; Fuentesfria et al., 2017). A seleção cuidadosa e estratégica da associação pode neutralizar a resistência, até mesmo revertê-la, através de um processo denominado inversão de seleção (Calderone et al., 2014; Robbins et al., 2016).

Na clínica, a associação de dois ou mais agentes antifúngicos no tratamento de infecções fúngicas invasivas potencialmente fatais tem sido utilizadas há muito tempo, quando na ausência de monoterapia que seja efetiva (Cui et al., 2015; Chang et al., 2017 A). O exemplo mais clássico em infecções fúngicas, validado por ensaios clínicos e considerado “padrão ouro”, é a associação da anfotericina B e da flucitocina no tratamento da meningite criptocócica. Esta associação demonstra maior taxa de cura e menos recaídas em relação à monoterapia com a anfotericina B, além da redução da nefrotoxicidade e melhora no

resultado clínico (Calderone et al., 2014; Robbins et al., 2016; Fuentefria et al., 2017). As diretrizes da Infectious Diseases Society of America (IDSA) recomenda esta associação também para o tratamento de alguns tipos clínicos de candidíase, como infecções graves com envolvimento do sistema nervoso central (SNC), infecções endovasculares e intra-abdominais (Cui et al., 2015).

Devido à limitada eficácia da monoterapia, o tratamento de infecções fúngicas por biofilmes de *Candida* spp., que possuem alta recalcitrância, representam uma importante estratégia (Nett, 2014; Robbins et al., 2016; Fuentefria et al., 2017). Além disso, essas infecções apresentam CIMs bastante elevadas e a associação é uma abordagem que pode solucionar este problema, uma vez que já é bem estabelecido que o tratamento do biofilme com associação de agentes antifúngicos apresenta valores de CIMs muito menores em relação à monoterapia (Iñigo et al., 2012).

Em paciente de alto risco, a terapia de associação para profilaxia é importante, e agentes antifúngicos, como o fluconazol, o posaconazol, o voriconazol e a micafungina, demonstram eficácia neste grupo de pacientes (Chang et al., 2017 A). Embora equinocandinas e formulações de anfotericina B sejam, atualmente, os fármacos comercialmente disponíveis que apresentam os melhores resultados sobre o biofilme de espécies de *Candida*, alguns fatores devem ser avaliados para delinear a escolha da melhor opção, como a eficácia *in vitro/in vivo* e menores riscos (De Cremer et al., 2015; Chang et al., 2017 A).

### **3.6.2. Novas formulações**

Os fármacos antifúngicos atualmente disponíveis vêm desempenhando um papel modesto na redução das altas taxas de mortalidade e a introdução de novos agentes antifúngicos está relacionada a notáveis dificuldades. Além disso, questões significativas como o perfil de toxicidade, interações medicamentosas, vias restritas de administração, biodisponibilidade baixa nos locais-alvo, a formação de biofilmes e questões próprias do paciente, tornam necessário o desenvolvimento de novas abordagens para subjugar esses desafios (Fuentefria et al., 2017; Gonzalez-Lara et al., 2017 B).

Neste sentido, por meio da tecnologia farmacêutica, a pesquisa e o desenvolvimento de novas formulações antifúngicas podem representar uma

abordagem idealmente promissora, principalmente em relação às formulações originais. Dessa forma, é possível a reutilização de fármacos, superando ou simplesmente amenizando algumas de suas deficiências (Chang et al., 2017 A; Fuentefria et al., 2017).

Importantes exemplos são observados através das diferentes formulações de anfotericina B, com perfil atenuado de toxicidade para anfotericina B lipossomal em relação à anfotericina B desoxicolato, principalmente em relação à nefrotoxicidade, mantendo-se sua eficácia (Fuentefria et al., 2017).

Além disso, as mudanças que vêm ocorrendo na epidemiologia das espécies ocasionarão alterações nas recomendações de tratamento, devido às suscetibilidades diferenciais, determinando a necessidade crucial de novos agentes antifúngicos, principalmente, com novos mecanismos de ação. Neste meio tempo, novas abordagens são importantes para inovação do tratamento das infecções persistentes, como aquelas relacionadas ao biofilme (Pappas et al., 2018).

#### **3.6.2.1. Sistema formador de filme**

As formas farmacêuticas tópicas convencionais, como cremes e pomadas, possuem características sensoriais desagradáveis e um longo tempo de secagem, o que prejudica o contato persistente, podendo ser facilmente removida pelo paciente, exigindo repetidas aplicações em doenças crônicas (Frederiksen et al., 2015; Kathe et al., 2017). Por conseguinte, existe uma necessidade do desenvolvimento de uma formulação que permita aplicações menos frequentes, com excelente adesão, mantendo um contato contínuo com a pele por um período mais prolongado, um extensivo cenário de uso, mesmo nas mais diversas e extensas áreas do corpo e com secagem rápida (Frederiksen et al., 2015; Kathe et al., 2017). Seguindo este raciocínio, o sistema formador de filme (SFF) é uma nova formulação que obedece a estes critérios e é uma alternativa às formulações tópicas dérmicas convencionais (Kathe et al., 2017).

O sistema formador de filme é um tipo de formulação que produz um filme *in situ* após sua aplicação na superfície corporal. São sistemas contendo o fármaco e os excipientes responsáveis pela formação do filme adicionados a um veículo, que em contato com a pele evapora, formando uma película contendo os excipientes juntamente com o fármaco. As cadeias poliméricas presentes no excipiente,

altamente móveis, aproximam-se à medida que o solvente evapora, formando um filme fino e transparente (Frederiksen et al., 2015; Kathe et al., 2017). Nesse processo, a concentração do fármaco aumenta, atingindo rapidamente a saturação e, ainda que transitoriamente, pode atingir a supersaturação na superfície da pele (Frederiksen et al., 2015; Kathe et al., 2017).

O filme formado requer algumas características: alta flexibilidade, elasticidade, alta substantividade, consistência e aderência adequadas, além de forte adesão à pele. Os SFF podem apresentar-se como inúmeras formas farmacêuticas, géis (ou hidrogéis), emulsões e soluções, o que determina algumas das suas características finais, como as soluções, que formam filmes mecanicamente mais resistentes em relação àqueles formados por dispersões. As características do SFF dependem: fármaco, solvente, tipo e concentração do polímero e tipo e concentração do plastificante (Frederiksen et al., 2015; Kathe et al., 2017).

Os fármacos aplicáveis a estes sistemas, geralmente, não causam irritação na pele e são relativamente estáveis às enzimas presentes na epiderme. Em geral, compostos menores permeiam mais facilmente do que os maiores e aqueles com pesos moleculares superiores a 500 Daltons possuem um fluxo muito baixo (Frederiksen et al., 2015; Kathe et al., 2017). A permeabilidade da pele aumenta com o aumento da lipofilicidade, até certo ponto. Fármacos mais lipofílicos são mais adequados a um perfil de liberação sustentada, tendo um efeito de "reservatório" na pele (Frederiksen et al., 2015; Kathe et al., 2017).

O solvente representa importante componente na formação de filmes, uma vez que ajuda a solubilizar o (s) fármaco (s), assim como tem um impacto na permeação do mesmo (Kathe et al., 2017). Os solventes orgânicos, tais como os álcoois (etanol, isopropanol) são preferidos. No caso do etanol, apesar dos relatos de irritação da pele quando em altos níveis, a FDA aceita > 95% do solvente desidratado em soluções tópicas, além de atuar como potencializador da penetração e facilitador da partição inicial (Frederiksen et al., 2015).

A base destas formulações é representada pelos polímeros e uma variedade deles estão disponíveis para a preparação desses sistemas (Frederiksen et al., 2015; Kathe et al., 2017). O tipo e a concentração do polímero afetam as propriedades mecânicas e sensoriais do filme formado, bem como sua capacidade de liberar o fármaco. Altas concentrações formam filmes espessos e rígidos, não flexíveis e desconfortáveis (Frederiksen et al., 2015). Como a superfície da pele tem uma carga líquida negativa em pH fisiológico, polímeros catiônicos nas formulações vão formar filmes de maior substantividade em relação àqueles formados a partir de polímeros neutros ou aniônicos (Frederiksen et al., 2015).

Plastificantes são usados nos sistemas de formação de filme para conferir flexibilidade e melhorar a resistência à tração do filme formado, aumentando o volume livre entre as cadeias de polímero (Frederiksen et al., 2015; Kathe et al., 2017). O plastificante reduz a temperatura de transição vítrea do polímero ( $T_g$ ), acima da qual as cadeias são móveis e a película formada é flexível (Frederiksen et al., 2015). O plastificante da solução SFF usualmente aumenta tanto a flexibilidade da cadeia polimérica quanto a difusividade e liberação do fármaco (Frederiksen et al., 2015; Kathe et al., 2017).

As formulações de sistemas formadores de filme já têm seu uso na clínica estabelecido para algumas funções particulares, como no campo da cirurgia, onde são usadas como “colas” de tecido para fechar feridas operatórias, com ou sem agentes antimicrobianos profiláticos. São usados inclusive na agricultura, sendo pulverizados no solo sobre o qual forma um filme protetor, que aumenta a integridade e eleva a temperatura do solo, proporcionando a proteção dos cultivos (Kathe et al., 2017).

Na área clínica farmacêutica, apresentam um papel positivo na próxima geração de formulações tópicas, com liberação sustentada do fármaco na pele (Frederiksen et al., 2015; Kathe et al., 2017). No mercado, são comercializados vários sistemas de formação de filmes como distribuidores de fármacos que obtiveram sucesso. Um exemplo de produto baseado nesta tecnologia é o Lamisil Once® (Novartis Consumer Health SA, Nyon, Suíça), cujo princípio ativo é o cloridrato de terbinafina, usado para o tratamento de dermatofitoses (Frederiksen et al., 2015; Kathe et al., 2017).

### **3.6.3. Estratégias de combate imunológico**

Grande parte dos pacientes acometidos por estas infecções encontram-se com seu sistema imunológico comprometido de alguma forma, logo, uma estratégia potencial para reverter esse quadro é modificar e melhorar a resposta imunológica do hospedeiro através da imunomodulação (Scriven et al., 2017).

Um estudo realizado em animais com modelos de candidíase, aspergilose, criptococose e histoplasmose demonstrou que a administração de anticorpos monoclonais reativos, com componentes da superfície celular do fungo, conferiu proteção destes animais. Já em ensaios em seres humanos, o uso de anticorpos monoclonais contra a proteína de choque térmico (HSP 90) de *C. albicans* ocasionou o aumento do *clearance* da infecção (Scriven et al., 2017). A identificação de traços imunogenéticos relacionados à candidemia persistente e desfechos ruins pode orientar a imunoterapia em associação ao tratamento com agentes antifúngicos e monitoramento dessas infecções (Pappas et al., 2018).

Outra estratégia promissora a ser considerada no combate às infecções por *Candida* spp. é a indução de anticorpos protetores, por meio do estímulo da resposta imunológica adaptativa através de vacinas contendo componentes

conservados da parede celular fúngica. Esta estratégia pode ser utilizada para inúmeros gêneros fúngicos (Scriven et al., 2017). O problema relacionado a esta estratégia, é a especificidade para as diversas manifestações clínicas da candidíase e das vias de defesa envolvidas. Um exemplo é o da primeira vacina, que tem como alvo as proteínas de sequência tipo-aglutinina 3 (Als 3 - adesinas), testada em ensaio clínico de fase I com segurança e mostrou-se eficaz em ensaios clínicos de fase II, reduzindo episódios de vaginite em mulheres com candidíase vulvovaginal recorrente. Dessa forma, pode-se observar que é específico para manifestações clínicas do tipo candidíase vulvovaginal, via células TH17, melhorando a imunidade da mucosa frente à invasão e não à colonização (Pappas et al., 2018).

#### **3.6.4. Desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos**

Apesar das últimas opções terapêuticas disponibilizadas no tratamento antifúngico, como as equinocandinas e triazóis de terceira geração, os agentes disponíveis ainda não conseguem atender à dem<sup>anda</sup> de tratamento nas populações heterogêneas de pacientes e apresentam um impacto modesto na redução da alta taxa de mortalidade (Kathiravan et al., 2012; Gonzalez-Lara et al., 2017 B). Ademais, algumas questões não resolvidas, como toxicidade, interações medicamentosas, vias de administração restritas, espectro limitado e biodisponibilidade reduzida, mas principalmente a resistência emergente e a extensa formação de biofilmes, ainda permanecem sem solução, tornando a pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antifúngicos necessários e urgentes para superar estes desafios (Kathiravan et al., 2012; Gonzalez-Lara et al., 2017 B).

Os novos candidatos a agentes antifúngicos precisam apresentar algumas características específicas, como um mecanismo de ação mais seletivo, perfil de toxicidade no hospedeiro baixo ou ausente, poucas ou nulas interações medicamentosas, perfis farmacodinâmicos/farmacocinéticos aperfeiçoados, preferencialmente fungicida, amplo espectro de ação, principalmente frente a fungos patogênicos multirresistentes (Fuentefria et al., 2017).

A descoberta de novos alvos específicos em fungos é uma estratégia importante, contudo, é um desafio, devido às semelhanças metabólicas e estruturais entre as células eucarióticas fúngicas e de mamíferos. Porém, diferem em relação a

presença da parede celular fúngica, que representa um alvo promissor, com baixa toxicidade (Robbins et al., 2016; Giles et al., 2018; Gonzalez-Lara et al., 2017 B).

Recentemente, foram descritos novos antifúngicos ativos na membrana celular: albaconazol, isavuconazol, luliconazol, derivados de hidrazina, tirosol,  $\beta$ -lapachona e novos azóis alquilados, e, da mesma forma, novos compostos com ação na parede celular fúngica, incluindo: anfumafungina e piperazinil-piridazinonas (Fuentefria et al., 2017). Entretanto, devido à exigente lista de características, após a aprovação das equinocandinas, apenas um antifúngico foi aprovado na última década, o isavuconazol, que obteve aprovação da FDA em março de 2015 (Gonzalez-Lara et al., 2017 B).

Dados preocupantes acerca da alta incidência global e mortalidade relacionadas às infecções fúngicas fomentam o apoio a pesquisa básica de patógenos fúngicos e suas contrapartes relacionadas (Calderone et al., 2014). Entretanto, questões financeiras também representam um impasse na terapia antifúngica, ocorrendo devido ao tamanho do mercado consumidor. Dessa forma, acredita-se que o lucro seja demasiadamente pequeno em relação ao custo do desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, que é um processo longo, demorado, de alto custo e a restrição dos recursos financeiros para este campo de pesquisa, limita sua expansão (Calderone et al., 2014; Fuentefria et al., 2017).

Além disso, terapias antimicrobianas, em sua grande maioria, possuem um curto prazo de uso, de 2 a 3 semanas, enquanto o tratamento de doenças crônicas pode requerer uso contínuo a vida inteira (Calderone et al., 2014). Ainda, depois de vencidas todas as etapas, com o fármaco aprovado e já disponível para venda, eventualmente, pode ocorrer o desenvolvimento de resistência a esse novo fármaco (Calderone et al., 2014).

A Lei Generating Antibiotic Incentives Now GAIN (HR 2182) foi aprovada em 2012 nos EUA como parte da Food and Drug Administration Safety and Innovation Act (FDASIA). Constitui um grande esforço para reduzir a ameaça à saúde pública representada pela resistência aos antimicrobianos, através de novas descobertas. Assim, recentemente, a lista de bactérias resistentes aos medicamentos foi expandida para incluir fungos patogênicos resistentes (Calderone et al., 2014; Robbins et al., 2016).

A ação estimula o desenvolvimento e a aprovação de novos fármacos antibacterianos e antifúngicos, pois tem como prioridade o intuito de facilitar os ensaios clínicos e promover relacionamentos mais fortes entre a academia e a indústria. Outro ponto importante é que estende o período de exclusividade de um novo medicamento antimicrobiano por mais cinco anos (Robbins et al., 2016).

A busca da ciência pela descoberta de novos fármacos exige extensas colaborações de pesquisadores com conhecimento de todo o processo, em diversas áreas, com recursos para montagem e/ou disponibilidade de bibliotecas de compostos (Calderone et al., 2014). O dogma da nova descoberta antimicrobiana pode estar precisando de mudanças sutis em sua abordagem (Calderone et al., 2014).

#### **3.6.4.1. Abordagens baseadas em alvos terapêuticos**

Avanços mais recentes em genética humana, biologia computacional e bioinformática nos permitem novas metodologias para a descoberta mais rápida de novos alvos e moléculas com propriedades antifúngicas (Abad-Zapatero et al., 2014). A determinação das diferenças entre as características transcricional, translacional e metabólica dos microrganismos é determinada através de análises transcriptômicas, proteômicas e metabolômicas. Estas informações são organizadas em um banco de dados gratuito on-line, com disponibilidade de acesso a toda a comunidade científica. Os dados caracterizam uma “impressão digital” do microrganismo, com informações importantes, como fatores ambientais, fisiológicos e mutacionais, inclusive, relacionados à capacidade de desenvolver biofilmes (Costa-Orlandi et al., 2017; Fuentesfria et al., 2017). Além de fornecer informações fundamentais sobre o estilo de vida do biofilme, proporciona uma caracterização da matriz biofílica e identificação de novos alvos para terapias antifúngicas (Mitchell et al., 2016).

Um método computacional, através de informações estruturais 3D dos alvos dos fármacos, que ocorre a modelagem do farmacóforo ou por meio de modelagem por homologia, para que se possa compreender quimicamente e estruturalmente como ocorre a interação ligante-alvo. Esta abordagem pode ser usada como ferramenta de triagem de alto rendimento, otimizando a seleção de moléculas com potencial antifúngico, para compor uma biblioteca de *hits* (moléculas

bioativas) potencialmente seguros e eficazes. Entretanto, esta abordagem parte de um alvo previamente conhecido (Calderone et al., 2014).

#### **3.6.4.2. Seleção de compostos biologicamente ativos**

A pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos é um processo bastante complicado e a dificuldade de conseguir avançar até o uso na clínica e inserção no mercado pode, muitas vezes, gerar uma sensação de frustração nos setores envolvidos (Abad-Zapatero et al., 2014). Ainda assim, a necessidade de novas estratégias terapêuticas fez com a pesquisa de potenciais novas moléculas para tratamento antifúngico, na medida do possível, fosse expandida (Fuentefria et al., 2017).

Bibliotecas de compostos são muito utilizadas como base da pesquisa de novos agentes antifúngicos. Podem ser formadas por quatro tipos de compostos: sintéticos ou semissintéticos já existentes, com outras atividades conhecidas ("reaproveitamento"), derivados de estruturas sintéticas recém-sintetizadas (estruturas inéditas, com novo mecanismo de ação e estrutura base identificada, a partir da qual ocorre a otimização para derivados mais ativos), antifúngicos já estabelecidos quimicamente modificados e produtos naturais (Calderone et al., 2014; De Cremer et al., 2015; Fuentefria et al., 2017).

Grande parte dos compostos presentes nas bibliotecas tem seu projeto de síntese ou semissíntese racionalmente desenvolvidos, baseado em alvos e fisiologia do hospedeiro (Fuentefria et al., 2017). Além disso, a correlação entre estrutura e atividade é a abordagem mais usualmente utilizada. Todos os compostos intimamente relacionados devem ser adicionados à biblioteca, ainda que alguns deles não apresentem atividade, é essencial para a otimização de *hits*, uma vez que estabelecem a importância dos grupamentos, com base no nível de atividade destes compostos estruturalmente relacionados (Calderone et al., 2014; Fuentefria et al., 2017).

A identificação de *hits* e as alterações em torno da estrutura de maior sucesso também são importantes para as características farmacocinéticas (absorção, distribuição, metabolismo, eliminação), permeabilidade celular, estabilidade metabólica e ligação às proteínas plasmáticas. No entanto, é essencial que se acompanhe esse *feedback* (Calderone et al., 2014). Diante desses *hits*, logo

de início é realizado o perfil toxicológico (como cito e genotoxicidade), precedido pela avaliação da atividade biológica e seguido por estudos farmacocinéticos (Calderone et al., 2014).

O “reaproveitamento de fármacos” tem crescido consideravelmente nos últimos anos, é uma abordagem mais rápida, uma vez que os fármacos utilizados já são bem sucedidos na clínica, inclusive com perfil toxicidade tolerável, possivelmente já estabelecido. Todavia, é uma solução a curto prazo. Ainda, pode impulsionar a descoberta de novos agentes antifúngicos, através de pequenas modificações nas moléculas já existentes, o que possui menor custo de desenvolvimento (Abad-Zapatero et al., 2014).

As bibliotecas advindas da indústria farmacêutica são repletas de moléculas bastante refinadas em relação às características físico-químicas, como as da RoF de Lipinski, que será explicada mais adiante. No entanto, devido à pequena brecha existente entre a atividade sobre células humanas em relação às células fúngicas, a ação no hospedeiro pode sobrepor-se à antifúngica. Dessa forma, é interessante a escolha de moléculas que não apresentaram efeito biológico em humanos, evidenciando um espaço que pode direcionar a seletividade fúngica (Robbins et al., 2016). Logo, este pequeno espaço-alvo e a ausência de regras físico-químicas sistemáticas, tanto em relação à atividade dos compostos como à baixa toxicidade, representam falhas para o sucesso na descoberta de novos agentes antifúngicos (Robbins et al., 2016).

