

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

ROBERTA STEFANELLO DE JESUS

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE FUNGOS EMERGENTES E  
SUA SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS NA FORMA LIVRE E  
NANOENCAPSULADA**

PORTO ALEGRE

2013

ROBERTA STEFANELLO DE JESUS  
FARMACÊUTICA

**AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE FUNGOS EMERGENTES E  
SUA SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS NA FORMA LIVRE E  
NANOENCAPSULADA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Microbiologia do Ambiente

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Irene Cledes Kulkamp Guerreiro

PORTO ALEGRE

2013

CIP - Catalogação na Publicação

de Jesus, Roberta Stefanello

Avaliação da formação de biofilme de fungos emergentes e sua susceptibilidade a antifúngicos na forma livre e nanoencapsulada / Roberta Stefanello de Jesus. -- 2013.  
117 f.

Orientador: Alexandre Meneghello Fuentefria.  
Coorientadora: Irene Clemes Kulkamp Guerreiro.

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, 2013.

1. Fungos emergentes. 2. Biofilmes. 3. Susceptibilidade antifúngica. 4. Microdiluição em caldo. 5. Nanopartículas poliméricas. I. Fuentefria, Alexandre Meneghello, orient. II. Guerreiro, Irene Clemes Kulkamp, coorient. III. Título.

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

## AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar os meus caminhos na descoberta do “fascinante mundo dos fungos filamentosos e das leveduras”.

À minha família, que sempre me incentivou para que eu continuasse me aperfeiçoando na profissão que escolhi, em especial ao meu pai, ao meu irmão e à minha mãe, por ser um belíssimo exemplo de dedicação ao ensino.

À minha avó Maria pelas orações para que tudo desse certo.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Alexandre Meneghello Fuentesfria, pela oportunidade de realização do mestrado.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Irene Cledes Kulkamp Guerreiro e à bolsista Patrícia pelas contribuições na parte da nanotecnologia.

Ao Robson pelo auxílio na identificação de algumas leveduras.

À amiga Elaine, por toda a ajuda e suporte durante este período.

Aos queridos amigos que fiz durante o mestrado, em especial à Rosana, Dariane, Amanda, Jéssica, Jacque, Thaís, Débora, Cris, Grazi, Simone e Suellen pelo apoio, auxílio prestado e incentivo, que foram essenciais na concretização deste trabalho.

À Tati e à Leila, pela amizade, pelos chopes e risadas nos finais de tarde, além dos conselhos sobre micologia.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Laerte Ferreira, pelo grande aprendizado proporcionado nas idas à Faculdade de Veterinária da UFRGS.

Ao Flávio, ao Prof<sup>o</sup> Dr. Luiz Carlos Severo e a todo o pessoal do Laboratório de Micologia da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, por terem me dado o

privilégio de estagiar em seu laboratório e pelos seus valiosos ensinamentos, fazendo com que o meu encantamento pela micologia aumentasse ainda mais.

Ao Prof<sup>o</sup> Dr. Alessandro Pasqualotto, pela gentileza em ceder alguns de seus isolados de *Aspergillus* para que pudessem ser utilizados neste estudo.

A todos os demais colegas e amigos que passaram pelo Laboratório de Micologia Aplicada da FacFar-UFRGS ao longo deste período.

Aos funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da UFRGS, e também do departamento de Análises da Faculdade de Farmácia, pelo apoio e ensinamentos.

À CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado.

Enfim, a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para que este projeto se realizasse, os meus sinceros agradecimentos.

# AValiação da formação de biofilme de fungos emergentes e sua susceptibilidade a antifúngicos na forma livre e nanoencapsulada<sup>1</sup>

Autora: Roberta Stefanello de Jesus  
Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Irene Cledes Kulkamp Guerreiro

## RESUMO

Nos últimos anos, várias espécies de fungos, até então conhecidos como saprófitas do ambiente, têm emergido como importantes patógenos na prática clínica, associados muitas vezes com a resistência aos antimicrobianos disponíveis comercialmente. Dessa forma, o conhecimento de aspectos relacionados à patogenicidade desses microorganismos, como a formação de biofilme, assim como o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos e a novas alternativas terapêuticas faz-se necessário. Uma importante tecnologia neste contexto é a utilização de sistemas nanoestruturados a partir de polímeros biodegradáveis para a veiculação de fármacos. Este trabalho visa verificar em isolados fúngicos emergentes a expressão fenotípica de biofilme através do teste em microplaca de poliestireno e o perfil de susceptibilidade frente a antifúngicos na forma livre e incorporados em sistemas nanoestruturados, através da técnica de microdiluição em caldo. Foram selecionados para o estudo 82 isolados fúngicos potencialmente patogênicos, sendo 26 oriundos do ambiente e 56 procedentes de espécimes clínicos. Quanto à capacidade de formação de biofilme verificou-se que 68 (82,9%) isolados produziram biofilme pelo teste da microplaca, sendo 38 classificados como fortes, 17 como moderados e 13 como fracos produtores. Além disso, observou-se que os isolados clínicos apresentaram maior capacidade de formação de biofilme do que os isolados ambientais. Não houve correlação entre a produção de biofilme e a susceptibilidade aos antifúngicos testados nas células planctônicas. De um modo geral, os fungos foram sensíveis à maioria dos antifúngicos testados neste trabalho. Entretanto, o fluconazol apresentou baixa atividade ( $CIM \geq 64 \mu\text{g/mL}$ ) para 45% dos isolados avaliados. Com o intuito de investigar o efeito de cetoconazol e de fluconazol associados a nanoestruturas

sobre os diferentes fungos apresentados no estudo, também foram desenvolvidas nanocápsulas de poli- $\epsilon$ -caprolactona contendo estes fármacos. Análises físico-químicas das nanoestruturas revelaram tamanho médio de partícula variando de 206 nm para as nanocápsulas de cetoconazol (CN) e de 211 nm para as nanocápsulas de fluconazol (FN). Ambas as formulações apresentaram características homogêneas e demonstraram estruturas monodispersas. A eficiência de encapsulação do cetoconazol e do fluconazol nas formulações foi de 86,35 e de 80,5%, respectivamente. Os diversos gêneros investigados parecem se comportar de maneira diferente quando expostos às nanoestruturas dos dois fármacos em estudo, sugerindo que as espécies de *Candida* poderiam apresentar uma maior susceptibilidade *in vitro* frente a estas nanoestruturas quando comparadas à forma livre dos antifúngicos em questão. Os resultados obtidos demonstram a potencialidade destas formulações para a veiculação de cetoconazol e fluconazol. Como perspectivas, sugere-se a realização de estudos adicionais para evidenciar o efeito *in vitro* das nanopartículas sobre os diferentes fungos de importância clínica e ambiental.

Palavras-chave: Fungos emergentes; Biofilmes; Susceptibilidade antifúngica; Microdiluição em caldo; Antifúngicos; Nanopartículas poliméricas.

<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 (117 p.). Fevereiro, 2013.

# ASSESSMENT OF BIOFILM FORMATION OF EMERGING FUNGI AND THEIR SUSCEPTIBILITY TO ANTIFUNGAL AGENTS IN FREE FORM AND IN NANOCAPSULES<sup>1</sup>

Author: Roberta Stefanello de Jesus  
Advisor: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria  
Co-advisor: Prof. Dra. Irene Cledes Kulkamp Guerreiro

## ABSTRACT

In recent years, several fungal species known as environmental saprophytes have emerged as important pathogens in clinical practice, often associated with antimicrobial resistance commercially available. Thus, the knowledge of aspects related to these pathogenic micro-organisms, such as biofilm formation, as well as the profile of susceptibility to antifungal agents and new therapeutic options is necessary. An important technology in this context is the use of nanostructured materials from biodegradable polymers for the placement of drugs. This work aims to examine the emerging fungal isolates in the phenotypic expression of biofilm through the test on polystyrene microplate and the susceptibility profile to antifungals front in the free trade and in the nanostructured systems by the broth microdilution method. In this study, 82 potentially pathogenic fungal isolates were selected, being the 26 from environment originating and the 56 from the clinical specimens. Regarding the ability of biofilm formation was found that 68 (82,9%) isolates produced biofilm by the microplate assay. The isolates were classified as 38 strong, 17 moderate and 13 weak biofilm producers. Moreover, it was noted that clinical isolates showed greater capability for the biofilm formation than the environmental isolates. There was no correlation between the biofilm production and the susceptibility to antifungal agents tested in planktonic cells. In general, the fungi were susceptible of the majority of the antifungal agents tested in this study. However, the fluconazole showed low activity ( $MIC \geq 64 \mu\text{g/mL}$ ) for 45% of the isolates. In order to investigate the effect of the ketoconazole and the fluconazole associated with nanostructures against different fungi contained in the study, polymeric nanocapsules have also been developed containing



these drugs. Physicochemical analyzes showed an average size of nanostructures ranging from 206 nm for the nanocapsules of ketoconazole (CN), and 211 nm for the fluconazole (FN). The formulations showed homogeneous characteristics and demonstrated monodisperse structures. The encapsulation efficiency of ketoconazole and fluconazole in the formulations was 86,35 and 80,5%, respectively. The diverse genera investigated appear to behave differently when exposed to the nanostructures of the two drugs have being studied, suggesting that *Candida* species could exhibit a greater sensitivity to these nanostructures compared to the free form of antifungal concerned. The results demonstrate the potential of the formulations for the delivery of fluconazole and ketoconazole. As perspectives, we suggest further studies to demonstrate the *in vitro* effect of the nanoparticles against different fungi from the clinical and the environmental importance.

Keywords: Emerging fungi; Biofilms; Antifungal susceptibility; Broth microdilution method; Antifungal agents; Polymeric nanoparticles.

<sup>1</sup>Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (117 p.). February, 2013.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Modelo de desenvolvimento de biofilme em bactérias, leveduras e fungos filamentosos.....	14
<b>Figura 2.</b>	Leitura do ensaio de microdiluição em caldo após aplicação de resazurina.....	27
<b>Figura 3.</b>	Representação esquemática da preparação de nanocápsulas poliméricas pelo método de deposição interfacial de polímeros pré-formados.....	30
<b>Figura 4.</b>	Fenótipo de formação de biofilme em porcentagem dos isolados leveduriformes em comparação aos isolados de fungos filamentosos.....	49
<b>Figura 5.</b>	Fenótipo de formação de biofilme em porcentagem para as espécies de leveduras avaliadas.....	50
<b>Figura 6.</b>	Fenótipo de formação de biofilme em porcentagem para as diferentes espécies de fungos filamentosos.....	50
<b>Figura 7.</b>	Fenótipo de formação de biofilme em porcentagem de acordo com a origem dos isolados fúngicos.....	51
<b>Figura 8.</b>	Demonstração da CIM após aplicação de resazurina para o fluconazol em nanocápsulas e para as nanocápsulas “brancas”.....	54
<b>Figura 9.</b>	Variação das médias geométricas das concentrações inibitórias mínimas (CIM) para as principais espécies de fungos testadas frente ao fluconazol.....	55
<b>Figura 10.</b>	Variação das médias geométricas das concentrações inibitórias mínimas (CIM) para as principais espécies de fungos testadas frente à anfotericina B.....	55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Classificação dos isolados de <i>Candida</i> spp. de acordo com os pontos de corte do CLSI.....	43
<b>Tabela 2.</b>	Interpretação do teste de susceptibilidade <i>in vitro</i> para os fungos filamentosos de acordo com a literatura.....	44
<b>Tabela 3.</b>	Variação de CIM e CFM, valores de CIM <sub>50</sub> , CIM <sub>90</sub> , CFM <sub>50</sub> e CFM <sub>90</sub> para os 55 isolados leveduriformes testados frente a cinco antifúngicos segundo a metodologia de microdiluição em caldo do CLSI.....	56
<b>Tabela 4.</b>	Variação de CIM, CFM, valores de CIM <sub>50</sub> , CIM <sub>90</sub> , CFM <sub>50</sub> e CFM <sub>90</sub> para os 27 isolados de fungos filamentosos testados frente a cinco antifúngicos segundo a metodologia de microdiluição em caldo do CLSI.....	58
<b>Tabela 5.</b>	Média geométrica (MG) das concentrações inibitórias mínimas (CIM) para as diferentes espécies de fungos testadas frente aos cinco antifúngicos.....	59
<b>Tabela 6.</b>	Perfis de susceptibilidade predominantes para as diferentes espécies de fungos testadas frente aos cinco antifúngicos.....	60
<b>Tabela 7.</b>	Comparação da CIM e da CFM para os isolados de <i>Candida</i> spp. frente ao fluconazol em solução e em nanocápsulas poliméricas.....	61
<b>Tabela 8.</b>	Variação da CIM e média geométrica (MG), obtidas para as espécies de <i>Candida</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium</i> testadas frente ao fluconazol em solução e em nanocápsulas poliméricas.....	61
<b>Tabela 9.</b>	Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM) para os 82 isolados fúngicos testados frente aos cinco antifúngicos.....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CN** – Nanocápsula de cetoconazol
- FN** – Nanocápsula de fluconazol
- FS** – Fluconazol em solução
- NC** – Nanocápsulas sem fármaco associado
- CIM** – Concentração inibitória mínima
- CFM** – Concentração fungicida mínima
- CIM<sub>50</sub>** – Concentração inibitória mínima que inibe 50% do crescimento
- CIM<sub>90</sub>** – Concentração inibitória mínima que inibe 90% do crescimento
- CFM<sub>50</sub>** – Concentração fungicida mínima que inibe 50% do crescimento
- CFM<sub>90</sub>** – Concentração fungicida mínima que inibe 90% do crescimento
- ATCC** – *American Type Culture Collection*
- TSB** – caldo de triptose de soja
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- CLSI** – *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- PCL** – Poli-ε-caprolactona
- pH** – Potencial hidrogeniônico
- UFC** – Unidade formadora de colônia
- UV** – Ultravioleta
- RPMI** – Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
- MOPS** – Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
- DO** – Densidade óptica
- MG** – Média geométrica

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
3.1 Fungos Emergentes como Agentes de Infecções Humanas.....	4
3.2 Formação de Biofilmes Fúngicos e o seu Papel na Saúde e no Ambiente.....	9
3.3 Mecanismos de Ação e Resistência aos Antifúngicos.....	16
3.4 Avaliação da Susceptibilidade Antifúngica.....	22
3.5 Vetorização de Antifúngicos em Sistemas Nanoparticulados.....	27
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
4.1 Isolados.....	33
4.2 Identificação das leveduras.....	34
4.2.1 Identificação cromogênica.....	34
4.2.2 Identificação morfológica.....	34
4.2.2.1 Microcultivo em lâmina.....	34
4.2.3 Identificação Bioquímica.....	35
4.3 Identificação dos fungos filamentosos.....	35
4.3.1 Identificação morfológica.....	35
4.3.1.1 Microcultivo em lâmina.....	35
4.4 Teste de termotolerância a 37°C para os isolados de origem ambiental.....	36
4.5 Teste de triagem para formação de biofilme.....	36
4.5.1 Método do Cristal Violeta em Microplaca.....	36

4.6 Materiais utilizados na preparação das nanocápsulas.....	38
4.6.1 Preparação das nanocápsulas de poli-ε-caprolactona (PCL) contendo fluconazol e cetoconazol.....	38
4.6.2 Caracterização físico-química das formulações.....	39
4.6.2.1 Medidas de tamanho e polidispersão.....	39
4.6.2.2 Medida do potencial zeta.....	40
4.6.2.3 Teor de fármaco e eficiência de encapsulação.....	40
4.7 Testes de Susceptibilidade aos Antifúngicos.....	41
4.7.1 Método de microdiluição em caldo.....	42
4.7.1.1 Protocolo CLSI/M27-A3 (CLSI, 2008).....	42
4.7.1.2 Protocolo CLSI/M38-A2 (CLSI, 2008).....	43
4.7.1.3 Protocolos CLSI/M27-A3 e M38-A2 adaptados para as nanocápsulas contendo antifúngicos.....	44
4.7.1.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	46
4.8 Análise dos dados de biofilme.....	47
4.9 Análise de resultados das CIMs e CFMs.....	47
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
5.1 Avaliação da capacidade de formação de biofilme.....	48
5.2 Caracterização físico-química das nanocápsulas de fluconazol.....	51
5.3 Testes de susceptibilidade aos antifúngicos convencionais e nanoencapsulados.....	52
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
6.1 Avaliação da capacidade de formação de biofilme.....	62
6.2 Testes de susceptibilidade aos antifúngicos convencionais.....	67
6.3 Teste de susceptibilidade ao fluconazol nanoencapsulado.....	74

<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>78</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>79</b>
<b>9. APÊNDICE.....</b>	<b>95</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>97</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A incidência das infecções fúngicas aumentou consideravelmente depois da segunda metade do século XX, principalmente devido à crescente população de indivíduos imunocomprometidos. Além disso, os medicamentos disponíveis para o tratamento destas infecções apresentam algumas limitações, tanto pelo espectro de ação quanto pelos efeitos adversos. Neste sentido, a associação de antifúngicos a nanovetores é uma estratégia utilizada com o intuito de melhorar a eficácia e alterar a biodisponibilidade dos fármacos no organismo, reduzindo assim sua toxicidade.

Com o surgimento de fungos emergentes há a preocupação com a resistência aos antifúngicos convencionais, que alguns desses isolados apresentam. Portanto, a pesquisa da resistência desses agentes patogênicos, através do ensaio de susceptibilidade antifúngica, representa uma alternativa interessante, possibilitando conhecer informações importantes acerca da epidemiologia e da ecologia desses fungos.

Além disso, a pesquisa da resistência desses isolados associada ao estudo de novos sistemas de liberação de fármacos, como as nanopartículas poliméricas, permite conhecer melhor o tratamento mais apropriado para esses patógenos, atenuando assim, o erro inerente ao empirismo tradicionalmente utilizado na terapêutica da maioria das micoses.

A nanotecnologia é uma área da ciência que visa o estudo de materiais de dimensões em escala nanométrica, sendo que um dos campos de estudos mais promissores na utilização de nanopartículas poliméricas é a vetorização de antimicrobianos.



Ao mesmo tempo, conhecer também a virulência desses fungos emergentes, através da avaliação da capacidade de formação de biofilme, pode contribuir para o entendimento do papel desses micro-organismos nas doenças e o aprimoramento da estratégia utilizada no desenvolvimento de novas formulações voltadas ao tratamento das infecções fúngicas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho é caracterizar a capacidade de formação de biofilme de isolados fúngicos emergentes de origem ambiental e clínica, bem como sua susceptibilidade aos antifúngicos na forma livre e nanoencapsulada.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a produção fenotípica de biofilme através da técnica de adesão em microplaca de poliestireno usando o método do cristal violeta de isolados clínicos emergentes e ambientais potencialmente patogênicos;

2. Preparar e caracterizar as nanocápsulas de poli- $\epsilon$ -caprolactona contendo cetoconazol e fluconazol;

3. Avaliar o perfil de susceptibilidade dos isolados clínicos e ambientais emergentes frente aos antifúngicos na forma livre e na forma nanoencapsulada;

4. Avaliar o potencial do fluconazol nanoestruturado em reduzir a resistência microbiológica a este fármaco sobre suspensões celulares de *Candida* sp., *Rhodotorula* sp., *Fusarium* sp. e *Aspergillus* sp.;

5. Avaliar a atividade antifúngica do cetoconazol nanoestruturado sobre suspensões celulares de *Candida* sp.;

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Fungos Emergentes como Agentes de Infecções Humanas

Os fungos representam um problema crescente na prática clínica humana, uma vez que seu impacto tem aumentado significativamente nos últimos anos devido ao elevado número de pacientes imunocomprometidos (Denning & Hope, 2010; Miceli et al., 2011; Zaragoza et al., 2011; Antas et al., 2012).

Podem ser citados como fatores de risco para o desenvolvimento e aumento da incidência das infecções fúngicas a própria doença de base do hospedeiro, o uso prolongado de antibióticos de amplo espectro, corticosteróides, antineoplásicos e novos imunossupressores mais agressivos, hemodiálise, nutrição parenteral, uso de cateteres intravasculares de longa permanência, transplantes, entre outros (Lacaz et al., 2002; Chabasse et al., 2009; Sidrim & Rocha, 2010; Antas et al., 2012).

De acordo com Wingard (1999), os processos infecciosos causados por fungos estão diretamente relacionados com as características do hospedeiro, incluindo os aspectos ligados à sua saúde, ou com a exposição ambiental a esses micro-organismos. Entretanto, evidências na literatura demonstram que o principal reservatório dos fungos é o meio ambiente, uma vez que a maioria dessas infecções tem sido adquirida a partir de fontes ambientais e, apenas em alguns casos, da microbiota do hospedeiro (Wingard, 1999; Teixeira et al., 2005). Portanto, com a exceção de alguns agentes presentes na microbiota humana, como, por exemplo, a *Candida*, a grande maioria dos fungos são fundamentalmente micro-organismos do meio ambiente.

Historicamente, os fungos de maior prevalência associados às infecções fúngicas foram *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*. Porém, nos últimos anos, tem se observado que outras espécies incomuns de fungos tidas até então como habituais saprófitas, também podem causar infecções graves, sendo estes, classificados a partir deste momento como patógenos emergentes (Nucci & Marr, 2005; Chabasse et al., 2009; Miceli et al., 2011; Zaragoza et al., 2011; Antas et al., 2012).

Segundo Morse (1995), o termo “infecções emergentes” pode ser utilizado para designar uma infecção que apareceu recentemente na população ou que está aumentando rapidamente sua incidência ou distribuição geográfica.

As espécies do gênero *Candida* usualmente existem como comensais no trato gastrointestinal e no trato genital de indivíduos saudáveis, porém também podem ser considerados patógenos oportunistas (Lacaz et al., 2002; Douglas, 2003; Sidrim & Rocha, 2010; Miceli et al., 2011). Estas leveduras pertencentes à família *Cryptococcaceae* têm a sua patogenicidade fortemente associada às alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro humano (Lacaz et al., 2002; Douglas, 2003; Miceli et al., 2011), sendo que tanto as candidíases superficiais quanto as formas sistêmicas representam um conjunto de infecções classificadas como cutâneo-mucosas e/ou invasivas (hematogênicas) (Lacaz et al., 2002; Sidrim & Rocha, 2010).

Embora a *C. albicans* ainda permaneça sendo o principal patógeno causador de infecções fúngicas em humanos, nos últimos anos vem sendo observada uma mudança significativa no perfil epidemiológico destas infecções com o aumento de relatos de casos por espécies ditas *Candida* não-*albicans*. Dentre as principais espécies relatadas, podemos destacar: *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* e

*C. lusitaniae* (Chabasse et al., 2009; Sidrim & Rocha, 2010; Miceli et al., 2011). Além disso, altos índices de resistência aos derivados azólicos têm sido mais observados em *C. krusei* e *C. glabrata* (Sidrim & Rocha, 2010; Miceli et al., 2011; Tobudic et al., 2012). A *C. guilliermondii* tem demonstrado reduzida susceptibilidade ao fluconazol, porém é sensível ao triazólico de 2ª geração voriconazol (Kremery & Barnes, 2002; Pfaller et al., 2006; Miceli et al., 2011).

Um programa de vigilância epidemiológica, denominado ARTEMIS “Global Antifungal Surveillance Program” mostrou que a *C. albicans* é o principal patógeno envolvido em quadros de candidemias (63-70%), seguida por *C. glabrata* (44%), *C. tropicalis* (6%) e *C. parapsilosis* (5%) (Pfaller et al., 2007). Entretanto, a frequência de isolamento das diferentes espécies pode apresentar uma mudança segundo a região geográfica e a instituição hospitalar, fazendo com que as espécies de *Candida* apresentem algumas diferenças quanto à sua distribuição. No caso do Brasil, a *C. albicans* ainda é a principal levedura isolada de candidemias (Nucci & Marr, 2005; Colombo et al., 2006) e as espécies de *C. não-albicans* mais comumente encontradas em nosso país são *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* (Colombo et al., 2006; Miceli et al., 2011).

Com incidência baixa, mas de caráter emergente, cepas de *Kodamaea ohmeri* associadas a casos graves de fungemias em hospitais têm sido relatadas (Yang et al., 2009). Alguns autores também demonstraram a baixa susceptibilidade *in vitro* desta espécie de levedura ao fluconazol (Bergmann et al., 1998; Yang et al., 2009; Al-Sweih et al., 2011).

Neste sentido, o aprimoramento das técnicas de diagnóstico e as ferramentas de biologia molecular fizeram com que novas espécies de leveduras fossem frequentemente reconhecidas como patógenos oportunistas.

Outro grupo importante de leveduras que têm sido reportadas na literatura como agentes de micoses oportunistas é o grupo das leveduras não fermentadoras, destacando-se os gêneros *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Geotrichum* (Sidrim & Rocha, 2010; Zaragoza et al., 2011).

Pertencentes à família *Basidiomycetes*, os membros do gênero *Rhodotorula* estão presentes no ambiente, podendo ser encontrados no solo, água, sucos de frutas, leite, em cortinas de chuveiro e em escova de dente (Lacaz et al., 2002; Sidrim & Rocha, 2010). Dentre as espécies consideradas como patógenos emergentes destacam-se a *R. mucilaginosa* (também conhecida como *R. rubra*) seguida das espécies de *R. glutinis* e *R. minuta* (Tuon & Costa, 2008; Miceli et al., 2011). Estas espécies já foram associadas a um amplo espectro de fungemias relacionadas ao uso de cateter, ou a casos de sepse e infecções invasivas particularmente em pacientes com a imunidade debilitada (Zaas et al., 2003; Tuon & Costa, 2008).

O tratamento de escolha para as infecções causadas pela *Rhodotorula* é a anfotericina B, entretanto já foi descrita a resistência a dois triazólicos, o fluconazol e o voriconazol (Tuon & Costa, 2008; Miceli et al., 2011).

Outros agentes importantes no cenário atual das infecções fúngicas são os fungos filamentosos hialinos septados, também conhecidos como hialo-hifomicetos, que até então, não eram considerados patógenos habituais. A maioria desses fungos são saprófitas do solo, parasitas de vegetais e degradadores de matéria orgânica (Lacaz et al., 2002; Sidrim & Rocha, 2010). Em grande parte, esses fungos são oportunistas, apresentando limitado potencial patogênico. Neste caso, estas infecções são dependentes de um conjunto de fatores: do estado imunológico ou doença de base associada como, por

exemplo, transplantados, leucêmicos, diabéticos, das condições de trabalho e do modo de vida do indivíduo (Sidrim & Rocha, 2010; Antas et al., 2012).

Dentre os agentes de hialohifomicoses mais frequentemente isolados em laboratório, destacam-se o *Fusarium* sp. e o *Paecilomyces* sp., que por sua vez, são cosmopolitas, sendo geralmente detectados em amostras de solo, como decompositores de gramíneas, comida, papel, ou ainda infectando plantas, como é o caso de *Fusarium*, um importante fitopatógeno (Sidrim & Rocha, 2010; Antas et al., 2012). Nos últimos anos, estes fungos têm sido reconhecidos como importantes patógenos oportunistas em ambos os grupos de indivíduos: nos imunocompetentes ou nos indivíduos com o sistema imune debilitado. As principais manifestações clínicas associadas a estas infecções são ceratites, infecções cutâneas e subcutâneas (Lacaz et al., 2002; Antas et al., 2012).

Segundo Antas et al. (2012), apesar da tendência de resistência à maioria dos antifúngicos disponíveis atualmente para o tratamento das hialohifomicoses, os triazólicos como o voriconazol, posaconazol e ravuconazol têm demonstrado boa atividade contra isolados de *Paecylomices lilacinus*.

Diante deste cenário complexo, muitas vezes é necessária a profilaxia ou o tratamento prolongado com antimicrobianos, o que segundo Desnos-Ollivier et al. (2012), pode favorecer o aparecimento de cepas resistentes ou mutações no alvo de medicamentos.

Outros fungos importantes do grupo dos hialo-hifomicetos são os representantes do gênero *Aspergillus*, que abrange uma grande variedade de espécies, que por sua vez, encontram-se amplamente distribuídos na natureza, podendo apresentar diferentes formas clínicas em humanos, como alergias, micotoxicoses e infecções generalizadas, como

aspergilose pulmonar crônica e aspergilose invasiva, uma importante causa de mortalidade nos países desenvolvidos (Lacaz et al., 2002; Hedayati et al., 2007).

A principal via de transmissão de *Aspergillus* no homem é através da inalação; assim, a árvore broncopulmonar e os seios nasais são os locais preferenciais para o desenvolvimento de enfermidades aspergilares (Lacaz et al., 2002; Sidrim & Rocha, 2010). O crescimento desses fungos em matéria orgânica apresenta grande quantidade de conídios que se destacam do micélio, sendo facilmente veiculados tanto por correntes aéreas baixas, próximo ao solo, como por correntes de alta atmosfera, facilitando assim a inalação dessas estruturas reprodutivas (Sidrim & Rocha, 2010). Os *Aspergillus* também podem contaminar soluções injetáveis, como soro fisiológico e líquido de diálise peritoneal (Sidrim & Rocha, 2010).

