

Pedro Fernandes Barbosa

**Potencial antifúngico do composto CTP, contendo cobre(II)  
coordenado a 1,10-fenantrolina e teofilina, sobre espécies  
de *Candida não-albicans* resistentes ao fluconazol**



**Monografia apresentada ao Instituto de  
Microbiologia Paulo de Góes (IMPG), da  
Universidade Federal do Rio de Janeiro  
(UFRJ), como pré-requisito para obtenção  
do título de Bacharel em Ciências  
Biológicas: Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
RIO DE JANEIRO

2022

**Projeto de pesquisa realizado no Laboratório de Estudos Avançados de Microrganismos Emergentes e Resistentes (LEAMER), no Departamento de Microbiologia Geral, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG), sob a orientação do Professor Doutor André Luis Souza dos Santos e sob a coorientação da doutoranda Heloisa Freire Frota.**

## FICHA CATALOGRÁFICA

### CIP - Catalogação na Publicação

B238p      Barbosa, Pedro Fernandes  
Potencial antifúngico do composto CTP, contendo cobre(II) coordenado a 1,10-fenantrolina e teofilina, sobre espécies de *Candida* não-albicans resistentes ao fluconazol / Pedro Fernandes Barbosa. -- Rio de Janeiro, 2022.  
73 f.

Orientador: André Luis Souza dos Santos.  
Coorientadora: Heloisa Freire Prota.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. Infecções fúngicas. 2. *Candida*. 3. Compostos de coordenação. 4. 1,10-fenantrolina. 5. Teofilina.  
I. Santos, André Luis Souza dos, orient. II. Prota, Heloisa Freire, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

### INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

#### ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

ALUNO: **Pedro Fernandes Barbosa**

DRE: 119045660

BANCA EXAMINADORA: Profa. Fernanda de Ávila Abreu (Presidente)

Dra. Lucimar Ferreira Kneipp

Dra. Lívia de Souza Ramos

Profa. Daniela Sales Alviano (Suplente)

Título da Monografia: **“Potencial antifúngico do composto CTP, contendo cobre(II) coordenado a 1,10-fenantrolina e teofilina, sobre espécies de *Candida não-albicans* resistentes ao fluconazol”**

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/fis-sswx-yom>

Data e hora de início: **15 de dezembro de 2022 às 10:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 15 de dezembro de 2022.


NOTA Banca Examinadora:

10,0 Profa. Fernanda de Ávila Abreu

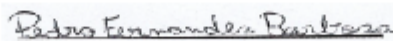
10,0 Dra. Lucimar Ferreira Kneipp

10,0 Dra. Lívia de Souza Ramos


Presidente da banca

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Fernanda de Ávila Abreu


Aluno:

  
\_\_\_\_\_  
Pedro Fernandes Barbosa

Orientador:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. André Luis Souza dos Santos/ Coorientador: M.Sc. Heloisa Freire Frota

Coordenador  
de TCC

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

## AGRADECIMENTOS

A minha família, meus pais Robson e Mara e a minha irmã Joana, que sempre foram minha base, me apoiando emocionalmente quando preciso. Meus pais sempre ressaltaram o importante poder que a educação proporciona na vida das pessoas e, juntamente com minha irmã, sempre me incentivaram e acreditaram em mim. Obrigado por sempre me apoiarem em minhas escolhas, só cheguei até aqui graças à diferença que vocês fazem em minha vida.

Ao meu orientador André, uma pessoa que sempre nos estimula a melhorar em todos os sentidos. Agradeço imensamente por ter acreditado em mim e aceitado me orientar durante essa jornada única que foi a graduação para o meu crescimento. Sou muito grato pela oportunidade de integrar o laboratório e por ser orientado por alguém que não só é um excelente profissional, mas que também sempre me deixou à vontade nos momentos de convívio social e pessoal. Obrigado pela qualidade do seu processo de orientação e de todo reflexo que ele proporcionou para o meu crescimento.

A Marta, que teve papel fundamental na minha formação. Obrigado por despertar o meu interesse científico durante a graduação. Foi graças a você que comecei meu estágio no LEAMER, o que faz desse projeto uma consequência direta de uma influência positiva de uma professora sobre seu aluno. Sempre acreditei no importante papel de formação que um professor exerce em seus alunos e hoje tenho um exemplo concreto disso. Obrigado também por todo convívio e ajuda no dia a dia do laboratório.

A minha coorientadora Heloísa, obrigado por tudo que você sempre me ensinou durante todo esse tempo de graduação. Sou muito grato por todo o convívio diário com você desde a minha entrada ao laboratório, quando ainda não tinha ideia de como um laboratório funcionava na prática. Você sempre esteve ali me acompanhando nos experimentos, sempre com uma paciência imensa em me dar qualquer explicação ou em corrigir resumos e apresentações. Se hoje cheguei até aqui, é porque você desempenhou papel crucial na minha formação.

A todos os membros e ex-membros do LEAMER. Agradeço pelo convívio diário, pela boa disposição de todos em sempre ajudar e pelo impacto profissional que vocês tiveram na minha jornada. Todos são pessoas excelentes, obrigado por todas as risadas e por fazerem meus

dias mais leves. Em especial, agradeço as amizades mais próximas que fiz no laboratório e que espero levar para o resto da vida: Eduardo, Joice, Luca, Rafaela, Iuri e Giovanini.

A minha família da graduação: Athirson, Eduardo, Isabela, Matheus, Ralice, Renan, Stefanie e Vinicius. Obrigado por todo o acolhimento, ajuda, amizade, risadas e convivência durante essa jornada que foi a graduação. Contar com a amizade de vocês sempre foi um ponto crucial durante esse tempo e espero que continuemos juntos ao longo da vida.

As agências brasileiras que financiaram este estudo CNPq, FAPERJ e CAPES.

Ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes.

## RESUMO

PEDRO FERNANDES BARBOSA

### POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO COMPOSTO CTP, CONTENDO COBRE(II) COORDENADO A 1,10-FENANTROLINA E TEOFILINA, SOBRE ESPÉCIES DE *Candida não-albicans* RESISTENTES AO FLUCONAZOL

**Orientador:** André Luis Souza dos Santos

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Infecções ocasionadas por espécies de *Candida não-albicans* vem aumentando ao longo das últimas décadas, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Tais espécies apresentam resistência considerável aos antifúngicos padrões utilizados na clínica médica, como fluconazol e anfotericina B. Mediante a isto, a síntese de compostos de coordenação contendo metais de transição, quando ligados a 1,10-fenantrolina e moléculas biologicamente relevantes como a teofilina, oferece uma oportunidade de obter compostos com propriedades físico-químicas e biológicas mais desejáveis. Tais compostos possuem mecanismo de ação diferenciado dos compostos azólicos e dos poliênicos, além de uma promissora atividade anti-*Candida*, sendo uma alternativa para o tratamento de cepas resistentes aos antifúngicos clássicos. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica do composto de coordenação CTP [Cu(theo)<sub>2</sub>(phen)(H<sub>2</sub>O).5H<sub>2</sub>O], contra isolados clínicos de seis diferentes espécies de *Candida não-albicans* resistentes ao fluconazol, levando-se em consideração parâmetros como o crescimento planctônico, aspectos da biologia celular e a produção de biofilme. Os resultados obtidos demonstraram que o composto foi capaz de inibir o crescimento celular das espécies em concentrações variando de 7,81 a 62,5 µg/mL. CTP também gerou impacto relevante em diferentes parâmetros da biologia celular das espécies do gênero *Candida*, tais como a integridade da membrana plasmática, a atividade metabólica mitocondrial e a produção de espécies reativas de oxigênio. Além disso, o CTP apresentou um caráter inibitório promissor em relação aos processos de formação de biofilme e desarticulação de biofilme maduro, sendo principalmente evidenciado no tratamento das espécies *C. haemulonii* e *C. auris*, duas espécies conhecidas como resistentes a múltiplas drogas. Por último, os ensaios de infecção com modelos *in vivo* de *Galleria mellonella* demonstraram uma boa tolerância ao composto, uma vez que mesmo nas concentrações mais elevadas (31,25 a 250 µg/mL) todas as larvas sobreviveram durante um período de 120 horas de infecção. Mediante a isto, o

desenvolvimento do presente projeto permitiu averiguar o potencial antifúngico do composto CTP, visando o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de infecções ocasionadas por espécies de *Candida não-albicans* resistentes aos tratamentos convencionais.

**Palavras-chaves:** Infecções fúngicas; *Candida*; biofilme; compostos de coordenação; 1,10-fenantrolina; teofilina;



## ABSTRACT

PEDRO FERNANDES BARBOSA

### ANTIFUNGAL POTENTIAL OF THE COMPOUND CTP, CONTAINING COPPER(II) COORDINATED TO 1,10-PHENANTHROLINE AND THEOPHYLLINE, ON NON-*albicans Candida* SPECIES RESISTANT TO FLUCONAZOLE

**Advisor:** André Luis Souza dos Santos

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Infections caused by non-*albicans Candida* species have been increasing over the last few decades, mainly in immunocompromised patients. Such fungal species have considerable resistance to available antifungals used in the clinical medicine, such as fluconazole and amphotericin B. Based on these premises, the synthesis of coordination compounds containing transition metals, when linked to 1,10-phenanthroline and biologically relevant molecules such as theophylline, offers an opportunity to obtain compounds with more desirable physicochemical and biological properties. Such compounds have a different mechanism of action from azole and polyene compounds, in addition to promising anti-*Candida* activity, being an alternative for the treatment of strains resistant to classic antifungal agents. Thus, the present study aimed to evaluate the antifungal activity of the coordination compound CTP [Cu(theo)<sub>2</sub>(phen)(H<sub>2</sub>O).5H<sub>2</sub>O], against clinical isolates of six different non-*albicans Candida* species resistant to fluconazole, taking into account parameters such as planktonic growth, aspects of cell biology and biofilm production. The results showed that the compound CTP was able to inhibit the cell growth of the *Candida* species in concentrations ranging from 7.81 to 62.5 µg/mL. CTP also had a relevant impact on different parameters of cell biology of *Candida* species, such as plasma membrane integrity, mitochondrial metabolic activity and production of reactive oxygen species. In addition, CTP showed a promising inhibitory character in relation to the processes of biofilm formation and disarticulation of mature biofilms, being mainly evidenced in the treatment of *C. haemulonii* and *C. auris*, two species known to be resistant to multiple drugs. Finally, infection assays using the *in vivo* model of *Galleria mellonella* showed good tolerance to the compound, since even at the highest concentrations (31.25 to 250 µg/mL) all of the larvae survived during a period of 120 hours of infection. Collectively, the

development of the present project allowed to verify the antifungal potential of the CTP compound, aiming at the development of new drugs for the treatment of infections caused by non-*albicans* *Candida* species resistant to conventional treatments.

**Keywords:** Fungal infections; *Candida*; biofilm; coordination compounds; 1,10-phenanthroline; theophylline;

## RESUMO PARA LEIGOS

PEDRO FERNANDES BARBOSA

### POTENCIAL ANTIFÚNGICO DO COMPOSTO CTP, CONTENDO COBRE(II) COORDENADO A 1,10-FENANTROLINA E TEOFILINA, SOBRE ESPÉCIES DE *Candida não-albicans* RESISTENTES AO FLUCONAZOL

**Orientador:** André Luis Souza dos Santos

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Os fungos são organismos microscópicos presentes em diferentes ambientes, assim como em animais e nos seres humanos. *Candida* é um gênero de fungo naturalmente encontrado em diferentes partes do organismo dos seres humanos. Esses microrganismos coexistem em nosso organismo de forma pacífica, sem nos causar danos, porém em situações de desequilíbrio, como problemas nos sistemas de defesas do corpo, essa harmonia pode ser afetada, resultando na doença conhecida como candidíase. As espécies do gênero *Candida* utilizam diferentes mecanismos para ter mais sucesso durante a infecção como, por exemplo, a formação de biofilme, que é uma estrutura complexa formada por várias células fúngicas com o objetivo de se proteger e tornar mais difícil sua eliminação. Além disso, nos últimos anos, tem sido observado um aumento no número de infecções causadas por diversos fungos pertencentes a este gênero, acompanhado de um aumento na resistência dos mesmos frente aos medicamentos antifúngicos utilizados com mais frequência nos hospitais e centros de tratamento. Por isso, o desenvolvimento de novas moléculas com ação eficaz contra estes fungos, como a associação de compostos metálicos a moléculas biológicas, apresenta grande relevância para a área da saúde. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica de um novo complexo metálico denominado CTP, contra seis diferentes espécies de *Candida* resistentes ao antifúngico fluconazol. Com isso, os resultados obtidos neste projeto trazem informações relevantes sobre o novo composto CTP, evidenciando seus efeitos contra estes fungos, seus possíveis mecanismos de ação e a avaliação de sua toxicidade, visando o desenvolvimento de novas estratégias contra espécies do gênero *Candida* resistentes aos tratamentos atuais.

**Palavras-chaves:** Infecções fúngicas; *Candida*; biofilme; compostos de coordenação; 1,10-fenantrolina; teofilina;

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fatores-chave no desenvolvimento de processos de candidíase invasiva em pacientes hospitalizados em unidades de terapia intensiva .....	19
Figura 2 - Variações geográficas na distribuição de espécies do gênero <i>Candida</i> isoladas em hospitais e unidades de tratamento de diferentes países ao redor do mundo .....	21
Figura 3. Estrutura de um composto de coordenação.....	26
Figura 4. Estrutura do composto de coordenação [Cu(theo) <sub>2</sub> (phen)(H <sub>2</sub> O).5H <sub>2</sub> O] – CTP .....	29
Figura 5. Efeito de CTP sobre a integridade da membrana plasmática de espécies de <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> . .....	42
Figura 6. Efeito de CTP sobre a atividade mitocondrial de espécies do gênero <i>Candida</i> .....	43
Figura 7. Efeito de CTP na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em espécies do gênero <i>Candida</i> .....	44
Figura 8. Efeito de CTP sobre a adesão de espécies de <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> .. .....	46
Figura 9. Efeito de CTP sobre a viabilidade celular durante a formação de biofilmes de espécies de <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> .....	47
Figura 10. Efeito de CTP sobre a biomassa celular de espécies de <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> durante o processo de formação de biofilmes. ....	49
Figura 11. Efeito de CTP sobre a viabilidade celular de biofilmes pré-formados de espécies de <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> .....	50
Figura 12. Efeito de CTP sobre a biomassa celular em biofilmes pré-formados de espécies de <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> .....	52

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Taxas estimadas de incidência e mortalidade das doenças fúngicas invasivas mais frequentes que afetam os seres humanos.....	18
<b>Tabela 2.</b> Classes de drogas antifúngicas, alvos e principais perfis de resistência de espécies do gênero <i>Candida</i> frequentemente reportados na literatura.....	23
<b>Tabela 3.</b> Atividade antifúngica de fluconazol e do composto CTP contra espécies de <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> .....	40

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CTP – Composto de coordenação  $[\text{Cu}(\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_2)_2(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)].\text{H}_2\text{O}$

DCFHDA - diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína

DCF - diclorofluoresceína

DMSO - dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo (solvente)

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

EUA – Estados Unidos da América

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IMF – Intensidade Média de Fluorescência

PFA - Paraformaldeído

XTT - bromidrato de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)

## ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA .....	iii
AGRADECIMENTOS .....	v
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
RESUMO PARA LEIGOS.....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE TABELAS .....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	xiv
ÍNDICE.....	xv
1. INTRODUÇÃO .....	17
1.1. Infecções fúngicas.....	17
1.2. Gênero <i>Candida</i> e candidíase .....	18
1.3. Emergência e resistência de espécies de <i>Candida não-albicans</i> .....	21
1.4. Desenvolvimento de potenciais terapias antifúngicas: compostos metálicos.....	23
1.5. Ferramentas para a avaliação da eficácia e toxicidade de compostos com ação antimicrobiana: <i>Galleria mellonella</i> .....	29
2. JUSTIFICATIVA.....	32
3. OBJETIVOS.....	33
3.1. Objetivo Geral.....	33
3.2. Objetivos Específicos .....	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1. Compostos testes.....	34
4.2. Cepas microbianas e condições de cultivo .....	34
4.3. Teste de susceptibilidade ao antifúngico fluconazol .....	35
4.4. Ensaio de atividade antimicrobiana .....	35

4.5. Efeito do composto CTP sobre a integridade de membrana plasmática.....	36
4.6. Efeito do composto CTP sobre a atividade metabólica mitocondrial.....	36
4.7. Efeito do composto CTP sobre os níveis de estresse oxidativo intracelular.....	37
4.8. Efeito do composto CTP sobre a adesão celular a poliestireno .....	37
4.9. Efeito de CTP sobre o processo de formação de biofilme.....	37
4.9.1. Viabilidade celular (Quantificação da atividade mitocondrial) .....	38
4.9.2. Quantificação da biomassa.....	38
4.10. Desarticulação de biofilmes pré-formados .....	38
4.11. Toxicidade do composto CTP em larvas de <i>G. mellonella</i> .....	38
4.12. Análises estatísticas e interpretação dos resultados .....	39
5. RESULTADOS .....	40
5.1. Atividade antifúngica de Fluconazol e CTP sobre espécies de <i>Candida não-albicans</i> .	40
5.2 Efeito de CTP sobre a integridade da membrana plasmática .....	41
5.3. Efeito de CTP sobre a atividade metabólica mitocondrial.....	42
5.4. Efeito de CTP sobre a geração de EROs .....	43
5.5. Efeito de CTP sobre a adesão a substrato de poliestireno .....	45
5.6. Efeito inibitório de CTP sobre a viabilidade do biofilme .....	46
5.7. Efeito inibitório de CTP sobre a biomassa do biofilme.....	47
5.8. Efeito inibitório de CTP sobre a viabilidade do biofilme maduro.....	49
5.9. Efeito inibitório de CTP sobre a desarticulação da biomassa do biofilme maduro .....	50
5.10. Avaliação da toxicidade do composto de coordenação CTP em larvas de <i>G. mellonella</i> .....	52
6. DISCUSSÃO .....	53
7. CONCLUSÃO.....	61
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Infecções fúngicas

As infecções fúngicas têm se apresentado como um grave problema de saúde pública em virtude das elevadas taxas de morbidade e mortalidade apresentadas em todo o mundo (Hamdy *et al.*, 2016; Benedict *et al.*, 2017; Suleyman e Alangaden, 2021). Tais infecções vêm adquirindo maior relevância nos últimos anos proveniente de um crescimento significativo observado em suas incidências. Este aumento no número de doenças fúngicas pode sofrer influência de diferentes fatores, desde alterações do próprio patógeno, como o desenvolvimento de novos fatores de resistência e/ou virulência, fatores ambientais, como mudanças climáticas e o uso indiscriminado de substâncias químicas em produções agrícolas, além de mudanças associadas ao hospedeiro, principalmente por conta do crescimento no número de indivíduos imunossuprimidos, logo, mais susceptíveis a processos infecciosos em geral (Benedict *et al.*, 2017). O uso prolongado de antibióticos, processos de coinfeções com outros patógenos microbianos, extremos de idade, doenças imunossupressoras (como neutropenia e diabetes), tratamento quimioterápico para câncer, procedimentos médicos invasivos, destacam-se como algumas das causas relacionadas com este aumento no número de pacientes imunossuprimidos, tornando-os mais susceptíveis ao desenvolvimento de quadros de micoses sistêmicas (Castelli *et al.*, 2014; Hamdy, Zaoutis e Seo, 2016; von Lilienfeld-Toal *et al.*, 2021; Gandra *et al.*, 2020; Granato *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2022).

Estimativas do Ministério de Saúde Brasileiro, em 2016, apontam que mais de 3,8 milhões de pessoas sofram anualmente com alguma infecção fúngica grave (Giacomazzi *et al.*, 2016). Além disso, tais infecções causam um impacto econômico considerável, pois o custo hospitalar de um paciente é alto e o tempo de internação pode sofrer alterações ao longo do tratamento. Nos Estados Unidos da América, tal custo pode variar de 22 mil a valores superiores a 2 bilhões de dólares por ano (Hamdy, Zaoutis e Seo, 2016; Strollo *et al.*, 2017; Rayens, Norris e Cordero, 2022). Além deste impacto econômico, estudos apontam que a taxa de mortalidade global decorrente de infecções fúngicas invasivas corresponde a mais de 1,5 milhões de mortes anuais, sendo superior ao número de óbitos causados pela malária, e equivalente às taxas de morte causadas pelo HIV (Rayens e Norris *et al.*, 2022; Rayens, Norris e Cordero, 2022). Atualmente, estima-se que cerca de 1,7 bilhões de pessoas em todo o mundo sofram com algum tipo de infecção fúngica, sendo a maioria destas infecções superficiais de pele e mucosa,

capazes de afetar a qualidade de vida e o bem-estar dos indivíduos acometidos (Castelli *et al.*, 2014; Gow e Netea, 2016; Du, *et al.*, 2020; Rayens e Norris, 2022).

No estudo das infecções fúngicas invasivas, os fungos pertencentes aos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Pneumocystis* e *Histoplasma* são responsáveis por cerca de 80% a 90% destes processos infecciosos, com um maior destaque para as espécies *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Pneumocystis jirovecii* e *Cryptococcus neoformans* (**Tabela 1**). Contudo, nas últimas décadas, tem-se observado uma mudança neste perfil epidemiológico, potencializado pelo aumento da resistência a drogas antifúngicas por espécies fúngicas anteriormente suscetíveis (Pfaller e Diekema, 2010; Giacomazzi *et al.*, 2015; Gandra *et al.*, 2017; Firacative, 2020; Jenks *et al.*, 2020; Seagle, Williams e Chiller, 2021).

**Tabela 1.** Taxas estimadas de incidência e mortalidade das doenças fúngicas invasivas mais frequentes que afetam os seres humanos.

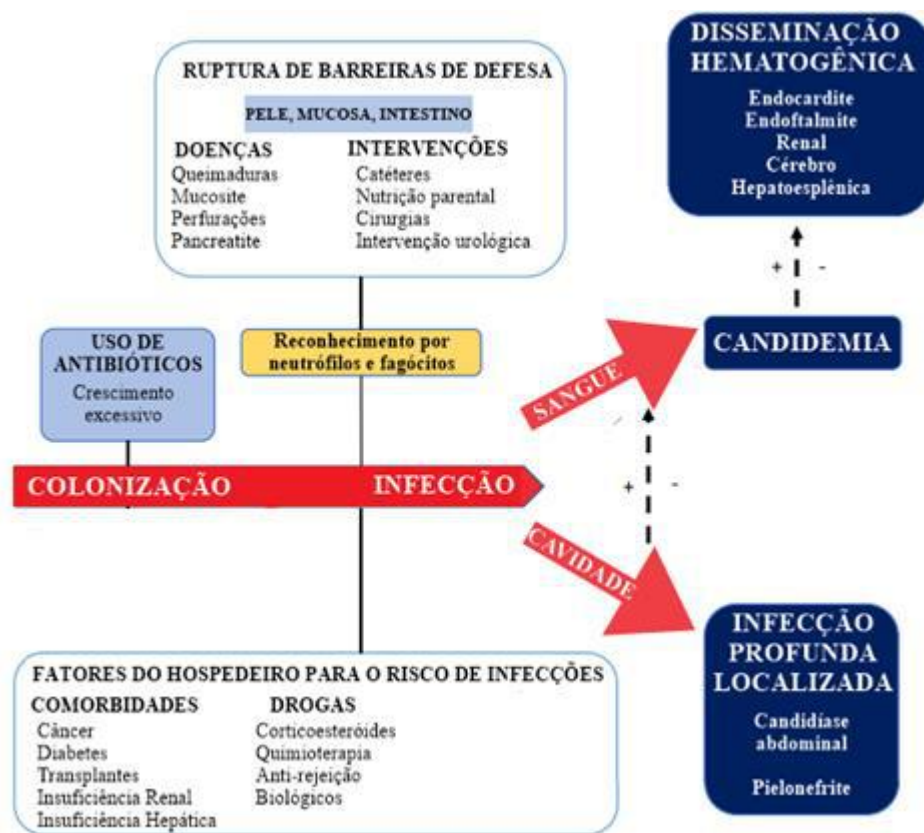
<b>Infecções fúngicas invasivas</b>	<b>Agente etiológico principal</b>	<b>Casos por ano</b>	<b>Taxa de mortalidade (%)</b>
<b>Candidíase invasiva</b>	<i>Candida albicans</i>	~ 750, 000	~ 40
<b>Aspergilose invasiva</b>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	> 300, 000	30-70
<b>Pneumonia por <i>Pneumocystis</i></b>	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	> 400, 000	10-60
<b>Meningite criptocócica</b>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	~ 225, 000	15-50
<b>Histoplasmose disseminada</b>	<i>Histoplasma capsulatum</i>	~ 100, 000	10-60
<b>Mucormicose</b>	<i>Rhizopus oryzae</i>	> 10, 000	35-100

Fonte: Firacative *et al.*, 2020.