#### **3.6.4.2.1. Propriedades físico-químicas**

Os *hits* podem possuir potência *in vitro* adequada a um potencial candidato a fármaco, mas podem, muitas vezes, possuir fracas propriedades farmacocinéticas e isso pode ocorrer porque a maioria dos medicamentos destina-se à terapia oral. Porém, a introdução de atividade oral não é previsível e necessita de um longo período de tempo e possui custo elevado. Além do mais, pode, facilmente, consumir mais recursos do que a otimização da atividade *in vitro*, tornando-se uma etapa limitante (Lipinski et al., 1997; Abad-Zapatero et al., 2014). Dessa forma, métodos que permitam previsões físico-químicas a partir da estrutura molecular são essenciais em ambos os cenários: a descoberta precoce e o desenvolvimento farmacêutico. O uso de variáveis "alternativas" para orientar a otimização desses

processos pode torná-los mais previsíveis e eficientes (Lipinski et al., 1997; Abad-Zapatero et al., 2014).

A proposta das diretrizes de Lipinski em 1997, mais tarde referidas como a “Regra dos Cinco” (RoF), tentou reduzir o número de entidades, usando pontos de corte razoáveis na busca pela absorção oral em moléculas iniciais (Abad-Zapatero et al., 2014). Devido à clareza e simplicidade de implementação que apresentam, tornaram-se "regras de ouro". Apesar de eficazes na triagem dos compostos, a maioria dos compostos que falham ao alerta serão problemáticos se progredirem para estudos experimentais. Porém, o inverso não é verdadeiro, os compostos que passam por este alerta ainda assim podem ser problemáticos nessa fase, não apresentando a atividade esperada pela via oral (Abad-Zapatero et al., 2014). (Lipinski et al., 1997; Abad-Zapatero et al., 2014).

A RoF baseia-se em quatro parâmetros implicados globalmente à solubilidade e permeabilidade, de acordo com Lipinski a má absorção ou permeação são mais prováveis: i) moléculas que exibem mais de cinco doadores de ligação hidrogênio (H); ii) peso molecular superior a 500 Daltons (Da); iii) LogP acima de cinco; iv) mais de 10 aceptores de ligação de H. É designada como “Regra dos Cinco” pois os pontos de corte são múltiplos de cinco (Lipinski et al., 1997; Leeson e Davis, 2004). Além disso, desde a publicação de Lipinski et al. (1997), pesquisadores incluíram outras duas propriedades que também são importantes para uma boa disponibilidade via oral: v) ligações rotacionáveis, que devem ser  $\leq 10$ ; vi) área de superfície polar (PSA)  $\leq 140 \text{ \AA}^2$  (ou a soma de doadores e aceptores de ligação H  $\leq 12$ ) (Veber et al., 2002; Keller et al., 2006).

A massa molecular de uma substância, mais frequentemente chamada de peso molecular (MW), é definida como a massa referente a uma molécula daquela substância, medida em unidade de massa atômica (u) ou Dalton (Da) (Leeson e Springthorpe, 2007). Funciona como uma limitação física, logo, seu aumento está relacionado com permeabilidade (intestinal e hematoencefálica) mais baixa (Lipinski et al., 1997; Bickel, 2005). Ao longo dos anos 1983-2002, o peso molecular referente aos fármacos aprovados neste período apresentou razoável aumento em relação à média já existente (Walters, 2012).

A lipofilia da molécula é expressa como a proporção de moléculas não ionizadas distribuídas entre uma fase apolar (octanol) e uma fase polar (água) em

condições de equilíbrio, que é comumente expressa na forma logarítmica: LogP. Valores mais altos implicam maior afinidade pela fase apolar, isto é, maior lipofilicidade (Lipinski et al., 1997; Leeson e Springthorpe, 2007). Propriedade usualmente presente nas análises de propriedades físico-químicas, relacionada à absorção, quanto maior for a lipossolubilidade, mais facilmente o fármaco irá atravessar a membrana. Entretanto, deve manter certa hidrossolubilidade, para que consiga dissolver-se nos fluidos corpóreos e passagem completa pelas membranas (Lipinski et al., 1997).

O LogP é uma característica com forte influência na promoção da ligação ao receptor, conseqüentemente, na potência do fármaco, na captação celular e na farmacocinética. Possuem influência inclusive sobre o perfil de toxicidade, uma vez que valores de LogP muito altos aumentam a probabilidade de ligação a múltiplos alvos, inclusive no hospedeiro, bem como acarretam uma depuração metabólica lenta (Ghose et al., 1999; Leeson e Springthorpe, 2007). Mesmo pequenas melhorias nos valores de LogP podem gerar efeitos consideráveis sobre o composto, refletindo em uma notável produção de novos fármacos (García- Sosa et al., 2012).

Ao longo de um período de décadas de desenvolvimento de fármacos orais, LogP foi a propriedade com menor alteração da média em relação as demais características inclusas na RoF. Sua distribuição pode ser usada para identificar ou caracterizar uma biblioteca ou classe de medicamentos (Ghose et al., 1999; Leeson e Springthorpe, 2007; García- Sosa et al., 2012). Todavia, seu uso deve ser cauteloso, devido à sua incapacidade de explicar a ionização de compostos sob condições fisiológicas (García-Sosa et al., 2012).

O índice de caráter doador de ligação hidrogênio (H) é definido, principalmente, pela soma de NH e de OH, que é uma medida aproximada dessa capacidade. Já o caráter acceptor de ligação de H é expresso pela soma de átomos de N e O (Lipinski et al., 1997). Contudo, ainda pode haver algumas falhas em relação a esta propriedade, por exemplo, embora um nitrogênio piridínico seja um bom acceptor e o nitrogênio pirrol seja um acceptor muito mais pobre, contam igualmente como aceptores no cálculo da simples soma dos Ns (Lipinski et al., 1997; Abad-Zapatero et al., 2014). Quanto à capacidade de realizar ligações de

hidrogênio, a literatura relaciona o menor número de doadores com melhor permeabilidade (Lipinski et al., 1997).

Para Lipinski et al. (1997), que avaliaram a absorção, era importante que a molécula não tivesse alta polaridade, para que pudesse ser mais facilmente absorvida pela membrana (Lipinski et al., 1997). Os grupos aceptores de ligações de hidrogênio, quando em demasia, também impedem a permeabilidade através da membrana lipídica celular, porém de maneira menos eficiente que os doadores de ligação de hidrogênio (Lipinski et al., 1997). A polaridade também está relacionada com a ligação ao alvo biológico, logo, pode-se supor que tenha um importante papel na interação biológica entre a molécula e a célula fúngica (Wiktorowicz et al., 2002).

Estudos recentes sobre a absorção de fármacos também destacaram a importância da área de superfície polar (PSA), relacionada à contagem e soma da área de superfície de todos os átomos polares (geralmente oxigênio e nitrogênio), incluindo também os hidrogênios ligados. Pode ser calculada ou estimada de muitas maneiras através de diferentes softwares (Leeson e Springthorpe, 2007; Abad-Zapatero et al., 2014). Notavelmente, vem atraindo muita atenção como preditor de absorção, uma vez que a diminuição do número de grupos funcionais polares em uma molécula favorece a absorção passiva, devido ao menor grau de solvatação dessa molécula, assim, menor energia necessária para a dessolvatação desse composto (Clark e Picket, 2000; Veber et al., 2002). A área de superfície polar baixa tem melhor correlação com a taxa de permeação que LogP (Veber et al., 2002).

Amplamente utilizada como um filtro, a contagem de ligações rotativas também é um parâmetro que vem sendo abordado atualmente, que mede a flexibilidade da molécula. Esta se refere à facilidade com que a molécula atravessa a membrana. Quando limitada representa uma vantagem, contudo, o aumento da contagem de ligações rotativas tem um efeito negativo na taxa de permeação. Fármacos em desenvolvimento clínico que são interrompidos possuem mais ligações rotativas em relação àqueles comercializados (Veber et al., 2002; Pajouhesh e Lenz, 2005). Embora seja importante, rigidez molecular é um item bastante complexo, não apenas dado pela simples contagem de ligações rotacionáveis, bem como não pode garantir alta biodisponibilidade (Veber et al., 2002).

Vale ressaltar também o LogD (Coeficiente 1-octanol/água em vários valores de pH) que também tem tido sua importância relatada, por se tratar de um descritor de lipofilicidade dependente do pH, portanto, mais realista sob pH fisiológico (Leeson e Springthorpe, 2007; García-Sosa et al., 2012).

É importante salientar que a violação de uma ou mais destas propriedades da RoF não elimina as chances do fármaco de prosseguir nos estudos. Então, foi desenvolvido um escore para ser atribuído, o ROF-Score, que fica entre "0" e "4". Quando o RoF-Scores são maiores que um, ou seja, a molécula viola mais de uma das regras, são consideradas marginais para desenvolvimento posterior, mesmo que as chances de sucesso diminuam, ainda assim é possível (Petit et al., 2012). A RoF foi derivada de candidatos a fármacos que atingiram a fase II, portanto muitos desses compostos terão, eventualmente, falhado na progressão para o mercado, dentre eles, os compostos altamente lipofílicos tendem a ser descontinuados antes da fase III (Leeson e Davis, 2004; Leeson e Springthorpe, 2007). Ainda, existem casos aos quais a RoF parece não ser aplicável, como os compostos que atuam como substratos para transportadores biológicos, produtos naturais, vitaminas, antifúngicos e glicosídeos cardíacos (Lipinski et al., 1997; Keller et al., 2006; Cerqueira et al., 2015).

Além de relevante sobre a farmacocinética, os medicamentos orais comercializados compatíveis com a RoF obtiveram sucesso em relação a rigorosos obstáculos toxicológicos e clínicos (Leeson e Springthorpe, 2007). Entretanto, algumas brechas ainda são encontradas, como efeitos colaterais, toxicidade inespecífica e viabilidade química (Meanwell, 2011; Abad-Zapatero et al., 2014). Embora estas propriedades tenham demonstrado correlação com previsão de propriedades farmacocinéticas (solubilidade, absorção, metabolismo e toxicidade), não servem para discriminação geral de fármacos em relação a moléculas que provavelmente não são terapeuticamente relevantes (Abad-Zapatero et al., 2014; Benet et al., 2016).

O processo de desenvolvimento de novos fármacos é um empreendimento desafiador, com taxas de sucesso muito baixas e um tempo médio de 12 anos da descoberta até a chegada ao mercado consumidor. Logo, a tentativa de compreender profundamente as razões do fracasso de um candidato tem levado ao interesse considerável de analisar as propriedades físico-químicas e a partir

delas formar bibliotecas (Leeson e Springthorpe, 2007; Meanwell, 2011; Petit et al., 2012). Assim, a escolha destes parâmetros de forma adequada, durante a descoberta de *hits* promissores, poderia inferir regularidades ou generalidades, que conectam os domínios químico e biológico. Este conjunto de “diretrizes” poderia indicar o que se tem e o que se deve obter para melhorar a chance de sucesso, além do enfoque primário que lhe foi atribuído, que é a predição da capacidade de atividade por via oral (Leeson e Springthorpe, 2007; Abad-Zapatero et al., 2014).

As áreas terapêuticas apresentam diferenças significativas nos valores de cada uma destas propriedades. Como os agentes anti-infecciosos, que têm um perfil muito diferente em relação às demais classes terapêuticas, no geral, moléculas maiores e menos lipofílicas. Dentre as determinantes, provavelmente relacionada à sua atividade em uma célula com características diferentes das células humanas, assim como à penetração na parede celular (Ghose et al., 1999; Leeson e Davis, 2004; García-Sosa et al., 2012). Fármacos anticancerígenos possuem alto desvio padrão entre os membros desta classe, muito provavelmente devido à complexidade da doença, que afeta diferentes partes do corpo e tecidos. Embora estas propriedades, por si só, não definam uma classe ou um alvo específico, intervalos podem ser designados e podem representar uma ferramenta de otimização da eficácia ou direcionamento a um alvo (Ghose et al. al., 1999). Logo, o uso da RoF poderia ser expandido, de acordo com o paradigma de semelhança: semelhança específica com fármacos (classificada por doença, administração, alvo e outros), uma estratégia racional e de grandes perspectivas, fontes de promissoras bibliotecas (García-Sosa et al., 2012; Petit et al., 2012).

#### **3.6.4.3. Novos compostos com atividade biológica antifúngica**

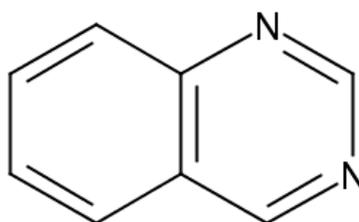
Devido ao crescente aumento do fenômeno da resistência dos microrganismos frente aos fármacos antifúngicos atualmente disponíveis, muitas vezes relacionados ao biofilme, bem como a emergência de novos patógenos, torna-se necessário projetar continuamente novos agentes antifúngicos. Visto a importância de serem altamente diversificados em termos de substituições, para continuidade da pesquisa da atividade biológica geral e também específica sobre pontos críticos, destaca-se a relevância dos esqueletos heterocíclicos (Ajani et al., 2016).

Estratégias como a triagem de alto rendimento são importantes para identificar compostos com atividade antifúngica e frente ao biofilme, que sejam eficazes, inclusive sobre as células persistentes, com ação isolada ou que facilitem a ação dos antifúngicos convencionais ou do sistema imunológico (Nett, 2014). Neste campo, a pesquisa atual, além dos fármacos já disponíveis, foca-se no rastreamento de bibliotecas de pequenas moléculas, medicamentos não patenteados já aprovados e síntese racional de novos compostos, procurando por possíveis novos agentes antifúngicos, assim como erradicadores ou inibidores da formação de biofilme (Bujdáková, 2016).

#### 3.6.4.3.1. Derivados de quinazolina

Heterociclos, em particular contendo nitrogênio, são importantíssimos na química medicinal, pois oferecem diversos espaços químicos na investigação do potencial medicinal, além de exibirem diversas atividades biológicas e farmacológicas. Isso se deve, em parte, às semelhanças com inúmeras moléculas já conhecidas por suas atividades biológicas, uma vez que, dentre os fármacos disponíveis atualmente, a maioria possui heterocíclicos em sua estrutura (Asif, 2014; Babu et al., 2015; Khan et al., 2016; Hameed et al., 2018).

A quinazolina é um composto formado por um anel de benzeno e um anel de pirimidina fundidos, chamado benzopirimidina (1,3-benzodiazina) (**Figura 13**). Ocorre naturalmente, principalmente como alcaloide em algumas plantas medicinais (Babu et al., 2015; Ajani et al., 2016). Foi sintetizada pela primeira vez em 1903, a partir do qual os estudos se intensificaram (Babu et al., 2015; Ajani et al., 2016; Hameed et al., 2018).



**Figura 13.** Representação da estrutura química do núcleo quinazolina.

A quinazolina possui um papel significativo na pesquisa medicinal, pois apresenta um grande número de compostos derivados e amplo espectro de atividades biológicas. Entre as atividades encontram-se: anti-HIV, antidiabética,

anticâncer, antimicrobiana (ex. antituberculoso), antifúngica, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, antileishmania, antimalárica, anticonvulsivantes, relaxante muscular, antiarrítmica, sedativa, hipnótica, antipsicótica significativa, antidepressiva, antiparkinsoniana, entre outros (Asif, 2014; Babu et al. , 2015; Ajani et al., 2016; Hameed et al., 2018), além de potenciais aplicações em outras áreas, como da biologia e de pesticidas (Babu et al., 2015).

A continuidade da pesquisa através de *leads* derivados de quinazolininas ainda é uma estratégia relevante para o desenvolvimento de novas moléculas biologicamente ativas. Para isso, há métodos simples, versáteis e eficazes que, geralmente, fornecem compostos novos e efetivos com maior diversidade estrutural (Asif, 2014; Babu et al., 2015; Ajani et al., 2016; Khan et al., 2016). A natureza das quinazolininas substituídas é principalmente determinada pela posição da ligação dos substituintes, isto é, se estão ligados à porção do anel heteroatômico ou ao núcleo de benzeno (Ajani et al., 2016).

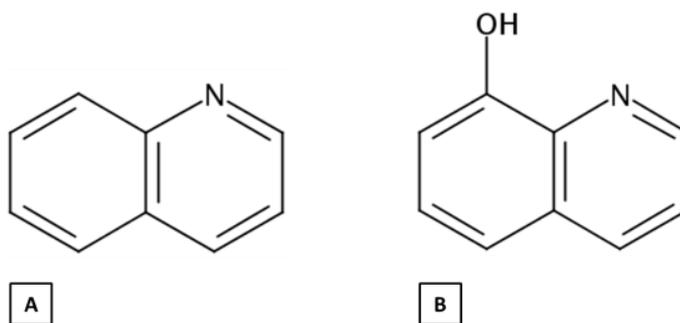
Entre os derivados de quinazolinina, alguns já demonstraram atividade antifúngica frente *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. Dentre o grande número de compostos já testados, foi demonstrada boa atividade antifúngica frente a diversas espécies (Ajani et al., 2016; Khan et al., 2016). Devido à capacidade de resistência aos agentes antifúngicos comercialmente disponíveis e o difícil tratamento de alguns patógenos fúngicos, derivados de quinazolinina são considerados importantes precursores para o desenvolvimento de moléculas farmacologicamente ativas (Ajani et al., 2016).

A quinazolinina e seus derivados possuem, inclusive, alguns medicamentos já comercializados, com inúmeras atividades farmacológicas. Até o momento, cerca de 26 medicamentos são utilizados clinicamente, dentre eles: erlotinib (tratamento de vários tipos de tumores); cloridrato de prazosina (agente bloqueador adrenérgico – tratamento da hipertensão); gefitinib (tratamento de certos tipos de câncer); alfuzosina (tratamento da hiperplasia prostática benigna) (Asif, 2014; Babu et al., 2015; Ajani et al., 2016).

#### **3.6.4.3.2. Derivados de 8-hidroxiquinolina**

A 8-hidroxiquinolina é um derivado da quinolina, originário de plantas, bem como da síntese. Apresenta um anel heterocíclico de seis membros fundido a um

anel benzênico com uma hidroxila no carbono 8 (Sashidhara et al. 2009; Prachayasittikul et al., 2013; Kadri et al., 2014; Oliveri e Vecchio, 2016). 8-hidroxiquinolinas (oxinas, 8-quinolinóis, 8-HQs) e seus derivados são uma subclasse de quinolinas. Têm sido utilizadas como fungicida na agricultura e como conservante nas indústrias têxtil, madeireira e de papel (Prachayasittikul et al., 2013; Oliveri e Vecchio, 2016).



**Figura 14.** Representação da estrutura química: A) núcleo quinoliníco; B) 8-hidroxiquinolina.

8-HQ e seus derivados possuem capacidade quelante de íons metálicos, demonstrando preferência por  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ , conforme tendência:  $\text{Mn}^{2+} < \text{Co}^{2+} < \text{Ni}^{2+} < \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ . Uma vez que íons metálicos exibem função muito importante nos processos biológicos e que a homeostase do metal é necessária para a manutenção do equilíbrio, está estabelecido que a quelação, entre vários fatores, é importante para a atividade farmacológica (Prachayasittikul et al., 2013; Oliveri e Vecchio, 2016). Como resultado, possuem uma grande variedade de funções biológicas (Prachayasittikul et al., 2013; Oliveri e Vecchio, 2016).

Nas últimas décadas, a atenção sobre 8-HQs cresceu exponencialmente como uma base de pesquisa para novos candidatos a fármacos, devido a seus efeitos biológicos, como antibacterianos, antimaláricos, neuroproteção, efeitos anticancerígenos, anti-HIV e antifúngicos (Prachayasittikul et al., 2013; Oliveri e Vecchio, 2016). Dentro da atividade antimicrobiana, derivados 8-HQs exercem atividades contra uma variedade de microrganismos tais como *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (incluindo MRSA), *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii* (Prachayasittikul et al., 2013).

Neste contexto, uma série de trabalhos visando a obtenção de novos derivados de 8-HQ, seus perfis de atividade antifúngica, toxicidade e mecanismo de

ação são encontrados na literatura. Estes derivados apresentam atividade antifúngica frente a inúmeras cepas de *Candida* spp. e de fungos dermatofíticos dos gêneros *Trichophyton* e *Microsporum*, bem como níveis variados de atividade sobre biofilmes de *Candida* spp. Ainda, o mecanismo de ação dos mesmos foi correlacionado a danos na membrana celular e à inibição da formação de pseudo-hifas de *Candida* spp. Também são apresentados estudos em moscas *Drosophila melanogaster*, embrião de galinha e ensaios de modelagem matemática de farmacocinética/farmacodinâmica que demonstraram a possibilidade de uso oral em infecções sistêmicas por *Candida* spp. (Pippi et al., 2017; Joaquim et al., 2018; Pippi et al., 2018 (A); Pippi et al., 2018 (B); Pippi et al., 2019).

Além do mais, uma grande vantagem desta subclasse, 8-HQs, é a variabilidade de modificações possíveis, em várias posições. Mesmo o grupo hidroxila pode ser facilmente alquilado ou acilado, bem como é fortemente ativador de substituintes orto/para, logo, as posições 5 e 7 podem ser facilmente funcionalizadas (Oliveri e Vecchio, 2016). Portanto, a 8-HQ e seus derivados são candidatos promissores a serem otimizados, de maneira a potencializar suas atividades, melhorar o perfil de toxicidade e o espectro de patologias, inclusive de microrganismos (Prachayasittikul et al., 2013; Oliveri e Vecchio, 2016).

A 8-HQ provou ser uma estrutura de grande valor e um exemplo bem conhecido é o clioquinol (Oliveri e Vecchio, 2016). Entre as décadas de 50 e 70, este derivado halogenado de 8-HQ, o 5-cloro-7-iodo-quinolin-8-ol (clioquinol), foi usado como agente antiparasitário oral, no tratamento da amebíase intestinal, com mecanismo de ação desconhecido (Maoa e Schimmera, 2008). No entanto, devido aos relatos de neurotoxicidade (neuropatia mielo-óptica subaguda - SMON) em pacientes japoneses, onde supostamente afetou cerca de 10.000 pessoas na década de 70, a formulação oral foi retirada do mercado. Formulações tópicas ainda estão disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas e parasitárias (Maoa e Schimmera, 2008; Bareggi e Cornelli, 2010).