Nos países de clima temperado, a espécie predominante no solo é o *A. fumigatus*; enquanto em regiões tropicais, as espécies mais frequentemente encontradas são o *A. flavus* e o *A. niger* (Hedayati et al., 2007; Sidrim & Rocha, 2010). Apesar do pouco conhecimento a respeito da frequência de resistência destes fungos aos azólicos, já foram descritos relatos deste fenômeno em diversos países, usualmente em cepas de *A. fumigatus* (Howard et al., 2009; Pfaller, 2012).

### **3.2 Formação de Biofilmes Fúngicos e o seu papel na Saúde e no Ambiente**

A patogenicidade dos fungos envolve mecanismos complexos que ainda não estão totalmente esclarecidos. O que de fato é regra, é que o fungo deve possuir a habilidade de multiplicar-se na temperatura do corpo humano, a 37°C, mantendo assim a plena condição fisiológica de sobrevivência. Neste sentido, Robert & Casadevall (2009)



sugerem em seu estudo sobre termotolerância que novos patógenos fúngicos tendem a emergir de gêneros já tolerantes a temperaturas mais elevadas.

Outros autores descrevem que o comportamento patogênico de fungos oportunistas está diretamente associado com características biológicas específicas, por exemplo, a capacidade de estruturas reprodutivas (conídios) germinarem e crescerem em temperaturas iguais ou superiores a temperatura dos mamíferos mesmo na ausência de nutrientes (Debeaupuis et al., 1997).

O que já está bem estabelecido, é que um patógeno deve apresentar alguns fatores de virulência para que a infecção se estabeleça no hospedeiro. Uma das formas de defesa do micro-organismo capaz de causar infecções em implantes hospitalares é principalmente a sua habilidade de aderência a superfícies abióticas e a formação de biofilme (Douglas, 2003; Miceli et al., 2011). Logo, a compreensão do mecanismo de formação de biofilme é o primeiro passo na determinação de sua função e, conseqüentemente, de seu impacto econômico na saúde, indústria e meio ambiente (Huq et al., 2008; Siqueira et al., 2011).

O biofilme é constituído por um conjunto de micro-organismos distintos que convivem em associação. Nas últimas décadas, bacteriologistas e, mais recentemente, micologistas têm observado que os micro-organismos praticamente não existem na sua forma livre ou planctônica nos tecidos do hospedeiro, mas se agrupam formando uma comunidade multicelular e plural, tanto sob os tecidos quanto em objetos inanimados como os dispositivos implantáveis, destacando-se neste caso as próteses e cateteres (Douglas, 2003; Ramage et al., 2009; Giolo & Svidzinski, 2010).

Os fungos leveduriformes e filamentosos possuem o potencial de desenvolvimento na natureza em dois tipos de fenótipos: planctônico ou sésil (em biofilme). O fenótipo planctônico caracteriza-se pela forma livre de desenvolvimento dos

fungos no hospedeiro ou superfície abiótica, enquanto a forma séssil caracteriza-se pelo desenvolvimento de um grupo de diferentes cepas, sob uma matriz polissacarídica rica em canais em toda a sua extensão que permitem a passagem de nutrientes e oxigênio; e também conferem proteção contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e entrada de antimicrobianos, dificultando assim a difusão dos fármacos nos tecidos (Ramage et al., 2012). Essa estrutura é denominada de biofilme e facilita o processo de adesão e colonização das cepas constituintes sobre o hospedeiro ou sobre diferentes dispositivos médicos implantáveis.

O estudo dos biofilmes microbianos tem recebido uma atenção maior nos últimos anos. Como os fungos são eucariotos e mais complexos do que as bactérias, as infecções fúngicas associadas aos biofilmes são difíceis de serem diagnosticadas e tratadas adequadamente (Douglas, 2003; Harding et al., 2009; Ramage et al., 2009; Ramage et al., 2012). Logo, o entendimento do papel dos biofilmes fúngicos durante o curso da infecção pode ajudar o manejo clínico destas doenças.

Historicamente, a *C. albicans* é descrita na literatura como o principal patógeno com habilidade para formar biofilme e tem sido extensivamente estudada, sendo considerada a terceira principal causa de infecções intravasculares relacionadas a cateteres (Douglas, 2003; Ramage et al., 2009). De maneira geral, a versatilidade em se adaptar a diferentes habitats e a capacidade de formar biofilme são os principais fatores atribuídos à virulência da *C. albicans* (Douglas, 2003; Miceli et al., 2011).

Entretanto, nos últimos anos, diferentes espécies do gênero *Candida* também têm sido associadas com a formação de biofilme em dispositivos implantáveis, incluindo a *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (Ramage et al., 2009; Pannanusorn et al., 2012). Outros fungos que já foram descritos na literatura com a capacidade de formação de biofilme, incluem: *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Trichosporon*,

*Saccharomyces*, *Pneumocystis*, *Aspergillus*, *Coccidioidis*, alguns zigomicetos e recentemente, *Rhodotorula* (Ramage et al., 2009; Singh et al., 2011; Nunes et al., 2013).

Além das leveduras, como por exemplo, *C. albicans* e *Cryptococcus neoformans*, uma hipótese recentemente levantada é a de que fungos filamentosos também são capazes de formar biofilmes (Harding et al., 2009; Ramage et al., 2012). Porém, poucos trabalhos vêm investigando esta questão e o número de relatos na literatura é bastante escasso.

A formação de biofilmes é um sistema fortemente regulado e depende da sinergia da expressão de uma variedade de genes e das condições ambientais durante o curso da infecção (LaFleur et al., 2006; Ramage et al., 2009; Ramage et al., 2012). Esta regulação, no caso das leveduras, é realizada por um sistema de comunicação microbiana, denominado de “quorum sensing”, que é utilizado para controlar algumas características do micro-organismo, desde as associadas à sobrevivência até as determinantes de patogenicidade (Douglas, 2003; Harding et al., 2009; Ramage et al., 2009).

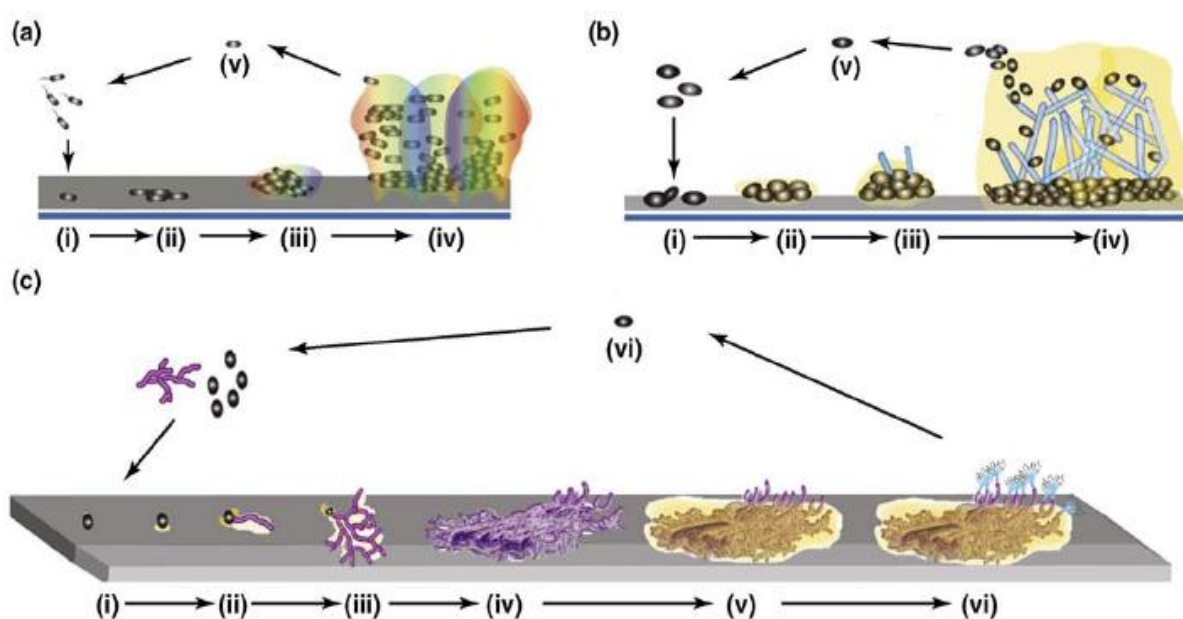
Outra questão preocupante neste contexto é que o modo de crescimento sésil está fortemente associado a um importante aumento na resistência aos antimicrobianos, e, em função disso, os cientistas vêm desenvolvendo modelos de ensaios de biofilmes com o intuito de investigar o perfil de susceptibilidade dessas comunidades microbianas frente a esses fármacos, em comparação com o perfil das células planctônicas (Ramage et al., 2009). Isto provavelmente advém da dificuldade de alguns antimicrobianos difundirem através da camada polissacarídica que compõe a matriz extracelular, ou porque subpopulações de leveduras, conhecidas como células “persisters”, que estão presentes dentro do biofilme e diferem fisiologicamente das células planctônicas, são responsáveis pela persistência das infecções relacionadas com biofilmes (LaFleur et al., 2006; Ramage et al., 2009).

A adesão de micro-organismos nas superfícies sólidas que leva à formação do biofilme é facilitada por seus produtos metabólicos, incluindo exopolímeros e adesinas. Esta matriz de polímeros comporta-se como barreira que reduz a eficácia dos desinfetantes ou antimicrobianos, dificultando a remoção do biofilme, na medida em que ajudam a ancorar os micro-organismos a essas superfícies (Galvão et al., 2006).

Com base em algumas observações experimentais, Harding et al. (2009) estabeleceram modelos para descrever o desenvolvimento e as características dos biofilmes de leveduras e fungos filamentosos, que apresentam diferenças importantes na composição de sua arquitetura (Harding et al., 2009). O modelo de biofilme para a *C. albicans* apresenta várias semelhanças com o modelo bacteriano (Figura 1a), exceto pela presença acentuada de hifas e pseudohifas (Douglas, 2003; Harding et al., 2009). De acordo com estes autores, este modelo abrange cinco etapas distintas de desenvolvimento (Figura 1b): (i) adsorção das células leveduriformes em uma superfície, (ii) aderência à superfície, (iii) formação de microcolônias de leveduras e um estímulo inicial para o crescimento de hifas, seguida pela formação de microcolônias na camada superior predominantemente de hifas, e na produção de matriz extracelular que compõe estas microcolônias, (iv) maturação do biofilme e (v) dispersão das células do biofilme maduro. Além disso, segundo Douglas (2003), este perfil pode variar de acordo com as propriedades da superfície na qual as leveduras encontram-se aderidas.

A partir dos modelos desenhados para bactérias e leveduras, Harding et al. (2009), propõem um modelo preliminar de desenvolvimento do biofilme para os fungos filamentosos (Figura 1c), contendo as seguintes etapas de desenvolvimento: (i) deposição dos propágulos fúngicos (esporos, fragmentos de hifas ou esporangiosporos) em uma superfície sólida; (ii) fixação ou aderência a esta superfície através da liberação de substâncias adesivas pelos esporos germinativos, (iii) formação da microcolônia de fase

I; esta fase envolve o alongamento apical e a ramificação das hifas durante o início do crescimento e colonização da superfície com a produção de uma matriz extracelular polimérica que permite o crescimento da colônia e a adesão ao substrato, (iv) início da maturação que envolve a formação de uma rede compacta de hifas ou micélio e formação de canais de água para a passagem de nutrientes, (v) maturação que é caracterizada pela formação de corpos de frutificação, sendo que é justamente o crescimento aéreo que vai permitir a dispersão dos fungos para a colonização de novos polímeros; (vi) dispersão ou fase planctônica envolvendo a dispersão dos fragmentos do biofilme.



**FIGURA 1.** Modelo de desenvolvimento de biofilme em bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Cinco estágios são definidos para bactérias (a) e *Candida albicans* (b): (i) adsorção, (ii) aderência, (iii) formação de microcolônias, (iv) maturação e (v) dispersão. O modelo de fungos filamentosos (c) inclui as seguintes etapas: (i) adsorção, (ii) aderência, (iii) microcolônia I, (iv) microcolônia II (desenvolvimento micelial, camadas de hifas e hifas de agregação), (v) maturação e (vi) dispersão ou fase planctônica.

\*Adaptado de Harding et al., 2009.

Dentre os métodos utilizados para a análise dos biofilmes microbianos destaca-se a microscopia (Huq et al., 2008; Peeters et al., 2008), além de outros métodos fenotípicos que foram desenvolvidos ao longo dos anos para o cultivo e a quantificação dos

biofilmes, como discos de cateteres, radiomarcção e teste em microplaca com cristal violeta e outros indicadores, incluindo Syto9, diacetato de fluoresceína (FDA), resazurina, sais de tetrazólio (XTT, CTC), metileno dimetil azul (DMMB) e calcoflúor (Huq et al., 2008; Peeters et al., 2008).

Além disso, o teste em microplaca de poliestireno vem sendo muito utilizado na investigação fenotípica da formação de biofilmes de procariotos e eucariotos, principalmente das leveduras do gênero *Candida* (Shin et al., 2002; Peeters et al., 2008; Thein et al., 2007).

O teste em microplaca de poliestireno com cristal violeta (CV) foi primeiramente descrito por Christensen et al. (1985) e modificado por Stepanovic et al. (2007), e devido à sua rapidez e simplicidade, e por permitir a avaliação de um número grande de isolados, vem sendo comumente usado para a quantificação de biofilmes formados por uma ampla variedade de micro-organismos (Peeters et al., 2008).

Este método utiliza uma microplaca de 96 poços que permite determinar semiquantitativamente a formação de biofilme através da leitura da densidade óptica (DO) (Peeters et al., 2008). O biofilme é então corado com CV a 0,5%, fazendo a correlação direta da presença macroscópica do biofilme microbiano aderido à placa de poliestireno (Stepanovic et al., 2007). O CV é um corante básico, o qual se liga aos polissacarídeos da matriz extracelular e às moléculas de carga negativa da superfície à qual os micro-organismos encontram-se aderidos (Li et al., 2003).

Com relação aos métodos genotípicos, diversos métodos de análise dos genes envolvidos no processo de formação de biofilme também vêm sendo utilizados. Sendo assim, já foram descritos alguns genes específicos e moléculas sinalizadoras de “quorum sensing” que são regulados nos biofilmes de *C. albicans*, como por exemplo: o gene *caace2* que afeta a morfogênese, aderência e virulência; *not4* que está diretamente

associado com o desenvolvimento da hifa; *hwp1* relacionado com a adesão e penetração na célula hospedeira e o farnesol, que é uma molécula de “quorum sensing” envolvida na formação do biofilme de *C. albicans* (LaFleur et al., 2006; Ramage et al., 2009).

### **3.3 Mecanismos de Ação e Resistência aos Antifúngicos**

Os antifúngicos podem ser classificados em quatro classes principais de acordo com o seu mecanismo de ação. O grupo dos poliênicos, que atua na membrana plasmática; as pirimidinas, que promovem a inibição da síntese de ácidos nucleicos; os azólicos, que interferem na síntese do ergosterol e as equinocandinas, que por sua vez, inibem a síntese de glucana da parede celular de diversos fungos patogênicos (Lacaz et al., 2002; White et al., 2005; Sidrim & Rocha, 2010; Cuenca-Estrella, 2010).

A classe dos azólicos que se constituem no maior grupo de antifúngicos disponíveis, compreende os imidazóis (miconazol e cetoconazol) e os triazóis (fluconazol e itraconazol), utilizados com considerável sucesso no tratamento de infecções micóticas superficiais e sistêmicas (Bodey et al., 1992; Sidrim & Rocha, 2010). Inicialmente, somente o cetoconazol foi disponibilizado para o tratamento de infecções sistêmicas, tendo sido posteriormente aprovados os triazólicos fluconazol e itraconazol (1ª geração); e, a partir do século XXI, os derivados de 2ª geração, como voriconazol, posaconazol e ravuconazol (Sidrim & Rocha, 2010).

O principal mecanismo de ação desses compostos é através da inibição da enzima citocromo P-450 demetilase, uma importante enzima envolvida na biossíntese do ergosterol fúngico. A célula fúngica tratada com azólicos apresenta acúmulo de lanosterol, 3,6-diol esterol e ausência de ergosterol, sendo que o excesso de esteróis

metilados interfere na fluidez e permeabilidade da membrana plasmática inibindo desta forma o crescimento dos fungos (Bodey et al., 1992; Sidrim & Rocha, 2010).

A classe dos poliênicos constitui o segundo maior grupo de antibióticos antifúngicos, originalmente isolados de espécies de *Streptomyces*, embora somente a anfotericina B e a nistatina apresentem aplicação na terapêutica (Mathew & Nath, 2009). Apesar de muitas décadas de uso, a anfotericina B ainda permanece como padrão ouro no tratamento das infecções sistêmicas, principalmente em virtude de sua ação letal contra diferentes fungos causadores de micoses profundas em pacientes com quadros de imunossupressão grave (Bodey et al., 1992).

Esta classe de antifúngicos, quando em doses fungistáticas age diretamente sobre membranas contendo ergosterol, resultando em um aumento da permeabilidade da membrana, o que determina o efluxo de íons  $K^+$  e  $Mg^{++}$  e a entrada de prótons que produzem acidificação no interior da membrana, promovendo assim a inibição do crescimento do micro-organismo (Thomas, 1986).

Por outro lado, em doses fungicidas, as moléculas dos poliênicos se agregam com os esteróis da membrana fúngica e formam poros aquosos, através do mecanismo de peroxidação de lipídios, pelo qual os constituintes citoplasmáticos, como os íons potássio, extravasam destruindo assim o gradiente de prótons da membrana (Thomas, 1986; Gallis et al., 1990).

As constantes falhas no tratamento das micoses têm chamado a atenção de pesquisadores para o problema da resistência aos antifúngicos, bem como para os mecanismos moleculares envolvidos neste fenômeno (Espinel-Ingroff, 2008; Kanafani & Perfect, 2008; Pfaller, 2012).

A resistência aos antimicrobianos pode ser definida em termos microbiológicos e clínicos. A resistência microbiológica se refere à reduzida susceptibilidade do micro-



organismo ao agente antimicrobiano pelo ensaio de sensibilidade *in vitro*, no qual a concentração inibitória mínima (CIM) do fármaco ultrapassa o limite superior do ponto de corte definido para esse micro-organismo (Kanafani & Perfect, 2008; Espinel-Ingroff, 2008; Tobudic et al., 2012; Pfaller, 2012).

Este tipo de resistência, por sua vez, abrange a resistência primária (ou intrínseca) que está presente em um organismo sem prévia exposição ao fármaco e a resistência secundária (ou adquirida) que é aquela desenvolvida em resposta à exposição a essas substâncias e que, geralmente é dependente de uma alteração na expressão de genes (Pfaller, 2012). A *C. krusei*, por exemplo, é intrinsecamente resistente ao fluconazol, enquanto a resistência secundária pode ser observada nas outras espécies deste gênero (Tobudic et al., 2012).

A resistência clínica é definida como a persistência de uma infecção, mesmo após a administração de um agente antifúngico que demonstre nos testes de sensibilidade *in vitro* uma concentração inibitória mínima baixa contra o patógeno causador da doença (Tobudic et al., 2012). Um conjunto de fatores em associação pode determinar a ocorrência deste tipo de resistência, como fatores do hospedeiro, fatores farmacológicos e fatores ligados ao próprio fungo (Espinel-Ingroff, 2008).

Neste contexto, a resistência aos azólicos é certamente uma das questões que desperta maior interesse na atualidade. O aumento do espectro de leveduras resistentes ao fluconazol, de *Aspergillus* resistente a itraconazol e o surgimento de isolados da classe dos *Mucorales* resistentes a voriconazol são os principais problemas levantados pelos pesquisadores (Cuenca-Estrella, 2010; Pfaller, 2012; Tobudic et al., 2012).

De acordo com Cuenca-Estrella (2010), o alvo dos azólicos é a enzima 14- $\alpha$  lanosterol demetilase, que é um produto do gene *erg11* nas leveduras, conhecido como *cyp51* nos fungos filamentosos, e por isso, alterações importantes nestes genes têm sido

relacionadas com a resistência aos antifúngicos desta classe.

Diversos estudos têm demonstrado nos últimos anos, que as leveduras do gênero *Candida* têm se tornado mais resistentes aos azólicos, um fenômeno que está associado com o elevado consumo de fluconazol na medicina (Tobudic et al., 2012; Pfaller, 2012). Embora os triazólicos sejam amplamente utilizados para o tratamento e profilaxia das diversas formas de aspergilose, pouco é conhecido a respeito da frequência de resistência de *Aspergillus* a itraconazol, voriconazol e posaconazol (Verweij et al., 2009; Pfaller, 2012).

A resistência ao itraconazol em *Aspergillus* foi descrita pela primeira vez em 1997 em três isolados clínicos obtidos da Califórnia na década de 80 (Denning et al., 1997); desde então, diversos relatos descrevem este problema, usualmente em cepas de *A. fumigatus*.

Além disso, há a preocupação com a resistência cruzada neste contexto. Segundo Howard et al. (2009), dos 34 isolados de *A. fumigatus* resistentes a itraconazol demonstrados em seu estudo, 65% apresentaram resistência cruzada com voriconazol e 74% com posaconazol.

De acordo com Cuenca-Estrella (2010), dentre os mecanismos mais comuns de resistência aos azólicos encontrados em fungos filamentosos, encontram-se as mutações de ponto e a superexpressão ou amplificação do gene *cyp51*.

O aumento do consumo de antifúngicos utilizados na terapêutica de um modo geral tem influenciado significativamente a emergência de cepas com baixa resposta clínica (Rogers, 2006). De acordo com Pannanusorn et al. (2012) o uso profilático do fluconazol, fármaco amplamente utilizado na prevenção e tratamento de infecções da corrente sanguínea causadas por leveduras, resultou em uma diminuição da incidência das infecções causadas por *C. albicans*, ao contrário daquelas causadas por espécies de

*C. não-albicans*. Portanto, também tem se observado a partir desses relatos uma mudança nos padrões epidemiológicos das *Candidas* resistentes ao fluconazol.

Segundo alguns autores, atualmente observa-se uma diminuição da susceptibilidade de isolados de *C. glabrata* a fluconazol, o que também vem ocorrendo com *Rhodotorula* sp. e fungos filamentosos como *Aspergillus terreus*, *Zygomycetes*, *Fusarium* sp. e *Scedosporium* sp. (Perea & Patterson, 2002; Rogers, 2006; Giolo & Svidzinski, 2010; Alastruey-Izquierdo et al., 2009).

Bossche (1997) cita como mecanismos de resistência das leveduras do gênero *Candida* aos azólicos, o aumento dos níveis de *cdr1* no RNA mensageiro, bem como resistências mediadas por genes, as quais levam ao acúmulo ou redução de moléculas intracelulares; alterações em enzimas que agem na rota do ergosterol, como a 14 $\alpha$ -desmetilase e a esqualeno epoxidase; bem como a resistência intrínseca.

Quanto aos mecanismos de resistência adquirida, estes também podem ser variados e complexos. Para Rogers (2006), a resistência aos azólicos parece envolver uma maior expressão de genes de transportadores farmacológicos, causando o efluxo dos fármacos das células fúngicas.

De acordo com Cuenca-Estrella (2010), a redução da concentração intracelular dos azólicos, em isolados clínicos de leveduras, poderia estar associada com uma diminuição da captação do fármaco. Alguns dos principais tipos de transportadores descritos na literatura são: os transportadores ABC (ATP binding cassette), que estão associados com o efluxo de todos os azóis; e a família de proteínas transportadoras denominadas MFS (major facilitator superfamily), que parecem estar envolvidas apenas com a resistência ao fluconazol (Cuenca-Estrella, 2010).

A resistência secundária em leveduras, também pode estar relacionada com a ocorrência de alterações mutagênicas no gene *erg11*, e/ou por um excesso na produção de

ergosterol. Por outro lado, uma redução na susceptibilidade à caspofungina de isolados clínicos de *C. albicans* e *C. krusei* se deve às mutações dirigidas à  $\beta(1,3)$ -glucana sintase nas subunidades protéicas FKs (Rogers, 2006).

Lima et al. (2009) mostraram que 48% das espécies de leveduras testadas em seu estudo apresentaram resistência aos azólicos, sendo destas, 36% da espécie *C. albicans* e 64% de espécies de *C. não-albicans*. Este trabalho também demonstrou que pacientes com cepas resistentes haviam utilizado previamente antifúngicos para tratamento de candidíase oral ou onicomicose recorrente (Lima et al., 2009).

Outra questão preocupante relacionada à resistência clínica aos azólicos, mas com um fator ambiental fortemente associado, é que em alguns países da Europa, em especial na Holanda, onde as taxas de resistência são altas para *A. fumigatus* (em torno de 8%), acredita-se que este fungo esteja se tornando mais resistente devido ao elevado consumo de azóis na agricultura (Verweij et al., 2009).

Por outro lado, a resistência aos poliênicos, em especial à anfotericina B, é rara e seus mecanismos ainda são pouco conhecidos, embora a maioria deles esteja associada com uma diminuição na quantidade de ergosterol na membrana ou com um aumento de fosfolipídios, que reduzem a afinidade do fármaco com os esteróis (Cuenca-Estrella, 2010). O que já se sabe é que este antibiótico apresenta atividade limitada contra *A. terreus* e *A. nidulans* (Verweij et al., 2009).

Balajee et al. (2005) descrevem que algumas espécies menos comuns do complexo *Fumigati*, como *A. lentulus* e *A. fumigati**affinis* parecem ser intrinsecamente resistentes à anfotericina B.

As alterações causadas na membrana de isolados resistentes têm sido associadas com mutações nos genes *erg2* e *erg3* que codificam enzimas envolvidas na biossíntese do ergosterol (Cuenca-Estrella, 2010). Além disso, outro mecanismo envolvido com esta

resistência está relacionado ao aumento da atividade da catalase intracelular do fungo, o que impede a formação de radicais livres responsáveis pela abertura de poros na membrana (Kerridge & Nicholas, 1986).

A experiência da Holanda mostra que a resistência de *Aspergillus* aos azólicos é um fenômeno real, mas ainda de baixa frequência e restrito a poucos países. Entretanto, observando-se a evolução desses mecanismos nota-se que os fungos são capazes de se adaptar rapidamente em resposta à pressão ambiental imposta pelos antifúngicos. Logo, a busca por novas alternativas terapêuticas para o tratamento destas infecções permanece constante.

### **3.4 Avaliação da Susceptibilidade Antifúngica**

Em virtude da disponibilidade de novos antifúngicos, de uma mudança no perfil epidemiológico de espécies associada à falha terapêutica e do surgimento de cepas resistentes houve a necessidade do desenvolvimento e padronização de métodos para a investigação da susceptibilidade *in vitro* aos antifúngicos, como vem sendo feito há muitos anos para os antibióticos.

De um modo geral, a maioria desses métodos emprega técnicas de diluição em caldo e difusão em ágar, que apresentam como princípio básico a exposição de um inóculo definido do fungo a ser estudado a concentrações conhecidas do fármaco, em condições ótimas de crescimento, e após um determinado período, observa-se a inibição deste crescimento (Sidrim & Rocha, 2010). A leitura final, tanto em meio líquido quanto em meio sólido, permite identificar a menor concentração do fármaco capaz de inibir o crescimento do micro-organismo em teste, que na técnica de microdiluição em caldo é

denominada de concentração inibitória mínima (CIM) (Stoppa, 2009).

Porém, no caso da técnica de difusão em ágar, a leitura permite apenas a análise qualitativa da atividade do fármaco, pois neste caso utilizam-se discos de antifúngicos contendo uma concentração única de antifúngico. Mesmo assim, esta técnica é muito utilizada nos laboratórios de microbiologia em função de sua simplicidade e baixo custo (Paredes, 2009; Giolo & Svidzinski, 2010).

Uma série de fatores vem sendo ajustados e aperfeiçoados ao longo dos anos nestes ensaios para assegurar a reprodutibilidade dos resultados obtidos em diferentes laboratórios, tais como: tamanho do inóculo, composição do meio de cultivo, tempo e temperatura de incubação, pH do meio e critério de leitura dos resultados (Espinel-Ingroff et al., 1998; Arikán, 2007). Entretanto, além das diferenças causadas por todas estas variáveis relacionadas aos testes de susceptibilidade *in vitro*, diversos fatores do hospedeiro, do sítio da infecção e da farmacocinética do fármaco podem afetar a resposta terapêutica *in vivo*. Dessa forma, muitas vezes o sucesso terapêutico previsto *in vitro* pode não ocorrer *in vivo*.

A falta de correlação entre os testes *in vitro* e os resultados do tratamento é ilustrada pela regra do “90-60” proposta por Rex & Pfaller (2002), que sustenta que as infecções por micro-organismos sensíveis respondem à terapêutica apropriada em 90% das vezes, enquanto que as infecções por micro-organismos resistentes respondem à terapêutica em 60% das vezes (Rex & Pfaller, 2002).

Mas, quando analisados criteriosamente todos estes fatores, os ensaios de sensibilidade podem auxiliar inclusive no monitoramento do desenvolvimento da resistência durante o tratamento, bem como na identificação de isolados fúngicos menos sensíveis ou resistentes ao agente terapêutico (Espinel-Ingroff, 2008).