## 1.2. Gênero *Candida* e candidíase

O gênero *Candida* faz parte da microbiota anfibiôntica humana e espécies pertencentes a este gênero são encontradas colonizando diferentes sítios do organismo de indivíduos saudáveis, tais como a pele e as superfícies mucosas da cavidade oral, do trato gastrointestinal e da vagina (Lagunes e Rello 2016; Hameed *et al.*, 2021). Entretanto, em situações de quebra da homeostase, como, por exemplo, no comprometimento da microbiota residente do hospedeiro pelo uso de antibióticos de amplo espectro, algumas espécies deste gênero são capazes de gerar doenças em seres humanos e, por isso, são classificadas como patógenos oportunistas, uma vez que tornam-se patogênicas em situações específicas em que ocorre um

desequilíbrio entre fungo-hospedeiro (Alves *et al.*, 2020). Logo, diversos fatores podem tornar indivíduos mais suscetíveis a estas infecções (**Figura 1**) como diabetes mellitus, insuficiência renal ou hepática, pancreatite, perfurações, queimaduras, nutrição parenteral, realização de hemodiálise, ventilação mecânica, uso de medicamentos imunossupressores, uso de cateter central, extremos de idade, administração de antibióticos de amplo espectro, processos de coinfeções, infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e cirurgias, especialmente abdominais (Kullberg e Arendrup, 2015; Mccarty e Pappas, 2015; Calandra *et al.*, 2016; Lagunes e Rello, 2016; Bongomin *et al.*, 2017; Muñoz *et al.*, 2020; Hameed *et al.*, 2021; Rayens, Norris e Cordero, 2022).



**Figura 1** - Fatores-chave no desenvolvimento de processos de candidíase invasiva em pacientes hospitalizados em unidades de terapia intensiva (adaptado de Logan, Martin-Loeches e Bicanic, 2020).

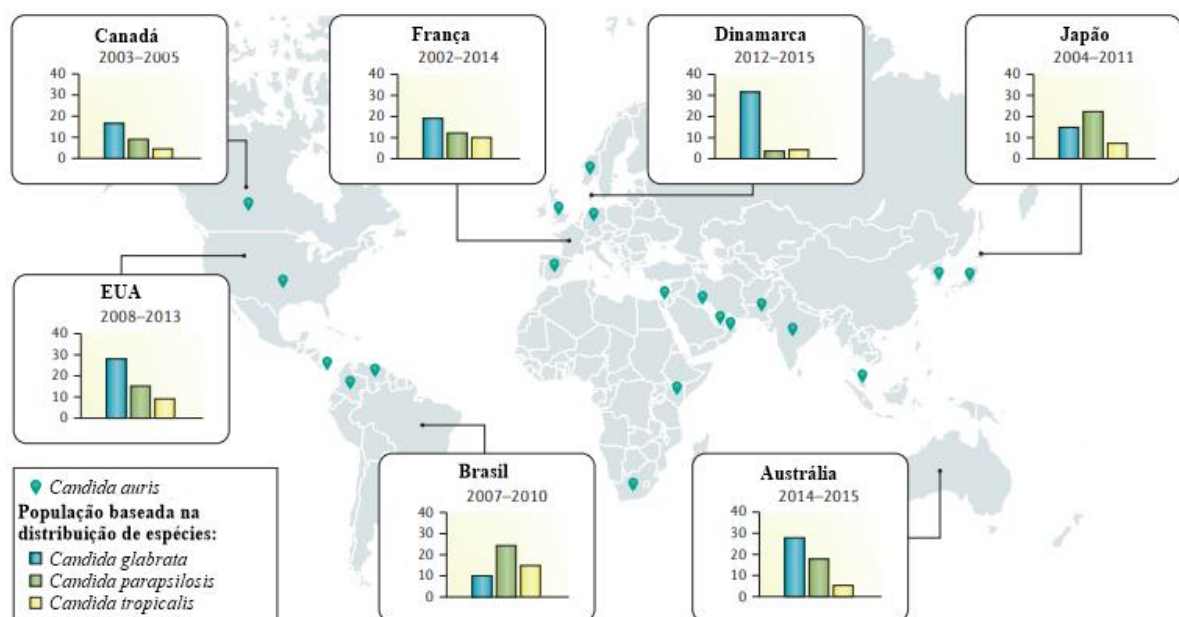
As infecções causadas pelas diferentes espécies de *Candida* são denominadas como candidíases. As manifestações clínicas de quadros de candidíase podem variar desde sintomas superficiais brandos como as infecções mucocutâneas, infecções do trato urinário, abscessos de pele relacionados à inserção de cateteres; até ao desenvolvimento de quadros de infecções sanguíneas e sistêmicas, denominadas como candidemias, que apresentam taxas de mortalidade

elevadas de 40% para estes casos (Brown *et al.*, 2012; Bongomin *et al.*, 2017; Du *et al.*, 2020; Firacative, 2020). As espécies pertencentes ao gênero *Candida* correspondem à principal causa de infecções fúngicas nosocomiais, sendo à quarta causa principal de todas as infecções adquiridas dentro do ambiente hospitalar (Du *et al.*, 2020). Por isso, pacientes submetidos a regimes de tratamento intensivo destacam-se como um grupo extremamente suscetível a esse tipo de infecção devido ao tempo prolongado de internação, a gravidade dos quadros clínicos apresentados e sua condição imunológica debilitada (Kullberg e Arendrup, 2015; Mccarty e Pappas, 2015; Calandra *et al.*, 2016; Lagunes e Rello, 2016; Gandra *et al.*, 2017; Du *et al.*, 2020).

Além disso, sabe-se que a patogenicidade das leveduras do gênero *Candida* está associada com uma grande variedade de fatores de virulência que influenciam em seu potencial infeccioso, tais como a secreção de enzimas hidrolíticas, dimorfismo, capacidade de adesão a superfícies bióticas ou abióticas e formação de biofilme (Liu *et al.*, 2016; Araújo *et al.*, 2017). Dentre esses fatores, a formação de biofilme tem impacto considerável na sobrevivência das espécies, visto que grande parte desses microrganismos é capaz de viver nesta configuração. Um biofilme consiste em uma comunidade de microrganismos aderida a uma determinada superfície, de material inerte ou tecido vivo, sendo revestidos/protegidos por uma matriz polimérica estrutural produzida pelas próprias células microbianas (Cavalheiro *et al.*, 2018). A formação de biofilme gera um impacto considerável na persistência das infecções, uma vez que protege o microrganismo de processos decorrentes da resposta imunológica do hospedeiro, como a fagocitose, além de conferir maior resistência à ação de drogas antifúngicas, visto que a produção da matriz extracelular é capaz de atuar como uma barreira à difusão de drogas, limitando a penetração das mesmas. Com base nisso, a capacidade de adesão a diferentes superfícies possibilita que esses microrganismos formem biofilmes em dispositivos médicos, como cateteres intravasculares, próteses, ou em diferentes tecidos do hospedeiro, tornando as infecções relacionadas à formação de biofilme uma problemática clínica complexa e significativa (Li e Lee, 2017; Dominguez *et al.*, 2019).

Dentre estas infecções, a espécie *C. albicans* é o principal agente etiológico do gênero *Candida* associado a quadros de candidíases invasivas nosocomiais ao redor do mundo, com taxas de mortalidade variando de 15% a 25% em adultos, sendo ainda a espécie mais frequentemente isolada em amostras clínicas de pacientes internados com quadro de candidemia (Calgin e Cetinkol, 2018). Contudo, nos últimos anos, têm-se observado uma diminuição na incidência de processos infecciosos pela espécie *C. albicans* em detrimento de um aumento preocupante na ocorrência de infecções causadas por espécies de *Candida* não-

*albicans*, tais como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. haemulonii* e, mais recentemente, *C. auris*. Essa prevalência no perfil das infecções por espécies de *Candida* não-*albicans* têm sido documentada em estudos epidemiológicos em diferentes países, onde a incidência na proporção de isolamento de tais espécies sofre variação conforme a região geográfica (**Figura 2**). Nos EUA, Canadá e em determinados países do norte da Europa, como a França e a Dinamarca, *C. glabrata* já se destaca como a segunda espécie mais prevalente do gênero *Candida*. Em contrapartida, em países do sul da Europa, da Ásia e da América Latina, como o Brasil, *C. parapsilosis* é a segunda espécie de maior incidência em pacientes com quadros de fungemias, sendo responsável por uma faixa percentual de 20% a 30% dos casos. Paralelamente, diversos surtos causados pela espécie *C. auris* foram relatados em países da Ásia, como o Japão e Índia, da Europa, como o Reino Unido e a França, na África, na Oceania e no continente americano, em países como os EUA, Canadá, Colômbia, Venezuela e, mais recentemente, no Brasil (Gonçalves *et al.*, 2010; Nucci *et al.*, 2010; Fortún *et al.*, 2012; Nunes, Batista e Pessoa, 2022).



**Figura 2** - Variações geográficas na distribuição de espécies do gênero *Candida* isoladas em hospitais e unidades de tratamento de diferentes países ao redor do mundo (Pappas *et al.*, 2018).

### 1.3. Emergência e resistência de espécies de *Candida* não-*albicans*

Diferentes grupos de pesquisa ao redor do mundo apontam que este processo de mudança no perfil micológico sofre influência de diversos fatores, tais como as mudanças

ambientais e climáticas, variações entre as regiões geográficas, condições fisiológicas e metabólicas dos pacientes e, principalmente, o aumento da resistência de tais espécies frente ao uso dos agentes antifúngicos, utilizados em grande escala em hospitais e centros de tratamento (Bassetti, Peghin e Timsit, 2016; Pappas *et al.*, 2018; Pristov e Ghannoum, 2019). A utilização prolongada de drogas antifúngicas e/ou antibacterianas também pode estimular um desequilíbrio na microbiota dos pacientes em tratamento, potencializando assim a colonização de espécies fúngicas e aumentando o risco de desenvolvimento de quadros de candidíases invasivas (Bohner, Papp e Gácsér, 2022). Dessa forma, este crescimento na incidência de infecções por espécies de *Candida* não-*albicans* pode estar fortemente vinculado à utilização inadequada das drogas antifúngicas disponíveis como opções terapêuticas na clínica médica, visto que diferentes padrões de resistência já foram observados em todas as espécies de relevância clínica pertencentes ao gênero *Candida*. Particularmente, a resistência aos compostos azólicos tem sido documentada de forma mais frequente, configurando um evento preocupante, visto que o fluconazol corresponde ao agente antifúngico mais comumente utilizado para profilaxia e tratamento de infecções pelo gênero *Candida* em hospitais públicos no Brasil e em outras partes do mundo (Arendrup *et al.*, 2013; Katragkou *et al.*, 2015; Bassetti, Peghin e Timsit, 2016; Pappas *et al.*, 2018; Pristov e Ghannoum, 2019; Liu *et al.*, 2021).

Nesse sentido, perfis de resistência as drogas antifúngicas já foram detectados em diferentes espécies clinicamente relevantes de *Candida* não-*albicans* (**Tabela 2**). A resistência de *C. tropicalis* ao fluconazol tem sido extensivamente relatada em análises literárias, onde o crescente uso global deste antifúngico se destaca como uma das principais causas para esta tendência dominante de resistência (Doi *et al.*, 2016; Rodríguez *et al.*, 2017; Zuza-Alves *et al.*, 2017; Murphy e Bicanic, 2021). Configurando um desafio altamente relevante para a clínica médica, *C. glabrata* apresenta suscetibilidade reduzida aos antifúngicos azólicos e, de forma mais recente, um perfil de resistência a fármacos das classes dos poliênos e das equinocandinas (Carolus *et al.*, 2020; Frías-De-León *et al.*, 2021; Tortorano *et al.*, 2021). *C. krusei* é classificada como uma espécie intrinsecamente resistente aos compostos azólicos, uma vez que cerca de mais de 95% de seus isolados clínicos e veterinários apresentam resistência a esta classe de antifúngicos e relatos de cepas resistentes à anfotericina B também já são reportados na literatura (Dagi *et al.*, 2016; Maraki *et al.*, 2019; Jamiu *et al.*, 2021; Murphy e Bicanic, 2021). De forma similar, dados presentes na literatura demonstram que as taxas de resistência ao fluconazol em isolados de *C. parapsilosis* são cinco vezes maiores na comparação com *C. albicans*, e esta espécie de *Candida* não-*albicans* apresenta ainda uma resistência intrínseca única a compostos da classe das equinocandinas (Neji *et al.*, 2017; Rybak *et al.*, 2017; Whaley

*et al.*, 2017; Pristov e Ghannoum, 2019; Roberto *et al.*, 2020). *C. haemulonii* constitui um desafio no que se refere ao tratamento, uma vez que tal espécie apresenta resistência aos antifúngicos clássicos mais comumente utilizados na clínica médica, como anfotericina B, voriconazol e fluconazol (Ramos *et al.*, 2015; Gandra *et al.*, 2017; Gandra *et al.*, 2020; Ramos *et al.*, 2020). Descrita pela primeira vez em 2009 no Japão, a espécie *C. auris* têm se tornando uma ameaça à saúde pública mundial, uma vez que apresenta resistência intrínseca a uma ou mais classes de antifúngicos e alguns isolados já são resistentes a representantes de todas as três principais classes de drogas antifúngicas, limitando severamente as opções terapêuticas disponíveis (Lockhart *et al.*, 2017; Spivak e Hanson, 2018; Hata *et al.*, 2019; Du *et al.*, 2020; Ramos *et al.*, 2022).

Como demonstrado, este aumento crescente da resistência por espécies de *Candida* não-*albicans* limita ainda mais a utilização de um número já escasso de drogas antifúngicas disponíveis atualmente (**Tabela 2**), visto que somente três principais classes de antifúngicos (azóis, poliênos e equinocandinas) são utilizadas como tratamento de primeira escolha na clínica médica para estas infecções (Khanina *et al.*, 2021; Murphy e Bicanic, 2021). Tal padrão de resistência faz com que o tratamento destas fungemias torne-se de difícil execução, sendo necessário o desenvolvimento de alternativas terapêuticas a fim de lidar com infecções causadas por espécies com tal perfil reduzido de susceptibilidade.

#### 1.4. Desenvolvimento de potenciais terapias antifúngicas: compostos metálicos

Nas últimas décadas, o uso extensivo e excessivo de drogas antifúngicas no tratamento de tais infecções têm proporcionado o aumento da resistência microbiana em uma ampla gama de espécies fúngicas (Santos *et al.*, 2017). Nesse sentido, há uma necessidade urgente na descoberta ou desenvolvimento de novas moléculas eficazes e seguras contra tais patógenos, que possuam espectro de ação distinto aos antifúngicos disponíveis na clínica médica (Enoch *et al.*, 2017; Khanina *et al.*, 2021). No entanto, o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas é de difícil execução e torna-se um desafio por uma série de razões como, por exemplo, a similaridade entre estruturas de células eucarióticas microbianas (principalmente fungos e protozoários) e células eucarióticas humanas, o que faz com que drogas tóxicas para estes microrganismos também sejam capazes de causar danos em tecidos e células de mamíferos (Silva *et al.*, 2018). Dadas as dificuldades no tratamento de infecções fúngicas invasivas, o redirecionamento de moléculas orgânicas e compostos bioativos com propriedades

antimicrobianas previamente caracterizadas, destacam-se como potenciais estratégias alternativas frente a esta problemática (Peyclit *et al.*, 2021).

**Tabela 2.** Classes de drogas antifúngicas, alvos e principais perfis de resistência de espécies do gênero *Candida* frequentemente reportados na literatura.

<b>Classe de antifúngicos</b>	<b>Alvo da droga</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Principais espécies com resistência reportada</b>
Azóis (fluconazol, voriconazol, itraconazol, posaconazol, isavuconazol)	Biossíntese de ergosterol (alvo molecular: 14- $\alpha$ -lanosterol demetilase)	Inibe a síntese de ergosterol, reduzindo sua presença na membrana fúngica e causando acúmulo de precursores de esteróis tóxicos	<i>C. glabrata</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. krusei</i> <i>C. haemulonii</i> <i>C. auris</i>
Polienos (anfotericina B, nistatina)	Membrana celular (alvo molecular: ergosterol)	Sequestra o ergosterol das membranas e induz a formação de poros, com extravasamento de íons. Induz aumento de moléculas reativas de oxigênio	<i>C. glabrata</i> <i>C. haemulonii</i> <i>C. krusei</i> <i>C. auris</i>
Equinocandinas (caspofungina, anidulafungina, micafungina)	Parede celular (alvo molecular: $\beta$ -1,3-glucano sintase)	Inibe a síntese de $\beta$ -1,3-glucana, reduzindo assim a estabilidade da parede celular	<i>C. glabrata</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. haemulonii</i> <i>C. auris</i>

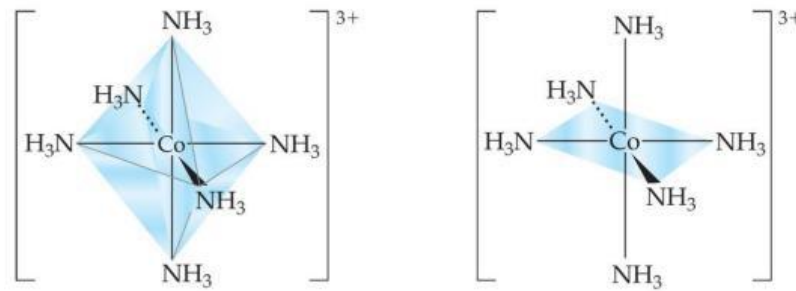
Fonte: adaptado de Murphy e Bicanic, 2021.

O uso terapêutico de metais e de compostos metálicos como opções de tratamento para uma ampla variedade de patologias, data de tempos remotos, sendo bem evidenciado ao longo da história das civilizações. Neste contexto, antigos povos, como os egípcios, assírios e chineses, foram capazes de reconhecer a importância da utilização de diversos compostos metálicos no tratamento de doenças, assim como os benefícios associados a este uso. Na medicina chinesa, o trióxido de arsênio foi utilizado em práticas de antissepsia e no tratamento de psoríase, sífilis e doenças reumáticas, além de ser um dos primeiros compostos a ser sugerido para o tratamento de leucemias (Waxman Anderson, 2001; Ndagi, Mhlongo e Soliman, 2017). O uso terapêutico primário de ouro e cobre está diretamente associado com o desenvolvimento



das sociedades chinesa e egípcia, uma vez que ambas utilizavam estes metais no tratamento de certas infecções, como a sífilis (Glisic e Djuran, 2014). Na década de 1960, a descoberta da platina, posteriormente renomeada para cisplatina, e de suas propriedades antitumorais, revolucionou o desenvolvimento de estratégias de tratamento para indivíduos com câncer, possibilitando a formação de drogas anticâncer à base de metal (Jungwirth *et al.*, 2011). Dessa forma, a utilização de compostos metálicos como agentes terapêuticos e o conhecimento das propriedades medicinais destas moléculas tornaram-se temáticas de estudos cada vez mais ampliadas pela comunidade científica.

O desenvolvimento de novas técnicas de biotecnologia molecular e de química combinatória, nas últimas décadas, fundamentou as bases para a síntese de uma grande diversidade de complexos metálicos, contendo diferentes centros metálicos e ligantes variados em suas estruturas, com destaque para os metais de transição (Lin *et al.*, 2021). Logo, a formulação e a aplicação de compostos de coordenação adquiriram grande relevância, uma vez que as características únicas dos metais de transição utilizados neste processo de síntese, possibilitam a geração de diferentes estruturas e moléculas de interesse. A estrutura de um composto de coordenação é caracterizada pela presença de um íon metálico ou átomo metálico central, que atua como um ácido de Lewis, ligado covalentemente por pontes de hidrogênio a íons ou moléculas biológicas de interesse, que atuam como bases de Lewis, sendo denominadas como ligantes (**Figura 3**). Assim, o átomo da base de Lewis que forma a ligação com o íon metálico central é classificado como o átomo doador de elétrons, enquanto que o átomo/íon metálico central, no ácido de Lewis do complexo, comporta-se como o átomo receptor de elétrons desta estrutura (Hoehne e Dall'Oglio, 2013; Gandra *et al.*, 2017; Granato *et al.*, 2021; Lin *et al.*, 2021). Além disso, as propriedades termodinâmicas e cinéticas entre as interações metal-ligante estimulam uma vasta gama de possíveis interações com moléculas biológicas de interesse, conferindo características únicas aos compostos de coordenação. Por exemplo, os compostos de coordenação positivamente carregados são capazes de interagir com uma gama de estruturas biológicas negativamente carregadas como ácidos nucleicos, fosfolipídios e regiões específicas de proteínas. Diferentes propriedades como a variação da carga elétrica de suas moléculas, possibilidades de coordenação com moléculas variáveis e atividade redox frente a diferentes compostos orgânicos, são fatores que tornam estes compostos em agentes promissores com aplicações variadas na esfera da saúde (Frezza *et al.*, 2010; Li, Collins e Keene, 2015; Ndagi, Mhlongo e Soliman, 2017).



**Figura 3.** Estrutura de um composto de coordenação. Na figura, o elemento cobalto atua como íon metálico central, enquanto que moléculas de amônia ( $\text{NH}_3$ ) atuam como ligantes inorgânicos, resultando na formação do composto de coordenação (adaptado de “Chemistry, The Central Science, 11<sup>th</sup> edition”, 2009).

Com base nisto, os metais de transição podem ser complexados com uma ampla variedade de moléculas biológicas de interesse e a escolha da molécula inorgânica/orgânica durante a síntese de um composto de coordenação é de suma importância, uma vez que a correlação adequada entre um metal com um ligante orgânico com atividade biológica, impacta diretamente no efeito e na aplicação pretendida para o composto e, por isso, tal etapa constitui um desafio importante no projeto de complexos organometálicos (Kalinowska-Lis *et al.*, 2014; Renfrew, 2014; Lin *et al.*, 2021; Gordon *et al.*, 2022).

Neste contexto, nas últimas duas décadas, a molécula de 1,10-fenantrolina tem adquirido destaque na química de composição devido a sua capacidade de ligação, modulação e ligação ao DNA, além de apresentar uma ampla gama de propriedades estruturais, eletrônicas e/ou magnéticas (Raman, Mahalakshmi e Mitu, 2014). Esta molécula é classificada como um heterocíclico aromático derivado do fenantreno, apresentando átomos de nitrogênio que substituem os átomos de carbono nas posições 1 e 10 de sua estrutura. Tal característica possibilita a formação de anéis quelatos de alta estabilidade com íons metálicos, configurando a molécula e seus derivados orgânicos como agentes quelantes promissores na síntese de uma grande diversidade de compostos de coordenação (Bottega, 2012; Mccann *et al.*, 2013; Raman, Mahalakshmi e Mitu, 2014; Gandra *et al.*, 2017). Paralelo a isso, diferentes estudos ressaltam o potencial antimicrobiano deste composto contra patógenos bacterianos e fúngicos, onde a 1,10-fenantrolina e seus derivados foram capazes de inibir a proliferação e/ou exibir atividade bacteriostática e fungistática contra patógenos oportunistas de relevância na clínica médica, tais como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. haemulonii*, *Phialophora verrucosa*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Além disso, estes mesmos resultados evidenciam que tal potencial antimicrobiano se torna maior sob a configuração de compostos de coordenação quando comparado ao mesmo potencial

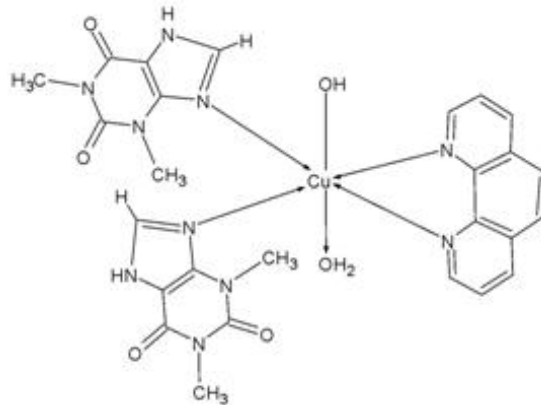
inibitório induzido pela 1,10-fenantrolina, por seus derivados orgânicos ou pelos metais isoladamente (Palmeira *et al.*, 2006; Creaven *et al.*, 2009; Mccann *et al.*, 2013; Gandra *et al.*, 2017; Granato *et al.*, 2017; Gandra *et al.*, 2020; Granato *et al.*, 2021).

