

LÍVIA DESSUPOIO PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIFÚNGICO DE AZÓIS
E SEUS ANÁLOGOS METÁLICOS SOBRE
LEVEDURAS E BIOFILME DE *Candida* spp.**



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
NOVEMBRO / 2017**

Trabalho realizado no Departamento de Parasitologia e Biologia Celular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, sob a orientação da Professora Sonia Rozental e coorientação de Taissa Vieira Machado Vila.

D426a Dessupoio Pereira, Livia
AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIFÚNGICO DE AZÓIS E SEUS
ANÁLOGOS METÁLICOS SOBRE LEVEDURAS E BIOFILME DE
Candida spp. / Livia Dessupoio Pereira. -- Rio de
Janeiro, 2017.
58 f.

Orientadora: Sonia Rozental.

Coorientadora: Taissa Vieira Machado Vila.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2017.

1. Candida. 2. Biofilme. 3. Antifúngicos. 4.
Micologia. 5. Onicomicose. I. Rozental, Sonia,
orient. II. Vieira Machado Vila, Taissa, coorient.
III. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

LÍVIA DESSUPOIO PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIFÚNGICO DE AZÓIS E SEUS ANÁLOGOS
METÁLICOS SOBRE LEVEDURAS E BIOFILME DE *Candida* spp**

Rio de Janeiro, 21 de Novembro de 2017.

(Dr. Antonio Ferreira Pereira, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes/UFRJ)

(Dra. Daniela Sales Alviano, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes/UFRJ)

(Dr. Sergio Eduardo Longo Fracalanza, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes/UFRJ)

(Dra. Eliana Barreto Bergter, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes/UFRJ)

Dedico essa monografia aos meus pais, Alessandra Dessupoio Pereira e Maurício Machado Pereira, e ao meu irmão, João Victor Dessupoio Pereira, por todo carinho, apoio e atenção que me deram ao longo desses anos de formação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me dado forças para concluir mais uma etapa na minha vida.

À minha mãe, Alessandra, por todo apoio e amor recebido por todos os meus 21 anos.

Ao meu pai, Maurício, por todos os conselhos e carinhos essenciais pra minha caminhada.

Ao meu irmão, João Victor, por sempre me incentivar para que eu dê o meu melhor.

À minha amiga-irmã, Yuli, por toda ajuda e todo amor nos meus momentos difíceis.

À minha orientadora, Dr^a Sonia Rozental, pelo auxílio e apoio durante toda minha formação acadêmica.

À minha co-orientadora, Dr^a Taissa Vieira Machado Vila, por toda paciência, apoio e principalmente ensinamento, mesmo distante.

À toda equipe do Laboratório de Biologia Celular de Fungos que, durante esses 3 anos, me proporcionaram amizades, bons momentos e contribuição pra minha formação.

Aos meus professores, por todos os ensinamentos que me fizeram crescer tanto na minha formação como na vida pessoal.

À todos os meus amigos do curso de Microbiologia e Imunologia, que levarei pra sempre no meu coração.

RESUMO

LÍVIA DESSUPOIO PEREIRA

AValiação DO EFEITO ANTIFÚNGICO DE AZÓIS E SEUS ANÁLOGOS METÁLICOS SOBRE LEVEDURAS E BIOFILME DE *Candida* spp

Orientadores: Sonia Rozental e Taissa Vila

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.

As espécies de *Candida* são importantes agentes de infecções fúngicas oportunistas superficiais e disseminadas. As leveduras de *Candida* spp. possuem a capacidade de formar biofilme, uma comunidade de microorganismos que aderem às superfícies bióticas e abióticas cobertas por uma matriz extracelular. Os biofilmes são menos suscetíveis a agentes antifúngicos, dificultando o tratamento dessas infecções. Derivados de imidazóis e triazóis são os principais antifúngicos usados para tratar infecções causadas por *Candida* spp., mas são ineficazes contra biofilmes. Estudos anteriores mostraram que os metais de transição complexados em derivados de imidazóis têm efeito sobre *Saccharomyces cerevisiae*, além de ser utilizados contra doenças parasitárias, como malária, leishmaniose e doença de Chagas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica de complexos organometálicos associados a compostos azólicos em células planctônicas e biofilmes de *Candida glabrata* e *Candida albicans*. Para este trabalho, foram utilizados Fluconazol (FLC), Itraconazol (ITR), Clotrimazol (CTZ) e Cetoconazol (KTZ) puro ou complexado com ouro (Au) e zinco (Zn). Os antifúngicos padrão e os sais de partida foram utilizados como controles experimentais. A atividade em células planctônicas foi avaliada por ensaios de microdiluição de caldo, de acordo com o documento M27-A2 proposto pelo CLSI, e biofilmes com protocolos já previamente descritos pelo grupo. A menor concentração de cada fármaco capaz de inibir 50% e 90% do crescimento de células planctônicas (CI₅₀ e CI₉₀) ou a atividade metabólica de biofilmes (CIB₅₀ e CIB₉₀) foi determinada por espectrofotometria, lida a 490 nm. Além disso, a atividade inibitória dos complexos em biofilmes formados em fragmentos de unhas foi realizada de acordo com o protocolo também descrito pelo grupo e os efeitos foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (SEM). As células planctônicas foram suscetíveis tanto à CTZ sozinho quanto aos complexos com zinco e ouro, com CI₉₀ próximo ou menor do que o correspondente antifúngico sozinho, com ênfase em ZnAcITR (0,25-1 µg / mL) e AuCTZCl (0,008-0,03 µg / mL). A complexação com ouro não aumentou a atividade antifúngica de KTZ sobre leveduras e valores similares (CI₉₀) foram encontrados para os complexos e o antifúngico isolado. Em

biofilmes, AuCTZ (64-128 $\mu\text{g} / \text{mL}$) e ZnAcCTZ (32-64 $\mu\text{g} / \text{mL}$) apresentaram os melhores resultados inibitórios, com CIB_{50} menor do que o antifúngico sozinho (KTZ e CTZ, 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para ambos). Na microscopia eletrônica de varredura, mostramos a presença de clamidosporos e leveduras alteradas em *Candida albicans*. Em *Candida glabrata*, observou-se a presença de pseudohifas, que pode ser uma resposta ao estresse submetido pelos tratamentos. No ensaio de combinação de drogas (checkerboard), observamos indiferença nas combinações de sal de partida com o antifúngico sozinho, com os sais de zinco, porém também obtivemos resultados sinérgicos com os sais de ouro. Já na atividade hemolítica, todos os compostos demonstraram baixa toxicidade. Com esses resultados demonstramos que os azóis complexados com ouro e zinco apresentaram atividade antifúngica contra células planctônicas e biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata*. Além disso, confirmamos que são compostos promissórios e uma análise mais aprofundada é necessária, utilizando testes *in vivo* para avaliar eficácia e citotoxicidade associadas a essas moléculas.

Palavras-chave: *Candida*, Antifúngicos, Biofilme, Micologia, Microbiologia, Onicomicose

ABSTRACT**LÍVIA DESSUPOIO PEREIRA****EVALUATION OF THE ANTIFUNGAL EFFECT OF AZOLES AND ITS METAL ANALOGUES ON YEASTS AND BIOFILM OF *Candida* spp****Orientadores: Sonia Rozental e Taissa Vila**

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.

Candida species are important agents of superficial and disseminated opportunistic fungal infections. The yeasts of *Candida* spp. can form biofilms, a community of microorganisms that adhere to the biotic and abiotic surfaces and grows covered by an extracellular matrix. Biofilms are less susceptible to antifungal agents, making it difficult to treat these infections. Imidazoles and triazoles derivatives are the major antifungal agents used to treat infections caused by *Candida* spp., but are ineffective against biofilms. Previous studies have shown that the transition metals complexed in imidazole derivatives have an effect on *Saccharomyces cerevisiae* and also against parasitic diseases such as malaria, leishmaniasis and Chagas' disease. Thus, the objective of this work was to evaluate the antifungal activity of organometallic complexes associated with azole compounds in planktonic cells and biofilms of *Candida glabrata* and *Candida albicans*. For this work, Fluconazole (FLC), Itraconazole (ITR), Clotrimazole (CTZ) and Ketoconazole (KTZ) alone or complexed with gold (Au) and zinc (Zn) were used. Standard antifungals and starting salts were used as experimental controls. The growth inhibitory activity in planktonic cells was evaluated by broth microdilution assays, according to the document M27-A2 published by the CLSI, and biofilm inhibition was evaluated using protocols previously described by the group. The lowest concentration of each drug that inhibits 50% and 90% of planktonic cell growth (IC₅₀ and IC₉₀) or the biofilm metabolism activity (BIC₅₀ and BIC₉₀) was determined by spectrophotometry, read at 490 nm. In addition, the inhibitory activity of the complexes in biofilms formed on fragments of sterilized nails was performed according to the protocol also described by the group and the effects were evaluated by scanning electron microscopy (SEM). Planktonic cells were susceptible to both CTZ alone and to the complexes with zinc and gold, with IC₉₀ similar to or lower than the corresponding antifungal alone, with an emphasis on ZnAcITR (0.25-1 µg/mL) and AuCTZCl (0.008-0,03 µg/mL). Complexation with gold did not increase the antifungal activity of KTZ on yeasts and similar values (CI₉₀) were found for isolated antifungal and complexes. In biofilms, AuCTZ (64-128 µg / mL) and ZnAcCTZ (32-64 µg / mL) showed the best inhibitory results, with CIB₅₀ lower than the antifungal alone (KTZ and CTZ, 256 µg / mL for both). Using SEM, we

showed the presence of chlamydospores and altered yeasts in *Candida albicans*. In *Candida glabrata*, the presence of pseudohyphae was observed, which may be a result of stress response due to the treatments. In the checkerboard assay we observed indifference in the starting salt combinations with the antifungal alone, with the zinc salts, but also obtained synergistic results with the gold salts. In the hemolytic activity, all the compounds demonstrated low toxicity. With these results, we showed that the gold and zinc complexes have good antifungal activity against planktonic cells and biofilms of *C. albicans* and *C. glabrata*. In addition, we confirm that they are promising compounds and further analysis is required using *in vivo* tests to assess efficacy and cytotoxicity associated with these molecules.

Key-words: *Candida*, Antifungal, Biofilm, Mycology, Microbiology, Onychomycosis

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MEC: Matriz extracelular

FFND: Fungos filamentosos não-dermatófitos

ATTC: American Type Culture Collection

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

L-AMB: Anfotericina B lipossomal

FLC: Fluconazol

ITR: Itraconazol

CTZ: Clotrimazol

KTZ: Cetoconazol

AMB: Anfotericina B

CFM: Concentração fungicida mínima

CIM: Concentração inibitória mínima

CI₅₀: Concentração inibitória mínima que inibe 50% do crescimento

CI₉₀: Concentração inibitória mínima que inibe 90% do crescimento

CIB₅₀: Concentração inibitória mínima que inibe 50% do crescimento do biofilme

CIB₉₀: Concentração inibitória mínima que inibe 50% do crescimento do biofilme

RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute 1640

MOPS: Ácidos 3-(N-morfolino)propanosulfônico

PBS: Solução salina tamponada com fosfato

XTT: 2,3 bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino) carbonil]-2H-hidróxido de tetrazolium

RPM: Rotação por minuto

DMSO: Dimetilsulfóxido

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Candidíase.....	14
1.2 <i>Candida albicans</i>	15
1.3 <i>Candida glabrata</i>	15
1.4 Biofilmes.....	16
1.5 Etapas de formação do biofilme.....	17
1.6 Onicomicoses	20
1.7 Antifúngicos.....	22
1.7.1 Antifúngicos comerciais.....	22
1.7.2 Busca por novos antifúngicos	23
2 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivos específicos	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Microrganismos.	28
4.2 Antifúngicos comerciais e sintéticos.....	28
4.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	28
4.4 Concentração Fungicida Mínima (CFM)	29
4.5 Formação de biofilme por <i>Candida</i> spp.....	30
4.5.1 Efeito dos antifúngicos em biofilmes maduros.....	30
4.5.2 Formação do biofilme em fragmentos de unha.....	30
4.5.3 Quantificação do biofilme.....	31
4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	31
4.7 Ensaio de combinação de drogas (<i>Checkerboard</i>).....	32
4.8 Atividade hemolítica dos compostos teste	32
5. RESULTADOS	34
5.1 Determinação da atividade dos agentes antifúngicos sobre células planctônicas de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida glabrata</i>	34

5.2 Determinação da atividade dos agentes antifúngicos sobre biofilmes maduros de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida glabrata</i>	36
5.3 Quantificação da atividade metabólica dos agentes antifúngicos sobre biofilmes maduros de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida glabrata</i> formados em fragmentos de unha.....	38
5.4 Alterações morfológicas causadas pela ação dos agentes antifúngicos sobre biofilmes maduros formados em fragmentos de unha.....	39
5.5 Checkerboard dos sais de partida com o Clotrimazol e Cetoconazol	45
5.6 Atividade hemolítica dos complexos metálicos e seus antifúngicos padrão.....	47
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÕES.....	54
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 Candidíase

As espécies de *Candida* são leveduras normalmente presentes na microbiota humana e, em indivíduos saudáveis, não causam sintomas e colonizam as mucosas do trato urogenital, gastrointestinal e cavidade oral, além de unhas e pele. Entretanto, são importantes agentes de infecções fúngicas oportunistas em pacientes hospitalizados e/ou imunossuprimidos. A candidíase pode ser classificada em duas categorias dependendo da severidade da doença. A primeira categoria envolve as infecções nas mucosas da orofaringe e dos tratos gastrointestinal, caracterizadas com a presença de feridas de cor esbranquiçadas, conhecidas como “sapinho”. Adicionalmente, estima-se que a candidíase vulvovaginal acometa a mucosa vaginal de 75% das mulheres no mundo que, em 40-45% dos casos, relatam repetidas aparições dos sintomas (Centers for Disease Control and Preventions, CDC, USA - <https://www.cdc.gov/std/tg2015/candidiasis.htm>). A segunda categoria envolve infecções sistêmicas, comuns em pacientes imunocomprometidos, incluindo os HIV positivos, transplantados, pacientes em processo quimioterápico e recém-nascidos com baixo peso (Kabir, Hussain, & Ahmad, 2012).

O diagnóstico precoce de candidíase invasiva é difícil e, geralmente, acontece durante o curso da infecção, antes de se encontrar as evidências microbiológicas. Isso pode atrasar o tratamento antifúngico apropriado, além de poder ser em parte responsável por suas altas taxas de mortalidade - comparáveis com as reportadas por choque séptico (Eggimann et al., 2015). A profilaxia com antifúngicos e o tratamento empírico precoce de candidíase aumenta a sobrevivência dos pacientes em condições de risco, mas levou a um uso excessivo dessas drogas, prescritas indiscriminadamente a todos os pacientes colonizados com espécies de *Candida*. O uso extensivo de antifúngicos também alterou o perfil de resistência e o aumento de infecções causadas por espécies de *Candida* com susceptibilidade reduzida (Eggimann et al., 2015).

A prevalência global da candidíase é de 6.9 casos por 1000 pacientes (Sanguinetti, Posteraro, & Lass-Flörl, 2015) e sua taxa de mortalidade é maior que 60% em casos de infecções sistêmicas (Glöckner & Cornely, 2015). Essas infecções por *Candida* possuem grandes consequências no sistema de saúde e na economia de um país e,

somente nos Estados Unidos, é responsável por aproximadamente 100.000 mortes e gastos de \$6,5 bilhões de dólares em despesas extras anualmente (Nobile & Johnson, 2015).

