

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta Tese  
será disponibilizado somente a partir  
de 23/02/2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

**Monica Yonashiro Marcelino**

**DESENVOLVIMENTO DE DERIVADOS NITROFURANOS ANTIFÚNGICOS  
PARA O CONTROLE DE INFECÇÕES POR *Candida* spp**

**Araraquara**

**2018**

**Monica Yonashiro Marcelino**

**DESENVOLVIMENTO DE DERIVADOS NITROFURANOS ANTIFÚNGICOS  
PARA O CONTROLE DE INFECCÕES POR *Candida spp***

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área de pesquisa em Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP como pré-requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

Coorientador: Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano

**Araraquara**

**2018**

### Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**M586d**

Marcelino, Monica Yonashiro

Desenvolvimento de derivados nitrofuranos antifúngicos para o controle de infecções por *Candida* spp. / Monica Yonashiro Marcelino. – Araraquara, 2018.  
142 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”.  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Biociências e  
Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de pesquisa em Microbiologia.

Orientadora: Ana Marisa Fusco Almeida.

Coorientador: Rondinelli Donizetti Herculano.

1. Derivados nitrofuranos. 2. *Candida* spp. 3. Biofilme. 4. *Galleria mellonella*.  
5. *Caenorhabditis elegans*. 6. *Danio rerio* I. Almeida, Ana Marisa Fusco, orient. II. Herculano,  
Rondinelli Donizetti, coorient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por Maria Irani Coito CRB-8/4.440

**CAPES: 40300005**

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA TESE:** Desenvolvimento de derivados nitrofuranos antifúngicos para o controle de infecções por *Candida spp*

**AUTORA: MONICA YONASHIRO MARCELINO**

**ORIENTADORA: ANA MARISA FUSCO ALMEIDA**


**COORDENADOR: RONDINELLI DONIZETTI HERCULANO**

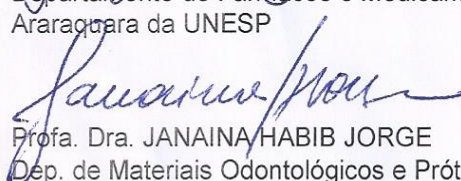
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: ANÁLISES CLÍNICAS pela Comissão Examinadora:

  
Profa. Dra. ANA MARISA FUSCO ALMEIDA  
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

  
Prof. Dr. SERGIO LUIZ DE SOUZA SALVADOR  
Departamento de Análises Clínicas Toxicologia e Bromatologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP-Ribeirão Preto

  
Profa. Dra. JULIANA CAMPOS JUNQUEIRA  
Departamento de Biotecnologia e Diagnóstico Bucal / Instituto de Ciência e Tecnologia do Campus de São José dos Campos/UNESP

  
Prof. Dr. JEAN LEANDRO DOS SANTOS  
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

  
Profa. Dra. JANAINA HABIB JORGE  
Dep. de Materiais Odontológicos e Prótese / Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araraquara da UNESP.

Araraquara, 23 de fevereiro de 2018

Este trabalho foi desenvolvido na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/SP – UNESP, sendo a doutoranda contemplada com bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

*“A meu querido tío, padrinho e amigo Shigueyuki Yonashiro (in memoriam).”*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por iluminar o meu caminho durante esta caminhada.

Aos meus pais, Carlos e Luci, meus irmãos, Guilherme e Caio, minhas avós e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu concluísse esta etapa de minha vida.

As minhas queridas amigas e companheiras de apartamento, Bruna e Priscila, pelo apoio e amizade durante o desenvolvimento deste estudo.

A Profa. Ana Marisa Fusco Almeida pela orientação, paciência, amizade e grande empenho que tornaram possível a conclusão desta tese.

Ao Prof. Rondinelli Herculano pelo incentivo e com quem partilhei o que era o broto daquilo a que veio a ser esse trabalho. Nossas conversas durante e para além do laboratório foram fundamentais.

Ao Prof. Luigi Scipione, meu supervisor durante estágio no exterior, por me acolher em seu laboratório na Universidade de Roma - La Sapienza e ensinar sobre a síntese de compostos orgânicos.

A Profa. Maria José Soares Mendes Giannini pela colaboração, apoio e disponibilidade em me ajudar.

Aos amigos do laboratório de Micologia Clínica e Núcleo de Proteômica: Ana, Carol (MG), Carol (Panta), Carol (Tatoo), Claudia, Fernanda, Haroldo, Jaqueline, Junya, Kaila, Larissa, Liliana (Lili), Luana, Mariana, Natália, Nayla, Patrícia (Laranja), Paulo, Priscila, Rodrigo, Rosângela, Suélen e Wanessa. Agradeço-lhes muito pela convivência, por cada palavra, pelas trocas, aprendizados e lições.

Em especial, a Junya pela amizade e disponibilidade em me ensinar e ajudar na realização e análise dos experimentos. A Lili pelos ensinamentos e auxílio com os métodos alternativos. A Claudia por estar sempre presente e me ajudar nos ensaios com as células. Ao Paulo pelos conselhos e apoio. A Carol (MG) por ter me recebido tão bem quando cheguei ao laboratório. A Jaque por compartilhar todas as etapas, correrias e prazos durante a realização deste estudo. A Priscila, Natália, Mariana, Rodrigo e Panta pelos cafés, conversas, risadas e conselhos. Ao Haroldo por ser companheiro durante minha estadia na Europa. A Wanessa e Luana, pela amizade e por serem uns “tormentos” durante esta etapa.



Aos amigos do Grupo de Bioengenharia e Biomateriais, Bruna, Felipe, Matheus e Nathan pelo incentivo, ajuda e apoio constantes.

Aos companheiros de laboratório de Química Farmacêutica da Universidade de Roma – La Sapienza, Chiara, Alessio, Elenora, e em especial, a Martina pelos ensinamentos e por toda ajuda na síntese dos derivados nitrofuranos.

Ao Ricardo e Rodrigo pelas aulas de italiano e pelos maravilhosos cappuccinos.

As funcionárias da seção de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Daniela Tita, Claudia Molina e Aniele Vilella, pela colaboração, eficiência e presteza nos serviços realizados.

Aos membros da banca representada pelo Prof. Dr. Sergio Luiz de Souza Salvador (USP), Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira (UNESP), Profa. Dra. Janaina Habib Jorge (UNESP) e Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos (UNESP) pelas contribuições e atenção dispensada na leitura desta tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão das bolsas de doutorado e doutorado sanduíche.

Enfim, a todas as outras pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o sucesso deste trabalho.

*Cada día que amanhece assemelha-se a uma página em branco, na qual gravamos os nossos pensamentos, ações e atitudes. Na essência, cada dia é a preparação de nosso próprio amanhã.*

*Chico Xavier*

## RESUMO

O aumento na incidência de infecções fúngicas tem progredido significativamente e dados epidemiológicos mostram que as leveduras do gênero *Candida* são as principais responsáveis pelas micoses em humanos. A terapêutica para o tratamento dos processos infecciosos causados por fungos tem encontrado uma série de problemas, como a crescente evolução da resistência aos antimicrobianos, o número restrito de fármacos disponíveis e os efeitos colaterais. Neste contexto, faz-se necessário o desenvolvimento de antifúngicos mais eficazes e menos tóxicos. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi o de realizar a síntese e verificar a atividade antifúngica de derivados nitrofuranos contra células planctônicas e biofilmes de cepas padrão de *Candida* spp., bem como analisar os efeitos tóxicos destes compostos em modelos alternativos ao uso de mamíferos. Realizou-se a síntese e caracterização físico-química de derivados nitrofuranos. Estes tiveram sua sensibilidade testada contra células planctônicas e biofilmes de *Candida* spp. nos tempos de 6, 24 e 48 horas. Além disso, foram realizados ensaios de citotoxicidade dos derivados nitrofuranos, bem como ensaios de toxicidade em *Galleria mellonella*, *Danio rerio* (zebrafish) e *Caenorhabditis elegans*. Os resultados obtidos mostraram que os compostos L7CF 113 e L7CF165 foram os que apresentaram melhor atividade antifúngica. Os biofilmes de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* formados em 6 horas apresentaram atividade metabólica reduzida quando em contato com os compostos L7CF 113 e L7CF 165 em concentrações iguais ou superiores a 62,50 µg/mL. Por sua vez, os biofilmes de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C.tropicalis*, formados nos tempos de 24 e 48 horas, apresentaram atividade metabólica reduzida para o composto L7CF 113 e L7CF 165 em concentrações iguais ou superiores a 125 µg/mL. Os ensaios de citotoxicidade e em *G. mellonella* mostraram que estas substâncias não apresentaram toxicidade. No modelo zebrafish, o L7CF 113 mostrou não ser tóxico na concentração de 31.25 µg/mL, já para o composto L7CF 165, 24 horas pós fertilização verificou-se que não houve sobrevivência dos embriões. Em modelo *C. elegans*, o composto L7CF 113 não apresentou toxicidade. Por sua vez, o composto L7CF 165 reduziu a taxa de sobrevivência dos nematoides em concentrações superiores a 31.25 µg/mL. Conclui-se assim, que os derivados nitrofuranos L7CF 113 e L7CF 165 são compostos promissores para o tratamento de infecções causadas por *Candida* spp. Sendo que, o L7CF 113 foi o que se mostrou menos tóxico nos modelos utilizados.

**Palavras-chave:** Derivados nitrofuranos. *Candida* spp. Biofilme. *Galleria mellonella*. *Caenorhabditis elegans*. *Danio rerio*.

## ABSTRACT

The increase in the incidence of fungal infections has progressed significantly and epidemiological data show that yeasts of the genus *Candida* are the main responsible for the mycoses in humans. Therapy for the treatment of infectious processes caused by fungi has encountered a number of problems, such as the increasing evolution of antimicrobial resistance, the limited number of drugs available and the side effects. In this context, the development of more effective and less toxic antifungal agents is necessary. The objective of the present study was to perform the synthesis and to verify the antifungal activity of nitrofurans derivatives against planktonic cells and biofilms of reference strains of *Candida* spp., as well as to analyze the toxic effects of these compounds in alternative models to the use of mammals. The physico-chemical synthesis and characterization of nitrofurans derivatives was carried out. These had their sensitivity tested against planktonic cells and biofilms of *Candida* spp. at times of 6, 24 and 48 hours. In addition, cytotoxicity assays of nitrofurans derivatives as well as toxicity assays were performed in *Galleria mellonella*, *Danio rerio* (zebrafish) and *Caenorhabditis elegans*. The results obtained showed that the compounds L7CF 113 and L7CF 165 showed the best antifungal activity. The biofilms of *C. albicans*, *C. krusei* and *C. glabrata* formed in 6 hours showed reduced metabolic activity when in contact with the compounds L7CF 113 and L7CF 165 in concentrations equal to or greater than 62.50 µg / mL. The biofilms of *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*, formed at 24 and 48 hours, presented reduced metabolic activity for compound L7CF 113 and L7CF 165 in concentrations equal to or greater than 125 µg / mL. The cytotoxicity assays and in *G. mellonella* model showed that these substances showed no toxicity. In the zebrafish model, the L7CF 113 showed to be non-toxic at the concentration of 31.25 µg / mL, already for the compound L7CF 165, 24 hours after fertilization it was verified that there was no survival of the embryos. In model *C. elegans*, compound L7CF 113 showed no toxicity. In turn, L7CF 165 reduced the survival rate of nematodes at concentrations greater than 31.25 µg / mL. It is thus concluded that the nitrofurans derivatives L7CF 113 and L7CF 165 are promising compounds for the treatment of infections caused by *Candida* spp. L7CF 113 was the least toxic in the models employed.

**Keywords:** Derivatives nitrofuranos. *Candida* spp. Biofilm. *Galleria mellonella*. *Caenorhabditis elegans*. *Danio rerio*.

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Modelo de desenvolvimento de biofilmes. ....	26
<b>Figura 2.</b> Estrutura química fundamental de um nitrofurano. ....	28
<b>Figura 3.</b> Estrutura química [(5-nitrofurano-2-il) metil]-(2E)-3-fenilprop-2-enoato .....	53
<b>Figura 4.</b> Estrutura química (2E)-3-(5-nitrofurano-2-il)-1-fenilpro-2-em-1-ona .....	53
<b>Figura 5.</b> Estrutura química (2E)-1-(4-metoxifenil)-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-1-ona .....	54
<b>Figura 6.</b> Estrutura química (2E)-1-[4-(1H-imidazol-1-il) fenil]-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-em-1-ona.....	55
<b>Figura 7.</b> Estrutura química (2E)-1-[4-(metanossulfonil)fenil]-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-em-1-ona.....	56
<b>Figura 8.</b> Estrutura química (2E)-1-[4-metilsulfanil) fenil]-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-em-1-ona .....	57
<b>Figura 9.</b> Estrutura química (2E)-1-(2,4-dicloro-5-fluorofenil)-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-em-ona .....	57
<b>Figura 10.</b> Cinética de formação dos biofilmes de <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. tropicalis</i> .....	61
<b>Figura 11.</b> Quantificação de polissacarídeos no decorrer da formação do biofilme de <i>Candida</i> spp.....	62
<b>Figura 12.</b> Quantificação da massa total no decorrer da formação do biofilme de <i>Candida</i> spp.....	65
<b>Figura 13.</b> Microscopia eletrônica de varredura em diferentes magnificações da formação do biofilme de <i>Candida albicans</i> após 6 (A), 24 (B), 48 (C) e 72 horas (D) de crescimento.....	66
<b>Figura 14.</b> Microscopia eletrônica de varredura em diferentes magnificações da formação do biofilme de <i>Candida glabrata</i> após 6 (A), 24 (B) e 48 (C) e 72 horas (D) de crescimento.....	67
<b>Figura 15.</b> Microscopia eletrônica de varredura em diferentes magnificações da formação do biofilme de <i>Candida krusei</i> após 6 (A), 24 (B), 48 (C) e 72 horas (D) de crescimento.....	68
<b>Figura 16.</b> Microscopia eletrônica de varredura em diferentes magnificações da formação do biofilme de <i>Candida parapsilosis</i> após 6 (A), 24 (B), 48 (C) e 72 horas (D) de crescimento. ....	69
<b>Figura 17.</b> Microscopia eletrônica de varredura em diferentes magnificações da formação do biofilme de <i>Candida tropicalis</i> após 6 (A), 24 (B), 48 (C) e 72 horas (D) de crescimento. ....	70
<b>Figura 18.</b> Perfil de interação de células fúngicas de <i>C. albicans</i> com linhagens celulares constituintes da pele: HaCaT (queratinócitos humanos) e 3T3 (fibroblasto embrionário murino). ....	71

<b>Figura 19.</b> Análise das imagens adquiridas no equipamento <i>In Cell Analyser 2000</i> da interação de células fúngicas de <i>C. albicans</i> em linhagens celulares de mamíferos HaCaT (A) e 3T3 (B).....	72
<b>Figura 20.</b> Efeito dos derivados nitrofuranos L7CF 113 e L7CF 165 contra biofilmes de <i>Candida spp</i> em estágio inicial de desenvolvimento (6 horas). ....	75
<b>Figura 21.</b> Efeito dos derivados nitrofuranos L7CF 113 e L7CF 165 contra biofilmes de <i>Candida spp</i> após 24 horas de crescimento.....	76
<b>Figura 22.</b> Efeito dos derivados nitrofuranos L7CF 113 e L7CF 165 contra biofilmes de <i>Candida spp</i> após 48 horas de crescimento.....	77
<b>Figura 23.</b> Microscopia eletrônica de varredura em diferentes magnificações dos biofilmes de <i>Candida albicans</i> após tratamento com derivados nitrofuranos. ....	78
<b>Figura 24.</b> Microscopia eletrônica de varredura em diferentes magnificações dos biofilmes de <i>Candida glabrata</i> após tratamento com derivados nitrofuranos. ....	79
<b>Figura 25.</b> Microscopia eletrônica de varredura em diferentes magnificações dos biofilmes de <i>Candida krusei</i> após tratamento com derivados nitrofuranos. ....	80
<b>Figura 26.</b> Microscopia eletrônica de varredura em diferentes magnificações dos biofilmes de <i>Candida parapsilosis</i> após tratamento com derivados nitrofuranos. ....	81
<b>Figura 27.</b> Microscopia eletrônica de varredura em diferentes magnificações dos biofilmes de <i>Candida tropicalis</i> após tratamento com derivados nitrofuranos.....	82
<b>Figura 28.</b> Citotoxicidade dos derivados nitrofuranos L7CF 113 e L7CF 165 em linhagens celulares HaCaT, 3T3 e HepG2.....	83
<b>Figura 29.</b> Larvas de <i>Galleria mellonella</i> .....	84
<b>Figura 30.</b> Toxicidade dos derivados nitrofuranos L7CF 113 e L7CF 165 em modelo alternativo <i>Galleria mellonella</i> .....	85
<b>Figura 31.</b> Porcentagem de sobrevivência de embriões de Zebrafish em contato com diversas concentrações do derivado nitrofurano L7CF 113 em 6, 24, 48 e 72 horas pós-fertilização (hpf). ....	87
<b>Figura 32.</b> Porcentagem de sobrevivência de embriões de Zebrafish em contato com diversas concentrações do derivado nitrofurano L7CF 165 em 6, 24, 48 e 72 horas pós-fertilização (hpf). ....	88
<b>Figura 33.</b> Imagens representativas do desenvolvimento embrionário do zebrafish em 24, 48 e 72 horas pós-fertilização (hpf).....	89