Assim como a 1,10-fenantrolina, a molécula de teofilina (1,3-dimetilxantina) também se destaca como um ligante orgânico em potencial para a síntese de compostos de coordenação com ação antimicrobiana. A teofilina é uma substância alcaloide, pertencente à classe das metilxantinas, sendo encontrada em grãos de cacau, café verde e folhas de chá verde (Banner, 2003; Ogunlaja *et al.*, 2020). É um fármaco aprovado a cerca de 70 anos, sendo amplamente prescrito e utilizado como um broncodilatador, principalmente no tratamento de asma e doenças crônicas pulmonares, onde atua na desobstrução das vias aéreas dos pulmões (Barnes, 2013; Ogunlaja *et al.*, 2020). Trabalhos publicados também já demonstraram que a teofilina possui propriedades anti-inflamatórias, potencial antitumoral e ação em doenças neurodegenerativas, além de ser capaz de inibir a replicação do vírus da imunodeficiência humana-1 (HIV-1) em células humanas (Hirsh *et al.*, 2004; Nunnari *et al.*, 2005; Ching *et al.*, 2017; Oñatibia-Astibia, Franco e Martínez-Pinilla, 2017; Peng *et al.*, 2018). Ademais, sabe-se que moléculas da classe das metilxantinas possuem propriedades antiquitinases, classificando-as como agentes antifúngicos em potencial, visto que as quitinases fúngicas são fundamentais na remodelação da parede celular e na replicação celular fúngica (Tsirilakis *et al.*, 2012). Mediante a isto, grupos de pesquisa já foram capazes de evidenciar o potencial antimicrobiano promissor desta molécula. Tratamentos com a teofilina promovem uma inibição significativa para a espécie *C. albicans*, através de múltiplos mecanismos de ação como o aumento da permeabilidade da membrana plasmática, diminuição dos níveis de ergosterol, bloqueio de ciclos metabólicos e atividades enzimáticas (Singh *et al.*, 2020). Tal potencial também é observado durante o uso da molécula na formulação de compostos de coordenação contendo complexos metálicos, visto que tais compostos foram capazes de inibir o crescimento de bactérias gram-negativas e gram-positivas, assim como das espécies fúngicas *C. albicans* e *C. tropicalis* (Majodina *et al.*, 2021).

Drogas à base de metais têm atraído enorme atenção devido aos seus efeitos farmacológicos, que incluem atividades anticancerígenas, anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas (Anthony *et al.*, 2020; Gandra *et al.*, 2020; Granato *et al.*, 2021). Em estudos com metais de transição, o cobre se destaca como um elemento extremamente relevante para a manutenção de diversos processos metabólicos e fisiológicos do organismo humano, tais como o funcionamento do citocromo C e da enzima superóxido dismutase dependente de cobre, sendo estas enzimas/proteínas associadas com processos essenciais de metabolismo energético, respiração celular e síntese de DNA (Fengyi *et al.*, 2018; Chudal *et al.*, 2020). Uma vez que

este metal já foi bem caracterizado e aplicado ao longo da história evolutiva humana, diferentes grupos de pesquisa evidenciaram o alto potencial de complexos de cobre em terapias associadas a doenças inflamatórias, assim como o potencial de compostos de coordenação a base de íons de cobre em associação com ligantes do “tipo fenantrolina” contra infecções microbianas desencadeadas por patógenos bacterianos, virais e fúngicos (Lebon *et al.*, 2002; Stanila *et al.*, 2011; Gandra *et al.*, 2017; Granato *et al.*, 2017; Granato *et al.*, 2021). Para além disso, trabalhos desenvolvidos na área da química médica têm demonstrado o potencial de fármacos a base de cobre como ferramentas para o desenvolvimento de terapias antitumorais (Jiang *et al.*, 2022). Neste contexto, muitos destes compostos têm sido selecionados para a realização de ensaios pré-clínicos, e sua alta eficácia está associada a uma ampla variedade de mecanismos de ação, tais como a produção de espécies reativas de oxigênio, clivagem de DNA, inibição da atividade proteossômica, paraptose, entre outros (Martinez-Buli *et al.*, 2015; Zeeshan *et al.*, 2016; Xin *et al.*, 2017; Sangeetha e Murali, 2018; Jiang *et al.*, 2022).

Dessa forma, compostos de coordenação à base de cobre, utilizando-se da molécula de 1,10-fenantrolina como ligante, já apresentaram potente atividade inibitória contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. haemulonii* (Mccann *et al.*, 2012; Gandra *et al.*, 2017; Gandra *et al.*, 2020). Dentre os mecanismos de ação propostos para tais compostos de coordenação, sabe-se que estes são capazes de afetar a função mitocondrial, pois inibem a síntese de citocromos *b* e *c*, além de reduzirem o conteúdo de ergosterol na membrana plasmática fúngica, aumentando sua permeabilidade (Mccann *et al.*, 2013; Gandra *et al.* 2017; Gandra *et al.*, 2020). Tais mecanismos de ação, diferem dos compostos azólicos e poliênicos frequentemente utilizados na terapia, o que poderia tornar menos provável o desenvolvimento de mecanismos de resistência por espécies de *Candida*, constituindo assim uma possível alternativa terapêutica (Ndagi, Mhlongo e Soliman, 2017; Lin *et al.*, 2021). Sendo assim, os compostos de coordenação sintetizados a partir de moléculas de teofilina e 1,10-fenantrolina em associação com o metal cobre, como o novo composto [Cu(theo)<sub>2</sub>(phen)(H<sub>2</sub>O).5H<sub>2</sub>O] (denominado CTP) apresentado no presente estudo (**Figura 4**), pode contribuir para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas eficazes para o tratamento de infecções ocasionadas por espécies de *Candida* não-*albicans* resistentes aos tratamentos convencionais.



**Figura 4.** Estrutura do composto de coordenação [Cu(theo)<sub>2</sub>(phen)(H<sub>2</sub>O).5H<sub>2</sub>O] – CTP. Neste composto, o metal cobre atua como íon metálico central, sendo ligado covalentemente com duas moléculas de teofilina e uma molécula de 1,10-fenantrolina, que atuam como os ligantes orgânicos nesta formulação (adaptado de Gordon et al., 2022).

#### 1.5. Ferramentas para a avaliação da eficácia e toxicidade de compostos com ação antimicrobiana: *Galleria mellonella*

Apesar de muitas drogas a base de metais apresentarem propriedades biológicas relevantes que fundamentam a sua utilização como agentes antimicrobianos em potencial, níveis de citotoxicidade dos compostos em células humanas já foram observados na realização de estudos pré-clínicos (Ng, Wu e Aldrich-Wright, 2018). Metais pesados como cobre, ferro e zinco são necessários para regular a homeostase do organismo humano, sendo essenciais para a função fisiológica de diferentes enzimas e proteínas. No entanto, estudos apontam que, em concentrações elevadas, tais metais são capazes de causar danos relevantes aos organismos vivos, através da geração de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, redução da integridade da membrana plasmática, ativação/inibição de fatores de transcrição de sinais, clivagem de moléculas de DNA e toxicidade a células renais (Ng, Wu e Aldrich-Wright, 2018; Kim, Kim e Kumar, 2019). Tais características limitam o desenvolvimento de pesquisas com compostos metálicos com enfoque no desenvolvimento de terapias efetivas contra patógenos microbianos. Desse modo, a realização de estudos de toxicidade *in vivo* a respeito dos compostos de coordenação configura-se como ponto essencial para apurar a verdadeira eficácia destes compostos.

Ao longo dos últimos anos, a comunidade científica tem demonstrado um grande interesse no desenvolvimento de modelos *in vivo*, a partir de hospedeiros não mamíferos, para os estudos da patogenicidade microbiana e toxicidade de moléculas, uma vez que a realização de testes em modelos animais clássicos gera enormes impactos éticos e financeiros para o desenvolvimento de pesquisas (Trevijano-Contador e Zaragoza 2014; Silva *et al.*, 2018). Neste

cenário, a substituição de modelos mamíferos em detrimento de organismos invertebrados, tais como as larvas de *Galleria mellonella*, destaca-se como uma opção eticamente preferível e diversos projetos têm aplicado estes insetos em ensaios de avaliação da toxicidade de moléculas, patogenicidade de microrganismos, principalmente em espécies bacterianas e fúngicas, assim como em estudos de eficácia de novos compostos antimicrobianos em potencial (Wu, Xu e Yi, 2016; Allegra *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018; Guerrieri *et al.*, 2019; Muñoz *et al.*, 2020).

A espécie *G. mellonella* possui uma ampla gama de vantagens morfológicas, fisiológicas e imunológicas frente a outros organismos invertebrados, o que torna suas larvas em modelos animais promissores (Tsai, Loh e Proft, 2016; Guerrieri *et al.*, 2019). Tais vantagens incluem: o tamanho relativamente maior das larvas, em comparação com outros modelos invertebrados, facilitando a manipulação e o manuseio dos sistemas durante a inoculação; a possibilidade de inoculação na região da hemocele, conferindo maior precisão no uso dos inóculos; o baixo custo e a facilidade de manutenção do modelo, visto que as larvas não necessitam de equipamentos especializados para a sua sobrevivência, podendo ser dispostas em placas de Petri e mantidas em incubadoras comuns; a sua capacidade de permanência em amplas faixas de temperatura, variando entre 15°C a 37°C; a obtenção de grandes grupos de animais em um mesmo cultivo, permitindo o uso de mais indivíduos para aumentar o poder estatístico dos ensaios. Soma-se a isto a maior aceitabilidade ética associada com o estudo desta espécie como sistema experimental, o que configura a utilização das larvas de *G. mellonella* como uma opção mais rápida quando comparada a modelos que necessitam de aprovação do Comitê de Ética para a iniciação dos experimentos (Wang *et al.*, 2013; Trevijano-Contador e Zaragoza 2014; Tsai, Loh e Proft, 2016; Wu *et al.*, 2016; Kwadha *et al.*, 2017; Allegra *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018; Guerrieri *et al.*, 2019; Gandra *et al.*, 2020; Muñoz *et al.*, 2020).

Mediante a isto, a aplicação das larvas de *G. mellonella* apresenta grande relevância em estudos de toxicidade de substâncias e eficácia de compostos com ação antimicrobiana, onde os resultados obtidos expressam uma forte correlação com dados provenientes do uso de modelos mamíferos (Sheehan e Kavanagh, 2018; Gandra, 2018). Além disso, as larvas inoculadas com microrganismos alvos são susceptíveis a tratamento com substâncias antimicrobianas e moléculas bioativas, tornando o modelo viável para o estudo de características farmacocinéticas dos compostos, tais como a concentração máxima das drogas e o tempo de meia-vida, o que permite uma posterior correlação direta dos resultados com o modelo humano (Wang *et al.*, 2013; Guerrieri *et al.*, 2019; Durieux *et al.*, 2021). No contexto da micologia médica, diferentes estudos de avaliação de toxicidade e eficácia de agentes

antimicrobianos e compostos antifúngicos clássicos já foram realizados. Por exemplo, os fármacos fluconazol, anfotericina B e caspofungina, já foram aplicados em ensaios de tratamento de larvas infectadas com *C. tropicalis*, onde as larvas tratadas com diferentes concentrações de caspofungina apresentaram um percentual de sobrevivência maior frente à infecção por esta espécie, quando comparadas com os sistemas contendo os demais antifúngicos (Silva *et al.*, 2018). De maneira similar, pesquisas avaliaram a toxicidade de complexos metálicos contendo prata, manganês e cobre, em associação com a molécula de 1,10-fenantrolina, frente ao modelo de *G. mellonella*. Os resultados obtidos evidenciaram a eficácia da aplicação deste modelo para determinação de concentrações tóxicas de moléculas bioativas e na análise do potencial de compostos de coordenação frente ao fungo *Phialophora verrucosa*, assim como a espécies do gênero *Candida*, resistentes a diferentes classes de antifúngicos (Gandra *et al.*, 2020; Granato *et al.*, 2021).

Portanto, a combinação de características fisiológicas, éticas, imunológicas e logísticas, reforça o potencial das larvas de *G. mellonella* como um modelo *in vivo* de alta relevância para análises de toxicidade dos compostos de coordenação e de sua eficácia no tratamento de infecções fúngicas. Logo, o uso deste modelo nos ensaios laboratoriais pode fornecer informações essenciais frente às análises pertinentes ao presente estudo.

## 2. JUSTIFICATIVA

Na última década, ocorreu um aumento significativo na incidência de infecções fúngicas oportunistas. A espécie *C. albicans* é o principal agente etiológico do gênero *Candida* associado a quadros de candidíases invasivas nosocomiais ao redor do mundo. Contudo, nos últimos anos, tem-se observado uma mudança deste perfil epidemiológico, devido a um aumento na ocorrência de infecções ocasionadas por espécies de *Candida* não-*albicans*. Tais espécies apresentam susceptibilidade reduzida aos principais antifúngicos utilizados na clínica médica, como o fluconazol e a anfotericina B, resultando em falhas terapêuticas no tratamento de pacientes acometidos por tais infecções. Neste contexto de crescente resistência, os antifúngicos atuais apresentam limitações severas quanto ao seu espectro de ação, seletividade e potência. Portanto, o desenvolvimento e/ou aprimoramento de novos compostos com ação antifúngica estabelece-se como um campo relevante para a comunidade científica. Dessa forma, a síntese de compostos de coordenação contendo metais de transição, quando ligados a 1,10-fenantrolina e moléculas biologicamente relevantes como a teofilina, oferece uma oportunidade de obter compostos com propriedades físico-químicas e biológicas mais desejáveis. Os compostos de coordenação apresentam mecanismo de ação diferenciado dos compostos azólicos e dos poliênicos, através de sua ação multialvo, além de apresentarem uma promissora atividade anti-*Candida*, configurando uma alternativa para o tratamento de cepas que sejam resistentes aos antifúngicos clássicos. Com base nisso, o estudo de novos compostos de coordenação biologicamente ativos, consolida-se como uma alternativa em potencial para aplicações terapêuticas no combate a fungos resistentes.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antifúngica do complexo de coordenação denominado CTP [Cu(theo)<sub>2</sub>(phen)(H<sub>2</sub>O).5H<sub>2</sub>O] contra isolados clínicos, resistentes ao antifúngico fluconazol, pertencentes a seis diferentes espécies de *Candida* não-*albicans* (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. haemulonii* e *C. auris*) levando-se em consideração as formas planctônicas e biofilmes.

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antifúngica do composto CTP sobre o crescimento planctônico de isolados clínicos de *Candida* spp. (estabelecimento da concentração inibitória mínima – CIM e da concentração fungicida mínima – CFM);
- Avaliar os efeitos do composto CTP sobre diferentes aspectos da biologia celular dos isolados clínicos de *Candida* spp., a saber: integridade de membrana celular, atividade mitocondrial e estresse oxidativo;
- Avaliar a influência de CTP sobre o biofilme de isolados clínicos de *Candida* spp. (adesão a substrato abiótico, formação de biofilme e desarticulação do biofilme maduro);
- Avaliar a toxicidade do composto CTP no modelo *in vivo* de larvas de *G. mellonella* infectadas com o composto-teste.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Compostos testes

O composto de coordenação (CTP) foi sintetizado e gentilmente cedido pelo grupo de pesquisa do Dr. Adeniyi Ogunlaja do Departamento de Química da Universidade Nelson Mandela, África do Sul. O composto foi diluído em DMSO e armazenado à temperatura ambiente. O antifúngico fluconazol (Sigma-Aldrich) foi utilizado para confirmação da resistência dos isolados clínicos frente a compostos azólicos, sendo diluído em DMSO e armazenado a -30°C, na ausência de luz.

### 4.2. Cepas microbianas e condições de cultivo

As cepas fúngicas utilizadas neste estudo são isolados clínicos pertencentes ao gênero *Candida*, resistentes a fluconazol, a saber: *C. tropicalis* cepa MG 6, *C. glabrata* cepa M, *C. krusei* cepa MG 26, *C. parapsilosis* cepa LIP 45, *C. haemulonii* cepa LIP Ch2 e *C. auris* cepa 885 (**Quadro 1**) pertencentes à Micoteca do Laboratório de Estudos Avançados de Microrganismos Emergentes e Resistentes (LEAMER, IMPG-UFRJ). As cepas clínicas foram isoladas de diferentes sítios anatômicos de pacientes internados em hospitais de Minas Gerais e Rio de Janeiro, Brasil, com exceção da cepa *C. auris* que foi isolada na Colômbia (fornecida por colaboradores). As cepas encontram-se estocadas em meio de cultura Sabouraud suplementado com 20% de glicerol e armazenadas no freezer a -80°C. Para os experimentos, as leveduras foram repicadas em caldo Sabouraud dextrosado e cultivadas, sob agitação constante (200 rpm), a 37°C por 48 h (Ramos *et al.*, 2015). As culturas foram centrifugadas a 10000×g por 10 min, a 4°C. Após esse período, as células foram lavadas três vezes em tampão fosfato salino (PBS, pH 7,2). O número de células foi quantificado através de contagem em câmara de Neubauer.

**Quadro 1.** Identificação dos isolados clínicos utilizados no estudo.

Isolados	Ano de Isolamento	Sítio do Isolamento
<i>C. tropicalis</i> MG 6	2015	Gastrotomia
<i>C. glabrata</i> M	2015	Gastrotomia
<i>C. krusei</i> MG 26	2015	Gastrotomia
<i>C. parapsilosis</i> LIP 45	2015	Gastrotomia
<i>C. haemulonii</i> LIP CH2	2009	Planta do pé
<i>C. auris</i> 885	2016	Sangue

#### 4.3. Teste de susceptibilidade ao antifúngico fluconazol

O teste de susceptibilidade ao antifúngico fluconazol foi realizado seguindo o método de microdiluição em meio líquido RPMI 1640, baseado no protocolo M27-A3 do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (do inglês “CLSI”, 2008). As diluições seriadas dos antifúngico foram realizadas em placas de 96 poços, com as concentrações finais variando de 64 a 0,125 µg/mL, em um volume final de 200 µL. Para cada poço da placa contendo os antifúngicos foram adicionados 100 µL contendo  $10^2$  células fúngicas anteriormente cultivadas em meio Sabouraud por 48 h. Os poços contendo apenas inóculo e meio RPMI foram utilizados como controle de crescimento microbiano e de meio, respectivamente. A placa foi incubada durante 24 h a 37°C, para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Após 24h de incubação, realizou-se a leitura visual da placa e posterior visualização da mesma em microscópio para a interpretação dos resultados, sendo o valor de CIM determinado a partir da menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano ao fim do período de incubação.

#### 4.4. Ensaio de atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do composto CTP foi avaliada através do método de microdiluição em meio líquido RPMI 1640, utilizando-se placas de poliestireno de 96 poços de fundo U, padronizado segundo o documento M27-A3 do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (do inglês “CLSI”, 2008). Para tal, diluições seriadas foram realizadas para a obtenção de concentrações finais variando de 500 a 0,48 µg/mL do composto em um volume final de 200 µL. Para cada poço da placa contendo os antifúngicos foram adicionados 100 µL contendo  $10^2$  células fúngicas anteriormente cultivadas em meio Sabouraud por 48 h. Os poços contendo apenas inóculo e meio RPMI foram utilizados como controle de crescimento microbiano e de meio, respectivamente. A placa foi incubada durante 24 h a 37°C, para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM) de cada substância. Considerou-se CIM a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano após 24h de incubação. A inibição do crescimento planctônico foi determinada através da leitura visual da placa e posterior visualização da mesma em microscópio para a interpretação dos resultados. Para determinar a CFM, 10 µL dos poços onde não houve crescimento microbiano visível foram inoculados em placas de Petri contendo meio de cultura Sabouraud dextrose agar. Após 48 h de incubação a 37°C, considerou-se CFM a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano.

#### 4.5. Efeito do composto CTP sobre a integridade de membrana plasmática.

A integridade da membrana plasmática foi avaliada através da incubação das células com iodeto de propídio, capaz de se ligar ao DNA de células com dano de membrana plasmática (Marinho *et al.*, 2014). Suspensões contendo concentrações de  $10^6$  células dos isolados clínicos foram preparadas e tratadas com o composto CTP em concentrações equivalentes a 1×CIM, 2×CIM e 4×CIM, em meio líquido RPMI 1640, sendo posteriormente incubadas por 24 h a 37°C. Após esse período, as células foram lavadas três vezes em tampão fosfato salino (PBS, pH 7,2) e incubadas com o iodeto de propídio a 1 µg/mL por 20 min. Após, as leveduras foram analisadas por citometria de fluxo (EPICS ELITE flowcytometer, Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA) equipado com laser de argônio com potência de 15 mW e emissão a 488 nm, e analisadas através do software CellQuest. Células não tratadas e células tratadas com paraformaldeído (PFA) foram utilizadas como controles comparativos. As análises foram realizadas por citometria de fluxo, avaliando-se o percentual de células fluorescentes e a média de intensidade de fluorescência.

#### 4.6. Efeito do composto CTP sobre a atividade metabólica mitocondrial

A atividade mitocondrial foi avaliada através do método de bromidrato de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (XTT). Nesta técnica, a conversão do XTT em formazana por desidrogenases mitocondriais atua como indicador de viabilidade celular, e a quantidade de formazana produzida é diretamente proporcional ao número de células metabolicamente ativas (Kuhn *et al.*, 2003). Neste ensaio, suspensões contendo  $10^6$  leveduras foram tratadas com CTP em concentrações equivalentes a 1×CIM e 2×CIM, em meio líquido RPMI 1640, sendo incubadas por 24 h a 37°C. Ao fim da incubação, os sobrenadantes foram descartados e os poços lavados três vezes com PBS. Em seguida, foram adicionados a cada poço 200 µL de uma solução contendo 40 µL de XTT (1 mg/mL), 0,2 µL de menadiona (4 mM) e 159,8 µL de PBS, e as placas foram incubadas a 37 °C por 3 h, na ausência de luz. Após a incubação, 100 µL de cada poço foram transferidos para outra placa de 96 poços e a mudança de coloração foi mensurada a 492 nm em leitor de microplacas (SpectraMax 190, Molecular Devices, EUA). Células sem nenhum tipo de tratamento foram utilizadas como controle positivo, enquanto que células tratadas com paraformaldeído (PFA) por 24 h foram utilizadas como controle negativo (células não viáveis) deste teste.