Hoje em dia, ainda não há um convencimento da associação entre clioquinol e SMON, uma vez que é extremamente rara fora do Japão. Logo, existem suposições e hipóteses acerca deste fato, como a relação dos efeitos neurotóxicos à deficiência de vitamina B12, que pode ter sua absorção reduzida pelo clioquinol, cuja concomitante suplementação poderia resolver. Enquanto outras alternativas a

associam ao tipo de formulação utilizada no Japão ou a suscetibilidade genética daquela população (Maoa e Schimmera, 2008; Bareggi e Cornelli, 2010)

Devido a sua capacidade como quelante de alguns íons, como  $Zn^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ , o clioquinol ressurgiu como uma terapia potencial para a doença de Alzheimer, seguido por seus derivados, também apresenta potencial eficácia como terapêutica no tratamento de malignidades (Maoa e Schimmera, 2008; Bareggi e Cornelli, 2010). Dada a eficácia do clioquinol, ao longo dos últimos anos, seu estudo vem crescendo, bem como de novos compostos derivados com um perfil toxicológico aprimorado (Bareggi e Cornelli, 2010).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Local de trabalho**

Os experimentos e avaliações microbiológicas foram realizados nas dependências do Laboratório do Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada, localizado no Anexo II da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). A síntese das moléculas sintéticas inéditas foi realizada na mesma Instituição, no Laboratório do “Pharmaceutical Synthesis Group”.

### **4.2. Cepas Fúngicas**

Foram selecionados um total de nove cepas fúngicas para incluir neste estudo, pertencentes às três espécies de *Candida* formadoras de biofilme de modo mais expressivo de acordo com a literatura: *C. albicans* (CA CV42, CA CV44, CA DEB23), *C. tropicalis* (ATCC 750, CT 72A, CT RL104) e *C. parapsilosis* (ATCC 22019, CP RL27m, CP RL100). Todas as cepas pertencem à coleção de fungos do Laboratório do Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brasil) e foram obtidas de cateter, hemocultura, candidíase oral ou aspirado traqueal, identificados fenotipicamente através do sistema automatizado Vitek Yeast Biochemical Card (BioMerieuxVitek, Hazelwood, Mo) ou identificadas por MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight; Shimadzu). Também foram usadas cepas padrão provenientes da ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA), uma de cada

espécie, exceto de *C. albicans*. As cepas são mantidas armazenadas em temperatura ambiente, cultivadas em ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol (SDA; HiMedia, Mumbai, Índia).

### **4.3. Agentes antifúngicos**

Os compostos sintéticos inéditos avaliados foram: um derivado de quinazolina (PH100) e um derivado de 8-hidroxiquinolina (PH157). A síntese desses compostos é descrita por Rocha et al. (dados ainda não publicados) e Joaquim et al. (2018), respectivamente.

Os agentes antifúngicos utilizados foram: anidulafungina (AND) (Pfizer®, Nova York, NY), fluconazol (FLZ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), voriconazol (VRZ) (Pfizer®, Nova York, NY), cetoconazol (KTZ) (Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil) e anfotericina B (AMB) (Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil), todos obtidos comercialmente. A solução estoque de FLZ foi preparada em água destilada estéril, já as soluções estoque dos demais agentes antifúngicos foram preparadas em DMSO (Dimetilsulfóxido; Sigma-Aldrich), de modo que quando diluída em meio de ensaio, uma concentração máxima de DMSO de 2% fosse obtida nos ensaios.

### **4.4. Suscetibilidade de células planctônicas e sésseis**

As células sésseis foram obtidas a partir de biofilmes formados em cateter venoso central de poliuretano. Culturas de células de *Candida* spp. cultivadas durante 24 horas em Agar Sabouraud Dextrose (SDA) a 35 °C foram ressuspensas em água peptonada. A concentração foi ajustada em espectrofotômetro (GT220, Global Trade Technology) a 530 nm a uma transmitância equivalente a 0,5 da Escala McFarland ( $1,0-5,0 \times 10^6$  Unidades formadoras de colônias por mL - UFC/mL). Em seguida, 0,2 mL desta suspensão fúngica foram transferidos para um tubo contendo 1,8 mL de água peptonada. As amostras de cateter foram adicionadas ao tubo contendo o inóculo e incubadas durante 48 horas a uma temperatura de 35 °C. Em seguida, os cateteres foram lavados duas vezes com 1 mL de água estéril para a retirada das células não aderentes, colocados em outro tubo contendo 2 mL de água estéril e incubados em banho de ultrassom (USC-700; UNIQUE, São Paulo, Brasil) por 20 minutos a uma potência de 40 KHz, para separar as células aderidas.

A concentração inibitória mínima de células planctônicas (PMIC) e das células sésseis (SMIC) foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo M27-A3 (CLSI, 2008) e os resultados para células planctônicas foram interpretados através do documento M27-S4 (CLSI, 2012). A solução contendo antifúngico foi preparada em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640; Sigma-Aldrich), em concentração igual ao dobro daquela a ser testada, com a faixa final de concentrações testadas de 1-0,000976 µg/mL para AND; 128-0,0125 µg/mL para FLZ; 128-0,015625 µg/mL para VRZ; 32-0,0625 µg/mL para CTZ; 8-0,015625 µg/mL para AMB; 128-0,25 µg/mL para PH100 e 32-0,0625 µg/mL para PH157.

As células sésseis foram obtidas de biofilmes pré-formados, que assim como as células planctônicas, foram cultivados em SDA por 24 h a 35 °C. Estas células, então, foram suspensas em solução salina 0,85% estéril (Dinâmica; Diadema, São Paulo, Brasil). Em espectrofotômetro (GT220, Global Trade Technology), num comprimento de onda de 530 nm, a suspensão foi ajustada a uma transmitância equivalente a escala 0,5 de McFarland (concentração de células de 1,0-5,0 x 10<sup>6</sup> Unidades Formadoras de Colônias por mL ou UFC/mL). Então, duas diluições subsequentes foram realizadas, 1:50 e 1:20, esta última, em meio RPMI 1640, pH 7,0 e tamponado com MOPS (ácido morfolinopropanossulfônico; Dinâmica), de modo a se obter uma concentração de células de 1,0-5,0 x 10<sup>3</sup> UFC/mL.

O ensaio de microdiluição em caldo foi realizado em microplacas de poliestireno estéreis de 96 poços. Os agentes antifúngicos foram microdiluídos em meio RPMI 1640, de forma seriada, na proporção 1:1. O inóculo fúngico foi, posteriormente, adicionado em proporção 1:1 com o fármaco na placa de microtitulação, resultando em uma concentração fúngica de 0,5-2,5 x 10<sup>3</sup> UFC/mL.

Foram determinadas as menores concentrações capazes de inibir 50% e 100% do crescimento visual fúngico das células planctônicas (PMIC<sub>50</sub> e PMIC<sub>100</sub>) e de suas respectivas células sésseis (SMIC<sub>50</sub> e SMIC<sub>100</sub>).

#### **4.5. Inibição da formação do biofilme (IBF)**

A capacidade dos agentes antifúngicos em inibir a formação de biofilme em microplacas de poliestireno de 96 poços foi avaliada pela técnica de Bachmann

et al. (2002) com modificações. Os poços das microplacas foram pré-tratados com 100 µl de solução contendo os antifúngicos em uma faixa de concentração determinada para cada um (AND: 10-0,0039 µg/mL; FLZ: 640-0,5 µg/mL; VRZ: 40-0,0156 µg/mL; KTZ: 320-0,0625 µg/mL; AMB: 40-0,0156 µg/mL; PH100 256-0,5 µg/mL e PH157 160-0,0313 µg/mL), onde permaneceram em contato durante 48 horas a temperatura de 4-8 °C. Após, os agentes antifúngicos foram removidos dos poços das microplacas e lavados com 100 µL de água destilada estéril. Culturas de células de *Candida* de 24 horas em SDA foram ressuspensas em meio RPMI 1640 numa concentração de 10<sup>6</sup> UFC/mL. A partir deste inóculo fúngico, uma diluição 1:10 foi realizada, adicionando-se 20 µl em cada poço das microplacas juntamente com 180 µl de meio RPMI 1640, para formação do biofilme em estufa a 35 °C durante 48 horas.

A biomassa do biofilme foi determinada através da técnica descrita por Stepanović et al. (2007), com modificações. O sobrenadante foi aspirado cuidadosamente e os poços foram lavados três vezes com água estéril, para remover as células não aderentes. A fixação do biofilme foi feita com a adição de 150 µL de metanol (Merck; Darmstadt, Alemanha) durante 30 minutos. O metanol foi removido e as microplacas foram secas a temperatura ambiente por 30 minutos. Para coloração do biofilme, 150 µL de corante cristal violeta (Synth, São Paulo, Brasil), em concentração de 0,5% (p/v) foram adicionados e deixados durante 20 minutos. O corante foi removido e os poços lavados com água até a remoção do corante excedente. Em seguida, 150 µL de etanol 95% (Merck, Darmstadt, Alemanha) foram adicionados para ressuspender o corante, por um período de 30 minutos. Então, 100 µL foram transferidos para outra placa microplaca de poliestireno de 96 poços.

A leitura foi realizada em leitora de microplacas (SpectraMax®), em comprimento de onda de 450 nm. Através das médias das absorbâncias obtidas nas diferentes concentrações testadas, foram determinadas as concentrações capazes de inibir 50% e 90% da formação do biofilme, designadas como IBF<sub>50</sub> e IBF<sub>90</sub>, respectivamente. O percentual inibitório foi determinado em relação ao controle não tratado (100%) (de acordo com a fórmula abaixo, onde A corresponde ao valor de absorbância). O ensaio foi realizado em triplicata.

$$IBF = \left[ 1 - \left( \frac{A450 \text{ poços tratados}}{A450 \text{ poços não tratados}} \right) \right] \times 100$$

#### 4.6. Remoção de biofilme (BR)

A capacidade dos agentes antifúngicos de remover o biofilme pré-formado em microplacas de poliestireno de 96 poços foi avaliada de acordo com a técnica de Ramage et al. (2001) com algumas modificações. Esta técnica avalia a remoção do biofilme e não a morte celular das células presentes no mesmo ou daquelas que foram removidas. Culturas de células de *Candida* de 24 horas em SDA foram ressuspensas em solução salina estéril 0,85% (p/v) em uma concentração de  $10^6$  UFC/mL. A partir deste inóculo fúngico, uma diluição 1:10 foi realizada, adicionando 20  $\mu$ l a cada poço das microplacas juntamente com 180  $\mu$ l de meio RPMI 1640 para a formação do biofilme, incubadas por 48 horas a 35 °C. Após, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e os poços das microplacas foram lavados três vezes com solução salina estéril, para remover as células não aderentes. Então, os poços foram tratados com as soluções antifúngicas em faixas de concentração determinadas (AND 10-0,0039  $\mu$ g/mL; FLZ 640-0,5  $\mu$ g/mL; VRZ 40-0,0156  $\mu$ g/mL; KTZ 320-0,0625  $\mu$ g/mL; AMB 40-0,0156  $\mu$ g/mL; PH100 256-0,5  $\mu$ g/mL e PH157 160-0,0313  $\mu$ g/mL). As microplacas contendo os agentes antifúngicos foram incubadas por 48 horas a uma temperatura de 35 °C.

A biomassa do biofilme foi avaliada de acordo com a técnica descrita por Stepanović et al. (2007), com modificações. O sobrenadante foi aspirado cuidadosamente e os poços foram lavados três vezes com água destilada estéril para remover as células não aderentes. A fixação do biofilme foi feita com a adição de 150  $\mu$ l de metanol (Merck) durante 30 minutos. Removido o metanol, as microplacas foram secas a temperatura ambiente por 30 minutos. Para coloração do biofilme, 150  $\mu$ L de corante cristal violeta (Synth) 0,5% (p/v) foram adicionados e deixados por 20 minutos. O corante foi removido e os poços lavados com água até a remoção do excesso do corante. Em seguida, 150  $\mu$ L de etanol 95% (Merck) foram adicionados para ressuspender o corante e deixado por um período de 30 minutos. Então, 100  $\mu$ L foram transferidos para microplaca de poliestireno de 96 poços.

A leitura foi realizada em leitora de microplacas (SpectraMax®), em comprimento de onda de 450 nm. Através das médias das absorbâncias obtidas nas

diferentes concentrações testadas, determinaram-se as concentrações capazes de remover 50% e 90% do biofilme pré-formado, designadas como BR<sub>50</sub> e BR<sub>90</sub>, respectivamente. O percentual de remoção foi determinado em relação ao controle não tratado (100%) (de acordo com a fórmula abaixo, onde A corresponde ao valor de absorbância). O ensaio foi realizado em triplicata.

$$BR = \left[ 1 - \left( \frac{A_{450} \text{ biofilme tratado}}{A_{450} \text{ biofilme não tratado}} \right) \right] \times 100$$

#### 4.7. Suscetibilidade de Biofilmes (BMIC)

A capacidade dos agentes antifúngicos em matar as células presentes no biofilme pré-formado em microplacas de poliestireno de 96 poços foi avaliada por técnica já descrita na literatura por Ramage et al. (2001) e Shuford et al. (2007) com modificações. Esta técnica avalia a redução da viabilidade celular do biofilme aderido e não a remoção ou viabilidade celular da porção deste biofilme que possa vir a ser removida pela ação do composto. Culturas de células de *Candida* de 24 horas em SDA foram ressuspensas em solução salina estéril 0,85% (p/v) em concentração de 10<sup>6</sup> UFC/mL. A partir deste inóculo fúngico, 20 µl foram adicionados a cada poço das microplacas juntamente com 180 µl de meio RPMI 1640 para a formação de biofilme e incubadas por 48 horas a 35 °C. Então, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e os poços foram lavados três vezes com solução salina estéril para remover as células não aderentes. Os poços foram tratados com soluções antifúngicas em faixas de concentração determinadas para cada um (AND 10-0,0039 µg/mL; FLZ 640-0,5 µg/mL; VRZ 40-0,0156 µg/mL; KTZ 320-0,0625 µg/mL; AMB 40-0,0156 µg/mL; PH100 256-0,5 µg/mL e PH157 160-0,0313 µg/mL). Incubou-se na presença dos agentes antifúngicos durante 48 horas a 35 °C. Após, o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e os poços foram lavados três vezes com água estéril para remover as células não aderentes.

A atividade antifúngica contra biofilmes pré-formados foi estimada utilizando o corante vital MTT brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, preparado na concentração de 0,5 mg/mL. O uso deste corante baseia-se na atividade de desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, que irão clivar o anel de tetrazólio, reduzindo o sal MTT e formando cristais insolúveis de formazan E,Z-1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-

difenilformazan (Traba e Liang, 2011; Pippi et al., 2017). Desta forma, uma alíquota de 150 µL foi adicionada aos poços das placas de microtitulação, que foram incubadas durante três horas, a 35 °C. O corante foi removido e o formazan presente nas células foi extraído com 150 µL de álcool isopropílico por homogeneização. As microplacas foram deixadas em repouso por 5 minutos e, em seguida, 100 µL foram transferidos para outra microplaca de poliestireno de 96 poços.

A leitura foi realizada em leitora de microplacas (SpectraMax®) em um comprimento de onda de 570 nm. O percentual de redução da atividade metabólica dos biofilmes tratados foi calculado em relação aos controles sem tratamento (100%) (conforme fórmula abaixo, onde A corresponde ao valor de absorbância). Dessa forma, foram determinadas as concentrações capazes de reduzir a atividade metabólica em 50% e 90%, designadas como BMIC<sub>50</sub> e BMIC<sub>90</sub>, respectivamente. O ensaio foi realizado em triplicata.

$$BMIC = \left[ 1 - \left( \frac{A_{570} \text{ biofilme tratado}}{A_{570} \text{ biofilme não tratado}} \right) \right] \times 100$$

#### 4.8. **Checkerboard test**

O efeito da associação entre AND e AMB sobre biofilmes de *Candida* foi realizado utilizando a técnica *Checkerboard*, de acordo com Tobudic et al. (2010) modificada. A atividade de inibição, remoção e redução da atividade metabólica de biofilmes da associação procedeu-se da mesma maneira que para os agentes antifúngicos sozinhos, entretanto, usando concentrações definidas de ambos agentes antifúngicos. As concentrações testadas foram selecionadas a partir dos ensaios anteriores realizados em placas de microtitulação, 2 µg/mL (AND) e 20 µg/mL (AMB). A partir destas concentrações, consideradas como o ponto central, também foram utilizadas as concentrações: oito, quatro e duas vezes maiores, também dividida por dois, por quatro e por oito (x8; x4; x2; x1; /2; /4; /8). Três cepas foram avaliadas, uma de cada espécie: CA DEB23, CT 72A e CP RL27m. O índice de concentração inibitória fracionária (ICIF) para cada teste foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$ICIF = \left( \frac{Ac}{As} \right) + \left( \frac{Bc}{Bs} \right)$$

Onde Ac e Bc são as concentrações dos agentes antifúngicos em combinação, As e Bs são as concentrações dos agentes antifúngicos sozinhos. Para aplicação na fórmula, utilizou-se IBF<sub>90</sub>, RB<sub>50</sub> e BMIC<sub>50</sub> dos agentes antifúngicos sozinhos e em combinação. A classificação da associação foi feita de acordo com Tobudic et al. (2010), através do índice de concentração inibitória fracionária (ICIF). Quando o valor do ICIF é > 4, a associação é considerada antagônica, quando > 0,5 e ≤ 4,0 é considerada indiferente, quando ≤ 0,5, considera-se sinérgica. Os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **4.9. Prevenção da formação de biofilme de *Candida* em cateter venoso central de poliuretano**

Avaliou-se a capacidade dos compostos antifúngicos inibirem a formação de biofilme em cateter venoso central de poliuretano (Arrow International, Teleflex Medical, Athlone, Ireland). As amostras de cateter esterilizadas, de 1 cm de comprimento, foram colocadas em tubos com 2,0 mL de solução contendo os compostos antifúngicos, em concentrações fixas e pré-determinadas para cada um, por um período de 24 horas a 4-8 °C. As concentrações utilizadas foram: 1 µg/mL e 0,5 µg/mL para AND; 256 µg/mL para FLZ; 8 µg/mL para VRZ; 32 µg/mL para KTZ; 8 µg/mL e 2,5 µg/mL para AMB; 256 µg/mL para PH100; 16 µg/mL para PH157 e 0,5/2,5 µg/mL para a combinação de AND/AMB.

Na preparação do inóculo foram utilizadas culturas de células de *Candida* de 24 horas em SDA a 35 °C, que foram ressuspensas em água peptonada (HiMedia) a uma concentração de 10<sup>6</sup> UFC/mL. Em seguida, 0,2 ml desta suspensão fúngica foi transferido para um tubo contendo 1,8 mL de água peptonada (diluição de 10 vezes). As amostras de cateter são retiradas da solução antifúngica, lavadas com 1 mL de água estéril, adicionadas ao tubo contendo o inóculo e incubadas por 48 horas a 35 °C. Os cateteres, então, são removidos do tubo e lavados duas vezes com 1 mL água estéril para remover as células não-aderentes, são então colocados em um tubo contendo 2,0 mL de água estéril e submetido a banho de ultrassom durante 20 minutos a uma potência de 40 KHz, para desprender as células aderidas. Os mesmos procedimentos foram realizados para o cateter que foi exposto à solução sem a presença de agente antifúngico (controle não tratado). Em seguida, foram retirados 10 µl dos tubos contendo o cateter e realizadas diluições em série de

10 vezes (até  $10^{-4}$ ). Então, foram removidos 10  $\mu\text{L}$ , de cada tubo (contendo cada diluição e sem diluição), são e semeados em placas SDA e incubados durante 24 horas a 35 °C. Posteriormente, as UFC/cm<sup>2</sup> de cateter e o percentual de inibição da formação do biofilme em comparação com o controle não tratado foram determinados. Ensaio realizado em triplicata.

#### **4.10. Avaliação da capacidade de erradicação do biofilme de *Candida* em cateter venoso central de poliuretano**

Avaliou-se a capacidade dos compostos antifúngicos na remoção do biofilme pré-formado em cateter venoso central de poliuretano e sua ação sobre as células removidas. O inóculo foi preparado a partir de culturas de células de *Candida* de 24 horas em SDA a 35 °C, que foram ressuspensas em água peptonada a uma concentração de  $10^6$  UFC/mL. Em seguida, 0,2 mL desta suspensão fúngica foram adicionados aos tubos contendo 1,8 mL de água peptonada. As amostras de cateter estereis, de 1 cm de comprimento, foram adicionadas aos tubos contendo o inóculo e incubadas durante 48 horas a 35 °C. Após, os cateteres foram lavados duas vezes com 1 mL de água estéril para remover as células não aderentes e adicionados aos tubos contendo 2,0 mL de solução contendo os compostos antifúngicos, por um período de 48 horas a 35 °C. As concentrações fixas utilizadas foram de 1  $\mu\text{g/mL}$  e 0,5  $\mu\text{g/mL}$  para AND; 256  $\mu\text{g/mL}$  para FLZ; 8  $\mu\text{g/mL}$  para VRZ; 32  $\mu\text{g/mL}$  para KTZ; 8  $\mu\text{g/mL}$  e 2,5  $\mu\text{g/mL}$  para AMB; 256  $\mu\text{g/mL}$  para PH100; 16  $\mu\text{g/mL}$  para PH157 e 0,5/2,5  $\mu\text{g/mL}$  para a combinação de AND/AMB.