Devido à necessidade de padronização dos testes de susceptibilidade, em 1982 o

órgão responsável pela normalização de técnicas laboratoriais nos Estados Unidos, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (antigo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* – NCCLS) designou um subcomitê para padronizar esses ensaios para fungos e antifúngicos. Assim, em 1992 foi proposto um método de referência para a avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos frente à *Candida* sp. e *Cryptococcus neoformans* (CLSI, 1992) que foi aprovado e publicado em 1997 (CLSI, 1997).

A partir disso, houve a publicação de diversas versões atualizadas deste documento, que ocorreram de 2002 a 2008. Por outro lado, dada a maior complexidade morfológica dos fungos filamentosos, bem como uma curva de crescimento mais lenta para a maioria dos representantes desse grupo, uma proposta de padronização para esses fungos foi apresentada somente no ano de 1998 e aprovada em 2002 (NCCLS, 2002), sendo que a sua última atualização foi publicada em 2008 (CLSI, 2008a e 2008b).

Esses documentos descrevem técnicas de macro e microdiluição em caldo para a determinação da CIM e suas principais características abrangem a preparação do inóculo por espectrofotometria, a utilização de RPMI tamponado com MOPS (morpholinepropanesulfonic acid) a pH 7.0, temperatura e período de incubação definidos, leitura visual, valores por percentual de inibição e as recomendações para o controle de qualidade dos ensaios (Cuenca-Estrella, 2010). O meio de cultura mais empregado nestes testes é o RPMI 1640, que é um meio quimicamente definido e bastante complexo, e permite o crescimento de diversas espécies de fungos, mas sem causar qualquer interação com a atividade dos fármacos avaliados no ensaio (Sidrim & Rocha, 2010).

Entretanto, esses métodos apesar de estarem bastante difundidos apresentam algumas limitações. Com a finalidade de obter uma maior exatidão na determinação dos

valores das CIMs, e baseado no documento M-27 do CLSI, em 2002 o *European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (EUCAST) propôs modificações na determinação da CIM para leveduras fermentadoras de glicose, como as representantes do gênero *Candida* (EUCAST, 2002; Stoppa, 2009). Dentre as principais modificações, destacam-se: suplementação do RPMI com 2% de glicose, aumento do tamanho do inóculo e leitura espectrofotométrica (Stoppa, 2009). Um método para a avaliação da atividade antifúngica para fungos filamentosos também foi proposto em 2008, baseado no documento M38-A do CLSI (EUCAST, 2008b).

Segundo Desnos-Ollivier et al. (2012), o conhecimento a respeito do perfil de susceptibilidade aos antifúngicos está limitado às espécies responsáveis pelas infecções em humanos. Mas, ainda é a técnica de maior aceitação internacional, devido ao seu menor custo e facilidade na execução. Até o momento, somente o Etest, que é uma alternativa à técnica de diluição em caldo proporciona a determinação quantitativa da CIM, e alguns sistemas colorimétricos comerciais como o Sensititre YeastOne apresentam equivalência com os métodos de diluição em caldo (Paredes, 2009).

Outra limitação em relação à susceptibilidade antifúngica é a questão do não estabelecimento de pontos de corte na leitura da CIM para a maioria dos antifúngicos, no caso de fungos filamentosos, sendo recomendada por alguns autores para determinar a leitura, a concentração fungicida mínima, porém ainda sem o estabelecimento de sua correlação com a clínica (Lacaz et al., 2002; Pfaller et al., 2004; Schreiber, 2007).

Uma alternativa às técnicas de diluição em caldo é o documento M44-A do CLSI (CLSI, 2004), que propõe a padronização da técnica de disco-difusão para *Candida* spp. frente aos fármacos fluconazol e voriconazol. Neste método utiliza-se ágar Mueller-Hinton acrescido com 2% de glicose e azul de metileno como meio de cultivo, discos de papel contendo 25 µg de antifúngico e a leitura da zona de inibição (halo) é realizada

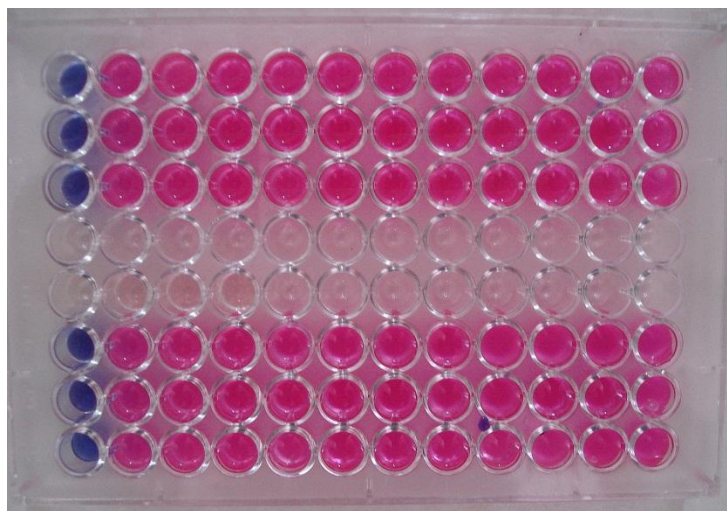


após 24 horas (CLSI, 2004).

Quanto à leitura dos ensaios de diluição, para a anfotericina B os pontos finais são tipicamente bem definidos, sendo considerada a CIM como a menor concentração do fármaco capaz de inibir substancialmente o crescimento do organismo visualmente detectado. Por outro lado, para os azólicos os pontos finais são menos definidos do que os descritos para anfotericina B, o que pode se constituir em fonte de variabilidade. Para essa classe de fármacos, a turbidez permitida corresponde a uma redução de aproximadamente 50% no crescimento, comparado com o crescimento no meio isento de fármaco (Paredes, 2009).

Outra questão a ser levada em conta é a ocorrência do fenômeno de *trailing*, que é decorrente do mecanismo de ação intracelular dos azóis e que é usado para descrever o reduzido, mas persistente crescimento do micro-organismo antes que a inibição ocorra, o que pode muitas vezes causar uma interpretação errada de resistência antifúngica (CLSI, 2004; Paredes, 2009). Neste caso, o resultado obtido após a leitura de 24 horas é consistente com a resposta do tratamento *in vivo* (Stoppa, 2009).

Além disso, também já foram desenvolvidos sistemas colorimétricos, onde a leitura visual dos ensaios de microdiluição em caldo é facilitada pela utilização de indicadores de oxidação-redução (Figura 2). Os compostos mais utilizados são os derivados tetrazólicos, como o MTT [3-(4,5-dimetil-2-triazolil)-2,5-difenil-2H-brometo de tetrazólio] e o XTT [2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfo-fenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida], além de resazurina (Nateche et al., 2006; Sidrim & Rocha, 2010). Esses indicadores possibilitam uma mudança na cor do meio, que é dependente do metabolismo do micro-organismo utilizado no inóculo, auxiliando na determinação do ponto final da reação (Nateche et al., 2006).



**FIGURA 2.** Leitura do ensaio de microdiluição em caldo após aplicação de resazurina.  
Fonte: Roberta Stefanello de Jesus

Outras técnicas de avaliação da susceptibilidade aos antifúngicos e sistemas comerciais baseados em parâmetros do CLSI, também têm sido intensamente investigados, destacando-se o Vitek (BioMérieux), a determinação da atividade fungicida e a quantificação de ergosterol (Lacaz et al., 2002; Sidrim & Rocha, 2010).

Portanto, os ensaios de susceptibilidade aos antifúngicos são fundamentais para orientar a seleção do agente terapêutico mais seguro e adequado para cada paciente.

### **3.5 Vetorização de Antifúngicos em Sistemas Nanoparticulados**

A busca por medicamentos mais eficazes e menos tóxicos para o hospedeiro tem sido crescente. Uma importante tecnologia nesse contexto é a utilização de sistemas nanoestruturados para o tratamento das infecções fúngicas.

A literatura neste campo é bastante vasta trazendo inúmeros trabalhos relacionados à liberação de substâncias com propriedades terapêuticas que apresentam

aplicação farmacêutica, principalmente com a utilização de nanopartículas poliméricas (Schaffazick et al., 2003; Mohanraj & Chen, 2006; Mora-Huertas et al., 2010; Zhang et al., 2010; Mudshinge et al., 2010).

Estas, por sua vez, têm atraído a atenção dos pesquisadores em relação a outros sistemas coloidais, como por exemplo, os lipossomas, devido a possibilidade de aperfeiçoamento de aspectos relacionados à estabilidade dos compostos bioativos veiculados através desses sistemas, e em virtude de suas inúmeras potencialidades terapêuticas (Schaffazick et al., 2003; Guterres et al., 2007; Mora-Huertas et al., 2010).

Dentre os polímeros utilizados para o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados associados à encapsulação e liberação controlada de compostos bioativos, destacam-se a poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL), os homo e copolímeros de lactato e glicolato (PLA, PGA, PLGA) e os polihidroxialcanoatos (PHA) (Reis et al., 2006; Mora-Huertas et al., 2010).

Nesta perspectiva, em meados da década de 1990, ocorreu o desenvolvimento das formulações lipídicas de anfotericina B, incrementando o emprego deste fármaco nas infecções fúngicas sistêmicas e permitindo a adoção de um esquema terapêutico mais benéfico e seguro para os pacientes (Lacaz et al., 2002; Vyas & Gupta, 2006; Sidrim & Rocha, 2010).

O termo nanopartículas poliméricas engloba as nanocápsulas e as nanoesferas, que podem ser constituídas de polímeros biodegradáveis. Portanto, nanocápsulas e nanoesferas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos, sendo uma de suas principais características o seu tamanho, já que apresentam um diâmetro na ordem de nanômetros (menores do que 1000 nm) (Schaffazick et al., 2003; Reis et al., 2006; Guterres et al., 2007; Mora-Huertas et al., 2010). Estas nanopartículas apresentam algumas diferenças quanto à organização morfológica e estrutural do polímero, e a

presença ou ausência de uma fase oleosa na sua composição (Schaffazick et al., 2003).

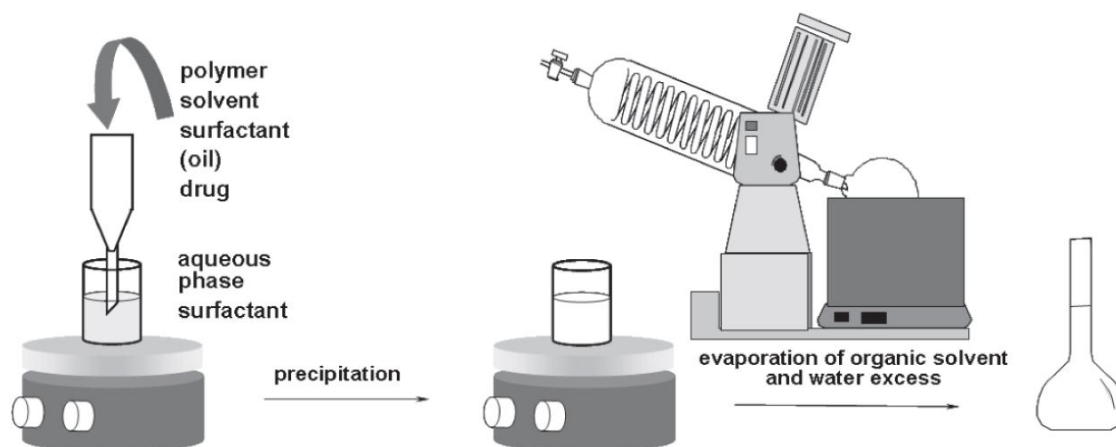
As nanocápsulas são vesículas constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (Schaffazick et al., 2003; Reis et al., 2006; Mora-Huertas et al., 2010).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para a preparação de nanopartículas poliméricas. De um modo geral, estes métodos podem ser divididos em duas categorias principais: a dos métodos baseados na polimerização *in situ* de monômeros dispersos (Reis et al., 2006; Mora-Huertas et al., 2010), ou das técnicas baseadas na precipitação de polímeros (sintéticos ou naturais) pré-formados (Figura 3) (Guterres et al., 2007), tais como PCL, poli(ácido-lático) (PLA), poli(ácido-glicólico) (PLG) e poli(ácido-lático-co-glicólico) (PLGA) (Fessi et al., 1989; Reis et al., 2006; Mora-Huertas et al., 2010).

De acordo com Reis et al. (2006) o método de deposição interfacial do polímero pré-formado é uma técnica de emulsificação/solidificação, na qual um componente de natureza oleosa é empregado para a preparação de nanocápsulas, o qual é miscível com o solvente do polímero, mas imiscível com a mistura. Segundo esses mesmos autores, a principal diferença desta técnica em relação às outras, é que o polímero é dissolvido em conjunto com o fármaco numa mistura de solventes (fase orgânica). Assim, esta mistura é injetada lentamente em um meio aquoso sob agitação, o que resulta na deposição do polímero sob a forma de nanocápsulas com cerca de 230 nm de diâmetro (Reis et al., 2006).

Após a mistura das duas fases miscíveis, o polímero precipita na interface pela redução de sua solubilidade na mistura de solventes, sendo que a difusão mútua dos

solventes favorece a formação de nanogotas de óleo que servem como núcleo para que ocorra esta precipitação do polímero (Fessi et al., 1989). A partir disso, nota-se o surgimento imediato de uma suspensão leitosa, devido à formação das nanocápsulas.



**FIGURA 3.** Representação esquemática da preparação de nanocápsulas poliméricas pelo método de deposição interfacial de polímeros pré-formados.

\*Adaptado de Guterres et al., 2007.

A caracterização físico-química das nanopartículas envolve vários aspectos, como a distribuição de tamanho de partícula, a determinação do potencial zeta, que reflete o potencial de superfície das partículas, a determinação do pH, a quantidade de fármaco associado às nanoestruturas, a cinética de liberação do fármaco, além da avaliação da estabilidade da formulação em função do tempo de armazenamento (Schaffazick et al., 2003; Mora-Huertas et al., 2010).

O desenvolvimento de sistemas coloidais poliméricos como vetores de fármacos visa inúmeras aplicações terapêuticas, sendo estes planejados, principalmente, para administração parenteral, oral, tópica e oftálmica (Mora-Huertas et al., 2010). Desta forma, uma das áreas mais promissoras para o emprego de nanopartículas é a vetorização de antimicrobianos (Mora-Huertas et al., 2010; Zhang et al., 2010) almejando

principalmente, uma distribuição mais seletiva dos mesmos no organismo e, assim, um aumento do índice terapêutico; a liberação controlada dos fármacos e a redução de seus efeitos adversos, além de possibilitar uma maior estabilidade dessas formulações nanoestruturadas em comparação às formulações tradicionais (Schaffazick et al., 2003; Mora-Huertas et al., 2010).

Além desses benefícios, as nanoestruturas também são capazes de proteger o fármaco frente à degradação enzimática, química ou imunológica (Barratt, 2000).

Em artigo de revisão, Huh & Kwon (2011) mostram que diversos esforços têm sido realizados no combate à resistência aos antimicrobianos, particularmente, utilizando-se ferramentas de nanotecnologia para a vetorização de antibióticos como novas estratégias para enfrentar os desafios atuais no tratamento de doenças infecciosas.

Neste sentido, de acordo com White et al. (1998), a associação de fármacos antifúngicos a sistemas nanoparticulados pode ser uma alternativa no tratamento de infecções fúngicas resistentes ao tratamento convencional, sendo possível que estes sistemas alterem a maneira como a célula do fungo interaja com o fármaco, podendo ter um efeito negativo ou positivo no desenvolvimento da resistência aos azólicos.

Vários relatos na literatura descrevem a encapsulação de antifúngicos em nanopartículas poliméricas nos últimos anos. Devido ao caráter lipofílico e à fraca solubilidade em água de alguns azólicos, Bachhav et al. (2011) investigaram micelas poliméricas como sistemas de vetorização de três desses fármacos, fluconazol, econazol e clotrimazol para aplicação tópica. O aumento do tempo de retenção na pele do econazol em associação às micelas demonstrou uma maior biodisponibilidade do fármaco nanoestruturado em comparação com uma formulação lipossomal comercializada para uso tópico (Bachhav et al., 2011). Em outro estudo anterior, a associação de econazol e clotrimazol à nanopartículas do copolímero poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico)

(PLGA) permitiu o aumento significativo da biodisponibilidade desses fármacos após a administração oral e intravenosa em camundongos (Pandey et al., 2005).

Gupta & Vyas (2012) verificaram um importante aumento da eficácia terapêutica, quando fluconazol foi associado à nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) em um modelo murino de candidíase cutânea.

Kakkar & Kaur (2011) demonstraram a possibilidade de vetorização do cetoconazol para aplicação oftálmica usando sistemas de nanovesículas elásticas, que permitiram o direcionamento do fármaco ao segmento posterior dos olhos, uma limitação das formulações usadas tradicionalmente na terapêutica.

Além disso, Italia *et al.* (2011) verificaram um aumento da atividade antifúngica de uma formulação de anfotericina B associada a nanopartículas poliméricas comparável ou melhor do que o perfil demonstrado por duas formulações deste antibiótico que vem sendo comumente utilizadas no tratamento de aspergilose invasiva.

Portanto, a escolha adequada do polímero e a habilidade em modificar a liberação de fármacos a partir de nanoestruturas poliméricas representam estratégias interessantes para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (Kayser, 2005). Neste sentido, a busca de novas estratégias terapêuticas, a partir do resgate de antifúngicos já disponíveis no mercado, como o cetoconazol e o fluconazol, por meio do desenvolvimento de vetores nanoestruturados pode possibilitar um tratamento mais eficaz, a partir de doses menores dos fármacos e, conseqüentemente, menos tóxicas para o paciente.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ISOLADOS

Foram selecionados para o estudo 82 isolados de fungos emergentes, abrangendo 26 isolados de diferentes nichos ambientais e 56 isolados de diferentes amostras clínicas, que fazem parte da coleção de fungos do Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada (GPMA) da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

Destes, um total de 55 isolados corresponderam às leveduras: *Candida tropicalis* (n=22), *Candida parapsilosis* (n=13), *Candida albicans* (n=9), *Candida catenulata* (n=3), *Candida guilliermondii* (n=1), *Rhodotorula mucilaginosa* (n=5), *Rhodotorula glutinis* (n=1) e *Kodamaea ohmeri* (n=1). Sendo os demais 27 isolados analisados de fungos filamentosos: *Aspergillus flavus* (n=6), *Aspergillus niger* (n=6), *Aspergillus fumigatus* (n=5), *Aspergillus terreus* (n=1), *Fusarium* sp. (n=6), *Paecilomyces* sp. (n=2) e *Cunninghamella* sp. (n=1).

Entre os isolados ambientais foram analisadas no estudo as seguintes espécies: *Candida parapsilosis* (n=4), *Candida catenulata* (n=3), *Candida guilliermondii* (n=1), *Kodamaea ohmeri* (n=1), *Rhodotorula glutinis* (n=1), *Aspergillus flavus* (n=4), *Aspergillus niger* (n=3), *Fusarium* sp. (n=6), *Paecilomyces* sp. (n=2) e *Cunninghamella* sp. (n=1).

Entre os isolados clínicos foram analisadas no estudo as seguintes espécies: *Candida tropicalis* (n=22), *Candida parapsilosis* (n=9), *Candida albicans* (n=9), *Rhodotorula mucilaginosa* (n=5), *Aspergillus flavus* (n=2), *Aspergillus niger* (n=3), *Aspergillus fumigatus* (n=5) e *Aspergillus terreus* (n=1).



## 4.2 IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS

### 4.2.1 IDENTIFICAÇÃO CROMOGÊNICA

A determinação da pureza e identificação preliminar dos isolados de *Candida* sp. foi realizada em meio CHROMagar *Candida* (Probac, Brasil). A partir de subcultivos neste meio foi possível identificar *C. albicans* e *C. tropicalis*. Fragmentos destas culturas foram inoculados em placas de Petri (90mmX15mm) contendo o ágar cromogênico. Estas placas foram, então, incubadas por 24 a 48 horas à temperatura de 32°C. Através da visualização da produção de substâncias cromogênicas no meio: (verde: *C. albicans*, azul: *C. tropicalis*, rosa: *C. krusei*) foi realizada a identificação dos isolados. Posteriormente, colônias isoladas de cada espécie foram subcultivadas para ágar sabouraud dextrose (HiMedia, Índia) em tubos de ensaio e incubadas à temperatura de 32°C por um período de 24 horas para a identificação morfológica e bioquímica.

### 4.2.2 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

#### 4.2.2.1 MICROCULTIVO EM LÂMINA

Cada isolado de levedura foi semeado de maneira a formar 3 estrias paralelas e equidistantes uma das outras sobre a superfície de ágar batata dextrose (HiMedia, Índia) contido em placas de Petri. Estas estrias foram cobertas com lamínulas (24mmX24mm) estéreis e, em seguida, as placas de Petri foram incubadas à temperatura de 32°C por 48-96 horas. A leitura por microscopia óptica com aumento de 40X foi procedida para a verificação da produção de clamidósporos, sugestivos de *C. albicans* ou a presença de blastoconídios sem hifas ou pseudo-hifas que é um indicativo de *C. glabrata*, *Rhodotorula* sp. ou outras espécies de *Candida*.

### **4.2.3 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA**

As provas bioquímicas foram realizadas utilizando o equipamento automatizado VITEK 2 Compact (BioMérieux, França) e o sistema comercial ID 32C (BioMérieux, França). Estes sistemas apresentam testes de assimilação de carboidratos e compostos nitrogenados miniaturizados e uma base de dados para a identificação de leveduras. Dentre alguns dos substratos disponíveis nestes sistemas estão a galactose, lactose, sacarose, maltose, celobiose, metil-D-glicosídeo, xilose, arabinose, trealose, rafinose, xilitol, sorbitol, glicose, inositol, além de meios contendo ainda cicloheximida, nitrato e uréia. A metodologia de identificação baseia-se nos métodos bioquímicos estabelecidos por Wickerham & Burton (1948). O inóculo, incubação e leitura dos resultados foram procedidos de acordo com as especificações do fabricante. Ao término da análise dos perfis bioquímicos, o equipamento imprimiu relatório de identificação para cada isolado testado. O grau de certeza de identificação foi dado por percentuais de probabilidade. A identificação foi considerada correta e completa quando os percentuais de probabilidade foram  $\geq 85\%$ .

## **4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS**

### **4.3.1 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA**

#### **4.3.1.1 MICROCULTIVO EM LÂMINA**

Cada isolado de fungo filamentoso foi semeado, a partir de um repique recente, nos 4 lados de um cubo de ágar batata dextrose contido em uma placa de Petri. Então, foi feita uma câmara úmida adicionando 1 mL de água destilada estéril no fundo da placa,

para evitar a dessecação do meio de cultura, durante o crescimento do fungo. A placa foi tampada e incubada a 32°C por 7 a 10 dias, até a observação do desenvolvimento de hifas como ou sem pigmentação. Após, observou-se em microscópico óptico com objetiva de 40X o tipo e cor da hifa e a forma, disposição e formação de esporos.

#### **4.4 TESTE DE TERMOTOLERÂNCIA A 37°C PARA OS ISOLADOS DE ORIGEM AMBIENTAL**

Todos os isolados de origem ambiental utilizados neste trabalho antes de serem identificados através dos métodos fenotípicos foram submetidos ao teste de termotolerância a 37°C com a finalidade de selecionar somente aqueles potencialmente patogênicos de acordo com Lendeers et al. (1999). Logo, um inóculo na concentração de  $10^4$  esporos/mL foi semeado em duplicata em tubos contendo caldo sabouraud e incubado a 37°C por um período de 24 a 72 horas para os isolados leveduriformes e de 7 a 10 dias para os isolados de fungos filamentosos. A capacidade do isolado fúngico se multiplicar na temperatura corporal humana foi considerada positiva quando observou-se turvação no caldo.

#### **4.5 TESTE DE TRIAGEM PARA FORMAÇÃO DE BIOFILME**

##### **4.5.1 MÉTODO DO CRISTAL VIOLETA EM MICROPLACA**

A formação de biofilme pelos fungos foi avaliada em placas de microtitulação de poliestireno pelo método do Cristal Violeta descrito por Stepanovic et al. (2007), com pequenas modificações. Foram preparados 200 mL de meio TSB (caldo triptose de soja) suplementado com 1% de glicose. A suspensão do inóculo foi preparada em salina estéril (0,85%) alcançando-se a turbidez equivalente a 0,5 da escala de McFarland ( $1,5 \times 10^6$

UFC/mL) para os fungos leveduriformes. Para as espécies de fungos filamentosos, foram preparadas suspensões de conídios ou esporangiosporos ajustadas em espectrofotômetro (Spectrum Instruments Co., China) para uma densidade óptica que variou de: 0,09 a 0,11 (*Aspergillus* e *Paecilomyces*) e de 0,15 a 0,17 (*Fusarium* e *Cunninghamella*), obtendo-se uma concentração final em torno de  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL. O ensaio foi realizado em quadruplicata em três períodos diferentes obtendo-se 12 repetições para cada isolado investigado. Para isso, os poços da microplaca foram preenchidos sequencialmente com alíquotas de 180  $\mu$ L de caldo TSB e 20  $\mu$ L do inóculo fúngico. No controle positivo, foram transferidos 180  $\mu$ L de caldo TSB e um inóculo de 20  $\mu$ L de uma suspensão de *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984), e no controle negativo transferiram-se somente 200  $\mu$ L de caldo TSB. O período de incubação utilizado foi de 48 horas para as leveduras e fungos filamentosos à 37°C, com a exceção da *Cunninghamella* sp., que foi de 24 horas, e um período de 72 horas para os isolados do gênero *Rhodotorula* sp. Após o período de incubação, seguiram-se as etapas de fixação, coloração e leitura das absorbâncias na placa de microtitulação, respectivamente. O corante utilizado no estudo foi a violeta de genciana (Newprov) a 0,5% nas mesmas condições estabelecidas por Stepanovic et al. (2007) para o corante cristal violeta. A avaliação da formação de biofilme foi realizada através de leitura da absorbância de cada poço utilizando-se leitor de microplacas em comprimento de onda de 570 nm. O ponto de corte correspondeu ao valor médio das absorbâncias do controle negativo somado a três desvios padrão. Para a interpretação dos dados foram considerados os valores médios da leitura de absorbância de acordo com a equação de Stepanovic et al. (2007). As amostras foram classificadas como fortemente (absorbância média superior a quatro vezes o ponto de corte), moderadamente (absorbância média entre duas e quatro vezes o ponto de corte) ou fracamente (absorbância média superior a duas vezes o ponto de corte) produtoras de

biofilme. As amostras não produtoras apresentaram valor de absorbância igual ou inferior ao ponto de corte.

#### **4.6 MATERIAIS UTILIZADOS NA PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS**

O polímero poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL, PM 80.000) foi adquirido da Aldrich (Alemanha), o fluconazol da Pharma Nostra (Brasil) e o cetoconazol da Embrapharma (Brasil). Os tensoativos monoestearato de sorbitano e polissorbato 80 foram obtidos da Delaware (Porto Alegre, Brasil). O óleo composto de triglicerídeos dos ácidos caprílico e cáprico (Miglyol 810) foi obtido da Hulls (França). O dimetilsulfóxido (DMSO) (Vetec, Brasil), o RPMI 1640 (HiMedia, Índia), o ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS, Sigma-Aldrich, Alemanha) e a resazurina (Sigma-Aldrich, Alemanha) também foram utilizados nos ensaios.

##### **4.6.1 PREPARAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS DE POLI- $\epsilon$ -CAPROLACTONA (PCL) CONTENDO FLUCONAZOL E CETOCONAZOL**

A preparação das nanocápsulas foi realizada através do método de deposição interfacial do polímero pré-formado seguido pela evaporação do solvente, descrito por Fessi et al. (1989). Inicialmente preparou-se a fase orgânica, na qual foram dissolvidos 100 mg de polímero poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL), juntamente do fármaco (5 mg de fluconazol e 4 mg de cetoconazol) em uma solução de acetona (10 mL) contendo 2,5% v/v de Miglyol 810 N (triglicéride cáprico/caprílico). A dissolução ocorreu por meio de agitação com o auxílio de um agitador magnético e aquecimento até 40°C. Em seguida, a solução orgânica foi vertida em uma solução externa aquosa (20 mL) contendo 0,75%

p/v de polissorbato 80, mantendo a mesma agitação por 10 minutos, a fim de promover a formação das nanocápsulas. Posteriormente, esta suspensão foi levada ao rotavapor, mantendo-se a temperatura do banho em torno de 50°C para evaporação do solvente à pressão reduzida, até um volume final de 10 mL, de maneira que a concentração final de fármaco foi ajustada para 0,5 mg/mL (m/v) para o fluconazol e de 0,4 mg/mL (m/v) para o cetoconazol. Após a evaporação do solvente a 50°C as formulações foram deixadas à temperatura ambiente até o resfriamento total. Então, foram retiradas alíquotas para a caracterização físico-química das partículas e as formulações foram então submetidas à filtração (0,45 µm) e armazenadas em frascos âmbar estéreis a 4°C até sua utilização nos ensaios de susceptibilidade. A suspensão de nanocápsulas usada como controle (NC) nos ensaios foi preparada da mesma maneira descrita acima, diferindo apenas pela ausência de fármaco nestas formulações.