1.2 *Candida albicans*

Candida albicans é uma levedura pleomórfica não clássica que vive como comensal em pessoas saudáveis. Em um rank feito pelo *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), *Candida* spp. é o terceiro patógeno mais comumente isolado no sangue de pacientes hospitalizados (Tsui, Kong, & Jabra-Rizk, 2016) e quase 50% destas infecções são causadas por *C. albicans* (Ulu Kilic et al., 2016). Em geral, *C. albicans* é o patógeno predominante isolado em candidemias (infecções da corrente sanguínea por *Candida* spp.), porém sua epidemiologia varia em diferentes locais. A prevalência de infecções por *C. albicans* é de > 60% no norte da Europa, 45% - 58% nos demais países Europeus e nos Estados Unidos e 40%-42% na Ásia e na América do Sul (Falagas, Roussos, & Vardakas, 2010). Em um estudo envolvendo 22 hospitais brasileiros durante 9 anos (2003-2012), *C. albicans* foi o causador predominante dos episódios de candidemia (42%) (Colombo et al., 2014) e em outro estudo feito durante 5 anos (2006-2010) em um hospital de referência no sudeste do Brasil esta espécie foi responsável por 44% dos episódios (Moretti et al., 2013).

1.3 *Candida glabrata*

Candida glabrata é a espécie representante haploide do gênero *Candida* spp. que também coloniza comensalmente o trato gastrointestinal e geniturinário, porém em menor prevalência se comparada à *C. albicans*. Essa espécie não possui vários fatores de virulência que fazem parte da patogenicidade de outras espécies, incluindo *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, como a formação de pseudohifas e hifas verdadeiras (*C. albicans*) e secreção de proteases (Kaur et al., 2005). Entretanto, *C. glabrata* possui susceptibilidade intrinsecamente reduzida a antifúngicos. A redução da susceptibilidade nesta espécie se dá por diversos fatores, como a superexpressão ou mutação de genes ligados a alvos de antifúngicos e o aumento na expressão de bombas de efluxo, que provocam a expulsão da droga, reduzindo sua atividade. (Rodrigues, Silva, & Henriques, 2014).

Atualmente, as espécies de *Candida* não-*albicans*, principalmente *Candida glabrata*, se tornaram importantes agentes de infecções oportunistas em populações com doenças de alto risco e, por conta da resistência intrínseca aos principais antifúngicos disponíveis, a taxa de sucesso terapêutico em infecções causadas por *C. glabrata* é reduzida (Gonçalves et al., 2016). A idade dos pacientes também se tornou um fator epidemiologicamente importante: *C. glabrata* possui taxa de colonização de 44% em pacientes com 75 anos ou mais em UTIs (Glöckner & Cornely, 2015) e foi isolada do sangue de mais de 30% dos pacientes com idade maior do que 80 anos (Sandven et al., 2006). No Brasil, a incidência de candidemia causada por *C. glabrata* varia de 11,2% a 13,1% em diferentes regiões e, em um estudo em um hospital do sudeste, 45,7% destas infecções ocorreram em pacientes com malignidades (Moretti et al., 2013).

1.4 Biofilmes

Biofilmes são comunidades microbianas estruturadas que se formam aderidas a uma superfície biótica ou abiótica, onde os microrganismos estão embebidos em uma matriz extracelular polimérica secretada por eles mesmos e as células que os compõem possuem características diferentes das células planctônicas (em suspensão) (Douglas, 2003). A matriz extracelular funciona como uma barreira difusional para antifúngicos, reduzindo o transporte dessas moléculas para a parte interna do biofilme e o acesso às células das camadas mais basais. (Donlan & Costerton, 2002). A menor penetração e retenção dos antifúngicos na matriz faz com que estes biofilmes sejam menos susceptíveis aos tratamentos e a eliminação total do foco infeccioso é difícil, culminando em maior índice de reinfecções e redução do sucesso terapêutico (Nobile & Johnson, 2015).

Catéter venoso central, cateter urinário, marcapassos, válvulas cardíacas, próteses, lentes de contato e dentaduras são exemplos de dispositivos médicos susceptíveis a formação de biofilmes por *Candida spp.* Uma vez que estes biofilmes se formem, estas superfícies funcionam como um reservatório de partículas infecciosas que se despreendem constantemente e, dependendo de onde estes dispositivos estão inseridos ou do tecido que têm contato, podem causar infecções sistêmicas ou de órgãos profundos e tecidos. As células que se despreendem de biofilmes (células de dispersão) são mais virulentas do que células planctônicas convencionais e são responsáveis pela

disseminação de uma infecção localizada, agravando o quadro infeccioso (Uppuluri et al., 2010). A dificuldade de difusão dos antifúngicos é responsável pela dificuldade de eliminação total, principalmente em dispositivos médicos inseridos em pacientes, como catéteres, culminando em um ciclo de reinfecção (Nobile & Johnson, 2015).

1.5 Etapas de formação do biofilme

Em superfícies abióticas, há uma divisão didática das etapas de formação do biofilme (Figura 1). Em biofilmes de *C. albicans*, descreve-se: (1) Fase inicial de aderência das células leveduriformes em suspensão à uma superfície biótica ou abiótica; (2) Fase de desenvolvimento com o início da proliferação, formando uma camada basal para as células se ancorarem, além da produção de projeções filamentosas; (3) Fase de maturação, que inclui o crescimento das hifas e pseudohifas juntamente com a produção da matriz extracelular (MEC), que embebe todas as células; (4) Fase de dispersão, onde as leveduras das camadas mais superficiais são liberadas do biofilme para outros sítios, reiniciando o ciclo (criando outro foco inicial de biofilme) ou disseminado a infecção (Nobile & Johnson, 2015) (Figura 1). Apesar da fase de dispersão ser mostrada apenas no final do esquema didático, sabe-se que a liberação das células do biofilme de *C. albicans*, a grande maioria na forma leveduriforme, ocorre em todas as fases do ciclo de desenvolvimento. Esse processo de dispersão é dependente de diferentes fatores do ambiente, como condições nutricionais e físicoquímicas. O conhecimento desse fenômeno é muito importante para a clínica, já que as células que se desprendem do biofilme de *C. albicans* possuem potencial para a disseminação da infecção nos pacientes acometidos, além do próprio desenvolvimento da candidemia (Uppuluri et al., 2010).

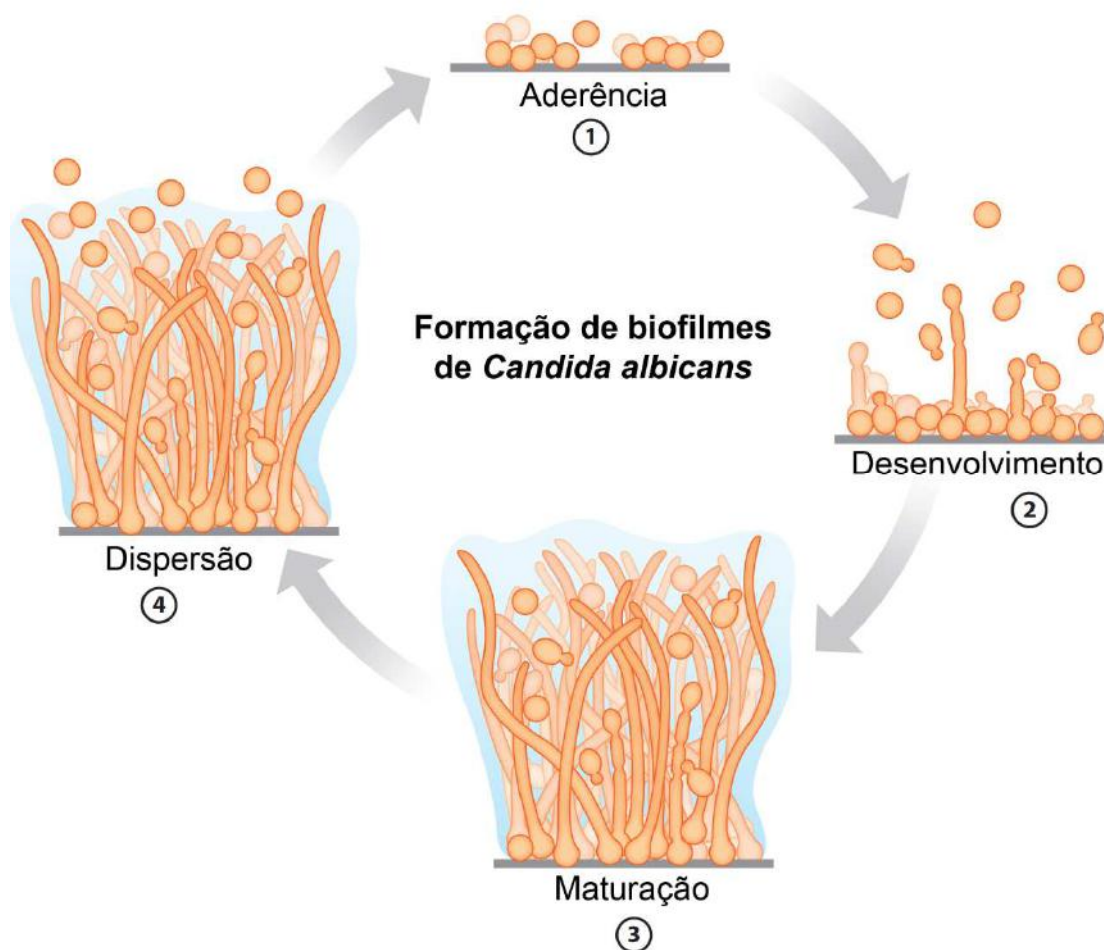


Figura 1 - Esquema sobre as etapas de formação do biofilme. (1) Fase de aderência das leveduras no substrato; (2) Fase de desenvolvimento, com o surgimento das projeções filamentosas; (3) Fase de maturação, com a presença de hifas e pseudohifas, além da matriz extracelular; (4) Fase de dispersão, tendo a liberação de leveduras para reinício do ciclo. Adaptado de Nobile C. J. & Johnson A. D., *Annual Reviews in Microbiology*, 2015.

Algumas diferenças no biofilme formado por *C. glabrata* são notáveis, se comparado ao formado por *C. albicans*. Ambos se iniciam pela aderência das leveduras no substrato biótico ou abiótico e depois, formam a camada basal de células sobre a superfície. Para *C. albicans*, durante a fase de desenvolvimento, ocorre a ativação de vias de sinalização que culminam com a indução da morfogênese, e algumas leveduras de *C. albicans* passam a crescer como filamentos (hifas), num processo conhecido como filamentação. Entretanto, isso não acontece com *C. glabrata*, que forma um biofilme composto de múltiplas camadas de leveduras arredondadas sem a presença de formas filamentosas, como hifas ou pseudohifas (D'Enfert & Janbon, 2015) (Figura 2). Também é marcante a diferença na composição da matriz extracelular dessas duas espécies: *C. albicans* possui

matriz composta 55% por proteínas, 25% por carboidratos, 15% por lipídeos e 5% por ácidos nucleicos (Zarnowski et al., 2014). *C. glabrata*, apesar de se conhecer pouco sobre a composição de seu biofilme, já se sabe que possui altas quantidades de carboidratos e proteínas, em alguns casos cinco vezes maior que outras espécies (D'Enfert & Janbon, 2015) (Rodrigues et al., 2014).

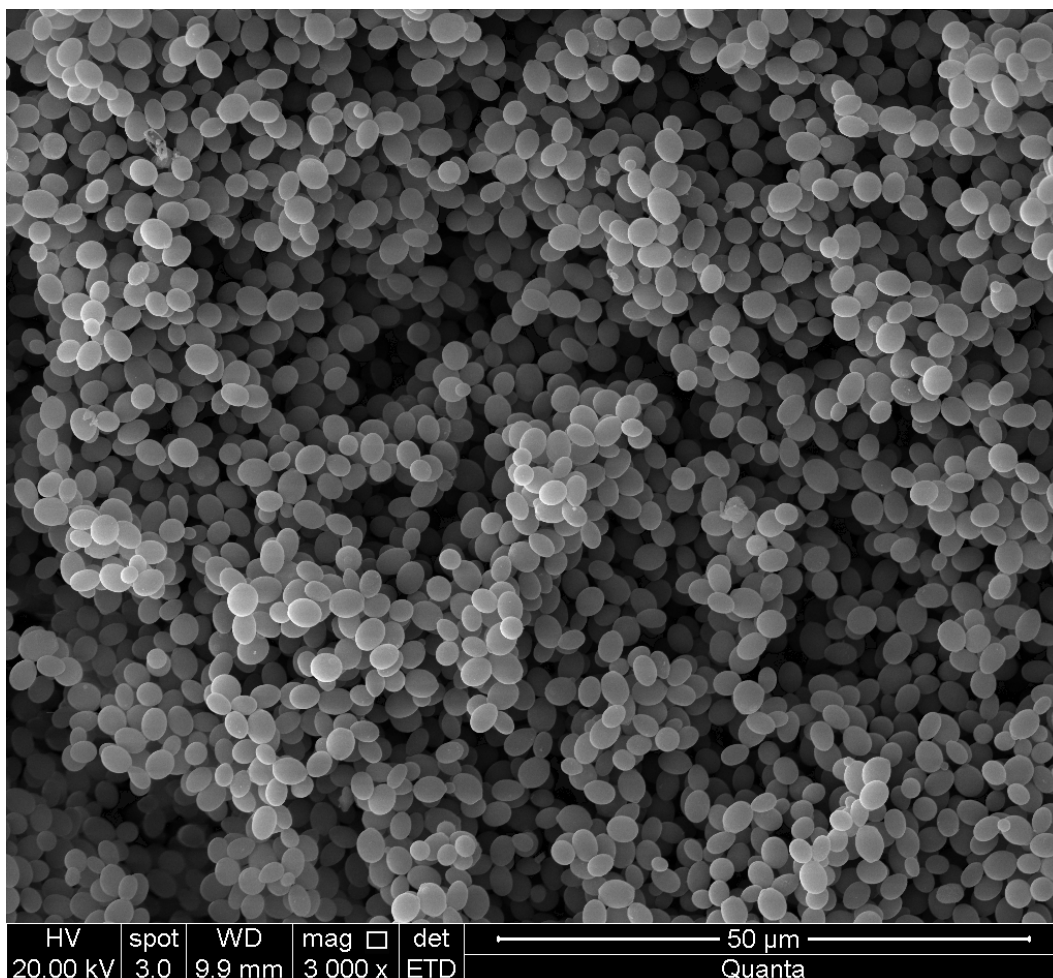


Figura 2 - Imagem de microscopia eletrônica de varredura de biofilme de *Candida glabrata* formado *in vitro* sobre fragmentos de unha por 24h. Observa-se que todo o volume é composto por várias camadas de leveduras arredondadas sobrepostas. A ausência de matriz extracelular é justificada pela extração da mesma durante o processamento da amostra. Taissa Vila & Livia Pereira, arquivo pessoal, 2014.

Candida glabrata apresenta menor atividade metabólica em suas células planctônicas e em seu biofilme se comparada a outras espécies e múltiplas cepas possuem similar habilidade de formação de biofilme, porém sua biomassa é menor quando comparada à de biofilmes de outras espécies de *Candida* spp.. Esses e outros fatores, antes considerados somente como chaves para a sobrevivência dessa espécie, parecem

também ser responsáveis por ela ser tão bem adaptada a colonizar tecidos e dispositivos médicos inseridos em pacientes (Rodrigues et al., 2014).