As amostras de cateter foram retiradas da solução antifúngica e lavadas duas vezes com 1 mL de água estéril para remover as células não aderentes. A partir das soluções contendo os compostos antifúngicos, 10  $\mu\text{L}$  são retirados e diluições em série de dez vezes são feitas (até  $10^{-4}$ ). Então, 10  $\mu\text{L}$  diretamente deste tubo e 10  $\mu\text{L}$  de cada diluição foram semeados em placas SDA e incubadas durante 24 horas a 35 °C. As amostras do cateter foram, então, colocadas em outros tubos contendo 2,0 mL de água destilada estéril e submetido ao banho de ultrassom durante 15 minutos a uma potência de 40 KHz por 20 minutos para desprender as células aderidas. Os mesmos procedimentos foram realizados para os biofilmes pré-formados em cateter, mas que foram expostos à solução sem agentes antifúngicos (controle não tratado). Em seguida, são retirados 10  $\mu\text{L}$  de cada tubo e são

realizadas diluições em série de 10 vezes (até  $10^{-4}$ ). Então, 10  $\mu$ L diretamente do tubo contendo o cateter e 10  $\mu$ L de cada diluição foram semeados em placas de SDA, incubadas por 24 horas a 35 °C. As UFCs são determinadas, tanto da solução antifúngica (percentual de células removidas do biofilme do cateter, mas que permaneceram viáveis), como do tubo contendo o cateter (células que permaneceram aderidas ao cateter e viáveis). Posteriormente, determinaram-se as UFC/cm<sup>2</sup> do cateter e o porcentual de erradicação do biofilme em relação ao controle sem tratamento. O ensaio foi realizado em triplicata.

#### 4.11. Preparação de um sistema de revestimento (Sistema Formador de Filme) para a prevenção da formação do biofilme de *Candida* spp.

Os compostos antifúngicos foram incorporados em uma formulação de sistema formador de filme, do tipo hidrogel. A capacidade de inibição da formação do biofilme sobre cateter venoso central de poliuretano dessas formulações foi avaliada. As concentrações testadas foram fixas para cada composto: AND em 0,5  $\mu$ g/mL e 1  $\mu$ g/mL; AMB em 2,5  $\mu$ g/mL; AND/AMB em 0,5/2,5  $\mu$ g/mL e PH157 em 16  $\mu$ g/mL. Este tipo de formulação já havia sido descrita anteriormente por Kathe et al. (2017). A composição e o preparo das mesmas encontram-se expostas na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Composição da formulação do sistema formador de filme:

Formulações testadas	Componentes							Água Ultrapura
	Pullulan (mg/mL)	Carbopol 980 (mg/mL)	DMSO (%)	NaOH 9%	Composto Antifúngico ( $\mu$ g/mL)			
					AND	AMB	PH157	
CONTROLE	20	0,65	0,5000	q.s	-	-	-	q.s
AND <sup>a</sup>	20	0,65	0,0625	q.s	0,5	-	-	q.s
AND <sup>b</sup>	20	0,65	0,1250	q.s	1	-	-	q.s
AMB	20	0,65	0,1000	q.s	-	2,5	-	q.s
AND/AMB	20	0,65	0,1625	q.s	0,5	2,5	-	q.s
PH157	20	0,65	0,3200	q.s	-	-	16	q.s

CONTROLE: formulação sem princípio ativo; AND<sup>a</sup>: anidulafungina (0,5  $\mu$ g/mL); AND<sup>b</sup>: anidulafungina (1  $\mu$ g/mL); AMB: anfotericina B (2,5  $\mu$ g/mL); AND/AMB: associação de anidulafungina e anfotericina B (0,5/2,5  $\mu$ g/mL); PH157: derivado de 8-hidroxiquinolina (16  $\mu$ g/mL). Preparo: Solubilizar o carbopol e o pullulan na água; adicionar o princípio ativo (previamente solubilizado em DMSO); ajustar pH com NaOH 9% (até pH 5,0-6,0).

As amostras de cateter esterilizadas, de 1 cm de comprimento, foram colocadas em tubos com 1,0 mL da formulação por um período de 10 minutos em temperatura de 25-28 °C. Após, o cateter foi removido do tubo e seco nesta mesma temperatura durante 30 minutos para a formação do filme.

Neste ensaio, três cepas foram testadas: CA CV42, CT 72A e CP RL27m. Na preparação do inóculo foram utilizadas culturas de células de *Candida* de 24 horas em SDA a 35 °C, que foram ressuspensas em água peptonada a uma concentração de  $10^6$  UFC/mL. Em seguida, 0,2 ml desta suspensão fúngica foi transferido para um tubo contendo 1,8 mL de água peptonada (diluição 1:10). As amostras de cateter são adicionadas a este tubo contendo o inóculo e incubadas por 48 horas a 35 °C. Os cateteres, então, são removidos do tubo e lavados duas vezes com 1 mL água estéril para remover as células não-aderentes. Então, são colocados em outro tubo contendo 2,0 mL de água estéril e submetido a banho de ultrassom durante 20 minutos a uma potência de 40 KHz, para desprender as células aderidas. Os mesmos procedimentos foram realizados para o cateter que foi exposto à formulação sem adição de compostos (controle não tratado). Em seguida, 10 µl foram retirados de cada tubo e realizadas diluições em série de dez vezes (até  $10^{-4}$ ). Assim como das diluições, também são removidos 10 µL diretamente do tubo de água contendo o cateter e semeados em placas SDA com incubação durante 24 horas a 35 °C. Então, foram determinadas as UFC/cm<sup>2</sup> de cateter e posteriormente o percentual de inibição da formação do biofilme em comparação com o controle não tratado. O ensaio foi realizado em triplicata.

#### **4.12. Determinação das características físico-químicas**

As características físico-químicas dos compostos como: peso molecular, número de aceptores e de doadores de ligação de hidrogênio, LogP, PSA e número de ligações rotacionáveis foram determinadas através do programa de edição molecular MarvinSketch, versão 18.18 (ChemAxon Ltd., 2018 - Budapest, Hungary).

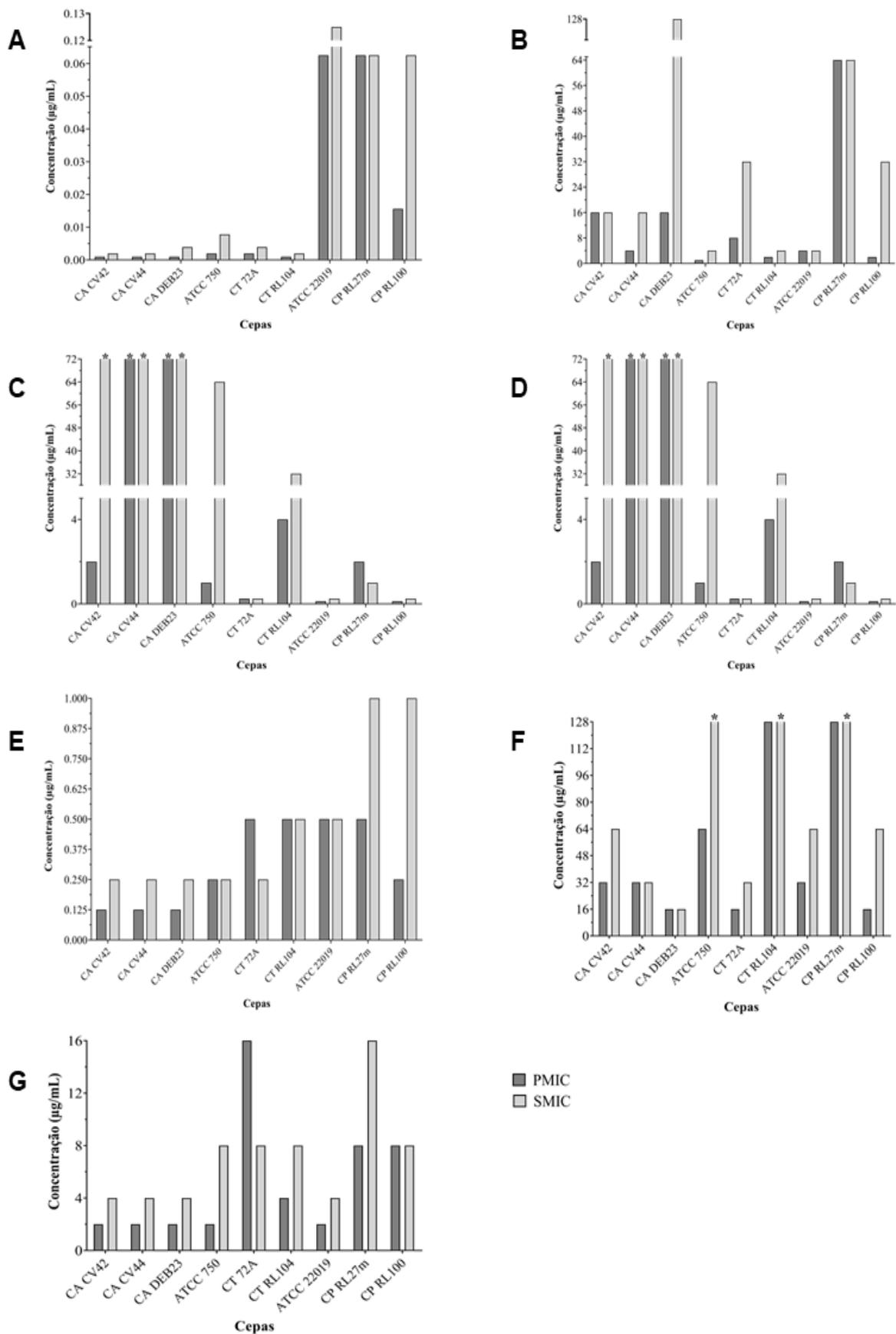
#### **4.13. Tratamento estatístico dos dados**

Os dados foram analisados por meio da Análise de Variância One-Way e do Teste Kruskal-Wallis, considerado estatisticamente significativo valor de  $p < 0,05$ . Seguidos pelo Teste de Comparações Múltiplas de Tukey e pelo Teste de

Comparações Múltiplas de Dunn, respectivamente. O teste de Mann-Whitney também foi utilizado. As análises foram realizadas utilizando o software IBM SPSS Statistics 18.0. Para realizar a determinação da correlação das características físico-químicas com a atividade dos compostos utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson, através do software R versão 3.5.1.

## 5.RESULTADOS

Os agentes antifúngicos testados estão comercialmente disponíveis, além deles, foram avaliadas duas novas moléculas inéditas. Determinamos sua concentração inibitória mínima para células planctônicas (PMICs), bem como sua concentração inibitória mínima para células sésseis (SMICs). Além destes agentes, também avaliou-se a PMIC e SMIC das duas moléculas sintéticas inéditas: um derivado de quinazolina e um derivado de 8-hidroxiquinolina. As concentrações de SMIC<sub>50</sub> e SMIC<sub>100</sub> foram, de maneira geral, maiores em comparação com o PMIC<sub>50</sub> e PMIC<sub>100</sub>, respectivamente, embora as diferenças, em alguns casos, tenham sido muito pequenas, destacando-se a cepa CP RL 27m, de *C. parapsilosis*, que apresentou iguais SMIC<sub>100</sub> e PMIC<sub>100</sub> bem como SMIC<sub>50</sub> e PMIC<sub>50</sub> para a maioria dos antifúngicos. A leitura foi realizada de acordo com o documento M27-A3 (CLSI, 2008) para células planctônicas, os intervalos de CIM encontrados foram: 0,00098-0,0625 µg/mL para AND; 1-64 µg/mL para FLZ; 0,125- > 64 µg/mL para VRZ; 0,5-32 µg/mL para KTZ, 0,125-0,5 µg/mL para AMB; 16-128 µg/mL para PH100 e 2-16 µg/mL para PH157. Apesar de não haver nada padronizado para leitura no caso de células sésseis, para fins de comparação, seguimos o mesmo padrão descrito para suas respectivas células planctônicas. Os intervalos encontrados foram: 0,00195-0,125 µg/mL para AND; 4-128 µg/mL para FLZ; 0,25- > 64 µg/mL para VRZ; 0,5-32 µg/mL para KTZ; 0,25-1 µg/mL para AMB; 16- > 128 µg/mL para PH100 e 4-16 µg/mL para PH157 (**Tabela 2 – apêndices**). A **figura 15** ilustra a diferença entre PMIC e SMIC para cada composto frente a cada cepa.



**Figura 15.** Concentração inibitória mínima dos compostos frente a células plancônicas e sésseis das cepas de *Candida* spp. (CA: *C. albicans*; CP: *C. parapsilosis*; CT: *C. tropicalis*): A) AND; B) FLZ; C) VRZ; D) KTZ; E) AMB; F) PH100; G) PH157. \* PMIC ou SMIC não identificada, superior a maior concentração testada.

A atividade exercida contra biofilmes, como a IBF e tratamento de biofilme pré-formado, BR e BMIC, avaliadas em microplacas de 96 poços demonstraram atividade superior da AND e da AMB. O pré-tratamento de superfície com AND e AMB foi efetivo, inibindo mais de 90% da formação do biofilme, numa faixa de concentração de 0,125-2 µg/mL e 1-40 µg/mL, respectivamente. Apenas para uma cepa, CP RL27m, as concentrações testadas de AND inibiram ligeiramente mais de 50%, sem chegar a 90% de atividade. O VRZ foi capaz de inibir mais de 50% do biofilme, chegando a 90% de inibição apenas para uma cepa, ATCC 750, na concentração de 40 µg/mL. Tanto o FLZ quanto o KTZ falharam em inibir mais de 90% do biofilme, mas mostraram 50% de inibição para a maioria das cepas. Dentre as moléculas sintéticas inéditas, destaca-se a atividade da PH157, que inibiu mais de 50% da formação do biofilme para todas as cepas e atingiu 90% de inibição para dois: CA DEB23 e ATCC 750, embora a PH100 não tenha alcançado 90% de inibição, inibiu a formação do biofilme em até 50% com exceção de duas cepas de *C. parapsilosis* (ATCC 22019 e CP RL27m) onde os valores obtidos foram inferiores a 50% de inibição (**Tabela 2 – apêndices**).

O tratamento do biofilme pré-formado exigiu concentrações mais elevadas, de modo que mais de 90% pudessem ser removidos. Tanto a AND quanto a AMB foram capazes de remover mais de 90% do biofilme para uma parte das cepas, em concentrações na faixa de 1-2 µg/mL e 4-40 µg/mL, respectivamente, e foram capazes de remover mais de 50% do biofilme para todas as cepas. O VRZ, nas concentrações testadas, foi capaz de remover mais de 50% do biofilme para todas as cepas, sem atingir 90% de remoção. Já o FLZ e o KTZ removeram pouco mais de 50% do biofilme apenas para algumas cepas: CA CV42, ATCC 750, ATCC 22019 e CP RL100 para o primeiro e CA CV42, CA DEB23, ATCC 750, ATCC 22019 e CP RL100 para o segundo. No caso das moléculas PH100 e PH157, ambas demonstraram capacidade de remoção de 50% do biofilme, com exceção das cepas CA CV44, CP RL27m e CP RL100 frente a molécula PH100, que apresentaram resultados inferiores a 50%. Diferentemente de AND e AMB, nas concentrações testadas os demais antifúngicos não atingiram 90% de remoção do biofilme para nenhuma cepa (**Tabela 2 - apêndices**).

Biofilmes pré-formados foram tratados com agentes antifúngicos e uma redução significativa da atividade metabólica foi observada. AND e AMB,

novamente, mostraram os melhores resultados, reduzindo mais de 90% do metabolismo do biofilme nas faixas de concentração de 0,125-2 µg/mL e 1-40 µg/mL, respectivamente. O VRZ reduziu mais de 90% do metabolismo celular de quatro cepas em concentrações de 20 µg/mL para um deles e 40 µg/mL para os demais. Além disso, o KTZ apresentou redução de mais de 90% do metabolismo para quatro cepas: CA DEB23, ATCC 750, ATCC 22019 e CP RL100, contudo, em alta concentração (320 µg/mL). Já FLZ apresentou redução maior que 90% para apenas uma cepa: ATCC 750 e atingiu mais 50% da redução do metabolismo do biofilme para todas as cepas, exceto a cepa CP RL27m. As moléculas PH100 e PH157 não obtiveram êxito em reduzir 90% da atividade metabólica, no entanto, exibiram inibição de 50% para todas as cepas, com uma única exceção, que foi a cepa CP RL27m frente a molécula PH100 (**Tabela 2 - apêndices**).

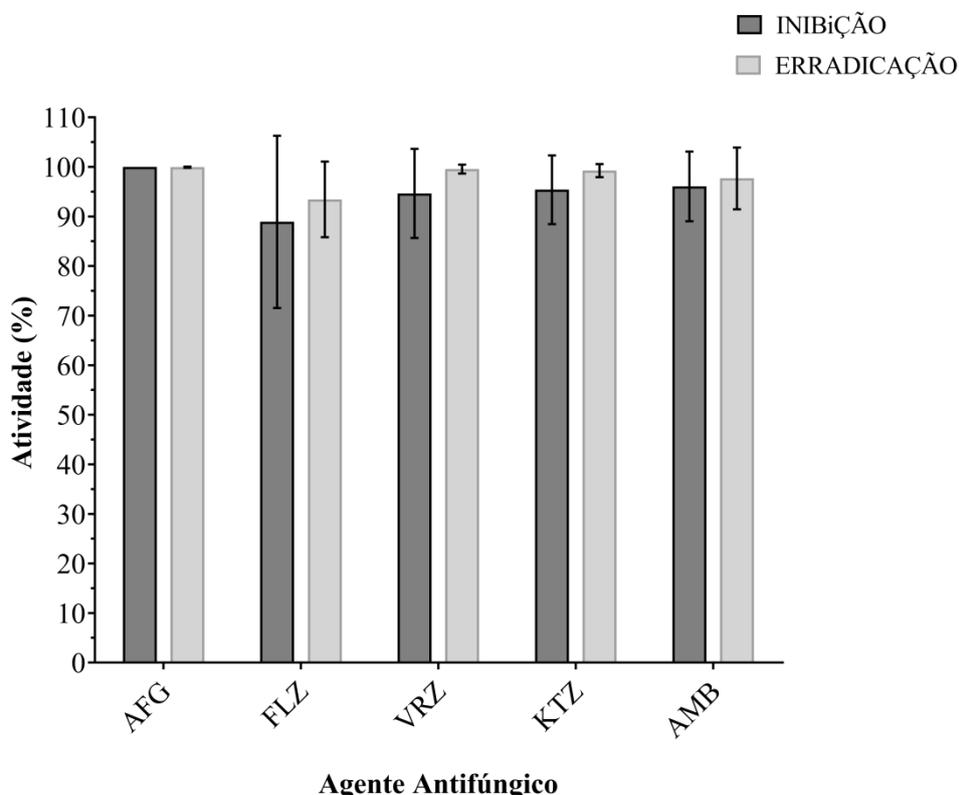
Tanto na avaliação do IBF, como do BR e do BMIC da anidulafungina, encontramos efeito paradoxal quando testada em altas concentrações ( $\geq 5$  µg/mL), ou seja, observamos uma redução na atividade contra o biofilme.

A ação dos agentes antifúngicos sobre os biofilmes formados em cateteres venosos centrais mostrou-se superior àquela avaliada em microplacas de 96 poços. A AND, na avaliação da inibição do biofilme, apresentou atividade de 100% para todas as cepas, enquanto na avaliação da erradicação do biofilme, 100% de atividade foi observada para quase todas as cepas, a única exceção foi a cepa CP RL27m (99,64%).

Na avaliação da inibição para os demais agentes antifúngicos e moléculas sintéticas, houve ampla variação entre as cepas, podendo-se destacar boa atividade da AMB (79,19-100%), VRZ (78,16-100%) e KTZ (79,73-100%). O FLZ foi menos efetivo em relação aos demais agentes antifúngicos (50-99,74%), bem como as moléculas sintéticas, que tiveram uma variação muito grande, PH100 (17,29-100%) e PH157 (27,89-100%).

Quando nos referimos à erradicação do biofilme pré-formado, a variação foi menor, entretanto, manteve-se a tendência de boa atividade da AMB (81,13-100%), VRZ (97,24-100%) e KTZ (95,88-99,84%). FLZ novamente apresentou menor desempenho em relação aos demais (81,82-100%), da mesma forma baixa atividade foi demonstrada pelas moléculas sintéticas PH100 (34,33-100%) e PH157 (34,33-99,99%) (**Tabela 3 - apêndices**). As médias de atividade (inibição e

erradicação) frente a biofilmes em cateter, com seus respectivos coeficientes de variação, podem ser observados na **Figura 16**.



**Figura 16.** Média do percentual da inibição e da erradicação do biofilme formado em cateter venoso central de poliuretano referente a cada composto, com seus respectivos coeficientes de variação. AND: anidulafungina (1 µg/mL); FLZ: fluconazol (256 µg/mL); VRZ: voriconazol (8 µg/mL); KTZ: cetoconazol (32 µg/mL); AMB: anfotericina B (8 µg/mL); PH100: derivado de quinazolina (256 µg/mL); PH157: derivado de 8-hidroxiquinolina (16 µg/mL).

Para determinar se seria possível otimizar a atividade dos dois antifúngicos com os melhores resultados obtidos em microplacas de 96 poços, a AND e a AMB, testamos a eficácia da sua combinação. Uma associação entre AND (2 µg/mL) e AMB (20 µg/mL) foi avaliada a IBF<sub>90</sub>, BR<sub>50</sub> e BMIC<sub>50</sub>. A associação apresentou um ICIF menor que 0,5, para todas as cepas nos três testes, indicando uma atividade sinérgica desta associação (**Tabela 4 – apêndices**).