<b>Figura 34.</b> Porcentagem de sobrevivência do <i>Caenorhabditis elegans</i> em contato com diversas concentrações de derivado nitrofurano L7CF 113 após 24, 48, 72 e 96 horas.....	90
<b>Figura 35.</b> Porcentagem de sobrevivência do <i>Caenorhabditis elegans</i> em contato com diversas concentrações de derivado nitrofurano L7CF 165 após 24, 48, 72 e 96 horas.....	91
<b>Figura 36.</b> Eficácia terapêutica do derivado nitrofurano L7CF 113 em modelo alternativo <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	92
<b>Figura 37.</b> Eficácia terapêutica do derivado nitrofurano L7CF 165 em modelo alternativo <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	92

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Condição clínica ou fatores de risco associados a <i>Candida</i> espécies .....	16
<b>Tabela 2.</b> Indicações clínicas e efeitos toxicológicos dos azóis de segunda geração. ....	22
<b>Tabela 3.</b> Ensaios <i>in vitro</i> para avaliação da citotoxicidade.....	36
<b>Tabela 4.</b> Valores da concentração inibitória mínima (CIM), expressos em µg/mL, para os derivados nitrofuranos, fluconazol e anfotericina B contra <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> e <i>C. tropicalis</i> . ....	59
<b>Tabela 5.</b> Valores da concentração fungicida mínima (CFM), expressos em µg/mL, para os derivados nitrofuranos, fluconazol e anfotericina B contra <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> e <i>C. krusei</i> . ....	60



## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 – TESE</b> .....	<b>14</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1. Espécies de <i>Candida</i></b> .....	<b>15</b>
1.1.1. <i>Candida albicans</i> .....	16
1.1.2. <i>Candida glabrata</i> .....	17
1.1.3. <i>Candida krusei</i> .....	18
1.1.4. <i>Candida parapsilosis</i> .....	18
1.1.5. <i>Candida tropicalis</i> .....	19
<b>1.2. Terapia Antifúngica</b> .....	<b>20</b>
1.2.1. Azóis .....	20
1.2.2. Poliênicos.....	23
1.2.3. Equinocandinas .....	23
1.2.4. Análogos de pirimidinas .....	24
<b>1.3. Biofilmes</b> .....	<b>24</b>
<b>1.4. Derivados Nitrofuranos</b> .....	<b>27</b>
<b>1.5. Métodos Alternativos ao Uso de Mamíferos</b> .....	<b>29</b>
1.5.1. Modelos não mamíferos.....	30
1.5.1.1. <i>Galleria mellonella</i> .....	31
1.5.1.2. <i>Danio rerio</i> .....	32
1.5.1.3. <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	33
1.5.2. Cultura de células e tecidos .....	34
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
<b>2.1. Objetivo geral</b> .....	<b>37</b>
<b>2.2. Objetivos específicos</b> .....	<b>37</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>

<b>3.1. Microrganismos .....</b>	<b>38</b>
<b>3.2. Obtenção dos derivados nitrofuranos.....</b>	<b>38</b>
3.2.1. Síntese dos derivados nitrofuranos .....	38
3.2.1.1. [(5-nitrofurano-2-il) metil]-(2E)-3-fenilprop-2-enoato ( L7CF 113).....	38
3.2.1.2. (2E)-3-(5-nitrofurano-2-il)-1-fenilpro-2-em-1-ona (L7CF 165) .....	39
3.2.1.3. (2E)-1-(4-metoxifenil)-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-1-ona (MYM 13) .....	40
3.2.1.4. (2E)-1-[4-(1H-imidazol-1-il) fenil]-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-em-1-ona (MYM 14).....	40
3.2.1.5. (2E)-1-[4-(metanossulfonil)fenil]-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-em-1-ona (MYM 15).....	41
3.2.1.6. (2E)-1-[4-metilsulfanil) fenil]-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-em-1-ona – (MYM 16).....	42
3.2.1.7. (2E)-1-(2,4-dicloro-5-fluorofenil)-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-em-ona (MYM 18).....	42
3.2.2. Caracterização dos derivados nitrofuranos .....	43
3.2.2.1. Espectometria de massas (EM).....	43
3.2.2.2. Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR).....	43
3.2.2.3. Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	43
3.2.2.4 Determinação do feixe de fusão .....	44
<b>3.3. Preparo dos derivados nitrofuranos .....</b>	<b>44</b>
<b>3.4. Determinação da sensibilidade das cepas de <i>Candida spp.</i> dos derivados nitrofuranos pela técnica de microdiluição .....</b>	<b>44</b>
<b>3.5. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....</b>	<b>45</b>
<b>3.6. Formação de biofilmes de espécies de <i>Candida spp.</i> .....</b>	<b>45</b>
<b>3.7. Caracterização do biofilme .....</b>	<b>45</b>
3.7.1. Quantificação da atividade metabólica do biofilme por ensaio de redução do XTT ..	45
3.7.2. Quantificação de polissacarídeos pela coloração com Safranina .....	46
3.7.3. Quantificação da massa total por coloração Cristal Violeta .....	46
3.7.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	47

<b>3.8. Análise do perfil de interação célula fúngica e célula de mamífero.....</b>	<b>47</b>
3.8.1. Cultivo das células de mamíferos .....	47
3.8.2. Preparo do inóculo .....	47
3.8.3. Marcação do fungo .....	47
3.8.4. Marcação das células de mamíferos .....	48
3.8.5. Protocolo fungo-célula.....	48
<b>3.9. Efeitos dos derivados nitrofuranos frente aos biofilmes .....</b>	<b>48</b>
<b>3.10. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) biofilme tratado .....</b>	<b>49</b>
<b>3.11. Modelo cultura celular .....</b>	<b>49</b>
3.11.1. Linhagens celulares.....	49
3.11.3. Ensaio de citotoxicidade por Sulforodamina B .....	49
<b>3.12. Ensaio de toxicidade em modelo animal alternativo <i>Galleria mellonella</i>.....</b>	<b>50</b>
<b>3.13. Avaliação de segurança dos derivados nitrofuranos em modelo Zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....</b>	<b>50</b>
<b>3.14. Toxicidade e eficácia antifúngica utilizando o modelo <i>Caenorhabditis elegans</i> .....</b>	<b>51</b>
<b>3.15. Análise Estatística.....</b>	<b>52</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>4.1. Síntese e caracterização dos derivados nitrofuranos .....</b>	<b>52</b>
4.1.1. [(5-nitrofurano-2-il) metil]-(2E)-3-fenilprop-2-enoato (L7CF 113).....	53
4.1.2. (2E)-3-(5-nitrofurano-2-il)-1-fenilpro-2-em-1-ona (L7CF 165) .....	53
4.1.3. (2E)-1-(4-metoxifenil)-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-1-ona (MYM 13) .....	54
4.1.4. (2E)-1-[4-(1H-imidazol-1-il) fenil]-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-em-1-ona (MYM 14)	55
4.1.5. (2E)-1-[4-(metanossulfonil)fenil]-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-em-1-ona (MYM 15)	56
4.1.6. (2E)-1-[4-metilsulfanil) fenil]-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-em-1-ona (MYM 16) .	57
4.1.7. (2E)-1-(2,4-dicloro-5-fluorofenil)-3-(5-nitrofurano-2-il)prop-2-em-ona (MYM 18)	57

<b>4.2. Determinação da sensibilidade das cepas de <i>Candida spp.</i> pela técnica de microdiluição.....</b>	<b>58</b>
<b>4. 3. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....</b>	<b>60</b>
<b>4.4. Formação de biofilmes de espécies de <i>Candida spp.</i> .....</b>	<b>60</b>
4.4.1. Determinação da atividade metabólica do biofilme .....	60
4.4.2. Quantificação de polissacarídeos pela coloração com Safranina .....	61
4.4.3. Quantificação da massa total por coloração Cristal Violeta .....	64
4.4.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	66
<b>4.5. Análise do perfil de interação célula fúngica e célula de mamífero.....</b>	<b>71</b>
<b>4.6. Efeitos dos derivados nitrofuranos frente aos biofilmes .....</b>	<b>73</b>
<b>4.9. Avaliação de segurança dos derivados nitrofuranos em modelo Zebrafish (<i>Danio rerio</i>).....</b>	<b>86</b>
<b>4.10. Toxicidade e eficácia antifúngica utilizando o modelo <i>Caenorhabditis elegans</i> .....</b>	<b>89</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>93</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>95</b>
<b>APÊNDICE 1 .....</b>	<b>113</b>
<b>CAPÍTULO 2 – ARTIGOS.....</b>	<b>128</b>



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Espécies de *Candida*

Nas últimas décadas, a incidência de infecções fúngicas tem progredido significativamente em decorrência do crescente número de indivíduos imunocomprometidos, tais como portadores da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA), pacientes submetidos a cirurgias, transplantes, nutrição parenteral, terapia com antimicrobianos de amplo espectro, quimioterápicos e corticosteroides. Dados epidemiológicos mostram que os fungos do gênero *Candida* são os principais responsáveis pelas micoses em humanos e podem causar desde simples infecções superficiais até sistêmicas graves, podendo levar o paciente a óbito (SANGUINETTI *et al.*, 2015; SAVASTANO *et al.*, 2016).

Taxonomicamente, classifica-se o gênero *Candida* como pertencente ao reino *Fungi*, divisão *Eumycota*, filo *Deuteromycota*, ordem *Cryptococcales*, classe *Blastomycetes*, família *Cryptococcaceae*, e este apresenta entre 150 a 200 diferentes espécies (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; NEPPELENBROEK *et al.*, 2014). Dentre estas, há relatos de que aproximadamente 20 são agentes etiológicos de doenças em humanos, sendo *Candida albicans* o patógeno de maior prevalência. Entretanto, mais de 40% das candidíases são causadas por espécies não albicans (CNAs), como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (SARDI *et al.*, 2013; SANGUINETTI *et al.*, 2015; HOFST *et al.*, 2016; ARENDRUP; PATTERSON, 2017; LIN *et al.*, 2017).

Conforme mostra resumidamente a **Tabela 1**, idade, doenças adjacentes, localização geográfica, extensivo uso de fluconazol para profilaxia e a administração de antibióticos específicos tem sido considerados fatores determinantes para a variabilidade na incidência e prevalência das diferentes espécies de *Candida* (ANTINORI *et al.*, 2016).

**Tabela 1.** Condição clínica ou fatores de risco associados a *Candida* espécies

<i>Candida</i> spp	Condição clínica / Fatores de risco	Localização geográfica
<i>Candida albicans</i>	Recém-nascidos, crianças e adultos	Estados Unidos da América, Europa Central e Setentrional
<i>Candida glabrata</i>	Idosos, diabetes, câncer, doenças hematológicas, recipientes de células-tronco, profilaxia com azóis	Estados Unidos da América, Europa Setentrional (Dinamarca)
<i>Candida krusei</i>	Doenças hematológicas, recipientes de células-tronco, profilaxia com azóis, terapia com corticosteróides	Kwait, Europa Setentrional (Finlândia)
<i>Candida parapsilosis</i>	Uso de cateteres, recém-nascidos, pacientes em Unidade de Terapia Intensiva (UTI)	América do Sul (Brasil), Austrália, Norte da África e Europa Meridional (Espanha)
<i>Candida tropicalis</i>	Doenças hematológicas, terapia com corticosteróides	Ásia (China, Taiwan, Tailândia, Índia), América do Sul e Europa Setentrional (Islândia)

Fonte: Antimori et al., 2016

#### 1.1.1. *Candida albicans*

*Candida albicans* é um constituinte da microbiota endógena humana que coloniza pele, orofaringe, mucosa vaginal e gastrointestinal (KADOSH; LOPEZ-RIBOT, 2013; POLKE et al., 2015; HOFS et al., 2016). Uma característica de extrema importância deste fungo é o polimorfismo, ou seja, habilidade de apresentar diferentes morfologias, como blastóporos (levedura), tubos germinativos, pseudo-hifas, hifas verdadeiras e clamidósporos. Esta capacidade depende de fatores ambientais, disponibilidade de nutrientes, níveis de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, temperatura e pH e está fortemente relacionada a virulência deste microrganismo. Além deste aspecto, a formação de biofilmes, expressão de adesinas e invasinas na superfície celular, capacidade de provocar danos nas células hospedeiras, tigmotropismo, secreção de enzimas hidrolíticas, mudanças fenotípicas, são fatores, também, associados a patogenicidade de *C. albicans* (MODRZEWSKA; KURNATOWSKI, 2013; LU; SU; LIU, 2014; POLKE et al., 2015; HOFS et al., 2016; SAWANT; KHAN, 2017).

Na fase comensal, *C. albicans*, comumente, é encontrada em superfícies mucosas, entretanto, quando ocorre um desequilíbrio com o hospedeiro ou algum tipo de traumatismo, por exemplo, através da inserção de dispositivos médicos hospitalares e/ou procedimentos cirúrgicos, abre-se uma porta para o desenvolvimento do processo infeccioso. Numa etapa

inicial, o microrganismo encontra-se com o tecido celular, o que pode acarretar na fixação do fungo a células epiteliais, que são a primeira linha de defesa do organismo. Ressalta-se que dependendo do sistema imune e estado fisiológico do hospedeiro, esta interação pode resultar num crescimento acentuado e invasão do tecido epitelial, seguido pelo desenvolvimento da doença e ativação imune (HOFS *et al.*, 2016; BORAL *et al.*, 2017; NAGLIK *et al.*, 2017).

A candidíase sistêmica (invasiva) compreende a candidemia e a candidíase de tecido profundo. A primeira caracteriza-se pela presença do fungo na corrente sanguínea. Por sua vez, a segunda origina-se por disseminação hematogênica, podendo causar uma infecção secundária em diferentes órgãos, como coração, pulmão, fígado, rim, baço, olhos, rim, meninges e peritônio. Destaca-se que o mecanismo de patogenicidade não é exclusivo da *C. albicans*, sendo semelhante para grande parte das espécies pertencentes ao gênero *Candida* (KULLBERG; ARENDRUP, 2015; ANTINORI *et al.*, 2016; DESAI *et al.*, 2017; MELLINGHOFF *et al.*, 2018; SBRANA *et al.*, 2018).

#### 1.1.2. *Candida glabrata*

O fungo patogênico humano *Candida glabrata*, dentre as espécies não albicans, é o principal responsável pelas infecções na corrente sanguínea e mucosas de superfícies. Este microrganismo tem se tornado um sério problema de saúde, visto que as taxas de mortalidade para pacientes com infecções sistêmicas têm sido relativamente altas. Isto ocorre, provavelmente, devido a sua capacidade de desenvolver rapidamente resistência aos fármacos antifúngicos, em especial, aos azóis e seus derivados (TURNER; BUTLER, 2014; HEALEY *et al.*, 2016; MUNOZ-DUARTE *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2018). Adicionalmente, este pode resistir as condições de estresse causadas pelo sistema imune do hospedeiro e sobreviver por até 5 meses sob superfícies inanimadas (ROMAO *et al.*, 2017).

Diferentemente de outras espécies patogênicas de *Candida*, a *C. glabrata*, com tamanho variando entre 1-4  $\mu\text{m}$ , é uma levedura haploide, que não possui a habilidade de formar pseudo-hifas e apresenta-se sempre como blastoconídio, independentemente das condições ambientais. Outra característica é que esta como comensal pode ser encontrada em diversas partes do corpo humano, como boca, trato gastrointestinal e mucosa vaginal, e ao ser tornar um agente patogênico, além de doenças invasivas, pode causar vulvovaginite e candidíase bucal (GIRI; KINDO, 2012; TURNER; BUTLER, 2014; GLOCKNER; CORNELLY, 2015; FIGUEIREDO-CARVALHO *et al.*, 2017).