1.6 Onicomicoses

As unhas de seres humanos são estruturas queratinizadas, presentes da extremidade superior à ponta de cada dedo da mão e do pé. Além de sua função biológica, como proteção às falanges, as unhas também possuem propósitos estéticos e cosméticos (Baswan et al., 2017). As unhas das mãos, em condições normais, crescem totalmente em seis meses e as unhas dos pés levam em torno de 12 a 18 meses. Esse tempo aumenta em pessoas imunocomprometidas, desnutridas, que estão passando por infecções agudas ou em uso de drogas anti-mitóticas (Fleckman, 2005).

A onicomicose é uma infecção fúngica crônica que acomete as unhas e é mais comum em pacientes com mais de 70 anos, diabéticos, portadores de HIV, imunossuprimidos, obesos ou com problemas vasculares (Gupta, Cernea, & Foley, 2016). Os idosos são altamente propensos a desenvolver onicomicoses e essa prevalência relacionada a idade pode ocorrer por serem fumantes ou diabéticos, terem traumas em unhas envelhecidas ou longa exposição a fungos patogênicos, falta de cuidados com a unha dos pés, terapias com drogas imunossupressoras e principalmente, pelos idosos apresentarem um sistema imunológico mais frágil e/ou debilitado. Onicomicoses representam aproximadamente 50% de todas as doenças observadas em unhas em todo o mundo e acometem 2 - 18,5% da população mundial (Baswan et al., 2017). A incidência de onicomicose é maior entre as mulheres (Jayatilake, Tilakaratne, & Panagoda, 2009), pela exposição da região periungueal ao remover a cutícula por questões cosméticas, muitas vezes sem esterilização dos materiais utilizados. Além disso, o contato com superfície e a propensão aos traumas, principalmente dos pés pelo uso de sapatos abertos, e a frequente exposição das unhas a água, detergentes e sabões, desequilibrando a microbiota ali presente, também são motivos para esta maior incidência (Jayatilake, Tilakaratne, & Panagoda, 2009). Por estética, as mulheres procuram mais que os homens por tratamentos quando possuem lesões em suas unhas, levando a crer que os dados epidemiológicos podem refletir não uma maior incidência em mulheres mas apenas uma maior taxa de diagnóstico uma vez que a obtenção desses dados é reduzida

em humanos pela falta de relatos e os que existem, podem estar subestimados (Alvarez, González, & Castro, 2004).

Em sua maioria, as onicomicoses são causadas por fungos filamentosos dermatófitos, como *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*. Porém, infecções das unhas por fungos filamentosos não-dermatófitos (FFND), como *Scopulariopsis brevicaulis*, espécies de *Aspergillus* e de *Fusarium*, e de leveduras, como espécies de *Candida* não são incomuns (Gupta, Cernea, & Foley, 2016). A diferença geográfica da frequência desses fungos pode ser explicada pelas condições climáticas e em países quentes e úmidos, como o Brasil, observamos uma maior incidência de onicomicoses causadas por leveduras, como *Candida* spp. (Alvarez, González & Castro, 2004), ainda que este não seja o principal agente isolado destas infecções. Já na Europa e em outros países, como Estados Unidos, a doença é causada principalmente por dermatófitos, como *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *Trichophyton interdigitale* (Vlahovic, 2016).

Recentemente, uma corrente de pesquisadores passou a defender a hipótese de que as unhas podem ser um substrato para o crescimento de biofilmes, tendo como base vários fatores como a aderência desses fungos a placa ungueal, presença de elementos fúngicos inativos, habilidade das leveduras de formar biofilme e baixa penetração das drogas utilizadas para tratar onicomicoses (gerando resistência) (Nusbaum, Kirsner & Charles, 2012). O tratamento de onicomicoses é longo e a taxa de cura total é baixa, muitas vezes atribuída à dificuldade de eliminação do patógeno, já que a espessa placa ungueal forma por si só uma barreira para o acesso de antifúngicos. A taxa de recorrência da onicomicose chega a ser maior do que 50% e pode ser associada com essa falha de tratamento ou re-infecção por exposição a uma cepa fúngica diferente. Além disso, mesmo que o fungo causador seja clinicamente erradicado, o paciente ainda se mantém exposto ao ambiente contaminado e tem chance de recorrência (Baswan et al., 2017).

O tratamento de onicomicoses inclui desde paliativos - como manter os pés e as mãos completamente secos, descartar sapatos velhos que podem estar contaminados com esporos e manter as unhas sempre curtas e limpas (Gupta & Ryder, 2003) - a antifúngicos sistêmicos administrados por via oral, porém o tratamento com antifúngicos tópicos é o mais utilizado (Baswan et al., 2017). Além disso, também é importante saber sobre organismo causador da doença e levar em consideração se é um dermatófito ou não (Gupta et al., 2016). Os antifúngicos tradicionalmente usados para

tratar onicomicoses causadas por dermatófitos – como triazóis (Fluconazol e Itraconazol), imidazóis (Clotrimazol, Cetoconazol, Miconazol), morfollinas (amorolfina) e alilaminas (Terbinafina) –, sejam eles tópicos ou sistêmicos, são menos eficazes contra onicomicoses causadas por espécies de *Candida* (Vila, Rozental e de Sá Guimarães, 2015).

1.7 Antifúngicos.

1.7.1 Antifúngicos comerciais

Os antifúngicos comerciais disponíveis são divididos em três classes principais: agentes poliênicos, azóis e equinocandinas. Fungos são organismos eucarióticos e, portanto, mais próximos das células humanas do que bactérias e vírus, o que limita o número de alvos possíveis para as drogas antifúngicas e conseqüentemente, a quantidade de classes existentes. Além disso, problemas de seletividade, toxicidade e o desenvolvimento de resistência dos fungos a esses antifúngicos contribuem para manter o arsenal terapêutico limitado (Maubon et al., 2014).

Os agentes poliênicos, como por exemplo anfotericina B e a nistatina, são moléculas anfipáticas que se ligam ao ergosterol da membrana plasmática dos fungos, causando a formação de poros que geram desequilíbrio osmótico, além de atuar como uma esponja ao extrair o ergosterol, e o resultado final é a morte da célula fúngica (Maubon et al., 2014). Os poliênicos possuem um amplo espectro de ação e a anfotericina B é considerada o padrão ouro, na clínica, para o tratamento de infecções fúngicas. Entretanto, por mais que sejam usados na clínica desde a década de 60, possuem uma grande limitação por terem alto grau de nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, principalmente pela similaridade do ergosterol dos fungos com o colesterol presente em células de mamíferos (Shapiro, Robbins, & Cowen, 2011).

Imidazóis (cetonazol e clotrimazol) e triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol) são exemplos de antifúngicos da maior classe de agentes usados na clínica, os azóis, sendo os triazóis mais comumente usados para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas (Odds, Brown e Gow, 2003; Maubon et al., 2014). Estes agentes bloqueiam a síntese de ergosterol ao inibir a enzima lanosterol-14 α -demetilase, também chamada de Erg11p ou Cyp51p. Esse bloqueio leva a depleção de ergosterol da

membrana, gerando mudanças em sua permeabilidade; altera a atividade de algumas proteínas ligadas a membrana que são envolvidas com a síntese de parede celular e leva a síntese e acúmulo de um esteroide intermediário tóxico para a célula fúngica pela não atuação da Erg11p (Maubon et al., 2014). Os azóis em sua maioria atuam de forma fungistática contra espécies de *Candida* e fungicida contra fungos filamentosos, e essa atuação fungistática favorece a seleção de populações, gerando resistência contra essas drogas (Shapiro, Robbins, & Cowen, 2011).

A classe das equinocandinas é a mais nova e foi introduzida à clínica na década de 2000, sendo representada pela caspofungina, micafungina e anidulafungina. São metabólitos secundários, sendo um núcleo hexapeptídico cíclico com uma cadeia lateral lipídica, que é a responsável pela atividade antifúngica (Odds, Brown e Gow, 2003). Sua ação é inibir a (1,3)- β -D-glucana sintase, responsável pela síntese de β -1,3-glucana, um polissacarídeo essencial da parede celular fúngica (Maubon et al., 2014). Por ter como alvo um componente específico da célula fúngica (parede celular), essa é a classe antifúngica mais seletiva e possui baixa toxicidade associada (Shapiro, Robbins, & Cowen, 2011). É importante citar o aumento exponencial de resistência da *C. glabrata* às equinocandinas. Nos últimos dez anos, a resistência de menos de 1% a qualquer uma das equinocandinas aumentou para 9,3% para anidulafungina e caspofungina; e 8% para micafungina e, além disso, a resistência a elas e aos azóis parece coexistir em um mesmo isolado (Pfaller et al., 2012). Em um estudo hospitalar, a resistência a equinocandinas aumentou de 4,9% para 12,3% e, entre 78 isolados resistentes ao fluconazol, 14,1% era resistente a uma ou mais equinocandinas. Essa correlação entre as duas classes de antifúngicos está associada à mutação do gene FKS da *C. glabrata*, que é responsável pela produção da enzima alvo desta classe (Alexander et al., 2013).

1.7.2 Busca por novos antifúngicos

Com o aumento da incidência de cepas resistentes as terapias antifúngicas disponíveis e, consequentemente, gerando a falha do tratamento e aumento da mortalidade associada a infecções fúngicas, a busca por novas drogas antifúngicas se torna cada vez mais urgente (Maubon et al., 2014). A resistência aos poliênicos é associada com mudanças na composição dos esteróis de membrana, que acontece por mutações em genes envolvidos com a via de biossíntese do ergosterol. A baixa susceptibilidade aos azóis se

dá por vários mecanismos, sendo o principal deles a superexpressão de bombas de efluxo de drogas (levando ao transporte dos azóis para fora da célula fúngica), seguido de mutações pontuais no gene *ERG11*, gerando alterações conformacionais na enzima *Erg11p* (faz com que diminua a afinidade das drogas a essa enzima alvo) e mutações no gene *ERG3* (leva a produção de fecosterol e não de esteróis tóxicos para o fungo). No caso das equinocandinas, a resistência é mediada pela mutação nos genes *FKS*, modificando as propriedades catalíticas e cinéticas da enzima alvo dessas drogas (Maubon et al., 2014). As infecções por causadas por biofilmes são ainda mais resistentes uma vez que, além dos mecanismos tradicionais de resistência apresentados acima, a secreção de MEC reduz a difusão dos antifúngicos e as diferenças nas taxa de reprodução e metabolismo, assim como a presença de células persistentes reduzem/dificultam a atividade de drogas que afetam o metabolismo celular (Scorzoni et al., 2017).

É importante citar que apenas alguns antifúngicos, como as equinocandinas e a anfotericina B lipossomal (L-AMB) demonstram alguma eficácia contra biofilmes de *Candida spp. in vitro* (Delattin, Cammue, & Thevissen, 2014). Além disso, as leveduras que constituem o biofilme são 1000 vezes mais resistentes aos azóis do que as mesmas em forma planctônica, livre (Lamfon et al., 2004). Além disso, após o tratamento com anfotericina B, as células de *C. albicans* sobreviventes são capazes de produzir um novo biofilme a partir de uma nova subpopulação de células persistentes, sugerindo que elas não são mutantes e sim variações fenotípicas da população selvagem (Scorzoni et al., 2017). As onicomicoses causadas por espécies de *Candida* são comumente tratadas com fluconazol oral e tópico, porém como dito anteriormente, os azóis não possuem boa atividade contra biofilmes, não levando a cura da doença e, além disso, podendo levar a resistência da cepa envolvida pela pressão seletiva constante do longo tratamento (em torno de 1 ano) (Scorzoni et al., 2017).

Muitos estudos têm sido realizados em busca de novos alvos e potenciais drogas antifúngicas. Em paralelo, outra abordagem possível (e potencialmente mais barata) é o melhoramento químico das moléculas existentes. Nesse contexto, grupos como o da professora Maribel Navarro (INMETRO/UFJF) propuseram a complexação de antifúngicos com diferentes metais buscando melhorar seus efeitos farmacológicos, reduzir a toxicidade e/ou agregar novos efeitos intracelulares e extracelulares. Essa nova abordagem consiste na modificação de uma molécula com atividade biológica já

conhecida ao incorporar metais de transição em sua estrutura (Navarro et al., 2004). A atividade fungicida do cetoconazol e do clotrimazol complexados com ouro, cobre e rutênio foi demonstrada *in vitro* na levedura não patogênica *Saccharomyces cerevisiae* (Navarro et al., 2004) e imidazóis complexados a prata demonstraram boa atividade antifúngica *in vivo* utilizando modelo de *Galleria mellonella* infectada com *C. albicans*, protegendo a larva mesmo quando infectada com uma dose letal do fungo (McCann et al., 2012). Além disso, o aumento da atividade anti-protozoário de drogas complexadas a metais foi demonstrada em *Plasmodium* spp., *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. (Navarro et al., 2010).

2 JUSTIFICATIVA

Considerando a crescente resistência das espécies de *Candida* aos antifúngicos disponíveis atualmente, muitos estudos buscam novos alvos para atuação de novas classes e também potenciais novos antifúngicos. Destaca-se o fato de algumas espécies, como *Candida glabrata*, serem intrinsecamente resistentes aos azóis, que são as drogas de primeira escolha para o tratamento de candidíases e outras infecções, como as onícomicoses.

Essa preocupação gerada pela resistência também é agravada pela limitada quantidade de classes de antifúngicos, em que até as equinocandinas, a mais nova classe de antifúngicos usadas na clínica e que era considerada como solução para os tratamentos de infecções fúngicas, já possuem crescente resistência associada. Também é visto que diferentes micoses, mesmo as consideradas mais brandas ou mais graves, possuem tratamento com a mesma classe de antifúngicos, mudando apenas o tempo de exposição à droga. Isso gera uma pressão das drogas aos patógenos, podendo levar a uma resistência cruzada entre as classes e até mesmo a falhas terapêuticas, ocasionando com a morte do paciente.

Adicionalmente, a maioria das infecções causadas por espécies de *Candida* envolvem a formação de biofilmes em superfícies bióticas e abióticas e é importante destacar que, conforme o maior uso de instrumentos médicos, como cateteres, também se observa o maior o número de infecções associadas a esses biofilmes. Além disso, também é observada a dificuldade no tratamento de doenças envolvidas com formação de biofilme, que possui susceptibilidade reduzida aos fármacos pela presença da matriz extracelular e de outros fatores.