A atividade sobre biofilmes formados em cateter utilizando a associação dos agentes antifúngicos, AND e AMB em menores concentrações, demonstraram aumento considerável na atividade em comparação com os agentes sozinhos. Enquanto sozinhos, AND inibiu de 52,70-75,96% e erradicou 69,71-96,97% dos biofilmes, AMB inibiu 49,78-68,12% e erradicou 61,84-96,81% dos biofilmes, quando associados, a inibição foi de 94,89-100% e a erradicação foi 99,08-100%.

Quando incorporados em uma formulação de sistema formador de filme e sua eficácia na inibição do biofilme foi avaliada, a mesma tendência foi observada. Enquanto a PH157 inibiu 40,16-99,70% em solução, em um sistema formador de filme esse intervalo foi de 42,68-78,09%, embora tenha ocorrido discrepância, a média manteve-se semelhante (69,22% e 65,69%, respectivamente). Já a AND inibiu 49,58-70,12%, AMB teve uma performance inferior, 37,71-73,49%, já a associação demonstrou significativo incremento de atividade e da eficácia, com inibição de 93,41-98,26% (**Tabela 5 – apêndices**).

As características físico-químicas dos compostos são apresentadas na **Tabela 6 (apêndices)**.

## 6. DISCUSSÃO

Os biofilmes formados por espécies de *Candida* representam um importante e grave problema na clínica, principalmente relacionado com dispositivos médicos, como cateter venoso central, e relacionado a altos índices de morbidade e mortalidade, falhas terapêuticas e custos de saúde. Atualmente, como não há medicamentos com ação específica sobre biofilme, a recomendação é a remoção dos dispositivos infectados quando há suspeita de infecção por biofilme. Porém nem sempre isso é viável e o tratamento antimicrobiano se faz necessário. Devido às limitadas opções de tratamento disponíveis, fica evidente a necessidade de identificação de novas terapias (De Cremer et al., 2015).

Devido as dificuldades correlacionadas à terapia fúngica de maneira geral, investigamos a suscetibilidade de biofilmes de *Candida* spp. frente a cinco agentes antifúngicos atualmente disponíveis e dois novos compostos sintéticos (um derivado de quinazolina – PH100 e um derivado de 8-hidroxiquinolina – PH157) e da associação de AMB e AND, na busca da melhor terapia *in vitro*, com posterior uso em uma formulação específica para revestimento de superfície como a de cateteres. A análise de correlação entre atividade em biofilme e propriedades físico-químicas foi realizada no intuito de obter variáveis que possam orientar no desenvolvimento futuro de novas moléculas com atividade direcionada aos biofilmes de *Candida* spp.

Quanto à suscetibilidade em células planctônicas e suas respectivas células sésseis, para fins de comparação, percentuais de inibição (50% ou 100%)

para os agentes antifúngicos foram determinados de acordo com documento M27-A3 (CLSI 2008). Como nesse documento não há o estabelecimento de padrões de leitura para os novos compostos, foram definidos como PMICs e SMICs valores referentes a 100% de inibição. Dessa forma, observou-se diferença entre os perfis apresentados frente à grande parte dos compostos antifúngicos testados, embora algumas diferenças sejam pequenas e não uniformes de acordo com espécie ou cepa e composto testado, bem como, são indiferentes à classificação como resistente ou sensível a este composto. Essas mudanças ocorrem devido às características e à natureza do biofilme, já que as células sésseis são fenotipicamente diferentes das células planctônicas, mesmo que provenientes da mesma cepa (Ramage et al., 2001; Giles et al., 2018). Conforme demonstrado pela literatura, pode-se observar que há uma forte tendência a uma menor suscetibilidade aos agentes antifúngicos, como posaconazol (PSZ), VRZ, itraconazol (ITZ), FLZ e equinocandinas, bem como para AMB, das células sésseis em relação às suas respectivas células planctônicas (Bouza et al., 2015; Bujdáková, 2016; Hacıoglu et al., 2018; Turan et al., 2018).

No entanto, perfis semelhantes de suscetibilidade também podem ser encontrados entre células planctônicas e suas correspondentes células sésseis (Bouza et al., 2015). Como apresentado pelo KTZ, uma exceção aos demais compostos testados, pois não houve diferenças entre os perfis de suscetibilidade de células planctônicas e sésseis para 7 das 9 cepas. Além disso, a cepa CP RL 27m apresentou valor de SMIC inferior em relação à PMIC para VRZ e a cepa 72A para AMB e PH157. Inclusive, Fujimoto e Takemoto (2018) encontraram, em um mesmo ensaio com AMB lipossomal, leituras de 50% de inibição com valores de CIM para células sésseis inferiores às CIMs de células planctônicas. No entanto, quando avaliado 80% de inibição, as células sésseis demonstraram menor suscetibilidade (Fujimoto e Takemoto, 2018).

Embora a atividade antifúngica de PH100 não tenha sido tão pronunciada, esta classe já havia demonstrado em outros estudos essa atividade frente a espécies de *Candida*, *Aspergillus* e *Cryptococcus neoformans*, com valores de CIM baixos, como por exemplo, 12,5 µg/mL (Kathiravan et al., 2012; Ajani et al., 2016). Da mesma forma, a classe das 8-HQs já havia demonstrado a capacidade de atividade antifúngica para espécies de *Candida* e fungos dermatofíticos, embora

nem todos os derivados tenham apresentado atividade tão expressiva como a PH157 (Pippi et al., 2017; Joaquim et al., 2018). Mesmo demonstrando uma tendência de menor suscetibilidade das células sésseis em relação as respectivas células planctônicas, de um modo geral, tanto PH100 quanto PH157, esta última principalmente, mantiveram a atividade antifúngica.

A composição do biofilme de *Candida* spp., formado em microplacas de poliestireno de 96 poços, apresenta diferenças relacionadas com as espécies (Silva et al., 2009). De maneira geral, os biofilmes de *C. tropicalis* apresentaram maior suscetibilidade aos compostos antifúngicos, principalmente AMB, já demonstrado anteriormente por Kawai et al. (2015), e AND. Estes biofilmes apresentam composição irregular de hifas, sendo compostos, em sua maioria, apenas por células leveduriformes grandes, ancoradas sobre a superfície, com menor quantidade de proteínas e carboidratos (Silva et al., 2009). Essa maior suscetibilidade pode estar relacionada com essa menor densidade e organização do biofilme, o que permitiria maior acesso dos agentes antifúngicos às células, onde desenvolvem sua ação. Consequentemente, ocasionando interferência na organização das múltiplas camadas formadas pelas células.

Os biofilmes de *C. parapsilosis* demonstraram menor suscetibilidade à inibição da sua formação em comparação com as outras espécies, principalmente para AND e AMB, além dos compostos PH100 e PH157. O arranjo destes biofilmes se dá por inúmeras camadas formadas por altas concentrações de células leveduriformes e pseudo-hifas, na matriz extracelular há grandes quantidades de carboidratos e pequenas quantidades de proteínas (Silva et al., 2009). A baixa atividade dos agentes antifúngicos sobre a inibição pode ser explicada devido ao fato de sua ação ser principalmente sobre as células e não propriamente sobre o quórum-sensing. Muito provavelmente esteja relacionado a alta capacidade de *C. parapsilosis* em colonizar dispositivos através da formação de biofilme (Bouza et al., 2015).

Em relação a *C. albicans*, os biofilmes apresentaram menor suscetibilidade quando avaliada a remoção e redução da atividade metabólica. Essa recalcitrância ocorreu principalmente para anfotericina B, o que já havia sido relatado por Bachmann et al. (2002), e anidulafungina, em menor proporção, também se aplica a PH100 e PH157. Biofilmes de *C. albicans* são compostos por

uma intrincada malha de células leveduriformes, hifas e pseudo-hifas, formando múltiplas camadas (Pannanusorn et al. 2013; Chandra et al., 2015). Levando em consideração a densidade, complexidade e organização dos mesmos, uma maior dificuldade dos agentes antifúngicos em alcançar as células e agir sobre elas já era esperada. A diferença na composição entre os biofilmes formados por cada espécie de *Candida* spp. faz parte de um conjunto de fatores que produziu distintas respostas aos agentes antifúngicos. Observa-se que a composição estrutural mais densa e complexa dificulta a ação sobre o biofilme. A densidade celular simples do biofilme está relacionada com a tolerância aos agentes antifúngicos, porém, a arquitetura em si do biofilme e a transição morfológica de células leveduriformes a hifas, possuem uma influência maior (Bujdáková, 2016).

Analisando os dados de uma maneira mais ampla, as PMICs inibiram percentuais da formação do biofilme inferiores a 50% para a AND, FLZ, PH100 e PH157. Embora, VRZ, KTZ e AMB tenham apresentado concentrações inferiores ou iguais as PMICs capazes de atingir a  $IBF_{50}$  para algumas cepas, estatisticamente, não demonstraram diferença em relação ao controle sem tratamento ( $p < 0,05$ ). Assim, pode-se observar que este efeito não foi proporcionalmente estendido, uma vez que concentrações muito superiores às PMICs de VCR e KTZ não atingiram a  $IBF_{90}$ , assim como para FLZ, PH100 e PH157, apenas AMB e AND obtiveram êxito. Embora Hacıoglu et al. (2018) tenham observado monoterapias antifúngicas com inibição da formação de biofilme de até 75%, nos valores de CIM, mesmo para equinocandinas e AMB, que são as terapias mais eficazes, também puderam observar o baixo ou nulo benefício apresentado pelos azóis (Ramage et al., 2014; Hacıoglu et al., 2018).

Derivados de quinazolina também já foram estudados em biofilmes, no entanto bacterianos, embora de importantes espécies hospitalares (Kamal et al., 2015). Pippi et al. (2018) demonstraram a inibição do biofilme de *Candida* spp. pela classe das 8-HQs, através do clioquinol e outros dois derivados, e embora o clioquinol tenha apresentado 90% de inibição em concentrações mais baixas, os demais derivados testados, assim como a PH157, também foram pouco ativos e mesmo em concentrações mais elevadas não atingiram inibição de 90%.

Após a adesão das células, o biofilme se desenvolve através de modificações morfológicas e aumento do número de células, além da produção de

matriz extracelular, o que influencia na estruturação final do biofilme, conseqüentemente, no perfil de suscetibilidade (Cavalheiro e Teixeira, 2018). Dessa maneira, em ensaios de remoção do biofilme, onde os compostos agem sobre o biofilme já formado, a BR<sub>50</sub> ocorreu em concentrações iguais ou menores que as PMICs apenas para uma minoria dos casos. Assim como nos ensaios de inibição, VRZ, KTZ e AMB apresentaram este comportamento e, novamente, não houve diferença estatística em relação ao controle sem tratamento ( $p < 0,05$ ). Uma vez que a erradicação de biofilmes maduros é extremamente difícil (Hacioglu et al., 2018), a recalcitrância desses biofilmes fica ainda mais evidente quando avaliada a BR<sub>90</sub>, a qual poucos compostos conseguiram atingir. Apenas AMB e AND obtiveram êxito e atingiram níveis de remoção do biofilme de 90%, para isso, foram necessárias concentrações mais elevadas e ainda assim não foram alcançados para todas as cepas testadas. Os compostos sintéticos PH100 e PH157 foram menos ativos sob o caráter de remoção do biofilme, da mesma forma Pippi et al. (2018) também demonstraram anteriormente para derivados de 8-HQ, mesmo em altas concentrações. Este efeito pode ser atribuído ao fato de que os compostos testados, provavelmente, ajam sobre o biofilme a nível celular e não sobre o quórum-sensing ou em nível de estruturação do mesmo.

Nos ensaios de redução da atividade metabólica dos biofilmes, a BMIC<sub>50</sub> pode ser observada em concentrações iguais ou menores às PMICs de AND, VRZ, KTZ, AMB, PH100 e PH157, embora para uma minoria das cepas. Entretanto, assim como nos ensaios de inibição e remoção, não diferiram estatisticamente do controle sem tratamento ( $p < 0,05$ ). Apesar da maioria dos compostos terem apresentado maior atividade redutora do metabolismo em relação à remoção do biofilme, ainda assim, AND e AMB demonstraram superioridade, alcançando BMIC<sub>90</sub> para a maioria das cepas. Pode-se observar que a AND (equinocandinas em geral) apresenta maior atividade em relação à AMB e, embora AMB também demonstre bons efeitos, são necessárias concentrações mais altas. Ainda, ambas apresentam atividade superior aos azóis (Bouza et al., 2015; Hacioglu et al., 2018). Apesar do melhor desempenho da AND, estudos de acompanhamento mostraram que não há erradicação completa do biofilme por equinocandinas e ainda apresentam cinética de morte mais lenta em relação à AMB lipossomal (Ramage et al., 2014).

Derivados de quinazolininas testados em biofilmes bacterianos demonstraram eficácia na redução da viabilidade celular, contudo, o derivado testado neste estudo (PH100) em biofilmes de *Candida* spp. teve uma atividade menos significativa, ainda que altas concentrações tenham conseguido reduzir até 50% da viabilidade celular dos biofilmes (Fleeman et al., 2017). Já o composto PH157, ainda que em doses um pouco mais altas, obteve êxito em matar pelo menos 50% das células do biofilme. Porém, mesmo nas maiores concentrações testadas, não foi capaz de atingir  $\text{BMIC}_{90}$ . Da mesma forma isso foi demonstrado por Pippi et al. (2018). Estes resultados seguem a tendência apresentada pelas PMICs destes compostos, uma vez que BMIC mede a viabilidade celular do biofilme, ou seja, a capacidade dos compostos em matar as células presentes nesta estrutura. Contudo, este efeito segue até certo ponto, a partir do qual passa a ser limitado pelo efeito de proteção conferido pela estrutura do biofilme às células.

A avaliação da suscetibilidade do biofilme fúngico sobre cateteres venosos centrais de poliuretano foi estudada através de duas abordagens, entre as mais comuns no manejo dessas infecções relacionadas a cateteres, a ALT e o tratamento do biofilme já formado (Hacioglu et al., 2018).

No ensaio de erradicação do biofilme, entre os compostos testados, novamente a AND apresentou resultados superiores aos demais (100% atividade, exceto para uma cepa sobre a qual apresentou 99,64% de erradicação). Apesar do alto coeficiente de variação (6,38% e 8,16% respectivamente), a AMB e o FLZ também demonstraram boa atividade, assim como VRZ e KTZ, no entanto, estes com uma variabilidade mais baixa em seus resultados (0,90% e 1,32% respectivamente). As moléculas, PH100 e PH157, demonstraram atividade intermediária, com médias de atividade próximas de 75% (34,33-100% e 34,33-99,99% respectivamente), porém, coeficientes de variação bastante elevados (36,16% e 34,11% respectivamente). Ainda assim, exibiram atividade superior a 90% de erradicação do biofilme para algumas cepas. Embora Pippi et al.(2018) tenham demonstrado boa atividade de erradicação de biofilmes em dispositivo intrauterino pelo derivado de 8-HQ clioquinol, este é um derivado mais potente se comparado com a PH157, uma vez que os autores apresentaram as PMICs deste composto, que são, em geral, inferiores a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Na ALT, a interação do agente antifúngico com o material pode alterar a superfície e inibir ou dificultar a adesão das células ou o agente pode ser liberado da superfície e exibir atividade inibitória sobre as células planctônicas (Bachmann et al., 2002). Todavia, a maioria dos compostos, através desta abordagem, não conseguiu agir sobre estas células de maneira a inibir consistentemente 100% da formação do biofilme. Os compostos PH100 e PH157, embora tenham exibido atividade de inibição superior a 90% para algumas cepas, a média de atividade foi mais baixa que para erradicação (17,29-100% e 27,89-100% respectivamente) e seus respectivos coeficientes de variação 64,34% e 43,97%, que foram altíssimos, seguidos pelo FLZ, que apesar da boa atividade, apresentou alta variabilidade (19,52%). VRZ, KTZ e AMB demonstraram grande capacidade em inibir a formação do biofilme, porém, os coeficientes de variação destes compostos foram razoavelmente altos (9,49%, 7,27% e 7,32% respectivamente). Logo, apesar da boa atividade, podem não obter sucesso em todos os casos, o que é suportado pela literatura, onde na prática, AMB apresentou uma taxa de sucesso sobre cateter em apenas 60% dos casos (Bouza et al., 2015).

Já a AND foi altamente eficiente na inibição da formação dos biofilmes (100%). Ainda assim, a literatura sobre ALT com equinocandinas em monoterapia, bem como com AMB, mostra que mesmo em altas concentrações, estes compostos não são capazes de apresentar ação completa (100%) sobre biofilme, o que indica a necessidade de um tratamento sistêmico combinado (Bouza et al., 2015; Bujdáková, 2016; Fujimoto e Takemoto, 2018). Apesar de AND, seguido por AMB, KTZ e VRZ, terem demonstrado os melhores resultados em cateter, o tratamento potencial para eliminar os biofilmes de *Candida* ocorre, particularmente, com o uso de equinocandinas (como a AND) e AMB (Bujdáková, 2016) e, apesar de KTZ e VRZ terem demonstrado ser alternativas de tratamento, não foram robustos em relação aos diferentes ensaios. Inúmeros autores, por meio da análise de dados *in vitro* e *in vivo* disponíveis, concluíram que equinocandinas, como micafungina (MFG) ou preferivelmente AND, AMB (AMB lipossomal ou desoxicolato AMB) e o etanol demonstram ser as estratégias mais promissoras para uso no tratamento ALT (Walraven e Lee, 2012; Bujdáková, 2016; Fujimoto e Takemoto, 2018). Entretanto não testamos o etanol devido ao potencial de incompatibilidade com cateteres de poliuretano (Walraven e Lee, 2012).

Tanto a ALT como o tratamento dos biofilmes já formados sobre os biomateriais com agentes antifúngicos demonstraram ser possíveis estratégias de combate ao biofilme. No entanto, testamos a ação sobre o cateter como um todo, superfície interna e externa, e estudos *in vivo* são necessários para confirmar estes resultados, uma vez que dos inúmeros casos de sucesso no salvamento de cateteres descritos, a terapia ALT *in vivo* avalia apenas a ação intraluminal, e, infecções por biofilme envolvendo a ponta do cateter ou a superfície externa podem contribuir para um aumento na taxa de falha. Além disso, quando associadas a infecções disseminadas, podem ser necessárias terapia antifúngica sistêmica concomitante (Nett, 2014; Fujimoto e Takemoto, 2018).

A formação de biofilme por *Candida* spp. varia dependendo do tipo de material em que cresce (Estivill et al., 2011). No contexto dessas infecções é essencial considerar o material, principalmente aqueles que se encontram mais próximos do cenário clínico (Chandra et al., 2015; Giles et al., 2018). Apesar do sucesso na erradicação do biofilme demonstrado pela grande maioria dos compostos testados, sabe-se do desafio que biofilmes maduros representam na clínica. A vantagem do poliuretano é sua capacidade de propiciar menor formação de biofilme em relação a outros materiais (Chandra et al., 2015; Giles et al., 2018; Cavalheiro e Teixeira, 2018). Isto explica resultados de “esterilização” do material com os tratamentos testados, além disso, *in vivo*, outros fatores favorecem maior formação de biofilme e baixa suscetibilidade do mesmo (Ou et al., 2017).

De uma maneira geral, observaram-se diferenças entre os resultados encontrados na atividade frente a biofilmes em microplacas de poliestireno e em cateteres de poliuretano. Os agentes antifúngicos apresentaram maior atividade frente aos biofilmes formados em cateter, uma vez que 100% de atividade foi possível para algumas cepas neste substrato, enquanto em microplacas isso não foi demonstrado. Destaca-se também a maior atividade da AND sobre os demais compostos, bem como seu menor coeficiente de variação. Basas et al. (2016) também encontraram discrepâncias entre os resultados obtidos em microplacas de poliestireno e em discos de silicone, neste último, também com destaque para a atividade superior da anidulafungina. A discrepância entre os resultados em diferentes substratos é, entre outros fatores, devido a natureza físico-química dessa superfície sobre a qual o biofilme é formado, visto que apresenta efeito sobre as

características finais deste biofilme, o que está relacionado à sua suscetibilidade (Nunes-Beltran, 2017; Cavalheiro e Teixeira, 2018). O poliuretano, assim como o silicone, também é um material utilizado na composição de cateteres e é um substrato confiável para testes de suscetibilidade de biofilmes *in vitro* (Basas et al., 2016).

Embora FLZ, VRZ e KTZ tenham demonstrado boa atividade em cateter, não se mostraram robustos, com desempenho inferior quando testados em placas de microdiluição de poliestireno. Enquanto PH100 e PH157 tiveram um desempenho inferior em microplacas de poliestireno, os perfis de atividade em cateter foram regulares, apesar dos altos coeficientes de variação. Resultados equivalentes sobre os azóis e sua menor atividade em biofilmes já é conhecida (Bachmann et al, 2002, Turan et al., 2018). Derivados de 8-HQ, como o clioquinol, possuem boa atividade sobre biofilmes de *Candida* spp. sobre dispositivos, como o dispositivo intrauterino. Contudo, em microplacas há um decréscimo dessa atividade (Pippi et al., 2018). Com destaque para a atividade da AND, bem como AMB, que apresentaram uma tendência sobre perfil de atividade em placas de microdiluição e cateter. Embora na literatura a maioria dos estudos tenha abordado apenas o parâmetro de redução de atividade metabólica em microplacas, ainda assim corroboram com os resultados gerais aqui apresentados. As equinocandinas são encontradas como os agentes antifúngicos mais ativos contra os biofilmes de *Candida* spp., seguidas pela AMB, quando usada em altas concentrações (Bachmann et al, 2002; Andes et al., 2012; Walraven e Lee, 2012; Bouza et al., 2015; Basas et al., 2016; Turan et al., 2018).