#### 4.7. Efeito do composto CTP sobre os níveis de estresse oxidativo intracelular

As células fúngicas foram incubadas por 1 h com a sonda diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFHDA). Esta, após penetrar na célula, é hidrolisada a 2',7'-diclorofluoresceína, composto não fluorescente, mas que na presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) é rapidamente oxidado e transformado em diclorofluoresceína (DCF), este sim capaz de emitir fluorescência (Oyama *et al.*, 1994). Neste experimento,  $10^6$  células foram tratadas em meio líquido RPMI 1640 contendo o composto CTP em concentrações equivalentes a 1×CIM, 2×CIM e 4×CIM e incubadas por 3 h a 37°C. Após esse período, as células foram lavadas três vezes em tampão PBS (pH 7,2) e incubadas por 1 h com a sonda DCFHDA. Posteriormente, as leveduras foram analisadas por citometria de fluxo (EPICS ELITE flowcytometer, Coulter Eletronics, Hialeah, FL, USA). Células sem nenhum tipo de tratamento foram utilizadas como controle positivo, enquanto que células tratadas com 4 mM de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e incubadas por 3 h a 37°C foram utilizadas como controle negativo deste teste. As análises foram realizadas por citometria de fluxo, avaliando-se o porcentual de células fluorescentes e a média de intensidade de fluorescência.

#### 4.8. Efeito do composto CTP sobre a adesão celular a poliestireno

Neste ensaio, suspensões contendo  $10^4$  leveduras foram tratadas com CTP em concentrações equivalentes a 1×CIM, 2×CIM e 4×CIM em meio líquido RPMI 1640. De forma simultânea, as suspensões foram transferidas para placas de poliestireno de 24 poços e incubadas por 3 h a 37°C, para promover o processo de adesão celular e o tratamento com o composto dentro do mesmo período. Após a incubação, o sistema foi lavado 3 vezes com PBS e as células aderidas foram analisadas com auxílio de um microscópio invertido. Os experimentos foram realizados em triplicata, e cinco diferentes campos microscópicos foram considerados em cada sistema para a expressão do número total de células aderidas/poço.

#### 4.9. Efeito de CTP sobre o processo de formação de biofilme

Para determinar a influência de CTP na formação de biofilme pelos isolados de *Candida* spp.,  $10^6$  células dos isolados foram tratadas com CTP, em concentrações equivalentes a 1×CIM, 2×CIM e 4×CIM, sendo incubadas em placas de poliestireno contendo 200  $\mu$ L de meio Sabouraud durante 48 h de formação do biofilme. Após este período os poços foram lavados para remover células não aderidas e a viabilidade celular e a biomassa foram avaliadas como descrito a seguir.

#### 4.9.1. Viabilidade celular (Quantificação da atividade mitocondrial)

A viabilidade celular do biofilme foi quantificada através da determinação da atividade metabólica mitocondrial (redução do XTT- Sigma-Aldrich). Os meios de cultura foram descartados e os poços lavados três vezes com PBS para remoção de células não aderidas. Em seguida, foram adicionados a cada poço 200  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 40  $\mu\text{L}$  de XTT (1 mg/mL), 0,2  $\mu\text{L}$  de menadiona (4 mM) e 159,8  $\mu\text{L}$  de PBS, e as placas foram incubadas a 37 °C por 3 h, na ausência de luz. Após a incubação, 100  $\mu\text{L}$  de cada poço foram transferidos para outra placa de 96 poços e a mudança de coloração foi mensurada a 492 nm em leitor de microplacas (SpectraMax 190, Molecular Devices, EUA) (PEETERS, NELIS & COENYE, 2008).

#### 4.9.2. Quantificação da biomassa

Para quantificar a formação da biomassa do biofilme, os sobrenadantes foram descartados e os poços lavados três vezes com PBS para remover as células não aderidas. Em seguida, as biomassas foram fixadas adicionando 200  $\mu\text{L}$  de metanol 99% por 15 min. O metanol foi retirado e os poços foram secos a temperatura ambiente por 5 min e, posteriormente, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo 0,4% de cristal violeta e as placas foram incubadas por 20 min. Após a retirada do cristal violeta, os poços foram novamente lavados com PBS para retirar o excesso de corante. Posteriormente, as biomassas foram descoradas com 33% de ácido acético (200  $\mu\text{L}$ ) por 5 min e, em seguida, 100  $\mu\text{L}$  da solução descorante foi transferida para outra placa de 96 poços, onde a absorbância foi mensurada a 590 nm em leitor de microplacas (SpectraMax 190, Molecular Devices, EUA).

#### 4.10. Desarticulação de biofilmes pré-formados

Uma concentração de  $10^6$  células foi incubada em placa de poliestireno contendo 200  $\mu\text{L}$  de Sabouroud por 48 h a 37°C, permitindo assim a formação de biofilme. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e descartado, e 200  $\mu\text{L}$  de meio RPMI 1640 contendo CTP em concentrações equivalentes a 1×CIM, 2×CIM, 4×CIM e 8×CIM, para cada isolado, foram adicionados aos poços. As placas foram incubadas por 24h e, posteriormente, a viabilidade celular e a biomassa foram avaliadas como descrito acima.

#### 4.11. Toxicidade do composto CTP em larvas de *G. mellonella*

Larvas de *G. mellonella* foram selecionadas de acordo com a similaridade de tamanho e peso (0,21 – 0,28 g). As larvas (10 animais por grupo) foram inoculadas com diferentes

concentrações do composto CTP (250 a 31,25  $\mu\text{g/mL}$ ). As inoculações foram feitas com seringas Hamilton na hemocele da última pró-pata do animal como descrito por Brennan e colaboradores (2002). Em cada experimento, um mesmo número de larvas foi inoculado com 10  $\mu\text{L}$  de PBS para o monitoramento de potenciais efeitos devido a injúria física e como controle da citotoxicidade. Um segundo grupo controle, também com 10 larvas, foi utilizado sem nenhum tipo de manipulação. Todas as larvas foram acondicionadas em placas de Petri previamente esterilizadas, por 5 dias, no escuro e à temperatura ambiente. A mortalidade das larvas foi monitorada e registrada diariamente. A morte da larva foi avaliada pela melanização e falta de movimento em resposta ao estímulo do toque (Silva *et al.*, 2018).

#### 4.12. Análises estatísticas e interpretação dos resultados

Todos os experimentos foram realizados pelos menos três vezes, utilizando-se triplicatas. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste t de Student (nas comparações entre dois grupos) e pela Análise de Variância One-way ANOVA (nas comparações entre três ou mais grupos). Valores de P menores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism9. Para a interpretação geral dos resultados, as médias dos controles positivos foram calculadas e expressadas com o valor percentual de 100%. Após, as médias dos diferentes sistemas de tratamento foram analisadas e os valores percentuais foram calculados com base no controle de células (100%) anteriormente determinado. Posteriormente, realizou-se a comparação dos diferentes sistemas de tratamento com os grupos controles dentro das respectivas análises para a expressão do percentual de aumento ou redução proveniente do tratamento com o composto-teste em cada um dos ensaios realizados.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Atividade antifúngica de Fluconazol e CTP sobre espécies de *Candida não-albicans*

O potencial do antifúngico fluconazol e de CTP contra espécies de *Candida não-albicans* foi avaliado através da determinação dos valores de CIM e CFM (**Tabela 3**). Os valores de CIM de fluconazol para as seis cepas analisadas foram superiores a maior concentração (64 µg/mL) utilizada no ensaio (**Tabela 3**).

Os valores de CIM do CTP frente aos seis isolados clínicos variaram de 7,81 a 62,5 µg/mL. A espécie *C. krusei* apresentou maior susceptibilidade frente a ação do composto (7,81 µg/mL), seguida da espécie *C. haemulonii* (15,62 µg/mL). Outras espécies de *Candida*, como *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. auris* apresentaram o valor de 31,25 µg/mL na utilização de CTP. Ademais, a espécie *C. tropicalis* apresentou o valor mais elevado de CIM para CTP (62,5 µg/mL).

A atividade fungicida do composto CTP foi investigada mediante a determinação dos valores de CFM para cada isolado clínico (**Tabela 3**). Os valores de CFM do composto frente as seis espécies apresentaram variação de 15,62 a 62,5 µg/mL. *C. haemulonii* apresentou maior susceptibilidade frente à ação de CTP (15,62 µg/mL). Outras espécies do gênero *Candida*, como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. auris* apresentaram CFM no valor de 31,25 µg/mL frente a utilização do composto. Ademais, a espécie *C. tropicalis* destacou-se pelo valor mais elevado de CFM para CTP (62,5 µg/mL).

**Tabela 3.** Atividade antifúngica de fluconazol e do composto CTP contra espécies de *Candida não-albicans*.

Espécies	CTP		
	FLU (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CFM (µg/mL)
<i>C. tropicalis</i> MG 6	>64	62,5	62,5
<i>C. glabrata</i> M	>64	31,25	31,25
<i>C. krusei</i> MG 26	>64	7,81	31,25
<i>C. parapsilosis</i> LIP 45	>64	31,25	31,25
<i>C. haemulonii</i> LIP CH2	>64	15,62	15,62
<i>C. auris</i> 885	>64	31,25	31,25

FLU: Fluconazol; CIM: Concentração Inibitória Mínima; CFM: Concentração Fungicida Mínima

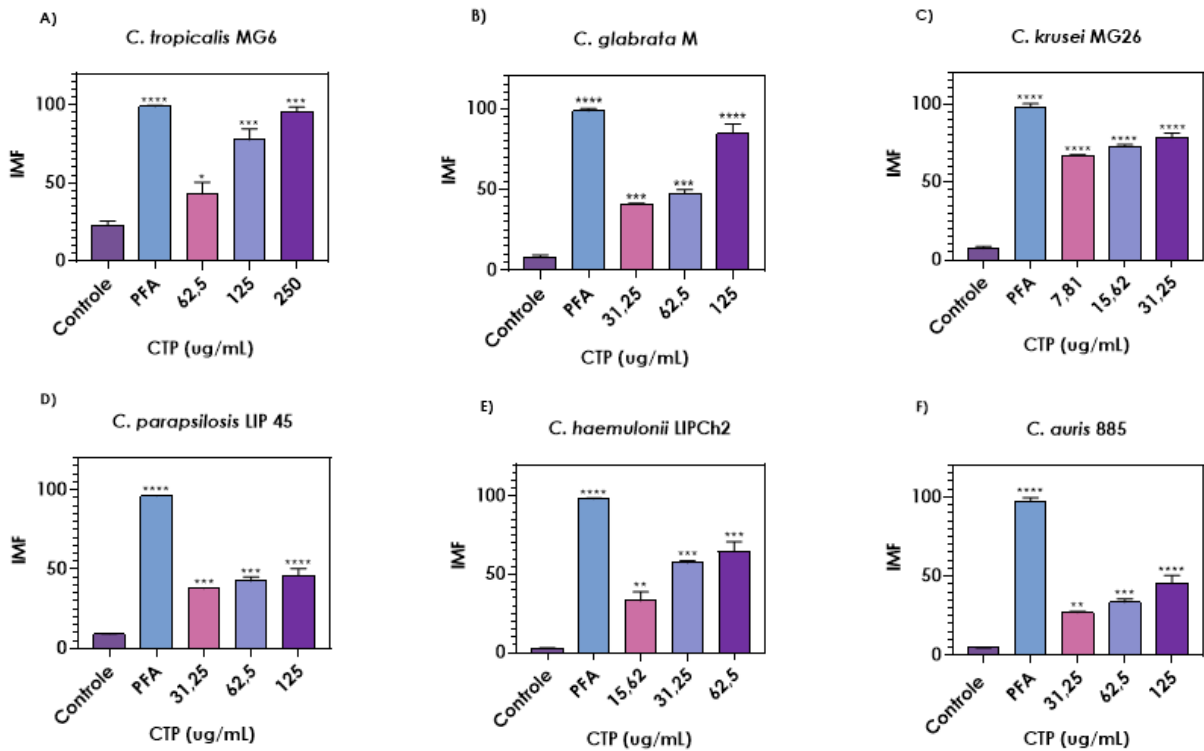


## 5.2 Efeito de CTP sobre a integridade da membrana plasmática

O efeito de CTP sobre a integridade da membrana das células fúngicas foi investigado através da incorporação passiva do iodeto de propídio (PI), uma vez que esta molécula é capaz de atravessar apenas células com membranas danificadas, ligando-se aos ácidos nucleicos e produzindo fluorescência. Neste contexto, as espécies do gênero *Candida* foram tratadas com concentrações equivalentes a 1×CIM, 2×CIM e 4×CIM de CTP e os resultados de suas fluorescências são demonstrados na **Figura 5**.

Conforme mostrado na figura 5, o porcentual de células danificadas sofreu alterações conforme a concentração de CTP foi aumentada, quando comparado ao controle (células não tratadas). Mediante a isto, o tratamento com CTP apresentou maior ação contra a integridade da membrana plasmática das espécies *C. krusei*, *C. haemulonii*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, onde o mesmo atua de maneira dose-dependente, visto que o crescimento dentre as respectivas doses do composto gerou aumentos progressivos nos percentuais de células com danos na membrana plasmática (**Figura 5**). Para *C. krusei*, o tratamento com CTP em concentrações crescentes de 7,81 a 31,25 µg/mL induziu um crescimento em danos celulares de cerca de 60 a 71%, quando comparado com células não tratadas (**Figura 5C**). De maneira similar, observa-se um padrão de aumento de 33 a 76,5% na detecção dos níveis de fluorescência para *C. glabrata*, após a incubação com CTP em concentrações de 31,25 a 125 µg/mL (**Figura 5B**). Em seguida, também se destaca que a utilização do composto nas mesmas faixas de concentrações anteriores (31,25 a 125 µg/mL) foi capaz de induzir alterações na membrana plasmática da espécie *C. parapsilosis*, com aumentos percentuais de cerca de 29 a 37% na comparação com o grupo controle (**Figura 5D**).

Em tempo, observou-se que o tratamento com CTP apresenta maior eficácia nas concentrações de 2×CIM e 4×CIM para a espécie *C. tropicalis* (125 e 250 µg/mL) e para *C. haemulonii* (31,25 e 62,5 µg/mL). O número de células marcadas com PI ampliou-se em 54,6 e 72,6% para *C. tropicalis*, enquanto que aumentos de 54,3 e 61,5% foram observados para *C. haemulonii*, após o tratamento com as respectivas concentrações (**Figura 5A e 5E**). Por fim, a aplicação de CTP apresenta um menor impacto sobre a membrana plasmática de *C. auris*, quando comparada com as demais espécies de *Candida-ao albicans* (**Figura 5E**), uma vez que o perfil de células afetadas cresceu em cerca de 22 a 40,8%, após a interação com concentrações crescentes de 31,25 a 125 µg/mL do composto.



**Figura 5. Efeito de CTP sobre a integridade da membrana plasmática de espécies de *Candida* não-*albicans*.** Células tratadas com concentrações de CTP equivalentes a 1×CIM, 2×CIM e 4×CIM foram marcadas com iodeto de propídio (PI) para a mensuração da intensidade média de fluorescência (IMF). Células não tratadas e células tratadas com paraformaldeído (PFA) foram usadas como controles comparativos. As barras indicam os desvios padrão. Asteriscos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) vs. Controle;  $p = 0,01$  a  $0,05$  (\*);  $p = 0,001$  a  $0,01$  (\*\*);  $p = 0,0001$  a  $0,001$  (\*\*\*);  $p = < 0,0001$  (\*\*\*\*).

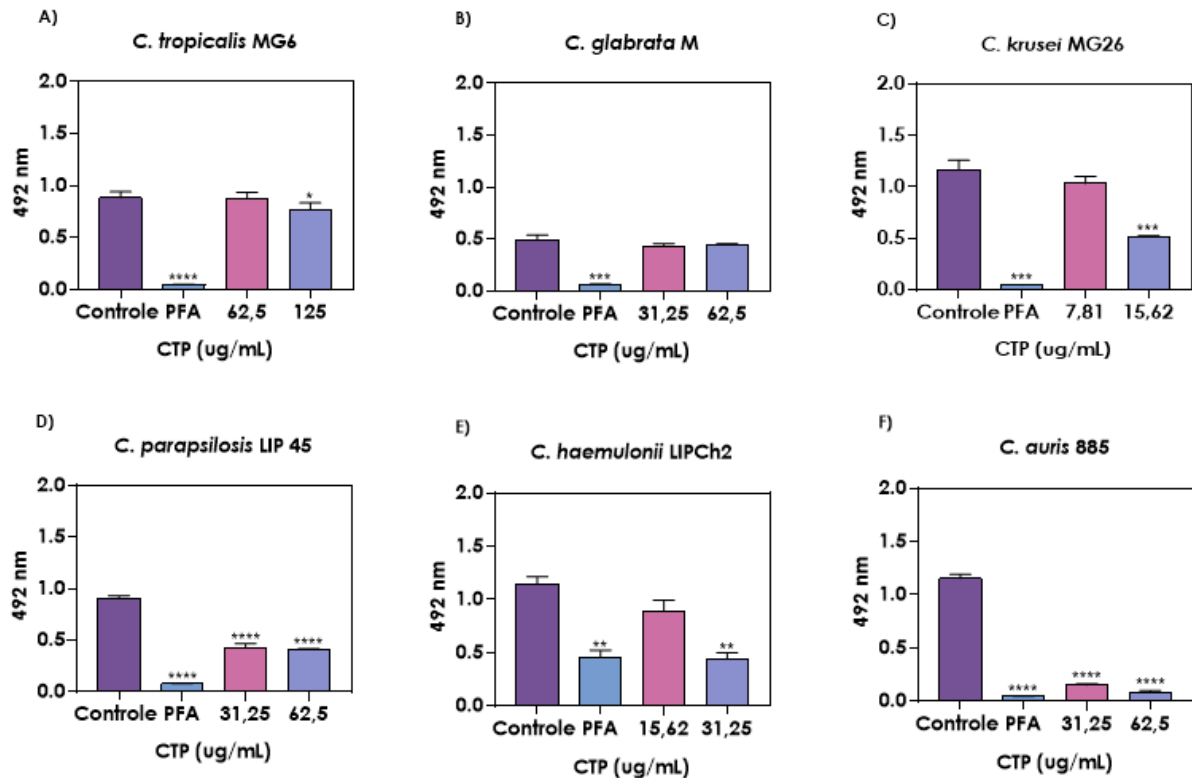
### 5.3. Efeito de CTP sobre a atividade metabólica mitocondrial

O impacto de CTP sobre a atividade metabólica mitocondrial das leveduras do gênero *Candida* foi avaliado através do ensaio de redução de XTT. Nesta análise, as células foram tratadas com CTP por 24 h, em concentrações equivalentes a 1×CIM e 2×CIM e, posteriormente, a utilização do XTT permitiu avaliar o percentual de células metabolicamente ativas.

Na **figura 6**, o modo de ação dose-dependente de CTP é observado nas análises das espécies *C. auris* e *C. parapsilosis*. O tratamento com as concentrações de 31,25 e 62,5 µg/mL foi capaz de reduzir a atividade metabólica de *C. auris* em 86,3 e 93,3%, enquanto que a viabilidade celular de *C. parapsilosis* diminuiu em 55,7 e 58,6%, respectivamente (**Figura 6F e 6D**). De forma similar, a aplicação das concentrações de 31,25 e 62,5 µg/mL (4×CIM) também gerou reduções percentuais significativas de 61,5 e 55,7% na viabilidade de *C. haemulonii* e *C. krusei*, respectivamente (**Figura 6E e 6C**).

Ademais, CTP aparenta ser ineficaz frente as espécies *C. tropicalis* e *C. glabrata*, quando comparado aos respectivos controles de células, uma vez que o composto não foi capaz

de gerar alterações relevantes sobre a atividade mitocondrial de ambas as espécies (**Figura 6A e 6B**).



**Figura 6.** Efeito de CTP sobre a atividade mitocondrial de espécies do gênero *Candida*. As células foram tratadas com CTP em concentrações equivalentes a 1×CIM e 2×CIM e o método de XTT foi utilizado como indicador de viabilidade celular para células metabolicamente ativas. Células não tratadas e células tratadas com paraformaldeído (PFA) foram usadas como controles comparativos. As barras indicam os desvios padrão. Asteriscos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) vs. Controle;  $p = 0,01$  a  $0,05$  (\*);  $p = 0,001$  a  $0,01$  (\*\*);  $p = 0,0001$  a  $0,001$  (\*\*\*) ;  $p = < 0,0001$  (\*\*\*\*).

#### 5.4. Efeito de CTP sobre a geração de EROs

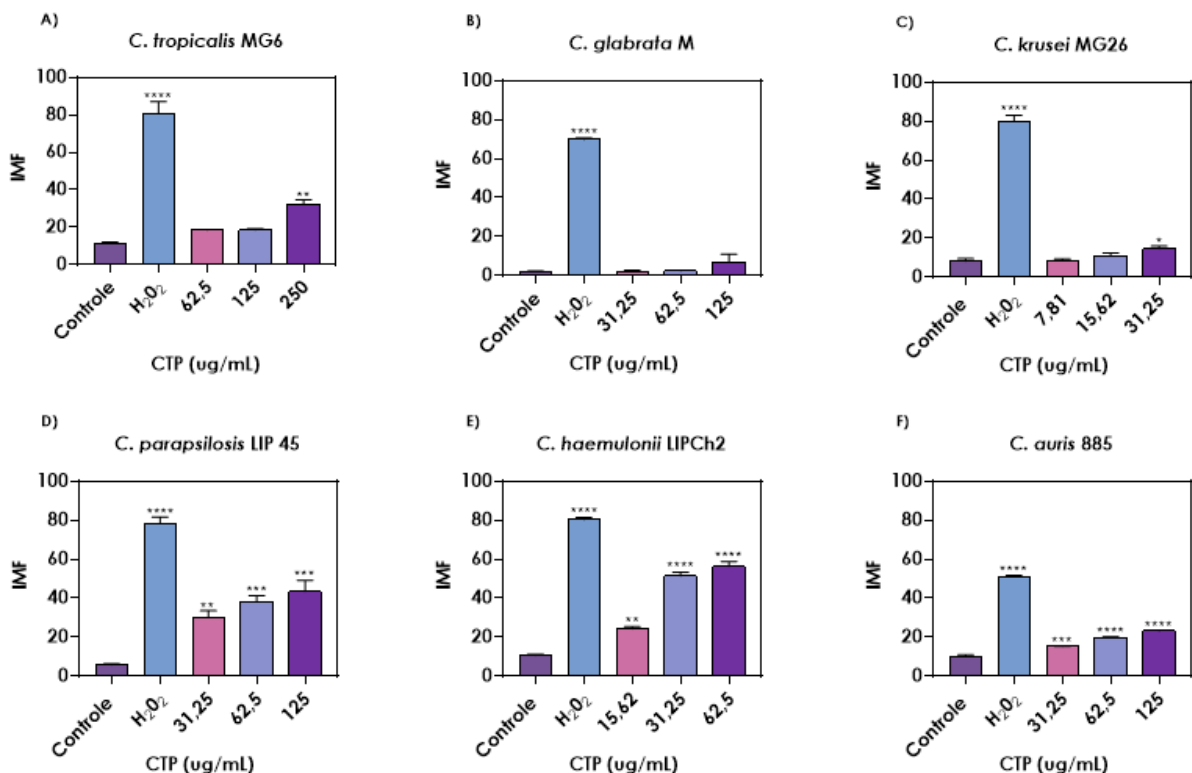
A geração intracelular de EROs foi monitorada a partir da utilização do marcador de fluorescência DCFH-DA em espécies do gênero *Candida* tratadas com CTP em concentrações equivalentes a 1×CIM, 2×CIM e 4×CIM. Após, o porcentual intracelular de EROs foi mensurado através de análises de citometria de fluxo.

Como demonstrado na **Figura 7**, é possível observar um aumento mais relevante na produção de EROs em *C. haemulonii*, seguido das espécies *C. parapsilosis* e *C. auris*, após um período de 2 h de incubação com CTP. Na presente análise, o composto destacou-se de forma mais significativa frente à espécie *C. haemulonii*, onde o mesmo apresenta propriedade dose-dependente, visto que a utilização das concentrações de 31,25 e 62,5  $\mu\text{g/mL}$  (2×CIM e 4×CIM),

gerou aumentos percentuais de 41 e 45,8% na produção celular de EROs para a espécie (Figura 7E).

Em relação a *C. parapsilosis*, observou-se que a incubação com 62,5 e 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  do composto foi capaz de induzir danos celulares mais significativos, visto que nas respectivas concentrações de 2 $\times$ CIM e 4 $\times$ CIM de CTP, *C. parapsilosis* apresenta um crescimento em seu perfil de fluorescência de 32,5 e 37,8% (Figura 7D).