#### **4.6.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FORMULAÇÕES**

##### **4.6.2.1 MEDIDAS DE TAMANHO E POLIDISPERSÃO**

A determinação de tamanho das partículas e o índice de polidispersão, que se refere à distribuição de tamanho das nanoestruturas, foram realizados pela técnica de difração de laser, utilizando o equipamento Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, UK). As amostras foram utilizadas sem diluição prévia. O tamanho médio das partículas foi expresso através do diâmetro de esfera equivalente ( $D_{[4,3]}$ ) e a distribuição de tamanho foi expressa pelo valor de SPAN, segundo a equação abaixo:

$$Span = D(0,9) - D(0,1) / D(0,5)$$

Onde  $D_{(0,9)}$ ,  $D_{(0,1)}$  e  $D_{(0,5)}$  são os diâmetros de 90%, 10% e 50% dos volumes acumulados, respectivamente.

#### **4.6.2.2 MEDIDA DO POTENCIAL ZETA**

Na determinação do potencial zeta (mV) foi utilizada a técnica da microeletroforese em equipamento de Zetasizer (Malvern) à 25°C. As análises foram realizadas diluindo-se 1:500 (v/v) as suspensões de nanocápsulas em solução de NaCl 10 mM.

#### **4.6.2.3 TEOR DE FÁRMACO E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO**

Para validação do método de doseamento do fluconazol e do cetoconazol foi utilizada a espectrofotometria (UV – 1800 PC Spectrophotometer). Para isso foi feita uma varredura de 200 a 300 nm, para determinar o comprimento de onda de absorção máxima. A linearidade foi determinada a partir da construção de três curvas de determinação na faixa de 5 a 50 µg/mL. A precisão foi determinada a partir do doseamento de seis amostras na concentração de 30µg/mL. A exatidão foi determinada pelo doseamento de três concentrações, baixa, média e alta (30, 40 e 50 µg/mL) pelo método de adição do padrão. A especificidade foi avaliada a partir da comparação de amostras com e sem adição de nanocápsulas controle (NC).

Para determinação do teor de fármaco, as formulações de nanocápsulas NC, FN e CN foram diluídas em acetonitrila até a concentração de 12µg/mL. Após, as amostras foram lidas em espectrofotômetro de ultravioleta em 260nm e a absorbância obtida para

as NC foram descontadas do valor obtido para FN e CN, com o intuito de determinar a quantidade de antifúngico presente em cada formulação.

Para a realização do teste de porcentagem de encapsulação, as amostras de nanocápsulas foram diluídas em acetato de etila (1:3) e o fármaco livre da suspensão final das nanocápsulas foi homogeneizado em vórtex por três minutos. Após, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm durante cinco minutos e uma alíquota do sobrenadante foi levada para leitura em espectrofotômetro a 260 nm.

#### **4.7 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS**

Na avaliação da susceptibilidade foram utilizados quatro antifúngicos azólicos, fluconazol, itraconazol, cetoconazol e miconazol, e um derivado poliênico, a anfotericina B.

A susceptibilidade dos isolados de leveduras e fungos filamentosos ao fluconazol (Pharma Nostra, Brasil), itraconazol (Jansen-Cilag, Brasil), cetoconazol (Embrapharma, Brasil), miconazol (Pharma Nostra, Brasil) e anfotericina B (Cristália, Brasil) foi estabelecida pelo método de microdiluição em caldo de acordo com os documentos M27-A3 e M38-A2 (CLSI, 2008) para leveduras e fungos filamentosos, respectivamente. Como controle de qualidade da atividade antifúngica dos fármacos testados, foram incluídas em cada ensaio *Candida albicans* ATCC 24433 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 como organismos-controle. A interpretação dos testes foi realizada de acordo com a padronização recomendada pelo CLSI (2008) (Tabela 1 e tabela 2).



## 4.7.1 MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

### 4.7.1.1 PROTOCOLO CLSI/M27-A3 (CLSI, 2008)

Soluções-estoque de itraconazol, cetoconazol, miconazol e anfotericina B foram preparadas separadamente por solubilização do fármaco em dimetilsulfóxido (DMSO) para obter-se uma concentração de 1600 µg/mL. Para a preparação da solução-estoque de fluconazol, o fármaco foi solubilizado em água destilada estéril à concentração de 6400 µg/mL.

Posteriormente, as soluções-estoque foram diluídas em RPMI 1640 tamponado a pH 7.0 com tampão MOPS (0,165 M) para todos os antifúngicos. As concentrações finais para cada fármaco variaram de 0,0313 a 16 µg/mL para itraconazol, cetoconazol, miconazol e anfotericina B, e de 0,125 a 64 µg/mL para fluconazol.

A suspensão do inóculo foi preparada em salina estéril (0,85%) alcançando-se a turbidez equivalente a 0,5 da escala de McFarland ( $1,5 \times 10^6$  UFC/mL). Posteriormente, esta suspensão foi diluída 1:50 em salina. A solução final do inóculo foi diluída 1:20 em caldo RPMI obtendo-se uma concentração final de  $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  UFC/mL.

O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de 96 poços com fundo em U que foram incubadas a 35°C de 24 a 48 h para as leveduras do gênero *Candida* e *Kodamaea ohmeri*, e de 48 a 72 h para *Rhodotorula*. A CIM foi definida como a menor concentração do fármaco capaz de inibir 50% do crescimento fúngico para os azólicos, e 100% do crescimento fúngico para a anfotericina B, em comparação com o controle de crescimento livre de antifúngico. Incluíram-se nestes ensaios um controle livre de micro-organismo (controle de esterilidade) e um controle livre de antifúngico (controle de crescimento).

**TABELA 1.** Classificação dos isolados de *Candida* spp. de acordo com os pontos de corte do CLSI, para os cinco antifúngicos testados

Antifúngicos	Sensível ( $\mu\text{g/mL}$ )	Sensível Dose-Dependente ( $\mu\text{g/mL}$ )	Resistente ( $\mu\text{g/mL}$ )
Anfotericina B	$\leq 1,0$	-	$\geq 2,0$
Fluconazol	$\leq 8,0$	16,0 - 32,0	$\geq 64,0$
Itraconazol	$\leq 0,125$	0,25 - 0,5	$\geq 1,0$
Miconazol <sup>a</sup>	$\leq 8,0$	-	$\geq 16,0$
Cetoconazol <sup>b</sup>	$\leq 8,0$	-	$\geq 16,0$

<sup>a</sup>Adaptado de Isham & Ghannoum (2009).

<sup>b</sup>Adaptado de Bremenkamp et al. (2011).

#### 4.7.1.2 PROTOCOLO CLSI/M38-A2 (CLSI, 2008)

Para induzir a formação de conídios e esporangiosporos para a preparação do inóculo, os fungos foram cultivados em ágar batata dextrose durante sete dias a 32°C. As colônias de sete dias foram cobertas com 3 mL de solução salina a 0,85% e foi preparada uma suspensão de esporos mexendo-se delicadamente as colônias com uma pipeta de transferência. Foi retirado o sobrenadante e transferido para um novo tubo estéril com salina, e as densidades ópticas (DO) foram lidas e ajustadas em espectrofotômetro (Spectrum Instruments Co., China) com uma variação de 0,09 a 0,11 para as espécies de *Aspergillus* e de *Paecilomyces*, e de 0,15 a 0,17 para *Fusarium* e *Cunninghamella*. Posteriormente, estas suspensões foram diluídas 1:50 em caldo RPMI-MOPS. Logo, a suspensão do inóculo apresentou uma concentração final de  $0,4 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$  UFC/mL.

O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de 96 poços com fundo em U que foram incubadas a 35°C por 24 h para *Cunninghamella* e por 48 h para os demais fungos analisados no estudo. A CIM foi definida como a menor concentração do fármaco capaz de inibir 50% (100% para a anfotericina B e itraconazol) do crescimento fúngico, em comparação com o controle de crescimento livre de antifúngico. Incluíram-se nestes

ensaios um controle livre de micro-organismo (controle de esterilidade) e um controle livre de antifúngico (controle de crescimento).

**TABELA 2.** Interpretação do teste de susceptibilidade *in vitro* para os fungos filamentosos frente aos cinco antifúngicos testados\*

Antifúngicos	Sensível ( $\mu\text{g/mL}$ )	Sensível Dose-Dependente ( $\mu\text{g/mL}$ )	Resistente ( $\mu\text{g/mL}$ )
Anfotericina B	$\leq 1,0$	2,0	$\geq 4,0$
Fluconazol	$\leq 8,0$	16,0 - 32,0	$\geq 64,0$
Itraconazol	$\leq 1,0$	2,0	$\geq 4,0$
Miconazol	$\leq 1,0$	-	$\geq 4,0$
Cetoconazol	$\leq 1,0$	-	$\geq 4,0$

\*Adaptado de Espinel-Ingroff (2008).

#### 4.7.1.3 PROTOCOLOS CLSI/M27-A3 e M38-A2 ADAPTADOS PARA AS NANOCÁPSULAS CONTENDO ANTIFÚNGICOS

No momento da realização do ensaio de susceptibilidade, a formulação nanoestruturada foi diluída em água destilada estéril para obtenção da mesma concentração do fármaco na forma livre (32  $\mu\text{g/mL}$  para o cetoconazol e 128  $\mu\text{g/mL}$  para o fluconazol) de acordo com os manuais do CLSI (2008) e, posteriormente foi submetida à filtração através de membrana Millipore® (Merck Millipore, EUA) de 0,45  $\mu\text{m}$  e armazenada em frasco âmbar estéril. Também foram preparadas diluições nas mesmas concentrações para as nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL) sem fármaco para servirem de comparação na análise dos resultados.

O perfil de susceptibilidade das leveduras frente aos fármacos investigados foi determinado pela técnica de microdiluição em caldo, em triplicata, de acordo com o documento M27-A3 (para leveduras) e M38-A2 (para fungos filamentosos) (CLSI, 2008), com modificações. Além disso, determinou-se a concentração inibitória mínima

(CIM) através de análise visual e leitura em espectrofotômetro a 570 nm (EnVision® Microplate Reader) após 42h de incubação em estufa microbiológica a 35°C. Depois, realizou-se a confirmação da CIM dos fármacos nanoencapsulados através da aplicação de resazurina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) a 0,01% segundo Nateche et al. (2006), modificado para fungos.

Os isolados de *Candida* foram repicados em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol (HiMedia, Mumbai, Índia) e mantidos por 24 h a 32°C. A suspensão do inóculo foi preparada em salina estéril (0,85%) alcançando-se a turbidez equivalente a 0,5 da escala de McFarland ( $1,5 \times 10^6$  UFC/mL). A solução final do inóculo foi diluída em caldo RPMI-MOPS obtendo-se uma concentração final de  $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  UFC/mL.

O ensaio foi realizado em microplacas estéreis de 96 poços com fundo em U que foram incubadas a 35°C por 42h. A CIM foi definida como a menor concentração da droga capaz de inibir 50% do crescimento fúngico, em comparação com o controle de crescimento livre de antifúngico. Incluíram-se nestes ensaios um controle livre de micro-organismo (controle de esterilidade) e um controle livre de antifúngico (controle de crescimento). *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) foi incluída como controle de qualidade da metodologia dos ensaios.

Após a leitura da CIM e antes da aplicação de resazurina, realizou-se o teste da concentração fungicida mínima (CFM) que está descrito no item 4.6.1.4 deste capítulo.

Para auxiliar na leitura visual da atividade antifúngica das nanocápsulas poliméricas de cetoconazol e de fluconazol, utilizou-se o corante vital conhecido como resazurina a 0,01% conforme descrito por Nateche et al. (2006). Após o período de incubação de 42 h, uma alíquota de 20 µL de uma solução de resazurina a 0,01% foi adicionada em todos os poços da microplaca; as placas foram incubadas por 6 h à 32°C e após este período, foi realizada a leitura visual dos resultados. Uma mudança na

coloração da resazurina de azul para rosa indica a redução do indicador e, assim, o crescimento do fungo na microplaca pode ser comparado visualmente com a mudança da cor observada na coluna de crescimento do controle positivo do ensaio.

#### **4.7.1.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)**

Após a leitura da CIM, uma alíquota de 20 µL dos poços em que se determinou a CIM e as concentrações imediatamente mais concentradas, bem como os controles de crescimento dos micro-organismos, foram subcultivados em placas de Petri contendo agar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol, e desprovidas de qualquer antifúngico, e foram incubadas a 32°C por 24h. Designou-se como CFM a concentração fungicida mínima em que não ocorreu crescimento visível (100% de inibição) dos fungos testados com base no crescimento dos controles (Denning et al., 1992). Os ensaios foram realizados em duplicata.

#### **4.8 ANÁLISE DOS DADOS DE BIOFILME**

Os dados obtidos no teste de biofilme foram submetidos à análise estatística utilizando-se análise de variância (ANOVA) e Teste Exato de Fisher do programa SPSS (versão 18). Os níveis de significância estatística foram estabelecidos em  $p < 0,05$ .

#### **4.9 ANÁLISE DE RESULTADOS DAS CIMs E CFMs**

O resultado das CIMs e das CFMs obtidas pelos métodos em estudo foi avaliado segundo 4 características de distribuição: (1) variação dos valores, representando os limites inferior e superior destas concentrações para cada antifúngico referente às diferentes espécies de fungos testados; (2) CIM<sub>50</sub> e CFM<sub>50</sub> definidas como a concentração inibitória mínima da droga capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras testadas; (3) CIM<sub>90</sub> e CFM<sub>90</sub> definidas como a concentração inibitória mínima da droga capaz de inibir o crescimento de 90% das amostras testadas e (4) média geométrica, utilizada para a comparação da potência dos antifúngicos em estudo.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

Das 82 amostras analisadas, 68 (82,9%) produziram biofilme pelo teste da microplaca, sendo 38 fortes, 17 moderadas, 13 fracas produtoras, e apenas 14 (17,1%) amostras do total de isolados avaliados pelo método do cristal violeta não foram capazes de produzir biofilme.

Do total de leveduras analisadas, 91% (50/55) dos isolados foram produtores de biofilme, sendo que destes, 29 (52,7%) apresentaram fenótipo fortemente aderente, 12 (21,8%) fenótipo moderadamente aderente e 9 (16,4%) fracamente aderente (Figura 4). Por outro lado, 5 cepas (9%) não foram produtoras de biofilme através deste método (Figura 4).

Dentre as diferentes espécies de leveduras analisadas no estudo, as espécies do gênero *Candida* foram as maiores produtoras de biofilme (Figura 5), destacando-se as espécies: *C. tropicalis* com 16 (73%) cepas com fenótipo fortemente aderente, seguida pelas espécies de *C. albicans* (55,5%) e *C. parapsilosis* (54%) (Figura 5). Porém, todas as demais espécies do gênero também apresentaram cepas capazes de formar biofilme. Com exceção de 2 (9,09%) isolados de *C. tropicalis* e de 3 (60%) dos 5 isolados de *R. mucilaginosa* testados (Figura 5).

Em relação aos fungos filamentosos, dos 27 isolados avaliados por este método, 18 cepas (66,7%) produziram biofilme, sendo que apenas 9 cepas (33,3%) apresentaram fenótipo fortemente aderente. Além disso, 5 cepas (18,5%) destes 18 isolados de fungos filamentosos produtores de biofilme, apresentaram fenótipo moderadamente aderente e 4

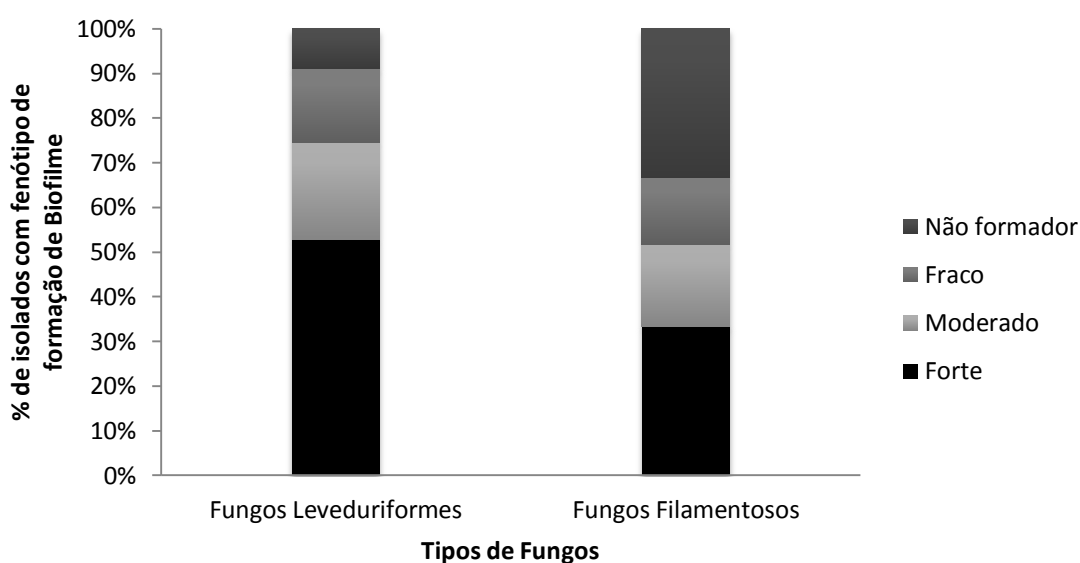
cepas (15%) fracamente aderente (Figura 4). Por outro lado, 9 isolados (33,3%) não produziram biofilme (Figura 4).

Com base na figura 6, pode-se observar que dentre as espécies de fungos filamentosos capazes de formar biofilme, destacaram-se os fungos do gênero *Aspergillus*, particularmente *A. flavus* (66,7%), *A. niger* (50%) e *A. terreus* (100%). Por outro lado, 100% dos isolados de *Fusarium* sp. e de *Cunninghamella* sp., e 50% das cepas de *Paecilomyces* sp. não formaram biofilme.

Além disso, observou-se que os isolados clínicos apresentaram maior capacidade de formação de biofilme ( $p < 0,05$ ) do que os isolados ambientais (Figura 7).

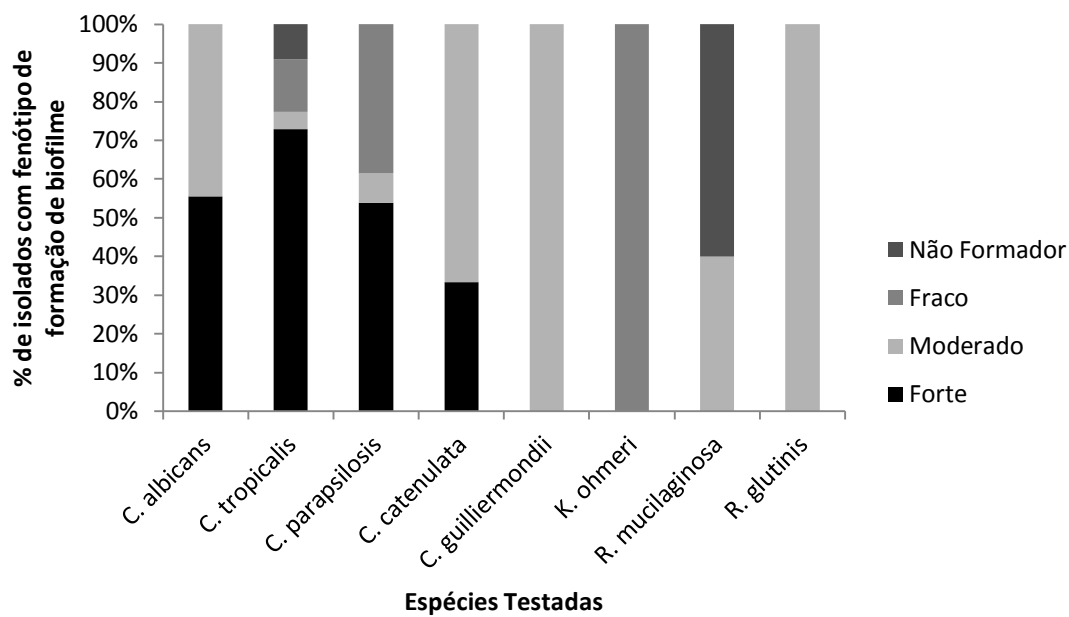
De um modo geral, os fungos apresentaram elevada sensibilidade tanto aos azólicos quanto à anfotericina B. Dentre os isolados altamente produtores de biofilme, 34% foram resistentes a fluconazol, 10,5% resistentes a itraconazol, 10,5% resistentes a anfotericina B e 2,6% resistentes a miconazol.

Não houve correlação entre a produção de biofilme e a susceptibilidade aos antifúngicos testados nas células planctônicas ( $p > 0,05$ ).

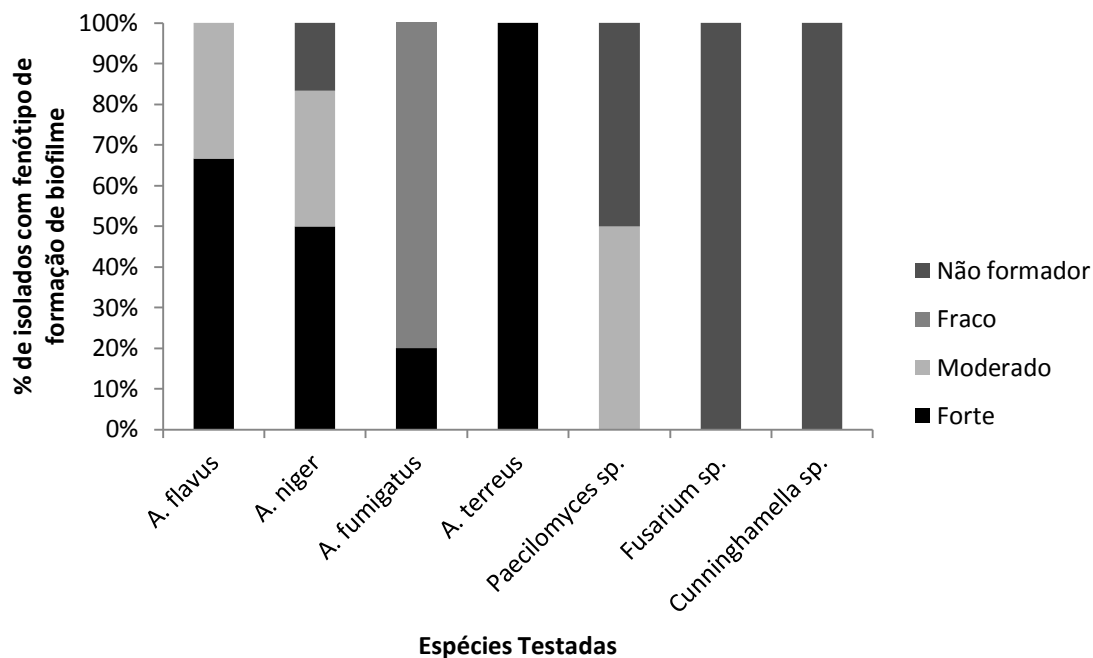


**Figura 4.** Fenótipo de formação de biofilme em porcentagem dos isolados leveduriformes em comparação aos isolados de fungos filamentosos, obtido através do método do cristal violeta.

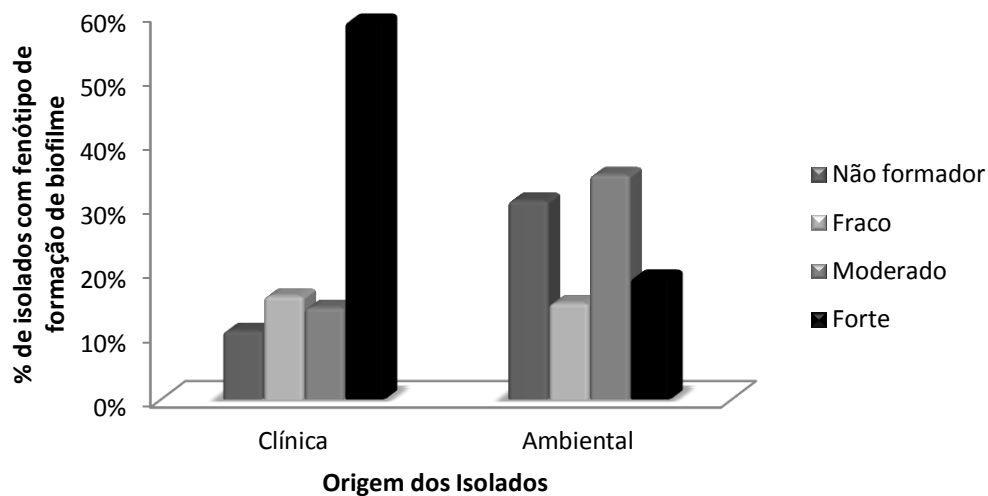




**Figura 5.** Fenótipo de formação de biofilme em porcentagem para as oito espécies de leveduras avaliadas, obtido através do método do cristal violeta.



**Figura 6.** Fenótipo de formação de biofilme para as diferentes espécies de fungos filamentosos, obtido através do método do cristal violeta.



**Figura 7.** Fenótipo de formação de biofilme em porcentagem de acordo com a origem dos isolados fúngicos, obtido através do método do cristal violeta.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS DE FLUCONAZOL

Quanto à avaliação visual das suspensões, estas apresentaram aspecto leitoso e opaco e não houve mudança de coloração e formação de precipitados nas formulações. O teor total de fluconazol foi de  $97,45 \pm 2,60\%$  com uma eficiência de encapsulação de  $80,5 \pm 10,4\%$ . As nanocápsulas apresentaram baixo índice de polidispersão, diâmetro médio de  $211 \pm 4,2$  nm, valor de SPAN de  $1,69 \pm 0,02$  e o potencial zeta negativo ( $-11,6 \pm 1,6$  mV).

### 5.3 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS CONVENCIONAIS E NANOENCAPSULADOS

O perfil de sensibilidade *in vitro* a cinco antifúngicos, comercialmente disponíveis, em relação a diferentes espécies de fungos leveduriformes e filamentosos foi avaliado segundo o ensaio de microdiluição em caldo do CLSI (2008). As variações das CIMs e das CFMs; CIM<sub>50</sub>, CIM<sub>90</sub> e as CFM<sub>50</sub> e CFM<sub>90</sub> de todos os antifúngicos testados estão listadas nas tabelas 3 e 4.

De um modo geral, os fungos foram sensíveis à maioria dos antifúngicos testados neste trabalho. Entretanto, observou-se que 45% dos isolados apresentaram alto grau de resistência a fluconazol (CIM  $\geq$  64 $\mu$ g/mL), sendo que as maiores médias geométricas foram encontradas para este fármaco (Tabela 5 e figura 9).

Por outro lado, a anfotericina B mostrou-se o agente mais eficaz (Tabela 6), visto que apresentou as menores médias geométricas para a maioria dos isolados fúngicos (Figura 10), com exceção de *Cunninghamella* sp. (isolado *CUR01*, CIM=4  $\mu$ g/mL) e um isolado de *A. flavus* (isolado *AFL05*, CIM=16  $\mu$ g/mL).

Além disso, a determinação da CIM detectou 11% de isolados resistentes a cetoconazol, 13,4% resistentes a itraconazol e 15,8% resistentes a miconazol.

A variação das CIMs para as amostras de *Candida* sp. foi de 0,125-64  $\mu$ g/mL para o fluconazol, de 0,03-16  $\mu$ g/mL para o itraconazol, de 0,03-8  $\mu$ g/mL para o cetoconazol e o miconazol, e de 0,03-1  $\mu$ g/mL para a anfotericina B (Tabela 3). Para as espécies de *Rhodotorula* sp. a variação das CIMs foi de 16-64  $\mu$ g/mL para o fluconazol, de 0,06-0,5  $\mu$ g/mL para o itraconazol, de 0,03-0,125  $\mu$ g/mL para o cetoconazol, de 2-16  $\mu$ g/mL para o miconazol e de 0,03-0,125  $\mu$ g/mL para a anfotericina B (Tabela 3).

Para *K. ohmeri*, as CIMs foram de 2 µg/mL para fluconazol, de 0,03 µg/mL para itraconazol, cetoconazol e miconazol, respectivamente, e de 0,125 µg/mL para anfotericina B (Tabela 3).

Todos os fungos filamentosos apresentaram para o fluconazol CIMs de 64 µg/mL. O intervalo da CIM para itraconazol foi de 0,03-1 µg/mL para *Aspergillus* sp. e de 0,03-0,25 µg/mL para *Paecilomyces* sp. Já, para o cetoconazol, a variação foi de 0,125-4 µg/mL para *Aspergillus* spp. e de 0,06-0,125 µg/mL para *Paecilomyces* sp. Quanto ao miconazol, a variação da CIM foi de 1-16 µg/mL para *Aspergillus* sp. e de 0,06-4 µg/mL para *Paecilomyces* sp. (Tabela 4).