As estratégias de patogenicidade deste fungo compreendem invasão, colonização, evasão imune e persistência, sendo que estas não são tão agressivas como a de *C. albicans*. Outros fatores de virulência incluem a capacidade de sobreviver e reproduzir-se no interior de macrófagos, induzir respostas de citocinas pós-inflamatórias, secretar enzimas hidrolíticas (fosfolipases e hemolisinas) e formar biofilmes em superfícies bióticas (mucosa) e abióticas, como acrílico, poliuretano, látex, silicone e cateteres (HO; HAYNES, 2015; KASPER *et al.*, 2015; HOSIDA *et al.*, 2017).

### 1.1.3. *Candida krusei*

*Candida krusei* é uma levedura diploide, heterozigótica, que em contraste com a maioria das outras espécies do gênero *Candida*, que possuem formato ovoide, apresenta morfologia alongada, assemelhando a longos grãos de arroz. Este patógeno, apesar de sua baixa prevalência (aproximadamente 2%), tem sido responsável por altas taxas de mortalidade decorrentes de infecções fúngicas disseminadas acometendo, principalmente, pacientes neutropênicos, em especial, aqueles submetidos a transplantes de medula óssea ou portadores de doenças hematológicas, como leucemia mielóide (Samaranayake e Samaranayake, 1994; GIRI; KINDO, 2012; FORASTIERO *et al.*, 2015; WHALEY *et al.*, 2016). Adicionalmente, este pode ser agente etiológico de endoftalmites, endocardites, osteomielites, pneumonia, candidíase oral, vaginite, onicólise, e espondilite (YADAV *et al.*, 2012).

Este microrganismo apresenta resistência intrínseca contra fármacos antifúngicos pertencente a classe dos azóis, especificamente para o fluconazol (FLU). Apesar do mecanismo desta resistência não estar completamente elucidado, acredita-se que se deve ao fato da administração extensiva e repetitiva do FLU para suprimir infecções fúngicas (CUOMO *et al.*, 2017; DA SILVA *et al.*, 2018).

As características relacionadas à virulência da *C. krusei*, são semelhantes à de *C. albicans* e compreendem modulação do sistema imune, adesão a superfícies, produção de enzimas, como proteinases e fosfolipases, variabilidade antigênica, dimorfismo (levedura e pseudo-hifa), mudanças fenotípicas e formação de biofilmes (YADAV *et al.*, 2012; TAN *et al.*, 2018).

### 1.1.4. *Candida parapsilosis*

*Candida parapsilosis* é um ubíquo da natureza, encontrado em animais domésticos, insetos, solo e ambiente marinho, bem como, um comensal da pele humana. Normalmente, é isolada do espaço subungueal das mãos e do trato gastrointestinal. Relatos apontam que este

fungo pode causar uma doença invasiva sem prévia evidência de colonização via transmissão horizontal, a partir de fontes exógenas de infecções decorrentes da administração intravenosas de fármacos, instrumentos médicos hospitalares, em especial cateteres, ventilação mecânica, nutrição parenteral e por meio das mãos humana. Outros fatores considerados de risco são transplantes, uso de antibióticos e soluções oftalmológicas. As manifestações clínicas relacionadas a este patógeno incluem infecções do trato urinário, vulvovaginites, endocardites, artrites, perionites, meningites, queratites, otomicoses e onicomises (PAMMI *et al.*, 2013; SINGARAVELU *et al.*, 2014; GIL-ALONSO *et al.*, 2016). Ressalta-se ainda que nas últimas décadas, tem sido relatada a predominância de infecções por *C. parapsilosis* em recém-nascidos com baixo peso (abaixo de 1,500 kg), prematuros e submetidos a terapia com antibióticos, esteroides e bloqueadores de H<sub>2</sub> e a em unidades de terapia intensiva (PAMMI *et al.*, 2013; GARZILLO *et al.*, 2017; MAGOBO *et al.*, 2017).

Apesar da disponibilidade de antifúngicos para o tratamento de fungemias associadas a *C. parapsilosis*, as taxas de mortalidade atribuídas a este fungo são elevadas, compreendendo entre 25 a 40%. Isto deve-se aos determinantes de virulência que compreendem capacidade de adesão a superfície do hospedeiro, dimorfismo (fase leveduriforme e filamentosa), habilidade de crescimento em objetos e superfícies inanimadas, e em soluções contendo glicose para nutrição parenteral, formação de biofilmes e a secreção de enzimas hidrolíticas extracelulares (lipases, proteinases e fosfolipases), que podem modular a resposta imune, celular e humoral, e assim, contribuir para danos no tecido hospedeiro e invasão do hospedeiro pelas células fúngicas (SINGARAVELU *et al.*, 2014; BERKOW *et al.*, 2015; RYBAK *et al.*, 2017; TOTH, A. *et al.*, 2017; TOTH, R. *et al.*, 2017).

#### 1.1.5. *Candida tropicalis*

*Candida tropicalis* é uma levedura patogênica oportunista humana que coloniza pele, trato gastrointestinal e urogenital. Além disso, tem sido isolada de superfícies de dispositivos médicos hospitalares, como cateteres. Esta espécie comumente é encontrada em regiões de clima tropical e dependendo da região pode ser responsável por 3 a 66% dos casos de candidemia, sendo que a sua prevalência em alguns países chega a ser superior à de *Candida albicans* (CHEN *et al.*, 2014; KARKOWSKA-KULETA *et al.*, 2016; TREVINO-RANGEL *et al.*, 2017).

Este fungo é considerado um dos principais responsáveis por infecções do trato urinário e da corrente sanguínea. Sendo que, os principais fatores de risco predisponentes para o

desenvolvimento de infecções nosocomias disseminadas por *C. tropicalis* compreendem procedimentos cirúrgicos, leucemia aguda, terapia antineoplásica, neutropenia, transplantes de medula óssea, e malignidades hematológicas. (KARKOWSKA-KULETA *et al.*, 2016; GOMEZ-CASANOVA *et al.*, 2017).

Há relatos que sugerem que a *C. tropicalis* seja mais virulenta do que as demais espécies de *Candida não albicans*, entretanto, os mecanismos de patogenicidade não estão totalmente descritos. Sabe-se que a capacidade de alterar entre a forma de levedura e a de filamentos alongados é uma característica diretamente associada ao potencial patogênico deste fungo. Esta alteração morfológica reversível permite ao patógeno se adaptar rapidamente a mudanças ambientais no hospedeiro. Outros aspectos incluem alta habilidade para aderir em células epiteliais e endoteliais, secreção de fatores hemolíticos e enzimas líticas (fosfolipases e proteases) e formação de biofilmes. Adicionalmente, este microrganismo tem sido capaz de sobreviver em altas concentrações de sais, possibilitando a persistência fúngica em ambientes salinos, contribuindo, assim, para a expressão de fatores de patogenicidade *in vitro* e resistência a fármacos antifúngicos (BRILHANTE *et al.*, 2016; KARKOWSKA-KULETA *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2016; ZUZA-ALVES *et al.*, 2016; ZUZA-ALVES *et al.*, 2017).

## 1.2. Terapia Antifúngica

A terapêutica para o tratamento dos processos infecciosos causados por fungos, estão disponíveis para administração por via oral, tópica e intravenosa e incluem, principalmente, 4 classes de agentes antifúngicos: azóis, poliênicos, equinocandinas e análogos de pirimidinas (CHANG *et al.*, 2016; SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2017; FUENTEFRÍA *et al.*, 2018).

### 1.2.1. Azóis

Os azóis são moléculas cíclicas orgânicas largamente empregadas no tratamento e prevenção de micoses devido ao seu amplo espectro de atividade. Diferentemente dos mamíferos, cujas células são ricas em colesterol, o ergosterol é esterol predominante na membrana celular dos fungos. Neste contexto, os azóis foram desenvolvidos com o propósito de inibir a enzima dependente do citocromo (CYP) 450, lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase, codificada pelo gene ERG11 que converte o lanosterol em ergosterol. Sendo assim, estes fármacos alteram a biossíntese de ergosterol, que por sua vez, causa um aumento na permeabilidade da membrana

celular, resultando na lise e morte da célula fúngica. Divide-se estes fármacos em dois grupos, os imidazóis e os triazólicos. (CHANG *et al.*, 2016; CAMPOY; ADRIO, 2017).

Miconazol, cetoconazol e clotrimazol foram os primeiros antifúngicos imidazólicos desenvolvidos. Entretanto, estes não são empregados para uso sistêmico, devido ao alto potencial de toxicidade hepática e hormonal, severos efeitos colaterais e numerosas interações com outros fármacos. Sendo assim, no início da década de 1990, surgiram os triazóis de primeira geração, fluconazol e itraconazol, que são compostos sintéticos que apresentam um perfil de segurança melhorado quando comparados aos imidazólicos (CAMPOY; ADRIO, 2017; CARMONA; LIMPER, 2017; MOURAD; PERFECT, 2018).

O fluconazol é o agente de primeira linha para o tratamento de candidíase mucocutânea, candidíase vaginal, orofaríngea e esofágica, candidemia em pacientes não neutropênicos, profilaxia. Este medicamento exibe excelente biodisponibilidade, tolerabilidade e perfil de segurança, e apresenta atividade terapêutica contra grande parte das cepas de *Candida* spp., exceto para *Candida glabrata* (atividade reduzida) e *Candida krusei* (resistência intrínseca). É também altamente eficaz para o tratamento de infecções por *Cryptococcus neoformans*, entretanto, não possuiu relevância clínica para *Aspergillus* espécies (SCORZONI *et al.*, 2013; CHANG *et al.*, 2016; CAMPOY; ADRIO, 2017; CARMONA; LIMPER, 2017). Por sua vez, o itraconazol exibe uma gama antifúngica mais ampla que o fluconazol, sendo efetivo para casos de aspergiloses. Ambos os fármacos de primeira geração têm certas limitações clínicas, uma vez que não apresentam atividade contra patógenos emergentes (*Scedosporium*, *Fusarium* e *Mucorales*), bem como aumentam a resistência aos azóis, principalmente, devido a sua natureza fungistática ao invés de fungicida (CAMPOY; ADRIO, 2017; SEYEDMOUSAVI *et al.*, 2017). Além disso, estes podem causar distúrbios eletrolíticos, alopecia, lábios rachados, e efeitos tóxicos no fígado, trato gastrointestinal e coração (MOURAD; PERFECT, 2018).

Com a finalidade de solucionar estes problemas surgiram os azóis de segunda geração, que são derivados do itraconazol e fluconazol, e incluem o voriconazol, posaconazol, albaconazol, eficonazol, ravuconazol e isavuconazol (ALLEN *et al.*, 2015; PEYTON *et al.*, 2015; MOURAD; PERFECT, 2018). A **Tabela 2** mostra as principais indicações e efeitos adversos relacionados a esses fármacos.

**Tabela 2.** Indicações clínicas e efeitos toxicológicos dos azóis de segunda geração.

AZOL DE 2 <sup>a</sup> GERAÇÃO	INDICAÇÕES CLÍNICAS	EFEITOS TOXICOLÓGICOS
Voriconazol	Aspergilose invasiva, candidíase invasiva e mucocutânea, <i>Cryptococcus</i> spp., fungos dimórficos, <i>Scedosporium apiospermum</i> , <i>Fusarium</i> spp	Distúrbios visuais, reações cutâneas, confusão mental, eritema facial, síndrome de Stevens-Johnson
Posaconazol	<i>Candida krusei</i> , <i>Candida guilliermondii</i> , <i>Candida dubliniensis</i> , <i>Aspergillus</i> spp, <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Mucorales</i> spp, aspergilose invasiva juntamente com infecções por <i>Candida</i> em imunocomprometidos, profilaxia de infecções fúngicas	Distúrbios gastrointestinais, dor abdominal, náusea.
Eficonazol	Dermatófitos e não dermatófitos causadores de onicomicoses ( <i>Candida</i> spp)	Reações cutâneas
Ravuconazol	<i>Candida</i> spp, <i>Aspergillus</i> spp, <i>Mucorales</i> spp	Dores de cabeça e abdominal
Isavuconazol	<i>Fusarium</i> spp, <i>Candida</i> spp., <i>Mucorales</i> spp, <i>Cryptococcus</i> spp, leveduras negras, <i>Trichosporon</i> spp., <i>Geotrichum capitatum</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Distúrbios eletrolíticos, hepáticos, cardíacos e gastrointestinais
Albaconazol	<i>Aspergillus</i> , <i>Paecilomyces Chaetomium</i> , <i>Scedosporium prolificans</i> , candidíase vulvovaginal, onicomicoses	Não há relatos de sérios efeitos colaterais.

Fonte: (Allen *et al.*, 2015; Peyton *et al.*, 2015; Chang *et al.*, 2016; Mourad e Perfect, 2018)

### 1.2.2. Poliênicos

Antifúngicos poliênicos exercem sua atividade se ligando e desorganizando o ergosterol da membrana celular fúngica. Isto faz com que ocorra aumento da permeabilidade celular, o que acarreta desequilíbrio osmótico devido ao surgimento de poros permeáveis à saída de água e pequenas moléculas essenciais, resultando na morte do microrganismo. Desenvolvida em 1950, a anfoterina B (AmB), um produto natural da bactéria *Streptomyces nodosus*, é um fungicida pertencente a esta classe de fármacos, e tem sido empregada como o padrão ouro para o tratamento de infecções fúngicas invasivas causadas por leveduras (*Candida* e *Cryptococcus*) e fungos filamentosos (*Aspergillus*). No entanto, a AmB tem sua aplicação limitada, uma vez que causa grave nefrotoxicidade e outros efeitos adversos, como anormalidades eletrolíticas, hipomagnesemia, calafrios e febre (CHANG *et al.*, 2016; CARMONA; LIMPER, 2017; LIU *et al.*, 2018; MOURAD; PERFECT, 2018).

Tendo em vista seu alto potencial de toxicidade, mas amplo espectro de atividade, a formulação da AmB foi aperfeiçoada por meio da criação de formulações lipídicas, como complexo lipídico de AmB (ABLC - Albecet<sup>®</sup>), dispersão coloidal de AmB (ABCD - Amphocil<sup>®</sup>) e dispersão coloidal de AmB (LAmB - AmBisome<sup>®</sup>). Estes derivados de AmB são mais eficazes e menos tóxicos, especialmente no que diz respeito aos efeitos no rim (LIU *et al.*, 2018; PEA; LEWIS, 2018).

A nistatina é outro poliênico com vasta atividade antifúngica, entretanto, seu uso é limitado a via tópica, devido à baixa solubilidade em água e elevada toxidez, diarreia, aperto no peito, dor de estômago, náuseas, comichão e inchaço na boca ou mãos (SEMIS *et al.*, 2013; SAWANT; KHAN, 2017).

### 1.2.3. Equinocandinas

A mais nova classe de antifúngicos aprovada pelo FDA (Food and Drug Administration) foi a das equinocandinas, que atua inibindo a  $\beta$ -1,3-D- glicano sintase, uma enzima essencial para a síntese da parede celular fúngica, causando a morte e lise celular. Caspofungina, micafungina, anidulofungina são os fármacos pertencentes a esta classe, e são os únicos que agem exclusivamente sobre a parede celular e não sobre a membrana, o que faz com que não ocorra reações cruzadas com as células de mamíferos e, assim, a toxicidade é reduzida. Outras características incluem alta atividade contra *Candida* spp, *Aspergillus* spp e *Cryptococcus* spp (exceto *C. neoformans* e *C. gatti*), baixa resistência a isolados e poucas interações

medicamentosas. Entretanto, estas possuem alto peso molecular e não são estáveis em meios ácidos, o que as torna contraindicadas para o uso oral, sendo administradas somente por infusão ou injeção intravenosa (CHANG *et al.*, 2016; CARMONA; LIMPER, 2017; PUIA-DUMITRESCU; SMITH, 2017; SAWANT; KHAN, 2017; LIU *et al.*, 2018).