A análise das espécies *C. tropicalis* e *C. auris* demonstraram que o composto é capaz de induzir um maior estresse oxidativo quando aplicado em valores referentes a 4 $\times$ CIM. (Figura 7F). Para *C. tropicalis*, a concentração de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  foi considerada significativa, com um aumento percentual de 21% na indução de estresse oxidativo celular (Figura 7A). Do mesmo modo, o tratamento com a concentração de 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CTP proporcionou um aumento de 13% no nível de células fluorescentes de *C. auris*, dentro da mesma análise. Por último, cabe ressaltar que a utilização de CTP apresentou uma menor eficácia na indução de estresse oxidativo para as espécies *C. glabrata*, *C. krusei*, através da comparação com seus respectivos controles de células (Figura 7B e 7C).



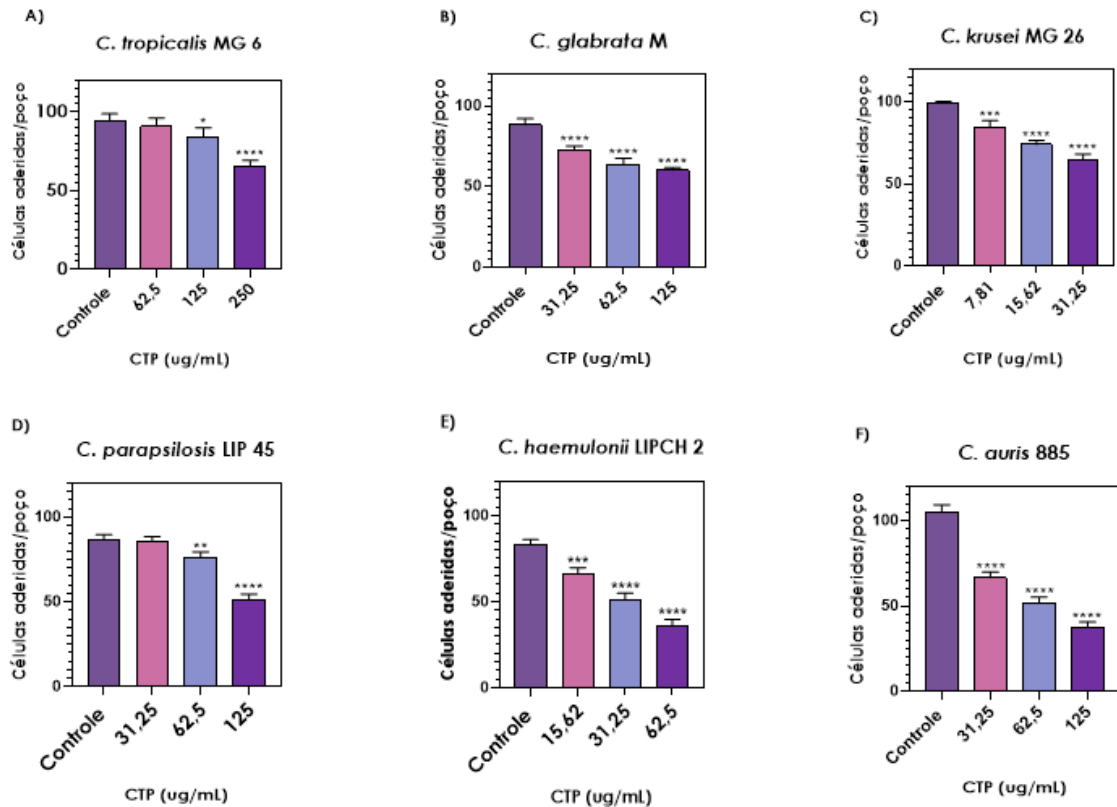
**Figura 7. Efeito de CTP na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em espécies do gênero *Candida*.** A análise de citometria de fluxo para a produção de EROs intracelular foi realizada com o uso de DCFH-DA. As células foram tratadas com concentrações de CTP equivalentes a 1 $\times$ CIM, 2 $\times$ CIM e 4 $\times$ CIM por 3 h e coradas com DCFH-DA. Células não tratadas e células tratadas com peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) foram usadas como controles comparativos. As barras indicam os desvios padrão. Asteriscos representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) vs. Controle;  $p = 0,01$  a  $0,05$  (\*);  $p = 0,001$  a  $0,01$  (\*\*);  $p = 0,0001$  a  $0,001$  (\*\*\*) ;  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

### 5.5. Efeito de CTP sobre a adesão a substrato de poliestireno

O potencial de CTP sobre a adesão das leveduras do gênero *Candida* foi avaliado através da utilização do material poliestireno como modelo de superfície abiótica. Neste ensaio, as células foram tratadas com CTP em concentrações equivalentes a 1×CIM, 2×CIM e 4×CIM e, incubadas por 3 h em placas de poliestireno para promover a adesão celular. Posteriormente, o número de células aderidas foi quantificado com auxílio de um microscópio invertido e cinco campos aleatórios foram contabilizados.

Os resultados evidenciados na **Figura 8** demonstram que o composto testado foi capaz de reduzir a adesão das leveduras analisadas, principalmente quando utilizado em concentrações mais elevadas, configurando assim um caráter dose-dependente. Tal observação torna-se mais evidente nas análises de *C. auris* e *C. haemulonii*, nas quais o tratamento com CTP promoveu padrões de reduções variando em cerca de 38,9 a 67,6% e 19 a 62%, respectivamente, na comparação com células não tratadas de ambas as espécies (**Figura 8F e 8E**).

Para as demais espécies, o composto de coordenação testado apresenta melhor atuação quando utilizado na maior concentração de 4×CIM (**Figura 8A, 8B, 8C e 8D**). A concentração de 125 µg/mL reduziu as taxas de adesão celular de *C. glabrata* e *C. parapsilosis* em 31,5 e 43,3%, respectivamente (**Figura 8B e 8D**). Na análise de *C. krusei*, o tratamento com a concentração de 31,25 µg/mL promoveu uma diminuição de 35% sobre o número de células aderidas totais (**Figura 8C**). De maneira similar, *C. tropicalis* apresentou uma redução de 33,8% em seu processo de adesão celular, a partir do tratamento com a concentração de 250 µg/mL (**Figura 8A**).



**Figura 8. Efeito de CTP sobre a adesão de espécies de *Candida* não-*albicans*.** As células ( $10^4$ ) foram tratadas com concentrações de CTP equivalentes a 1×CIM, 2×CIM e 4×CIM e incubadas em placas de poliestireno por 3 h a 37°C para avaliar o processo de adesão celular. Posteriormente, os sistemas foram lavados e o número de células aderidas foi quantificado com auxílio de um microscópio invertido. Os resultados foram expressos como número de células totais aderidas/campo levando-se em consideração cada isolado clínico estudado. Células não tratadas foram usadas como controle comparativo. As barras indicam os desvios padrão. Asterisco representa uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) vs. Controle;  $p = 0,01$  a  $0,05$  (\*);  $p = 0,001$  a  $0,01$  (\*\*);  $p = 0,0001$  a  $0,001$  (\*\*\*) ;  $p = < 0,0001$  (\*\*\*\*).

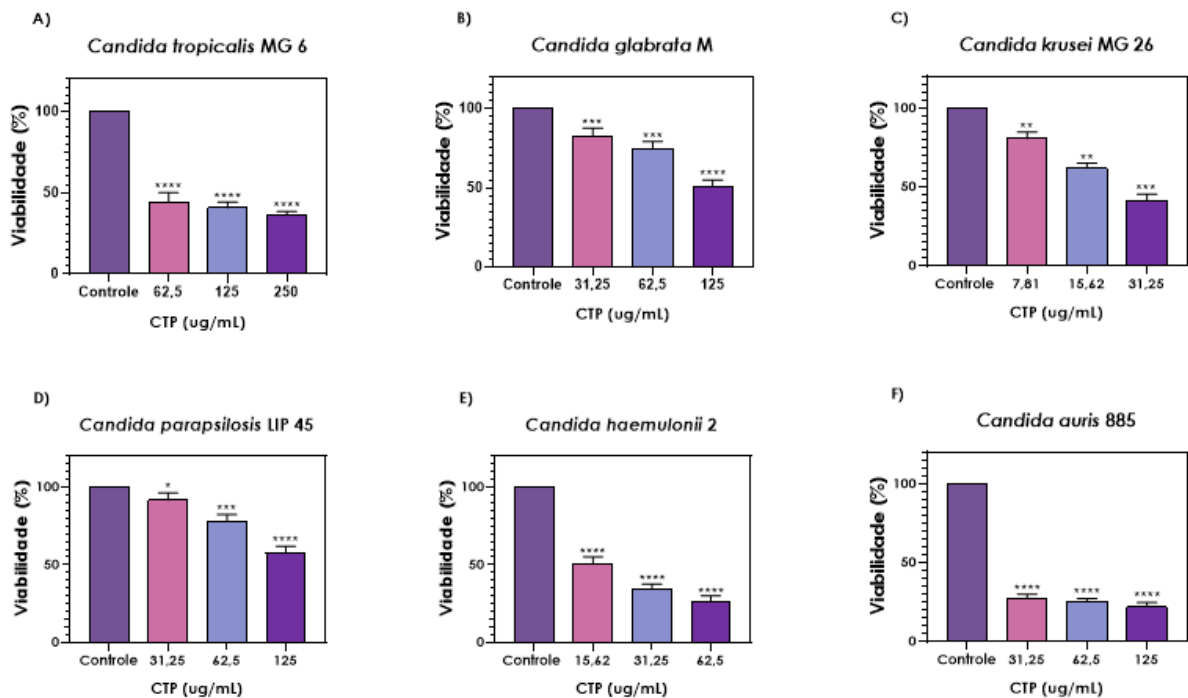
## 5.6. Efeito inibitório de CTP sobre a viabilidade do biofilme

O impacto de CTP sobre a viabilidade celular das leveduras do gênero *Candida*, durante o processo de formação de biofilme, foi avaliado através do ensaio de redução de XTT. Nesta análise, as células foram tratadas com CTP em concentrações equivalentes a 1×CIM, 2×CIM e 4×CIM e, incubadas por 48 h para a formação de biofilme. Posteriormente, a utilização do XTT permitiu avaliar o percentual de células metabolicamente ativas.

Os resultados apresentados na **Figura 9** evidenciaram a maior eficácia de CTP sobre as espécies *C. auris*, *C. haemulonii* e *C. tropicalis*, durante o desenvolvimento inicial dos biofilmes (**Figura 9F, 9E e 9A**). Mais especificamente, observa-se que o tratamento com concentrações de 31,25 a 125 µg/mL gerou um impacto significativo sobre o biofilme de *C. auris*, uma vez que todas as estratégias de tratamento com o composto foram capazes de gerar reduções superiores a 70% nas taxas de viabilidade, quando comparado ao grupo controle (**Figura 9F**). De maneira

similar, a viabilidade celular do biofilme de *C. haemulonii* foi reduzida em cerca de 49,6 a 73,3%, a partir do tratamento com CTP em concentrações de 15,62 a 62,5  $\mu\text{g/mL}$  (**Figura 9E**). Ademais, a aplicação de doses de 62,5 a 250  $\mu\text{g/mL}$  do composto também foi capaz de gerar alterações percentuais significativas para *C. tropicalis*, visto que mais de 50% da viabilidade de seu biofilme foi inibida em todos os tratamentos com o composto, onde o mesmo parece funcionar de maneira dose-dependente (**Figura 9A**).

Paras as demais amostras, o composto de coordenação testado apresentou melhor atuação quando utilizado na maior concentração de 4 $\times$ CIM (**Figura 9B, 9C e 9D**). A concentração de 125  $\mu\text{g/mL}$  reduziu as taxas de viabilidade celular dos biofilmes de *C. glabrata* e *C. parapsilosis* em 49,3 e 42,4%, respectivamente (**Figura 9B e 9D**). Na análise de *C. krusei*, o tratamento com a concentração de 31,25  $\mu\text{g/mL}$  levou a uma inibição de 58,6% na atividade metabólica celular (**Figura 9C**). Tais observações levam à suposição de que o composto atue com caráter dose-dependente.



**Figura 9. Efeito de CTP sobre a viabilidade celular durante a formação de biofilmes de espécies de *Candida* não-*albicans*.** As células foram tratadas com concentrações de CTP equivalentes a 1 $\times$ CIM, 2 $\times$ CIM e 4 $\times$ CIM por 48 h de formação de biofilme. A viabilidade celular foi avaliada através do uso de XTT e a absorbância foi mensurada em leitor de ELISA a 492 nm. As barras de erro representam o desvio médio padrão. Células não tratadas foram usadas como controle comparativo. As barras indicam os desvios padrão. Asterisco representa uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) vs. Controle;  $p = 0.01$  a  $0.05$  (\*);  $p = 0.001$  a  $0.01$  (\*\*);  $p = 0.0001$  a  $0.001$  (\*\*\*);  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

### 5.7. Efeito inibitório de CTP sobre a biomassa do biofilme

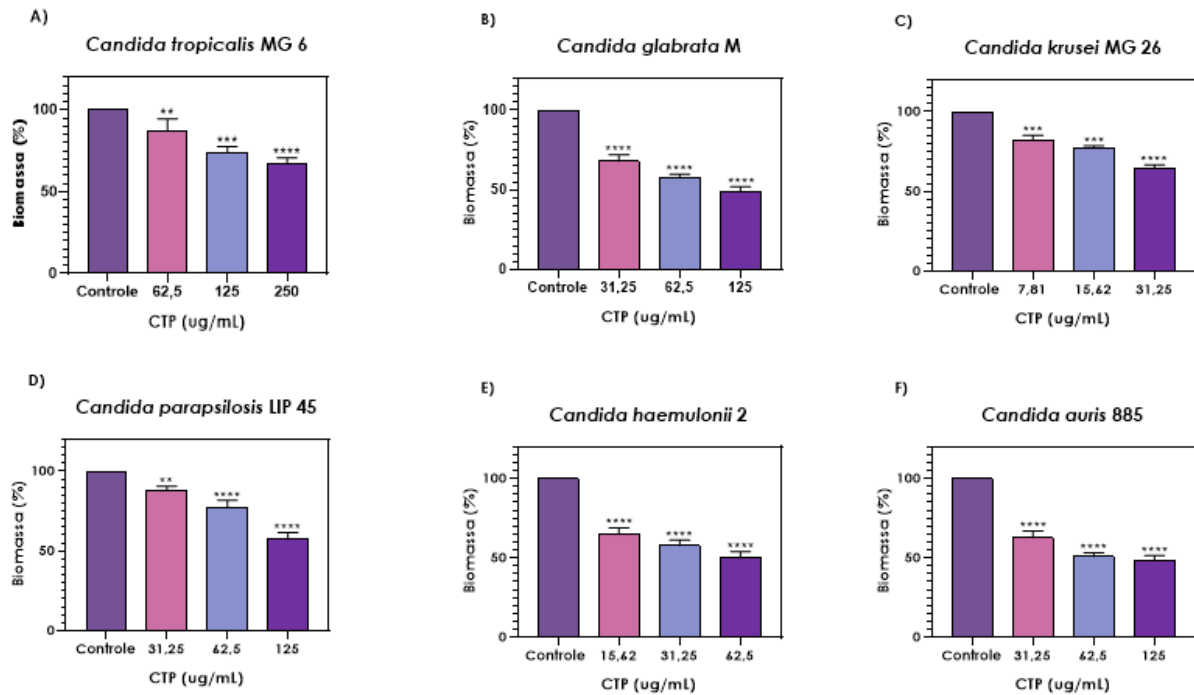
A ação de CTP sobre a biomassa celular presente no processo de formação de biofilme das leveduras do gênero *Candida*, foi avaliada através da utilização do corante cristal violeta.

Nesta análise, as células foram tratadas com CTP em concentrações equivalentes a 1×CIM, 2×CIM e 4×CIM e, incubadas por 48 h para a formação de biofilme. Posteriormente, a utilização do cristal violeta possibilitou quantificar a biomassa microbiana presente no biofilme.

Similarmente aos resultados anteriores, a análise da **Figura 10** evidenciou que o tratamento com CTP possui maior êxito sobre a desarticulação da biomassa de *C. auris*, *C. haemulonii* e *C. glabrata*, durante o processo de formação de seus biofilmes (**Figura 10F, 10E e 10B**). Tal observação torna-se ainda mais evidente no ensaio com a concentração de 4×CIM do composto, capaz de reduzir 50% da biomassa presente no biofilme para as três espécies anteriormente mencionadas. Particularmente, o tratamento com concentrações de 31,25 a 125 µg/mL gerou um impacto significativo na biomassa de *C. auris*, reduzindo-a em cerca de 37,3 a 51,6%, enquanto que as mesmas concentrações foram capazes de reduzir o biofilme de *C. glabrata* em cerca de 31,9 a 51,3% (**Figura 10E e 10B**). Do mesmo modo, uma variação de inibição de 34,6 a 50% sobre a biomassa celular do biofilme de *C. haemulonii* pode ser observada a partir do tratamento com CTP nas concentrações de 15,62 a 62,5 µg/mL (**Figura 10E**). Tais observações demonstram que o composto possui uma atuação dose-dependente, indo de acordo com as análises anteriores.

Paras as demais espécies, o composto de coordenação testado demonstrou melhor desempenho nas concentrações de 2×CIM e 4×CIM (**Figura 10A, 10C e 10D**). A concentração de 125 µg/mL foi capaz de reduzir 42,5% do biofilme de *C. parapsilosis* (**Figura 10D**). Na análise de *C. krusei*, o tratamento com as concentrações de 15,62 e 31,25 µg/mL produziram uma diminuição de 22,6 a 35,5% sobre a biomassa microbiana presente no biofilme (**Figura 10C**). Em paralelo, o tratamento com CTP em concentrações de 125 e 250 µg/mL gerou uma inibição de cerca de 26,6 a 32,5% no biofilme de *C. tropicalis* (**Figura 10A**).





**Figura 10. Efeito de CTP sobre a biomassa celular de espécies de *Candida* não-*albicans* durante o processo de formação de biofilmes.** As células foram tratadas com concentrações de CTP equivalentes a 1×CIM, 2×CIM, 4×CIM e 8×CIM por 48 h de formação de biofilme. A quantificação da biomassa foi avaliada através do uso de cristal violeta e a absorbância foi mensurada em leitor de ELISA a 590 nm. As barras de erro representam o desvio médio padrão. Células não tratadas foram usadas como controle comparativo. As barras indicam os desvios padrão. Asterisco representa uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) vs. Controle;  $p = 0,01$  a  $0,05$  (\*);  $p = 0,001$  a  $0,01$  (\*\*);  $p = 0,0001$  a  $0,001$  (\*\*\*) ;  $p = < 0,0001$  (\*\*\*\*).

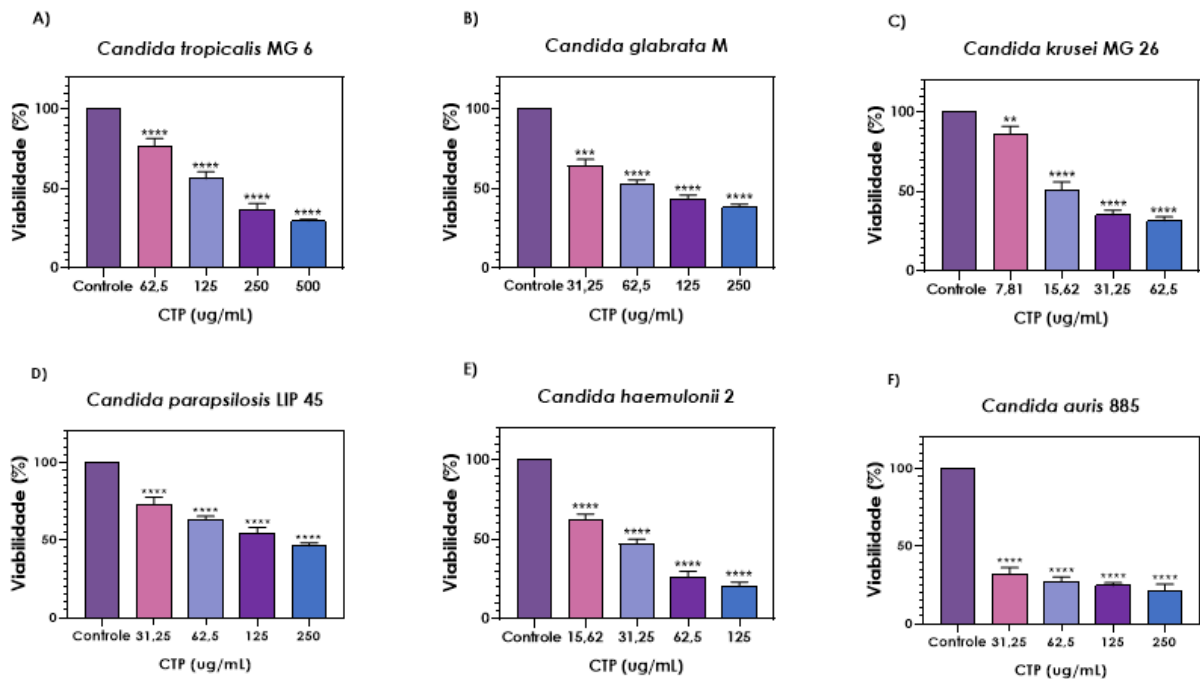
### 5.8. Efeito inibitório de CTP sobre a viabilidade do biofilme maduro

Para investigar o potencial do CTP na desarticulação de biofilmes pré-formados das leveduras do gênero *Candida*, cerca de  $10^6$  células foram incubadas por 48 h para promover a formação de biofilme, sendo posteriormente tratadas com CTP por 24 h em concentrações equivalentes a 1×CIM, 2×CIM, 4×CIM e 8×CIM. Posteriormente, a viabilidade celular foi novamente avaliada através do ensaio de redução de XTT.

Na **Figura 11**, os resultados demonstraram que o tratamento com CTP possui caráter promissor frente ao gênero *Candida*, uma vez que o composto foi capaz de atuar de forma dose-dependente, reduzindo a viabilidade celular dos biofilmes maduros em geral. De forma similar as análises de formação de biofilme, a espécie *C. auris* destacou-se como mais suscetível ao composto de coordenação testado, uma vez que o tratamento com concentrações crescentes de 31,25 até 250  $\mu\text{g/mL}$  resultou em diminuições significativas sobre a atividade metabólica de seu biofilme, com taxas de redução variando de 68 a 78,5% (**Figura 11F**). Ademais, o efeito dose-dependente do composto também pode ser facilmente observado nas demais espécies analisadas. O tratamento com concentrações de 15,62 a 125  $\mu\text{g/mL}$  foi capaz de reduzir a viabilidade celular

presente no biofilme de *C. haemulonii* em cerca de 37,7 a 79,4% (**Figura 11E**), enquanto que a atividade metabólica de *C. tropicalis* foi inibida em cerca de 23,4 a 70,2%, quando o biofilme foi tratado com concentrações de 62,5 a 500 µg/mL (**Figura 11A**).

Em paralelo, observou-se que cerca de 26,9 a 53,8% do metabolismo de *C. parapsilosis* sofreu inibições mediante ensaios de tratamento com CTP em concentrações sucessivas de 31,25 a 250 µg/mL (**Figura 11D**), enquanto que as mesmas concentrações do composto promoveram reduções sobre as taxas metabólicas do biofilme de *C. glabrata*, variando de 35,7 a 61,6% (**Figura 11B**). Quanto a espécie *C. krusei*, a utilização de CTP apresentou melhor desempenho nas maiores concentrações de 15,62, 31,25 e 62,5 µg/mL, sendo possível observar reduções percentuais de cerca de 48,9 a 68,3% em células metabolicamente ativas no biofilme, ao fim do período de interação com a molécula-alvo (**Figura 11C**).