Em relação aos demais gêneros de fungos filamentosos obteve-se intervalos de CIMs para itraconazol de  $\geq 16$  µg/mL para *Fusarium* sp. e de 1 µg/mL para o isolado de *Cunninghamella* sp.; para o cetoconazol de 8-16 µg/mL para *Fusarium* sp. e de 4 µg/mL para *Cunninghamella* sp.; para o miconazol de 8-16 µg/mL referente aos isolados de *Fusarium* sp. e de 4 µg/mL para *Cunninghamella* sp., e para a anfotericina B de 0,125-2 µg/mL para *Fusarium* sp. e de 4 µg/mL para a *Cunninghamella* sp. (Tabela 4).

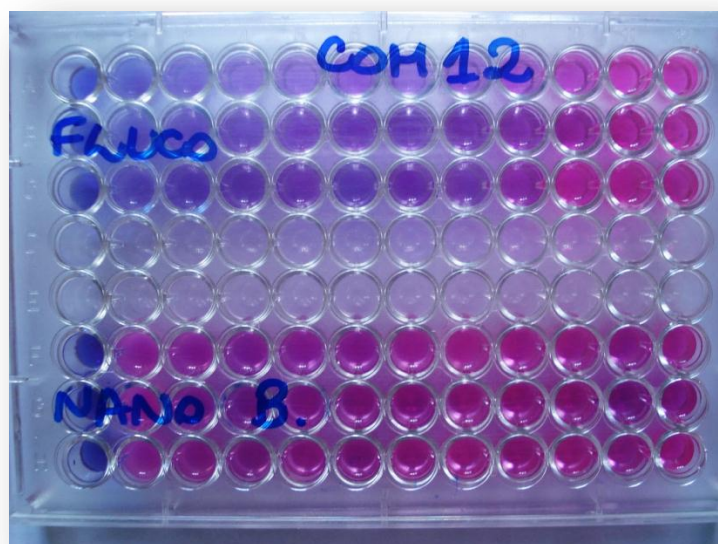
Em relação à avaliação da atividade antifúngica da formulação nanoestruturada contendo fluconazol, observou-se uma redução na CIM destas formulações em comparação ao fármaco investigado na forma livre, particularmente frente aos isolados do gênero *Candida* (Tabela 7).

Entre os 19 isolados analisados frente às nanocápsulas poliméricas de fluconazol (FN), o mais susceptível foi a *C. albicans* (COM12) com a CIM de 4 µg/mL, enquanto que para a FS a CIM foi de 64 µg/mL, demonstrando-se assim uma redução de quatro diluições na CIM com a utilização da nanoencapsulação. Além disso, a redução na CIM para o fármaco nanoencapsulado em comparação ao livre para os isolados de *C. tropicalis* com os códigos 72A, 72P e 94P foi de 1, duas e duas diluições,

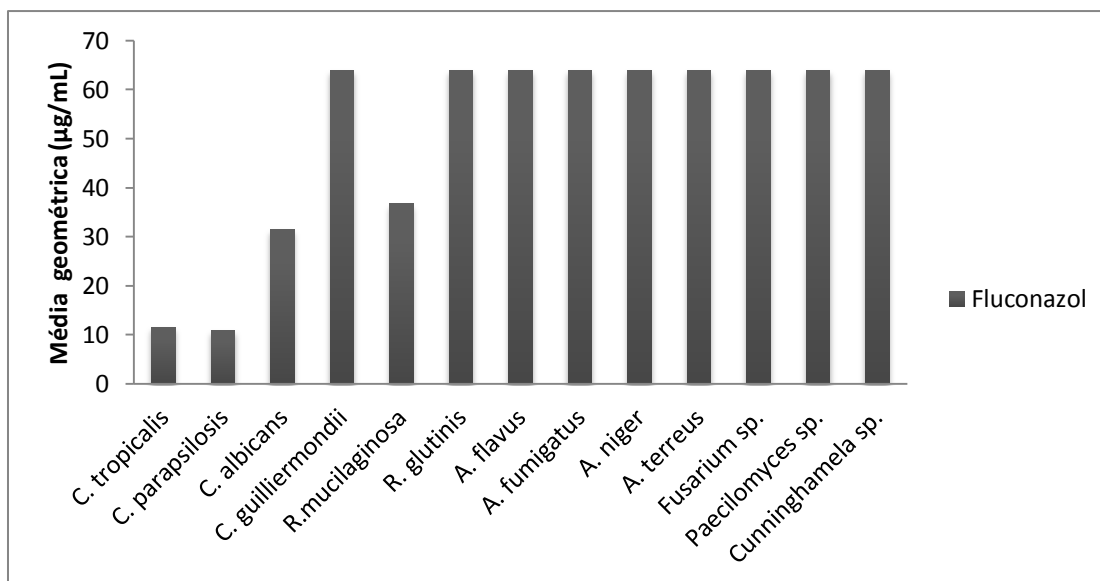
respectivamente (Tabela 7). A variação da CIM para a FN foi de 4-32  $\mu\text{g/mL}$ , obtendo-se uma média geométrica de 13,45  $\mu\text{g/mL}$ , bastante inferior à média geométrica de FS (MG=64  $\mu\text{g/mL}$ ) (Tabela 8).

Não foi observada atividade antifúngica das nanocápsulas sem fármaco (nanoestruturas “brancas”) contra os isolados avaliados (Figura 8).

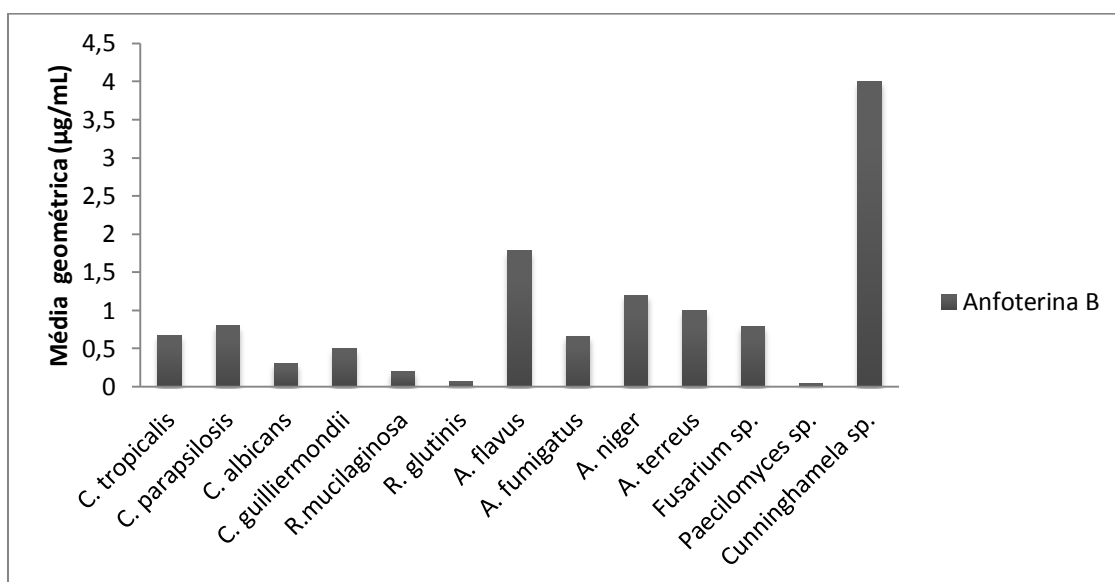
O capítulo referente aos resultados e à discussão da susceptibilidade antifúngica de isolados de *Candida* spp. frente à formulação de cetoconazol associado a nanopartículas de poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL), além de sua caracterização físico-química encontram-se em anexo neste trabalho, sob a forma de um manuscrito submetido à revista “Microbiological Research”.



**Figura 8.** Demonstração da CIM após aplicação de resazurina para o fluconazol em nanocápsulas (fluco) e para as nanocápsulas “brancas” (nano b.) contra um isolado clínico de *C. albicans* (COM 12). Fonte: Roberta Stefanello de Jesus



**Figura 9.** Variação das médias geométricas das concentrações inibitórias mínimas (CIM) para as principais espécies de fungos testadas frente ao fluconazol.



**Figura 10.** Variação das médias geométricas das concentrações inibitórias mínimas (CIM) para as principais espécies de fungos testadas frente à anfotericina B.

**TABELA 3.** Variação de CIM e CFM, valores de CIM<sub>50</sub>, CIM<sub>90</sub>, CFM<sub>50</sub> e CFM<sub>90</sub> para os 55 isolados leveduriformes testados frente a cinco antifúngicos segundo a metodologia de microdiluição em caldo (CLSI, 2008)

Espécies (nº de isolados) e antifúngicos	CIM (µg/mL)			CFM (µg/mL)		
	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	Variação	CFM <sub>50</sub>	CFM <sub>90</sub>	Variação
<i>C. tropicalis</i> (22)						
Fluconazol	0,5	4	0,125-64	64	64	1-64
Itraconazol	0,03	0,03	0,03-8	1	16	0,125-16
Cetoconazol	0,03	0,03	0,03-8	16	16	0,25-16
Miconazol	0,25	0,5	0,03-8	16	16	0,5-16
Anfotericina B	0,125	0,5	0,03-0,5	0,125	0,5	0,03-0,5
<i>C. parapsilosis</i> (13)						
Fluconazol	1	4	0,125-16	8	16	0,125-64
Itraconazol	0,03	0,03	0,03-0,125	1	1	0,03-4
Cetoconazol	0,03	0,03	≤0,03	1	16	0,03-16
Miconazol	0,06	0,06	0,03-8	2	16	0,25-16
Anfotericina B	0,5	0,5	0,03-1	0,5	0,5	0,03-1
<i>C. albicans</i> (9)						
Fluconazol	0,125	0,125	0,125-64	64	64	4-64
Itraconazol	0,03	0,03	0,03-16	0,125	0,125	0,125-16
Cetoconazol	0,03	0,03	0,03-8	16	16	≥16
Miconazol	0,03	0,03	0,03-4	16	16	0,5-16
Anfotericina B	0,25	0,25	0,06-0,25	0,25	0,25	0,06-0,25
<i>C. catenulata</i> (3)						
Fluconazol	2	-	0,5-4	16	-	16-64
Itraconazol	0,03	-	≤0,03	0,5	-	0,03-8
Cetoconazol	0,03	-	≤0,03	16	-	≥16
Miconazol	0,03	-	0,03-0,25	16	-	1-16
Anfotericina B	0,125	-	0,125-0,5	0,125	-	0,125-0,5
<i>C. guilliermondii</i> (1)						
Fluconazol	-	-	64	-	-	64
Itraconazol	-	-	4	-	-	16
Cetoconazol	-	-	0,03	-	-	16
Miconazol	-	-	1	-	-	4
Anfotericina B	-	-	0,5	-	-	0,5
Todas as <i>Candida</i> sp. (48)						
Fluconazol	1	4	0,125-64	64	64	0,125-64
Itraconazol	0,06	4	0,03-16	0,5	16	0,03-16
Cetoconazol	0,03	0,03	0,03-8	16	16	0,03-16
Miconazol	0,25	8	0,03-8	16	16	0,03-16
Anfotericina B	0,125	0,5	0,03-1	0,125	0,5	0,03-1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (5)						
Fluconazol	64	64	16-64	64	64	16-≥64
Itraconazol	0,25	0,25	0,06-0,5	2	2	0,25-8
Cetoconazol	0,06	0,06	0,03-0,125	0,125	0,125	0,125-0,25

Miconazol	8	8	2-16	16	16	≥16
Anfotericina B	0,125	0,125	0,03-0,125	0,125	0,125	0,03-0,125
<i>Rhodotorula glutinis</i> (1)						
Fluconazol	-	-	64	-	-	64
Itraconazol	-	-	0,5	-	-	2
Cetoconazol	-	-	0,06	-	-	0,125
Miconazol	-	-	16	-	-	16
Anfotericina B	-	-	0,06	-	-	0,06
Todas as <i>Rhodotorula</i> sp. (6)						
Fluconazol	64	64	16-64	64	64	16-≥64
Itraconazol	0,25	0,5	0,06-0,5	2	2	0,25-16
Cetoconazol	0,06	0,06	0,03-0,125	0,125	0,125	0,125-0,25
Miconazol	8	16	2-16	16	16	≥16
Anfotericina B	0,06	0,125	0,03-0,125	0,06	0,125	0,03-0,125
<i>Kodamaea ohmeri</i> (1)						
Fluconazol	-	-	2	-	-	8
Itraconazol	-	-	0,03	-	-	1
Cetoconazol	-	-	0,03	-	-	16
Miconazol	-	-	0,03	-	-	16
Anfotericina B	-	-	0,125	-	-	0,125

---

CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima; -: não determinado.



**TABELA 4.** Variação de CIM, CFM, valores de CIM<sub>50</sub>, CIM<sub>90</sub>, CFM<sub>50</sub> e CFM<sub>90</sub> para os 27 isolados de fungos filamentosos testados frente a cinco antifúngicos segundo a metodologia de microdiluição em caldo (CLSI, 2008)

Espécies (nº de isolados) e antifúngicos	CIM (µg/mL)			CFM (µg/mL)		
	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	Variação	CFM <sub>50</sub>	CFM <sub>90</sub>	Variação
<i>Aspergillus flavus</i> (6)						
Fluconazol	64	64	64	64	64	>64
Itraconazol	0,25	0,25	0,125-0,5	0,25	0,25	0,125-0,5
Cetoconazol	0,5	1	0,25-1	4	4	0,5-16
Miconazol	1	2	0,5-2	4	16	2-16
Anfotericina B	1	2	0,5-16	1	2	0,5-16
<i>Aspergillus niger</i> (6)						
Fluconazol	64	64	64	64	64	>64
Itraconazol	0,5	0,5	0,125-1	0,5	0,5	0,125-1
Cetoconazol	2	2	1-4	8	16	4-16
Miconazol	2	8	1-8	16	16	4-16
Anfotericina B	0,25	0,5	0,125-2	0,25	0,5	0,125-2
<i>Aspergillus fumigatus</i> (5)						
Fluconazol	64	64	64	64	64	>64
Itraconazol	0,25	0,25	0,03-0,5	0,25	0,25	0,03-0,5
Cetoconazol	2	2	0,125-4	16	16	4-16
Miconazol	2	2	2-16	16	16	4-16
Anfotericina B	1	1	0,125-2	1	1	0,125-2
<i>Aspergillus terreus</i> (1)						
Fluconazol	-	-	64	-	-	64
Itraconazol	-	-	0,25	-	-	0,25
Cetoconazol	-	-	1	-	-	≥16
Miconazol	-	-	2	-	-	≥16
Anfotericina B	-	-	1	-	-	1
Todos os <i>Aspergillus</i> sp. (18)						
Fluconazol	64	64	64	64	64	>64
Itraconazol	0,25	0,5	0,03-1	0,25	0,5	0,03-1
Cetoconazol	1	4	0,125-4	8	16	1-16
Miconazol	2	8	1-16	8	16	2-16
Anfotericina B	1	1	0,125-16	1	1	0,125-16
<i>Fusarium</i> sp. (6)						
Fluconazol	64	64	64	64	64	>64
Itraconazol	16	16	≥16	16	16	≥16
Cetoconazol	16	16	8-16	16	16	16
Miconazol	16	16	8-16	16	16	16
Anfotericina B	0,5	2	0,125-2	0,5	2	0,125-2
<i>Paecilomyces</i> sp. (2)						
Fluconazol	-	-	64	-	-	>64
Itraconazol	-	-	0,03-0,25	-	-	0,03-0,25
Cetoconazol	-	-	0,06-0,125	-	-	0,25-1
Miconazol	-	-	0,06-4	-	-	1-16
Anfotericina B	-	-	0,03-0,06	-	-	0,03-0,06
<i>Cunninghamella</i> sp. (1)						
Fluconazol	-	-	64	-	-	>64
Itraconazol	-	-	1	-	-	1
Cetoconazol	-	-	4	-	-	16
Miconazol	-	-	4	-	-	16
Anfotericina B	-	-	4	-	-	4

CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima; -: não determinado.

**TABELA 5.** Média geométrica (MG) das concentrações inibitórias mínimas (CIM) para as diferentes espécies de fungos testadas frente aos cinco antifúngicos

Espécies	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) / MG				
	FLU	ITR	CET	MIC	ANF
<i>Candida albicans</i>	31,58	0,09	0,10	0,08	0,30
<i>Candida tropicalis</i>	11,58	0,07	0,06	0,60	0,67
<i>Candida parapsilosis</i>	10,90	0,06	0,03	0,20	0,80
<i>Candida catenulata</i>	1,59	0,03	0,03	0,06	0,20
<i>Candida guilliermondii</i>	64,00	4,00	0,03	1,00	0,50
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	36,76	0,75	0,22	6,96	0,20
<i>Rhodotorula glutinis</i>	64,00	0,50	0,06	16,00	0,06
<i>Kodamaea ohmeri</i>	2,00	0,03	0,03	0,03	0,12
<i>Aspergillus flavus</i>	64,00	0,79	0,50	1,40	1,78
<i>Aspergillus niger</i>	64,00	1,60	2,00	2,80	1,20
<i>Aspergillus fumigatus</i>	64,00	0,20	1,32	3,03	0,66
<i>Aspergillus terreus</i>	64,00	0,25	1,00	2,00	1,00
<i>Fusarium</i> sp.	64,00	16,00	12,67	14,20	0,79
<i>Paecilomyces</i> sp.	64,00	0,09	0,28	0,50	0,04
<i>Cunninghamella</i> sp.	64,00	1,00	4,00	4,00	4,00

FLU=fluconazol; ITR=itraconazol; CET=cetoconazol; MIC=miconazol; ANF=anfotericina B.

**TABELA 6.** Perfis de susceptibilidade predominantes para as diferentes espécies de fungos testadas frente aos cinco antifúngicos

Espécies	Antifúngicos				
	FLU	ITR	CET	MIC	ANF
<i>Candida albicans</i>	SDD	S	S	S	S
<i>Candida tropicalis</i>	S	S	S	S	S
<i>Candida parapsilosis</i>	S	S	S	S	S
<i>Candida catenulata</i>	S	S	S	S	S
<i>Candida guilliermondii</i>	R	R	S	SDD	S
<i>R. mucilaginosa</i>	SDD	SDD	S	S	S
<i>Rhodotorula glutinis</i>	R	SDD	S	R	S
<i>Kodamaea ohmeri</i>	S	S	S	S	S
<i>Aspergillus flavus</i>	R	S	S	S	SDD
<i>Aspergillus niger</i>	R	S	S	SDD	S
<i>Aspergillus fumigatus</i>	R	S	SDD	SDD	S
<i>Aspergillus terreus</i>	R	S	S	SDD	S
<i>Fusarium sp.</i>	R	R	R	R	S
<i>Paecilomyces sp.</i>	R	S	S	S	S
<i>Cunninghamella sp.</i>	R	S	R	R	R

FLU=fluconazol; ITR=itraconazol; CET=cetoconazol; MIC=miconazol; ANF=anfotericina B.

Perfil de susceptibilidade estabelecido de acordo com o CLSI: S = sensível; SDD = sensível dose-dependente; R = resistente.

**TABELA 7.** Comparação da CIM e da CFM para os isolados de *Candida* sp. frente ao fluconazol em solução e em nanocápsulas poliméricas

Isolados	Antifúngicos ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	Fluconazol em solução (FS)		Fluconazol em nanocápsulas (FN)	
	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>Candida albicans</i> (CO M12)	64	>64	4	>64
<i>Candida tropicalis</i> (CO 72A)	64	>64	32	>64
<i>Candida tropicalis</i> (CO 72P)	64	>64	16	>64
<i>Candida tropicalis</i> (CO 94P)	64	>64	16	>64

CIM: concentração inibitória mínima; CFM: concentração fungicida mínima.

**TABELA 8.** Variação da CIM e média geométrica (MG), obtidas para as espécies de *Candida*, *Rhodotorula*, *Aspergillus* e *Fusarium* testadas frente ao fluconazol em solução e em nanocápsulas poliméricas

Isolados	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	Fluconazol em solução (FS)		Fluconazol em nanocápsulas (FN)	
	Variação	MG	Variação	MG
<i>Candida</i> spp. (n = 4)	64	64	4 - 32	13,45
<i>Rhodotorula</i> spp. (n = 3)	64	64	64	64
<i>Aspergillus</i> spp. (n = 10)	64	64	64	64
<i>Fusarium</i> sp. (n = 2)	64	64	64	64

CIM: concentração inibitória mínima; MG: média geométrica.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

A formação de biofilme através do método da microplaca por fungos filamentosos e leveduriformes oriundos de diferentes tipos de amostras clínicas e ambientais foi observada neste estudo. Do total de fungos analisados, 82,9% produziram biofilme, sendo 55,9% fortes produtores, enquanto apenas 17,1% dos isolados não foram capazes de produzir biofilme por este método. Estes achados corroboram com os estudos de Pierce et al. (2008) e Thein et al. (2007), nos quais diversas espécies de fungos também apresentaram alta capacidade de formação de biofilme em superfícies de poliestireno quando avaliadas sob diferentes condições ambientais.

Em relação às leveduras, 91% dos isolados analisados foram produtores de biofilme, destacando-se o gênero *Candida*, uma vez que todas as espécies deste gênero foram capazes de formar biofilme. As espécies de *C. tropicalis* e *C. albicans* destacaram-se como fortes produtores de biofilme com 73% e 55% dos isolados, respectivamente. Estes dados são compatíveis aos observados por Minagi et al. (1985), em que a *C. tropicalis* demonstrou maior aderência a polímeros plásticos do que a *C. albicans*.

De acordo com Pannanusorn et al. (2012), uma alta frequência de isolados clínicos de *C. tropicalis* (87%) foram fortes produtores de biofilme, semelhante à taxa encontrada no presente trabalho. Os isolados de *C. albicans* mostraram-se bons formadores de biofilme, o que está de acordo com estudos anteriores (Douglas, 2003; Gasparetto et al., 2005; Pierce et al., 2008; Ramage et al., 2009).

Vários autores demonstraram a capacidade de espécies de *C. não-albicans* em formar biofilme (Shin et al., 2002; Silva et al., 2011; Pannasourn et al., 2012). Shin et al. (2002) descreveram uma alta frequência de formação de biofilme entre os isolados clínicos de *C. não-albicans* em comparação aos isolados de *C. albicans* (61% e 8%, respectivamente), quando estas foram avaliadas em meio de cultura suplementado com 8% de glicose. As principais espécies formadoras de biofilme neste estudo foram *C. tropicalis* (80%) e *C. parapsilosis* (73%), sendo que a maior parte dos isolados positivos de *C. tropicalis* (59%) foi classificada como forte produtora de biofilme (Shin et al., 2002).

Entretanto o impacto da formação de biofilme como um importante fator de virulência de diferentes espécies de *Candida*, ainda não está totalmente compreendido. Segundo Pannanusorn et al. (2012), diferenças nas condições experimentais, como pH, meio de cultura, disponibilidade de oxigênio, entre outros, além da origem das espécies poderiam ser responsáveis pelos diferentes achados na literatura a respeito destas leveduras.

Por outro lado, em relação às leveduras do gênero *Rhodotorula* apesar de apresentarem um papel de destaque como agentes de fungemias associadas ao uso de cateter venoso central (CVC) (Tuon & Costa, 2008), neste estudo apenas 40% dos isolados clínicos de *R. mucilaginosa*, a principal espécie de interesse médico, apresentaram a capacidade de produzir biofilme em microplaca, enquanto 1 isolado ambiental de *R. glutinis* foi formador. Segundo Nunes et al. (2013), isolados de *R. mucilaginosa* exibiram maior habilidade de formação de biofilme através do ensaio do cristal violeta em microplaca, comparados às demais espécies investigadas no estudo.

Embora o gênero *Rhodotorula* tenha sido geralmente considerado de baixa patogenicidade, Dworecka-Kaszak & Kizerwetter-Swida (2011) mostraram em um relato

de caso um tipo incomum de pseudomicélio com numerosos blastosporos alongados formados por *Rhodotorula*, sugerindo assim que estas leveduras poderiam expressar seus fatores de virulência dependendo das condições do hospedeiro.

No presente estudo, observou-se que de um modo geral, a produção de biofilme por isolados clínicos foi significativamente maior que a de isolados ambientais, reforçando a hipótese de Pannanusorn et al. (2012). Neste sentido, Nunes et al. (2013) também mostraram que isolados clínicos de *R. mucilaginosa* foram melhores produtores de biofilme em comparação aos isolados ambientais quando avaliados pelo método da microplaca.

Já em relação aos fungos filamentosos, dos 27 isolados avaliados pelo método da microplaca, 66,7% foram capazes de produzir biofilme, enquanto 33,3% não produziram biofilme. As espécies de fungos filamentosos que se destacaram como fortes produtoras foram *A. terreus* e *A. flavus*. Ao contrário de estudos anteriores, em que *A. fumigatus* foi descrito como excelente produtor de biofilme, no presente estudo, apenas 20% dos isolados desta espécie foram fortes formadores (Pierce et al., 2008; Seidler et al., 2008). Entretanto, quando comparados entre espécies, isolados de *A. flavus* têm apresentado uma tendência à resistência aos agentes antifúngicos (Rhudramurthy et al., 2011). Além disso, já foi documentado que a anfotericina B apresentou baixa atividade contra *A. terreus* (Walsh et al., 2003; Steinbach et al., 2004).

No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas entre a formação de biofilme e a susceptibilidade aos antifúngicos testados.

Vários estudos têm demonstrado que os biofilmes fúngicos apresentam um aumento dos níveis de resistência frente aos antimicrobianos, principalmente azólicos e poliênicos, dificultando assim o tratamento das infecções causadas por estes agentes

(Ramage et al., 2012). Neste sentido, procurou-se correlacionar neste trabalho a produção de biofilme com a susceptibilidade das células planctônicas aos diferentes antifúngicos.

A frequência de isolados resistentes aos antifúngicos apresentou um perfil bastante variável quando avaliada para isolados ambientais formadores e não formadores de biofilme, demonstrando-se uma maior tendência de resistência para os isolados não formadores de biofilme em comparação aos formadores quando correlacionados estes dois parâmetros. Logo, este fato parece estar relacionado com múltiplos fatores como, a influência do tipo de isolado, espécie de fungo, tipo de material e fármaco investigado, além de outros parâmetros metodológicos (Pierce et al., 2008; Ramage et al., 2012). Por outro lado, os níveis de resistência para os isolados clínicos formadores e não formadores foram bastante semelhantes.

Singh et al. (2011) mostraram que três importantes espécies da ordem dos *Mucorales*, como *Rhizopus oryzae*, *Lichtheimia corymbifera* e *Rhizomucor pusillus* foram capazes de aderir e formar biofilmes em microplacas de poliestireno, sendo este ensaio confirmado por técnica de microscopia. No entanto, no presente estudo 33,3% dos isolados de fungos filamentosos não foram capazes de produzir biofilme pela técnica da microplaca, destacando-se neste caso os fungos dos gêneros *Cunninghamella* sp., também da ordem dos *Mucorales*, e isolados de *Fusarium* sp.

Em geral, a repetibilidade do presente ensaio foi alta uma vez que pequenas diferenças foram observadas entre as médias dos resultados dos três experimentos para a maioria dos fungos analisados. Entretanto, o ensaio parece ser menos apropriado para a quantificação da biomassa do biofilme de alguns fungos filamentosos, como *Cunninghamella* e *Fusarium*, uma vez que foram observadas algumas variações importantes entre cada experimento, principalmente em relação à leitura dos sinais de absorvância obtidos para estes dois gêneros em particular, que foram consideravelmente



menores em comparação com as absorvâncias obtidas para todos os outros gêneros, embora tenha sido utilizada a mesma concentração de violeta de genciana (0,5%) para todos os isolados.

Os isolados de *Fusarium* apresentaram valores mínimos e máximos de absorvância entre 0,119 e 2,08, respectivamente, enquanto *Cunninghamella* apresentou uma variação entre 0,317 a 1,78. Já para isolados de *A. flavus*, considerado como forte produtor neste ensaio foi de 2,904 a 2,929. Portanto, uma hipótese levantada é a de que esta incapacidade de produção de biofilme desses isolados seria devido à inadequada fixação destes biofilmes quando avaliados por esta metodologia.

A capacidade de formação de biofilme também está relacionada com o tipo de superfície utilizada para a adesão inicial. Neste sentido, vários trabalhos têm mostrado que os micro-organismos aderem-se mais facilmente em superfícies hidrofóbicas e apolares, tais como o poliestireno e outros materiais plásticos (Ramage et al., 2009).

A produção de biofilme também pode ser associada ao desenvolvimento e persistência de infecções fúngicas importantes, principalmente aquelas relacionadas com o uso de dispositivos implantáveis, como as fungemias, já que, as células presentes no biofilme são resistentes aos antimicrobianos, como extensivamente demonstrado na literatura (Douglas, 2003; LaFleur et al., 2006; Seidler et al., 2008; Ramage et al., 2009; Ramage et al., 2012).

Seidler et al. (2008) mostraram que biofilmes formados por *A. fumigatus* em células epiteliais dos brônquios exibiram reduzida susceptibilidade antifúngica quando comparados com as células planctônicas.