Apesar da caspofungina, micafungina e anidulofungina apresentarem atividade antifúngica similar, as diferenças atreladas a estrutura química levam a uma farmacocinética distinta. A caspofungina, por exemplo pode alterar a concentração plasmática da ciclosporina A, tacrolimus, rifampicina, dexametossana e carbamazepina. Já a caspofungina, pode aumentar em torno de 30% à exposição a anfotericina B; sendo assim, pode não ser bem tolerado quando administrada concomitantemente. Os principais efeitos adversos relacionados a estes medicamentos compreendem erupção cutânea, prurido, urticária, prurido, inchaço facial, rubor vasodilatação, dispneia, broncoespasmo e hipotensão (CHANG *et al.*, 2016; CARMONA; LIMPER, 2017; GIANNELLA *et al.*, 2018).

#### 1.2.4. Análogos de pirimidinas

O principal representante desta classe é a 5-Flucitosina (5-FC), que age interferindo na síntese de DNA e proteína das células fúngicas. A 5-FC apresenta atividade contra *Candida ssp.*, *Cryptococcus spp* e *Saccharomyces*, e comumente é administrada em associação com outros antifúngicos, como a AmB, no tratamento candidíase no sistema nervoso central, criptococose meníngea, endocardite da valva nativa ou candidíase urinária resistente ao fluconazol. Este fármaco tem baixa disponibilidade e adquire resistência durante o tratamento. Leucopenia, trombocitopenia, hepatotoxicidade, diarreia e erupção cutânea são seus principais efeitos adversos (CARMONA; LIMPER, 2017; MOURAD; PERFECT, 2018; PEA; LEWIS, 2018).

### 1.3. Biofilmes

Em se tratando de resistência aos fármacos antifúngicos deve-se considerar o crescimento de biofilmes. Estes são definidos como uma comunidade de microrganismos altamente organizada, estruturada, coordenada e funcional envolta por uma matriz extracelular de polissacarídeos e aderidos entre si a uma superfície (FINKEL; MITCHELL, 2011; RAMAGE *et al.*, 2011; RODRIGUES; HENRIQUES, 2017). Ressalta-se que as células desse arranjo

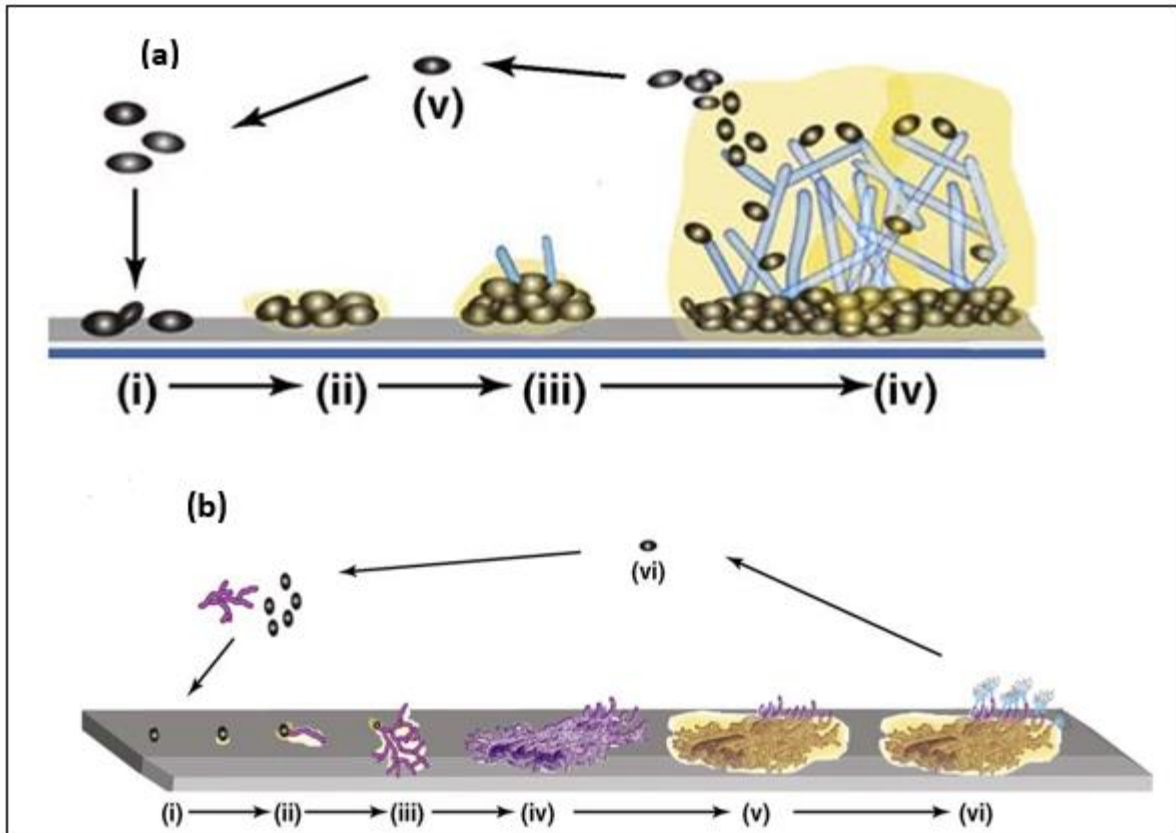
celular diferem em relação ao metabolismo e a expressão gênica quando comparadas as formas planctônicas ou formas livres (LI *et al.*, 2015).

O desenvolvimento dos biofilmes de leveduras e fungos filamentosos são semelhantes, no entanto, há diferenças em relação a morfologia e quantidade de etapas. Segundo proposto por Harding *et al.* (2009) e Costa-Orlandi *et al.* (2017) as leveduras apresentam 5 estágios que compreendem a adsorção das células à superfície, adesão inicial, formação da camada basal de microcolônias, maturação em que é possível verificar a presença de inúmeras colônias interligadas com canais de água para permitir a circulação de nutrientes e dispersão das células do biofilme maduro. Por sua vez, os fungos filamentosos são verificados 6 fases: adsorção, adesão ativa, primeira formação de microcolônias através da germinação e/ou desenvolvimento de monocamada, segunda formação de colônias com desenvolvimento de micélios camadas e agrupamentos de hifas, maturação e dispersão de conídios e/ou artroconídios (HARDING *et al.*, 2009; COSTA-ORLANDI *et al.*, 2017). A **Figura 1** mostra um modelo de desenvolvimento para leveduras, no caso *Candida albicans*, e outro para fungos filamentosos. Observa-se que na formação do biofilme de *C. albicans* há formação de hifas, um importante fator de virulência relacionado a este fungo.

Em ambientes hospitalares, o emprego de dispositivos médicos, como cateteres, enxertos vasculares, válvulas cardíacas, articulações artificiais, shunts do sistema nervoso central, criam um nicho ideal para a formação de biofilmes. Sendo que, muitas vezes, é necessária a remoção do aparato para erradicação do processo infeccioso. *Candida albicans* é a levedura formadora de biofilme mais notória, no entanto, outras espécies de *Candida* (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*) também estão relacionadas a este tipo de infecção (CHANDRA; MUKHERJEE, 2015; NETT; ANDES, 2015; GILES *et al.*, 2018).



**Figura 1.** Modelo de desenvolvimento de biofilmes.



(a) *Candida albicans*: (i) adsorção, (ii) adesão, (iii) formação de microcolônias, (iv) maturação, (v) dispersão.  
 (b) fungos filamentosos: (i) adsorção, (ii) adesão ativa, (iii) primeira formação de microcolônias, (iv) segunda formação de colônias, (v) maturação, (vi) dispersão. Extraído de (HARDING *et al.*, 2009).

Outras características inerentes aos microrganismos organizados em biofilmes são a alta resistência aos agentes antimicrobianos e aos mecanismos de defesa do hospedeiro. Estudos apontam que os biofilmes de *Candida* são clinicamente resistentes à anfotericina B, fluconazol, itraconazol, cetoconazol e flucitosina. Há relatos também de que os triazólicos de 2ª geração (voriconazol e ravuconazol) não apresentam atividades contra biofilmes (MUKHERJEE; CHANDRA, 2004; INIGO *et al.*, 2012; TAFF *et al.*, 2013; NETT; ANDES, 2015; RODRIGUES; HENRIQUES, 2017). As equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulofungina) e formulações lipídicas de AmB são os fármacos mais efetivos para o tratamento de infecções associadas a biofilmes, entretanto, já há indícios de que esta atividade esteja reduzida (FINKEL; MITCHELL, 2011; RAMAGE *et al.*, 2011; SARDI *et al.*, 2013; BAGHDADI *et al.*, 2016).

Os mecanismos de resistência dos microrganismos organizados em biofilmes em relação aos agentes antimicrobianos não estão completamente elucidados, neste contexto, Inigo *et al.* (2012) propuseram algumas teorias (INIGO *et al.*, 2012):

I- Restrita penetração de fármacos no interior do biofilme: matriz extracelular pode impedir ou restringir a penetração do fármaco no interior do biofilme. Isto, possivelmente ocorre, devido a formação de uma barreira de difusão, que faz com que somente a camada da superfície seja exposta a dose efetiva.

II - Mudanças fenotípicas decorrentes da diminuição da taxa de crescimento ou limitação de nutrientes: indícios apontam que as células que constituem um biofilme cresçam mais lentamente devido à limitada disponibilidade de nutrientes. Esta característica está frequentemente acompanhada de alterações na composição da superfície celular, que por sua, poderiam afetar a susceptibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos.

III – Resposta adaptativa ao estresse ambiental devido a expressão de genes de resistência induzidos pelo contato com a superfície: quando microrganismos entram em contato com a superfície e formam um biofilme pode ocorrer a ativação ou repressão dos genes expressos, resultando numa alteração fenotípica. Por exemplo, “upregulation” dos genes que codificam as enzimas da via do ergosterol (por exemplo: lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase) ou “overexpression” das bombas de efluxo multidrogas nas células do biofilme.

IV- Presença de células tolerantes, também denominadas persisters: são células que sobrevivem a todos os tipos de insultos antimicrobianos, e que por sua vez, proliferam e criam um ambiente resistente aos antimicrobianos.

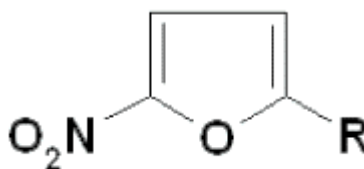
Considerando-se o aumento da resistência aos antifúngicos, associados ao número restrito de fármacos disponíveis comercialmente e que ainda apresentam muitos efeitos adversos, há a necessidade de desenvolvimento de antifúngicos novos e mais eficazes. Neste contexto, há uma série de estudos buscando novos compostos, entre os quais tem apresentado resultados promissores os derivados nitrofuranos (ALTUNTAS *et al.*, 2014; DE VITA *et al.*, 2014; ZORZI *et al.*, 2014).

#### 1.4. Derivados Nitrofuranos

Nitrofuranos são uma classe de fármacos que são caracterizados pela presença do radical nitro (NO<sub>2</sub>) na posição 5 do anel furano e vários substituintes na posição 2 (**Figura 2**). Desde a década de 1940, estes compostos têm sido empregados, especialmente, para o tratamento de

infecções bacterianas. No entanto, há estudos que mostram que esta classe química pode ser utilizada para diferentes fins terapêuticos, como tuberculostáticos, anti-Leishmania, antifúngicos, atividade tripanocida e efeito anti-proliferativo nas linhagens de células cancerígenas. Além disso, estes têm sido empregados como fármacos de uso veterinário para prevenir e controlar doenças, bem como são adicionados a ração para estimular o crescimento de aves, suínos e bovinos (HAMILTON-MILLER; BRUMFITT, 1978; MENDLING; MAILLAND, 2002; MENDLING *et al.*, 2002; ZORZI *et al.*, 2014; KAMAL *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2016; RUTH *et al.*, 2017).

**Figura 2.** Estrutura química fundamental de um nitrofurano.



O primeiro agente nitrofurano sintetizado e que apresentava atividade antimicrobiana foi a nitrofurazona, que deu origem aos compostos da próxima geração como a nitrofurantoína e a nifuroxazida. O mecanismo de ação destes compostos não está completamente elucidado. Acredita-se que a fração nitro do nitrofurano sofra redução pela ação das nitroreduases, e desta forma, ocorre a produção de espécies tóxicas de radicais livres, que são capazes de ativar intermediários que afetam processos essenciais para a sobrevivência de diferentes microrganismos (ZORZI *et al.*, 2014; KAMAL *et al.*, 2015; KRASAVIN *et al.*, 2017).

Em se tratando da atividade antifúngica dos derivados nitrofuranos, não há muitos relatos na literatura. De Vita *et al.* (2014) sintetizaram derivados do ácido cafeíco com grupamento nitrofurano e verificaram que estes foram mais efetivos que o fluconazol contra biofilmes de *Candida albicans* em diferentes estágios de desenvolvimento (DE VITA *et al.*, 2014). Em outro estudo, congêneres do 5-nitrofurano triazol foram testados em 14 diferentes linhagens de fungos e foi determinado que o composto 9f (grupamento nitrofurano tendo como radical 2,3-DiCl) apresentou atividade 2 vezes superior que o miconazol, contra *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*. Além disso, foi verificado que este derivado exerce seu potencial antifúngico pela inibição da biossíntese de ergosterol (KAMAL *et al.*, 2015).

Apesar da excelente atividade antimicrobiana dos nitrofuranos e seus metabólitos disponíveis comercialmente, estes foram banidos da Europa e outros países em decorrência dos seus efeitos carcinogênicos, mutagênicos, genotóxicos e em humanos. Como exemplo, pode-se citar a nitrofurantonoína, usada normalmente para o tratamento e profilaxia de infecções não complicadas do trato urinário, que tem sido considerada como agente responsável pelo surgimento de mutações e cânceres, toxicidade pulmonar, cardíaca e no sistema reprodutor, hepatotoxicidade (falha do fígado e cirrose) e neuropatia periférica, principalmente, em tratamentos de longa duração. Adicionalmente, este fármaco foi classificado pela American Geriatrics Society (AGS) como inapropriado para uso em idosos devido a sua habilidade de causar insuficiência renal. A furazolida, um nitrofurano sintético, também tem seu clínico limitado devido aos potenciais efeitos adversos. Neste contexto, tem se tornado um desafio para os pesquisadores o desenvolvimento de nitrofuranos com toxicidade reduzida e melhora na janela terapêutica (DAI *et al.*, 2016; OMIDI *et al.*, 2016; CLAUSSEN *et al.*, 2017; KRASAVIN *et al.*, 2017; ALDEEK *et al.*, 2018).

### **1.5. Métodos Alternativos ao Uso de Mamíferos**

Em 1959 Russel e Bruch publicaram o livro *The Principles of Humane Experimental Technique*, onde apresentaram um guia sobre a ética para o uso de animais em ciência, o princípio dos 3Rs, denominado assim em função das iniciais, em inglês, das suas principais finalidades: 1) substituição (*Replacement*), 2) redução (*Reduction*) e 3) refinamento (*Refinement*). Resumidamente, este princípio significa uma redução no número de animais empregados em pesquisa, diminuição do sofrimento ao mínimo possível garantindo o bem estar, e a busca por métodos alternativos que substituam os ensaios *in vivo* com mamíferos (HARTUNG, 2011; BURM *et al.*, 2014; AVEY *et al.*, 2015).

Sendo assim, a substituição dos testes com animais tem sido cada vez mais difundida. Os esforços para validar estas novas abordagens forneceram evidências de que estas não reduzem os padrões de segurança, podendo, assim, ser integrada nas avaliações de segurança de agências regulatórias. Neste contexto, métodos alternativos foram incluídos na OCDE (Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico) e na ICH (*International Conference on Harmonization*). Por sua vez, a Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América elaborou um guia com uma nova visão para os ensaios toxicológicos e avaliação de risco, o *Toxicity Testing in the 21st Century: a Vision and Strategy*. A *European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing* – ECVAM (Europa), *Interagency*

*Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods – ICCVAM* e a *Japanese Center for the Validation of Alternative Methods – JaCVAM* são os principais centros de desenvolvimento e validação de métodos para verificar a segurança e eficácia de químicos (HARTUNG, 2011; BARROS; MARIA-ENGLER, 2012).