**Figura 11. Efeito de CTP sobre a viabilidade celular de biofilmes pré-formados de espécies de *Candida* não-*albicans*.** As células foram incubadas por 48 h de formação de biofilme e posteriormente tratadas com concentrações de CTP equivalentes a 1×CIM, 2×CIM, 4×CIM e 8×CIM por 24 h. A viabilidade celular foi avaliada através do uso de XTT e a absorbância foi mensurada em leitor de ELISA a 492 nm. As barras de erro representam o desvio médio padrão. Células não tratadas foram usadas como controle comparativo. As barras indicam os desvios padrão. Asterisco representa uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) vs. Controle;  $p = 0,01$  a  $0,05$  (\*);  $p = 0,001$  a  $0,01$  (\*\*);  $p = 0,0001$  a  $0,001$  (\*\*\*) ;  $p = < 0,0001$  (\*\*\*\*).

### 5.9. Efeito inibitório de CTP sobre a desarticulação da biomassa do biofilme maduro

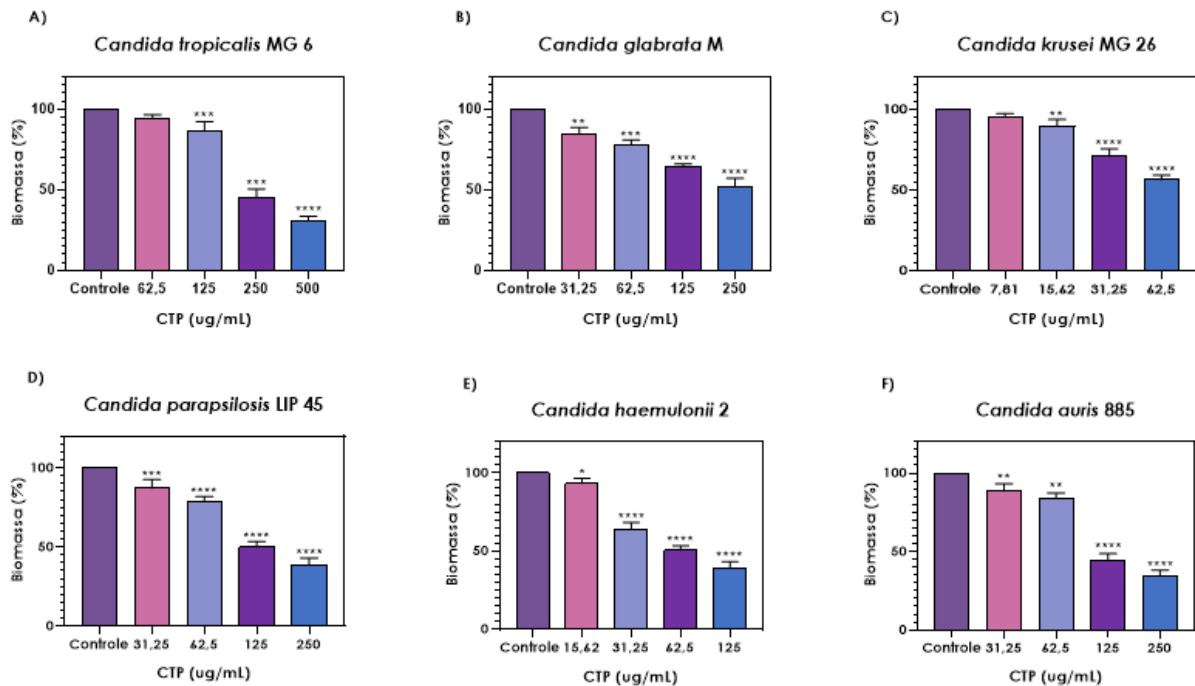
Para investigar o potencial de CTP na desarticulação de biofilmes pré-formados das leveduras do gênero *Candida*, cerca de  $10^6$  células foram incubadas por 48 h para promover a formação de biofilme, sendo posteriormente tratadas com CTP por 24 h em concentrações

equivalentes a 1×CIM, 2×CIM, 4×CIM e 8×CIM. Posteriormente, a quantificação da biomassa foi novamente avaliada através do uso do corante cristal violeta.

Como demonstrado na **Figura 12**, o composto de coordenação apresentou melhor desempenho de tratamento sobre os biofilmes das seis espécies analisadas a partir das maiores concentrações de 4×CIM e 8×CIM. Em conformidade com ensaios anteriores, *C. auris* apresentou maior susceptibilidade ao tratamento com CTP, uma vez que as concentrações de 125 e 250 µg/mL foram capazes de desarticular o biofilme pré-formado, com taxas de reduções da biomassa de 55,5 e 65,3% (**Figura 12F**). Em paralelo, estas mesmas concentrações também agiram sobre a biomassa do biofilme de *C. parapsilosis*, provocando diminuições de 50 e 61,1%, na comparação com células não tratadas (**Figura 12D**).

Para *C. tropicalis*, o tratamento com CTP a 250 e 500 µg/mL resultou em percentuais significativos de desarticulação do biofilme, com redução da biomassa celular em cerca de 54,5 e 69% (**Figura 12A**). Com o mesmo efeito dose-dependente, a quantificação do biofilme da espécie *C. haemulonii* sofreu uma diminuição expressiva de 49,5 e 61%, a partir do tratamento com as concentrações de 62,5 e 125 µg/mL (**Figura 12E**).

Para as demais espécies, o composto de coordenação testado também apresentou desempenho mais relevante quando utilizado em concentrações de 4×CIM e 8×CIM (**Figura 12B e 12C**). Assim, observou-se que as concentrações de 125 e 250 µg/mL foram capazes de inibir o biofilme de *C. glabrata* em 35,6 e 47,9% (**Figura 12B**), enquanto que 29,4 e 43,8% do biofilme de *C. krusei* sofreu alterações após o tratamento com doses de 31,25 e 62,5 µg/mL de CTP, respectivamente (**Figura 12C**).



**Figura 12. Efeito de CTP sobre a biomassa celular em biofilmes pré-formados de espécies de *Candida* não-*albicans*.** As células foram incubadas por 48 h de formação de biofilme e posteriormente tratadas com concentrações de CTP equivalentes a 1×CIM, 2×CIM, 4×CIM e 8×CIM por 24 h. A viabilidade celular foi avaliada através do uso de cristal violeta e a absorbância foi mensurada em leitor de ELISA a 590 nm. As barras de erro representam o desvio médio padrão. Células não tratadas foram usadas como controle comparativo. As barras indicam os desvios padrão. Asterisco representa uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) vs. Controle;  $p = 0.01$  a  $0.05$  (\*);  $p = 0.001$  a  $0.01$  (\*\*);  $p = 0.0001$  a  $0.001$  (\*\*\*);  $p = < 0,0001$  (\*\*\*\*).

### 5.10. Avaliação da toxicidade do composto de coordenação CTP em larvas de *G. mellonella*

A fim de determinar o grau de toxicidade do composto de coordenação CTP sobre as larvas de *G. mellonella*, os animais foram inoculados (10 µL por larva) com suspensões contendo diferentes concentrações do composto (31,25 a 250 µg/mL). Após 120 h de incubação, a mortalidade foi avaliada pela ausência de movimento dos animais mediante estímulo com uma pinça.

Mediante isto, os resultados destacaram que o composto não apresentou níveis de toxicidade durante todo o período avaliado, uma vez que mesmo a utilização das maiores concentrações (125 e 250 µg/mL) foi bem tolerada por todos os animais. Após 120 h de incubação, destacou-se que nenhum dos animais foi a óbito nos diferentes sistemas utilizados. Tal propriedade demonstrou o potencial de utilização inicial de CTP em células animais.

## 6. DISCUSSÃO

Infecções fúngicas oportunistas representam um sério problema de saúde pública mundial, visto que o número reduzido de drogas antifúngicas eficazes e o aumento progressivo na emergência de perfis de resistência tem cada vez mais limitado as opções terapêuticas para pacientes acometidos por estes quadros (Ramos *et al.*, 2015; Gandra *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2020; Babii *et al.*, 2021). A problemática associada ao tratamento de pacientes acometidos por infecções por espécies de *Candida* não-*albicans* destacam a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Neste contexto, estudos anteriores já foram capazes de demonstrar o potencial da molécula de teofilina, assim como as propriedades antimicrobianas de compostos contendo íons de cobre, com ligantes do “tipo-fenantrolina”, contra isolados clínicos do gênero *Candida*, tais como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. haemulonii* (Gandra *et al.*, 2017; Anthony *et al.*, 2020; Gandra *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2020; Frei *et al.*, 2022). Diante destes fatos, o presente estudo buscou avaliar o potencial antifúngico de um composto de coordenação, contendo o íon metálico cobre e ligantes como as moléculas 1,10-fenantrolina e teofilina, contra isolados clínicos de seis diferentes espécies de *Candida* não-*albicans*, resistentes ao fluconazol.

Dados presentes na literatura evidenciam a alta resistência das leveduras do gênero *Candida* ao antifúngico fluconazol (Pappas *et al.*, 2018; Alfouzan *et al.*, 2019; Babii *et al.*, 2021; Espinel-Ingroff, Cantón e Pemán, 2021; Liu *et al.*, 2021). Em corroboração com tais dados, todas as amostras utilizadas neste trabalho se mostraram resistentes a este antifúngico de referência. Em contrapartida, uma relevante atividade antifúngica foi observada a partir de CTP contra todos os isolados clínicos testados *in vitro*, sendo evidenciado através dos valores de CIM e CFM. Dessa forma, o composto foi capaz de inibir o crescimento planctônico das cepas testadas em concentrações de 7,81 a 62,5 µg/mL, enquanto que a capacidade fungicida sofreu variação de 15,62 a 62,5 µg/mL. Além disso, também se observou que os mesmos valores de CIM do composto promoveram uma atividade fungicida frente ao crescimento planctônico das espécies *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. haemulonii* e *C. auris*. Sabe-se que a formulação de compostos de coordenação promove uma atividade inibitória mais forte contra diferentes microrganismos, em comparação com a aplicação das mesmas moléculas de maneira isolada, sendo este uma possível explicação para o efeito observado (Gandra *et al.*, 2017; Gandra *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2020; Andrejević *et al.*, 2021; Granato *et al.*, 2021; Frei *et al.*, 2022).

Uma vez que a maioria dos antifúngicos azólicos e poliênicos são capazes de causar desequilíbrios a membrana plasmática fúngica (Shafiei *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2020), o impacto de CTP sobre essa estrutura essencial foi avaliado, na tentativa de identificar seu possível modo de ação. Neste contexto, o ensaio de PI foi utilizado como um indicador de dano celular, uma vez que este marcador é incapaz de penetrar células íntegras, ao passo que pode penetrar facilmente em células com membranas danificadas e se ligar ao DNA destas, emitindo fluorescência característica (Ma *et al.*, 2020). Assim, os resultados apresentados demonstraram que concentrações crescentes do composto foram capazes de gerar um aumento gradual no número de células fluorescentes, sendo este fenômeno mais evidenciado na análise das espécies *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. haemulonii*. Tal padrão também pode ser observado na literatura, de forma similar aos resultados obtidos no presente estudo. A utilização de complexos à base de cobre já foi capaz de comprometer a integridade da membrana plasmática de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, através de alterações na permeabilidade de suas membranas e diminuição nos níveis de ergosterol presente nas mesmas (Anthony *et al.*, 2020; Dileepan *et al.*, 2021; Stevanović *et al.*, 2021; Gaspar-Cordeiro *et al.*, 2022; Nareetsile *et al.*, 2022; Shanholtzer *et al.*, 2022). Tratamentos à base de teofilina contra *C. albicans* demonstraram o potencial antifúngico desta molécula, onde a mesma age sobre a membrana plasmática fúngica como um de seus principais alvos, promovendo variações em sua permeabilidade, alterações na composição de ergosterol e desequilíbrios no transporte dos íons sódio e potássio, capazes de regular o potencial da membrana plasmática (Singh *et al.*, 2020). Além disso, diferentes estudos têm evidenciado que compostos de coordenação contendo o metal cobre e/ou derivados da molécula de fenantreno possuem atividade antifúngica contra as espécies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, através de mecanismos de ação variados, incluindo o aumento da permeabilidade da membrana celular, assim como a geração de alterações morfológicas em sua estrutura (Setiawati *et al.*, 2017; Turecka *et al.*, 2018; Dar *et al.*, 2019). Cabe ressaltar ainda que os mesmos trabalhos têm destacado o potencial antifúngico superior da complexação de tais compostos com moléculas bioativas quando comparadas a aplicação das mesmas de maneira independente.

O impacto do CTP sobre a atividade metabólica mitocondrial das leveduras do gênero *Candida* foi avaliado através do ensaio de redução de XTT, visto que a mitocôndria é uma organela essencial para a homeostase de células eucarióticas e seu comprometimento afeta diretamente a obtenção de energia para processos vitais (Sun *et al.*, 2019). Logo, a utilização de XTT possibilita uma correlação direta com células metabolicamente ativas. Mediante a isto, o composto produziu impactos mais significativos para o metabolismo de *C. auris* e *C.*

*parapsilosis*, gerando assim um possível comprometimento mitocondrial em ambas as espécies. De maneira similar, pesquisas prévias já foram capazes de evidenciar o alto potencial de complexos metálicos à base de cobre e outros metais, assim como da molécula de teofilina contra diversos ciclos e eventos metabólicos da espécie *C. albicans*, resultando em alterações do processo de respiração celular (Gerwien *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2020; Ashrafi *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2022). O potencial de compostos de coordenação contendo molécula de 1,10-fenantrolina e outros derivados do fenantreno também já foi previamente demonstrado, em que a complexação da molécula com diferentes íons metálicos apresenta grande eficácia na redução da viabilidade celular do crescimento planctônico e em biofilmes de espécies fúngicas como *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. haemulonii* e *P. verrucosa* (Gandra *et al.*, 2017; Granato *et al.*, 2017; Eni Bekindaka *et al.*, 2018; Meade *et al.*, 2021; Falkievich *et al.*, 2022). Embora ainda não exista um consenso na literatura, alguns projetos ressaltam a aplicação de complexos metálicos e sua associação com ligantes orgânicos contra a espécie multirresistente *C. auris*, destacando o potencial de tais compostos na indução da disrupção do metabolismo mitocondrial como uma estratégia promissora para reprimir a proliferação celular desta levedura (Frei *et al.*, 2020; Granato *et al.*, 2021; Kamli *et al.*, 2021; Malik *et al.*, 2022; Simm *et al.*, 2022)

EROs são produzidas como consequência de disrupções ou alterações fisiológicas em diversos processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, inflamação, envelhecimento e morte (Seong e Lee, 2018; Gaspar-Cordeiro *et al.*, 2020). A concentração moderada de EROs também está relacionada a respostas fisiológicas naturais do organismo através de mecanismos de defesa da resposta imunológica e processos de sinalização celular (Seong e Lee, 2018). Logo, a produção de EROs induzida por CTP foi avaliada na suspeita de seu possível mecanismo de ação, através da utilização de uma sonda fluorescente. Nas análises de citometria de fluxo, o tratamento com CTP em concentrações de 2×CIM e 4×CIM foi capaz de gerar processos de estresse oxidativo mais relevantes para as espécies *C. haemulonii* e *C. parapsilosis*, quando comparadas com células não tratadas. Sabe-se que tratamentos com complexos metálicos contendo íons de cobre já foram capazes de inibir diferentes espécies do gênero *Candida* como *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, sendo capazes de induzir a produção de EROs, culminando na interrupção do crescimento e morte celular (Seong e Lee, 2018; Gaspar-Cordeiro *et al.*, 2020; Garcia-Marin *et al.*, 2022). De forma similar, grupos de pesquisa já evidenciaram o potencial antimicrobiano associado com a indução de estresse oxidativo derivado da complexação de íons metálicos com ligantes do “tipo-fenantrolina” sobre diferentes patógenos de relevância na clínica médica, tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* (Savic *et al.*, 2018; Sheng *et al.*,

2019; Galdino *et al.*, 2022). Além disso, sabe-se que complexos de teofilina são capazes de inibir processos metabólicos da espécie *C. albicans*, o que pode apresentar uma correlação direta com a produção de estresse oxidativo e inibição do metabolismo respiratório da espécie (Singh *et al.*, 2020; Majodina *et al.*, 2021).

Em síntese, nossas análises sobre os mecanismos de ação de CTP demonstraram o seu potencial no impacto do processo de respiração celular dos isolados clínicos, promovendo alterações em sua atividade mitocondrial e gerando um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, sendo estas observações mais evidentes nos ensaios com *C. parapsilosis*, *C. haemulonii* e *C. auris*. Da mesma forma, os ensaios com as leveduras *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. haemulonii* destacaram a capacidade do composto na promoção de danos na integridade da membrana plasmática das espécies estudadas. Estudos anteriores a respeito do modo de ação dos compostos de coordenação já haviam revelado que estas moléculas não só possuem ação sobre a atividade mitocondrial, o metabolismo respiratório celular, e o aumento da permeabilidade de membrana plasmática, mas também são capazes de restringir o crescimento celular microbiano por interferir com a síntese proteica, clivagem de proteínas e interação do DNA (Kharissova *et al.*, 2014; Gandra *et al.*, 2017; Andrejević *et al.*, 2021; Granato *et al.*, 2021; Cetin *et al.*, 2022; Frei *et al.*, 2022; Galdino *et al.*, 2022). Dessa forma, observou-se que o composto de coordenação testado apresenta um amplo prospecto de mecanismos de ação, diferenciados dos fármacos azólicos e poliênicos, sendo necessárias futuras análises para compreender totalmente o seu potencial e contribuir no desenvolvimento de novas opções terapêuticas com ação sobre os aspectos da biologia celular do gênero *Candida*.

Outro importante atributo de virulência corresponde ao processo de adesão celular, sendo este uma etapa crucial para que muitos microrganismos estabeleçam um processo infeccioso (Sionov *et al.*, 2020). Mediante a etapa de adesão inicial, os microrganismos são capazes de desenvolver processos de infecção, além de persistirem em superfícies bióticas e abióticas, principalmente em ambientes hospitalares (Kamauchi *et al.*, 2022). Desta maneira, nosso estudo avaliou a capacidade de adesão do isolados clínicos ao poliestireno, assim como o efeito de CTP sobre a adesão celular de espécies de *Candida* não-*albicans*. Os resultados obtidos demonstraram que o composto promoveu a diminuição da adesão celular das leveduras, através de um mecanismo com caráter dose-dependente. Tal propriedade foi mais efetiva na análise de *C. auris* e *C. haemulonii*, nas quais os tratamentos com CTP promoveram padrões de reduções variando em cerca de 38,9 a 67,6% e 19 a 62% em seu processo de adesão, respectivamente.



Estudos anteriores já haviam demonstrado o potencial de adesão das espécies *C. auris* e do complexo *C. haemulonii* em superfície de poliestireno, sendo este um fator também observado no presente estudo (Larkin *et al.*, 2017; Ramos *et al.*, 2020). Pesquisas recentes também já foram capazes de evidenciar o potencial de nanopartículas de prata e cobre contra o processo de adesão celular e formação de biofilme da espécie *C. albicans* (Padmavathi *et al.*, 2020). Ademais, sabe-se que complexos contendo moléculas de 1,10-feantrolina e/ou teofilina atuam como potentes inibidores dos processos de proliferação e crescimento celular das leveduras do gênero *Candida*, tais como *C. albicans*, *C. haemulonii*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* (Gandra *et al.*, 2017; Savic *et al.*, 2018; Gandra *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2020). Contudo, cabe ressaltar que ainda há uma defasagem literária de pesquisas com enfoque específico no potencial dos compostos de coordenação contra os processos de adesão celular das leveduras do gênero *Candida*. Por isso, espera-se que os resultados do presente projeto possam auxiliar a preencher tal lacuna.

Sabe-se que a adesão celular é a etapa predecessora a geração de biofilmes. O processo de formação de biofilmes é um fator de virulência bem estabelecido de diversos microrganismos, conferindo maior proteção a resposta imunológica do hospedeiro, assim como da ação de drogas antifúngicas (Mello *et al.*, 2017; Ramos *et al.*, 2017). A matriz extracelular do biofilme, composta por polissacarídeos, proteínas e DNA, é capaz de restringir que drogas administradas aos pacientes acessem as células do patógeno de maneira eficaz, configurando assim o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes como um grande desafio (Ramos *et al.*, 2020). Ademais, a formação de biofilmes em dispositivos médicos invasivos, como cateteres, possibilita que células patogênicas penetrem na circulação sanguínea, aumentando as chances da disseminação do agente infeccioso para sítios internos do hospedeiro (Ramos *et al.*, 2017; Sing *et al.*, 2020). Um alto percentual de leveduras do gênero *Candida* apresenta capacidade considerável de formar biofilmes e, por esse motivo, CTP também foi avaliado quanto a sua capacidade de inibir o crescimento das células em processos de formação e desarticulação de biofilmes, através dos parâmetros de quantificação da biomassa e viabilidade celular.

Os dados obtidos no presente estudo demonstraram que CTP foi capaz de promover reduções na viabilidade celular e na biomassa dos biofilmes produzidos pelos seis isolados clínicos avaliados, através de um efeito dose-dependente. Com base na variação percentual das análises de formação de biofilme, uma potente atividade antifúngica foi observada com o composto, sendo a ordem de redução da viabilidade celular dos isolados clínicos: *C. auris* > *C. haemulonii* > *C. tropicalis* > *C. krusei* > *C. glabrata* > *C. parapsilosis*. De forma similar, CTP

também promove padrões de redução relevantes sobre a biomassa celular das leveduras testadas, sendo a ordem de inibição das espécies: *C. auris* > *C. haemulonii* > *C. glabrata* > *C. krusei* > *C. parapsilosis* > *C. tropicalis*.

Posteriormente, observou-se que o composto de coordenação estudado também possui um potencial antifúngico relevante sobre a desarticulação de biofilmes maduros para as seis espécies analisadas, sendo a ordem de redução da viabilidade celular: *C. auris* > *C. haemulonii* > *C. tropicalis* > *C. krusei* > *C. glabrata* > *C. parapsilosis*. Paralelamente, CTP também promoveu redução significativa sobre a desarticulação da biomassa celular dos biofilmes maduros das seis leveduras, sendo a ordem de inibição das espécies: *C. auris* > *C. parapsilosis* > *C. haemulonii* > *C. glabrata* > *C. tropicalis* > *C. krusei*.

Corroborando com os percentuais apresentados no presente estudo, um amplo número de projetos disponíveis na literatura já destacou os efeitos de compostos contendo complexos de cobre, ligantes derivados do fenantreno e moléculas de teofilina contra a formação e a desarticulação dos biofilmes formados pelas espécies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. haemulonii*, *C. auris* e *C. tropicalis*, destacando também o potencial de complexação destas moléculas para o aprimoramento de suas propriedades antifúngicas (Gandra *et al.*, 2017; Savic *et al.*, 2018; Gandra *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2020; Kamli *et al.*, 2021; Stevanović *et al.*, 2021; Aldossary *et al.*, 2022; Frei *et al.*, 2022). Além disso, é interessante destacar que o composto de coordenação testado demonstrou uma atividade eficaz contra o processo de adesão celular dos isolados clínicos e tal observação pode estar associada com os perfis de redução da biomassa microbiana observada durante os ensaios de biofilme. Ademais, também foi observado que o composto parece atuar de forma mais eficaz sobre a redução da viabilidade celular dos biofilmes das leveduras, quando comparado com as análises de quantificação da biomassa. Tal observação fomenta a hipótese de que CTP induza alterações no metabolismo celular das espécies do gênero *Candida* como um de seus principais mecanismos de ação, sendo este um efeito observado tanto nas análises sobre o crescimento planctônico, quanto em processos de biofilmes, pertencentes ao presente estudo. Entretanto, testes futuros são necessários para confirmar a veracidade deste possível padrão de ação proposto.