Além disso, a formação de biofilme por fungos filamentosos também tem sido associada com a disseminação desses agentes como contaminantes de redes de sistemas

de abastecimento de água, configurando assim um grave problema de saúde pública conforme mostrado em artigo de revisão (Siqueira et al., 2011).

Segundo Harding et al. (2009), proteínas denominadas hidrofobinas, exclusivas de fungos filamentosos, apresentam um papel importante na formação desses biofilmes microbianos, auxiliando na ligação das hifas a superfícies hidrofóbicas. No caso das *Candidas*, destacam-se as adesinas, proteínas específicas da parede celular, que estão diretamente relacionadas com a habilidade de adesão destas leveduras às diferentes superfícies (Silva et al., 2011).

Portanto, o método da microplaca para a avaliação da expressão fenotípica de biofilmes tem sido muito utilizado para avaliar isolados fortes e fracos produtores de biofilme, e além de rápido e simples, no presente estudo mostrou-se eficaz para a análise presuntiva dos biofilmes de fungos leveduriformes e filamentosos oriundos de diferentes tipos de amostras ambientais e clínicas.

## **6.2 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIFÚNGICOS CONVENCIONAIS**

No presente estudo, a susceptibilidade *in vitro* de 82 isolados de fungos patogênicos a fluconazol, itraconazol, cetoconazol, miconazol e anfotericina B foi determinada através da técnica de microdiluição em caldo conforme o CLSI (2008).

Em virtude da padronização do ensaio de microdiluição em caldo do CLSI abranger apenas algumas das espécies de fungos analisadas neste trabalho, foram propostas algumas adaptações nesta técnica para a determinação da CIM para as demais espécies abordadas no estudo.

De modo geral, todos os antifúngicos testados exibiram uma boa atividade *in vitro* contra a maioria dos isolados, exceto o fluconazol em que a taxa de resistência foi de 45%. Em contrapartida, a anfotericina B apresentou excelente atividade, com médias geométricas bastante baixas para os fungos em geral.

Segundo alguns autores, o uso excessivo de fluconazol na terapêutica poderia estar associado com o aumento das CIMs exibidas por diferentes espécies de leveduras, pois isso estaria selecionando o aparecimento de resistência em isolados previamente sensíveis (Kanafani & Perfect, 2008; Tobudic et al., 2012).

A análise do perfil de susceptibilidade dos isolados clínicos de *C. albicans* demonstrou CIMs relativamente baixas, o que está de acordo com outros estudos brasileiros em que foram verificadas baixas taxas de resistência aos antifúngicos quando utilizado o ensaio de microdiluição em caldo (Da Matta et al., 2007; Demitto et al., 2012).

No presente estudo, as CIMs em que 90% dos isolados de *C. albicans* foram inibidos foram de 0,125 µg/mL para fluconazol, de 0,03 µg/mL para itraconazol, cetoconazol e miconazol, e de 0,25 µg/mL para anfotericina B. Um estudo espanhol apresentou CIM<sub>90</sub> para isolados clínicos de *C. albicans* de 0,25 µg/mL para fluconazol, 0,03 µg/mL para itraconazol e 0,12 µg/mL para anfotericina B, portanto bastante semelhantes aos resultados encontrados no presente trabalho (Cuenca-Estrella et al., 2006).

O Programa SENTRY de Vigilância de Resistência, realizado durante o ano de 2003, mostrou que 90% dos isolados analisados desta espécie apresentaram CIMs de 0,5 µg/mL para fluconazol, 0,12 µg/mL para itraconazol, 0,016 µg/mL para cetoconazol e de 1 µg/mL para anfotericina B, sendo neste caso as CIMs um pouco mais elevadas do que as obtidas neste trabalho (Messer et al., 2006).

Em estudo posterior do SENTRY, realizado no período de 2008 a 2009, nenhum dos isolados clínicos de *C. albicans* apresentou resistência ao fluconazol quando se considerou uma CIM > 4 µg/mL (Pfaller et al., 2011).

Em relação aos isolados de *C. tropicalis* e de *C. parapsilosis*, as CIM<sub>90</sub> foram muito semelhantes para estas duas espécies, diferindo apenas para o miconazol que foi de 0,5 µg/mL para *C. tropicalis* e de 0,06 µg/mL para *C. parapsilosis*, o que está de acordo com o estudo de Cuenca-Estrella et al. (2006), sugerindo CIMs um pouco maiores para as espécies de *C. não-albicans* quando comparadas às *C. albicans*, uma tendência que vem sendo demonstrada em vários trabalhos (Ishan & Ghannoum, 2009; Fleck et al., 2007; Cuenca-Estrella et al., 2006; Trofa et al., 2008).

No último SENTRY, dos 91 isolados de origem hospitalar de *C. tropicalis* analisados, 3,3% apresentaram resistência ao fluconazol, enquanto dos 156 isolados de *C. parapsilosis*, 5,8% foram resistentes ao fluconazol (Pfaller et al., 2011). Neste caso, a espécie de *C. não-albicans* em que se observou um perfil de resistência predominante aos azólicos em comparação às demais espécies foi a *C. glabrata*. Uma das explicações para esse fenômeno é a resistência intrínseca ao fluconazol apresentada por esta espécie de *Candida* (Pfaller et al., 2011).

A *C. catenulata* é uma espécie incomum, considerada um contaminante natural de laticínios, mas já há relatos na literatura de sua associação com fungemias em pacientes sob uso de quimioterapia (Radosavljevic et al., 1999). Os isolados ambientais desta espécie apresentados no presente trabalho demonstraram alta sensibilidade a todos os fármacos testados, corroborando com estudos anteriores encontrados na literatura (Radosavljevic et al., 1999; Fleck et al., 2007).

Além dos isolados de *C. catenulata*, outra espécie emergente que também apresentou elevada sensibilidade a todos os agentes antifúngicos avaliados foi a

*Kodamaea ohmeri* (Poojary & Sapre, 2009), embora alguns trabalhos já tenham descrito resistência ao fluconazol apresentada por isolados clínicos desta espécie, sendo que no caso do presente trabalho, o isolado testado foi de origem ambiental (Lee et al., 2007).

Outra espécie rara é a *C. guilliermondii*, um patógeno oportunista geralmente associado com onicomicoses, porém raramente relacionado às infecções invasivas causadas por fungos (Pfaller et al., 2006). Entretanto, alguns trabalhos têm mostrado um decréscimo da susceptibilidade desta espécie de *Candida* aos antifúngicos comumente utilizados na terapêutica, como o fluconazol (Pfaller et al., 2006). O isolado ambiental apresentado neste trabalho, conforme já descrito em outros estudos (Pfaller et al., 2006), apresentou resistência ao fluconazol (CIM $\geq$ 64  $\mu$ g/mL) e ao itraconazol (CIM=4  $\mu$ g/mL).

Outras leveduras emergentes que vêm chamando a atenção dos pesquisadores como potenciais patógenos oportunistas são as espécies que compõem o gênero *Rhodotorula*, particularmente a *R. mucilaginosa* e a *R. glutinis* (Zaragoza et al., 2011).

Dessa forma, as duas espécies de *Rhodotorula* analisadas neste trabalho apresentaram perfis de susceptibilidade semelhantes, uma vez que a anfotericina B exibiu a melhor atividade contra todos os isolados investigados, apresentando baixas médias geométricas, o que está de acordo com o estudo de Nunes et al. (2013), em que a anfotericina B também mostrou boa atividade contra células planctônicas.

Entretanto, tanto os isolados clínicos quanto o isolado ambiental investigado foram resistentes a fluconazol (CIM<sub>90</sub>=64  $\mu$ g/mL) e miconazol (CIM<sub>90</sub>=16  $\mu$ g/mL), o que corrobora com estudos anteriores (Zaas et al., 2003; Gomez-Lopez et al., 2005; Zaragoza et al., 2011; Nunes et al., 2013).

Gomez-Lopez et al. (2005) observaram que a espécie *R. glutinis* apresentou maior sensibilidade aos antifúngicos testados em comparação à *R. mucilaginosa*, embora os isolados da primeira espécie tenham apresentado CIMs elevadas para fluconazol e

itraconazol. Neste sentido, Nunes et al. (2013) sugerem a anfotericina B e os novos triazólicos (voriconazol e posaconazol) como as melhores opções terapêuticas para o tratamento das infecções causadas por espécies do gênero *Rhodotorula*.

De modo geral, com exceção do fluconazol que não apresentou atividade contra os fungos filamentosos, conforme já descrito na literatura devido ao seu limitado espectro de ação (Lacaz et al., 2002; Teixeira et al., 2005; CLSI, 2008; Sidrim & Rocha, 2010), os demais antifúngicos investigados apresentaram boa atividade para a maioria dos isolados avaliados destacando-se a anfotericina B e o itraconazol, com as menores médias geométricas.

Dentre as espécies de *Aspergillus* analisadas, *A. flavus* demonstrou menor sensibilidade à anfotericina B quando comparado às outras espécies do gênero investigadas no presente estudo. Estes resultados estão de acordo com outros estudos apresentados na literatura (Sabatelli et al., 2006; Rudramurthy et al., 2011).

O SENTRY realizado em 2003 mostrou resultados de CIMs para isolados clínicos de *A. fumigatus* superiores aos valores encontrados neste trabalho, destacando-se a CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> para a anfotericina B de 2 e 4 µg/mL, para o fluconazol de 256 e >256 µg/mL, para cetoconazol de 4 e 8 µg/mL e para itraconazol de 1 e 2 µg/mL (Messer et al., 2006). Entretanto, para as demais espécies, as variações das CIMs foram semelhantes aos resultados do presente trabalho.

Por outro lado, a análise do perfil de sensibilidade dos isolados ambientais de *Fusarium* sp. demonstrou CIMs elevadas para todos os azólicos testados. Estes resultados corroboram com o estudo de Teixeira et al. (2005). Porém, ao contrário dos demais agentes antifúngicos, a anfotericina B apresentou elevada atividade contra estes isolados (MG=0,79 µg/mL).

Em estudo de Iqbal et al. (2008), isolados clínicos do complexo *Fusarium solani* apresentaram baixa sensibilidade a itraconazol, voriconazol e posaconazol. Além disso, este mesmo trabalho também demonstrou CIMs elevadas para todas as espécies de *Fusarium* à anfotericina B (Iqbal et al., 2008).

Tortorano et al. (2008) mostraram que isolados clínicos de *F. solani* apresentaram CIMs elevadas para todos os azólicos investigados no estudo, ao contrário de *F. verticillioides* que obtiveram CIMs baixas para posaconazol. Portanto, diante deste variado perfil de sensibilidade aos azólicos apresentado pelas diferentes espécies deste gênero, as formulações lipídicas de anfotericina B, conforme descrito por Tortorano et al. (2008) parecem ser as melhores opções terapêuticas para o tratamento das infecções causadas por estes fungos.

Pujol et al. (1997) mostraram que os fármacos testados em seu estudo apresentaram atividades similares contra isolados clínicos e ambientais de *Fusarium*, com CIMs bastante elevadas, exceto para anfotericina B e cetoconazol, que foram mais eficazes *in vitro* contra os isolados ambientais, o que também foi demonstrado no presente trabalho.

Os fungos do gênero *Paecilomyces* são conhecidos como habituais saprófitas do solo, do ar ou como contaminantes da água. Dentre as espécies do gênero, destacam-se *P. variotii* e *P. lilacinus*, devido ao seu incremento, nos últimos anos, como agentes causadores de infecções fúngicas graves, principalmente relacionadas a cirurgias oculares, uso de implantes médicos ou terapia imunossupressora (Castelli et al., 2008; Sidrim & Rocha, 2010; Antas et al., 2012).

Os isolados ambientais de *Paecilomyces* avaliados neste trabalho mostraram alta sensibilidade a todos os antifúngicos testados, apresentando CIMs baixas, com exceção de fluconazol (CIM=64 µg/mL). De acordo com Antas et al. (2012), os estudos de

susceptibilidade *in vitro* com *Paecilomyces* são bastante escassos, mas em recente revisão da literatura mostrou-se que o fluconazol e a anfotericina B apresentam baixa atividade *in vitro*, enquanto azólicos mais antigos como cetoconazol, miconazol e itraconazol, as CIMs variam de 0,5->2 µg/mL, o que também foi demonstrado no presente estudo.

Outro fungo filamentoso que chamou bastante atenção em relação ao seu perfil de susceptibilidade foi a *Cunninghamella*, demonstrando-se neste trabalho CIMs elevadas para todos os antifúngicos testados, com exceção de itraconazol para o qual a CIM foi de 1 µg/mL. Em estudo de Pastor et al. (2010), a terbinafina e o posaconazol mostraram maior atividade contra isolados clínicos de diferentes espécies de *Cunninghamella* quando comparados com anfotericina, voriconazol, itraconazol, ravuconazol e caspofungina.

De um modo geral, as CFMs encontradas no presente trabalho foram elevadas para os azólicos frente aos isolados avaliados confirmando a necessidade de concentrações elevadas destes fármacos para a obtenção do efeito fungicida, conforme elucidado no mecanismo de ação dos azólicos. Por outro lado, as CFMs obtidas para a anfotericina B, de um modo geral foram baixas confirmando o efeito fungicida deste antimicrobiano sobre as células fúngicas.

Os resultados obtidos no estudo reforçam a importância da realização de ensaios de susceptibilidade *in vitro*, já que alguns isolados da mesma espécie demonstraram perfis de sensibilidade diferentes aos antifúngicos analisados. Além disso, a determinação da CIM permite a comparação entre os micro-organismos expostos aos mesmos fármacos.



### 6.3 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AO FLUCONAZOL NANOENCAPSULADO

O fluconazol é um antifúngico sintético, comumente utilizado no tratamento de candidíases superficiais e sistêmicas, mas também é eficaz contra os agentes causadores de dermatofitoses (Santos et al., 2005; Sidrim & Rocha, 2010). Este antifúngico encontra-se disponível comercialmente na forma de comprimidos e soluções parenterais, porém seu uso é limitado devido à possibilidade de interações medicamentosas com outros medicamentos e o desenvolvimento de resistência, particularmente associada às espécies de *Candida* (Lacaz et al., 2002; Santos et al., 2005).

Por isso, para contornar essas dificuldades foi proposto no presente estudo o desenvolvimento de uma formulação deste agente antifúngico incorporado em nanocápsulas de poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) visando diferentes aplicações terapêuticas, uma vez que avaliou-se o perfil de susceptibilidade de agentes causadores de diversos tipos de micoses frente às nanopartículas e ao fármaco na sua forma livre.

A literatura tem mostrado que a pesquisa de nanoestruturas associadas aos mais variados tipos de polímeros para a veiculação de fluconazol com o objetivo de aplicação na terapêutica é crescente, especialmente voltada ao tratamento de candidíases.

Nozari et al. (2012) avaliaram o efeito de nanopartículas de prata em combinação com fluconazol sobre espécies de *Candida* isoladas de vulvovaginites crônicas. Gupta & Vyas (2012) investigaram a atividade antifúngica de nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados para uso tópico de fluconazol em modelo animal de candidíase cutânea. Bhalaria et al. (2009) desenvolveram uma formulação de fluconazol encapsulado em etossomas com o intuito de avaliar sua eficácia clínica no tratamento de candidíases.

Assis et al. (2008) analisaram o perfil de liberação e as características morfológicas de nanocápsulas de fluconazol marcado com tecnécio<sup>99m</sup> na tentativa de desenvolver uma formulação mais segura para o tratamento de sepse causada pela forma disseminada da candidíase. Yadav & Ahuja (2010) avaliaram a liberação oftálmica de fluconazol encapsulado em nanopartículas de goma de cordia. Gajbhiye et al. (2009) investigaram a atividade antifúngica *in vitro* de nanopartículas de prata em combinação com fluconazol contra espécies de *Phoma*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Candida albicans*.

A suspensão contendo fluconazol desenvolvida no presente estudo apresentou partículas com diâmetro submicrométrico adequado, inferior a 400 nm, corroborando com outros estudos da literatura (Assis et al., 2008; Gupta & Vyas, 2012).

Quanto às características físico-químicas, as nanocápsulas de fluconazol (FN) apresentaram distribuição de tamanho homogênea e potencial zeta negativo ( $-11,6 \pm 1,6$  mV), semelhante aos estudos anteriores (Ramasamy et al., 2012; Souza et al., 2012). Em relação ao teor total de fármaco, a formulação desenvolvida apresentou  $97,45 \pm 2,60\%$  de fluconazol. A taxa de encapsulação obtida para as FN foi alta obtendo-se um percentual de  $80,5 \pm 10,4\%$ , o que está de acordo com estudos anteriores (Bachhav et al., 2011; Gupta & Vyas, 2012).

A formulação nanoestruturada desenvolvida no presente trabalho apresentou aspecto leitoso e opaco característico de suspensões coloidais nanométricas. Portanto, conforme já descrito na literatura (Sousa, 2007) e visando eliminar a interferência da turbidez das nanoestruturas também foram realizados experimentos paralelos em microplacas de controle. Sendo assim, com o intuito de eliminar a influência da suspensão na turbidez do meio de cultura e facilitar a leitura do ensaio, para cada experimento realizado para a determinação da susceptibilidade por espectrofotômetro a 570 nm, foram preparadas microplacas “controle” sem inóculo e contendo as

nanoestruturas nos mesmos volumes a serem testadas sobre as suspensões de células fúngicas (Sousa, 2007). Logo, os resultados da verificação das densidades ópticas em leitor de microplacas foram utilizados no cálculo da leitura das microplacas inoculadas.

Além disso, a utilização de resazurina possibilitou uma melhor visualização do ponto final das CIMs para as formulações nanoestruturadas.

Neste trabalho avaliou-se a atividade antifúngica *in vitro* de FN contra espécies de *Candida*, *Rhodotorula*, *Aspergillus* e *Fusarium*, através da técnica de microdiluição em caldo. Entretanto, com exceção das espécies de *Candida* em que as CIMs das FN variaram de 4 a 32 µg/mL, enquanto a variação para a FS foi de  $\geq 64$  µg/mL, os demais fungos patogênicos investigados apresentaram CIMs iguais às obtidas para a forma livre do fármaco. Além disso, a média geométrica obtida para FN, em relação aos isolados de *Candida* foi bastante inferior a do fármaco livre, demonstrando-se assim a potência da formulação nanoestruturada sobre as leveduras deste gênero.

Dentre as espécies de fungos investigadas no presente estudo, destacou-se a *C. albicans* por apresentar uma maior susceptibilidade às nanocápsulas, com uma redução na CIM de quatro diluições. Gajbhige et al. (2009) também mostraram que o fluconazol em combinação com nanopartículas de prata obteve a máxima inibição contra *C. albicans*. Além disso, um estudo anterior havia mostrado que nanopartículas de prata tiveram um efeito significativo sobre *C. albicans* (Kim et al., 2009).

Segundo Nozari et al. (2012), a associação de fluconazol com nanopartículas de prata também promoveu um aumento da atividade antifúngica contra isolados de *Candida*, oriundos de candidíases vulvovaginais, em comparação ao fármaco sozinho.

Entretanto, para os outros fungos investigados no estudo de Gajbhige et al. (2009), como por exemplo o *Fusarium*, o aumento da atividade antifúngica das nanopartículas não foi significativo, o que de certa forma, está de acordo com os achados

do presente trabalho, no qual não foi observado um aumento da atividade do fármaco quando associado em nanopartículas poliméricas contra fungos filamentosos.

Neste estudo também foram utilizadas formulações das nanoestruturas sem conter o fármaco (nanoestruturas “brancas”) que foram avaliadas em paralelo com os experimentos de susceptibilidade, e utilizadas nos mesmos volumes das nanocápsulas do fármaco usadas na preparação das microplacas. Logo, não foi observada atividade antifúngica destas nanoestruturas contra os fungos investigados no presente estudo.

Por outro lado, estudo anterior demonstrou que a presença de tensoativos na composição da formulação, como o Poloxamer, poderia estar associada com a ação antimicrobiana das nanocápsulas sem o fármaco quando avaliadas contra isolados de *Candida* (Sousa, 2007).

Os resultados obtidos demonstram a possibilidade de veiculação do fluconazol em nanocápsulas poliméricas com uma redução na dose efetiva do mesmo. Porém, mais estudos acerca da atividade antifúngica *in vitro* desses sistemas nanoestruturados, particularmente direcionados aos fungos filamentosos e a outras leveduras emergentes são necessários, visto que estudos de susceptibilidade antifúngica *in vitro* utilizando estes sistemas para vários dos fungos apresentados neste trabalho ainda são escassos.

## 7 CONCLUSÕES

- A metodologia do cristal violeta permitiu quantificar a produção de biofilme de diferentes isolados leveduriformes e filamentosos, destacando-se como uma técnica simples, rápida e reprodutível para a avaliação presuntiva de um grande número de isolados clínicos e ambientais. Além disso, esta técnica também possibilitou a diferenciação de isolados fúngicos altamente produtores de biofilme dos baixos produtores.
- Os isolados clínicos apresentaram maior capacidade de formação de biofilme em comparação aos isolados ambientais.
- Não houve correlação entre a produção de biofilme e a susceptibilidade aos antifúngicos testados contra células planctônicas.
- De modo geral, o perfil de susceptibilidade aos antifúngicos testados seguiu o padrão de resultados mostrados por estudos anteriores.
- A anfotericina B mostrou excelente atividade *in vitro* contra a maioria dos isolados analisados.
- Este estudo demonstrou ser viável obter nanocápsulas de poli- $\epsilon$ -caprolactona contendo cetoconazol ou fluconazol associado utilizando o método de deposição interfacial do polímero seguido pelo deslocamento do solvente.
- As nanocápsulas contendo os antifúngicos apresentaram atividade superior à forma livre dos fármacos para os isolados do gênero *Candida*, destacando-se as nanocápsulas de cetoconazol que demonstraram um maior efeito *in vitro* em comparação às nanocápsulas de fluconazol quando avaliadas contra os mesmos fungos.
- A encapsulação de antifúngicos em carreadores submicrométricos mostrou-se uma alternativa interessante, principalmente para o desenvolvimento de novas formulações no tratamento das candidíases, como ficou demonstrado no presente estudo.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; CASTELLI, M. V.; CUESTA, I; ZARAGOZA, O.; MONZÓN, A.; MELLADO, E.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. *In vitro* activity of antifungals against *Zygomycetes*. **Clinical Microbiology and Infection**. 2009, v. 15, n. 5, p. 71-76.

AL-SWEIH, N.; KHAN, Z. U.; AHMAD, S.; DEVARAJAN, L.; KHAN, S.; JOSEPH, L.; CHANDY, R. *Kodamaea ohmeri* as an emerging pathogen: a case report and review of the literature. **Medical Mycology**. 2011; v. 49, n. 7, p. 766-770.

ANTAS, P. R. Z.; BRITO, M. M. S.; PEIXOTO, E.; PONTE, C. G. G.; BORBA, C. M. Neglected and emerging fungal infections: review of hyalohyphomycosis by *Paecilomyces lilacinus* focusing in disease burden, *in vitro* antifungal susceptibility and management. **Microbes and Infection**. 2012, v. 14, p. 1-8.

ARIKAN, S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. **Medical Mycology**, v. 45, n. 7, p. 569-587, nov. 2007.

ASSIS, D. N.; MOSQUEIRA, V. C. F.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; CARDOSO, V. N. Release profiles and morphological characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy of <sup>99m</sup>Techneium-fluconazole nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**. 2008, v. 349, p. 152-160.

BACHHAV, Y. G.; MONDON, K.; KALIA, Y. N.; GURNY, R.; MÖLLER, M. Novel micelle formulations to increase cutaneous bioavailability of azole antifungals. **Journal of Controlled Release**. 2011, v. 153, p. 126-132.

BALAJEE, S. A.; GRIBSKOV, J. L.; HANLEY, E.; NICKLE, D.; MARR, K. A. *Aspergillus lentulus* sp. Nov., a new sibling species of a *A. fumigatus*. **Eukaryotic Cell**. 2005, v. 4, p. 625-632.

BARRATT, G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharmaceutical Science Technology Today**. 2000; v. 3, n. 5, p. 163-171.

BERGMAN, M. M.; GAGNON, D.; DOERN, G. V. *Pichia ohmeri* fungemia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 1998, v. 30, p. 229-231.

BHALARIA, M. K.; NAIK, S.; MISRA, A. N. Ethosomes: a novel delivery system for antifungal drugs in the treatment of topical fungal diseases. **Indian Journal of Experimental Biology**. 2009, v. 47, p. 368-375.

BODEY, G.; BUELTMANN, B.; DUGUID, W.; GIBBS, D.; HANAK, H.; HOTCHI, M.; MALL, G.; MARTINO, P.; MEUNIER, F.; MILLIKEN, S.; NAOE, S.; OKUDAIRA, M.; SCEVOLA, D.; VAN'T WOUT, J. Fungal infections in cancer patients: an international autopsy survey. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. 1992, v. 11, p. 99-109.

BOSSCHE, H. V. Mechanisms of antifungal resistance. **Revista Iberoamericana de Micología**. 1997, v. 14, p. 44-49.

BREMENKAMP, R. M.; CARIS, A. R.; JORGE, A. O. C.; BACK-BRITO, G. N.; MOTA, A. J.; BALDUCCI, I.; BRIGHENTI, F. L.; KOGA-ITO, C. Y. Prevalence and antifungal resistance profile of *Candida* spp. oral isolates from patients with type 1 and 2 diabetes mellitus. **Archives of Oral Biology**. 2011, v. 56, p. 549-555.

CASTELLI, M. V.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; CUESTA, I.; MONZON, A.; MELLADO, E.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Susceptibility testing and molecular classification of *Paecilomyces* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2926-2928, aug. 2008.

CHABASSE, D.; PIHET, M.; BOUCHARA, J. Émergence de nouveaux champignons pathogènes en médecine: revue générale. **Revue Francophone Des Laboratoires**. 2009, v. 416, p. 71-86.

CHRISTENSEN, G. D.; SIMPSON, W. A.; YOUNGER, J. J.; BADDOUR, L. M.; BARRETT, F. F.; MELTON, D. M.; BEACHEY, E. H. Adherence of coagulase-negative *staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *staphylococci* to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology**. 1985, v. 22, n. 6, p. 996-1006.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE 2008a. **Publication M27-A3: reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**; approved standard – third edition. Wayne, Pa. CLSI 28 (14): 1-30.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE 2008b. **Publication M38-A2: reference method for broth dilution antifungals susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi**; approved standard – second edition. Wayne, Pa. CLSI 28 (14): 1-30.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Proposed standard M-27P. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 1992.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Approved standard M-27A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 1997.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for disk diffusion susceptibility testing of yeasts**. Approved standard M-44A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2004.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J. et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**. 2006, v. 44, p. 2816-2823.

CUENCA-ESTRELLA, M.; GOMEZ-LOPEZ, A.; MELLADO, E.; BUITRAGO, M. J.; MONZON, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3.378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 3, p. 917-921, mar. 2006.

CUENCA-ESTRELLA, M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. **Revista Española de Quimioterapia**. 2010, v. 23, n. 4, p. 169-176.

DA MATTA, D. A.; DE ALMEIDA, L. P.; MACHADO, A. M.; AZEVEDO, A. C.; KUSANO, E. J. U.; TRAVASSOS, N. F.; SALOMÃO, R.; COLOMBO, A. L. Antifungal



susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 2007, v. 57, p. 399-404.

DEBEAUPUIS, J. P.; SARFATI, J.; CHAZALET, V.; LATGI, J. P. Genetic diversity among clinical and environmental isolates of *A. fumigatus*. **Infection and Immunity**. 1997, v. 65, p. 3080-3085.

DEMITTO, F. O.; AMARAL, R. C. R.; BIASI, R. P.; GUILLIERMETTI, E.; SVIDZINSKI, T. I. E.; BAEZA, L. C. Susceptibilidade a antifúngicos *in vitro* de *Candida* spp. de pacientes do Hospital Universitário Regional de Maringá-PR. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v. 48, n. 5, p. 315-321, out. 2012.

DENNING, D. W.; HANSON, L. H.; PERLMAN, A. M.; STEVENS, D. A. *In vitro* Susceptibility and Synergy Studies of *Aspergillus* Species to Conventional and New Agents. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 1992, v. 15, p. 21-34.

DENNING, D. W.; VENKATESWARLU, K.; OAKLEY, K. L.; ANDERSON, M. J.; MANNING, N. J.; STEVENS, D. A.; WARNOCK, D. W.; KELLY, S. L. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 1997, v. 41, n. 6, p. 1364-1368.

DENNING, D. W.; HOPE, W. W. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. **Trends in Microbiology**. 2010, v. 18, n. 5, p. 195-204.

DESNOS-OLLIVIER, M.; ROBERT, V.; RAOUX-BARBOT, D.; GROENEWALD, M.; DROMER, F. Antifungal susceptibility profiles of 1698 yeast reference strains revealing potential emerging human pathogens. **Plos One**. 2012, v. 7, n. 3, p. e32278.

DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends in Microbiology**. 2003, v. 11, n. 1, p. 30-37.

DWORECKA-KASZAK, B.; KIZERWETTER-SWIDA, M. Pseudomycelium forming *Rhodotorula* – unusual picture of biofilm. **Mikologia Lekarska**. 2011, v. 18, n. 2, p. 74-78.