No Brasil, em outubro de 2008, foi aprovada a Lei Arouca (lei 11.794) que regulamentou o uso de animais na pesquisa e educação. Adicionalmente, esta lei criou o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, que é o órgão responsável pelo monitoramento e avaliação de técnicas alternativas que substituam o uso de animais. Em 2011, foi instituído o Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM - Brazilian Center for Validation of Alternative Methods). Ainda no Brasil, a Portaria nº 491, de 3 de julho de 2012, instituiu a Rede Nacional de Métodos Alternativos – RENAMA no âmbito do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação que tem por objetivos (BARROS; MARIA-ENGLER, 2012; PRESGRAVE *et al.*, 2016):

I- estimular a implantação de ensaios alternativos ao uso de animais através do auxílio e do treinamento nas metodologias necessárias;

II - monitorar periodicamente o desempenho dos laboratórios associados através de comparações interlaboratoriais;

III - promover a qualidade dos ensaios através do desenvolvimento de materiais de referência químicos e biológicos certificados, quando aplicável;

IV - incentivar a implementação do sistema de qualidade laboratorial e dos princípios das boas práticas de laboratório (BPL);

V - promover o desenvolvimento, a validação e a certificação de novos métodos alternativos ao uso de animais.

#### 1.5.1. Modelos não mamíferos

Historicamente tem-se empregado os modelos mamíferos, entretanto o seu uso em pesquisa está relacionado com alto custo, restrições éticas, necessidade de formação especializada, longos períodos para reprodução e dificuldades para obtenção e manutenção dos animais durante a realização dos experimentos. Neste contexto, os animais não mamíferos despontam como uma opção, visto que apresentam uma série de vantagens, tais resultados preditivos, como baixo custo, fácil manuseio, pequeno tamanho para reprodução e curto período

de vida (GLAVIS-BLOOM *et al.*, 2012; NORVILLE *et al.*, 2014). Entre estes hospedeiros, *Acanthamoeba castellanii*, *Dictyostellium discoideum*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Galleria mellonella* e *Danio rerio* tem sido cada vez mais empregados para estudar várias doenças humanas, bem como a toxicidade e eficiência de novas substâncias (SCORZONI *et al.*, 2013; BROWNE *et al.*, 2014; GRATACAP; WHEELER, 2014; NEWMAN *et al.*, 2014; FREIRES *et al.*, 2016).

#### 1.5.1.1. *Galleria mellonella*

*Galleria mellonella*, a larva da cera da mariposa, tem sido utilizada como uma alternativa não onerosa, de fácil manipulação, com possibilidade de reprodução em larga escala, rapidez na execução dos ensaios, que é capaz de gerar dados confiáveis e reprodutíveis que refletem quase que exatamente aqueles obtidos empregando animais superiores. Estas larvas podem ser incubadas em temperaturas que variam entre 25 e 37°C, possibilitando simular o habitat natural do microrganismo e em condições de infecção nos mamíferos. Além disso, neste tipo de modelo é possível administrar doses exatas de patógenos. Outra característica interessante das larvas de *G. mellonella* é o fato de apresentarem seis tipos de células de fagocitose que se alternam durante a infecção, e que são utilizadas como um parâmetro da resposta das larvas após a exposição aos patógenos. Ainda, pode-se avaliar o processo infeccioso e os efeitos tóxicos de compostos por meio da falta de movimento e pela melanização das larvas (REEVES *et al.*, 2004; SCORZONI *et al.*, 2013; GU *et al.*, 2017; JORJAO *et al.*, 2017).

Larvas de *G. mellonella* têm sido empregadas como um modelo para o entendimento da interação hospedeiro-patógeno. Norville *et al.* (2014) verificaram que larvas de *G. mellonella* são susceptíveis a infecção por *Coxiella burnetii*, devido a presença da bactéria no interior dos hemócitos e pelo fato que a morte das larvas ocorria de maneira dose-dependente (NORVILLE *et al.*, 2014). Em outro estudo larvas de *G. mellonella* foram utilizadas para avaliar a interação da larva com o agente patogênico *Candida krusei*. Os autores mostraram que as leveduras matavam as larvas mantidas em diferentes temperaturas (25, 30 e 37°C) e reduziam a densidade de hemócitos, bem como relataram que a melanização do inseto ocorria de acordo com a concentração do fungo (SCORZONI *et al.*, 2013).

Este modelo alternativo também tem sido utilizado para verificar a atividade antimicrobiana de diferentes fármacos e compostos. Gu *et al.* (2017) utilizaram o modelo *G. mellonella* para estudar *in vivo* a eficácia da associação de minociclina /fluconazol

(MINO/FLC) e doxiciclina/fluconazol (DOXY/FLC) contra *C. albicans*. Os resultados obtidos mostraram que as taxas de sobrevivência das larvas infectadas com doses letais de *C. albicans* aumentaram de maneira significativa na presença dos fármacos combinados quando comparados ao fluconazol sozinho. Além disso, a carga fúngica reduziu 4 vezes e o estudo histológico revelou poucas áreas infectadas, bem como um grau de destruição menor quando as larvas foram expostas a combinação (GU *et al.*, 2017).

Ensaio para verificação do potencial de toxicidade de compostos sintéticos, extratos, fármacos, cafeína e seus metabólicos, conservantes de alimentos, como o nitrato de potássio, também têm sido realizados utilizando-se as larvas da mariposa da cera (IGNASIAK; MAXWELL, 2017; KEPPANAN *et al.*, 2017; MAGUIRE *et al.*, 2017a; b; PALANCO *et al.*, 2017).

#### 1.5.1.2. *Danio rerio*

Zebrafish (*Danio rerio*), é um outro animal não mamífero que tem sido utilizado em diferentes campos de pesquisas, como desenvolvimento genético, genômica toxicologia aquática, neurociência e outras áreas biomédicas (ARUNACHALAM *et al.*, 2013; NEWMAN *et al.*, 2014; SANTORO, 2014). Este é um excelente exemplar para ensaios toxicológicos e de descoberta de novos fármacos, bem como para estudos de biologia de desenvolvimento e genética molecular. Além disso, é considerado o único modelo vertebrado para a investigação de uma série de fatores fisiológicos. Suas principais vantagens incluem pequeno tamanho corporal, alta fecundidade, embriogênese extracorpórea rápida (embriões que se desenvolvem externamente e rapidamente, atingindo a maturidade em aproximadamente 3 meses), a criação é menos onerosa que de ratos e os embriões são relativamente grandes e transparentes, o que possibilita a visualização em todas as etapas de desenvolvimento em tempo real. Outra característica interessante deste modelo é que o sequenciamento do seu genoma apresenta ortologia com a maioria dos genes dos mamíferos (IWANAMI, 2014; DUBINSKA-MAGIERA *et al.*, 2016; EUM *et al.*, 2016).

Alguns aspectos, como a falta de recursos analíticos suficientes (bibliotecas de anticorpos utilizados amplamente na cultura celular) e limitações relacionadas a técnicas, devem ser considerados ao trabalhar com este modelo. No entanto, estas desvantagens são superadas, em grande parte pela realização de triagens genéticas em larga escala, bem como possibilidade de manipulação direta do embrião. Estas particularidades representam uma vantagem considerável

sobre os modelos tradicionais de vertebrados e fizeram com que o zebrafish se tornasse um modelo padrão (IWANAMI, 2014).

Sendo o zebrafish um modelo bem aceito, este tem sido muito empregado para prever os efeitos teratogênicos de novos fármacos, nanopartículas e outros agentes químicos. Grünspan *et al.* (2018) avaliaram toxicidade embrionária de 4 metalofármacos anticonvulsivantes, contendo  $Zn^{+2}$  e  $Cu^{+2}$ , e verificaram que os compostos contendo cobre são mais tóxicos do que aqueles que possuem zinco em sua constituição (GRUNSPAN *et al.*, 2018). Por sua vez, Singulani *et al.* (2017) verificam o potencial tóxico do ácido gálico e seus derivados esterificados, em embriões de zebrafish. Os autores mostraram que dois compostos foram menos tóxicos (ácido gálico e dodecil galato) e que isto está relacionado ao comprimento de sua cadeia carbônica (SINGULANI *et al.*, 2017). Tartrazina (JOSHI; KATTI, 2017), bisfenóis (Moreman *et al.*, 2017), clomazona (STEVANOVIC *et al.*, 2017), cefalosporinas (QIAN *et al.*, 2018), metilxantinas (BASNET *et al.*, 2017), entre outras substâncias, também foram testados por esta alternativa e os resultados foram adequados, mostrando que este é um modelo validado.

#### 1.5.1.3. *Caenorhabditis elegans*

*Caenorhabditis elegans* é um nematoide de vida livre no solo, transparente, com 1mm de comprimento e 50  $\mu$ m de largura, e constituído de aproximadamente 1000 células. Desde que Sydney Brenners iniciou a caracterização deste modelo em 1960, este tem sido extensivamente empregado como um dos principais modelos para estudos de interação parasita-hospedeiro, testes preliminares da eficácia de potenciais antimicrobianos, e como uma ferramenta para a triagem de novos fármacos (BOYD *et al.*, 2012; MUHAMMED *et al.*, 2016; HUNT, 2017; KIM *et al.*, 2017).

Numerosas características explicam porque este invertebrado se tornou tão emblemático para os pesquisadores, entre as quais destacam-se: 1) O ciclo de vida do *C. elegans* é rápido, e entre 3-4 dias está completo e ocorre o desenvolvimento e liberação de ovos a partir de hermafroditas para iniciar uma nova geração. Ressalta-se que cada larva adulta pode pôr em torno de 300 ovos, os quais se tornam larvas num intervalo de horas; 2) A sua transparência, permite visualizar eventos celulares ou usar marcadores fluorescentes para estudar processos *in vivo*, como localização celular ou expressão específica do tecido; 3) Baixo custo na manutenção e cultura, os animais são mantidos em meio sólido de cultura para nematoides (NGM - *Nematode Growth Medium*) e se alimentam da bactéria não patogênica *Escherichia coli*



linhagem OP50; 4) Não são perigosos para uso em laboratório; 5) Não há necessidade de aprovação de comitê de ética para realização dos estudos; 6) Sequência genômica totalmente elucidada e com vários genes homólogos aos dos mamíferos; 7) Genoma pode ser facilmente manipulado por meio das bibliotecas disponíveis de RNAi; 8) Possibilita o estudo do sistema imune do hospedeiro (HOWE *et al.*, 2013; DIOGO; BRATANICH, 2014; HUNT, 2017; XIONG *et al.*, 2017).

Este modelo tem sido utilizado como um hospedeiro alternativo *in vivo* para o entendimento da patogênese de fungos (especialmente *Candida* spp e *Cryptococcus neoformans*), bactérias e vírus, bem como para o estudo das interações patógeno-hospedeiro, visto que os fatores de virulência no *C. elegans* são muito semelhantes aos das infecções em mamíferos. Sabe-se que quando a fonte de alimento do *C. elegans* é substituída por patógenos, é possível verificar aspectos fenotípicos relacionados a processos infecciosos, tais como acúmulo do microrganismo no intestino, formação de biofilmes na cutícula, inchaço na cauda e tempo de vida significativamente reduzido, entre 1,5-dias (TAMPAKAKIS *et al.*, 2008; DIOGO; BRATANICH, 2014; MUHAMMED *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2017; ORTEGA-RIVEROS *et al.*, 2017). Breger *et al.* (2007) mostraram que quando *Candida albicans* infecta *C. elegans* em meio líquido, o fungo forma biofilme e mata o nematoide devido a formação de uma rede de filamentos que penetram através da cutícula. Esta informação é de extrema importância, uma vez que a filamentação é uma característica crucial relacionada a virulência nos humanos. Neste contexto, os autores concluíram que este modelo pode auxiliar no estudo das bases moleculares da patogênese da *C. albicans* (BREGER *et al.*, 2007).

Fundamentado em resultados preditivos positivos na área de toxicologia, este invertebrado também tem sido utilizado para identificar alvos farmacológicos para diversas doenças humanas, bem como uma alternativa para ensaios de toxicidade. Por exemplo, Harlow *et al.*, (2016) mostraram que 89% dos compostos testados que comprometeram a viabilidade dos ovos na larva também causam efeitos no desenvolvimento de mamíferos (Harlow *et al.*, 2016). Em outro estudo, verificou-se que o 7-cetocolesterol, conhecido por ser citotóxico em várias linhagens celulares, reduziu a capacidade reprodutiva e o tempo de vida do *C. elegans* (ZONG *et al.*, 2014).

### 1.5.2. Cultura de células e tecidos

Os sistemas de cultura celular são uma importante ferramenta empregada em uma ampla gama de estudos biomédicos e médicos. Isto justifica-se, porque este modelo pode mostrar

diferentes níveis de organização e comportamento celular, e assim, fornecer informações relevantes que façam conexão com o *in vivo*. As células quando isoladas, selecionadas e cultivadas adequadamente podem responder uma série de questões fundamentais necessárias para determinar o perfil de segurança de um fármaco, bem como o mecanismo de ação. Para esta finalidade, a substância investigada é adicionada ao meio de cultura adequado para a linhagem celular de escolha e, portanto, sua ação a nível molecular ou celular pode ser estudada (ASTASHKINA *et al.*, 2012; DOKE; DHAWALE, 2015; AMELIAN *et al.*, 2017).

A maioria dos ensaios com células utilizam o modelo tradicional bidimensional (2D), que compreende o crescimento em monocamada sobre superfícies rígidas de placas/frascos, sendo que as células estão igualmente expostas a nutrientes, fatores de crescimento e fármacos que estão presentes no meio de cultura. Comumente, estas proliferam em uma maior velocidade do que *in vivo* e estão no mesmo estágio de ciclo celular. A metodologia possui a habilidade de fornecer informações básicas sobre citotoxicidade, penetração e acúmulo de fármacos, bem como possibilita a seleção de novos compostos de acordo com as propriedades biofarmacêuticas desejadas. Além disso, muitas vezes, exibe níveis diferenciais na expressão de genes e proteínas em comparação com *modelos in vivo*. Os benefícios associados a esta técnica incluem facilidade de execução, rapidez, reprodutibilidade, baixo custo e possibilidade de usar pequenas quantidades do composto a ser testado (HARTUNG; SABBIONI, 2011; CLIFT *et al.*, 2014; EDMONDSON *et al.*, 2014; RAVI *et al.*, 2015; AMELIAN *et al.*, 2017; JAROCH *et al.*, 2018).

A determinação *in vitro* dos efeitos tóxicos de uma determinada substância pode ser avaliada por diferentes tipos de ensaios, conforme apresentado na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Ensaios *in vitro* para avaliação da citotoxicidade.

ENSAIO	TIPO DE AVALIAÇÃO
MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) XTT (hidróxido de 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5 -sulfofenil)-5- [(fenilamino) carbonil] -2H-tetrazólio) MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2Htetrazólico)	Quantifica os efeitos antimetabólicos. Usados na avaliação da viabilidade e proliferação celular.
Sulforodamina B	Quantifica a biomassa total. Usado na avaliação da viabilidade e proliferação celular.
Alamar Blue® CellTiter-Blue®	Quantifica os efeitos antimetabólicos. Usados na avaliação da viabilidade e proliferação celular.
CellTiter-Glo®	Quantifica o ATP (adenosina trifosfato). Usado na avaliação da viabilidade e proliferação celular.
ToxiLight™	Quantifica a citólise. Usado na avaliação da morte celular. A maioria comumente associada a necrose embora, a ruptura possa ocorrer também por apoptose.
Determinação da desidrogenase láctica (LDH) CytoTox-ONE™	Quantifica a citólise. Usados na avaliação da morte celular. A maioria comumente associada a necrose embora, a ruptura possa ocorrer também por apoptose.
Vermelho neutro TOX-4™	Quantifica a capacidade endocítica. Usados na avaliação da viabilidade celular.
Live/dead assays-Calcein AM/ethidium homodimer HoeCHTS 33342 DAPI Iodeto de propídio	Quantifica a integridade da membrana.
CyQuant®	Quantifica a concentração de DNA e eventos antiproliferativos. Usado na avaliação da viabilidade e proliferação celular.
5-Bromo-2'-deoxyuridina (BrdU), incorporação de timidina radioativa	Quantifica os eventos antiproliferativos. Usado na avaliação da proliferação celular.
Azul de Trypan Azul de metileno	Quantifica a integridade da membrana. Usados para avaliação da viabilidade celular.
Caspase –Glo 3/7® Apo-One®	Quantifica a apoptose.