Portanto, é de suma importância que pesquisas sobre novos alvos ou melhoramentos nas classes antifúngicas já existentes aconteçam, a fim de aumentar o arsenal de combate a doenças causadas por esses patógenos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade *in vitro* de azóis complexados a moléculas de zinco e ouro sobre células planctônicas e biofilmes de *Candida albicans* e *Candida glabrata*, além da utilização de um modelo *in vitro* de onicomicose para avaliação do tratamento com esses complexos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a susceptibilidade *in vitro* de leveduras de *C. albicans* e *C. glabrata* à ação dos antifúngicos complexados ao zinco e ao ouro, comparado aos antifúngicos comerciais (anfotericina B, fluconazol, itraconazol, cetoconazol e clotrimazol);
- Determinar a concentração inibitória mínima e a concentração fungicida mínima em leveduras de *C. albicans* e *C. glabrata*, utilizando os compostos citados acima;
- Avaliar a susceptibilidade *in vitro* de biofilmes maduros de *C. albicans* e *C. glabrata* à ação dos antifúngicos complexados ao zinco e ao ouro, comparado aos antifúngicos comerciais (anfotericina B, fluconazol, itraconazol, cetoconazol e clotrimazol);
- A partir da utilização do modelo *in vitro* de formação de biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata* em fragmentos de unha humana, avaliar a susceptibilidade dos mesmos à ação dos antifúngicos complexados ao zinco e ao ouro, comparado aos antifúngicos comerciais (anfotericina B, fluconazol, cetoconazol e clotrimazol);
- Avaliar as alterações morfológicas dos biofilmes formados nos fragmentos de unha, causadas pelo tratamento com os antifúngicos complexados ao zinco e ao ouro, através da microscopia eletrônica de varredura;
- Determinar *in vitro* a atividade das moléculas formadoras dos complexos, a fim de avaliar e observar se a susceptibilidade das células planctônicas e do biofilme é resultado da complexação ou não;
- Determinar *in vitro* a atividade hemolítica dos antifúngicos complexados ao zinco e ao ouro, comparando aos antifúngicos comerciais (anfotericina B, fluconazol, itraconazol, cetoconazol e clotrimazol).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos.

Nesse projeto, foram utilizadas duas cepas padrão de *Candida* spp., obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC), *Candida albicans* SC5314 (ATCC MYA-2876) e *Candida glabrata* ATCC 2001. As cepas foram mantidas em meio de cultura ágar Sabouraud dextrose (Difco), a 4 °C, por não mais que 1 mês. Para realização dos experimentos, as culturas em ágar foram subcultivadas em duas passagens em caldo Sabouraud dextrose (Difco), por 24 horas, a 36°C. Em seguida, as leveduras obtidas na segunda passagem em cultura líquida foram coletadas por centrifugação (3000 RPM durante 5 minutos), lavadas em PBS estéril (pH 7,2) e padronizadas para a concentração desejada utilizando contagem em câmara de Neubauer.

4.2 Antifúngicos comerciais e sintéticos.

Para esse trabalho, foram utilizados os seguintes antifúngicos comerciais: Fluconazol (FLC), Itraconazol (ITR), Clotrimazol (CTZ) e Cetoconazol (KTZ) (Sigma-Aldrich; USA). Os estoques foram armazenados em solução a 1600 µg/mL em DMSO a -20°C e diluídos em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich; USA) imediatamente antes dos experimentos. Um total de oito compostos gerados por complexação de azóis com metais foram testados neste trabalho, sendo quatro complexos de zinco (ZnAcFLC; ZnAcITR; ZnAcCTZ; ZnClCTZ;) e quatro complexos de ouro (AuKTZ; AuKTZCl; AuCTZ; AuCTZCl). Os sais de partida usados para a reação de complexação (AuClPPh₃; KAuCl₄; ZnAc; ZnCl₂) foram usados como controles para os experimentos. Os estoques foram armazenados em solução a 1600 µg/mL em DMSO, a -20°C e diluídos em meio de cultura RPMI 1640 imediatamente antes dos experimentos. Todos os compostos foram sintetizados e gentilmente cedidos pela Dra. Maribel Navarro, Universidade Federal de Juiz de Fora – Juiz de Fora, MG.

4.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Nesse teste, foi avaliada a susceptibilidade das células em suspensão de *Candida albicans* e *Candida glabrata* aos antifúngicos, pela técnica de microdiluição em caldo.

Os resultados obtidos foram analisados de acordo com o documento M27-A3 e os anexos S3 (2008a) e S4 (2012) do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008a,b; 2012) Resumidamente, alíquotas de 100 µL de meio RPMI 1640 pH 7.2 tamponado com 0,16M de MOPS (Sigma-Aldrich; USA) (pH 7,2) foram distribuídas em poços da microplaca de 96 poços. Em seguida, 100 µL de soluções 4x concentradas dos compostos a serem testados (preparadas utilizando o mesmo meio de cultura) foram adicionadas na coluna 1 das placas e serão realizadas diluições seriadas de 1:2 dos compostos, da coluna 1 a 10, obtendo concentrações finais em uma faixa de 0,007 µg/mL – 4 µg/mL e 0,001 µg/mL – 1 µg/mL. Por fim, as leveduras de *C. albicans* e *C. glabrata* foram padronizadas para 1×10^3 UFC/mL e 100 µL da suspensão fúngica final foi adicionada aos poços de cada placa. As placas prontas foram incubadas em estufas a 35°C, com injeção de 5% de CO₂, durante 48 horas. A concentração mínima de cada composto capaz de inibir 50% e 90% do crescimento das células planctônicas (CIM₅₀ e CIM₉₀) em relação ao controle foi determinada por leitura visual e confirmada por espectrofotometria (absorbância em 490 nm) em leitor de placas (Spectra Max M2/M2^e, Molecular Devices Ltd, USA).

4.4 Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A Concentração Fungicida Mínima (CFM) tem por definição ser a menor concentração do agente antifúngico capaz de levar o fungo em teste a morte. Após o resultado da CIM, uma alíquota de 10 µL de cada poço, onde não houve crescimento fúngico visível após o tratamento, foi transferida para uma placa de petri contendo meio Sabouraud dextrose sem a presença do antifúngico. Estas placas foram incubadas em estufas a 35°C, com injeção de 5% de CO₂, durante 48 horas, mantendo as mesmas condições do teste anterior. O resultado foi obtido por meio de análise visual, identificando a menor concentração dos antifúngicos em teste que impediu a formação de colônias no meio de cultivo. O efeito da droga é considerado fungicida quando o valor da CFM obtido é igual ou até 4 vezes maior que o valor da CIM (Pfaller, Sheehan, & Rex, 2004). Compostos com valores de CFM maiores do que 4x CIM foram considerados fungistáticos.

4.5 Formação de biofilme por *Candida* spp.

As leveduras de *Candida albicans* SC5314 e *Candida glabrata* ATCC 2001 foram cultivadas conforme escrito nas outras etapas e, após serem lavadas em PBS 0,01M, pH 7,2, foram padronizadas a 1×10^7 UFC/mL em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS e suplementado com 2% de glicose. Para a formação do biofilme, 100 μ L dessa suspensão padronizada foi adicionada aos poços da microplaca de 96 poços e, então, incubada a 36°C, sob agitação (150 RPM) por 1,5 horas para que as leveduras iniciem o processo de adesão ao fundo dos poços. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células aderidas incubadas por 24 h com 100 μ L de meio RPMI suplementado com 2% de glicose, a 36 °C, sob agitação (150 RPM).

4.5.1 Efeito dos antifúngicos em biofilmes maduros.

Para a avaliação da atividade antifúngica, após a formação do biofilme o sobrenadante dos poços foi descartado e os biofilmes foram lavados com 100 μ L de PBS estéril. Em seguida, diluições foram feitas em uma placa separada e transferidas cuidadosamente para a placa contendo o biofilme (100 μ L em cada poço). As placas contendo o biofilme recoberto pela diluição das drogas foram incubadas a 36°C, sob agitação (150 RPM), por 24 horas. Após a quantificação dos biofilmes pelo ensaio de redução do XTT (descrito a seguir na sessão 4.5.3), a menor concentração de cada composto capaz de reduzir a atividade metabólica do biofilme em 50% (Concentração Inibitória Mínima do Biofilme - CIMB₅₀) e 90% (CIMB₉₀) foi calculada, em relação ao controle, utilizando a seguinte fórmula: % inibição = $[100 - (100 \times A_{\text{tratado}}/A_{\text{controle}})]$, onde: A_{tratado} corresponde ao valor de absorbância em 490nm de cada poço do biofilme tratado e A_{controle} corresponde a absorbância dos poços controle.

4.5.2 Formação do biofilme em fragmentos de unha.

Fragmentos de unhas das mãos foram cedidos por voluntárias saudáveis, cortados com auxílio de uma tesoura e autoclavados antes de seu uso. Os biofilmes foram formados na região interna desses fragmentos de unha estéreis, segundo o protocolo descrito por Vila et al., 2015. Resumidamente, cada fragmento foi colocado no fundo de um poço da microplaca de 96 poços e em seguida, 100 μ L da suspensão fúngica padronizada a 1×10^7 UFC/mL foi adicionada sobre as unhas e as placas incubadas a 36°C, sob

agitação (150 RPM), por 1,5 horas, correspondendo a fase de aderência. Após esse tempo, o sobrenadante foi descartado para remover as células que não aderiram a superfície da unha e 100 µL de meio de cultura RPMI suplementado com 2% de glicose, contendo ou não (controle) as drogas em teste, foi adicionado a cada poço. As placas foram novamente incubadas a 36°C, sob agitação (150 RPM), por 24h. O efeito das drogas sobre os biofilmes formados em unhas foi avaliado quantitativamente pelo ensaio de redução do XTT (descrito na sessão 4.6.3) e visualmente por microscopia eletrônica de varredura (MEV), conforme descrito na sessão 4.6.

4.5.3 Quantificação do biofilme

O ensaio de redução do XTT é realizado para avaliar a atividade mitocondrial das células que compõem o biofilme que, ao metabolizar esse sal, formam uma substância alaranjada solúvel em água chamada Formazan, cujo valor da absorbância da luz é proporcional à taxa de atividade metabólica das células no ensaio (Peeters, Nelis, & Coenye, 2008). O ensaio de redução do XTT foi utilizado neste trabalho para avaliação do crescimento dos biofilmes e da atividade antifúngica dos compostos testados, tanto no fundo da placa quanto nas superfícies de unhas. Após a incubação do biofilme na presença dos compostos por 24h, o sobrenadante do biofilme foi descartado e a quantificação do biofilme foi realizada adicionando 100 µL de solução contendo XTT a 0,1 mg/mL e menadiona a 1 µM (ambos Sigma-Aldrich; USA) diluídos em PBS, nos poços contendo biofilmes. No caso de biofilmes formados nas unhas, cada fragmento foi transferido para o poço adjacente vazio com auxílio de uma pinça para garantir que apenas os biofilmes formados sobre a unha sejam quantificados. A placa foi, então, incubada a 36°C por 2 horas protegida da luz e, em seguida, 90 µL do sobrenadante da cultura foi cuidadosamente transferido para uma nova placa para leitura da absorbância em espectrofotômetro (490 nm) (Spectra Max M2/M2^e, Molecular Devices Ltd, USA).

4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Biofilmes de *Candida albicans* SC5314 e *Candida glabrata* ATCC 2001 foram formados na região interna de fragmentos de unha por 24h conforme descrito anteriormente e tratados com os compostos em teste por 24h adicionais. Estas unhas contendo o biofilme foram processadas para microscopia eletrônica de varredura,

conforme descrito por Vila et al., 2013. Os fragmentos de unha foram lavados duas vezes em PBS e fixados em solução contendo 4% paraformaldeído, 2,5% glutaraldeído, em 0,1M de tampão cacodilato por 1 hora, a temperatura ambiente. Após a fixação, as amostras foram lavadas com o mesmo tampão e pós-fixadas por 30 minutos em solução contendo tetróxido de ósmio a 1%, ferrocianeto de potássio a 1,25% e CaCl 5mM. Em seguida, as amostras foram lavadas em água e desidratadas utilizando concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). Por fim, as amostras foram secas em ponto crítico de CO₂, aderidas em suporte metálico, metalizadas com ouro e então, visualizadas em microscópio eletrônico de varredura (QUANTA 250, FEI, Holanda).

4.7 Ensaio de combinação de drogas (*Checkerboard*)

O ensaio de combinação de drogas consiste em avaliar a atividade antifúngica de duas drogas juntas, a fim de avaliar se suas atividades antifúngicas aumentarão por estarem juntas (sinergia), se não terão alteração de atividade (indiferença) ou se elas atrapalharão a atividade uma da outra (antagonismo) (F. C. Odds, 2003). Neste trabalho nós utilizamos o ensaio de combinação para elucidar se a atividade observada nos experimentos anteriores se dá pela complexação dos metais com o antifúngico ou apenas pela presença do sal de partida contendo o metal e do antifúngico na mesma solução. Assim, utilizamos o clotrimazol em combinação com os sais de partida ZnAc, KAuCl₄ e AuCIPPh₃. A leitura foi realizada visualmente. O resultado foi interpretado utilizando o Índice de Fracionamento (FIC index). O FIC index é calculado pela seguinte fórmula: $FI = [(CIMAc/CIMAs) + (CIMBc/CIMBs)]$, onde CIMAc é o CIM da droga A em combinação, CIMAs é o MIC da droga A sozinha, CIMBc é o CIM da droga B em combinação e CIMBs é o CIM da droga B sozinha. O resultado obtido é, então, comparado ao Índice estabelecido: se $FIC > 4$, antagonismo; Se $FIC < 4$ e $> 0,5$, indiferente; Se $FIC < 0,5$, sinérgico (F. C. Odds, 2003).

4.8 Atividade hemolítica dos compostos teste

1 mL de sangue coletado de voluntários saudáveis foi centrifugado a 1500 RPM por 5 minutos e lavado 3 vezes em solução salina (0,9% de NaCl em água ultra pura) para redução do plasma presente. Foi utilizada a solução de hemácias a 2,5% e o ensaio foi

realizado em microplaca de 96 poços. Cada um dos poços recebeu 200 μL dos antifúngicos em teste diluídos em concentrações finais nas faixas de 1000 $\mu\text{g/mL}$ – 100 $\mu\text{g/mL}$ e 500 $\mu\text{g/mL}$ – 75 $\mu\text{g/mL}$. 200 μL de água destilada estéril foi utilizada como controle positivo (100% hemólise), 200 μL de solução salina como controle negativo (0% hemólise) e 200 μL de DMSO a 0,01% como controle das diluições dos antifúngicos. Fluconazol e Anfotericina B nas concentrações finais de 2000 $\mu\text{g/mL}$ – 100 $\mu\text{g/mL}$ e 500 $\mu\text{g/mL}$ – 0,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, foram utilizados como antifúngicos padrão para comparação. Após a diluição das drogas, 50 μL da solução de hemácias foi adicionado em todos os poços e a placa foi incubada por 40 minutos em estufa a 37°C, com injeção de 5% CO_2 . Após o tempo determinado, a placa foi centrifugada a 3000 RPM por 5 minutos, 100 μL do sobrenadante foi transferido para uma nova placa de 96 poços e a absorbância em 562 nm foi determinada em espectrofotômetro para avaliar a quantidade de hemoglobina liberada. Por fim, a atividade hemolítica dos compostos que causou 50% de hemólise (AH50%) foi calculada em relação ao controle (sem adição de droga).

5. RESULTADOS

5.1 Determinação da atividade dos agentes antifúngicos sobre células planctônicas de *Candida albicans* e *Candida glabrata*

Primeiramente, foram realizados testes de susceptibilidade das células planctônicas de *C. albicans* (SC 5314) e *C. glabrata* (ATCC 2001) aos complexos metálicos de ouro e zinco em comparação aos antifúngicos padrão (fluconazol, itraconazol, cetoconazol e clotrimazol), com os resultados apresentados na tabela 1.