ESPINEL-INGROFF, A.; BARCHIESI, F.; HAZEN, K. C.; MARTINEZ-SUAREZ, J. V.; SCALISE, G. Standardization of antifungal susceptibility testing and clinical relevance. **Medical Mycology**. 1998, v. 36, p. 68-78.

ESPINEL-INGROFF, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. **Revista Iberoamericana de Micologia**. 2008, v. 25, p. 101-106.

EUCAST – EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY TESTING. **Method for the determination of minimum inhibitory concentration (mic) by broth dilution of fermentative yeasts**. Discussion document E.Dis. 7.1. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Taufkirchen, Germany, 2002.

EUCAST – EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY TESTING. **Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds**. Definitive document E.Def. 9.1. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Taufkirchen, Germany, 2008b.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J-PH; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmacy**. 1989, v. 55, p. R1-R4.

FLECK, R.; DIETZ, A.; HOF, H. *In vitro* susceptibility of *Candida* species to five antifungal agents in a German university hospital assessed by the reference broth microdilution method and Etest. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. 2007, v. 59, p. 767-771.

GAJBHIYE, M.; KESHARWANI, J.; INGLE, A.; GADE, A.; RAI, M. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. **Nanomedicine**. 2009, v. 5, p. 382-386.

GALLIS, H. A.; DREW, R. H.; PICKARD, W. W. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. **Review Infectious Diseases**. 1990, v. 12, n. 2, p. 308-329.

GALVÃO, C. F.; MOTTA, G. F.; ALVAREZ-LEITE, M. E. Análise quantitativa da contaminação da água das tubulações de equipamentos odontológicos. **Arquivo Brasileiro de Odontologia**. 2006, p. 3-9.

GASPARETTO, A.; NEGRI, M. F. N.; PAULA, C. R.; SVIDZINSKI, T. I. E. Produção de biofilme por leveduras isoladas da cavidade bucal de usuários de prótese dentária. **Acta Scientiarum Health Science**. 2005, v. 27, n. 1, p. 37-40.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. 2010, v. 46, n. 3, p. 225-234.

GOMEZ-LOPEZ, A.; MELLADO, E.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Susceptibility profile of 29 clinical isolates of *Rhodotorula* spp. and literature review. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. 2005, v. 55, p. 312-316.

GUPTA, M.; VYAS, S. P. Development, characterization and *in vivo* assessment of effective lipidic nanoparticles for dermal delivery of fluconazole against cutaneous candidiasis. **Chemistry and Physics of Lipids**. 2012, v. 165, p. 454-461.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous applications. **Drug Target Insights**. 2007, v. 2, p. 147-157.

HARDING, M. W.; MARQUES, L. L. R.; HOWARD, R. J.; OLSON, M. E. Can filamentous fungi form biofilms? **Trends in Microbiology**. 2009, v. 17, n. 11, p. 475-480.

HEDAYATI, M. T.; PASQUALOTTO, A. C.; WARN, P. A.; BOWYER, P.; DENNING, D. W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**. 2007, v. 153, p. 1677-1692.

HOWARD, S. J.; CERAR, D.; ANDERSON, M. J.; ALBARRAG, A.; FISHER, M. C.; PASQUALOTTO, A. C.; LAVERDIERE, M.; ARENDRUP, M. C.; PERLIN, D. S.; DENNING, D. W. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. **Emerging Infectious Diseases**. 2009, v. 15, n. 7, p. 1068-1076.

HUH, A. J.; KWON, Y. J. "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. **Journal of Controlled Release**. 2011, v. 156, p. 128-145.

HUQ, A.; WHITEHOUSE, C. A.; GRIM, C. J.; ALAM, M.; COLWELL, R. R. Biofilms in water, its role and impact in human disease transmission. **Current Opinion in Biotechnology**. 2008, v. 19, p. 244-247.

IQBAL, N. J.; BOEY, A.; PARK, B. J.; BRANDT, M. E. Determination of *in vitro* susceptibility of ocular *Fusarium* spp. isolates from keratitis cases and comparison of Clinical and Laboratory Standards Institute M38-A2 and Etest methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 2008, v. 62, p. 348-350.

ISHAM, N.; GHANNOUM, M. A. Antifungal activity of miconazole against recent *Candida* strains. **Mycoses**. 2009, v. 53, p. 434-437.

ITALIA, J. L.; SHARP, A.; CARTER, K. C.; WARN, P.; KUMAR, M. N. V. R. Peroral Amphotericin B Polymer Nanoparticles Lead to Comparable or Superior *In Vivo* Antifungal Activity to That of Intravenous Ambisome<sup>®</sup> or Fungizone<sup>™</sup>. **Plos One**. 2011, v. 6, n. 10, p. e25744.

KAKKAR, S.; KAUR, I. P. Spanlastics - A novel nanovesicular carrier system for ocular delivery. **International Journal of Pharmacy**. 2011, v. 413, p. 202-210.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. Antimicrobial Resistance. **Clinical Infectious Diseases**. 2008:46.

KAYSER, O. The impact of Nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. 2005, v. 6, n. 1, p. 3-5.

KERRIDGE, D.; NICHOLAS, R. D. Drug resistance in the opportunistic pathogens *Candida albicans* and *C. glabrata*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. 1986, v. 18, p. 39-49.

KIM, K. J.; SUNG, W. S.; SUH, B. K.; MOON, S. K.; CHOI, J. S.; KIM, J. G.; LEE, D. G. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. **Biometals**. 2009, v. 22, n. 2, p. 235-242.

KRCMERY, V.; BARNES, A. J. Non-*albicans Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **Journal Hospital Infection**. 2002, v. 50, p. 243-260.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINZ-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**. 9ª ed. São Paulo: Sarvier, 1104 p., 2002.

LAFLEUR, M. D.; KUMAMOTO, C. A.; LEWIS, K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2006, v. 50, n. 11, p. 3839-3846.

LEE, J. S.; SHIN, J. H.; KIM, M.; JUNG, S.; PARK, K. H.; CHO, D.; KEE, S. J.; SHIN, M. G.; SUH, S. P.; RYANG, D. W. *Kodamaea ohmeri* isolates from patients in a university hospital: identification, antifungal susceptibility, and pulsed-field gel electrophoresis analysis. **Journal of Clinical Microbiology**. 2007, v. 45, n. 3, p. 1005-1010.

LEENDERS, A. C. A. P.; BELKUM, A. V.; BEHRENDT, M.; LUIJENDIJK, A.; VERBRUGH, H. A. Density and molecular epidemiology of *Aspergillus* in air and relationship to outbreaks of *Aspergillus* infection. **Journal of Clinical Microbiology**. 1999, v. 37, p. 2343-2345.

LI, X.; YAN, Z.; XU, J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. **Microbiology**. 2003, v. 149, p. 353-362.

LIMA, K. M.; RÊGO, R. S. M.; DELGADO, M.; CASTRO, C. M. M. B. Espécies e suscetibilidade antifúngica *in vitro* de leveduras isoladas em unhas de pacientes com vírus da imunodeficiência humana. **Revista Ciência Médica**. 2009, v. 18, n. 2, p. 89-97.

MATHEW, B. P.; NATH, M. Recent approaches to antifungal therapy for invasive mycoses. **ChemMedChem**. 2009, v. 4, n. 3, p. 310-323.

MESSER, S.; JONES, R. N.; FRITSCH, T. R. International surveillance of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1782-1787, may 2006.

MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **Lancet Infectious Diseases**. 2011, v. 11, p. 142-51.

MINAGI, S.; MIYAKE, Y.; INAGAKI, K.; TSURU, H.; SUGINAKA, H. Hydrophobic interaction in *Candida albicans* and *Candida tropicalis* adherence to various denture base resin materials. **Infectious and Immunity**. 1985, v. 47, n. 2, p. 11-14.

MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. 2006, v. 5, n. 1, p. 561-573.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. 2010, v. 385, p. 113-142.

MORSE, S. S. Factors in the emergence of infectious diseases. **Emerging Infectious Diseases**. 1995, v. 1, p. 7-15.

MUDSHINGE, S. R.; DEORE, A. B.; PATIL, S.; BALGHAT, S. M. Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery. **Saudi Pharmaceutical Journal**. 2010, v. 19, p. 129-141.

NATECHE, F.; MARTIN, A.; BARAKA, S.; PALOMINO, J. C.; KHALED, S.; PORTAELS, F. Application of the resazurin microtitre assay for detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Algiers. **Journal of Medical Microbiology**. 2006, v. 55, p. 857-860.

NCCLS – NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi**. Approved Standard. NCCLS M38-A. 22(16), 2002.

NOZARI, S.; KOHAN, F. H.; KHOZANI, M. A.; AHMADI, F.; GHASEMI, Z.; NAMI, S.; FALAHATI, M. Comparison of antifungal effect of fluconazole alone and in combination with nanosilver particles against *Candida* species isolated from chronic candidal vulvovaginitis. **Razi Journal of Medical Sciences**. 2012, v. 18, n. 93, p. 1-7.

NUCCI, M.; MARR, K. A. Emerging fungal diseases. **Clinical Infectious Diseases**. 2005, v. 41, p. 521-526.

NUNES, J. M.; BIZERRA, F. C.; FERREIRA, R. C.; COLOMBO, A. L. Molecular identification, antifungal susceptibility profile and biofilm formation of clinical and

environmental *Rhodotorula* spp. isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2013, v. 57, n. 1, p. 382-389.

PANDEY, R.; AHMAD, Z.; SHARMA, S.; KHULLER, G. K. Nano-encapsulation of azole antifungals: Potential applications to improve oral drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. 2005, v. 301, p. 268-276.

PANNANUSORN, S.; FERNANDEZ, V.; RÖMLING, U. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection. **Mycoses**. 2012, p. 1-9.

PAREDES, C. V. T. Actualización em pruebas de susceptibilidad antifúngica. **Revista Chilena de Infectología**. 2009, v. 26, n. 2, p. 144-150.

PASTOR, F. J.; RUÍZ-CENDOYA, M.; PUJOL, I.; MAYAYO, E.; SUTTON, D. A.; GUARRO, J. *In vitro* and *in vivo* antifungal susceptibilities of the Mucoralean fungus *Cunninghamella*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2010, v. 54, n. 11, p. 4550-4555.

PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**. 2008, v. 72, p. 157-165.

PEREA, S.; PATTERSON, T. F. Antifungal Resistance in Pathogenic Fungi. **Clinical Infectious Diseases**. 2002, v. 35.

PIERCE, C. G.; UPPULURI, P.; TRISTAN, A. R.; WORMLEY, F. L. JR.; MOWAT, E.; RAMAGE, G.; LOPEZ-RIBOT, J. L. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocols**. 2008, v. 3, p. 1494-1500.

PFALLER, M. A.; SHEEHAN, D. J.; REX, J. H. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. **Clinical Microbiology Reviews**. 2004, v. 17, n. 2, p. 268-280.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; MENDEZ, M. *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic

and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology**. 2006, v. 44, p. 3551-3555.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, D. L. Results from the ARTEMIS DISK global antifungal surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. **Journal of Clinical Microbiology**. 2007, v. 45, p. 1735-1745.

PFALLER, M. A.; MOET, G. J.; MESSER, S. A.; JONES, R. N.; CASTANHEIRA, M. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 561-566, feb 2011.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**. 2012, v. 125, n. 1A, p. s3-s11.

POOJARI, A.; SAPRE, G. *Kodamaea ohmeri* infection in a neonate. **Indian Pediatrics**. 2009, v. 46, n. 7, p. 629-631.

PUJOL, I.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; SALA, J. *In vitro* antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium* spp. strains. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 1997, v. 39, p. 163-167.

RADOSAVLJEVIC, M.; KOENIG, H.; LETSCHER-BRU, V.; WALLER, J.; MALOISEL, F.; LIOURE, B.; HERBRECHT, R. *Candida catenulate* fungemia in a cancer patient. **Journal of Clinical Microbiology**. 1999, v. 37, n. 2, p. 475-477.

RAMAGE, G.; MOWAT, E.; JONES, B.; WILLIAMS, C.; LOPEZ-RIBOT, J. Our current understanding of fungal biofilms. **Critical Reviews in Microbiology**. 2009, v. 35, n. 4, p. 340-355.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal Biofilm Resistance. **International Journal of Microbiology**. 2012, p. 1-14.

RAMASAMY, T.; KHANDASAMI, U. S.; RUTTALA, H.; SHANMUGAM, S. Development of Solid Lipid Nanoparticles Enriched Hidrogels for Topical Delivery of



Anti-fungal Agent. **Macromolecular Research**. 2012, v. 20, n. 7, p. 682-692.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A. J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine**. 2006, v. 2, p. 8-21.

REX, J. H.; PFALLER, M. A. Has antifungal susceptibility testing come of age? **Clinical Infectious Diseases**. 2002, v. 35, p. 982-989.

ROBERT, V. A.; CASADEVALL, A. Vertebrate endothermy restricts most fungi as potential pathogens. **Journal of Infectious Diseases**. 2009, v. 200, p. 1623-1626.

ROGERS, T. R. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact? **International Journal of Antimicrobial Agents**. 2006, v. 27S, p. S7-S11.

RUDRAMURTHY, S. M.; CHAKRABARTI, A.; GEERTSEN, E.; MOUTON, J. W.; MEIS, J. *In vitro* activity of isavuconazole against 208 *Aspergillus flavus* isolates in comparison with 7 other antifungal agents: assessment according to the methodology of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. 2011, v. 71, p. 370-377.

SABATELLI, F.; PATEL, R.; MANN, P. A.; MENDRICK, C. A.; NORRIS, C. C.; HARE, R.; LOEBENBERG, D.; BLACK, T. A.; MCNICHOLAS, P. M. *In vitro* activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2006, v. 50, p. 2009-2015.

SANTOS, JR. I. D.; SOUZA, I. A. M.; BORGES, R. G.; DE SOUZA, L. B. S.; DE SANTANA, W. J.; COUTINHO, H. D. M. Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. **Scientia Medica**. 2005, v. 15, n. 3, p. 189-197.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**. 2003, v. 26, n. 5, p. 726-737.

SCHREIBER, A. Z. Antifungigrama: quando solicitar e como interpretar. **Prática Hospitalar**. 2007, v. 49, p. 87-91.

SEIDLER, M. J.; SALVENMOSER, S.; MÜLLER, F. C. *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 4130-4136, nov. 2008.

SHIN, J. H.; KEE, S. J.; SHIN, M. G. et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of blood stream isolates with isolates from other sources. **Journal of Clinical Microbiology**. 2002, v. 40, p. 1244-1248.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010, 388 p.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. **Trends in Microbiology**. 2011, v. 19, n. 5, p. 241-247.

SINGH, R.; SHIVAPRAKASH, M. R.; CHAKRABARTI, A. Biofilm formation by *zygomycetes*: quantification, structure and matrix composition. **Microbiology**. 2011, v. 157, p. 2611-2618.

SIQUEIRA, V. M.; OLIVEIRA, H. M. B.; SANTOS, C.; PATERSON, R. R. M.; GUSMÃO, N. B.; LIMA, N. Filamentous fungi in drinking water, particularly in relation to biofilm formation. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. 2011, v. 8, p. 456-469.

SOUSA, ELIANA CAMARGO DE. **Avaliação da atividade *in vitro* de nanoemulsões e nanocápsulas de fluconazol contra *Candida* spp.** Ouro Preto, 2007. 156 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – área de concentração: Biologia Molecular). Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Ouro Preto.

SOUZA, P. M. S.; LOBO, F. A.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Desenvolvimento de nanocápsulas de poly- $\epsilon$ -caprolactona contendo o herbicida atrazina. **Química Nova**. 2012, v. 35, n. 1, p. 132-137.

STEINBACH, W. J.; BENJAMIN JR., D. K.; KONTOYIANNIS, D. P.; PERFECT, J. R.; LUTSAR, I.; MARR, K. A.; LIONAKIS, M. S.; TORRES, H. A.; JAFRI, H.; WALSH, T. J. Infections due to *Aspergillus terreus*: a multicenter retrospective analysis of 83 cases. **Clinical and Infectious Diseases**. 2004, v. 39, p. 192-198.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; DI BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; CIRKOVIC, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *staphylococci*. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**. 2007, v. 115, n. 8, p. 891-899.

STOPPA, M. A. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. **Quimica Nova**. 2009, v. 32, n. 2, p. 498-502.

TEIXEIRA, A. B. A.; SILVA, M.; LYRA, L.; LUZ, E. A.; UNO, J.; TAKADA, H.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K.; SCHREIBER, A. Z. Antifungal susceptibility and pathogenic potential of environmental isolated filamentous fungi compared with colonizing agents in immunocompromised patients. **Mycopathologia**. 2005, v. 160, p. 129-135.

THEIN, Z. M.; SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. *In vitro* biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. **Archives of Oral Biology**. 2007, v. 52, p. 761-767.

THOMAS, A. H. Suggested mechanisms for the antimycotic activity for the polyene antibiotics and the N-substituted imidazoles. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 1986, v. 17, p. 269-279.

TOBUDIC, S.; KRATZER, C.; PRESTERL, E. Azole-resistant *Candida* spp. – emerging pathogens? **Mycoses**. 2012, v. 55, n. 1, p. 24-32.

TORTORANO, A. M.; PRIGITANO, A.; DHO, G.; ESPOSTO, M. C.; GIANNI, C.; GRANCINI, A.; OSSI, C.; VIVIANI, M. A. Species Distribution and *in vitro* antifungal susceptibility patterns of 75 clinical isolates of *Fusarium* spp. from Northern Italy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2008, v. 52, n. 7, p. 2683-2685.

TROFA, D.; GÁCSEK, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**. 2008, v. 21, n. 4, p. 606-625.

TUON, F. F.; COSTA, S. F. *Rhodotorula* infection: A systematic review of 128 cases from literature. **Revista Iberoamericana de Micologia**. 2008, v. 25, p. 135-140.

VERWEIJ, P. E.; SNELDERS, E.; KEMA, G. H. J.; MELLADO, E.; MELCHERS, W. J. G. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? **Lancet Infectious Diseases**. 2009, v. 9, p. 789-795.

VERWEIJ, P. E.; HOWARD, S. J.; MELCHERS, W. J. G.; DENNING, D. W. Azole-resistance in *Aspergillus*: proposed nomenclature and breakpoints. **Drug Resistance Updates**. 2009, v. 12, p. 141-147.

VYAS, S. P.; GUPTA, S. Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification. **International Journal of Nanomedicine**. 2006, v. 1, n. 4, p. 417-432.

WALSH, T. J.; PETRAITIS, V.; PETRAITIENE, R.; FIELD-RIDLEY, A.; SUTTON, D.; GHANNOUM, M.; SEIN, T.; SCHAUFLE, R.; PETER, J.; BACHER, J.; CASLER, H.; ARMSTRONG, D.; ESPINEL-INGROFF, A.; RINALDI, M. G.; LYMAN, C. A. Experimental pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: pathogenesis and treatment of an emerging fungal pathogen resistant to amphotericin B. **Journal of Infectious Diseases**. 2003, v. 188, p. 305-319.

WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN, R. A. Clinical, Cellular and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**. 1998, v. 11, n. 2, p. 382-402.

WHITE, P. L.; ARCHER, A. E.; BARNES, R. A. Comparison of non-culture-based methods for detection of systemic fungal infections, with an emphasis on invasive *Candida* infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2181-2187, may. 2005.

WICKERHAM, L. J.; BURTON, K. A. Carbon assimilation tests for the classification of yeasts. **Journal of Bacteriology**. 1948, v. 56, p. 363-371.

WINGARD, J. R. Fungal infection after bone marrow transplant. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**. 1999, v. 5, n. 2, p. 55-68.

YADAV, M.; AHUJA, M. Preparation and evaluation of nanoparticles of gum cordia, an anionic polysaccharide for ophthalmic delivery. **Carbohydrate Polymers**. 2010, v. 81, p. 871-877.

YANG, B.; PENG, M.; HOU, S. J.; SUN, J. R.; LEE, S. Y.; LU, J. Fluconazole-resistant *Kodamaea ohmeri* fungemia associated with cellulitis: Case report and review of the literature. **International Journal of Infectious Diseases**. 2009, v. 13, n. 6, p. e493-e497.

ZAAS, A. K.; BOYCE, M.; SCHELL, W.; LODGE, B. A.; MILLER, J. L.; PERFECT, J. R. Risk of fungemia due to *Rhodotorula* and antifungal susceptibility testing of *Rhodotorula* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**. 2003, v. 41, n. 11, p. 5233-5235.

ZARAGOZA, O.; MESA-ARANGO, A. C.; GÓMEZ-LÓPEZ, A.; BERNAL-MARTÍNEZ, L.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Process analysis of variables for standardization of antifungal susceptibility testing of nonfermentative yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2011, v. 55, n. 4, p. 1563-1570.

ZHANG, L.; PORNPATTANANANGKUL, D.; HU, C. M. J.; HUANG, C. M. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. **Current Medicinal Chemistry**. 2010, v. 17, p. 585-594.

## 9 APÊNDICE

**TABELA 9.** Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM - µg/mL) para os 82 isolados fúngicos testados frente aos cinco antifúngicos

Isolado	Espécie	CET	FLU	MICO	ITRA	ANFO
72A	<i>Candida tropicalis</i>	8	64	8	8	0.125
72P	<i>Candida tropicalis</i>	0.0313	64	0.0313	8	0.0625
94P	<i>Candida tropicalis</i>	4	64	0.0313	0.0313	0.0625
102A	<i>Candida tropicalis</i>	1	0.125	0.5	0.0313	0.5
15P	<i>Candida tropicalis</i>	0.0313	0.125	0.25	0.0313	0.125
94A	<i>Candida tropicalis</i>	0.0313	0.125	0.25	0.0313	0.5
2A	<i>Candida tropicalis</i>	0.0313	4	2	0.0625	0.125
2P	<i>Candida tropicalis</i>	0.0313	4	4	0.25	0.125
17A	<i>Candida tropicalis</i>	0.0313	0.25	4	0.0313	0.125
57A	<i>Candida tropicalis</i>	0.0313	0.125	0.0313	0.0313	0.0625
14A	<i>Candida tropicalis</i>	0.0313	1	0.0313	0.0313	0.0313
14P	<i>Candida tropicalis</i>	0.0313	0.125	0.5	0.0313	0.125
17P	<i>Candida tropicalis</i>	0.0313	0.125	2	0.0313	0.125
67A	<i>Candida tropicalis</i>	0.0313	0.125	0.0313	0.0313	0.125
79A	<i>Candida tropicalis</i>	0.0313	1	4	0.0313	0.25
57P	<i>Candida tropicalis</i>	0.0313	1	1	0.25	0.5
81P	<i>Candida tropicalis</i>	0.0313	0.5	0.0313	0.0313	0.5
86A	<i>Candida tropicalis</i>	0.0313	0.5	0.0313	0.0313	0.125
24A	<i>Candida tropicalis</i>	0.0625	16	0.125	0.0625	0.25
102P	<i>Candida tropicalis</i>	0.0313	0.25	0.125	0.0313	0.125
C1H99	<i>Candida tropicalis</i>	0.0313	0.125	0.0313	0.0313	0.0625
C1H96	<i>Candida tropicalis</i>	0.0313	4	8	0.0313	0.5
COM32	<i>Candida parapsilosis</i>	0.0313	0.5	1	0.0313	0.0313
COM7	<i>Candida parapsilosis</i>	0.0313	1	8	0.0313	0.0625
COM14	<i>Candida parapsilosis</i>	0.0313	2	0.25	0.0313	0.125
77A	<i>Candida parapsilosis</i>	0.0313	1	0.25	0.0313	0.0625
56P	<i>Candida parapsilosis</i>	0.0313	0.125	0.0313	0.125	0.5
65P	<i>Candida parapsilosis</i>	0.0313	0.125	0.0313	0.0313	0.5
C1M1	<i>Candida parapsilosis</i>	0.0313	0.125	0.0625	0.0313	1
28A	<i>Candida parapsilosis</i>	0.0313	0.125	0.0625	0.0313	0.125
16A	<i>Candida parapsilosis</i>	0.0313	0.125	0.0625	0.0313	0.5
1A01	<i>Candida parapsilosis</i>	0.0313	4	0.0313	0.0313	0.5
3D02	<i>Candida parapsilosis</i>	0.0313	4	0.25	0.0313	1
3D03	<i>Candida parapsilosis</i>	0.0313	16	0.125	0.0313	0.25
TR36	<i>Candida parapsilosis</i>	0.0313	4	0.0313	0.0313	1
COM12	<i>Candida albicans</i>	8	64	4	16	0.125
66A	<i>Candida albicans</i>	0.0313	1	0.0313	0.0313	0.0625
64A	<i>Candida albicans</i>	0.0313	0.125	0.0313	0.0313	0.25
85P	<i>Candida albicans</i>	0.0313	0.125	0.0313	0.0313	0.0625
79P	<i>Candida albicans</i>	0.0313	0.25	0.0313	0.0313	0.0625
C1H98	<i>Candida albicans</i>	0.0313	0.125	0.0313	0.0313	0.25
76P	<i>Candida albicans</i>	0.0313	0.125	0.0313	1	0.25
42P	<i>Candida albicans</i>	4	64	0.0313	0.0313	0.25

81A	<i>Candida albicans</i>	0.0313	0.125	1	0.0313	0.25
TR4	<i>Candida catenulata</i>	0.0313	4	0.0313	0.0313	0.125
TR5	<i>Candida catenulata</i>	0.0313	0.5	0.25	0.0313	0.125
TR11	<i>Candida catenulata</i>	0.0313	2	0.0313	0.0313	0.5
TR7	<i>Candida guilliermondii</i>	0.0313	64	1	4	0.5
TR8	<i>Kodamaea ohmeri</i>	0.0313	2	0.0313	0.0313	0.125
RHO1	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0.0313	64	8	0.0625	0.0313
RHO2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0.0313	64	2	0.25	0.125
RHO3	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0.125	16	16	0.25	0.0625
RHO6	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0.0625	64	8	0.5	0.125
RHO8	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0.0625	16	8	0.125	0.125
3D01	<i>Rhodotorula glutinis</i>	0.0625	64	16	0.5	0.0625
AFLHC503	<i>Aspergillus flavus</i>	0.5	64	1	0.25	2
AFLHC580	<i>Aspergillus flavus</i>	0.25	64	0.5	0.25	2
AFL05	<i>Aspergillus flavus</i>	0.5	64	1	0.25	16
ASP10	<i>Aspergillus flavus</i>	1	64	2	0.25	0.5
ASP19	<i>Aspergillus flavus</i>	1	64	2	0.5	1
ASP21	<i>Aspergillus flavus</i>	0.25	64	4	0.125	1
ASP01	<i>Aspergillus niger</i>	2	64	8	0.5	0.25
ASP05	<i>Aspergillus niger</i>	2	64	2	1	0.125
ASP07	<i>Aspergillus niger</i>	4	64	1	1	0.5
AN186	<i>Aspergillus niger</i>	2	64	2	0.125	0.5
AN1015	<i>Aspergillus niger</i>	2	64	8	0.5	2
AN9029	<i>Aspergillus niger</i>	1	64	2	0.5	0.25
AFUHC1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.125	64	16	0.0313	0.5
AFUP1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	64	2	0.5	1
AFU10	<i>Aspergillus fumigatus</i>	4	64	2	0.25	2
AFU294	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	64	2	0.5	0.125
AFU13073	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	64	2	0.25	1
AT10071	<i>Aspergillus terreus</i>	1	64	2	0.25	1
FUS02	<i>Fusarium sp</i>	16	64	16	16	0.5
FUS04	<i>Fusarium sp</i>	8	64	16	16	2
FUS11	<i>Fusarium sp</i>	16	64	16	16	0.5
FUS12	<i>Fusarium sp</i>	16	64	16	16	2
FUS13	<i>Fusarium sp</i>	16	64	16	16	0.125
FUS15	<i>Fusarium sp</i>	8	64	8	16	2
PAE01	<i>Paecilomyces sp</i>	0.0625	64	0.0625	0.0313	0.0313
PAE02	<i>Paecilomyces sp</i>	0.125	64	4	0.25	0.0625
CUR01	<i>Cunninghamella sp</i>	4	64	4	1	4

CET= cetoconazol; FLU= fluconazol; MICO= miconazol; ITRA= itraconazol; ANFO= anfotericina B.