Fonte: Adaptado de Astashkina *et al.*, 2012

## 5. CONCLUSÕES

- Dados analíticos e espectroscópicos dos derivados nitrofuranos sintetizados, mostraram que estes estão em concordância com as estruturas propostas.
- O estudo das características dos biofilmes em 6, 24, 48 e 72 horas (atividade metabólica, quantificação da biomassa total e de polissacarídeos, MEV) de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*, mostrou que estas apresentam valores máximos em 48 horas, indicando o biofilme maduro;
- Os derivados nitrofuranos L7CF113 e L7CF165 foram os compostos que apresentaram os melhores resultados nos testes de sensibilidade contra *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*. Entretanto, não apresentaram atividade contra *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*;
- Os biofilmes de *Candida albicans* e não *albicans* (*Candida krusei*, *Candida glabrata*) formados em 6 horas apresentaram atividade metabólica reduzida quando em contato com o composto L7CF 113 e L7CF 165 em concentrações iguais ou superiores a 62,50 µg/mL.
- Os biofilmes de *Candida albicans* e não *albicans* (*Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*) formados em 24 e 48 horas apresentaram atividade metabólica reduzida tanto para o composto L7CF 113 e L7CF165 em concentrações iguais ou superiores a 125 µg/mL.
- Os compostos L7CF 113 e L7CF165 não apresentaram evidência de citotoxicidade nas linhagens celulares estudadas (HaCaT, 3T3 E HepG2);

- Os compostos nitrofuranos L7CF 113 e L7CF165 nas concentrações de 10 mg/kg, 20 mg/kg e 30 mg/Kg não apresentaram toxicidade em modelo alternativo *Galleria mellonella*;
- Em embriões de *Danio rerio* (zebrafish), o composto L7CF113 não mostrou ser tóxico na concentração de 31.25 µg/mL. Por sua vez, o derivado L7CF 165 mostrou ser extremamente tóxicos para os embriões (taxa de sobrevivência = 0)
- Em modelo *C. elegans*, os compostos L7CF113 não apresentou toxicidade. Por sua vez o composto L7CF 165 reduziu a taxa de sobrevivência dos nematoides nas concentrações que variaram entre 125 e 31,25 µg/mL.
- Os derivados nitrofuranos, nas concentrações estudadas, não apresentaram atividade antifúngica contra *C. albicans* em modelo *in vivo* *C. elegans*. Sendo necessário, o emprego de maiores concentrações.

Diante destas conclusões, verificou-se que os derivados nitrofuranos L7CF 113 e L7CF 165 são compostos promissores para o tratamento de infecções causadas por *Candida* spp. Sendo que, o L7CF 113 foi o que se mostrou menos tóxico nos modelos utilizados.

## REFERÊNCIAS

ALDEEK, F. et al. Accurate Quantitation and Analysis of Nitrofuran Metabolites, Chloramphenicol, and Florfenicol in Seafood by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Method Validation and Regulatory Samples. **J Agric Food Chem**, Jan 23 2018. ISSN 1520-5118 (Electronic) 0021-8561 (Linking).

ALLEN, D. et al. Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 13, n. 6, p. 787-98, Jun 2015. ISSN 1744-8336 (Electronic) 1478-7210 (Linking).

ALTUNTAS, A. et al. Caffeic acid phenethyl ester protects against amphotericin B induced nephrotoxicity in rat model. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 702981, 2014. ISSN 2314-6141 (Electronic).

AMELIAN, A. et al. Application of standard cell cultures and 3D in vitro tissue models as an effective tool in drug design and development. **Pharmacol Rep**, v. 69, n. 5, p. 861-870, Oct 2017. ISSN 1734-1140 (Print) 1734-1140 (Linking).

ANTINORI, S. et al. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. **Eur J Intern Med**, v. 34, p. 21-28, Oct 2016. ISSN 1879-0828 (Electronic) 0953-6205 (Linking).

ARENDRUP, M. C.; PATTERSON, T. F. Multidrug-Resistant Candida: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. **J Infect Dis**, v. 216, n. suppl\_3, p. S445-S451, Aug 15 2017. ISSN 1537-6613 (Electronic) 0022-1899 (Linking).

ARUNACHALAM, M. et al. Natural history of zebrafish (*Danio rerio*) in India. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 1-14, Mar 2013. ISSN 1557-8542 (Electronic) 1545-8547 (Linking).

ASTASHKINA, A.; MANN, B.; GRAINGER, D. W. A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. **Pharmacol Ther**, v. 134, n. 1, p. 82-106, Apr 2012. ISSN 1879-016X (Electronic) 0163-7258 (Linking).

AVEY, M. T.; FENWICK, N.; GRIFFIN, G. The use of systematic reviews and reporting guidelines to advance the implementation of the 3Rs. **J Am Assoc Lab Anim Sci**, v. 54, n. 2, p. 153-62, Mar 2015. ISSN 1559-6109 (Print) 1559-6109 (Linking).

BAGHDADI, E. et al. Antifungal Susceptibility Patterns of Candida Species Recovered from Endotracheal Tube in an Intensive Care Unit. **Adv Med**, v. 9242031, n. 10, p. 23, 2016. ISSN 2356-6752 (Print) 2314-758X (Linking).

BARROS, S. B. D. M.; MARIA-ENGLER, S. S. Toxicology in the 21st Century. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, p. 5-5, 2012. ISSN 1984-8250. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-8250-2012-0005](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-8250-2012-0005)>.

BASNET, R. M.; GUARIENTI, M.; MEMO, M. Zebrafish Embryo as an In Vivo Model for Behavioral and Pharmacological Characterization of Methylxanthine Drugs. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 3, Mar 9 2017. ISSN 1422-0067 (Electronic) 1422-0067 (Linking).

BERKOW, E. L. et al. Multidrug Transporters and Alterations in Sterol Biosynthesis Contribute to Azole Antifungal Resistance in *Candida parapsilosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 10, p. 5942-50, Oct 2015. ISSN 1098-6596 (Electronic) 0066-4804 (Linking).

BORAL, H. et al. Overview of selected virulence attributes in *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum*, and *Exophiala dermatitidis*. **Fungal Genet Biol**, Nov 2 2017. ISSN 1096-0937 (Electronic) 1087-1845 (Linking).

BOYD, W. A.; SMITH, M. V.; FREEDMAN, J. H. *Caenorhabditis elegans* as a model in developmental toxicology. **Methods Mol Biol**, v. 889, p. 15-24, 2012. ISSN 1940-6029 (Electronic) 1064-3745 (Linking).

BREGER, J. et al. Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 2, p. e18, Feb 2007. ISSN 1553-7374 (Electronic) 1553-7366 (Linking).

BRILHANTE, R. S. N. et al. *Candida tropicalis* from veterinary and human sources shows similar in vitro hemolytic activity, antifungal biofilm susceptibility and pathogenesis against *Caenorhabditis elegans*. **Vet Microbiol**, v. 192, p. 213-219, Aug 30 2016. ISSN 1873-2542 (Electronic) 0378-1135 (Linking).

BROWNE, N. et al. Assessment of in vivo antimicrobial activity of the carbene silver(I) acetate derivative SBC3 using *Galleria mellonella* larvae. **Biometals**, v. 27, n. 4, p. 745-52, Aug 2014. ISSN 1572-8773 (Electronic) 0966-0844 (Linking).

BURM, S. M. et al. Alternative methods for the use of non-human primates in biomedical research. **ALTEX**, v. 31, n. 4, p. 520-9, 2014. ISSN 1868-596X (Print) 1868-596X (Linking).

BUSQUET, F. et al. OECD validation study to assess intra- and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 69, n. 3, p. 496-511, Aug 2014. ISSN 1096-0295 (Electronic) 0273-2300 (Linking).

CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochem Pharmacol**, v. 133, p. 86-96, Jun 1 2017. ISSN 1873-2968 (Electronic) 0006-2952 (Linking).

CARMONA, E. M.; LIMPER, A. H. Overview of Treatment Approaches for Fungal Infections. **Clin Chest Med**, v. 38, n. 3, p. 393-402, Sep 2017. ISSN 1557-8216 (Electronic) 0272-5231 (Linking).

CHANDRA, J. et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **J Bacteriol**, v. 183, n. 18, p. 5385-94, Sep 2001. ISSN 0021-9193 (Print) 0021-9193 (Linking).

CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K. *Candida* Biofilms: Development, Architecture, and Resistance. **Microbiol Spectr**, v. 3, n. 4, Aug 2015. ISSN 2165-0497 (Electronic) 2165-0497 (Linking).

CHANG, Y. L. et al. New Facets of Antifungal Therapy. **Virulence**, p. 0, Nov 7 2016. ISSN 2150-5608 (Electronic) 2150-5594 (Linking).

CHEN, Y. L. et al. Calcineurin controls hyphal growth, virulence, and drug tolerance of *Candida tropicalis*. **Eukaryot Cell**, v. 13, n. 7, p. 844-54, Jul 2014. ISSN 1535-9786 (Electronic) 1535-9786 (Linking).

CHITHRANI, B. D.; GHAZANI, A. A.; CHAN, W. C. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. **Nano Lett**, v. 6, n. 4, p. 662-8, Apr 2006. ISSN 1530-6984 (Print) 1530-6984 (Linking).

CHRISTENSEN, G. D. et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **J Clin Microbiol**, v. 22, n. 6, p. 996-1006, Dec 1985. ISSN 0095-1137 (Print) 0095-1137 (Linking).

CLARK, R. A.; GHOSH, K.; TONNESEN, M. G. Tissue engineering for cutaneous wounds. **J Invest Dermatol**, v. 127, n. 5, p. 1018-29, May 2007. ISSN 1523-1747 (Electronic) 0022-202X (Linking).

CLAUSSEN, K. et al. How Common Are Pulmonary and Hepatic Adverse Effects in Older Adults Prescribed Nitrofurantoin? **J Am Geriatr Soc**, v. 65, n. 6, p. 1316-1320, Jun 2017. ISSN 1532-5415 (Electronic) 0002-8614 (Linking).

CLIFT, M. J. et al. A comparative study of different in vitro lung cell culture systems to assess the most beneficial tool for screening the potential adverse effects of carbon nanotubes. **Toxicol Sci**, v. 137, n. 1, p. 55-64, Jan 2014. ISSN 1096-0929 (Electronic) 1096-0929 (Linking).

CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard - third edition. CLSI document M27-A3 (ISBN-1-56238-666-2)**. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2008.



COSTA-ORLANDI, C. et al. Fungal Biofilms and Polymicrobial Diseases. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 2, p. 22, 2017. ISSN 2309-608X. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/2309-608X/3/2/22> >.

CUOMO, C. A. et al. Whole Genome Sequence of the Heterozygous Clinical Isolate *Candida krusei* 81-B-5. **G3 (Bethesda)**, v. 7, n. 9, p. 2883-2889, Sep 7 2017. ISSN 2160-1836 (Electronic) 2160-1836 (Linking).

DA SILVA, B. G. M. et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) using toluidine blue inhibits both growth and biofilm formation by *Candida krusei*. **Lasers Med Sci**, Jan 13 2018. ISSN 1435-604X (Electronic) 0268-8921 (Linking).

DAI, C. et al. Curcumin Ameliorates Furazolidone-Induced DNA Damage and Apoptosis in Human Hepatocyte L02 Cells by Inhibiting ROS Production and Mitochondrial Pathway. **Molecules**, v. 21, n. 8, Aug 22 2016. ISSN 1420-3049 (Electronic) 1420-3049 (Linking).

DE CREMER, K. et al. Stimulation of superoxide production increases fungicidal action of miconazole against *Candida albicans* biofilms. **Sci Rep**, v. 6, p. 27463, Jun 7 2016. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking).

DE VITA, D. et al. Activity of caffeic acid derivatives against *Candida albicans* biofilm. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 24, n. 6, p. 1502-5, Mar 15 2014. ISSN 1464-3405 (Electronic) 0960-894X (Linking).

DE VITA, D. et al. Exploring the anti-biofilm activity of cinnamic acid derivatives in *Candida albicans*. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 26, n. 24, p. 5931-5935, Dec 15 2016. ISSN 1464-3405 (Electronic) 0960-894X (Linking).

DELATTIN, N.; CAMMUE, B. P.; THEVISSSEN, K. Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms. **Future Med Chem**, v. 6, n. 1, p. 77-90, Jan 2014. ISSN 1756-8927 (Electronic) 1756-8919 (Linking).

DESAI, J. V.; VAN DE VEERDONK, F. L.; LIONAKIS, M. S. Understanding the role of host immune responses in invasive candidiasis. **Intensive Care Med**, Nov 22 2017. ISSN 1432-1238 (Electronic) 0342-4642 (Linking).

DESBOIS, A. P.; COOTE, P. J. Utility of Greater Wax Moth Larva (*Galleria mellonella*) for Evaluating the Toxicity and Efficacy of New Antimicrobial Agents. **Adv Appl Microbiol**, v. 78, p. 25-53, 2012. ISSN 0065-2164 (Print) 0065-2164 (Linking).

DIOGO, J.; BRATANICH, A. The nematode *Caenorhabditis elegans* as a model to study viruses. **Arch Virol**, v. 159, n. 11, p. 2843-51, Nov 2014. ISSN 1432-8798 (Electronic) 0304-8608 (Linking).

DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharm J**, v. 23, n. 3, p. 223-9, Jul 2015. ISSN 1319-0164 (Print) 1319-0164 (Linking).

DUBINSKA-MAGIERA, M. et al. Zebrafish: A Model for the Study of Toxicants Affecting Muscle Development and Function. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 11, Nov 19 2016. ISSN 1422-0067 (Electronic) 1422-0067 (Linking).

EDMONDSON, R. et al. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. **Assay Drug Dev Technol**, v. 12, n. 4, p. 207-18, May 2014. ISSN 1557-8127 (Electronic) 1540-658X (Linking).

EUM, J. et al. 3D Visualization of Developmental Toxicity of 2,4,6-Trinitrotoluene in Zebrafish Embryogenesis Using Light-Sheet Microscopy. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 11, Nov 17 2016. ISSN 1422-0067 (Electronic) 1422-0067 (Linking).

EUSTIS, S.; EL-SAYED, M. A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. **Chem Soc Rev**, v. 35, n. 3, p. 209-17, Mar 2006. ISSN 0306-0012 (Print) 0306-0012 (Linking).

FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G. et al. Relationship between the Antifungal Susceptibility Profile and the Production of Virulence-Related Hydrolytic Enzymes in Brazilian Clinical Strains of *Candida glabrata*. **Mediators Inflamm**, v. 2017, p. 8952878, 2017. ISSN 1466-1861 (Electronic) 0962-9351 (Linking).

FINKEL, J. S.; MITCHELL, A. P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 2, p. 109-18, Feb 2011. ISSN 1740-1526.

FORASTIERO, A. et al. Rapid development of *Candida krusei* echinocandin resistance during caspofungin therapy. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 11, p. 6975-82, Nov 2015. ISSN 1098-6596 (Electronic) 0066-4804 (Linking).

FREIRES, I. A. et al. Alternative Animal and Non-Animal Models for Drug Discovery and Development: Bonus or Burden? **Pharm Res**, Nov 17 2016. ISSN 1573-904X (Electronic) 0724-8741 (Linking).

FUENTEFRIA, A. M. et al. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. **Lett Appl Microbiol**, v. 66, n. 1, p. 2-13, Jan 2018. ISSN 1472-765X (Electronic) 0266-8254 (Linking).

GARZILLO, C. et al. Risk factors for *Candida parapsilosis* bloodstream infection in a neonatal intensive care unit: a case-control study. **Ital J Pediatr**, v. 43, n. 1, p. 10, Jan 19 2017. ISSN 1824-7288 (Electronic) 1720-8424 (Linking).

GERBER, A. et al. Gold nanoparticles: recent aspects for human toxicology. **J Occup Med Toxicol**, v. 8, n. 1, p. 32, Dec 11 2013. ISSN 1745-6673 (Print) 1745-6673 (Linking).

GIANNELLA, M. et al. Use of echinocandin prophylaxis in solid organ transplantation. **J Antimicrob Chemother**, v. 73, n. suppl\_1, p. i51-i59, Jan 1 2018. ISSN 1460-2091 (Electronic) 0305-7453 (Linking).

GIL-ALONSO, S. et al. Postantifungal effect of caspofungin against the *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* clades. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 86, n. 2, p. 172-7, Oct 2016. ISSN 1879-0070 (Electronic) 0732-8893 (Linking).

GILES, C. et al. The importance of fungal pathogens and antifungal coatings in medical device infections. **Biotechnol Adv**, v. 36, n. 1, p. 264-280, Jan - Feb 2018. ISSN 1873-1899 (Electronic) 0734-9750 (Linking).

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, p. 225-234, 2010. ISSN 1676-2444. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S167624442010000300009&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S167624442010000300009&nrm=iso)>.