Dentre os compostos testados, tanto os complexos de ouro como os de zinco apresentaram resultados satisfatórios, com CI_{90} próximos ou menores do que os antifúngicos correspondentes sozinhos, com destaque para o AuCTZCl e o ZnAcITR, cujos valores de CI_{90} foram significativamente menores do que os seus respectivos antifúngicos sozinhos (Tabela 1) para *Candida albicans*. Os imidazóis cetoconazol e clotrimazol apresentaram CI_{90} menores do que o triazol fluconazol (droga mais utilizada no tratamento de candidíases), demonstrando que ainda podem ser uma boa escolha de tratamento para infecções superficiais. O sal de partida AuClPPh₃ sozinho apresentou atividade inibitória sobre o crescimento de *C. glabrata* enquanto o sal de partida KAuCl₄ mostrou atividade inibitória sobre *C. albicans* (Tabela 1).

Para *C. glabrata*, a CFM para cetoconazol (Sigma) e para seu complexo com ouro (AuKTZCl), e do complexo de itraconazol com zinco (ZnAcITR), foi 2 a 4 vezes maior que o CI_{90} (Tabela 1). Esses resultados sugerem que esses compostos possuem atividade fungicida contra as formas planctônicas das duas espécies de *Candida* em teste, de acordo com a definição de que um agente com atividade fungicida quando o CFM é até quatro vezes maior que o valor da CIM, proposta por Pfaller, Sheehan, & Rex, 2004.

Tabela 1. Atividade antifúngica dos complexos organometálicos conjugados com Clotrimazol, Cetoconazol, Fluconazol e Itraconazol, dos respectivos antifúngicos sozinhos e dos sais de partida sobre células planctônicas de *Candida albicans* SC 5314 e *Candida glabrata* ATCC 2001, determinado pelo método de microdiluição em caldo (CLSI, 2008b). A concentração inibitória mínima (CI) e a concentração fungicida mínima (CFM) estão expressas em µg/mL.

Compostos	<i>C.albicans</i> SC 5314			<i>C.glabrata</i> ATCC 2001		
	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM
Fluconazol (Sigma)	0,06-0,03	0,25	> 1	2	> 4	> 4
Itraconazol (Sigma)	0,008	0,03	> 4	0,25	1	> 4
Cetoconazol (Sigma)	< 0,002	0,004	> 1	0,06 - 0,125	0,125	2
Cetoconazol (KTZ)	< 0,002	0,002 - 0,004	> 1	0,016	0,06	2 - 4
AuKTZ	< 0,002	0,008	> 1	0,03	0,125 - 0,25	> 4
AuKTZCl	0,008-0,016	0,008-0,016 ^T	> 1	0,03	0,125 - 0,25	2 - 4
Clotrimazol (CTZ)	0,002-0,03	0,002 - 0,06	> 1	0,03	0,5 - 1	> 4
AuCTZ	0,002-0,125	0,004 - 0,25	> 1	0,5	1	> 4
AuCTZCl	0,002-0,016	0,008 - 0,03	> 1	0,06-0,5	0,5 - 1	> 4
ZnAcCTZ	0,001-0,003	0,016-0,03	> 4	0,03 - 0,25	0,5 - 1	> 4
ZnClCTZ	0,016	0,016-0,03	> 4	0,125 - 0,5	0,5 - 1	> 4
Fluconazol (FLC)	0,008-0,03	0,125-0,5	> 4	2	4	> 4
ZnAcFLC	0,016-0,06	0,25-0,5	> 4	2-4	4 - > 4	> 4
Itraconazol (ITR)	0,008	0,125-0,5	> 4	0,5 - 1	1 - 4	> 4
ZnAcITR	0,03-0,06	0,03-0,125	> 4	0,03 - 0,125	0,25 - 1	4
AuCIPPh3	0,5	> 1	> 1	0,25	1	> 4
KAuCl4	2	4	> 1	> 4	> 4	> 4
ZnAc	4	> 4	> 4	> 4	> 4	> 4
ZnCl2	0,5 - > 1	> 4	> 4	> 4	> 4	> 4

T: Efeito trailing;

5.2 Determinação da atividade dos agentes antifúngicos sobre biofilmes maduros de *Candida albicans* e *Candida glabrata*

Para determinar as concentrações mínimas dos compostos metálicos de ouro e zinco e antifúngicos padrão que afetam os biofilmes maduros *in vitro*, o ensaio de microdiluição foi adaptado e realizado conforme descrito anteriormente na sessão 4.5.

Dentre os compostos testados, AuKTZ, AuKTZCl, AuCTZ e ZnAcCTZ foram os complexos que apresentaram CIB₅₀ e CIB₉₀ menores ou semelhantes aos seus antifúngicos correspondentes sozinhos para ambas as espécies, *C. albicans* e *C. glabrata* (Tabela 2). O composto AuCTZ demonstrou a melhor atividade inibitória sobre biofilmes de *C. glabrata* ATCC 2001 formados em placa, reduzindo a atividade metabólica do biofilme em 50-60% em todas as concentrações testadas (Figura 3). Os dois complexos de zinco, ZnAcCTZ e ZnClCTZ, também reduziram significativamente a atividade metabólica dos biofilmes maduros de *C. glabrata* em concentrações acima de 32 µg/mL (Figura 3). Como o Fluconazol não apresenta atividade inibitória sobre biofilmes, o padrão ouro de comparação nestes experimentos foi a Anfotericina B. Os sais de partida que haviam demonstrado atividade antifúngica em células planctônicas não foram ativos contra biofilmes maduros de nenhuma das espécies (Tabela 2).

Tabela 2. Atividade antifúngica dos complexos organometálicos conjugados com Clotrimazol e Cetoconazol em biofilme maduro de *Candida albicans* SC 5314 e *Candida glabrata* ATCC 2001. A atividade antifúngica foi quantificada pelo método de redução do XTT. O CIB₅₀ e CIB₉₀ estão expressos em µg/mL.

Compostos.	<i>C. albicans</i> SC 5314		<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	
	CIB ₅₀	CIB ₉₀	CIB ₅₀	CIB ₉₀
Fluconazol (Sigma)	> 1024	> 1024	>1024	>1024
Anfotericina B (Sigma)	2 – 4	16 – 32	8	> 1024
Cetoconazol (Sigma)	2 - 512	1024	> 1024	> 1024
Cetoconazol (KTZ)	256	> 256	16 - 32	256
AuKTZ	128	> 128	64 - 128	256
AuKTZCl	128 - 256	256	1 – 4	256
Clotrimazol (CTZ)	256	> 256	64 - 128	>128
AuCTZ	64 – 128	256	64 – 128	128 – 256
AuCTZCl	>128	>128	> 256	> 256
ZnAcCTZ	16	256	32 – 64	> 256
ZnClCTZ	>128	>128	128	> 256
AuCIPPh3	>128	>128	> 256	> 256
KAuCl4	NR	NR	> 256	> 256
ZnAc	>128	>128	> 256	> 256
ZnCl2	NR	NR	> 256	> 256

NR: não realizado por falta de material.

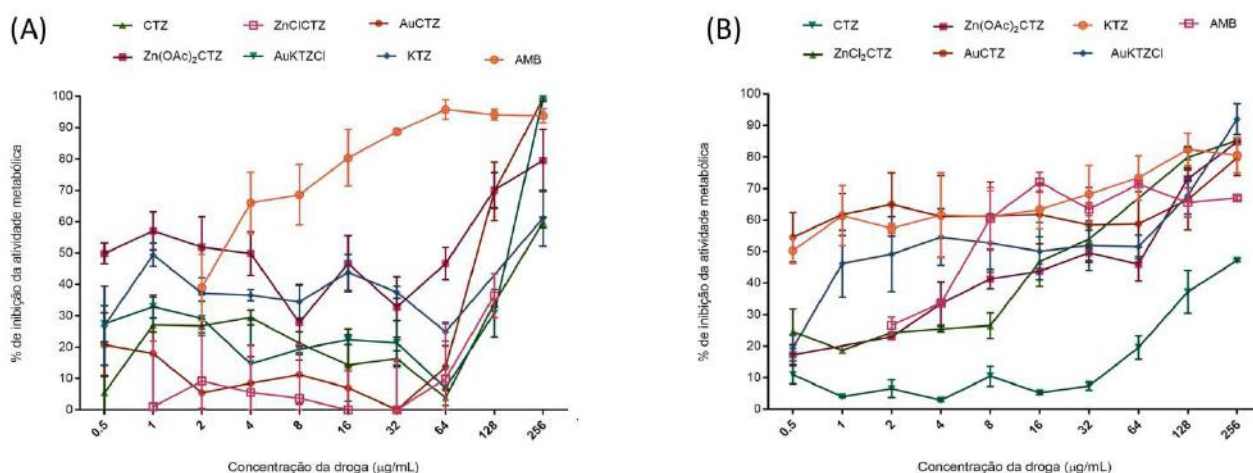


Figura 3. Curva de atividade de Anfotericina B (AMB), Clotrimazol (CTZ), Cetoconazol (KTZ) e seus complexos de ouro e zinco sobre biofilmes maduros de (A) *Candida albicans* e (B) *Candida glabrata*. O efeito foi avaliado pela % inibição da atividade metabólica das células do biofilme, através do ensaio de redução do XTT.

5.3 Quantificação da atividade metabólica dos agentes antifúngicos sobre biofilmes maduros de *Candida albicans* e *Candida glabrata* formados em fragmentos de unha

Os resultados previamente descritos demonstraram que alguns dos complexos metálicos de ouro e zinco possuem atividade significativa contra biofilmes maduros de *C. albicans* e *C. glabrata*. A fim de determinar se esses compostos também seriam ativos em um sistema *in vitro* que se assemelha à onicomicose, foi utilizado um modelo de biofilme formado em fragmentos de unha humana estéril conforme descrito previamente por Vila, Rozental, & de Sá Guimarães, 2015. Os compostos complexados que apresentaram atividade satisfatória sobre biofilmes no ensaio de diluição seriada foram selecionados para o teste de atividade em biofilmes formados sobre unhas e sua leitura feita por ensaio de redução do XTT, como descrito na sessão 4.5.3.

A concentração das drogas utilizadas no tratamento das unhas foi de 256 µg/mL e nos gráficos, é demonstrada a porcentagem de atividade metabólica das células formadoras dos biofilmes tanto tratados como o controle. Para ambas as espécies, todos os tratamentos com os complexos demonstraram uma diminuição da atividade metabólica do biofilme em relação ao controle, porém, apenas o AuCTZ e o AuKTZCI

apresentaram atividade significativa nas duas espécies (Figura 4). Também é importante destacar que todos os tratamentos reduziram significativamente os biofilmes formados por *C. glabrata* (Figura 4), que é a espécie que possui resistência intrínseca aos azóis (Glöckner & Cornely, 2015).

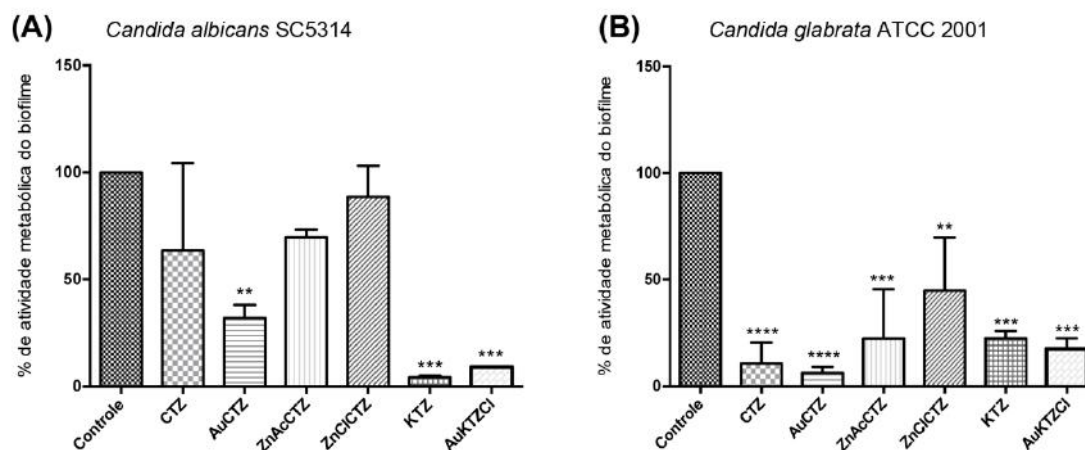


Figura 4: Gráfico em barras da porcentagem de células metabolicamente ativas do biofilme formado em fragmentos de unha após os tratamentos com o clotrimazol e seus complexos para as duas cepas estudadas. Teste de Dunnett: **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001. (A) *Candida albicans* SC5314; (B) *Candida glabrata* ATCC 2001.

5.4 Alterações morfológicas causadas pela ação dos agentes antifúngicos sobre biofilmes maduros formados em fragmentos de unha

A fim de observar os efeitos estruturais causados pelo tratamento de biofilmes com os complexos de zinco e ouro, biofilmes formados em unhas humanas e tratados por 24h com os compostos selecionados previamente foram observadas por MEV e comparados aos controles não tratados. Para as duas espécies, os biofilmes controle apresentaram uma arquitetura típica, sendo o biofilme de *C. albicans* formado por uma densa rede de hifas e pseudohifas e o de *C. glabrata* por múltiplas camadas de leveduras, sem a presença de formas filamentosas (Figuras 5, 6, 7 e 8).

Todos os tratamentos com os complexos na concentração de 256 µg/mL diminuiram a biomassa dos biofilmes formados por *C. albicans* na superfície da unha (Figura 5 – 3A,

4A e 5A; Figura 6 – 3A). Clamidosporos foram observados nos biofilmes tratados com AuCTZ (Figura 5 - 3B) e com ZnAcCTZ (Figura 5 – 5B e 5C) e também foram vistas alterações nas hifas que ficaram retorcidas nos tratamentos com CTZ, AuCTZ (Figura 5 – 2B, 2C, 3B e 3C) e AuKTZCl (Figura 6 – 3B e 3C).