Observou-se nos ensaios de inibição da formação, como de remoção e redução da atividade metabólica dos biofilmes em microplacas de poliestireno efeito paradoxal para anidulafungina, em diferentes níveis, mas frente a todas as cepas testadas, quando utilizadas concentrações  $\geq 5$   $\mu\text{g/mL}$ . Efeitos de crescimento paradoxal foram observados por Kawai et al. (2015) para MFG sobre biofilme de *C. tropicalis* e para o fluconazol sobre biofilme de *C. parapsilosis*. Este tipo de efeito no crescimento já é conhecido para as três equinocandinas: caspofungina (CFG), MFG e AND sobre biofilmes de *Candida* spp. Ocorre mais frequentemente para biofilmes em comparação com células planctônicas, devido às elevadas concentrações de fármacos que este tipo de crescimento exige (Chamilos et al., 2007; Ramage et al., 2014; Chandra et al., 2015). Isso pode ser um grande problema, uma vez que, o uso

de altas concentrações pode ocasionar uma redução na sua atividade em oposição ao objetivo de erradicação do biofilme.

A AND e a AMB, por apresentarem os melhores resultados sobre os biofilmes, tiveram sua associação testada em microplacas e em cateter de poliuretano. A AMB foi ativa em altas concentrações, porém, nestas condições, possui um perfil de toxicidade já conhecido, em geral, não pode ser administrada numa dose suficiente para o tratamento por causa de efeitos adversos (Hamill, 2013; Fujimoto e Takemoto, 2018). No caso da anidulafungina, como já citado, há o efeito paradoxal quando em altas concentrações associado ao alto custo deste agente antifúngico (Chamilos et al., 2007). Juntamente com os diferentes mecanismos de ação apresentados por estes agentes antifúngicos, a associação torna-se uma opção necessária e viável a ser estudada. A associação apresentou ICIF menor que 0,5, tanto na inibição da formação, como na remoção e na redução da atividade metabólica dos biofilmes, para os três cepas testadas, o que indica uma associação sinérgica. Efeito de associação este, entre equinocandinas e AMB, já conhecido para células planctônicas de espécies de *Candida* (Serena et al., 2008). Enquanto Touil et al. (2018) não detectaram interações antagônicas entre AMB/CFG e AMB/VRZ, o que indica que sejam combinações úteis como novas estratégias contra infecções relacionadas ao biofilme. Embora estudos pré-clínicos sejam, geralmente, favoráveis à consideração de combinações de azólicos ou polienos com equinocandinas, os resultados dos testes pré-clínicos, porém, são frequentemente conflitantes (Patterson et al., 2016). Testamos a associação com o objetivo de avaliar o comportamento da combinação, se seria possível reduzir as concentrações e manter a atividade. Mesmo que a associação não tenha tido atividade de 100%, pudemos ver este efeito sinérgico. Assim como Valentín et al. (2016), que demonstraram redução na concentração necessária de AND quando associada a AMB para cinco espécies de *Candida* spp. Embora o uso de terapias antifúngicas combinadas ainda não seja recomendado usualmente na clínica (Tobudic et al., 2010; Gulati e Nobile, 2016; Chang et al. 2017), evidências de sinergismo *in vitro* podem significar muito no processo de determinação da terapia adequada (Tobudic et al., 2010).

Assim como em microplacas, a associação de AND e AMB também foi testada em cateter venoso central de poliuretano. Dessa forma, a atividade de

inibição testada para AND em concentrações de 1 µg/mL e de 0,5 µg/mL (100% e 37,88-75,96% respectivamente) bem como para AMB em concentração de 2,5 µg/mL (49,78-68,12%), enquanto quando testada em uma concentração de 8 µg/mL houve uma faixa de inibição de 79,19-100%, o que demonstra grande redução na atividade quando usadas concentrações menores. Quando as mesmas concentrações são testadas na erradicação dos biofilmes, essa diferença na atividade foi menor, no entanto, ainda houve redução considerável da atividade. Para AND a erradicação foi de 69,71-96,97% na concentração de 0,5 µg/mL e 99,64-100% para a concentração de 1 µg/mL. Já para AMB em concentração de 2,5 µg/mL a erradicação foi de 61,94-96,81 e para concentração de 8 µg/mL foi de 81,13-100%. Da mesma forma, Basas et al. (2016) demonstraram em discos de silicone, que a AND em concentração de 1 µg/mL conseguiu erradicar pelo menos 90% do biofilme, no entanto, quando em concentrações menores (0,125-0,25 µg/mL), a eficácia foi reduzida para em torno de 50% da erradicação. Então, a associação de AND e AMB, nas menores concentrações, foi avaliada e pode-se observar significativo acréscimo da atividade com inibição de 94,89-100% e erradicação de 99,08-100%. A MFG em tratamento ALT associada com terapia sistêmica negativou candidemia e culturas, mas resquícios de células viáveis ainda eram observados em cateter (Salinas et al., 2018), o que demonstra que 100% de atividade é um desafio, principalmente *in vivo*. No entanto, a associação com a terapia sistêmica pode potencializar esse efeito final sobre os biofilmes.

Estratégias de tratamento ALT utilizam grandes doses de compostos e sua atividade é restrita ao biofilme formado no lúmen do cateter, então, não é adequado para o combate do biofilme formado na superfície externa do cateter e nos tecidos adjacentes (Girardot e Imbert, 2016). Logo, estratégias de revestimento dos cateteres para prevenção da fixação inicial de células fúngicas (microbianas) sobre suas superfícies no intuito de evitar que o biofilme se estabeleça são importantes (Giles et al., 2018). Acerca dessas necessidades baseou-se o desenvolvimento da formulação do tipo sistema formador de filme, incorporada com AND, AMB, PH157 e AND/AMB.

O caráter promissor dessas formulações foi demonstrado através da determinação de sua capacidade de inibição da formação do biofilme e, dentre as formulações, aquela contendo a associação, bem como aquela contendo a AND em

concentração de 1 µg/mL apresentaram os melhores resultados. Estas formulações tiveram, respectivamente, coeficientes de variação intermediário e baixo, bem como percentuais de inibição acima de 90% (90,50-98,26% e 93,41-98,26%, respectivamente) e demonstraram diferença estatisticamente significativa em relação ao controle sem tratamento ( $p < 0,05$ ). Em uma ideia semelhante, Zhou et al. (2018) testaram três formulações de hidrogel antibacterianas, que foram usadas no revestimento de cateteres e mostraram atividade de até 99,6% para biofilme bacteriano. Hidrogéis de quitosana seguem o mesmo princípio sobre dispositivos médicos, muito eficazes sobre a formação de biofilmes de inúmeras espécies de *Candida*, inclusive em ensaio *in vivo* de modelo de camundongo (Bujdaková, 2016; Cavalheiro e Teixeira, 2018). Vantagens deste tipo de formulação sobre as demais é seu perfil altamente promissor, uma vez que esses sistemas formadores de filme são simples, menos irritantes para a pele, possuem resistência à remoção e maior retenção (Kathe e Kathpalia, 2017).

A formulação contendo AMB foi pouco efetiva e apresentou alta variabilidade nos percentuais de inibição entre as cepas testadas (37,71-73,49%). Além disso, não apresentou diferença estatística do controle sem tratamento ( $p < 0,05$ ). Em partes, isso se deve à dose incorporada na formulação, que foi baixa (2,5 µg/mL). Conforme já havia sido demonstrado anteriormente, AMB é ativa sobre biofilme, mas em altas concentrações. Inclusive, hidrogéis à base de dextrano contendo AMB mostraram alta capacidade antifúngica local *in vitro*, não difundindo para o meio circundante e dessa forma, reduzindo o perfil de citotoxicidade (Giles et al., 2018). Ainda, géis fungicidas contendo AMB já foram implicados no tratamento *in vivo* de cateteres vasculares envolvendo biofilmes de *Candida* (Nett, 2014).

Dentre os novos compostos, embora tenham apresentado baixa eficácia sobre biofilme, PH157 teve perfil de atividade superior em relação a PH100 e, dessa forma, foi incorporada em uma formulação de sistema formador de filme no intuito de avaliar o comportamento de sua atividade. Porém, a formulação da PH157 apresentou resultados muito semelhantes aos observados anteriormente, inclusive um resultado inferior, de quando em solução (ALT) (40,16-99,7% quando em solução e 42,68-78,09% incorporada na formulação) e não apresentou diferença estatística do controle sem tratamento ( $p < 0,05$ ).

Muitos revestimentos atuais de dispositivos anti-infecciosos esbarram na limitação dos testes *in vitro* que não fornecem um ambiente de teste realista (Giles et al., 2018). Portanto, testes *in vivo* são necessários para que se dê continuidade ao processo de aprovação para uso diário na clínica médica, dada sua relevância e caráter promissor.

Outro objetivo do estudo era baseado em desenvolver forte suporte para nortear o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos, mais precisamente contra biofilmes de *Candida* spp., bem como fornecer informações que pudessem ser usadas para nortear a escolha do tratamento mais indicado a infecções relacionadas ao biofilme. Assim, através do estudo de Lipinski et al. (1997), que destacaram a importância das previsões físico-químicas através da estrutura molecular na fase de desenvolvimento de fármacos para via oral e de outros autores, que a partir daí, passaram a estudar essa tendência de um modo mais diversificado, que baseamos parte deste estudo.

No entanto, através da análise de correlação de Pearson, avaliamos a correlação, positiva ou negativa, entre a atividade sobre o biofilme de *Candida* spp. e cada uma dessas propriedades. Porém, essa correlação não foi encontrada, ou seja, a ação dos compostos testados, como um todo, sobre o biofilme não tem influência proporcional estatisticamente significativa. Ainda que algumas classes terapêuticas específicas, como aquela relacionada a doenças infecciosas, já houvessem demonstrado consideráveis tendências de semelhança geral baseada no seu perfil de propriedades físico-químicas, como peso molecular e LogP, para atividade frente a biofilmes de *Candida* spp., a princípio, essa tendência não foi observada (Ghose et al.1999).

Os agentes antifúngicos não obedecem a RoF, referente a atividade por via oral, embora individualmente as características físico-químicas possam ter impacto sobre os efeitos biológicos dos compostos, forte influência na ligação ao alvo e ação, bem como sobre o perfil farmacocinético/farmacodinâmico e toxicológico (Ghose et al., 1999; Leeson e Springthorpe, 2007; Cerqueira et al., 2015). Entretanto, o biofilme é uma estrutura muito mais complexa, com inúmeros determinantes sobre a suscetibilidade aos compostos antifúngicos (Yousif et al., 2014; Capote-Bonato et al, 2018). A resistência encontra-se relacionada a fatores físicos, como o biofilme em si que confere proteção física, seja contra o sistema

imunológico do hospedeiro como contra agentes antifúngicos, e fatores ligados a sua composição (Chatzimoschou et al., 2011; Gulati & Nobile, 2016). Ainda, a ausência de correlação pode estar associada ao baixo n amostral, foram testados apenas sete compostos, o que não permitiu maior clareza acerca destes resultados.

## 7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que:

- ✓ As células sésseis demonstraram, de maneira geral, suscetibilidade reduzida em relação às células planctônicas;
- ✓ Há influência indireta da espécie envolvida sobre a suscetibilidade nos diferentes ensaios aos agentes antifúngicos, bem como das propriedades da superfície sobre a qual o biofilme é formado;
- ✓ A AND demonstrou superioridade sobre os demais agentes antifúngicos no combate ao biofilme de *Candida* spp.. Porém, deve-se ter cautela com a possibilidade de efeito paradoxal em aumentos de dose;
- ✓ A AMB também apresentou atividade considerável sobre os biofilmes, entretanto, em altas concentrações, o que está relacionado com toxicidade, principalmente nefrológica;
- ✓ As deficiências apresentadas pelos agentes antifúngicos podem, em parte, ser superadas pela associação de AND e AMB, que apresentaram efeito sinérgico de associação. Assim, foi demonstrado que as doses desses agentes, quando associados, podem ser reduzidas, favorecendo o perfil de toxicidade e o custo/benefício, além de reduzir a chance de ocorrência de efeito paradoxal. Ainda, de grande importância, a associação reduz o desenvolvimento de resistência, dessa forma, uma alternativa altamente promissora para a terapia de infecções relacionadas aos biofilmes de *Candida* spp.;
- ✓ Ainda alicerçado nas deficiências apresentadas pelos fármacos antifúngicos atualmente disponíveis, novas formulações, como o sistema formador de filme para revestimento de superfícies de dispositivos médicos contendo AND (1 µg/mL) e contendo a associação AND/AMB (com todas as vantagens que demonstra) apresentam alto valor promissor. Além da eficácia destas formulações, o preparo das mesmas é simples e de baixo custo, ainda, é de fácil aplicação, representando

assim, uma alternativa próspera para uso na terapêutica, como forma de prevenção do biofilme de *Candida* spp.;

✓ Embora PH100 e PH157 não tenham demonstrado alta atividade sobre biofilme, possuem boa atividade frente a células planctônicas, principalmente a PH157, e podem ter sua atividade antifúngica otimizada;

✓ As características físico-químicas são fatores individuais importantes na atividade biológica, embora em conjunto, sobre biofilmes, não apresentem correlação proporcional com a atividade desenvolvida, muito provavelmente em função da complexidade que estas estruturas apresentam e os diversos mecanismos envolvidos na resistência ao tratamento;

✓ Finalmente, o perfil farmacotécnico e de toxicidade dérmica da formulação, além de seu comportamento no uso *in vivo* precisam ser avaliados para que estas formulações avancem de modo que sejam inseridas na terapêutica de prevenção das infecções relacionadas a dispositivos médicos.

## 8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Com o objetivo de desenvolver novas terapias mais eficazes no tratamento de infecções associadas à formação de biofilme, principalmente aquelas relacionadas ao uso de dispositivos médicos, os resultados obtidos nos fornecem dados preliminares que indicam a necessidade de outros estudos para otimização dos atuais e de novos compostos, bem como complementar a segurança da informação sob aspecto clínico.

De acordo com o cenário apresentado, tem-se como perspectivas futuras:

Em relação a atividade da associação AND e AMB, em solução e dentro do sistema formador de filme, têm-se como objetivos iminentes a avaliação da atividade sobre biofilmes formados por outras espécies de *Candida*, como *C. glabrata* e demais *Candida* não-*albicans*. Embora tenham uma contribuição mais singela para o quadro destas infecções, podem, futuramente, emergir.

Ainda, para que se possa inserir o uso desta formulação na clínica, é preciso, primeiramente, a continuação dos estudos de investigação do potencial de uso clínico da associação de AND e AMB, principalmente incorporados à formulação do sistema formador de filme. Logo, é necessário avaliar seus aspectos

farmacotécnico e farmacodinâmico, perfil de toxicidade celular e irritabilidade, compatibilidade dentro da formulação e com o material do dispositivo sobre o qual será aplicado. Validações de modelos animais *in vivo* para verificar seu comportamento sobre a pele do paciente, a potência e ação de prevenção da colonização, infecção e formação de biofilme na região de inserção do dispositivo médico, como cateteres venosos. Posteriormente, ensaios clínicos. A soma de todos estes resultados aos já obtidos neste trabalho nos informa sobre a eficácia e segurança desta formulação para inserção como rotina na clínica.

Ampliar estudos acerca da PH100 e PH157, avaliação do perfil de atividade sobre outras espécies fúngicas emergentes, como *Fusarium* spp., bem como os mecanismos de ação sobre as células planctônicas e as vias pela quais ocorre sua ação nas células fúngicas. Também, possíveis associações a agentes antifúngicos atualmente disponíveis com o objetivo de minimizar o surgimento e o efeito da resistência a estes agentes, bem como ampliar a atividade e o espectro de ação, assim como dar continuidade ao processo de planejamento racional e modificações estruturais destas moléculas no intuito de otimizar sua atividade, tanto em células planctônicas como em biofilmes.

Por fim, testar a atividade de mais compostos frente aos biofilmes destas cepas, para confirmar a ausência de correlação entre propriedades físico-químicas e atividade sobre o biofilme de *Candida* spp.

## 9. REFERÊNCIAS

- Abad-Zapatero C, Champness EJ, Segall MD. 2014. Alternative variables in drug discovery: promises and challenges. *Future Medicinal Chemistry*. 6(5):577-593.
- Ajani OO, Aderohunmu DV, Umeokoro EN, Olomieja AO. 2016. Quinazoline pharmacophore in therapeutic medicine. *Bangladesh Journal of Pharmacology*. 11:716-733.
- Alonso B, Pérez-Granda MJ, Rodríguez-Huerta A, Rodríguez C, Bouza E, Guembe M. 2018. The optimal ethanol lock therapy regimen for treatment of biofilm-associated catheter infections: Results from an *in vitro* study. *Journal of Hospital Infection*. 100(3):187-195. doi: 10.1016/j.jhin.2018.04.007.
- Andes DR, Safdar N, Baddley JW, Playford G, Reboli AC, Rex JH, Sobel JD, Pappas PG, Kullberg BJ. 2012. Impact of treatment strategy on outcomes in patients

with candidemia and other forms of invasive candidiasis: a patient-level quantitative review of randomized trials. *Clinical Infectious Disease*. 54(8): 1110-1122.

Arciola CR, Campoccia D, Montanaro L. 2018. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. *Nature Reviews Microbiology*. 16:397-409.

Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW. 2012. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials*. 33(26):5967-5982. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.05.031.

Arendrup MC. 2013. *Candida* and Candidaemia, Susceptibility and Epidemiology. *Danish Medical Journal*. 60(11):B4698.

Asif M. 2014. Chemical Characteristics, Synthetic Methods, and Biological Potential of Quinazoline and Quinazolinone Derivatives. *International Journal of Medicinal Chemistry*. 1-27. doi: 10.1155/2014/395637

Babu KS, Prabhakar V, Ravindranath LK, Latha J, Nagamaddaiah KH. 2015. Quinazoline Derivatives and its Biological Significance – A Review. *International Journal of Current Trends in Pharmaceutical Research*. 3(5):997-1010.

Bachmann SP, Walle KV, Ramage G, Patterson TF, Wickes BL, Graybill JR., López-Ribot JL. 2002. *In vitro* activity of caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 46(11):3591-3596.

Bareggi SR, Cornelli U. 2010. Clioquinol: Review of its Mechanisms of Action and Clinical Uses in Neurodegenerative Disorders. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 18(1):41-46.

Basas J, Morer A, Ratia C, Martín MT, Del Pozo JL, Gomis X, Rojo-Molinero E, Torrents E, Almirante B, Gavalda J. 2016. Efficacy of anidulafungin in the treatment of experimental *Candida parapsilosis* catheter infection using an antifungal-lock technique. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 71(10):2895-2901.

Benet LZ, Hosey CM, Ursu O, Oprea TI. 2016. BDDCS, the Rule of 5 and drugability. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 101:89-98.

Bickel U. 2005. How to Measure Drug Transport across the Blood-Brain Barrier. *NeuroRx*. 2(1):15-26.

Bos R, van der Mei HC, Busscher HJ. 1999. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiology Reviews*. 23:179-230.

Bouza E, Guinea J, Guembe M. 2015. The Role of Antifungals against *Candida* Biofilm in Catheter-Related Candidemia. *Antibiotics*. 4:1-17.

Bujdáková H. 2016. Management of *Candida* biofilms – state of knowledge and new options for prevention and eradication. *Future Microbiology*. 11(22):235-251.

Calderone R, Sun N, Gay-Andrieu F, Groutas W, Weerawarna P, Prasad S, Alex D, Li D. 2014. Antifungal drug discovery: the process and outcomes. *Future Microbiology*. 9(6):791-805.

Campoy S, Adrio JL. 2017. Antifungals. *Biochemical Pharmacology*. 133:86-96.

Capote-Bonato F, Sakita KM, de Oliveira AG, Bonfim-Mendonça Pde S, Crivellenti L Z, Negri M, Svidzinski TIE. 2018. *In vitro* interaction of *Candida tropicalis* biofilm formed on catheter with human cells. *Microbial Pathogenesis*. doi: 10.1016/j.micpath.2018.09.029.

Cavalheiro M, Teixeira MC. 2018. *Candida* Biofilms: Threats, Challenges and Promising Strategies. *Frontiers in Medicine*. 5:28. doi: 10.3389/fmed.2018.00028

Cerqueira NMFSA, Gesto D, Oliveira EF, Santos-Martins D, Brás NF, Sousa SF, Fernandes PA, Ramos MJ. 2015. Receptor-based virtual screening protocol for drug discovery. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 582:56-67. doi:10.1016/j.abb.2015.05.011

Chamilos G, Lewis RE, Albert N, Kontoyiannis DP. 2007. Paradoxical Effect of Echinocandins across *Candida* Species *In Vitro*: Evidence for Echinocandin-Specific and *Candida* Species-Related Differences. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 51(6):2257-2259.

Chandra J, Mukherjee PK. 2015. *Candida* Biofilms: Development, Architecture and Resistance. *Microbiol Spectrum*. 3(4).

Chang CC, Slavin MA, Chen SCA. 2017. New developments and directions in the clinical application of the echinocandins. *Archives Toxicology*. 91:1613–1621. (B)

Chang YL, Yua SJ, Heitmanb J, Wellingtonc M, Chen YL. 2017. New facets of antifungal therapy. *Virulence*. 8(2):222-236. (A)

Chatzimoschou A, Katragkou A, Simitsopoulou M, Antachopoulos C, Georgiadou E, Walsh TJ, Roilides E. 2011. Activities of Triazole-Echinocandin Combinations against *Candida* Species in Biofilms and as Planktonic Cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 55(5):1968–1974.

Clark DE, Pickett SD. 2000. Computational methods for the prediction of “drug-likeness.” *Drug Discovery Today*. 5(2):49-58. doi:10.1016/s1359-6446(99)01451-8

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard 3rd ed.. CLSI Document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, EUA, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. CLSI Document M27-S4, Fourth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, EUA, 2012.