## **10 ANEXOS**

10.1 O manuscrito a seguir foi escrito e submetido para a revista “Microbiological Research”.

**Ketoconazole-Loaded Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Nanocapsules for Improved Antifungal Activity Against *Candida* spp.**

**Roberta Stefanello de Jesus; Patrícia Inês Back; Irene Cledes Kulkamp Guerreiro;  
Alexandre Meneghello Fuentefria**



**Ketoconazole-Loaded Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Nanocapsules for Improved Antifungal Activity Against *Candida* spp.**

**Roberta Stefanello de Jesus<sup>1,2</sup>; Patrícia Inês Back<sup>2</sup>; Irene Clemes Kulkamp Guerreiro<sup>2\*</sup>; Alexandre Meneghello Fuentefria<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

<sup>2</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

**Abstract:** Considering the need to obtain new therapeutic agents aimed at acting against fungal infections, the purpose of this study was to formulate and investigate the *in vitro* characteristics and antifungal activity of ketoconazole-loaded poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsules (KN) against pathogenic yeasts. The KN were prepared by using the method of interfacial precipitation of a preformed polymer. Mean particle size of these nanocapsules was 206 nm according to a variation of some of the formulation components, such as the amount of polymer that was used in this assay. The KN surface was negatively charged showing -13.3 mV of zeta potential value. Drug encapsulation efficiency in KN reached up to 86.35% and the drug content was 0.41 mg/mL  $\pm$  0.05. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of the nanoparticles were determined to be much lower than those of ketoconazole in all the isolates tested in this study. The results demonstrate the possibility of delivery of ketoconazole in polymeric nanocapsules with a decrease in the effective dose of the drug. The increase in the *in vitro* antifungal activity through the nanoencapsulation points to the development of new formulations for treating infections caused by *Candida* spp.

**Keywords:** Ketoconazole; Polymeric nanocapsules; Antifungal susceptibility; Candidiasis.

\*Corresponding author. E-mail: [irenemail@gmail.com](mailto:irenemail@gmail.com)

## 1. Introduction

Yeasts of the genus *Candida* have great importance in the area of fungal infections especially due to the frequency in which they colonize and infect the human host, being responsible for the high mortality associated with these diseases (Akpan and Morgan 2002; Moreira-Oliveira et al. 2006; Denning and Hope 2010). For treating these infections, different therapeutic alternatives are currently available, such as formulations for topical use (e.g., nystatin, miconazole, clotrimazole and amphotericin B tablets) and systemic antifungal therapy, such as fluconazole, itraconazole and echinocandins (Akpan and Morgan 2002; Denning and Hope 2010). However, these drugs show some limitations, such as the occurrence of adverse effects, evidence of microbial resistance (Pinto et al. 2008) and possibility of infection recurrence (Denning and Hope 2010; Bremenkamp et al. 2011). Another alternative to be explored for treating candidiasis is ketoconazole. This imidazolic derivative shows as its main mechanism of action the inhibition of ergosterol synthesis, a steroidal component of the cell membrane in the fungal cell, which leads to the accumulation of sterols, inhibiting thus the growth of fungi (Martinez 2006; Denning and Hope 2010). Nevertheless, this drug has some limitations, such as hepatotoxicity, inhibition of steroid biosynthesis in mammals and variable bioavailability (Denning and Hope 2010), which may compromise treatment efficacy.

Therefore, a possible alternative for the development of these more effective pharmaceutical formulations is the use of nanotechnology for drug delivery. Among other vectors of these drug carrier systems, polymeric nanoparticles stand out, which have been largely studied due to their therapeutic potentials (Espuelas et al. 2002; Mudshinge et al. 2010). Some authors demonstrated the possibility of delivering

ketoconazole through different types of nanostructures. For example, Souto and Müller (2005) verified that the use of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers allowed greater control over drug release and an increase in its stability. Similarly, the use of ketoconazole as a model for investigation of a novel transport system of elastic nanovesicles was shown to be quite interesting as it enabled the drug to be released into the posterior portion of the eyes and due to its therapeutic potential in the treatment of ocular fungal infections that are difficult to treat with currently available drugs (Kakkar and Kaur 2011). On the other hand, Ramasamy et al. (2012) demonstrated, by *in vivo* studies using a cutaneous candidiasis model, the therapeutic efficacy of carbopol and xanthan gum hydrogels for the delivery of ketoconazole-loaded solid lipid nanoparticles. However, none of these authors evaluated the influence of nanoencapsulation on the *in vitro* efficacy of ketoconazole against *Candida* spp. isolates.

In view of this, the present work intended to develop and characterize polymeric nanocapsules of ketoconazole by the technique of interfacial deposition of a preformed polymer and assess the *in vitro* antifungal activity of these nanocapsules compared with the drug in its free form against *Candida* spp. isolates, using the broth microdilution method, evaluating, thus, the potential of nanoencapsulation for improving the activity of ketoconazole.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Materials**

Ketoconazole and Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) (PCL, MW 80.000) were obtained respectively from Embrafarma (São Paulo, Brazil) and Aldrich (Strasbourg, France).

The surfactants sorbitan monostearate and polysorbate 80 were purchased from Delaware (Porto Alegre, Brazil); Oil composed of caprylic and capric acid triglycerides (Miglyol 810®) from Hulls (Puteaux, France); dimethylsulfoxide (DMSO; Vetec, Brazil), RPMI 1640 (HiMedia, Mumbai, India), morpholinopropanesulfonic acid (MOPS, Sigma-Aldrich, Germany), resazurin (Sigma-Aldrich, Germany), sabouraud dextrose agar plus chloramphenicol (HiMedia, Mumbai, India) and CHROMagar Candida® (Probac do Brasil, São Paulo, Brazil) were also used in this study. All other reagents used in the study were of analytical grade.

## **2.2 Yeast isolates**

A total of 4 oral isolates of *Candida* (three *Candida tropicalis* and one *Candida albicans*) were tested. All clinical isolates were obtained from the Fungal Collection of the Research Group in Applied Mycology (GPMA), Pharmacy School, UFRGS, Porto Alegre, Brazil. The presumptive identification of isolates was done through observation of pigmentation of the colonies in the CHROMagar Candida® medium and confirmed by the commercial system VITEK 2 Compact (BioMérieux Vitek, Marcy L'Etoile, France). *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) was included in the study as a quality control strain.

## **2.3 Preparation of ketoconazole loaded in PCL nanocapsules**

The preparation of polymeric nanoparticles was performed by the method of interfacial deposition of preformed polymer described by Fessi et al. (1989). The organic phase was prepared using ketoconazole (4 mg), poly( $\epsilon$ -caprolactone) (100 mg), capric/caprylic triglycerides (160  $\mu$ L), sorbitan monostearate (38 mg), BHT (5 mg) dissolved in 27 mL acetone and 5 mL ethanol. After complete solubilization in a bath

(40°C ± 2°C) and constant stirring, the organic phase was poured into the aqueous phase. The aqueous phase was prepared with 53 mL of ultrapure water and Tween 80 (160 µL), and kept under constant stirring and heating at 40°C. The organic phase was then poured using a funnel onto the aqueous phase. Subsequently, the formulations were evaporated in Büchi Rotavapor at constant rotation and temperature of approximately 40°C to the final volume of 10mL. Nanocapsule formulations were prepared containing ketoconazole (KN) and without the drug (control nanocapsules-CN).

## 2.4 Physicochemical characterization of nanoparticles

### *Determination of particle size, polydispersity index and zeta potential*

The determination of particle size and the polydispersity index was performed by laser diffraction technique using the Mastersizer 2000® (Malvern Instruments). Samples were used without previous dilution. The average particle size was expressed by the equivalent sphere diameter (D[4,3]) and the size distribution was expressed by the SPAN value according to the equation below (Eq. 1), where D(0.9), D(0.1) and D(0.5) are the diameters of 90%, 10% and 50% of cumulative volumes, respectively.

$$Span = \frac{D(0.9) - D(0.1)}{D(0.5)} \quad \text{Eq.1}$$

The zeta potential was given by Zetasizer® (Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments), measured by electrophoretic mobility. The samples were diluted the ratio

of 1:500 (v/v) in 10 mM NaCl.

*Determination of drug content and entrapment efficiency of ketoconazole nanoparticles*

A method was validated by UV spectrophotometry (UV – 1800 PC Spectrophotometer) to determine the drug content in the formulations. The wavelength of analysis was 260 nm. The linearity was determined based on three determination curves prepared with a ketoconazole solution in the range from 5 to 50 µg/mL. Precision (intraday precision) and accuracy (standard addition method) were determined. Specificity was evaluated comparing samples of ketoconazole dilutions with and without addition of CN.

For determination of the drug content, KN samples were diluted with acetonitrile to the concentration of 12 µg/mL, filtered (0.45 µM) and read in UV spectrophotometer at 260 nm.

The entrapment efficiency (EE) was performed based on the method described by Kanis et al. (2011). The KN formulations were diluted in ethyl acetate (1:3) and the free ketoconazole present in the sample was extracted by vortexing for 3 minutes. Subsequently, the samples were centrifuged at 4000 rpm for 5 min, so that supernatant could be analyzed in the UV spectrophotometer at 260 nm. The EE was determined by comparing the quantity of ketoconazole recovered with the quantity of the initial weighted ketoconazole (Eq. 2).

$$EE(\%) = 100 \left( \frac{NCK - NCO}{NCK} \right) \text{ Eq.2}$$

## **2.5 Preparation of dilutions used in the microbiological assay**

A stock solution (1600 µg/mL) of ketoconazole (Embrafarma, Sao Paulo, Brazil) was prepared in dimethylsulfoxide (DMSO; Vetec, Brazil) and then a 32 µg/mL working solution was prepared (KS) from which dilutions were made in RPMI 1640 medium (HiMedia, Mumbai, India) and buffered to pH 7.0 with 0.165 M morpholinopropanesulfonic acid (MOPS, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) to give concentrations ranging from 0.0313 to 16 µg/mL of ketoconazole. At the time of assay, the KN was diluted in sterile distilled water to obtain the same concentration as KS (32 µg/mL).

## **2.6 Antifungal susceptibility testing**

The susceptibility profile of the yeasts was determined in triplicate by the broth microdilution technique according to the document M27-A3 of the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI 2008) with some modifications as described below. Furthermore, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by visual analysis and reading on UV-Visible Spectrophotometer at 570 nm (EnVision® Microplate Reader) after 42 h incubation at 35°C. For confirmation of the MIC of the KN, resazurin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) was used at 0.01% according to Nateche et al. (2006), adapted to yeast.

The isolates of *Candida* were subcultured on Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol and maintained at 32°C for 24h. The suspension of the inoculum was prepared in sterile saline (0.85%) to reach turbidity equivalent to 0.5 McFarland scale ( $1.5 \times 10^6$  CFU/mL). The final solution of the inoculum was diluted in RPMI-MOPS, yielding a final concentration from  $1 \times 10^3$  to  $5 \times 10^3$  CFU/mL.

The assay was performed in sterile 96-well U-bottom microplates that were

incubated at 35°C for 42 h. The MIC was defined as the lowest drug concentration able to inhibit 50% of fungal growth compared to the antifungal-free control. These tests included a control free of micro-organisms (sterility control) and an antifungal-free control (growth control).

After reading the MIC and before application of resazurin, we performed the minimum fungicidal concentration (MFC) test (Denning et al. 1992). A 20  $\mu$ L aliquot from the wells in which we determined the MIC and two concentrations immediately more concentrated, as well as control growth of micro-organisms, was subcultured in Petri dishes containing Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol and devoid of any antifungal, and incubated at 35°C for 24 h. MFC was designated as the minimum concentration at which there was no visible growth (100% inhibition) of the fungi tested based on the growth of the controls.

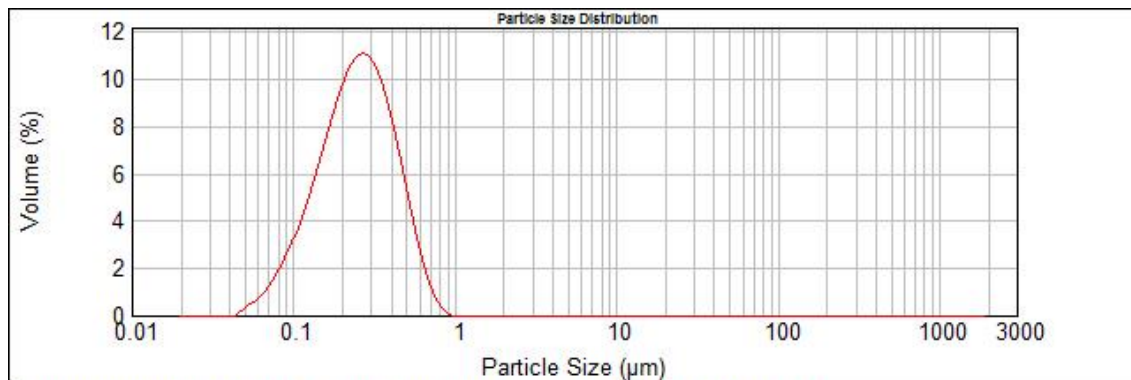
After incubation for 42 h, 20  $\mu$ L of the resazurin working solution was added to each well; the plates were incubated for 6 h at 35°C and the results were read visually. A change in colour of the resazurin from blue to pink indicated reduction of the indicator and, thus, fungal growth that was compared to the colour change observed in the column of the positive control growth.

### **3. Results**

The validation of the assay method showed linearity, accuracy and specificity in the range of 5 to 50  $\mu$ g/mL ( $r^2 = 0.9988$ ). The average size obtained for the KN was 206 nm showing size distribution with SPAN of 1.427 nm, while the CN values were 171 nm and 1.555 nm, respectively. A graph for particle size distribution of KN is shown in Figure 1. Moreover, the KN showed a good dispersity (Figure 1). The zeta potential was -13.3 mV for KN and -11.1 mV for CN. The percent recovery obtained was 106.18



$\pm 1.37\%$ , drug content was  $0.41 \text{ mg/mL} \pm 0.05$  and EE was  $86.35\%$ .



**Figure 1. Size distribution profile of ketoconazole nanoparticles containing 0.41 mg/mL of the drug (KN) performed by a laser particle size analyzer.**

Nanoencapsulation reduced the MIC in all the isolates evaluated in the study (Table 1). Among these, the most susceptible to the KN formulation was *Candida albicans* (COM12) with a MIC of  $0.0313 \text{ µg/mL}$ , while for KS the MIC was  $8 \text{ µg/mL}$ , consequently demonstrating an 8 dilution steps decrease in the MIC by nanoencapsulation. Similarly, the reduction in the MIC for the nanoencapsulated drug in comparison with the free drug for fungal isolates of *C. tropicalis* with the references CO102A, CO94P and CO72A was 4, 3 and 2 dilutions, respectively. The geometric means of MICs and MIC ranges of the formulations tested are shown in Table 1. Among the formulations evaluated, the KN showed interesting results since it had the lowest geometric mean ( $0.21 \text{ µg/mL}$ ).

**Table 1. *In vitro* antifungal susceptibility of the ketoconazole solution (KS) and ketoconazole nanocapsules (KN) against different clinical isolates of *Candida* spp.**

Isolates	Antifungal agents ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	Ketoconazole solution (KS)		Ketoconazole nanocapsules (KN)	
	MIC <sup>1</sup>	MFC <sup>2</sup>	MIC <sup>1</sup>	MFC <sup>2</sup>
<i>Candida albicans</i> (CO M12)	8	16	0.0313	>16
<i>Candida tropicalis</i> (CO 72A)	8	16	2	>16
<i>Candida tropicalis</i> (CO 94P)	4	>16	0.5	>16
<i>Candida tropicalis</i> (CO 102A)	1	>16	0.0625	>16
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019)	0.0625	ND	ND	ND
GM <sup>3</sup>	4	16	0.21	16
Range	1-8	16 to >16	0.0313-2	>16

<sup>1</sup>MIC: minimum inhibitory concentration; <sup>2</sup>MFC: minimum fungicidal concentration;

<sup>3</sup>GM: geometric mean; ND: not determined.

#### 4. Discussion

In the present work, poly- $\epsilon$ -caprolactone nanocapsules containing ketoconazole were developed by means of the interfacial deposition of a preformed polymer. Different alternatives have been found in literature for the delivery of ketoconazole using nanotechnological formulations, for example, solid lipid nanoparticles (Souto and Müller 2005; Venishetty et al. 2011; Ramasamy et al. 2012), nanostructured lipid carriers (Souto and Müller 2005), and a surfactant-based nanovesicular system for ophthalmic use (Kakkar and Kaur 2011). However, no work has been found on the web of science exploring the possibility of ketoconazole vectorization in poly- $\epsilon$ -caprolactone nanocapsules, since a vast majority of studies were conducted *in vivo* and evaluated with other types of nanostructures, mainly for topical or ophthalmic

application purposes (Souto and Müller 2005; Mudshinge et al. 2010; Kakkar and Kaur 2011; Ramasamy et al. 2012). Polymeric nanoparticles show a number of advantages over traditional formulations, such as greater stability and ability of controlled degradation in the body, in addition to being produced by quicker, simpler methods, when compared with other types of nanoparticles (Reis et al. 2006). Regarding the choice of polymer, poly- $\epsilon$ -caprolactone has been one of the most widely used due to its biocompatibility and biodegradability (Schaffazick et al. 2002; Reis et al. 2006).

As for physical and chemical characteristics, the nanocapsules in the present study showed homogeneous size distribution (Figure 1), as demonstrated in previous works (Souto and Müller 2005; Ramasamy et al. 2012). However, despite EE being around 86.35% after the formulation preparation, this finding in the study is in agreement with the recent work by Ramasamy et al. (2012) in which EE was 82-92%. By and large, the formulations prepared with PCL showed a milky, opaque appearance, particle diameter between 100 and 300 nm and negative zeta potential (-13.3 mV), which is similar to other studies (Souto and Müller 2005; Venishetty et al. 2011; Ramasamy et al. 2012), suggesting, thus, that the negative potential could be related to the characteristics and amount of the polymer present in the nanocapsules (Kulkamp et al. 2009; Bender et al. 2012).

Additionally, several studies suggest the use of nanotechnology as an alternative to avoid problems associated with the current treatment, namely, low therapeutic rate, adverse effects and development of resistance (White et al. 1998; Mudshinge et al. 2010). Kakkar and Kaur (2011) demonstrated that systems containing ketoconazole nanovesicles showed corneal permeation twice as high as did other formulations under study. According to Ramasamy et al. (2012), the development of a hydrogel enriched

with solid lipid nanoparticles of ketoconazole was shown to be a promising candidate to treat cutaneous candidiasis.

In the present study, the susceptibility to ketoconazole of two *Candida* species often associated with candidiasis, *C. albicans* and *C. tropicalis*, was evaluated through the broth microdilution method. The MICs of KN against *Candida* spp. ranged from 0.0313 to 2.0  $\mu\text{g/mL}$  (Table 1). Based on the results shown in this study, an increase in the *in vitro* activity of KN is suggested in comparison with KS due a decrease of 8 dilutions in the MIC for *C. albicans* followed by *C. tropicalis*. Among the yeasts under study, *C. albicans* stood out for showing high pathogenicity and being associated with biofilm formation, which may make treatment with antimicrobials, such as azolic agents, harder (Miceli et al. 2011). Furthermore, the MFCs found in the study both for KS and for KN confirmed the need for high concentrations of this drug to attain a fungicidal effect.

Nanoencapsulation has drawn a lot of attention in the past years, as it has shown to be viable for other drugs and a number of substances with therapeutic potential. For instance, the study by Pandey et al. (2005) showed that other nanoencapsulated azolic antifungal agents had better biodistribution and pharmacokinetics in the body of experimental animals, suggesting, thus, greater control over its release compared with conventional drugs. Rabinow et al. (2007) demonstrated that nanosystems containing itraconazole provided an increase in *in vivo* efficacy when assessed in rats infected with itraconazole-resistant strains of *C. albicans*. Jung et al. (2009) found that lipid nanoparticle formulations of amphotericin B and liposomal amphotericin B showed better *in vitro* activity against *C. albicans* than the drug solution in dimethylsulfoxide or when this was combined with sodium deoxycolate. Recently, Italia et al. (2011)

reported a formulation of amphotericin B (AmfB) nanoparticles with comparable or better antifungal activity upon oral administration than commercial AmfB products. The formulation at the total dose of 20 mg/kg caused 2.14 logs reduction in fungal burdens in the lungs of neutropenic mice infected with *A. fumigatus* in an invasive model (Italia et al. 2011). Jung et al. (2009) also found that the therapeutic effectiveness of AmfB Poly(ethylene glycol) lipid nanoparticles was comparable with or higher than Ambisome® when these were evaluated in an animal infection model with *A. fumigatus*.

Other substances with antifungal properties were also nanoencapsulated. Garg and Singh (2011) demonstrated an increase in the *in vivo* antifungal activity of eugenol when this was evaluated in the form of lipid nanoparticles using an oral candidiasis model in immunosuppressed experimental animals. According to these authors, the nanoparticles were able to protect the volatile oil from oxidative degradation; however, the *in vitro* activity of eugenol was not affected after encapsulation (Garg and Singh 2011). According to Panacek et al. (2009), silver nanoparticles were effective in the growth inhibition of pathogenic isolates of *Candida* spp. from inpatients in a hospital in the Czech Republic. Meanwhile, He et al. (2011) found that ZnO nanoparticles at higher concentrations than 3 mmol.L<sup>-1</sup> and of submicrometric size enabled the growth inhibition of two major phytopathogens, suggesting, thus, their application as a powerful fungicidal agent in agriculture.

However, to the best of our knowledge, this is the first report concerning the enhancing of ketoconazole *in vitro* activity by means of nanoencapsulation. The mechanisms accounting for the difference in the antimicrobial activity of ketoconazole-loaded polymeric nanocapsules in comparison with the solution drug, as could be

observed in our study, still need to be elucidated. This effect can be related to the stabilization by polymers, as suggested by Panacek et al. (2009), who studied the antifungal activity of silver nanoparticles. On the other hand, according to Patel et al. (2010), the decreased nanoparticle size and the water solubility profile could confer to these systems an increased contact with fungal cells, facilitating, thus, the rapid internalization of the drug.

Espuelas et al. (2002) showed that the association of AmfB with PCL nanospheres coated with surfactant (poloxamer 188) also improved the leishmanicidal action of the drug, suggesting, thus, that this association could increase the ability of the drug to interact with ergosterol, its target in the cell membrane. Therefore, as illustrated by the findings of the authors mentioned above (Espuelas et al. 2002) and based on the results observed in the present study, we suggest that PCL nanocapsules could increase the effect of ketoconazole, improving its permeability in the fungal cell membrane, which would explain the difference in the activity of the two formulations investigated in the present study.

The technique used in the preparation of KN demonstrated high encapsulation efficiency (>80%), simplicity and narrow particle size distribution. Finally, the results indicate that ketoconazole loaded in PCL nanocapsules offered advantageous properties, especially a decrease in the effective dose of the drug, and that these nanoparticles showed greater *in vitro* antifungal effect against *Candida* spp. than free ketoconazole by the CLSI broth dilution method.

## 5. Conclusions

In general, the nanoencapsulation of ketoconazole enabled a decrease in the MIC for all *Candida* spp. isolates analyzed in this study. In addition, the results showed a difference in the susceptibility profile between the assessed species, confirming the importance of these tests, especially to help healthcare professionals in the management of these infections. The results obtained in the study demonstrate the possibility of delivering ketoconazole in polymeric nanocapsules with a reduction in the effective dose of the drug. The increase in antifungal activity through encapsulation points to the development of new formulations in the treatment of infections caused by *C. albicans* and *C. tropicalis*.

## Conflicts of interest

There are none.

## Acknowledgements

The authors thank the financial support from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul).

## References

Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J* 2002;78:455-459.

Bender EA, Adorne MD, Colomé LM, Abdalla DSP, Guterres SS, Pohlmann AR. Hemocompatibility of poly( $\epsilon$ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. *Int J Pharm* 2012;

426:271-279.

Blignaut E, Messer S, Hollis RJ, Pfaller MA. Antifungal susceptibility of South African oral yeast isolates from HIV/AIDS patients and healthy individuals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 44:169–174.

Bremenkamp RM, Caris AR, Jorge AOC, Back-Brito GN, Mota AJ, Balducci I, Brighenti FL, Koga-Ito CY. Prevalence and antifungal resistance profile of *Candida* spp. oral isolates from patients with type 1 and 2 diabetes mellitus. *Arch Oral Biol* 2011;56:549-555.

Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard*. Third edition. Wayne: CLSI; 2008. [CLSI document M27-A3].

Denning DW, Hanson LH, Perlman AM, Stevens DA. *In vitro* Susceptibility and Synergy Studies of *Aspergillus* Species to Conventional and New Agents. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1992;15:21-34.

Denning DW, Hope WW. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. *Trends Microbiol* 2010;18(5):195-204.

Espuelas MS, Legrand P, Loiseau PM, Bories C, Barratt G, Irache JM. In Vitro Antileishmanial Activity of Amphotericin B Loaded in Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) in



Nanospheres. *J Drug Target* 2002;10(8):593–599.

Fessi H, Puisieux F, Devissaguet J-Ph, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm* 1989;55:R1-R4.

Garg A, Singh S. Enhancement in antifungal activity of eugenol in immunosuppressed rats through lipid nanocarriers. *Colloids Surf., B* 2011;87:280-288.

He L, Liu Y, Mustapha A, Lin M. Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Microbiol Res* 2011; 166:207-215.

Italia JL, Sharp A, Carter KC, Warn P, Kumar MNVR. Peroral Amphotericin B Polymer Nanoparticles Lead to Comparable or Superior *In Vivo* Antifungal Activity to That of Intravenous Ambisome<sup>®</sup> or Fungizone<sup>™</sup>. *Plos One* 2011;6(10):e25744.

Jung SH, Lim DH, Jung SH, Lee JE, Jeong K, Seong H, Shin BC. Amphotericin B-entrapping lipid nanoparticles and their in vitro and in vivo characteristics. *Eur J Pharm Sci* 2009;37:313-320.

Junqueira JC, Vilela SFG, Rossoni RD, Barbosa JO, Costa ACBP, Rasteiro VMC, Suleiman JMAH, Jorge AOC. Oral colonization by yeasts in HIV-positive patients in Brazil. *Rev Inst Med Trop* 2012;54(1):17-24.

Kakkar S, Kaur IP. Spanlastics-A novel nanovesicular carrier system for ocular delivery. *Int J Pharm* 2011;413:202-210.

Kanis LA, Prophiro JS, Vieira ES, Nascimento MP, Kulkamp-Guerreiro IC, Silva OS. Larvicidal activity of *Copaifera* sp. (Leguminosae) oleoresin microcapsules against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Parasitol Res* 2011;1:1-4.

Kulkamp IC, Paese K, Guterres SS, Pohlmann AR. Estabilização do ácido lipóico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. *Quim Nova* 2009;32:2078-2084.

Martinez R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. *J Bras Pneumol* 2006;32(5):449-60.

Miceli MH, Díaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis* 2011;11:142-51.

Moreira de Oliveira MS, Mikami Y, Miyaji M, Gabas R, Moretti ML. Determinação da frequência de *Candida* spp na cavidade oral de pacientes graves internados no Hospital de Clínicas – Unicamp, através de testes fenotípicos. *Rev Panam Infectol* 2006;8(4):16-20.

Mudshinge SR, Deore AB, Patil S, Balghat SM. Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery. *SPJ* 2010;19:129-141.

Nateche F, Martin A, Baraka S, Palomino JC, Khaled S, Portaels F. Application of the resazurin microtitre assay for detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Algiers. *J Med Microbiol* 2006;55:857-860.

Panacek A, Kolar M, Vecerova R, Pucek R, Soukupova J, Krystof V, Hamal P, Zboril R, Kvitek L. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* 2009;30:6333-6340.

Pandey R, Ahmad Z, Sharma S, Khuller GK. Nano-encapsulation of azole antifungals: Potential applications to improve oral drug delivery. *Int J Pharm* 2005; 301:268–276.

Patel NR, Damann K, Leonardi C, Sabliov CM. Itraconazole-loaded poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles for improved antifungal activity. *Nanomedicine (Lond)* 2010;5(7):1037-1050.

Pinto PM, Weikert-Oliveira RCB, Lyon JP, Cury VF, Arantes RR, Koga-Ito CY, Resende MA. In vitro antifungal susceptibility of clinical isolates of *Candida* spp. obtained for patients with different predisposing factors to candidosis. *Microbiol Res* 2008;163:579-585.

Rabinow B, Kipp J, Papadopoulos P, Wong J, Glosson J, Gass J, Sunc C, Wielgos T, White R, Cook C, Barker K, Wood K. Itraconazole IV nanosuspension enhances efficacy through altered pharmacokinetics in the rat. *Int J Pharm* 2007;339:251–260.

Ramasamy T, Khandasami US, Ruttala H, Shanmugam S. Development of Solid Lipid Nanoparticles Enriched Hidrogels for Topical Delivery of Anti-fungal Agent. *Macromol Res* 2012;20(7):682-692.

Reis CP, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine* 2006;2:8-21.

Schaffazick SR, Pohlmann AR, De Lucca Freitas L, Guterres SS. Caracterização e Estudo de Estabilidade de Suspensões de Nanocápsulas e de Nanoesferas Poliméricas Contendo Diclofenaco. *Acta Farm Bonaerense* 2002;21(2):99-106.

Souto EB, Müller RH. SLN and NLC for topical delivery of ketoconazole. *J Microencapsul* 2005;22(5):501-510.

Venishetty VK, Parikh N, Sistla R, Ahmed FJ, Diwan PV. Application of Validated RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Docetaxel and Ketoconazole in Solid Lipid Nanoparticles. *J Chromatogr Sci* 2011;49(2):136-141.

White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, Cellular and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. *Clin Microb Rev* 1998;11(2):382-402.