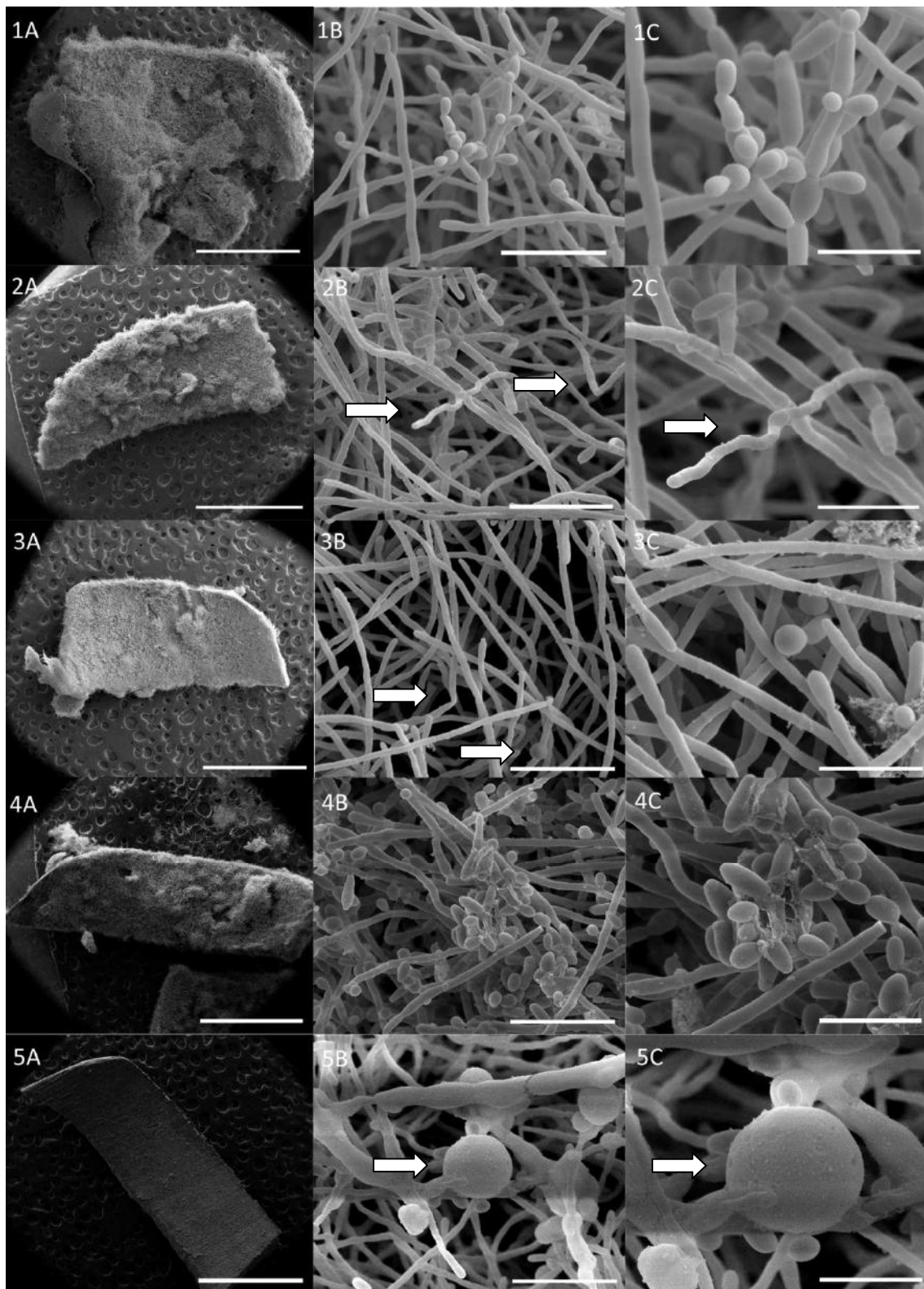


Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura de *Candida albicans* SC 5314 após tratamento com os complexos de CTZ. **1:** Controle; **2:** CTZ; **3:** AuCTZ; **4:** ZnClCTZ; **5:** ZnAcCTZ / **A:** 2mm; **B:** 20 μ M; **C:** 10 μ M

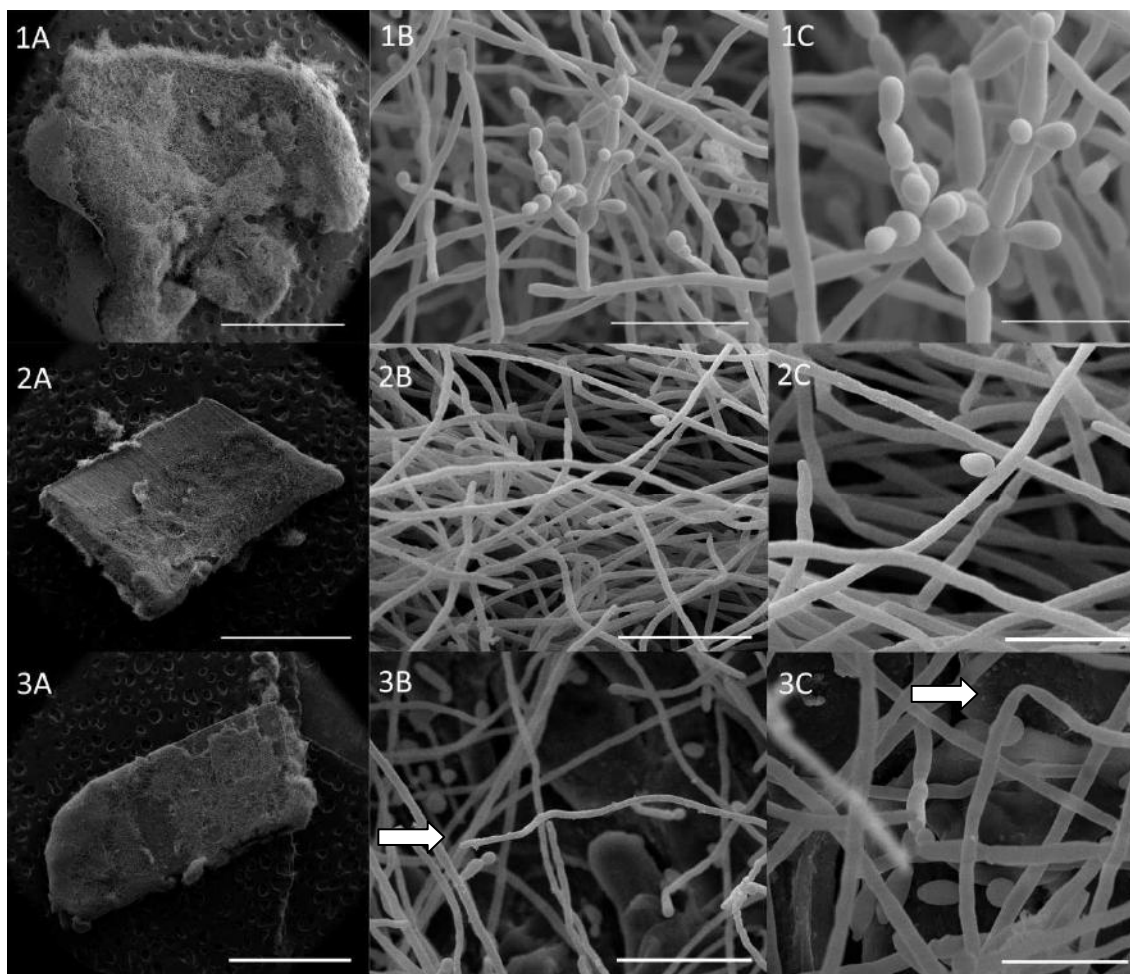


Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura de *Candida albicans* SC 5314 após tratamento com os complexos de KTZ. **1:** Controle; **2:** CTZ; **3:** AuCTZ; **4:** ZnClCTZ; **5:** ZnAcCTZ / **A:** 2mm; **B:** 20µM; **C:** 10µM

No caso de *C. glabrata*, o tratamento com os complexos na concentração de 256 µg/mL praticamente eliminou o biofilme formado por esse fungo, levando a redução da biomassa aderida à superfície da unha (Figura 7 – 3A, 4A e 5A; Figura 8 – 3A). Entretanto, o biofilme remanescente após o tratamento com CTZ, apesar de demonstrar leveduras maiores e entumescidas (Figura 7 – 2B e 2C), apresentava estrutura semelhante ao controle, sendo composto exclusivamente por formas leveduriformes, enquanto os biofilmes tratados com CTZ complexado aos metais apresentaram pseudohifas em sua estrutura (Figura 7 – 3B, 3C, 4B, 4C, 5B e 5C). No caso do KTZ, tanto ele quanto seu complexo teve a presença de formas filamentosas e leveduras com alterações (Figura 8 – 2B, 2C, 3B e 3C).

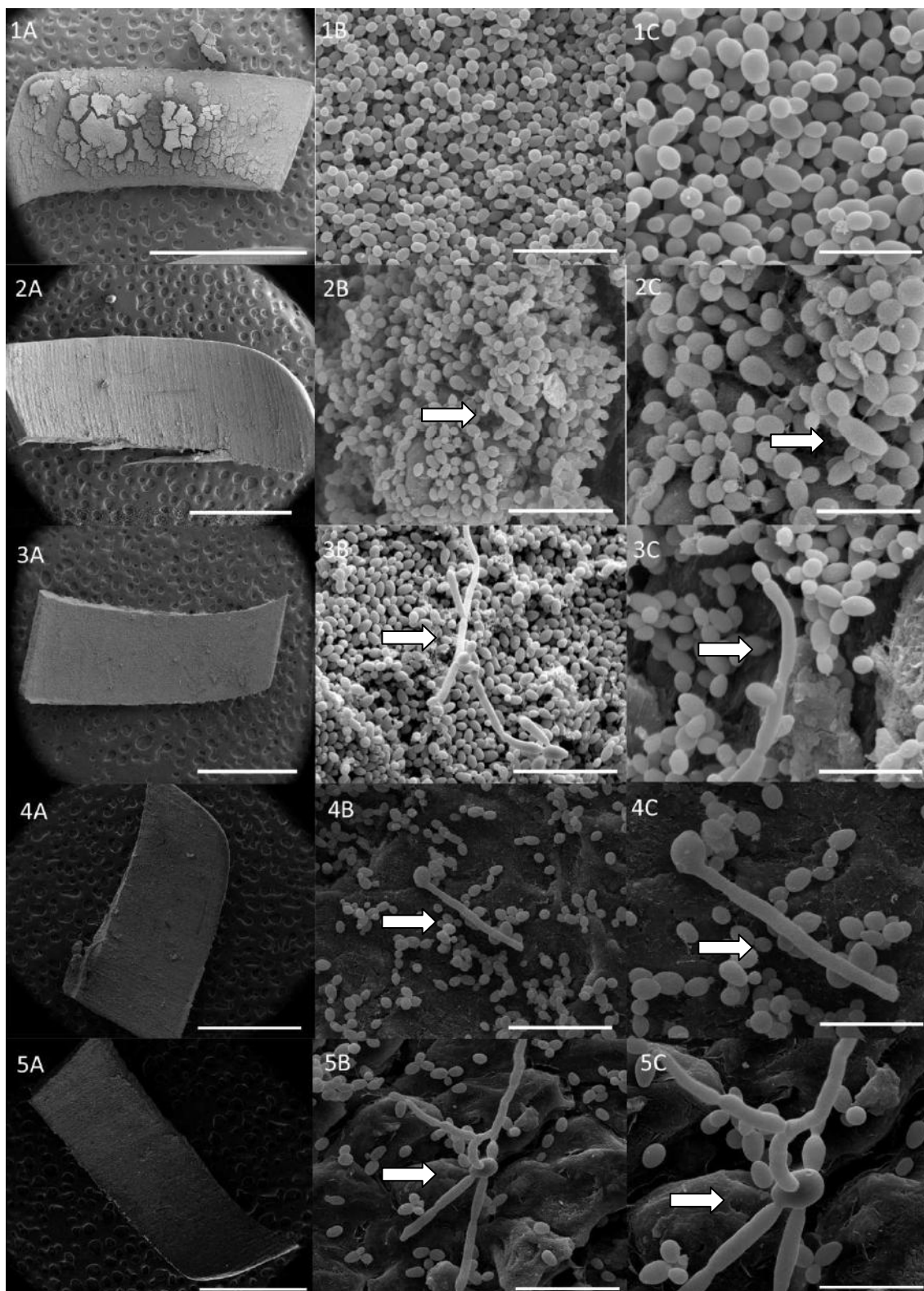


Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura de *Candida glabrata* ATCC 2001 após tratamento com os complexos de CTZ. **1:** Controle; **2:** CTZ; **3:** AuCTZ; **4:** ZnClCTZ; **5:** ZnAcCTZ / **A:** 2mm; **B:** 20µM; **C:** 10µM

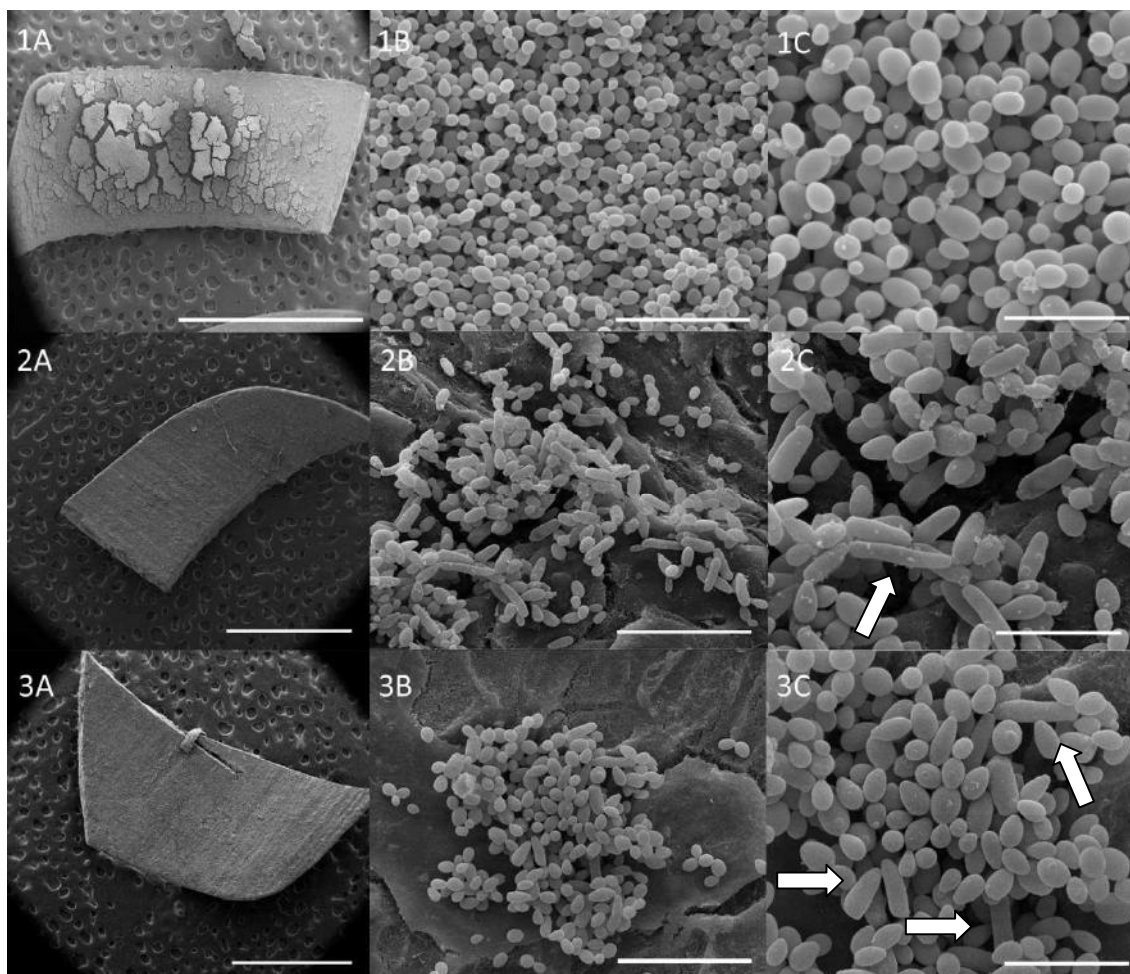


Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura de *Candida glabrata* ATCC 2001 após tratamento com os complexos de KTZ. **1:** Controle; **2:** KTZ; **3:** AuKTZCl / **A:** 2mm; **B:** 20 μ M; **C:** 10 μ M

5.5 Checkerboard dos sais de partida com Clotrimazol e Cetoconazol

A fim de entender o tipo de efeito demonstrado pela combinação do zinco e do ouro com os antifúngicos comerciais e buscando observar se esse efeito é visto após a complexação dos compostos ou se já existia mesmo sem os compostos estarem coordenados numa mesma molécula, realizamos o teste de efeito combinatório (Checkerboard). Conforme descrito na sessão 4.7, utilizamos o clotrimazol em combinação com os sais de partida ZnAc, ZnCl, KAuCl₄ e AuClPPh₃ e o cetoconazol com KAuCl₄ e AuClPPh₃. Em *Candida albicans*, a combinação dos sais de ouro com clotrimazol demonstraram atividade sinérgica, onde a CIM das combinações foi menor do que as CIM dos compostos sozinhos. Por outro lado, os sais de partida de zinco combinados ao clotrimazol e os sais de ouro combinados ao cetoconazol apresentaram indiferença, não havendo potencialização da ação deles em separado (Tabela 3). No caso de *C. glabrata*, três combinações com ouro demonstraram sinergia enquanto todas as combinações com zinco apresentaram indiferença (Tabela 4).