Dessa forma, as análises de formação e desarticulação dos biofilmes demonstraram que CTP é altamente eficaz contra as espécies *C. haemulonii* e *C. auris*. Tal constatação possui um alto grau de relevância, uma vez que trabalhos anteriores destacam o impacto da formação de biofilmes como um fator de resistência destas espécies contra antifúngicos da classe dos azóis, polienos e até mesmo representantes da classe das equinocandinas, além de ressaltar a necessidade do desenvolvimento de novas moléculas com propriedades antifúngicas contra

estes patógenos (Ramos *et al.*, 2015; Lockhart *et al.*, 2017; Ramos *et al.*, 2017 Chowdhary *et al.*, 2018; Khan *et al.*, 2018; Alfouzan *et al.*, 2019; Du *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2020; Ramos *et al.*, 2022). Neste sentido, diferentes complexos metálicos, incluindo os compostos de coordenação à cobre contendo ligantes de 1,10-fenantrolina e/ou teofilina, têm sido descritos nos últimos anos como agentes terapêuticos de eficácia contra o crescimento planctônico e biofilmes de *C. haemulonii* e *C. auris*, fundamentando o potencial observado no presente estudo (Gandra *et al.*, 2017; Savic *et al.*, 2018; Gandra *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2020; Kamli *et al.*, 2021; Aldossary *et al.*, 2022; Bandara e Smaranayake, 2022; Frei *et al.*, 2022).

Em última análise, os experimentos com o modelo *in vivo* de larvas de *G. mellonella* foram realizados a fim de avaliar a toxicidade do composto de coordenação CTP. O uso de larvas de *G. mellonella* em ensaios de avaliação de toxicidade de compostos apresenta diversas vantagens em comparação com outros modelos *in vivo*, como a facilidade de obtenção dos animais, seu baixo custo de manutenção e a ausência de necessidade de treinamento e equipamentos específicos (Gandra *et al.*, 2020; Muñoz *et al.*, 2020). Os resultados dos ensaios de infecção demonstraram que o composto apresenta boa tolerância pelo modelo animal, uma vez que mesmo na maior concentração utilizada (250 µg/mL), todas as larvas sobreviveram nos diferentes sistemas. A toxicidade de compostos de coordenação à cobre, prata e manganês contendo ligantes de 1,10-fenantrolina, em concentrações equivalentes ao presente estudo, já tinham sido classificados em baixa toxicidade em publicações prévias que também fizeram uso do modelo de *G. mellonella* (Gandra *et al.*, 2020; Granato *et al.*, 2021). De forma similar, o uso da molécula de teofilina em ensaios de infecção com o modelo de *Caenorhabditis elegans* demonstrou o caráter não-tóxico da molécula através de projetos previamente publicados (Singh *et al.*, 2020). Assim, o atual projeto demonstra o caráter promissor de utilização de CTP em células animais, sendo necessários futuros ensaios em diferentes modelos *in vivo* para retificar tal observação.

Por fim, destaca-se que o presente estudo demonstrou o potencial de CTP contra as espécies de *Candida* não-*albicans* resistentes ao fluconazol. Neste sentido, o composto apresenta uma ação dose-dependente, sendo capaz de inibir o crescimento planctônico das leveduras, e seus possíveis mecanismos de ação contra aspectos relevantes da biologia celular dos isolados clínicos foram investigados. Ademais, este trabalho também evidenciou o potencial do composto contra a formação de biofilme e a desarticulação de biofilmes maduros formados pelas leveduras do gênero *Candida*, demonstrando o impacto da molécula sobre os parâmetros de adesão, quantificação da biomassa e viabilidade celular, nos quais CTP apresenta

maior eficácia contra as espécies *C. auris* e *C. haemulonii*. Por último, a boa tolerância do composto de coordenação foi ressaltada através do uso de um modelo *in vivo*.

## 7. CONCLUSÃO

- O composto de coordenação CTP apresentou potente atividade antifúngica, com caráter dose-dependente, contra o crescimento planctônico e em biofilme das espécies de *Candida não-albicans*;
- CTP promoveu alterações significativas sobre a integridade da membrana plasmática de *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. haemulonii*;
- A atividade metabólica mitocondrial de *C. auris* e *C. parapsilosis* sofreu reduções expressivas a partir do tratamento com CTP;
- O CTP foi capaz de induzir aumentos relevantes na produção de espécies reativas de oxigênio nas espécies *C. haemulonii* e *C. parapsilosis*;
- CTP promoveu reduções no processo de adesão celular de leveduras do gênero *Candida* e tal efeito foi mais significativo em *C. haemulonii* e *C. auris*;
- Sobre o efeito do composto sobre a formação do biofilme, foi possível notar uma maior redução sobre a viabilidade celular quando comparada às análises de biomassa;
- CTP apresentou efeito dose-dependente eficaz contra a viabilidade de células presentes em biofilmes maduros bem como induziu a desarticulação da biomassa, principalmente nas espécies *C. haemulonii* e *C. auris*;
- A utilização do modelo *in vivo* de *G. mellonella* demonstrou a boa tolerância do composto de coordenação para células animais, visto que mesmo as maiores concentrações do composto não resultaram no óbito de nenhum dos animais.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aldossary, H. A., Rehman, S., Jermy, B. R., AlJindan, R., Aldayel, A., AbdulAzeez, S., Akhtar, S., Khan, F. A., Borgio, J. F., e Al-Suhaimi, E. A. (2022). Therapeutic Intervention for Various Hospital Setting Strains of Biofilm Forming *Candida auris* with Multiple Drug Resistance Mutations Using Nanomaterial Ag-Silicalite-1 Zeolite. *Pharmaceutics*, 14(10), Art. 10.
- Allegra, E., Titball, R. W., Carter, J., e Champion, O. L. (2018). *Galleria mellonella* larvae allow the discrimination of toxic and non-toxic chemicals. *Chemosphere*, 198, 469–472.
- Alfouzan, W., Dhar, R., Albarrag, A., e Al-Abdely, H. (2019). The emerging pathogen *Candida auris*: A focus on the Middle-Eastern countries. *Journal of Infection and Public Health*, 12(4), 451–459.
- Al-Siyabi, T., Busaidi, I. A., Balkhair, A., Al-Muharrmi, Z., Al-Salti, M., e Al'Adawi, B. (2017). First report of *Candida auris* in Oman: Clinical and microbiological description of five candidemia cases. *Journal of Infection*, 75(4), 373–376.
- Alves, R., Barata-Antunes, C., Casal, M., Brown, A. J. P., Dijck, P. V., e Paiva, S. (2020). Adapting to survive: How *Candida* overcomes host-imposed constraints during human colonization. *PLOS Pathogens*, 16(5), e1008478.
- Andrejević, T. P., Aleksic, I., Počkaj, M., Kljun, J., Milivojevic, D., Stevanović, N. L., Nikodinovic-Runic, J., Turel, I., Djuran, M. I., e Glišić, B. Đ. (2021). Tailoring copper(II) complexes with pyridine-4,5-dicarboxylate esters for anti-*Candida* activity. *Dalton Transactions*, 50(7), 2627–2638.
- Anthony, E. J., Bolitho, E. M., Bridgewater, H. E., Carter, O. W. L., Donnelly, J. M., Imberti, C., Lant, E. C., Lermyte, F., Needham, R. J., Palau, M., Sadler, P. J., Shi, H., Wang, F.-X., Zhang, W.-Y., e Zhang, Z. (2020). Metallo drugs are unique: Opportunities and challenges of discovery and development. *Chemical Science*, 11(48), 12888–12917.
- Gordon, A. T., Abosedo, O. O., Ntsimango, S., Hosten, E. C., Myeza, N., Eyk, A. van, Harmse, L., e Ogunlaja, A. S. (2022). Synthesis and anticancer evaluation of copper(II)- and manganese(II)- theophylline mixed ligand complexes. *Polyhedron*, 214, 115649.
- Ashrafi, M., Bayat, M., Mortazavi, P., Hashemi, S. J., e Meimandipour, A. (2020). Antimicrobial effect of chitosan–silver–copper nanocomposite on *Candida albicans*. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 10(1), 87–95.
- Babii, C., Savu, M., Motrescu, I., Birsa, L. M., Sarbu, L. G., e Stefan, M. (2021). The Antibacterial Synthetic Flavonoid BrCl-Flav Exhibits Important Anti-*Candida* Activity by Damaging Cell Membrane Integrity. *Pharmaceutics*, 14(11), 1130.
- Bandara, N., e Samaranyake, L. (2022). Emerging and future strategies in the management of recalcitrant *Candida auris*. *Medical Mycology*, 60(4), myac008.
- Barnes, P. J. (2013). Theophylline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 188(8), 901–906.
- Bergamasco, M. D., Garnica, M., Colombo, A. L., e Nucci, M. (2013). Epidemiology of candidemia in patients with hematologic malignancies and solid tumours in Brazil. *Mycoses*, 56(3), 256–263.
- Billamboz, M., Fatima, Z., Hameed, S., e Jawhara, S. (2021). Promising Drug Candidates and New Strategies for Fighting against the Emerging Superbug *Candida auris*. *Microorganisms*, 9(3), 634.

Bohner, F., Papp, C., e Gácsér, A. (2022). The effect of antifungal resistance development on the virulence of *Candida* species. *FEMS Yeast Research*, 22(1), foac019.

Calandra, T., Roberts, J. A., Antonelli, M., Bassetti, M., e Vincent, J.-L. (2016). Diagnosis and management of invasive candidiasis in the ICU: An updated approach to an old enemy. *Critical Care (London, England)*, 20(1), 125.

Calgin, M. K., e Cetinkol, Y. (2018). Distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* species at a university hospital in Northern Turkey. *Journal of Infection in Developing Countries*, 12(2), 97–101.

Cantón, E., Pemán, J., Quindós, G., Eraso, E., Miranda-Zapico, I., Álvarez, M., Merino, P., Campos-Herrero, I., Marco, F., de la Pedrosa, E. G. G., Yagüe, G., Guna, R., Rubio, C., Miranda, C., Pazos, C., Velasco, D., e FUNGEMYCA Study Group. (2011). Prospective multicenter study of the epidemiology, molecular identification, and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* isolated from patients with candidemia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(12), 5590–5596.

Carolus, H., Pierson, S., Lagrou, K., e Van Dijck, P. (2020). Amphotericin B and Other Polyenes-Discovery, Clinical Use, Mode of Action and Drug Resistance. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 6(4), 321.

Cetin, M. M., Peng, W., Unruh, D., Mayer, M. F., Mechref, Y., e Yelekci, K. (2022). Design, synthesis, molecular modeling, and bioactivity evaluation of 1,10-phenanthroline and prodigiosin (Ps) derivatives and their Copper(I) complexes against mTOR and HDAC enzymes as highly potent and effective new anticancer therapeutic drugs. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 980479.

Chang, Y.-L., Hsu, Y.-J., Chen, Y., Wang, Y.-W., e Huang, S.-M. (2017). Theophylline exhibits anti-cancer activity via suppressing SRSF3 in cervical and breast cancer cell lines. *Oncotarget*, 8(60), 101461–101474.

Chen, M., Xu, Y., Hong, N., Yang, Y., Lei, W., Du, L., Zhao, J., Lei, X., Xiong, L., Cai, L., Xu, H., Pan, W., e Liao, W. (2018). Epidemiology of fungal infections in China. *Frontiers of Medicine*, 12(1), 58–75.

Chen, X., Zhang, X., Chen, J., Yang, Q., Yang, L., Xu, D., Zhang, P., Wang, X., e Liu, J. (2017). Hinokitiol copper complex inhibits proteasomal deubiquitination and induces paraptosis-like cell death in human cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, 815, 147–155.

Chowdhary, A., Anil Kumar, V., Sharma, C., Prakash, A., Agarwal, K., Babu, R., Dinesh, K. R., Karim, S., Singh, S. K., Hagen, F., e Meis, J. F. (2014). Multidrug-resistant endemic clonal strain of *Candida auris* in India. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 33(6), 919–926.

Chudal, L., Pandey, N. K., Phan, J., Johnson, O., Lin, L., Yu, H., Shu, Y., Huang, Z., Xing, M., Liu, J. P., Chen, M.-L., e Chen, W. (2020). Copper-Cysteamine Nanoparticles as a Heterogeneous Fenton-Like Catalyst for Highly Selective Cancer Treatment. *ACS Applied Bio Materials*, 3(3), 1804–1814.

Coyle, B., Kavanagh, K., McCann, M., Devereux, M., e Geraghty, M. (2003). Mode of anti-fungal activity of 1,10-phenanthroline and its Cu(II), Mn(II) and Ag(I) complexes. *Biomaterials: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine*, 16(2), 321–329.

Creaven, B. S., Devereux, M., Karcz, D., Kellett, A., McCann, M., Noble, A., e Walsh, M. (2009). Copper(II) complexes of coumarin-derived Schiff bases and their anti-*Candida* activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103(9), 1196–1203.

Dagi, H. T., Findik, D., Senkeles, C., e Arslan, U. (2016). Identification and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from bloodstream infections in Konya, Turkey. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 15(1), 36.

Dar, O. A., Lone, S. A., Malik, M. A., Wani, M. Y., Talukdar, M. I. A., Al-Bogami, A. S., Hashmi, A. A., e Ahmad, A. (2019). Heteroleptic transition metal complexes of Schiff-base-derived ligands exert their antifungal activity by disrupting membrane integrity. *Applied Organometallic Chemistry*, 33(11), e5128.

Decat, E., Van Mechelen, E., Saerens, B., Vermeulen, S. J. T., Boekhout, T., De Blaiser, S., Vanechoutte, M., e Deschaght, P. (2013). Rapid and accurate identification of isolates of *Candida* species by melting peak and melting curve analysis of the internally transcribed spacer region 2 fragment (ITS2-MCA). *Research in Microbiology*, 164(2), 110–117.

Dileepan, A. G. B., Ganeshkumar, A., Ranjith, R., Maruthamuthu, D., Rajaram, R., & Rajam, S. (2021). Killing effects of *Candida albicans* through alteration of cellular morphology and growth metabolism using Tris-NHC ligand coordinated to AgI and CuI. *Journal of Molecular Structure*, 1225, 129117.

Durieux, M.-F., Melloul, É., Jemel, S., Roisin, L., Dardé, M.-L., Guillot, J., Dannaoui, É., e Botterel, F. (2021). *Galleria mellonella* as a screening tool to study virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. *Virulence*, 12(1), 818–834.

Eni, D., Yufanyi, D., Tabong, C., Jagan, R., & Agwara, M. (2018). Synthesis, Crystal Structures, Thermal and Antimicrobial Properties of Mn(II) Complexes of 1,10-Phenanthroline With Some Co-Ligands. *International Journal of Chemistry*, 10(4), Art. 4.

Enoch, D. A., Yang, H., Aliyu, S. H., & Micallef, C. (2017). The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1508, 17–65.

Espinel-Ingroff, A., Cantón, E., e Pemán, J. (2021). Antifungal Resistance among Less Prevalent *Candida Non-albicans* and Other Yeasts versus Established and under Development Agents: A Literature Review. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 7(1), 24.

Falkievich, D. B., Martínez Medina, J. J., Alegre, W. S., López Tévez, L. L., Franca, C. A., Ferrer, E. G., e Williams, P. A. M. (2022). Computational studies, antimicrobial activity, inhibition of biofilm production, and safety profile of the cadmium complex of 1,10-phenanthroline and cyanoguanidine. *Applied Organometallic Chemistry*, 36(6), e6695.

Firacative, C. (2020). Invasive fungal disease in humans: Are we aware of the real impact? *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 115, e200430.

Frei, A., Elliott, A. G., Kan, A., Dinh, H., Bräse, S., Bruce, A. E., Bruce, M. R., Chen, F., Humaidy, D., Jung, N., King, A. P., Lye, P. G., Maliszewska, H. K., Mansour, A. M., Matiadis, D., Muñoz, M. P., Pai, T.-Y., Pokhrel, S., Sadler, P. J. e Blaskovich, M. A. T. (2022). Metal Complexes as Antifungals? From a Crowd-Sourced Compound Library to the First *In Vivo* Experiments. *JACS Au*, 2(10), 2277–2294.

Frías-De-León, M. G., Hernández-Castro, R., Conde-Cuevas, E., García-Coronel, I. H., Vázquez-Aceituno, V. A., Soriano-Ursúa, M. A., Farfán-García, E. D., Ocharán-Hernández, E., Rodríguez-Cerdeira, C., Arenas, R., Robledo-Cayetano, M., Ramírez-Lozada, T., Meza-Meneses, P., Pinto-Almazán, R., e Martínez-Herrera, E. (2021). *Candida glabrata* Antifungal Resistance and Virulence Factors, a Perfect Pathogenic Combination. *Pharmaceutics*, 13(10), 1529.

Friedman, D. Z. P., e Schwartz, I. S. (2019). Emerging Fungal Infections: New Patients, New Patterns, and New Pathogens. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 5(3), 67.



Galdino, A. C. M., Viganor, L., Pereira, M. M., Devereux, M., McCann, M., Branquinha, M. H., Molphy, Z., O'Carroll, S., Bain, C., Menounou, G., Kellett, A., & dos Santos, A. L. S. (2022). Copper(II) and silver(I)-1,10-phenanthroline-5,6-dione complexes interact with double-stranded DNA: Further evidence of their apparent multimodal activity towards *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 27(1), 201–213.

Gandra, R. M., Mc Carron, P., Fernandes, M. F., Ramos, L. S., Mello, T. P., Aor, A. C., Branquinha, M. H., McCann, M., Devereux, M., e Santos, A. L. S. (2017). Antifungal Potential of Copper(II), Manganese(II) and Silver(I) 1,10-Phenanthroline Chelates Against Multidrug-Resistant Fungal Species Forming the *Candida haemulonii* Complex: Impact on the Planktonic and Biofilm Lifestyles. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1257.

Gandra, R. M., McCarron, P., Viganor, L., Fernandes, M. F., Kavanagh, K., McCann, M., Branquinha, M. H., Santos, A. L. S., Howe, O., e Devereux, M. (2020). *In vivo* Activity of Copper(II), Manganese(II), and Silver(I) 1,10-Phenanthroline Chelates Against *Candida haemulonii* Using the *Galleria mellonella* Model. *Frontiers in Microbiology*, 11, 470.

Garcia-Marin, L. E., Juarez-Moreno, K., Vilchis-Nestor, A. R., e Castro-Longoria, E. (2022). Highly Antifungal Activity of Biosynthesized Copper Oxide Nanoparticles against *Candida albicans*. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 12(21), 3856.

Gaspar-Cordeiro, A., da Silva, S., Aguiar, M., Rodrigues-Pousada, C., Haas, H., Lima, L. M. P., e Pimentel, C. (2020). A copper(II)-binding triazole derivative with ionophore properties is active against *Candida* spp. *Journal of Biological Inorganic Chemistry: JBIC: A Publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 25(8), 1117–1128.

Gerwien, F., Skrahina, V., Kasper, L., Hube, B., e Brunke, S. (2018). Metals in fungal virulence. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(1), fux050.

Giacomazzi, J., Baethgen, L., Carneiro, L. C., Millington, M. A., Denning, D. W., Colombo, A. L., Pasqualotto, A. C., e Association With The LIFE Program. (2016). The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses*, 59(3), 145–150.

Glišić, B. Đ., e Djuran, M. I. (2014). Gold complexes as antimicrobial agents: An overview of different biological activities in relation to the oxidation state of the gold ion and the ligand structure. *Dalton Transactions*, 43(16), 5950–5969.

Gonzalez-Lara, M. F., e Ostrosky-Zeichner, L. (2020). Invasive Candidiasis. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 41(1), 3–12.

Gow, N. A. R., e Netea, M. G. (2016). Medical mycology and fungal immunology: New research perspectives addressing a major world health challenge. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 371(1709), 20150462.

Granato, M. Q., Gonçalves, D. de S., Seabra, S. H., McCann, M., Devereux, M., dos Santos, A. L. S., e Kneipp, L. F. (2017). 1,10-Phenanthroline-5,6-Dione-Based Compounds Are Effective in Disturbing Crucial Physiological Events of *Phialophora verrucosa*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 76.

Granato, M. Q., Mello, T. P., Nascimento, R. S., Pereira, M. D., Rosa, T. L. S. A., Pessolani, M. C. V., McCann, M., Devereux, M., Branquinha, M. H., Santos, A. L. S., e Kneipp, L. F. (2021). Silver(I) and Copper(II) Complexes of 1,10-Phenanthroline-5,6-Dione Against *Phialophora verrucosa*: A Focus on the Interaction With Human Macrophages and *Galleria mellonella* Larvae. *Frontiers in Microbiology*, 12, 641258.

Guerrieri, C. G., Pereira, M. F., Galdino, A. C. M., dos Santos, A. L. S., Elias, W. P., Schuenck, R. P., e Spano, L. C. (2019). Typical and Atypical Enteroaggregative *Escherichia coli* Are Both Virulent in the *Galleria mellonella* Model. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1791.

- Hameed, S., Hans, S., Monasky, R., Thangamani, S., e Fatima, Z. (2021). Understanding Human Microbiota Offers Novel and Promising Therapeutic Options against *Candida* Infections. *Pathogens*, 10(2), 183.
- Hamdy, R. F., Zaoutis, T. E., e Seo, S. K. (2016). Antifungal stewardship considerations for adults and pediatrics. *Virulence*, 8(6), 658–672.
- Hirsh, L., Dantes, A., Suh, B.-S., Yoshida, Y., Hosokawa, K., Tajima, K., Kotsuji, F., Merimsky, O., e Amsterdam, A. (2004). Phosphodiesterase inhibitors as anti-cancer drugs. *Biochemical Pharmacology*, 68(6), 981–988.
- Hoehne, Lucélia e Dall’oglio, Camila. (2013) Compostos de coordenação e a química orgânica. *Revista Destaques Acadêmicos*, 5(4); 79-83.
- Jamiu, A. T., Albertyn, J., Sebolai, O. M., e Pohl, C. H. (2021). Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. *Medical Mycology*, 59(1), 14–30.
- Jenks, J. D., Cornely, O. A., Chen, S. C.-A., Thompson, G. R., e Hoenigl, M. (2020). Breakthrough invasive fungal infections: Who is at risk? *Mycoses*, 63(10), 1021–1032.
- Jiang, Y., Huo, Z., Qi, X., Zuo, T., e Wu, Z. (2022). Copper-induced tumor cell death mechanisms and antitumor theragnostic applications of copper complexes. *Nanomedicine (London, England)*, 17(5), 303–324.
- Jungwirth, U., Kowol, C. R., Keppler, B. K., Hartinger, C. G., Berger, W., e Heffeter, P. (2011). Anticancer activity of metal complexes: Involvement of redox processes. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(4), 1085–1127.
- Kamauchi, H., Furukawa, M., Kiba, Y., Kitamura, M., Usui, K., Katakura, M., Takao, K., e Sugita, Y. (2022). Antifungal activity of dehydrocurvularin for *Candida* spp. Through the inhibition of adhesion to human adenocarcinoma cells. *The Journal of Antibiotics*, 75(9), 530–533.
- Kamli, M. R., Srivastava, V., Hajrah, N. H., Sabir, J. S. M., Hakeem, K. R., Ahmad, A., e Malik, M. A. (2021). Facile Bio-Fabrication of Ag-Cu-Co Trimetallic Nanoparticles and Its Fungicidal Activity against *Candida auris*. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 7(1), 62.
- Khanina, A., Tio, S. Y., Ananda-Rajah, M. R., Kidd, S. E., Williams, E., Chee, L., Urbancic, K., Thursky, K. A., e Australasian Antifungal Guidelines Steering Committee. (2021). Consensus guidelines for antifungal stewardship, surveillance and infection prevention, 2021. *Internal Medicine Journal*, 51 Suppl 7, 18–36.
- Katiyar, S. K., e Edlind, T. D. (2001). Identification and expression of multidrug resistance-related ABC transporter genes in *Candida krusei*. *Medical Mycology*, 39(1), 109–116.
- Khan, Z. U., Al-Sweih, N. A., Ahmad, S., Al-Kazemi, N., Khan, S., Joseph, L., e Chandy, R. (2007). Outbreak of fungemia among neonates caused by *Candida haemulonii* resistant to amphotericin B, itraconazole, and fluconazole. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(6), 2025–2027.
- Kharissova, O. V., Méndez-Rojas, M. A., Kharisov, B. I., Méndez, U. O., e Martínez, P. E. (2014). Metal complexes containing natural and artificial radioactive elements and their applications. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(8), 10755–10802.
- Kim, J.-J., Kim, Y.-S., e Kumar, V. (2019). Heavy metal toxicity: An update of chelating therapeutic strategies. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology: Organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 54, 226–231.