Costa CR, Marreto LCNL, Rocha VL, da Silva TC, Silva MdoRR. 2018. Biofilm forming capability and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. from blood. *Revista de Patologia Tropical*. 47(1):11-18.

Costa-Orlandi CB, Sardi JCO, Pitangui NS, de Oliveira HC, Scorzoni L, Galeane MC, Medina-Alarcón KP, Melo WCMA, Marcelino MY, Braz JD, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJS. 2017. Fungal Biofilms and Polymicrobial Diseases. *Journal Fungi*. 3(2). doi: 10.3390/jof3020022

Cui J, Ren B, Tong Y, Dai H, Zhang L. 2015. Synergistic combinations of antifungals and antivirulence agents to fight against *Candida albicans*. *Virulence*. 6(4):362-371.

De Cremer K, Staes I, Delattin N, Cammue BP, Thevissen K, De Brucker K. 2015. Combinatorial drug approaches to tackle *Candida albicans* biofilms. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. 13(8):973-984.

de Oliveira DS. 1986. Interação Medicamentosa: Parte II. *Caderno de Farmácia*. 2(2):97-110.

Deorukhkar SC, Saini S, Mathew S. 2014. Virulence Factors Contributing to Pathogenicity of *Candida tropicalis* and Its Antifungal Susceptibility Profile. *International Journal of Microbiology*. 1-6. doi: 10.1155/2014/456878

Enoch DA, Ludlam HA, Brown NM. 2006. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *Journal of Medical Microbiology*. 55:809-818.

Estivill D, Arias A, Torres-Lana A, Carrillo-Muñoz AJ, Arévalo MP. 2011. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. *Journal of Microbiological Methods*. 86(2):238-242.

Fernández-Ruiz M, Aguado JM, Almirante B, Lora-Pablos D, Padilla B, Puig-Asensio M, Montejo M, García-Rodríguez J, Pemán J, Rui Pérez de Pipaón M, Cuenca-Estrella M. 2014. Initial Use of Echinocandins Does Not Negatively Influence Outcome in *Candida parapsilosis* Bloodstream Infection: A Propensity Score Analysis. *Clinical Infectious Diseases*. 58(10):1413–1421.

Ferreira C, Silva S, Faria-Oliveira F, Pinho E, Henriques M, Lucas C. 2010. *Candida albicans* virulence and drug-resistance requires the O-acyltransferase Gup1p. *BMC Microbiology*. 10(1):238. doi:10.1186/1471-2180-10-238

Filho JRNC. 2014. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de óleos essenciais extraídos de *Buchenavia Tetraphylla*. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco.

Fleeman R, Van Horn KS, Barber MM, Burda WN, Flanigan DL, Manetsch R, Shaw LN. 2017. Characterizing the Antimicrobial Activity of N2,N4-Disubstituted Quinazoline-2,4-Diamines toward Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 61(6). doi: 10.1128/AAC.00059-17

Frederiksen K, Guy RH, Petersson K. 2015. The potential of polymeric film-forming systems as sustained delivery platforms for topical drugs. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 13(3):349-360.

Fuentefria AM, Pippi B, Dalla Lana DF, Donato KK, de Andrade SF. 2017. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. *Letters in Applied Microbiology*. 66(1):2-13.

Fujimoto K, Takemoto K. 2018. Efficacy of liposomal amphotericin B against four species of *Candida* biofilms in an experimental mouse model of intravascular catheter infection. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 1-7. doi: 10.1016/j.jiac.2018.08.011

García-Sosa AT, Maran U, Hetényi C. 2012. Molecular Property Filters Describing Pharmacokinetics and Drug Binding. *Current Medicinal Chemistry*. 19(11):1646-1662.

Ghose AK, Viswanadhan VN, Wendolowski JJ. 1999. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. *Journal of Combinatorial Chemistry*. 1(1):55-68.

Giles C, Lamont-Friedrich SJ, Michl TD, Griesser HJ, Coad BR. 2018. The importance of fungal pathogens and antifungal coatings in medical device infections. *Biotechnology Advances*. 36(1):264-280.

Girardot M, Imbert I. 2016. Novel strategies against *Candida* biofilms: interest of synthetic compounds. *Future Microbiology*. 11(1):69-79. doi:10.2217/fmb.15.118

Goemaere B, Becker P, Van Wijngaerden E, Maertens J, Spriet I, Hendrickx M, Lagrou K. 2017. Increasing candidemia incidence from 2004 to 2015 with a shift in epidemiology in patients pre-exposed to antifungals. *Mycoses*. 61(2):127-133.

Gonzalez-Lara MF, Sifuentes-Osornio J, Ostrosky-Zeichner L. 2017. Drugs in Clinical Development for Fungal Infections. *Drugs*. 77(14):1505-1518. (B)

González-Lara MF, Torres-González P, Cornejo-Juárez P, Velázquez-Acosta C, Martínez-Gamboa A, Rangel-Cordero A, Bobadilla-del-Valle M, Ostrosky-Zeichner L, Ponce-de-León A, Sifuentes-Osornio J. 2017. Impact of inappropriate antifungal therapy according to current susceptibility breakpoints on *Candida* bloodstream infection mortality, a retrospective analysis. *BMC Infectious Diseases*. 17(1). doi: 10.1186/s12879-017-2846-2 (A)

Gulati M, Nobile CJ. 2016. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*. 18(5):310-321.

Hacioglu M, Birteksoz Tan AS, Dosler S, Inan N, Otuk G. 2018. *In vitro* activities of antifungals alone and in combination with tigecycline against *Candida albicans* biofilms. *PeerJ*. 6:e5263. doi:10.7717/peerj.5263

- Hameed A, Al-Rashida M, Uroos M, Ali SA, Arshia, Ishtiaq M, Khan KM. 2018. Quinazoline and quinazolinone as important medicinal scaffolds: a comparative patent review (2011–2016). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 28(4):281-297.
- Hamill RJ. 2013. Amphotericin B Formulations: A Comparative Review of Efficacy and Toxicity. *Drugs*. 73(9):919-934. doi: 10.1007/s40265-013-0069-4
- Hernández-Chávez MJ, Pérez-García LA, Niño-Veja GA, Mora-Montes HM. 2017. Fungal Strategies to Evade the Host Immune Recognition. *Journal of Fungi*. 3(4):51. doi:10.3390/jof3040051
- Iñigo M, Pemán J, Del Pozo JL. 2012. Antifungal activity against *Candida* biofilms. *The International Journal of Artificial Organs*. 35(10):780-791.
- Izquierdo AA, Melhem MSC, Bonfietti LX, Tudela JLR. 2015. Susceptibility test for fungi: Clinical and Laboratorial correlations in Medical Mycology. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 57(suplemento 19):57–64
- Joaquim AR, Pippi B, de Cesare MA, Rocha DA, Boff RT, Staudt KJ, Ruaro TC, Zimmer AR, de Araujo BV, Silveira GP, Martins AF, Teixeira ML, dos Santos FP, Fuentefria AM, de Andrade SF. 2018. Rapid tools to gain insights into the interaction dynamics of new 8-hydroxyquinolines with few fungal lines. *Chemical Biology & Drug Design*. doi:10.1111/cbdd.13435
- Kadri D, Crater AK, Lee H, Solomon VR, Ananvoranich S. 2014. The potential of quinoline derivatives for the treatment of *Toxoplasma gondii* infection. *Experimental Parasitology*. 145:135-144. doi: 10.1016/j.exppara.2014.08.008
- Kamal A, Babu KS, Poornachandra Y, Nagaraju B, Ali Hussaini SM, Shaik SP, Kumar CG, Alarifi A. 2015. Efficient and green sulfamic acid catalyzed synthesis of new 1,2-dihydroquinazoline derivatives with antibacterial potential. *Arabian Journal of Chemistry*. doi: 10.1016/j.arabjc.2015.10.013
- Kanafani ZA, Perfect JR. 2008. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Clinical Infectious Diseases*. 46(1):120-128.
- Kathe K, Kathpalia H. 2017. Film forming systems for topical and transdermal drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 12(6):487-497.
- Kathiravan MK, Salake AB, Chothe AS, Dudhe PB, Watode RP, Mukta MS, Gadhwe S. 2012. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 20(19):5678-5698.
- Kawai A, Yamagishi Y, Mikamo H. 2015. *In vitro* efficacy of liposomal amphotericin B, micafungin and fluconazole against non-*albicans* *Candida* species biofilms. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 21(9):647-653.
- Kean R, Delaney C, Rajendran R, Sherry L, Metcalfe R, Thomas R, McLean W, Williams C, Ramage G. 2018. Gaining Insights from *Candida* Biofilm Heterogeneity: One Size Does Not Fit All. *Journal of Fungi*. 4(1). doi: 10.3390/jof4010012

Keller TH, Pichota A, Yin Z. 2006. A practical view of “druggability.” *Current Opinion in Chemical Biology*. 10(4):357-361. doi:10.1016/j.cbpa.2006.06.014

Kernien JF, Snarr BD, Sheppard DC, Nett JE. 2018. The interface between Fungal Biofilms and innate immunity. *Frontiers in Immunology*. 8. doi: 10.3389/fimmu.2017.01968

Khan I, Zaib S, Batool S, Abbas N, Ashraf Z, Iqbal J, Saeed A. 2016. Quinazolines and quinazolinones as ubiquitous structural fragments in medicinal chemistry: An update on the development of synthetic methods and pharmacological diversification. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 24(11):2361-2381.

Lagree K, Desai JV, Finkel JS, Lanni F. 2018. Microscopy of fungal biofilms. *Current Opinion in Microbiology*. 43:100–107.

Lamoth F, Lockhart SR, Berkow EL, Calandra T. 2018. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 73(suplemento 1):i4-i13.

Leeson PD, Davis AM. 2004. Time-related differences in the physical property profiles of oral drugs. *Journal of Medicinal Chemistry*. 47(25):6338-6348.

Leeson PD, Springthorpe B. 2007. The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nature Reviews Drug Discovery*. 6:881-890.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. 1997. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 23(1-3):3-25.

Lipner SR, Scher RK. 2018. Part II: Onychomycosis: Treatment and Prevention of Recurrence. *Journal of the American Academy of Dermatology*. doi: 10.1016/j.jaad.2018.05.1260

Lockhart SR. 2014. Current Epidemiology of *Candida* Infection. *Clinical Microbiology Newsletter*. 36(17):131-136.

Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ. 2017. Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*. 16(1):19-31.

Lu Y, Su C, Liu H. 2014. *Candida albicans* hyphal initiation and elongation. *Trends in Microbiology*. 22(12):707-714.

Mantadakis E, Pana ZD, Zaoutis T. 2018. Candidemia in children: Epidemiology, prevention and management. *Mycoses*. 61(9):614-622.

Mao X, Schimmer AD. 2008. The toxicology of Clioquinol. *Toxicology Letters*. 182(1-3):1-6.

Meanwell NA. 2011. Improving Drug Candidates by Design: A Focus on Physicochemical Properties as a Means of Improving Compound Disposition and Safety. *Chemical Research in Toxicology*. 24(9):1420-1456.

- Mitchell KF, Zarnowski R, Andes DR. 2016. The Extracellular Matrix of Fungal Biofilms. *Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health*. 21-35. doi: 10.1007/5584\_2016\_6
- Morace G, Perdoni F, Borghi E. 2014. Antifungal drug resistance in *Candida* species. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2(4):254–259.
- Nett JE. 2014. Future directions for anti-biofilm therapeutics targeting *Candida*. *Expert Review Anti-Infective Therapy*. 12(3):375–382.
- Nikawa H, Sadamorp S, Hamada T, Satou N, Okuda K. 1989. Non-specific adherence of *Candida* species to surface-modified glass. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 27:269-271.
- Núñez-Beltrán A, López-Romero E, Cuéllar-Cruz M. 2017. Identification of proteins involved in the adhesion of *Candida* species to different medical devices. *Microbial Pathogenesis*. 107:293-303.
- Oliveri V, Vecchio G. 2016. 8-Hydroxyquinolines in medicinal chemistry: A structural perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 120:252-274.
- Ou H-T, Lee T-Y, Chen Y-C, Charbonneau C. 2017. Pharmacoeconomic analysis of antifungal therapy for primary treatment of invasive candidiasis caused by *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species. *BMC Infectious Diseases*. 17(1). doi: 10.1186/s12879-017-2573-8
- Pajouhesh H, Lenz GR. 2005. Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs. *NeuroRX*. 2(4):541-553. doi:10.1602/neurorx.2.4.541
- Pannanusorn S, Fernandez V, Romling U. 2013. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection. *Mycoses*. 56(3):264-272.
- Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Zeichner LO, Kullberg BJ. 2018. Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*. 4(article number: 18026). doi:10.1038/nrdp.2018.26
- Patterson TF, Thompson GR, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, Morrison VA, Nguyen MH, Segal BH, Steinbach WJ, Stevens DA, Walsh TJ, Wingard JR, Young JH, Bennett JE. 2016. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 63(4):e1–e60. doi:10.1093/cid/ciw326
- Peng D, Li X, Liu P, Luo M, Chen S, Su K, Zhang Z, He Q, Qiu J, Li Y. 2018. Epidemiology of pathogens and antimicrobial resistance of catheter-associated urinary tract infections in intensive care units: A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Infection Control*. doi: 10.1016/j.ajic.2018.07.012
- Perea JRA. 2016. Equinocandinas: aspectos aplicados de la farmacología. *Revista Iberoamericana de Micología*. 33(3):140-144.

Perlin DS. 2014. Echinocandin Resistance, Susceptibility Testing and Prophylaxis: Implications for Patient Management. *Drugs*. 74(14):1573-1585.

Petit J, Meurice N, Kaiser C, Maggiora G. 2012. Softening the Rule of Five - where to draw the line? *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 20(18):5343-5351.

Pfaller MA. 2012. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology and Consequences for Treatment. *The American Journal of Medicine*. 125(1A):S3–S13.

Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Nagy E, Dobiasova S, Rinaldi M, Barton R, Veselov A, Global Antifungal Surveillance Group. 2007. *Candida krusei*, a Multidrug-Resistant Opportunistic Fungal Pathogen: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *Journal Of Clinical Microbiology*. 46(2):515-521.

Pippi B. 2018. Análogos da 8-Hidroxiquinolina como candidatos a agentes antimicóticos: Estudo da atividade antifúngica, mecanismos de ação e parâmetros toxicológicos. Tese (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS.

Pippi B, Lopes W, Reginatto P, Silva FÉK, Joaquim AR, Alves RJ, Silveira GP, Vainstein MH, Andrade SF, Fuentefria AM. 2018. New insights into the mechanism of antifungal action of 8-hydroxyquinolines. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 27(1):41-48. (A)

Pippi B, Machado GdeRM, Bergamo VZ, Alves RJ, Andrade SF, Fuentefria AM. 2018. Clioquinol is a promising preventive morphological switching compound in the treatment of *Candida* infections linked to the use of intrauterine devices. *Journal of Medical Microbiology*. 67(11):1655-1663. (B)

Pippi B, Merkel S, Staudt KJ, Teixeira ML, de Araújo BV, Zanette RA, Andrade SF, Fuentefria, A. M. 2019. Oral clioquinol is effective in the treatment of a fly model of *Candida* systemic infection. *Mycoses*. doi:10.1111/myc.12888

Pippi B, Reginatto P, Machado GdaRM, Bergamo VZ, Dalla Lana DF, Teixeira ML, Franco LL, Alves RJ, Andrade SF, Fuentefria AM. 2017. Evaluation of 8-Hydroxyquinoline Derivatives as Hits for Antifungal Drug Design. *Medical Mycology*. 55(7):763-773.

Prachayasittikul V, Prachayasittikul S, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. 2013. 8-Hydroxyquinolines: a review of their metal chelating properties and medicinal applications. *Drug Design, Development and Therapy*. 7:1157-1178.

Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. 2012. Fungal Biofilm Resistance. *International Journal of Microbiology*. 1-14. doi:10.1155/2012/528521

Ramage G, Robertson SN, Williams C. 2014. Strength in numbers: antifungal strategies against fungal biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 43(2):114-120.

- Ramage G, Walle KV, Wickes BL, López-Ribot JL. 2001. Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45(9):2475-2479.
- Rasteiro VMdeC, da Costa ACBP, Araújo CF, de Barros PP, Rossoni RD, Anbinder AL, Jorge AOC, Junqueira JC. 2014. Essential oil of *Melaleuca alternifolia* for the treatment of oral candidiasis induced in an immunosuppressed mouse model. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 14(1):489. doi:10.1186/1472-6882-14-489
- Robbins N, Wright GD, Cowen LE. 2016. Antifungal Drugs: The Current Armamentarium and Development of New Agents. *Microbiol Spectrum*. 4(5):903-922.
- Rudramurthy SM, Shankarnarayan SA, Dogra S, Shaw D, Mushtaq K, Paul RA, Narang T, Chakrabarti A. 2018. Mutation in the Squalene Epoxidase Gene of *Trichophyton interdigitale* and *Trichophyton rubrum* Associated with Allylamine Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 62(5):e02522-17.
- Sakita KM, Faria DR, da Silva EM, Tobaldini-Valério FK, Kioshima ES, Svidzinski TIE, Bonfim-Mendonça PdeS. 2017. Healthcare workers' hands as a vehicle for the transmission of virulent strains of *Candida* spp.: A virulence factor approach. *Microbial Pathogenesis*. 113:225-232. doi: 10.1016/j.micpath.2017.10.044
- Salinas B, Guembe M, Cussó L, Kestler M, Guinea J, Desco M, Munoz P, Bouza E. 2018. Assessment of the anti-biofilm effect of micafungin in an animal model of catheter-related candidemia. *Medical Mycology*, myy065. doi:10.1093/mmy/myy065
- Samaranayake YH, Samaranayake LP. 1994. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. *Journal Medical Microbiology*. 41(5):295-310.
- Samaranayake YH, Wu PC, Samaranayake LP, So M. 1995. Relationship between the cell surface hydrophobicity and adherence of *Candida krusei* and *Candida albicans* to epithelial and denture acrylic surfaces. *APMIS*. 103:707-713.
- Sashidhara KV, Kumar A, Bhatia G, Khan MM, Khanna AK, Saxena JK. 2009. Antidyslipidemic and antioxidative activities of 8-hydroxyquinoline derived novel ketonamine Schiffs bases. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 44(4):1813-1818.
- Scriven JE, Tenforde MW, Levitz SM, Jarvis JN. 2017. Modulating host immune responses to fight invasive fungal infections. *Current Opinion in Microbiology*. 40:95-103.
- Seghir A, Boucherit-Otmani Z, Sari-Belkharroubi L, Boucherit K. 2017. Risque infectieux lié à la formation des biofilms multi-espèces (*Candida* - bactéries) sur cathéters vasculaires périphériques Infectious risk related to the formation of multi-species biofilms (*Candida* — bacteria) on peripheral vascular catheters. *Journal de Mycologie Médicale*. 27(1):20-17.
- Serena C, Marine M, Quindos G, Carrillo AJ, Cano JF, Pastor FJ, Guarro J. 2008. *In Vitro* Interactions of Micafungin with Amphotericin B against Clinical Isolates of

*Candida* spp. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 52(4):1529-1532. doi:10.1128/aac.01097-07

Shuford JA, Piper KE, Steckelberg JM, Patel R. 2007. *In vitro* biofilm characterization and activity of antifungal agents alone and in combination against sessile and planktonic clinical *Candida albicans* isolates. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 57(3):277-281.

Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. 2009. Biofilms of non-*Candida albicans*, *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. Medical Mycology. 47(7):681-689.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiology Reviews. 36(2):288-305.

Silva S, Rodrigues CF, Araújo D, Rodrigues ME, Henriques M. 2017. *Candida* Species Biofilms' Antifungal Resistance. Journal of Fungi. 3(1):8. doi:10.3390/jof3010008

Souza CMC, Pereira Junior SA, Moraes TdaS, Damasceno JL, Amorim Mendes S, Dias HJ, Stefani R, Tavares DC, Martins CHG, Crotti AEM, Mendes-Giannini MJS, Pires RH. 2016. Antifungal activity of plant-derived essential oils on *Candida tropicalis* planktonic and biofilms cells. Medical Mycology. 54(5):515-523. doi:10.1093/mmy/myw003

Stepanovic´ S, Vukovic´ D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic´ S, C´ Irkovic´ I, Ruzicka F. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS. 115(8):891-9.

Tabara K, Szewczyk AE, Bienias W, Wojciechowska A, Pastuszka M, Oszukowska M, Kaszuba A. 2015. Amorolfine vs. ciclopirox – lacquers for the treatment of onychomycosis. Postep Derm Alergo. 32(1):40-45.

Tobudic S, Kratzer C, Lassnigg A, Graninger W, Presterl E. 2010. *In vitro* activity of antifungal combinations against *Candida albicans* biofilms. Journal of Infection and Chemotherapy. 65(2):271-274.

Touil HFZ, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K. 2018. *In vitro* activity of antifungal combinations against planktonic and sessile cells of *Candida albicans* isolated from medical devices in an intensive care department. Journal de Mycologie Médicale. 28(3):414-418.

Traba C, Liang JF. 2011. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* biofilms to reactive discharge gases. Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research. 27(7):763-772.

Treviño-Rangel RdeJ, Peña-López CD, Hernández-Rodríguez PA, Beltrán-Santiago D, González GM. 2017. Association between *Candida* biofilm-forming bloodstream isolates and the clinical evolution in patients with candidemia: An observational nine-

year single center study in Mexico. *Revista Iberoamericana de Micología*. 35(1):11-16.

Turan H, Demirbilek M. 2018. Biofilm-forming capacity of blood-borne *Candida albicans* strains and effects of antifungal agents. *Revista Argentina de Microbiología*. 50(1):62-69.