Tabela 3. Ensaio de combinação de drogas pelo método de Checkerboard. A atividade antifúngica das drogas base em combinação com seus respectivos sais de partida foi avaliada em células planctônicas de *Candida albicans* SC 5314 e comparada à atividade de cada composto sozinho nas mesmas condições de cultivo. O Índice de concentração fracionada - FIC index – está expresso em $\mu\text{g/mL}$ e sua respectiva interpretação foi baseada nos parâmetros estabelecidos por Odds et al. conforme descrito na sessão 4.7.

<i>C.albicans</i>	MIC sozinho	MIC combinação	FICIndex	Interpretação
Clotrimazol KAuCl ₄	0,007 > 32	0,0007 0,5	0,12	Sinergismo
Clotrimazol AuClPPH ₃	0,007 4	0,0007 0,5	0,235	Sinergismo
Clotrimazol ZnAc	0,015 > 32	0,015 32	2	Indiferente
Clotrimazol ZnCl	0,007 32	0,015 1	2,17	Indiferente
Cetoconazol KAuCl ₄	0,007 32	0,0007 0,5	1	Indiferente
Cetoconazol AuClPPH ₃	0,003 2	0,0007 2	1,24	Indiferente

Tabela 4. Ensaio de combinação de drogas pelo método de Checkerboard. A atividade antifúngica das drogas base em combinação com seus respectivos sais de partida foi avaliada em células planctônicas de *Candida glabrata* ATCC 2001 e comparada à atividade de cada composto sozinho nas mesmas condições de cultivo. O Índice de concentração fracionada - FIC index – está expresso em $\mu\text{g/mL}$ e sua respectiva interpretação foi baseada nos parâmetros estabelecidos por Odds et al. conforme descrito na sessão 4.7.

<i>C.glabrata</i>	MIC sozinho	MIC combinação	FICIndex	Interpretação
Clotrimazol KAuCl ₄	0,06 32	0,015 8	0,5	Sinergismo
Clotrimazol AuClPPH ₃	0,03 4	0,0007 2	0,52	Sinergismo
Clotrimazol ZnAc	0,03 16	0,03 0,5	1	Indiferente
Clotrimazol ZnCl	0,125 1	0,06 0,5	0,98	Indiferente
Cetoconazol KAuCl ₄	0,125 32	0,06 2	0,54	Indiferente
Cetoconazol AuClPPH ₃	0,125 2	0,03 0,5	0,49	Sinergismo

5.6 Atividade hemolítica dos complexos metálicos e seus antifúngicos padrão

No ensaio de atividade hemolítica, determinamos a menor concentração de cada composto que causa 50% de hemólise (AH₅₀), em comparação com o controle não tratado, conforme descrito na sessão 4.8. Os antifúngicos padrão (fluconazol e Anfotericina B) foram incluídos no ensaio como “controle”.

A maior concentração do teste, de 2000 µg/mL, foi estabelecida e baseada pela avaliação dos resultados do teste de microdiluição em biofilme e sendo aproximadamente 100x do que a faixa de 256 µg/mL – 64 µg/mL, conforme demonstrado na sessão 5.2. Também foi considerada a diluição dos compostos e em alguns, não foi possível chegar a essa concentração.

A anfotericina B demonstrou AH₅₀ de 10 – 0,5µg/mL, tendo uma toxicidade alta e o fluconazol, > 2000 µg/mL, tendo uma toxicidade baixa. Três dos compostos complexados a metais avaliados apresentaram AH₅₀ > 750 µg/mL (AuCTZ) e > 500 µg/mL (ZnClCTZ, ZnAcCTZ), porém o AuKTZCl demonstrou AH₅₀ de 44,73, sendo mais tóxico para as hemácias do que os outros (Tabela 5). Os sais de partida e o CTZ não complexado também apresentaram AH₅₀ semelhante aos complexos (Tabela 5), confirmando que estes compostos não possuem atividade hemolítica nas concentrações em que foram ativos contra biofilmes de *C. albicans* e/ou *C. glabrata*. Já o KTZ sozinho provavelmente apresentará atividade hemolítica mais alta do que os outros antifúngicos padrão, assim como seu complexo com ouro.

Tabela 5. Ensaio de avaliação da atividade hemolítica dos antifúngicos em teste. A avaliação foi feita em hemácias cedidas por voluntários saudáveis e a hemólise causada pela presença da droga em teste foi comparada com a hemólise causada pelos antifúngicos padrão. Os valores demonstrados na tabela foram definidos como 100x mais do que os utilizados para o biofilme, conforme descritos na sessão 5.2.

Ensaio atividade hemolítica (AH50%)

	Composto	Atividade Hemolítica de 50% (AH₅₀)
Padrão	Anfotericina B (AMB)	10 – 0,5 µg/mL
	Fluconazol (FLC)	> 2000 µg/mL*
	Clotrimazol (CTZ)	> 500 µg/mL
	Cetoconazol (KTZ)	> 53,14 µg/mL **
Complexos metálicos	AuCTZ	> 750 µg/mL
	ZnAcCTZ	> 500 µg/mL
	ZnClCTZ	> 500 µg/mL
	AuKTZCl	44,73 µg/mL **
Sais de Partida	AuClPPh ₃	> 500 µg/mL
	KAuCl ₄	> 1000 µg/mL
	ZnAc	> 1000 µg/mL
	ZnCl	nr

* maior concentração utilizada no teste (aproximadamente 100x mais que 256µg/mL).

** Luana Borba, arquivo pessoal, 2016.

6. DISCUSSÃO

A vasta maioria das infecções causadas por *Candida* spp. envolve a proliferação e formação de biofilmes em superfícies bióticas e abióticas e, conforme as formas de tratamento avançam com um maior uso de aparatos médicos, em paralelo, também aumentam o número de infecções oportunistas associadas a biofilmes (Nett, 2016).

A onicomicose é uma doença fúngica crônica que acomete as unhas e é responsável por aproximadamente 50% de todas as doenças em unhas na área dermatológica (Gupta et al., 2016). Ela possui características que compartilha com as doenças que são causadas por presença de biofilme, como a aderência desses fungos a uma superfície biótica (placa ungueal), a capacidade de funcionar como reservatório de elementos fúngicos inativos (dormentes) e a baixa penetração das drogas disponíveis para o tratamento dessas infecções (Nusbaum, Kirsner & Charles, 2012).

O tratamento antifúngico de onicomicoses é dependente, em parte, do organismo causador da doença. Infecções causadas por dermatófitos geralmente respondem melhor à alilaminas, como a terbinafina, do que aos azóis, e o uso conjunto desses antifúngicos é ainda mais efetivo contra esses fungos, como *Scopulariopsis brevicaulis* e espécies de *Aspergillus* (Gupta, Cernea, & Foley, 2016). Enquanto isso, infecções causadas por espécies de *Candida* não respondem da mesma forma que os dermatófitos aos antifúngicos, sendo eles tanto tópicos como administrados por via oral (Vila, Rozental, & de Sá Guimarães, 2015).

Nos resultados aqui representados, constatamos a eficiência do fluconazol e itraconazol quando utilizados sobre as leveduras de *C. albicans* SC5314 *in vitro*, inibindo-as. Entretanto, o mesmo resultado não foi observado para *C. glabrata* ATCC 2001, revelando uma CI_{90} de 4 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 1), o que pode ser explicado pela espécie demonstrar uma conhecida baixa susceptibilidade aos azóis, independente da presença de determinantes para a resistência adquirida (Glöckner & Cornely, 2015). Em biofilmes maduros, a anfotericina B demonstrou eficiência na inibição da atividade metabólica do biofilme das duas espécies, o que não foi observado para o fluconazol, que apresentou $CIMB_{100} > 1024 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 2). Esses dados suportam a resistência das infecções de unha causadas por espécies de *Candida* ao tratamento com os azóis, incluindo os longos períodos de tratamento com esses antifúngicos (Jayatilake et al.,

2009). Além disso, os dados também suportam a hipótese de que a formação de biofilmes pode estar envolvida com a patogênese das onicomicoses, como mencionado anteriormente, aumentando a resistência aos tratamentos antifúngicos.

Embora, atualmente, doenças causadas por *Candida* spp. tenham como recomendação o tratamento com equinocandinas, o fluconazol e a anfotericina B ainda são amplamente utilizados (Ou et al., 2017), especialmente em países em desenvolvimento – incluindo o Brasil – dado que o tratamento com equinocandinas é extremamente caro e não está disponível amplamente em redes públicas no país. Já o clotrimazol e o cetoconazol são pouco utilizados no tratamento destas infecções por conta da reduzida biodisponibilidade oral e efeitos colaterais associados, que foram reduzidos nas formulações “de segunda geração” compostas pelo fluconazol e itaconazol. Em nossos resultados, o clotrimazol e o cetoconazol demonstraram melhor desempenho *in vitro* do que o fluconazol em ambas as espécies, tanto para as leveduras como para biofilme maduro (Tabela 1 e 2) e, embora a anfotericina B tenha demonstrado uma melhor atividade anti-biofilme em ambas as espécies, a elevada toxicidade dessa droga limita a sua utilização em diversos casos (Anderson et al., 2014; Souza & Amaral, 2017). Ainda, infecções nas unhas respondem lentamente ao tratamento com AMB, uma vez que esta não penetra facilmente nos tecidos e se liga fortemente às proteínas séricas (Jayatilake, Tilakaratne, & Panagoda, 2009). Com isso, é importante destacar a opção de uso tópico desses imidazóis e, possivelmente, dos seus complexos utilizados neste trabalho, podendo ter uma maior taxa de sucesso do que os azóis sobre a infecção *in vivo*.

Sendo assim, a busca por novos antifúngicos, especialmente com atividade sobre biofilmes se faz necessária, dado o limitado arsenal terapêutico disponível atualmente. Nessa busca, é importante que os candidatos apresentem baixa toxicidade, amplo espectro de ação, boa biodisponibilidade e, conforme já citado, atividade eficiente sobre biofilmes. Muitos estudos têm sido realizados em busca de novos alvos e potenciais drogas antifúngicas e uma abordagem possível é o melhoramento químico das moléculas existentes, com a utilização de metais. Os compostos inorgânicos são historicamente considerados agentes antimicrobianos e seu uso aplicado em diversos eventos em milhares de anos (Lemire, Harrison, & Turner, 2013). A literatura relata o uso de complexos metálicos no tratamento de doenças parasitárias, como malária, leishmaniose e doença de Chagas (Navarro et al., 2010), complexos de prata contra *C.*

albicans (McCann et al., 2012) e complexos de ouro, cobre e rutênio contra *S. cerevisiae* (Navarro et al., 2004).

Os nossos experimentos demonstraram que os complexos metálicos de CTZ e KTZ apresentaram atividade inibitória satisfatória sobre as leveduras e o biofilme maduro das duas espécies de *Candida* sp. em teste. Nas leveduras, a eficácia os complexos não diferiu muito do fármaco sozinho, sugerindo que a formação do complexo não potencializou a atividade do CTZ e do KTZ sobre as células planctônicas (Tabela 1). Porém, em biofilmes maduros, tanto os complexos de ouro quanto os de zinco apresentaram valores de CIM menores que o fármaco sozinho, em especial os complexos AuKTZCl, AuCTZ e ZnAcCTZ, para as duas cepas testadas (Tabela 2).

As duas espécies de *Candida* foram selecionadas para esse trabalho pelo envolvimento desse patógeno em onicomicoses (Alvarez, González, & Castro, 2004; Jayatilake, Tilakaratne, & Panagoda, 2009; Chadeganipour & Mohammadi, 2016; Thomas et al., 2010), além de apresentarem susceptibilidade reduzida aos antifúngicos comerciais, principalmente *C. glabrata*. Também foi considerada a alta incidência de onicomicoses no Brasil e em outros países do hemisfério sul pelo uso frequente de calçados abertos e conseqüentemente o contato com fungos do solo e maior probabilidade de traumas (Morales-Cardona et al., 2014), além da prática comum de remoção de cutículas por questões cosméticas, muitas vezes sem esterilização dos materiais utilizados (Jayatilake, Tilakaratne, & Panagoda, 2009). Neste trabalho, demonstramos que os complexos metálicos tiveram uma boa atuação no biofilme formado na superfície da unha, reduzindo a atividade metabólica de suas células formadoras nas duas cepas. Porém, é importante destacar a redução significativa da atividade metabólica de todos os tratamentos em *C. glabrata*, que é resistente aos azóis (Figura 4). O modelo de biofilmes em unha *in vitro* usado neste trabalho gerou um biofilme denso e consistente em ambas as espécies de *Candida*, e assim, provavelmente pode ser útil para outros estudos de atividade de fármacos contra onicomicoses. Observamos uma grande diminuição da densidade desse biofilme com a utilização dos tratamentos, principalmente em *C. albicans* (Figura 5 e 6), além de mudanças morfológicas, como leveduras maiores e inchadas. Porém, observamos também a formação de pseudohifas presentes no biofilme de *C. glabrata*, tanto nos tratamentos com CTZ (Figura 7) como nos de KTZ (Figura 8), também com presença de leveduras alteradas morfológicamente. Essa formação de estruturas filamentosa em *C. glabrata* já foi descrita na literatura

como ocorrendo em resposta à exposição a CO₂ (Sasani et al., 2017), ou à falta de nitrogênio (Calcagno et al., 2003; Csank & Haynes, 2000) e, além disso, foi demonstrado que além de mudar sua morfologia, *C. glabrata* também pode crescer como um organismo filamentosos, com capacidade de invasão (Csank & Haynes, 2000).

Como dito anteriormente, na busca por novos antifúngicos, uma das características mais importantes a serem consideradas é esses fármacos apresentarem uma baixa toxicidade. Apesar da toxicidade não ser crítica no modelo apresentado, já que a unha não absorve o fármaco utilizado topicamente (Baswan et al., 2017), o teste inicial utilizado neste trabalho foi a observação da atividade hemolítica desses compostos. Em nossos resultados, observamos que os complexos de ouro e de zinco, no geral, apresentaram uma baixa toxicidade se comparados a Anfotericina B (0,5 – 10 µg/mL), se aproximando mais ao Fluconazol (> 2000 µg/mL) (Tabela 5). Apenas o AuKTZCl demonstrou uma toxicidade mais alta do que os outros complexos (44,73 µg/mL) mas que foi menor do que a apresentada pelo seu antifúngico padrão sozinho, KTZ (> 53,14 µg/mL) (Tabela 5), que na literatura é descrito como um antifúngico com alta toxicidade associada (Campoy & Adrio, 2016). Portanto, é importante destacar que os resultados iniciais apresentados são promissores e testes adicionais utilizando células epiteliais (em simulação à região ao redor das unhas) e células hepáticas (padrão dos ensaios de citotoxicidade) serão realizados para uma avaliação completa da tolerabilidade desses compostos.