GIRI, S.; KINDO, A. J. A review of *Candida* species causing blood stream infection. **Indian J Med Microbiol**, v. 30, n. 3, p. 270-8, Jul-Sep 2012. ISSN 1998-3646 (Electronic) 0255-0857 (Linking).

GLAVIS-BLOOM, J.; MUHAMMED, M.; MYLONAKIS, E. Of model hosts and man: using *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Galleria mellonella* as model hosts for infectious disease research. **Adv Exp Med Biol**, v. 710, p. 11-7, 2012. ISSN 0065-2598 (Print) 0065-2598 (Linking).

GLOCKNER, A.; CORNELLY, O. A. *Candida glabrata*--unique features and challenges in the clinical management of invasive infections. **Mycoses**, v. 58, n. 8, p. 445-50, Aug 2015. ISSN 1439-0507 (Electronic) 0933-7407 (Linking).

GOMEZ-CASANOVA, N. et al. *Candida tropicalis* Isolates from Mexican Republic Exhibit High Susceptibility to Bleomycin and Variable Susceptibility to Hydrogen Peroxide. **Microb Drug Resist**, Dec 21 2017. ISSN 1931-8448 (Electronic) 1076-6294 (Linking).

GRATACAP, R. L.; WHEELER, R. T. Utilization of zebrafish for intravital study of eukaryotic pathogen-host interactions. **Dev Comp Immunol**, v. 46, n. 1, p. 108-15, Sep 2014. ISSN 1879-0089 (Electronic) 0145-305X (Linking).

GRUNSPAN, L. D. et al. Teratogenic and anticonvulsant effects of zinc and copper valproate complexes in zebrafish. **Epilepsy Res**, Jan 19 2018. ISSN 1872-6844 (Electronic) 0920-1211 (Linking).

GU, W. et al. In vivo activity of fluconazole/tetracycline combinations in *Galleria mellonella* with resistant *Candida albicans* infection. **J Glob Antimicrob Resist**, Nov 27 2017. ISSN 2213-7173 (Electronic) 2213-7165 (Linking).

HAMILTON-MILLER, J. M.; BRUMFITT, W. Comparative in vitro activity of five nitrofurans. **Chemotherapy**, v. 24, n. 3, p. 161-5, 1978. ISSN 0009-3157 (Print) 0009-3157 (Linking).

HARDING, M. W. et al. Can filamentous fungi form biofilms? **Trends Microbiol**, v. 17, n. 11, p. 475-80, Nov 2009. ISSN 1878-4380 (Electronic) 0966-842X (Linking).

HARLOW, P. H. et al. The nematode *Caenorhabditis elegans* as a tool to predict chemical activity on mammalian development and identify mechanisms influencing toxicological outcome. **Sci Rep**, v. 6, p. 22965, Mar 18 2016. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking).

HARTUNG, T. From alternative methods to a new toxicology. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 77, n. 3, p. 338-49, Apr 2011. ISSN 1873-3441 (Electronic) 0939-6411 (Linking).

HARTUNG, T.; SABBIONI, E. Alternative in vitro assays in nanomaterial toxicology. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol**, v. 3, n. 6, p. 545-73, 2011. ISSN 1939-0041 (Electronic) 1939-0041 (Linking).

HE, J. H. et al. Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity. **Neurotoxicol Teratol**, v. 42, p. 35-42, Mar-Apr 2014. ISSN 1872-9738 (Electronic) 0892-0362 (Linking).

HEALEY, K. R. et al. Prevalent mutator genotype identified in fungal pathogen *Candida glabrata* promotes multi-drug resistance. **Nat Commun**, v. 7, p. 11128, Mar 29 2016. ISSN 2041-1723 (Electronic) 2041-1723 (Linking).

HO, H. L.; HAYNES, K. *Candida glabrata*: new tools and technologies-expanding the toolkit. **FEMS Yeast Res**, v. 15, n. 6, Sep 2015. ISSN 1567-1364 (Electronic) 1567-1356 (Linking).

HOF, S.; MOGAVERO, S.; HUBE, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. **J Microbiol**, v. 54, n. 3, p. 149-69, Mar 2016. ISSN 1976-3794 (Electronic) 1225-8873 (Linking).

HOSIDA, T. Y. et al. Interactions between *Candida albicans* and *Candida glabrata* in biofilms: influence of the strain type, culture medium and glucose supplementation. **Mycoses**, Dec 23 2017. ISSN 1439-0507 (Electronic) 0933-7407 (Linking).

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498-503, Apr 2013. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23594743> >.

HUNT, P. R. The *C. elegans* model in toxicity testing. **J Appl Toxicol**, v. 37, n. 1, p. 50-59, Jan 2017. ISSN 1099-1263 (Electronic) 0260-437X (Linking).

IGNASIAK, K.; MAXWELL, A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. **BMC Res Notes**, v. 10, n. 1, p. 428, Aug 29 2017. ISSN 1756-0500 (Electronic) 1756-0500 (Linking).

INIGO, M.; PEMAN, J.; DEL POZO, J. L. Antifungal activity against *Candida* biofilms. **Int J Artif Organs**, v. 35, n. 10, p. 780-91, Oct 2012. ISSN 1724-6040 (Electronic) 0391-3988 (Linking).

IWANAMI, N. Zebrafish as a model for understanding the evolution of the vertebrate immune system and human primary immunodeficiency. **Exp Hematol**, v. 42, n. 8, p. 697-706, Aug 2014. ISSN 1873-2399 (Electronic) 0301-472X (Linking).

JAROCH, K.; JAROCH, A.; BOJKO, B. Cell cultures in drug discovery and development: The need of reliable in vitro-in vivo extrapolation for pharmacodynamics and pharmacokinetics assessment. **J Pharm Biomed Anal**, v. 147, p. 297-312, Jan 5 2018. ISSN 1873-264X (Electronic) 0731-7085 (Linking).

JORJAO, A. L. et al. From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies. **Virulence**, p. 0, Nov 13 2017. ISSN 2150-5608 (Electronic) 2150-5594 (Linking).

JOSHI, V.; KATTI, P. Developmental Toxicity Assay for Food Additive Tartrazine Using Zebrafish (*Danio rerio*) Embryo Cultures. **Int J Toxicol**, p. 1091581817735227, Jan 1 2017. ISSN 1092-874X (Electronic) 1091-5818 (Linking).

KADOSH, D.; LOPEZ-RIBOT, J. L. *Candida albicans*: adapting to succeed. **Cell Host Microbe**, v. 14, n. 5, p. 483-5, Nov 13 2013. ISSN 1934-6069 (Electronic) 1931-3128 (Linking).

KAMAL, A. et al. Synthesis and antimicrobial potential of nitrofurantriazole congeners. **Org Biomol Chem**, v. 13, n. 36, p. 9388-97, Sep 28 2015. ISSN 1477-0539 (Electronic) 1477-0520 (Linking).

KARKOWSKA-KULETA, J. et al. Characterization of the interactions between human high-molecular-mass kininogen and cell wall proteins of pathogenic yeasts *Candida tropicalis*. **Acta Biochim Pol**, v. 63, n. 3, p. 427-36, 2016. ISSN 1734-154X (Electronic) 0001-527X (Linking).

KASPER, L.; SEIDER, K.; HUBE, B. Intracellular survival of *Candida glabrata* in macrophages: immune evasion and persistence. **FEMS Yeast Res**, v. 15, n. 5, p. fov042, Aug 2015. ISSN 1567-1364 (Electronic) 1567-1356 (Linking).

KEPPANAN, R. et al. Molecular docking of protease from *Metarhizium anisopliae* and their toxic effect against model insect *Galleria mellonella*. **Pestic Biochem Physiol**, v. 138, p. 8-14, May 2017. ISSN 1095-9939 (Electronic) 0048-3575 (Linking).

KIM, W. et al. An update on the use of *C. elegans* for preclinical drug discovery: screening and identifying anti-infective drugs. **Expert Opin Drug Discov**, v. 12, n. 6, p. 625-633, Jun 2017. ISSN 1746-045X (Electronic) 1746-0441 (Linking).

KONG, E. F. et al. Modulation of *Staphylococcus aureus* Response to Antimicrobials by the *Candida albicans* Quorum Sensing Molecule Farnesol. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 12, Dec 2017. ISSN 1098-6596 (Electronic) 0066-4804 (Linking).

KOROSEC, B. et al. Antifungal activity of cinnamic acid derivatives involves inhibition of benzoate 4-hydroxylase (CYP53). **J Appl Microbiol**, v. 116, n. 4, p. 955-66, Apr 2014. ISSN 1365-2672 (Electronic) 1364-5072 (Linking).

KOVACIC, P.; BECVAR, L. E. Mode of action of anti-infective agents: focus on oxidative stress and electron transfer. **Curr Pharm Des**, v. 6, n. 2, p. 143-67, Jan 2000. ISSN 1381-6128 (Print) 1381-6128 (Linking).

KRASAVIN, M. et al. New nitrofurans amenable by isocyanide multicomponent chemistry are active against multidrug-resistant and poly-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Bioorg Med Chem**, v. 25, n. 6, p. 1867-1874, Mar 15 2017. ISSN 1464-3391 (Electronic) 0968-0896 (Linking).

KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, M. C. Invasive Candidiasis. **N Engl J Med**, v. 373, n. 15, p. 1445-56, Oct 8 2015. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking).

LANTZ-MCPEAK, S. et al. Developmental toxicity assay using high content screening of zebrafish embryos. **J Appl Toxicol**, v. 35, n. 3, p. 261-72, Mar 2015. ISSN 1099-1263 (Electronic) 0260-437X (Linking).

LI, X. et al. Potential Targets for Antifungal Drug Discovery Based on Growth and Virulence in *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 10, p. 5885-91, 2015. ISSN 1098-6596 (Electronic) 0066-4804 (Linking).

LIN, C. J. et al. Protein kinase A governs growth and virulence in *Candida tropicalis*. **Virulence**, p. 0, Dec 19 2017. ISSN 2150-5608 (Electronic) 2150-5594 (Linking).

LIU, N. et al. Emerging New Targets for the Treatment of Resistant Fungal Infections. **J Med Chem**, Jan 16 2018. ISSN 1520-4804 (Electronic) 0022-2623 (Linking).

LIZ-MARZAN, L. M. Gold nanoparticle research before and after the Brust-Schiffrin method. **Chem Commun (Camb)**, v. 49, n. 1, p. 16-8, Jan 4 2013. ISSN 1364-548X (Electronic) 1359-7345 (Linking).

LOPEZ-GARCIA, J. et al. HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation. **J Funct Biomater**, v. 5, n. 2, p. 43-57, May 8 2014. ISSN 2079-4983 (Print) 2079-4983 (Linking).

LU, Y.; SU, C.; LIU, H. *Candida albicans* hyphal initiation and elongation. **Trends Microbiol**, v. 22, n. 12, p. 707-14, Dec 2014. ISSN 1878-4380 (Electronic) 0966-842X (Linking).

LU, Y. et al. Quorum sensing controls hyphal initiation in *Candida albicans* through Ubr1-mediated protein degradation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 5, p. 1975-80, Feb 4 2014. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking).

MAGOBO, R. E. et al. Detection of neonatal unit clusters of *Candida parapsilosis* fungaemia by microsatellite genotyping: Results from laboratory-based sentinel surveillance, South Africa, 2009-2010. **Mycoses**, v. 60, n. 5, p. 320-327, May 2017. ISSN 1439-0507 (Electronic) 0933-7407 (Linking).

MAGUIRE, R. et al. Analysis of the acute response of *Galleria mellonella* larvae to potassium nitrate. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 195, p. 44-51, May 2017a. ISSN 1532-0456 (Print) 1532-0456 (Linking).

MAGUIRE, R. et al. Caffeine administration alters the behaviour and development of *Galleria mellonella* larvae. **Neurotoxicol Teratol**, v. 64, p. 37-44, Nov 2017b. ISSN 1872-9738 (Electronic) 0892-0362 (Linking).

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 3, p. 1021-33, Mar 2006. ISSN 0066-4804 (Print) 0066-4804 (Linking).

MELLINGHOFF, S. C. et al. EQUAL *Candida* Score: An ECMM score derived from current guidelines to measure QUALity of Clinical Candidemia Management. **Mycoses**, Jan 11 2018. ISSN 1439-0507 (Electronic) 0933-7407 (Linking).

MENDLING, W.; MAILLAND, F. Microbiological and pharmaco-toxicological profile of nifuratel and its favourable risk/benefit ratio for the treatment of vulvo-vaginal infections. A

review. **Arzneimittelforschung**, v. 52, n. 1, p. 8-13, 2002. ISSN 0004-4172 (Print) 0004-4172 (Linking).

MENDLING, W.; POLI, A.; MAGNANI, P. Clinical effects of nifuratel in vulvovaginal infections. A meta-analysis of metronidazole-controlled trials. **Arzneimittelforschung**, v. 52, n. 10, p. 725-30, 2002. ISSN 0004-4172 (Print) 0004-4172 (Linking).

MERRITT, J. H.; KADOURI, D. E.; O'TOOLE, G. A. Growing and analyzing static biofilms. **Curr Protoc Microbiol**, v. Chapter 1, p. Unit 1B 1, Jul 2005. ISSN 1934-8533 (Electronic).

MODRZEWSKA, B.; KURNATOWSKI, P. Selected pathogenic characteristics of fungi from the genus *Candida*. **Ann Parasitol**, v. 59, n. 2, p. 57-66, 2013. ISSN 2299-0631 (Print) 2299-0631 (Linking).

MONTEIRO, D. R. et al. Antifungal activity of tyrosol and farnesol used in combination against *Candida* species in the planktonic state or forming biofilms. **J Appl Microbiol**, v. 123, n. 2, p. 392-400, Aug 2017. ISSN 1365-2672 (Electronic) 1364-5072 (Linking).

MOREMAN, J. et al. Acute Toxicity, Teratogenic, and Estrogenic Effects of Bisphenol A and Its Alternative Replacements Bisphenol S, Bisphenol F, and Bisphenol AF in Zebrafish Embryo-Larvae. **Environ Sci Technol**, v. 51, n. 21, p. 12796-12805, Nov 7 2017. ISSN 1520-5851 (Electronic) 0013-936X (Linking).

MOURAD, A.; PERFECT, J. R. Tolerability profile of the current antifungal armoury. **J Antimicrob Chemother**, v. 73, n. suppl\_1, p. i26-i32, Jan 1 2018. ISSN 1460-2091 (Electronic) 0305-7453 (Linking).

MUHAMMED, M.; ARVANITIS, M.; MYLONAKIS, E. Whole animal HTS of small molecules for antifungal compounds. **Expert Opin Drug Discov**, v. 11, n. 2, p. 177-84, 2016. ISSN 1746-045X (Electronic) 1746-0441 (Linking).

MUKHERJEE, P. K.; CHANDRA, J. *Candida* biofilm resistance. **Drug Resist Updat**, v. 7, n. 4-5, p. 301-9, Aug-Oct 2004. ISSN 1368-7646 (Print) 1368-7646 (Linking).

MUNOZ-DUARTE, A. R. et al. *Candida glabrata* survives and replicates in human osteoblasts. **Pathog Dis**, v. 74, n. 4, p. ftw030, Jun 2016. ISSN 2049-632X (Electronic) 2049-632X (Linking).

MYLONAKIS, E. et al. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 24, p. 15675-80, Nov 26 2002. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking).



NAGLIK, J. R. et al. Candida albicans-epithelial interactions and induction of mucosal innate immunity. **Curr Opin Microbiol**, v. 40, p. 104-112, Dec 2017. ISSN 1879-0364 (Electronic) 1369-5274 (Linking).

NEPPELENBROEK, K. H. et al. Identification of Candida species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. **Oral Dis**, v. 20, n. 4, p. 329-44, May 2014. ISSN 1601-0825 (Electronic) 1354-523X (Linking).

NETT, J. E.; ANDES, D. R. Fungal Biofilms: In Vivo Models for Discovery of Anti-Biofilm Drugs. **Microbiol Spectr**, v. 3, n. 3, Jun 2015. ISSN 2165-0497 (Electronic) 2165-0497 (Linking).

NEWMAN, M.; EBRAHIMIE, E.; LARDELLI, M. Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research. **Front Genet**, v. 5, p. 189, 2014. ISSN 1664-8021 (Linking).

NORVILLE, I. H. et al. Galleria mellonella as an alternative model of Coxiella burnetii infection. **Microbiology**, v. 160, n. Pt 6, p. 1175-81, Jun 2014. ISSN 1465-2080 (Electronic) 1350-0872 (Linking).