Valentín A, Cantón E, Pemán J, Fernandez-Rivero ME, Tormo-Mas MA, Martínez JP. 2016. *In vitro* activity of anidulafungin in combination with amphotericin B or voriconazole against biofilms of five *Candida* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 71(12):3449-3452.

van der Mei HC, Bos R, Busscher HJ. 1998. A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 11:213–221.

Vandeputte P, Ferrari S, Coste A. T. 2012. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. *International Journal of Microbiology*. doi: 10.1155/2012/713687

Veber DF, Johnson SR, Cheng H-Y, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. 2002. Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*. 45(12):2615-2623. doi:10.1021/jm020017n

Walraven CJ, Lee SA. 2012. Antifungal Lock Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 57(1):1-8.

Walters WP. 2012. Going further than Lipinski's rule in drug design. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 7(2):99-107.

Watanabe H, Azuma M, Igarashi K, Ooshima H. 2006. Relationship between Cell Morphology and Intracellular Potassium Concentration in *Candida albicans*. *The Journal of Antibiotics*. 59(5):281-287.

Wiktorowicz W, Markuszewski M, Kryszynski J, Kalizan R. 2002. Quantitative structure-activity relationships study of a series of imidazole derivatives as potential new antifungal drugs. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*. 59(4):295-306.

Yousif A, Jamal MA, Raad I. 2014. Biofilm-Based Central Line- Associated Bloodstream Infections. G. Donelli (ed.), *Biofilm-based Healthcare-associated Infections*, vol. I, p. 157-179. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 830.

Zahran KM, Agban MN, Ahmed SH, Hassan EA, Sabet MA. 2015. Patterns of *Candida* biofilm on intrauterine devices. *Journal of Medical Microbiology*. 64:375-381. doi:10.1099/jmm.0.000042

Zhou C, Song H, Loh J, She J, Deng L, Bo L. 2018. Grafting Antibiofilm Polymer Hydrogel film onto Catheter by SARA SI-ATRP. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 1-27. doi:10.1080/09205063.2018.1507268

Zuza-Alves DL, de Medeiros SSTQ, de Souza LBFC, Silva-Rocha WP, Francisco EC, de Araújo MCB, Lima-Neto RG, Neves JP, Melo ASdeA, Chaves GM. 2016. Evaluation of Virulence Factors *In vitro*, Resistance to Osmotic Stress and Antifungal Susceptibility of *Candida tropicalis* Isolated from the Coastal Environment of Northeast Brazil. *Frontiers in Microbiology*. 7:1783. doi: 10.3389/fmicb.2016.01783

## 10. APÊNDICES

**Tabela 2.** Efeitos de compostos antifúngicos em células planctônicas, sésseis e biofilmes de *Candida* spp.

Ensaio	Cepas	Concentração (µg/mL)													
		AND		FLZ		VRZ		KTZ		AMB		PH100		PH157	
		PMIC <sub>50</sub>	PMIC <sub>100</sub>	PMIC <sub>50</sub>	PMIC <sub>100</sub>	PMIC <sub>50</sub>	PMIC <sub>100</sub>	PMIC <sub>50</sub>	PMIC <sub>100</sub>	PMIC <sub>50</sub>	PMIC <sub>100</sub>	PMIC <sub>50</sub>	PMIC <sub>100</sub>	PMIC <sub>50</sub>	PMIC <sub>100</sub>
Suscetibilidade de Células Planctônicas	CA CV42	0,00098	0,00780	16	64	0,12500	2	0,06250	32	0,06250	0,12500	16	32	0,50000	2
	CA CV44	0,00098	0,01560	4	> 256	0,25000	> 64	2	32	0,03125	0,12500	8	32	1	2
	CA DEB23	0,00098	0,01560	16	> 256	8	> 64	0,12500	32	0,03125	0,12500	4	16	1	2
	ATCC 750	0,00195	0,01560	1	8	0,12500	1	0,06250	8	0,06250	0,25000	8	64	1	2
	CT 72A	0,00195	0,00391	8	128	0,03125	0,25000	0,12500	4	0,06250	0,50000	8	16	4	16
	CT RL104	0,00098	0,00391	2	8	0,50000	4	4	16	0,12500	0,50000	16	128	1	4
	ATCC 22019	0,06250	0,25000	4	8	0,03125	0,12500	0,12500	0,50000	0,06250	0,50000	8	32	1	2
	CP RL27m	0,06250	0,12500	64	128	0,50000	2	0,12500	1	0,06250	0,50000	32	128	2	8
CP RL100	0,01560	0,03125	2	32	0,06250	0,12500	0,12500	2	0,06250	0,25000	2	16	0,50000	8	
Suscetibilidade de Células Sésseis		SMIC <sub>50</sub>	SMIC <sub>100</sub>	SMIC <sub>50</sub>	SMIC <sub>100</sub>	SMIC <sub>50</sub>	SMIC <sub>100</sub>	SMIC <sub>50</sub>	SMIC <sub>100</sub>	SMIC <sub>50</sub>	SMIC <sub>100</sub>	SMIC <sub>50</sub>	SMIC <sub>100</sub>	SMIC <sub>50</sub>	SMIC <sub>100</sub>
	CA CV42	0,00195	0,01560	16	> 256	0,12500	> 64	8	32	0,12500	0,25000	32	64	2	4
	CA CV44	0,00195	0,01560	16	> 256	4	> 64	16	32	0,12500	0,25000	16	32	1	4
	CA DEB23	0,00391	0,03125	128	> 256	32	> 64	4	32	0,06250	0,25000	4	16	1	4
	ATCC 750	0,00781	0,03125	4	32	0,50000	64	0,12500	8	0,12500	0,25000	32	> 64	4	8
	CT 72A	0,00391	0,01560	32	256	0,06250	0,25000	0,50000	4	0,06250	0,25000	16	32	4	8
CT RL104	0,00195	0,01560	4	64	4	32	1	16	0,12500	0,50000	16	> 128	4	8	

ATCC 22019	0,12500	0,50000	4	16	0,06250	0,25000	0,12500	0,50000	0,12500	0,50000	8	64	1	4
CP RL27m	0,06250	0,12500	64	128	0,50000	1	0,12500	1	0,06250	1	16	> 128	4	16
CP RL100	0,06250	0,12500	32	256	0,06250	0,25000	0,25000	4	0,25000	1	16	64	1	8

	<b>IBF<sub>50</sub></b>	<b>IBF<sub>90</sub></b>												
CA CV42	0,01560	0,25000	64	> 640	2	> 40	16	> 320	0,25000	4	256	> 256	8	160
CA CV44	0,03125	0,50000	128	> 640	4	> 40	32	> 320	0,50000	20	256	> 256	16	> 160
CA DEB23	0,06250	0,50000	64	> 640	2	> 40	16	> 320	0,25000	4	256	> 256	8	160
ATCC 750	0,00781	0,125000	64	> 640	0,50000	40	32	> 320	0,06250	1	128	> 256	8	160
CT 72A	0,01560	0,25000	320	> 640	1	> 40	320	> 320	0,12500	4	256	> 256	8	> 160
CT RL104	0,00781	0,25000	320	> 640	1	> 40	320	> 320	0,25000	2	256	> 256	16	> 160
ATCC 22019	0,12500	2	256	> 640	0,25000	> 40	8	> 320	0,25000	4	> 256	> 256	80	> 160
CP RL27m	0,12500	> 2	> 640	> 640	2	> 40	320	> 320	2	40	> 256	> 256	160	> 160
CP RL100	0,12500	1	256	> 640	0,50000	> 40	32	> 320	1	20	256	> 256	80	> 160

	<b>BR<sub>50</sub></b>	<b>BR<sub>90</sub></b>												
CA CV42	1	> 2	640	> 640	8	> 40	320	> 320	2	> 40	256	> 256	160	> 160
CA CV44	2	> 2	> 640	> 640	20	> 40	> 320	> 320	8	> 40	> 256	> 256	160	> 160
CA DEB23	1	> 2	> 640	> 640	2	> 40	16	> 320	8	> 40	256	> 256	16	> 160
ATCC 750	0,06250	1	128	> 640	1	> 40	160	> 320	0,12500	4	256	> 256	16	> 160
CT 72A	0,25000	2	> 640	> 640	2	> 40	> 320	> 320	0,50000	8	> 256	> 256	80	> 160
CT RL104	0,12500	1	> 640	> 640	4	> 40	> 320	> 320	1	8	256	> 256	16	> 160
ATCC 22019	0,25000	2	320	> 640	1	> 40	160	> 320	1	20	256	> 256	80	> 160
CP RL27m	0,50000	> 2	> 640	> 640	4	> 40	> 320	> 320	4	> 40	> 256	> 256	160	> 160

	CP RL100	0,50000	> 2	640	> 640	2	> 40	160	> 320	2	40	> 256	> 256	80	> 160
		<b>BMIC<sub>50</sub></b>	<b>BMIC<sub>90</sub></b>												
	CA CV42	0,25000	2	640	> 640	4	> 40	160	> 320	2	40	256	> 256	80	> 160
	CA CV44	0,25000	> 2	640	> 640	8	> 40	320	> 320	2	> 40	256	> 256	160	> 160
	CA DEB23	0,25000	2	640	> 640	0,5	40	4	320	2	40	256	> 256	16	> 160
<b>Suscetibilidade do Biofilme</b>	ATCC 750	0,01560	0,12500	32	640	0,5	40	16	320	0,06250	1	64	> 256	8	> 160
	CT 72A	0,01560	0,12500	256	> 640	1	> 40	160	> 320	0,25000	4	256	> 256	16	> 160
	CT RL104	0,03125	0,25000	320	> 640	4	> 40	320	> 320	0,50000	8	256	> 256	16	> 160
	ATCC 22019	0,06250	2	256	> 640	0,25000	40	4	320	0,25000	2	128	> 256	8	> 160
	CP RL27m	0,25000	> 2	> 640	> 640	2	> 40	32	> 320	2	> 40	> 256	> 256	80	> 160
	CP RL100	0,12500	1	128	> 640	1	20	8	320	0,50000	4	256	> 256	16	> 160

AND: anidulafungina; FLZ: fluconazol; VRZ: voriconazol; KTZ: cetoconazol; AMB: anfotericina B; PH100: derivado de quinazolina; PH157: derivado de 8-hidroxiquinolina.

CA: *C. albicans*; CP: *C. parapsilosis*; CT: *C. tropicalis*.

PMIC<sub>50</sub> e PMIC<sub>100</sub>: menor concentração capaz de inibir 50% e 100% do crescimento das células planctônicas, respectivamente.

SMIC<sub>50</sub> e SMIC<sub>100</sub>: menor concentração capaz de inibir 50% e 100% do crescimento das células sésseis, respectivamente.

IBF<sub>50</sub> e IBF<sub>90</sub>: concentração capaz de inibir 50% e 90% da formação de biofilme, respectivamente.

BR<sub>50</sub> e BR<sub>90</sub>: concentração capaz de remover 50% e 90% do biofilme formado, respectivamente.

BMIC<sub>50</sub> e BMIC<sub>90</sub>: concentração capaz de inibir 50% e 90% do metabolismo celular do biofilme, respectivamente.

**Tabela 3.** Efeitos dos compostos antifúngicos sobre os biofilmes de *Candida* spp. na superfície do cateter venoso central de poliuretano.

Ensaio	Cepas	UFC/cm <sup>2</sup>								Atividade em Biofilme (%)						
		AND	FLZ	VRZ	KTZ	AMB	PH100	PH157	Controle	AND	FLZ	VRZ	KTZ	AMB	PH100	PH157
<b>Inibição da Formação do Biofilme</b>	CA CV42	0	1146	0	0	0	2826	18189	56518	100	97,97	100	100	100	95,00	67,82
	CA CV44	0	20821	9095	4384	549	3110	30030	41643	100	50,00	78,16	89,47	98,68	92,53	27,89
	CA DEB23	0	3560	1146	1444	25	3479	19593	56796	100	93,73	97,98	97,46	99,96	93,87	65,50
	ATCC 750	0	0	0	303	0	0	0	4486	100	100	100	93,24	100	100	100
	CT 72A	0	120119	80905	1516	8329	66104	238346	398299	100	69,84	79,69	99,62	97,91	83,40	40,16
	CT RL104	0	2082	4486	1312	12	60631	165260	300297	100	99,31	98,51	99,56	100	79,81	44,97
	ATCC 22019	0	1444	7	7	4384	27310	20	45473	100	96,83	99,98	99,98	90,36	39,94	99,96
	CP RL27m	0	2623	0	3305	208214	777161	3003	1000405	100	99,74	100	99,67	79,19	22,32	99,70
	CP RL100	0	100365	33505	288735	18189	1177908	954209	1424164	100	92,95	97,65	79,73	98,72	17,29	33,00
<b>Média</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	88,93	94,66	95,41	96,09	60,53	67,64
<b>Coefficiente de Variação</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	19,52	9,49	7,27	7,32	64,34	43,97
<b>Erradicação do Biofilme</b>	CA CV42	0	9095	7	909	4	1	6	86987	100	89,54	100	98,95	99,99	100	99,99
	CA CV44	0	1555	6	9.39	0	3609	909	8554	100	81,82	99,93	99,89	100	57,81	89,37
	CA DEB23	0	3585	11	9244	0	3510	6969	224292	100	98,40	100	95,88	100	98,43	96,89
	ATCC 750	0	4	0	4	0	13	6	2082	100	99,79	100	99,79	100	99,39	99,70
	CT 72A	0	1041	3235	573	4	66630	263692	587448	100	99,82	99,45	99,90	100	88,66	55,11
	CT RL104	0	3560	1312	909	2383	218045	189175	372569	100	99,04	99,65	99,76	99,36	41,48	49,22
	ATCC 22019	0	0	0	3	0	5	5	5950	100	100	100	99,94	100	99,91	99,92
	CP RL27m	1819	90193	13944	3211	5319	332232	332232	297600	99,64	82,17	97,24	99,37	98,95	34,33	34,33
	CP RL100	0	722	4	6	1444	3211	2917	7649	100	90,56	99,94	99,92	81,13	58,03	61,86
<b>Média</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99,96	93,46	99,58	99,26	97,7	75,34	76,27
<b>Coefficiente de Variação</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,12	8,16	0,90	1,32	6,38	36,16	34,11

AND: anidulafungina (1 µg/mL); FLZ: fluconazol (256 µg/mL); VRZ: voriconazol (8 µg/mL); KTZ: cetoconazol (32 µg/mL); AMB: anfotericina B (8 µg/mL); PH100: derivado de quinazolina (256 µg/mL); PH157: derivado de 8-hidroxiquinolina (16 µg/mL); Controle: sem tratamento.

CA: *C. albicans*; CP: *C. parapsilosis*; CT: *C. tropicalis*.

UFC/cm<sup>2</sup>: unidades formadoras de colônias por centímetro quadrado de área do cateter.

**Tabela 4.** Efeitos da combinação de anidulafungina e anfotericina B em biofilmes de *Candida* spp. pelo teste *Checkerboard*.

Ensaio	Cepas	Concentração (µg/mL)			ICIF	Resultado
		IBF <sub>90</sub> AND	IBF <sub>90</sub> AMB	IBF <sub>90</sub> AND/AMB		
Inibição da Formação do Biofilme	CA CV42	2	40	0,5/2,5	0,31250	Sinérgica
	CT 72A	2	40	0,25/2,5	0,18750	Sinérgica
	CP RL27m	4	40	0,5/2,5	0,18750	Sinérgica
Remoção do Biofilme		BR <sub>50</sub> AND	BR <sub>50</sub> AMB	BR <sub>50</sub> AND/AMB	ICIF	Resultado
	CA CV42	2	20	0,5/2,5	0,37500	Sinérgica
	CT 72A	2	80	0,5/2,5	0,28125	Sinérgica
	CP RL27m	2	40	0,5/2,5	0,31250	Sinérgica
Suscetibilidade do Biofilme		BMIC <sub>50</sub> AND	BMIC <sub>50</sub> AMB	BMIC <sub>50</sub> AND/AMB	ICIF	Resultado
	CA CV42	2	20	0,5/2,5	0,37500	Sinérgica
	CT 72A	2	20	0,5/2,5	0,37500	Sinérgica
	CP RL27m	2	40	0,5/2,5	0,31250	Sinérgica

AND: anidulafungina; AMB: anfotericina B.

CA: *C. albicans*; CP: *C. parapsilosis*; CT: *C. tropicalis*.

IBF<sub>90</sub> AND e IBF<sub>90</sub> AMB: concentração de AND e AMB capaz de inibir 90% da formação de biofilme, respectivamente.

IBF<sub>90</sub> AND/AMB: concentração de cada agente antifúngico que, em combinação, promove 90% de inibição da formação de biofilme.

BR<sub>50</sub> AND e BR<sub>50</sub> AMB: concentração de AND e AMB capaz de remover 50% do biofilme pré-formado, respectivamente.

BR<sub>50</sub> AND/AMB: concentração de cada agente antifúngico que, em combinação, promove a remoção de 50% do biofilme pré-formado.

BMIC<sub>50</sub> AND e BMIC<sub>50</sub> AMB: concentração de AND e AMB capaz de reduzir 50% da atividade metabólica do biofilme pré-formado, respectivamente.

BMIC<sub>50</sub> AND/AMB: concentração de cada agente antifúngico que, em combinação, é capaz de reduzir 50% da atividade metabólica do biofilme pré-formado.

ICIF: Índice de Concentração Inibitória Fracionária.

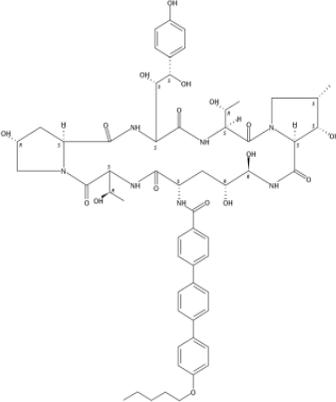
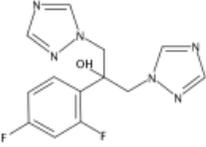
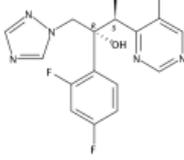
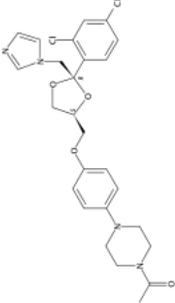
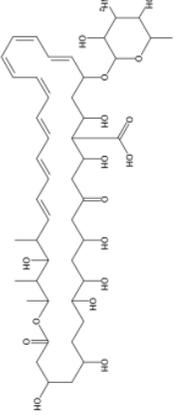
**Tabela 5.** Efeito dos compostos antifúngicos isolados e sua combinação, em solução e em uma formulação de um sistema formador de filme sobre biofilmes de *Candida* spp. na superfície do cateter venoso central de poliuretano.

Ensaio	Cepas	Atividade em Biofilme (%)									
		Solução					Sistema Formador de Filme				
		AND <sup>a</sup>	AND <sup>b</sup>	AMB	AND/AMB	PH157	AND <sup>a</sup>	AND <sup>b</sup>	AMB	AND/AMB	PH157
Inibição da Formação do Biofilme	CA CV42	37,88	100	59,00	100	67,82	70,12	98,26	64,85	98,26	78,09
	CT 72A	52,70	100	49,78	94,89	40,16	49,58	90,50	37,71	93,41	42,68
	CP RL27m	75,96	100	68,12	95,13	99,70	60,37	92,54	73,49	94,62	76,29
<b>Média</b>		63,88	100	58,97	96,67	69,22	60,03	93,77	58,68	95,43	65,69
<b>Coefficiente de Variação</b>		18,25	0	15,55	2,98	43,04	17,12	4,29	31,81	2,64	30,36
Erradicação do Biofilme	CA CV42	96,97	100	96,81	100	99,99	-	-	-	-	-
	CT 72A	69,71	100	61,84	99,91	55,11	-	-	-	-	-
	CP RL27m	94,46	99,64	93,90	99,08	34,33	-	-	-	-	-
<b>Média</b>		87,05	99,96	84,18	99,66	76,27	-	-	-	-	-
<b>Coefficiente de Variação</b>		17,30	0,12	23,05	0,51	34,11	-	-	-	-	-

AND<sup>a</sup>: anidulafungina (0,5 µg/mL); AND<sup>b</sup>: anidulafungina (1 µg/mL); AMB: anfotericina B (2,5 µg/mL); AND/AMB: associação de anidulafungina e anfotericina B (0,5/2,5 µg/mL); PH157: derivado de 8-hidroxiquinolina (16 µg/mL).

CA: *C. albicans*; CP: *C. parapsilosis*; CT: *C. tropicalis*.

Tabela 6. Características físico-químicas dos compostos antifúngicos.

Características Físico-Químicas	Composto Antifúngico						
	AND	FLZ	VRZ	KTZ	AMB	PH100	PH157
Estrutura Molecular						Sob Patente	Sob Patente
LogP	1,46	0,56	1,82	4,19	- 0,04	5,34	3,52
MW (g/mol)	1140,254	306,277	349,317	531,430	924,091	326,403	369,220
HBA	17	5	5	6	17	4	4
HBD	14	1	1	0	12	2	2
PSA (Å)	377,42	81,65	76,72	69,06	319,61	49,84	79,29
RB	14	5	5	7	3	5	2

AND: anidulafungina; FLZ: fluconazol; VRZ: voriconazol; KTZ: cetoconazol; AMB: anfotericina B.

LogP: coeficiente de partição de uma substância entre uma fase orgânica e uma fase aquosa.

MW: Peso Molecular.

HBA: Aceptores de Ligação de Hidrogênio.

HBD: Doadores de Ligação de Hidrogênio.

PSA: Área de Superfície Polar.

RB: Ligações Rotacionáveis.

Estruturas obtidas através do SciFinder<sup>®</sup>.