Em nosso estudo, os resultados dos testes de combinação de drogas (*Checkerboard*) indicaram que as combinações dos sais de zinco (ZnAc, ZnCl) usados na coordenação com o clotrimazol (CTZ) nas duas cepas foram indiferentes, ou seja, não houve a potencialização da atividade na ação conjunta desses compostos e a coordenação metal-azol é a responsável pela atividade observada destes complexos em biofilmes (Tabela 3 e 4). No caso de algumas das combinações dos sais de ouro (KAuCl₄, AuClPPh₃) usados na coordenação com o clotrimazol (CTZ) e com o cetoconazol (KTZ) obtivemos resultados sinérgicos nas duas cepas, com diminuição significativa do CIM, sugerindo que houve a potencialização da atividade mesmo sem a coordenação metal-azol formando uma única molécula (Tabela 3 e 4). Algumas hipóteses podem explicar estes resultados, como por exemplo, é possível que nos complexos de zinco, o metal não se separe do antifúngico ao entrar na célula fúngica e, no citoplasma, a presença do metal pode ajudar na atuação da droga na enzima-alvo e/ou dificultar a expulsão dessa droga

pelas bombas de efluxo. Esta hipótese pode explicar a maior susceptibilidade de *C. glabrata* aos complexos metálicos, uma vez que a resistência intrínseca de *C. glabrata* aos triazóis se dá, entre outros fatores, por aumento da expressão de bombas de efluxo de drogas. Nesse sentido, a complexação com zinco pode ser responsável por reduzir a taxa de expulsão dos antifúngicos da célula e aumentar a eficácia da droga. Por outro lado, no caso dos complexos de ouro, as moléculas possivelmente se separam dentro da célula fúngica e suas ações antifúngicas acontecem em separado – justificando a obtenção de resultados semelhantes no ensaio de combinação e nos ensaios com os complexos coordenados. Além disso, ressaltamos que o número de moléculas de metais e de azóis utilizadas para a complexação metal-azol é menor do que a que compões as soluções de cada um destes em separado. Sendo assim, mesmo que as moléculas se separem ao entrar na célula fúngica, a toxicidade dos compostos provavelmente é diminuída por estarem anteriormente complexados. Esta parece ser uma importante característica destes complexos e a sua confirmação pode gerar novas possibilidades de abordagens terapêuticas para infecções fúngicas. Com isso, é importante que mais estudos sejam feitos, principalmente em modelos *in vivo*, para que essas sugestões sejam sustentadas.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que:

- *Candida albicans* e *Candida glabrata* são susceptíveis aos complexos de clotrimazol e cetoconazol com ouro e zinco, na forma planctônica.
- Os complexos de itraconazol e fluconazol com zinco demonstraram eficácia, porém apenas o ZnAcITR em *Candida glabrata* teve valores menores quando comparado ao antifúngico padrão.
- Em relação ao biofilme, AuCTZ, AuKTZCl, ZnAcCTZ e ZnClCTZ demonstraram bons resultados nas duas cepas, se comparado ao controle.
- Os complexos testados nos fragmentos de unha humana *in vitro* foram eficazes em biofilmes maduros de ambas as espécies.
- O tratamento com os complexos reduziu a biomassa e a atividade metabólica das células de biofilmes maduros.
- Demonstramos que o modelo de formação de biofilme *in vitro* em fragmentos de unhas humanas gerou um biofilme denso, se aproximando da situação clínica e assim, possivelmente pode ser aplicado com sucesso para testes com novos agentes com atividade antifúngica para tratamento de onicomicoses.
- Os complexos possuem baixa toxicidade, se comparados a Anfotericina B.
- A coordenação zinco-clotrimazol é a responsável pela atuação desses complexos.
- A coordenação ouro-azol não é a responsável pela atuação desses complexos e possivelmente, o ouro se separa do fármaco padrão dentro da célula fúngica e suas ações acontecem em separado.
- Com todos os resultados observados, demonstramos que os complexos metal-azol utilizados neste trabalho são promissores e que devem ser considerados para usos em testes *in vivo*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, B. D., Johnson, M. D., Pfeiffer, C. D., Jiménez-Ortigosa, C., Catania, J., Booker, R., Castanheira, M., Messer, S. A., Perlin, D. S., Pfaller, M. A. (2013). Increasing echinocandin resistance in candida glabrata: Clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clinical Infectious Diseases*, 56(12), 1724–1732.
- Alvarez, M. I., González, L. Á., & Castro, L. Á. (2004). Onychomycosis in Cali, Colombia. *Mycopathologia*, 158(2), 181–186.
- Anderson, T. M., Clay, M. C., Cioffi, A. G., Diaz, K. A., Hisao, G. S., Tuttle, M. D., Nieuwkoop, A. J., Cornellas, G., Maryum, N., Wang, S., Uno, B. E., Wildeman, E. L., Gonen, T., Rienstra, C. M., Burke, M. D. (2014). Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nature Chemical Biology*, 10(5), 400–406.
- Baswan, S., Kasting, G. B., Li, S. K., Wickett, R., Adams, B., Eurich, S., & Schamper, R. (2017). Understanding the formidable nail barrier: A review of the nail microstructure, composition and diseases. *Mycoses*, (November 2016), 1–12.
- Calcagno, A. M., Bignell, E., Warn, P., Jones, M. D., Denning, D. W., Mühlischlegel, F. A., Rogers, T. R., Haynes, K. (2003). Candida glabrata STE12 is required for wild-type levels of virulence and nitrogen starvation induced filamentation. *Molecular Microbiology*, 50(4), 1309–1318.
- Campoy, S., & Adrio, J. L. (2016). Antifungals. *Biochemical Pharmacology*.
- Chadeganipour, M., & Mohammadi, R. (2016). Causative Agents of Onychomycosis: A 7-Year Study. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 30(6), 1013–1020.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard, 3rd ed., M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Colombo, A. L., Guimarães, T., Sukienik, T., Pasqualotto, A. C., Andreotti, R., Queiroz-Telles, F., Nouér, S. A., Nucci, M. (2014). Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period. *Intensive Care Medicine*, 40(10), 1489–1498.
- Csank, C., & Haynes, K. (2000). Candida glabrata displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiology Letters*, 189(1), 115–120.
- D'Enfert, C., & Janbon, G. (2015). Biofilm formation in Candida glabrata: What have we learnt from functional genomics approaches? *FEMS Yeast Research*, 16(1), 1–13.
- Delattin, N., Cammue, B. P. a, & Thevissen, K. (2014). Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms. *Future Medicinal Chemistry*, 6(1), 77–90.
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15(2), 167–19.
- Douglas, L. J. (2003). Candida biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*, 11(1), 30–36.
- Eggimann, P., Que, Y. A., Revely, J. P., & Pagani, J. L. (2015). Preventing invasive candida infections. Where could we do better? *Journal of Hospital Infection*, 89(4), 302–308.
- Falagas, M. E., Roussos, N., & Vardakas, K. Z. (2010). Relative frequency of albicans and the various non-albicans Candida spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: A systematic review. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(11), e954–e966.

- Fleckman, P. (2005). Structure and Function of the Nail Unit. In *Nails*. (pp. 13-25). Elsevier Inc..
- Glöckner, A., & Cornely, O. A. (2015). *Candida glabrata* - unique features and challenges in the clinical management of invasive infections. *Mycoses*, *58*(8), 445–450.
- Gonçalves, S. S., Souza, A. C. R., Chowdhary, A., Meis, J. F., & Colombo, A. L. (2016). Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. *Mycoses*, *59*(4), 198–219.
- Gupta, A. K., Cernea, M., & Foley, K. A. (2016). Improving Cure Rates in Onychomycosis. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*.
- Gupta, A. K., & Ryder, J. E. (2003). How to improve cure rates for the management of onychomycosis. *Dermatologic Clinics*, *21*(3), 499–505.
- Jayatilake, J. A. M. S., Tilakaratne, W. M., & Panagoda, G. J. (2009). Candidal onychomycosis: A mini-review. *Mycopathologia*, *168*(4), 165–173.
- Kabir, M. A., Hussain, M. A., & Ahmad, Z. (2012). *Candida albicans*: A Model Organism for Studying Fungal Pathogens. *International Scholarly Research Network Microbiology*, *2012*, 1–15.
- Kaur, R., Domergue, R., Zupancic, M. L., & Cormack, B. P. (2005). A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Current Opinion in Microbiology*, *8*(4), 378–384.
- Lamfon, H., Porter, S. R., McCullough, M., & Pratten, J. (2004). Susceptibility of *Candida albicans* biofilms grown in a constant depth film fermentor to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: A longitudinal study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *53*(2), 383–385.
- Lemire, J. A., Harrison, J. J., & Turner, R. J. (2013). Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(6), 371–384.
- Maubon, D., Garnaud, C., Calandra, T., Sanglard, D., & Cornet, M. (2014). Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: Where are we now? *Intensive Care Medicine*, *40*(9), 1241–1255.
- McCann, M., Curran, R., Ben-Shoshan, M., Mckee, V., Tahir, A. A., Devereux, M., Kavanagh, K., Creaven, B. S., Kelleth, A. (2012). Silver(I) complexes of 9-anthracenecarboxylic acid and imidazoles: synthesis, structure and antimicrobial activity. *Dalton Transactions (Cambridge, England : 2003)*, *41*(21), 6335–49.
- Morales-Cardona, C. A., Valbuena-Mesa, M. C., Alvarado, Z., & Solorzano-Amador, A. (2014). Non-dermatophyte mould onychomycosis: A clinical and epidemiological study at a dermatology referral centre in Bogota, Colombia. *Mycoses*, *57*(5), 284–293.
- Moretti, M. L., Trabasso, P., Lyra, L., Fagnani, R., Resende, M. R., de Oliveira Cardoso, L. G., & Schreiber, A. Z. (2013). Is the incidence of candidemia caused by *Candida glabrata* increasing in Brazil? Five-year surveillance of *Candida* bloodstream infection in a university reference hospital in southeast Brazil. *Medical Mycology*, *51*(April), 225–230.
- Navarro, M., Colmenares, I., Correia, H., Hernández, A., Ching, Y., Millán, Y., Ojeda, L. E., Velásquez, M., Fraile, G. (2004). In vitro activities of transition metal derivatives of ketoconazole and clotrimazole against a wild type strain of *Saccharomyces cerevisiae* in absence or presence of human neutrophils. *Arzneimittel-Forschung*, *54*(11), 746–51.
- Navarro, M., Gabbiani, C., Messori, L., & Gambino, D. (2010). Metal-based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: Recent achievements and perspectives. *Drug Discovery Today*, *15*(23–24), 1070–1078.
- Nett, J. E. (2016). The Host's Reply to *Candida* Biofilm. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *5*(1), 33.
- Nobile, C. J., & Johnson, A. D. (2015). *Candida albicans* Biofilms and Human Disease, *33*(4), 395–401.

- Nusbaum A. G., Kirsner R. S., Charles C. A. (2012) Biofilms in dermatology. *Skin Therapy Letter* 17:1–5.
- Odds, F. C. (2003). Synergy , antagonism , and what the checkerboard puts between them, (June), 273144.
- Odds, F. C., Brown, A. J. P., & Gow, N. A. R. (2003). Antifungal agents: Mechanisms of action. *Trends in Microbiology*, 11(6), 272–279.
- Ou, H.-T., Lee, T.-Y., Chen, Y.-C., & Charbonneau, C. (2017). Pharmacoeconomic analysis of antifungal therapy for primary treatment of invasive candidiasis caused by *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species. *BMC Infectious Diseases*, 17(1), 481.
- Peeters, E., Nelis, H. J., & Coenye, T. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*, 72(2), 157–165.
- Pfaller, M. A., Castanheira, M., Lockhart, S. R., Ahlquist, A. M., Messer, S. A., & Jones, R. N. (2012). Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), 1199–1203.
- Pfaller, M. A., Sheehan, D. J., & Rex, J. H. (2004). Determination of Fungicidal Activities against Yeasts and Molds: Lessons Learned from Bactericidal Testing and the Need for Standardization. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(2), 268–280.
- Rodrigues, C. F., Silva, S., & Henriques, M. (2014). *Candida glabrata*: A review of its features and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 33(5), 673–688.
- Sandven P, Bevanger L, Digranes A, Haukland HH, Mannsåker T, Gaustad P. Candidemia in Norway (1991 to 2003): results from a nationwide study. *J Clin Microbiol* 2006;44:1977–81
- Sanguinetti, M., Posteraro, B., & Lass-Flörl, C. (2015). Antifungal drug resistance among *Candida* species: Mechanisms and clinical impact. *Mycoses*, 58(S2), 2–13.
- Sasani, E., Khodavaisy, S., Agha Kuchak Afshari, S., Darabian, S., Aala, F., & Rezaie, S. (2017). Pseudohyphae formation in *Candida glabrata* due to CO₂ exposure. *Current Medical Mycology*, 2(4), 49–52.
- Scorzoni, L., de Paula e Silva, A. C. A., Marcos, C. M., Assato, P. A., de Melo, W. C. M. A., de Oliveira, H. C., Costa-Orlandi, C. B., Mendes-Giannini, M. J. S., Fusco-Almeida, A. M. (2017). Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. *Frontiers in Microbiology*, 8(January), 1–23.
- Shapiro, R. S., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2011). Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 75(2), 213–267.
- Souza, A. C. O., & Amaral, A. C. (2017). Antifungal Therapy for Systemic Mycosis and the Nanobiotechnology Era: Improving Efficacy, Biodistribution and Toxicity. *Frontiers in Microbiology*, 8(March), 1–13.
- Thomas, J., Jacobson, G. A., Narkowicz, C. K., Peterson, G. M., Burnet, H., & Sharpe, C. (2010). Toenail onychomycosis: An important global disease burden. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*.
- Tsui, C., Kong, E. F., & Jabra-Rizk, M. A. (2016). Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathogens and Disease*, 74(4), ftw018.
- Ulu Kilic, A., Alp, E., Cevahir, F., Ture, Z., & Yozgat, N. (2016). Epidemiology and cost implications of candidemia, a 6-year analysis from a developing country. *Mycoses*, (August 2016), 198–203.

- Uppuluri, P., Chaturvedi, A. K., Srinivasan, A., Banerjee, M., Ramasubramaniam, A. K., Köhler, J. R., Kadosh, D., Lopez-Ribot, J. L. (2010). Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS Pathogens*, 6(3).
- Vila, T. V. M., Ishida, K., de Souza, W., Prousis, K., Calogeropoulou, T., & Rozental, S. (2013). Effect of alkylphospholipids on *Candida albicans* biofilm formation and maturation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(1), 113–125.
- Vila, T. V. M., Rozental, S., & de Sá Guimarães, C. M. D. (2015). A new model of in vitro fungal biofilms formed on human nail fragments allows reliable testing of laser and light therapies against onychomycosis. *Lasers in Medical Science*, 30(3), 1031–1039.
- Vlahovic, T. C. (2016). Onychomycosis Evaluation, Treatment Options, Managing Recurrence, and Patient Outcomes.
- Zarnowski, R., Westler, W. M., Lacmbouh, G. A. de, Marita, J. M., Bothe, J. R., Bernhardt, J., Sahraoui, A. L. H., Fontaine, J., Sanchez, H., Hatfield, R. D., Ntambi, J. M., Nett, J. E., Mitchell, A. P., Andes, D. R. (2014). Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *mBio*, 5(4), e01333–e01314.