Kim, M.-N., Shin, J. H., Sung, H., Lee, K., Kim, E.-C., Ryoo, N., Lee, J.-S., Jung, S.-I., Park, K. H., Kee, S. J., Kim, S. H., Shin, M. G., Suh, S. P., e Ryang, D. W. (2009). *Candida haemulonii* and closely related species at 5 university hospitals in Korea: Identification, antifungal susceptibility, and clinical features. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 48(6), e57-61.

Kwadha, C. A., Ong'amo, G. O., Ndegwa, P. N., Raina, S. K., e Fombong, A. T. (2017). The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*. *Insects*, 8(2), 61.

Larkin, E., Hager, C., Chandra, J., Mukherjee, P. K., Retuerto, M., Salem, I., Long, L., Isham, N., Kovanda, L., Borroto-Esoda, K., Wring, S., Angulo, D., e Ghannoum, M. (2017). The Emerging Pathogen *Candida auris*: Growth Phenotype, Virulence Factors, Activity of Antifungals, and Effect of SCY-078, a Novel Glucan Synthesis Inhibitor, on Growth Morphology and Biofilm Formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(5), e02396-16.

Lebon, F., Boggetto, N., Ledecq, M., Durant, F., Benatallah, Z., Sicsic, S., Lapouyade, R., Kahn, O., Mouithys-Mickalad, A., Deby-Dupont, G., e Reboud-Ravaux, M. (2002). Metal-organic compounds: A new approach for drug discovery. N1-(4-methyl-2-pyridyl)-2,3,6-trimethoxybenzamide copper(II) complex as an inhibitor of human immunodeficiency virus 1 protease. *Biochemical Pharmacology*, 63(10), 1863–1873.

Li, F., Collins, J. G., e Keene, F. R. (2015). Ruthenium complexes as antimicrobial agents. *Chemical Society Reviews*, 44(8), 2529–2542.

Li, X.-H., e Lee, J.-H. (2017). Antibiofilm agents: A new perspective for antimicrobial strategy. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 55(10), 753–766.

Lin, Y., Betts, H., Keller, S., Cariou, K., e Gasser, G. (2021). Recent developments of metal-based compounds against fungal pathogens. *Chemical Society Reviews*, 50(18), 10346–10402.

Liu, F., Zhong, L., Zhou, F., Zheng, C., Zhang, K., Cai, J., Zhou, H., Tang, K., Dong, Z., Cui, W., e Zhang, G. (2021). Clinical Features, Strain Distribution, Antifungal Resistance and Prognosis of Patients with Non-albicans Candidemia: A Retrospective Observational Study. *Infection and Drug Resistance*, 14, 3233–3246.

Lockhart, S. R., Etienne, K. A., Vallabhaneni, S., Farooqi, J., Chowdhary, A., Govender, N. P., Colombo, A. L., Calvo, B., Cuomo, C. A., Desjardins, C. A., Berkow, E. L., Castanheira, M., Magobo, R. E., Jabeen, K., Asghar, R. J., Meis, J. F., Jackson, B., Chiller, T., e Litvintseva, A. P. (2017). Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 64(2), 134–140.

Logan, C., Martin-Loeches, I., e Bicanic, T. (2020). Invasive candidiasis in critical care: Challenges and future directions. *Intensive Care Medicine*, 46(11), 2001–2014.

Ma, H., Zhao, X., Yang, L., Su, P., Fu, P., Peng, J., Yang, N., e Guo, G. (2020). Antimicrobial Peptide AMP-17 Affects *Candida albicans* by Disrupting Its Cell Wall and Cell Membrane Integrity. *Infection and Drug Resistance*, 13, 2509–2520.

Majodina, S., Ndima, L., Abosede, O. O., Hosten, E. C., Lorentino, C. M. A., Frota, H. F., Sangenito, L. S., Branquinho, M. H., Santos, A. L. S., e Ogunlaja, A. S. (2021). Physical stability enhancement and antimicrobial properties of a sodium ionic cocrystal with theophylline. *CrystEngComm*, 23(2), 335–352.

Malik, M. A., Batterjee, M. G., Kamli, M. R., Alzahrani, K. A., Danish, E. Y., e Nabi, A. (2022). Polyphenol-Capped Biogenic Synthesis of Noble Metallic Silver Nanoparticles for Antifungal Activity against *Candida auris*. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 8(6), 639.

- Maraki, S., Mavromanolaki, V. E., Stafylaki, D., Nioti, E., Hamilos, G., e Kasimati, A. (2019). Epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Candida* isolates from Greek women with vulvovaginal candidiasis. *Mycoses*, 62(8), 692–697.
- Mareković, I., Pleško, S., Rezo Vranješ, V., Herljević, Z., Kuliš, T., e Jandrić, M. (2021). Epidemiology of Candidemia: Three-Year Results from a Croatian Tertiary Care Hospital. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 7(4), 267.
- Martí-Carrizosa, M., Sánchez-Reus, F., March, F., Cantón, E., e Coll, P. (2015). Implication of *Candida parapsilosis* FKS1 and FKS2 mutations in reduced echinocandin susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(6), 3570–3573.
- Martinez-Bulit, P., Garza-Ortíz, A., Mijangos, E., Barrón-Sosa, L., Sánchez-Bartéz, F., Gracia-Mora, I., Flores-Parra, A., Contreras, R., Reedijk, J., e Barba-Behrens, N. (2015). 2,6-Bis(2,6-diethylphenyliminomethyl)pyridine coordination compounds with cobalt(II), nickel(II), copper(II), and zinc(II): Synthesis, spectroscopic characterization, X-ray study and in vitro cytotoxicity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 142, 1–7.
- McCann, M., Geraghty, M., Devereux, M., O'Shea, D., Mason, J., e O'Sullivan, L. (2000). Insights into the mode of action of the anti-*Candida* activity of 1,10-phenanthroline and its metal chelates. *Metal-Based Drugs*, 7(4), 185–193.
- McCann, M., McGinley, J., Ni, K., O'Connor, M., Kavanagh, K., McKee, V., Colleran, J., Devereux, M., Gathergood, N., Barron, N., Prisecaru, A., e Kellett, A. (2013). A new phenanthroline-oxazine ligand: Synthesis, coordination chemistry and atypical DNA binding interaction. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 49(23), 2341–2343.
- Meade, E., Savage, M., Slattery, M., e Garvey, M. (2021). Investigation of Alternative Therapeutic and Biocidal Options to Combat Antifungal-Resistant Zoonotic Fungal Pathogens Isolated from Companion Animals. *Infectious Disease Reports*, 13(2), 348–366.
- Mora-Navarro, C., Caraballo-León, J., Torres-Lugo, M., e Ortiz-Bermúdez, P. (2015). Synthetic antimicrobial  $\beta$ -peptide in dual-treatment with fluconazole or ketoconazole enhances the in vitro inhibition of planktonic and biofilm *Candida albicans*. *Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society*, 21(12), 853–861.
- Muñoz, J. E., Ramirez, L. M., Dias, L. D. S., Rivas, L. A., Ramos, L. S., Santos, A. L. S., Taborda, C. P., e Parra-Giraldo, C. M. (2020). Pathogenicity Levels of Colombian Strains of *Candida auris* and Brazilian Strains of *Candida haemulonii* Species Complex in Both Murine and *Galleria mellonella* Experimental Models. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 6(3), 104.
- Muro, M. D., Motta, F. de A., Burger, M., Melo, A. S. de A., e Dalla-Costa, L. M. (2012). Echinocandin resistance in two *Candida haemulonii* isolates from pediatric patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(11), 3783–3785.
- Nareetsile, F. M., Matshwele, J. T. P., e Odisitse, S. (2022). Metallo-Drugs as Promising Antibacterial Agents and Their Modes of Action. *Journal of Medicinal and Chemical Sciences*, 5(6), 1109–1131.
- Ndagi, U., Mhlongo, N., e Soliman, M. E. (2017). Metal complexes in cancer therapy—An update from drug design perspective. *Drug Design, Development and Therapy*, 11, 599–616.
- Neji, S., Hadrich, I., Trabelsi, H., Abbes, S., Cheikhrouhou, F., Sellami, H., Makni, F., e Ayadi, A. (2017). Virulence factors, antifungal susceptibility and molecular mechanisms of azole resistance among *Candida parapsilosis* complex isolates recovered from clinical specimens. *Journal of Biomedical Science*, 24(1), 67.

- Ng, N. S., Wu, M. J., e Aldrich-Wright, J. R. (2018). The cytotoxicity of some phenanthroline-based antimicrobial copper(II) and ruthenium(II) complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 180, 61–68.
- Norn, S., Permin, H., Kruse, E., e Kruse, P. R. (2008). [Mercury—A major agent in the history of medicine and alchemy]. *Dansk Medicinhistorisk Arbog*, 36, 21–40.
- Nunes, M. B. M., Batista, L. M., e Pessoa, W. F. B. (2022). *Candida auris* - uma ameaça para a saúde pública no Brasil: Revisão narrativa: *Candida auris* - a public health threat in Brazil: narrative review. *Archives of Health*, 3(2), Art. 2.
- Oñatibia-Astibia, A., Franco, R., e Martínez-Pinilla, E. (2017). Health benefits of methylxanthines in neurodegenerative diseases. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(6).
- Oh, B. J., Shin, J. H., Kim, M.-N., Sung, H., Lee, K., Joo, M. Y., Shin, M. G., Suh, S. P., e Ryang, D. W. (2011). Biofilm formation and genotyping of *Candida haemulonii*, *Candida pseudohaemulonii*, and a proposed new species (*Candida auris*) isolates from Korea. *Medical Mycology*, 49(1), 98–102.
- Padmavathi, A. R., P, S. M., Das, A., Priya, A., Sushmitha, T. J., Pandian, S. K., e Toleti, S. R. (2020). Impediment to growth and yeast-to-hyphae transition in *Candida albicans* by copper oxide nanoparticles. *Biofouling*, 36(1), 56–72.
- Palmeira, V. F., Kneipp, L. F., Alviano, C. S., e dos Santos, A. L. S. (2006). The major chromoblastomycosis fungal pathogen, *Fonsecaea pedrosoi*, extracellularly releases proteolytic enzymes whose expression is modulated by culture medium composition: Implications on the fungal development and cleavage of key's host structures. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 46(1), 21–29.
- Pappas, P. G., Lionakis, M. S., Arendrup, M. C., Ostrosky-Zeichner, L., e Kullberg, B. J. (2018). Invasive candidiasis. *Nature Reviews. Disease Primers*, 4, 18026.
- Peng, H., Su, Q., Lin, Z.-C., Zhu, X.-H., Peng, M.-S., e Lv, Z.-B. (2018). Potential suppressive effects of theophylline on human rectal cancer SW480 cells in vitro by inhibiting YKL-40 expression. *Oncology Letters*, 15(5), 7403–7408.
- Peyclit, L., Yousfi, H., Rolain, J.-M., e Bittar, F. (2021). Drug Repurposing in Medical Mycology: Identification of Compounds as Potential Antifungals to Overcome the Emergence of Multidrug-Resistant Fungi. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 14(5), 488.
- Pfaller, M. A. (2012). Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American Journal of Medicine*, 125(1 Suppl), S3-13.
- Pristov, K. E., e Ghannoum, M. A. (2019). Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25(7), 792–798.
- Ramarao, N., Nielsen-Leroux, C., e Lereclus, D. (2012). The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 70, e4392.
- Ramos, L. S., Figueiredo-Carvalho, M. H. G., Barbedo, L. S., Ziccardi, M., Chaves, A. L. S., Zancopé-Oliveira, R. M., Pinto, M. R., Sgarbi, D. B. G., Dornelas-Ribeiro, M., Branquinha, M. H., e Santos, A. L. S. (2015). *Candida haemulonii* complex: Species identification and antifungal susceptibility profiles of clinical isolates from Brazil. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(1), 111–115.

- Ramos, L. S., Oliveira, S. S. C., Souto, X. M., Branquinha, M. H., e Santos, A. L. S. (2017). Planktonic growth and biofilm formation profiles in *Candida haemulonii* species complex. *Medical Mycology*, 55(7), 785–789.
- Ramos, L. S., Oliveira, S. S. C., Silva, L. N., Granato, M. Q., Gonçalves, D. S., Frases, S., Seabra, S. H., Macedo, A. J., Kneipp, L. F., Branquinha, M. H., e Santos, A. L. S. (2020). Surface, adhesiveness and virulence aspects of *Candida haemulonii* species complex. *Medical Mycology*, 58(7), 973–986.
- Ramos, L. S., Figueiredo-Carvalho, M. H. G., Silva, L. N., Siqueira, N. L. M., Lima, J. C., Oliveira, S. S., Almeida-Paes, R., Zancopé-Oliveira, R. M., Azevedo, F. S., Ferreira, A. L. P., Branquinha, M. H., e Santos, A. L. S. (2022). The Threat Called *Candida haemulonii* Species Complex in Rio de Janeiro State, Brazil: Focus on Antifungal Resistance and Virulence Attributes. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 8(6), 574.
- Ramos, L. de S., Silva, L. N., Mello, T. P. de, Frota, H. F., Branquinha, M. H., e Santos, A. L. S. (2022). Prospective Medicines against the Widespread, Emergent, and Multidrugresistant Opportunistic Fungal Pathogen *Candida auris*: A Breath of Hope. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 22(16), 1297–1305.
- Rayens, E., Norris, K. A., e Cordero, J. F. (2022). Mortality Trends in Risk Conditions and Invasive Mycotic Disease in the United States, 1999-2018. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 74(2), 309–318.
- Rayens, E., e Norris, K. A. (2022). Prevalence and Healthcare Burden of Fungal Infections in the United States, 2018. *Open Forum Infectious Diseases*, 9(1), ofab593.
- Renfrew, A. K. (2014). Transition metal complexes with bioactive ligands: Mechanisms for selective ligand release and applications for drug delivery. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, 6(8), 1324–1335.
- Roberto, A. E. M., Xavier, D. E., Vidal, E. E., Vidal, C. F. de L., Neves, R. P., e Lima-Neto, R. G. de. (2020). Rapid Detection of Echinocandins Resistance by MALDI-TOF MS in *Candida parapsilosis* Complex. *Microorganisms*, 8(1), 109.
- Ruan, S.-Y., Kuo, Y.-W., Huang, C.-T., Hsiue, H.-C., e Hsueh, P.-R. (2010). Infections due to *Candida haemulonii*: Species identification, antifungal susceptibility and outcomes. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(1), 85–88.
- Rybak, J. M., Dickens, C. M., Parker, J. E., Caudle, K. E., Manigaba, K., Whaley, S. G., Nishimoto, A. T., Luna-Tapia, A., Roy, S., Zhang, Q., Barker, K. S., Palmer, G. E., Sutter, T. R., Homayouni, R., Wiederhold, N. P., Kelly, S. L., e Rogers, P. D. (2017). Loss of C-5 Sterol Desaturase Activity Results in Increased Resistance to Azole and Echinocandin Antifungals in a Clinical Isolate of *Candida parapsilosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(9), e00651-17.
- Sangeetha, S., e Murali, M. (2018). Non-covalent DNA binding, protein interaction, DNA cleavage and cytotoxicity of [Cu(quamol)Cl]·H<sub>2</sub>O. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107(Pt B), 2501–2511.
- Santos, A. L. S., Kneipp, L. F., d'Avila-Levy, C. M., Sodre, C. L., e Branquinha, M. H. (2017). EDITORIAL: Old Drugs × New Perspectives/New Compounds × Old Necessities: Focusing on Combating Microbial Resistance - Part II. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17(11), 1235–1236.
- Sarma, S., Kumar, N., Sharma, S., Govil, D., Ali, T., Mehta, Y., e Rattan, A. (2013). Candidemia caused by amphotericin B and fluconazole resistant *Candida auris*. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 31(1), 90–91.
- Savić, N. D., Vojnovic, S., Glišić, B. Đ., Crochet, A., Pavic, A., Janjić, G. V., Pekmezović, M., Opsenica, I. M., Fromm, K. M., Nikodinovic-Runic, J., e Djuran, M. I. (2018). Mononuclear silver(I) complexes with 1,7-phenanthroline as potent inhibitors of *Candida* growth. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 156, 760–773.

- Seagle, E. E., Williams, S. L., e Chiller, T. M. (2021). Recent Trends in the Epidemiology of Fungal Infections. *Infectious Disease Clinics of North America*, 35(2), 237–260.
- Seong, M., e Lee, D. G. (2018). Reactive oxygen species-independent apoptotic pathway by gold nanoparticles in *Candida albicans*. *Microbiological Research*, 207, 33–40.
- Setiawati, S., Nuryastuti, T., Ngatidjan, N., Mustofa, M., Jumina, J., e Fitriastuti, D. (2017). In Vitro Antifungal Activity of (1)-N-2-Methoxybenzyl-1,10-phenanthroline Bromide against *Candida albicans* and Its Effects on Membrane Integrity. *Mycobiology*, 45(1), 25–30.
- Shafiei, M., Peyton, L., Hashemzadeh, M., e Foroumadi, A. (2020). History of the development of antifungal azoles: A review on structures, SAR, and mechanism of action. *Bioorganic Chemistry*, 104, 104240.
- Shanholtzer, C. N., Rice, C., Watson, K., Carreon, H., e Long, T. E. (2022). Effect of copper on the antifungal activity of disulfiram (Antabuse®) in fluconazole-resistant *Candida* strains. *Medical Mycology*, 60(4), myac016.
- Sheng, Z.-G., Shen, C., Fan, R.-M., Chao, X.-J., Liu, Y.-X., e Zhu, B.-Z. (2019). The Critical Role of X Chromosome-Linked Inhibitor of Apoptosis (XIAP) in Differential Synergism Induced by Pentachlorophenol and Copper-1,10-Phenanthroline Complex in Normal and Cancer Liver Cells. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 168(2), 339–348.
- Sheehan, G., e Kavanagh, K. (2018). Analysis of the early cellular and humoral responses of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Virulence*, 9(1), 163–172.
- Silva, L. N., de Mello, T. P., de Souza Ramos, L., Branquinha, M. H., e Dos Santos, A. L. S. (2019). Current Challenges and Updates on the Therapy of Fungal Infections. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 19(7), 495–499.
- Silva, L. N., Ramos, L. de S., Oliveira, S. S. C., Magalhães, L. B., Squizani, E. D., Kmetzsch, L., Vainstein, M. H., Branquinha, M. H., e Santos, A. L. S. D. (2020). Insights into the Multi-Azole Resistance Profile in *Candida haemulonii* Species Complex. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 6(4), 215.
- Simm, C., Weerasinghe, H., Thomas, D. R., Harrison, P. F., Newton, H. J., Beilharz, T. H., & Traven, A. (2022). Disruption of Iron Homeostasis and Mitochondrial Metabolism Are Promising Targets to Inhibit *Candida auris*. *Microbiology Spectrum*, 10(2), e0010022.
- Singh, S., Fatima, Z., Ahmad, K., e Hameed, S. (2020). Repurposing of respiratory drug theophylline against *Candida albicans*: Mechanistic insights unveil alterations in membrane properties and metabolic fitness. *Journal of Applied Microbiology*, 129(4), 860–875.
- Sionov, R. V., Feldman, M., Smoum, R., Mechoulam, R., e Steinberg, D. (2020). Anandamide prevents the adhesion of filamentous *Candida albicans* to cervical epithelial cells. *Scientific Reports*, 10(1), 13728.
- Spellberg, B., e Edwards, J. E. (2002). The Pathophysiology and Treatment of *Candida* Sepsis. *Current Infectious Disease Reports*, 4(5), 387–399.
- Spellberg, B. J., Filler, S. G., e Edwards, J. E. (2006). Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 42(2), 244–251.
- Spivak, E. S., e Hanson, K. E. (2018). *Candida auris*: An Emerging Fungal Pathogen. *Journal of Clinical Microbiology*, 56(2), e01588-17.

- Stevanović, N. L., Aleksic, I., Kljun, J., Skaro Bogojevic, S., Veselinovic, A., Nikodinovic-Runic, J., Turel, I., Djuran, M. I., e Glišić, B. Đ. (2020). Copper(II) and Zinc(II) Complexes with the Clinically Used Fluconazole: Comparison of Antifungal Activity and Therapeutic Potential. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 14(1), 24.
- Strollo, S., Lionakis, M. S., Adjemian, J., Steiner, C. A., e Prevots, D. R. (2016). Epidemiology of Hospitalizations Associated with Invasive Candidiasis, United States, 2002-2012. *Emerging Infectious Diseases*, 23(1), 7–13.
- Suleyman, G., e Alangaden, G. J. (2021). Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control, and Prevention. *Infectious Disease Clinics of North America*, 35(4), 1027–1053.
- Tortorano, A. M., Prigitano, A., Morroni, G., Brescini, L., e Barchiesi, F. (2021). Candidemia: Evolution of Drug Resistance and Novel Therapeutic Approaches. *Infection and Drug Resistance*, 14, 5543–5553.
- Trevijano-Contador, N., e Zaragoza, O. (2014). Expanding the use of alternative models to investigate novel aspects of immunity to microbial pathogens. *Virulence*, 5(4), 454–456.
- Tsai, C. J.-Y., Loh, J. M. S., e Proft, T. (2016). *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*, 7(3), 214–229.
- Tsirilakis, K., Kim, C., Vicencio, A. G., Andrade, C., Casadevall, A., e Goldman, D. L. (2012). Methylxanthine inhibit fungal chitinases and exhibit antifungal activity. *Mycopathologia*, 173(2–3), 83–91.
- Turecka, K., Chylewska, A., Kawiak, A., & Waleron, K. F. (2018). Antifungal Activity and Mechanism of Action of the Co(III) Coordination Complexes With Diamine Chelate Ligands Against Reference and Clinical Strains of *Candida* spp. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1594.
- van Asbeck, E. C., Clemons, K. V., e Stevens, D. A. (2009). *Candida parapsilosis*: A review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Critical Reviews in Microbiology*, 35(4), 283–309.
- von Lilienfeld-Toal, M., Wagener, J., Einsele, H., Cornely, O. A., e Kurzai, O. (2019). Invasive Fungal Infection. *Deutsches Arzteblatt International*, 116(16), 271–278.
- Wang, Y., Li, D.-D., Jiang, Y.-Y., e Mylonakis, E. (2013). Utility of insects for studying human pathogens and evaluating new antimicrobial agents. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 135, 1–25.
- Waxman, S., e Anderson, K. C. (2001). History of the development of arsenic derivatives in cancer therapy. *The Oncologist*, 6 Suppl 2, 3–10.
- Whaley, S. G., Berkow, E. L., Rybak, J. M., Nishimoto, A. T., Barker, K. S., e Rogers, P. D. (2016). Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-albicans *Candida* Species. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2173.
- Wu, G., Xu, L., e Yi, Y. (2016). *Galleria mellonella* larvae are capable of sensing the extent of priming agent and mounting proportionate cellular and humoral immune responses. *Immunology Letters*, 174, 45–52.
- Yang, S., Veerana, M., Yu, N., Ketya, W., Park, G., Kim, S., & Kim, Y. (2022). Copper(II)-MOF Containing Glutarate and 4,4'-Azopyridine and Its Antifungal Activity. *Applied Sciences*, 12(1), Art. 1.



Zhao, F., Wang, W., Lu, W., Xu, L., Yang, S., Cai, X.-M., Zhou, M., Lei, M., Ma, M., Xu, H.-J., e Cao, F. (2018). High anticancer potency on tumor cells of dehydroabietylamine Schiff-base derivatives and a copper(II) complex. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 146, 451–459.

Zeeshan, M., Murugadas, A., Ghaskadbi, S., Rajendran, R. B., e Akbarsha, M. A. (2016). ROS dependent copper toxicity in Hydra-biochemical and molecular study. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, 185–186, 1–12.

Zuza-Alves, D. L., Silva-Rocha, W. P., e Chaves, G. M. (2017). An Update on *Candida tropicalis* Based on Basic and Clinical Approaches. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1927.