OECD. **Guideline for Testing of Chemicals, 236. Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test.** OECD, Paris, France 2013.

OMIDI, M.; NIKNAHAD, H.; MOHAMMADI-BARDBORI, A. Dithiothreitol (DTT) rescues mitochondria from nitrofurantoin-induced mitotoxicity in rat. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 30, n. 12, p. 588-592, Dec 2016. ISSN 1099-0461 (Electronic) 1095-6670 (Linking).

ORTEGA-RIVEROS, M. et al. Usefulness of the Non-conventional Caenorhabditis elegans Model to Assess Candida Virulence. **Mycopathologia**, v. 182, n. 9-10, p. 785-795, Oct 2017. ISSN 1573-0832 (Electronic) 0301-486X (Linking).

PALACE-BERL, F. et al. Designing and exploring active N'-[(5-nitrofuranyl) methylene] substituted hydrazides against three Trypanosoma cruzi strains more prevalent in Chagas disease patients. **Eur J Med Chem**, v. 96, p. 330-9, 2015. ISSN 1768-3254 (Electronic) 0223-5234 (Linking).

PALANCO, A. C. et al. Activity of 3'-hydroxychalcone against Cryptococcus gattii and toxicity, and efficacy in alternative animal models. **Future Microbiol**, v. 12, p. 1123-1134, Oct 2017. ISSN 1746-0921 (Electronic) 1746-0913 (Linking).

PAMMI, M. et al. Candida parapsilosis is a significant neonatal pathogen: a systematic review and meta-analysis. **Pediatr Infect Dis J**, v. 32, n. 5, p. e206-16, May 2013. ISSN 1532-0987 (Electronic) 0891-3668 (Linking).

PEA, F.; LEWIS, R. E. Overview of antifungal dosing in invasive candidiasis. **J Antimicrob Chemother**, v. 73, n. suppl\_1, p. i33-i43, Jan 1 2018. ISSN 1460-2091 (Electronic) 0305-7453 (Linking).

PEYTON, L. R.; GALLAGHER, S.; HASHEMZADEH, M. Triazole antifungals: a review. **Drugs Today (Barc)**, v. 51, n. 12, p. 705-18, Dec 2015. ISSN 1699-3993 (Print) 1699-3993 (Linking).

POLKE, M.; HUBE, B.; JACOBSEN, I. D. Candida survival strategies. **Adv Appl Microbiol**, v. 91, p. 139-235, 2015. ISSN 0065-2164 (Print) 0065-2164 (Linking).

POONTHIYIL, V. et al. Recent applications of click chemistry for the functionalization of gold nanoparticles and their conversion to glyco-gold nanoparticles. **Beilstein J Org Chem**, v. 14, p. 11-24, 2018. ISSN 1860-5397 (Print) 1860-5397 (Linking).

PRAZYNSKA, M.; GOSPODAREK, E. In vitro effect of amphotericin B on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis* biofilm formation. **Mycopathologia**, v. 177, n. 1-2, p. 19-27, Feb 2014. ISSN 1573-0832 (Electronic) 0301-486X (Linking).

PRESGRAVE, O. et al. Brazilian Center for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM) and the process of validation in Brazil. **Altern Lab Anim**, v. 44, n. 1, p. 85-90, Mar 2016. ISSN 0261-1929 (Print) 0261-1929 (Linking).

PUIA-DUMITRESCU, M.; SMITH, P. B. Antifungal Drugs in Newborns and Children. **Pediatr Clin North Am**, v. 64, n. 6, p. 1389-1402, Dec 2017. ISSN 1557-8240 (Electronic) 0031-3955 (Linking).

QIAN, J. et al. Toxic effect prediction of cefatirizine amidine sodium and its impurities by structure-toxicity relationship of cephalosporins. **Toxicol In Vitro**, v. 46, p. 137-147, Feb 2018. ISSN 1879-3177 (Electronic) 0887-2333 (Linking).

RAI, M. et al. Bioactivity of noble metal nanoparticles decorated with biopolymers and their application in drug delivery. **Int J Pharm**, v. 496, n. 2, p. 159-72, Dec 30 2015. ISSN 1873-3476 (Electronic) 0378-5173 (Linking).

RAMAGE, G. et al. Commercial mouthwashes are more effective than azole antifungals against *Candida albicans* biofilms in vitro. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 111, n. 4, p. 456-60, Apr 2011. ISSN 1528-395X (Electronic) 1079-2104 (Linking).

RAMAGE, G. et al. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 9, p. 2475-9, Sep 2001. ISSN 0066-4804 (Print) 0066-4804 (Linking).

RAMAGE, G. et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. **Rev Iberoam Micol**, v. 18, n. 4, p. 163-70, Dec 2001. ISSN 1130-1406 (Print) 1130-1406 (Linking).

RATTANATA, N. et al. Gallic acid conjugated with gold nanoparticles: antibacterial activity and mechanism of action on foodborne pathogens. **Int J Nanomedicine**, v. 11, p. 3347-56, 2016. ISSN 1178-2013 (Electronic) 1176-9114 (Linking).

RAVI, M. et al. 3D cell culture systems: advantages and applications. **J Cell Physiol**, v. 230, n. 1, p. 16-26, Jan 2015. ISSN 1097-4652 (Electronic) 0021-9541 (Linking).

REEVES, E. P. et al. Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. **Mycopathologia**, v. 158, n. 1, p. 73-9, Jul 2004. ISSN 0301-486X (Print) 0301-486X (Linking).

RODRIGUES, C. F.; HENRIQUES, M. Liposomal and Deoxycholate Amphotericin B Formulations: Effectiveness against Biofilm Infections of *Candida* spp. **Pathogens**, v. 6, n. 4, Dec 1 2017. ISSN 2076-0817 (Print) 2076-0817 (Linking).

ROMAO, D. et al. A New Determinant of *Candida glabrata* Virulence: The Acetate Exporter CgDtr1. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 7, p. 473, 2017. ISSN 2235-2988 (Electronic) 2235-2988 (Linking).

RUTH, M. M. et al. Nifurtimox Is Ineffective against Drug-Resistant Mycobacteria. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 9, Sep 2017. ISSN 1098-6596 (Electronic) 0066-4804 (Linking).

RYBAK, J. M. et al. Loss of C-5 Sterol Desaturase Activity Results in Increased Resistance to Azole and Echinocandin Antifungals in a Clinical Isolate of *Candida parapsilosis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 9, Sep 2017. ISSN 1098-6596 (Electronic) 0066-4804 (Linking).

SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. **J Med Microbiol**, v. 41, n. 5, p. 295-310, Nov 1994. ISSN 0022-2615 (Print) 0022-2615 (Linking).

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLORL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58 Suppl 2, p. 2-13, Jun 2015. ISSN 1439-0507 (Electronic) 0933-7407 (Linking).

SANT, K. E.; TIMME-LARAGY, A. R. Zebrafish as a Model for Toxicological Perturbation of Yolk and Nutrition in the Early Embryo. **Curr Environ Health Rep**, Feb 7 2018. ISSN 2196-5412 (Electronic) 2196-5412 (Linking).

SANTORO, M. M. Zebrafish as a model to explore cell metabolism. **Trends Endocrinol Metab**, v. 25, n. 10, p. 546-54, Oct 2014. ISSN 1879-3061 (Electronic) 1043-2760 (Linking).

SARDI, J. C. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **J Med Microbiol**, v. 62, n. Pt 1, p. 10-24, Jan 2013. ISSN 1473-5644 (Electronic) 0022-2615 (Linking).

SAVASTANO, C. et al. *Candida glabrata* among *Candida* spp. from environmental health practitioners of a Brazilian Hospital. **Braz J Microbiol**, v. 47, n. 2, p. 367-72, Apr-Jun 2016. ISSN 1678-4405 (Electronic) 1517-8382 (Linking).

SAWANT, B.; KHAN, T. Recent advances in delivery of antifungal agents for therapeutic management of candidiasis. **Biomed Pharmacother**, v. 96, p. 1478-1490, Dec 2017. ISSN 1950-6007 (Electronic) 0753-3322 (Linking).

SBRANA, F. et al. Independent risk factors for mortality in critically ill patients with candidemia on Italian Internal Medicine Wards. **Intern Emerg Med**, Jan 10 2018. ISSN 1970-9366 (Electronic) 1828-0447 (Linking).

SCORZONI, L. et al. Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e60047, 2013. ISSN 1932-6203.

SCORZONI, L. et al. Evaluation of *Caenorhabditis elegans* as a host model for *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. **Pathog Dis**, v. 76, n. 1, Feb 1 2018. ISSN 2049-632X (Electronic) 2049-632X (Linking).

SEIDLER, M.; SALVENMOSER, S.; MULLER, F. M. In vitro effects of micafungin against *Candida* biofilms on polystyrene and central venous catheter sections. **Int J Antimicrob Agents**, v. 28, n. 6, p. 568-73, Dec 2006. ISSN 0924-8579 (Print) 0924-8579 (Linking).

SEIDLER, M. J.; SALVENMOSER, S.; MULLER, F. M. *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 11, p. 4130-6, 2008. ISSN 1098-6596 (Electronic) 0066-4804 (Linking).

SEMIS, R. et al. Mechanism of activity and toxicity of Nystatin-Intralipid. **Med Mycol**, v. 51, n. 4, p. 422-31, May 2013. ISSN 1460-2709 (Electronic) 1369-3786 (Linking).

SEYEDMOUSAVI, S. et al. Systemic Antifungal Agents: Current Status and Projected Future Developments. **Methods Mol Biol**, v. 1508, p. 107-139, 2017. ISSN 1940-6029 (Electronic) 1064-3745 (Linking).

SINGARAVELU, K.; GACSER, A.; NOSANCHUK, J. D. Genetic determinants of virulence - *Candida parapsilosis*. **Rev Iberoam Micol**, v. 31, n. 1, p. 16-21, Jan-Mar 2014. ISSN 2173-9188 (Electronic) 1130-1406 (Linking).

SINGULANI, J. L. et al. Activity of gallic acid and its ester derivatives in *Caenorhabditis elegans* and zebrafish (*Danio rerio*) models. **Future Med Chem**, v. 9, n. 16, p. 1863-1872, Oct 2017. ISSN 1756-8927 (Electronic) 1756-8919 (Linking).

SOVA, M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. **Mini Rev Med Chem**, v. 12, n. 8, p. 749-67, Jul 2012. ISSN 1875-5607 (Electronic) 1389-5575 (Linking).

STEVANOVIC, M. et al. Toxicity of clomazone and its formulations to zebrafish embryos (*Danio rerio*). **Aquat Toxicol**, v. 188, p. 54-63, Jul 2017. ISSN 1879-1514 (Electronic) 0166-445X (Linking).

TAFF, H. T. et al. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. **Future Microbiol**, v. 8, n. 10, p. 1325-37, Oct 2013. ISSN 1746-0921 (Electronic) 1746-0913 (Linking).

TAMPAKAKIS, E.; OKOLI, I.; MYLONAKIS, E. A *C. elegans*-based, whole animal, in vivo screen for the identification of antifungal compounds. **Nat Protoc**, v. 3, n. 12, p. 1925-31, 2008. ISSN 1750-2799 (Electronic) 1750-2799 (Linking).

TAN, Y. et al. Inhibitory effect of probiotic lactobacilli supernatants on single and mixed non-albicans *Candida* species biofilm. **Arch Oral Biol**, v. 85, p. 40-45, Jan 2018. ISSN 1879-1506 (Electronic) 0003-9969 (Linking).

TOTH, A. et al. Specific pathways mediating inflammasome activation by *Candida parapsilosis*. **Sci Rep**, v. 7, p. 43129, Feb 22 2017. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking).

TOTH, R. et al. *Candida parapsilosis* Secreted Lipase as an Important Virulence Factor. **Curr Protein Pept Sci**, v. 18, n. 10, p. 1043-1049, 2017. ISSN 1875-5550 (Electronic) 1389-2037 (Linking).

TREVINO-RANGEL, R. J. et al. Phenotypical characterization and molecular identification of clinical isolates of *Candida tropicalis*. **Rev Iberoam Micol**, Dec 26 2017. ISSN 2173-9188 (Electronic) 1130-1406 (Linking).

TSAI, C. J.; LOH, J. M.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214-29, Apr 2 2016. ISSN 2150-5608 (Electronic) 2150-5594 (Linking).

TURNER, S. A.; BUTLER, G. The *Candida* pathogenic species complex. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 4, n. 9, p. a019778, Sep 2 2014. ISSN 2157-1422 (Electronic) 2157-1422 (Linking).

UMAIR, M. et al. Nanotoxicity of Inert Materials: The Case of Gold, Silver and Iron. **J Pharm Pharm Sci**, v. 19, n. 2, p. 161-80, Apr-Jun 2016. ISSN 1482-1826 (Electronic) 1482-1826 (Linking).

WEISSIG, V.; PETTINGER, T. K.; MURDOCK, N. Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. **Int J Nanomedicine**, v. 9, p. 4357-73, 2014. ISSN 1178-2013 (Electronic) 1176-9114 (Linking).

WHALEY, S. G. et al. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans Candida* Species. **Front Microbiol**, v. 7, p. 2173, 2016. ISSN 1664-302X (Print) 1664-302X (Linking).

XIONG, H.; PEARS, C.; WOOLLARD, A. An enhanced *C. elegans* based platform for toxicity assessment. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 9839, Aug 29 2017. ISSN 2045-2322 (Electronic) 2045-2322 (Linking).

XU, Z. et al. Crystal Violet and XTT Assays on *Staphylococcus aureus* Biofilm Quantification. **Curr Microbiol**, v. 73, n. 4, p. 474-82, Oct 2016. ISSN 1432-0991 (Electronic) 0343-8651 (Linking).

YADAV, J. S. et al. *Candida krusei*: biotechnological potentials and concerns about its safety. **Can J Microbiol**, v. 58, n. 8, p. 937-52, Aug 2012. ISSN 1480-3275 (Electronic) 0008-4166 (Linking).

YU, S. J.; CHANG, Y. L.; CHEN, Y. L. Deletion of ADA2 increases antifungal drug susceptibility and virulence in *Candida glabrata*. **Antimicrob Agents Chemother**, Jan 8 2018. ISSN 1098-6596 (Electronic) 0066-4804 (Linking).

ZHANG, Q. et al. Regulation of filamentation in the human fungal pathogen *Candida tropicalis*. **Mol Microbiol**, v. 99, n. 3, p. 528-45, Feb 2016. ISSN 1365-2958 (Electronic) 0950-382X (Linking).

ZHAO, H. et al. Occurrence and levels of nitrofurantoin metabolites in sea cucumber from Dalian, China. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**, v. 33, n. 11, p. 1672-1677, Nov 2016. ISSN 1944-0057 (Electronic) 1944-0057 (Linking).

ZHAO, P.; LI, N.; ASTRUC, D. State of the art in gold nanoparticle synthesis. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 257, n. 3, p. 638-665, 2013/02/01/ 2013. ISSN 0010-8545. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854512002305> >.

ZHU, Y.; LIAO, L. Applications of Nanoparticles for Anticancer Drug Delivery: A Review. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 15, n. 7, p. 4753-73, Jul 2015. ISSN 1533-4880 (Print) 1533-4880 (Linking).

ZONG, Y. et al. Toxicity of 7-ketocholesterol on lethality, growth, reproduction, and germline apoptosis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **J Toxicol Environ Health A**, v. 77, n. 12, p. 716-23, 2014. ISSN 1528-7394 (Print) 0098-4108 (Linking).

ZORZI, R. R. et al. Exploring 5-nitrofurán derivatives against nosocomial pathogens: synthesis, antimicrobial activity and chemometric analysis. **Bioorg Med Chem**, v. 22, n. 10, p. 2844-54, 2014. ISSN 1464-3391 (Electronic) 0968-0896 (Linking).

ZUZA-ALVES, D. L. et al. Evaluation of Virulence Factors In vitro, Resistance to Osmotic Stress and Antifungal Susceptibility of *Candida tropicalis* Isolated from the Coastal Environment of Northeast Brazil. **Front Microbiol**, v. 7, p. 1783, 2016. ISSN 1664-302X (Print) 1664-302X (Linking).

ZUZA-ALVES, D. L.; SILVA-ROCHA, W. P.; CHAVES, G. M. An Update on *Candida tropicalis* Based on Basic and Clinical Approaches. **Front Microbiol**, v. 8, p. 1927, 2017. ISSN 1664-302X (Print) 1664-302X (Linking).