



**Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Campus de Araraquara  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**ANA LÍGIA BLANCO**

**Avaliação da atividade da micafungina incorporada em nanoemulsão frente  
a biofilme de *Candida auris* e *Candida albicans* e em modelo alternativo  
de *Galleria mellonella***

**Ana Lígia Blanco**  
Mestranda

**Profa. Dra. Taís Maria Bauab**  
Orientadora

**Araraquara**

**2023**



**Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Campus de Araraquara  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**ANA LÍGIA BLANCO**

**Avaliação da atividade da micafungina incorporada em nanoemulsão frente  
a biofilme de *Candida auris* e *Candida albicans* e em modelo alternativo  
de *Galleria mellonella***

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas, Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como  
parte dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Ana Lígia Blanco  
**Orientadora:** Taís Maria Bauab

**Araraquara**  
**2023**

---

**B337a** Blanco, Ana Lúgia.  
Avaliação da atividade da micafungina incorporada em nanoemulsão frente a biofilme de *Candida auris* e *Candida albicans* e em modelo alternativo de *Galleria mellonella* /Ana Lúgia Blanco. – Araraquara: [S.n.], 2023.  
53 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Taís Maria Bauab.

1. *Candida auris*. 2. *Candida albicans*. 3. Nanoemulsões. 4. Micafungina. 5. Biofilmes. I. Bauab, Taís Maria, orient. II. Título.

---

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP - Campus de Araraquara

**CAPES: 33004030078P6**  
**Esta ficha não pode ser modificada**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**Câmpus de Araraquara**



### **CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** Avaliação da atividade da micafungina incorporada em nanoemulsão frente a biofilme de *Candida auris* e *Candida albicans* e em modelo alternativo de *Galleria mellonella*

**AUTORA:** ANA LÍGIA BLANCO

**ORIENTADORA:** TAIS MARIA BAUAB

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciências Farmacêuticas, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. TAIS MARIA BAUAB (Participação Virtual)  
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Profa. Dra. JANAINA DE CÁSSIA ORLANDI SARDI (Participação Virtual)  
Universidade de Guarulhos - UNG

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI (Participação Virtual)  
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP

Araraquara, 12 de julho de 2023

## **Agradecimentos**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

Foi realizada a avaliação da atividade biológica do uso de uma nanoemulsão contendo micafungina sobre os biofilmes formados por *C. auris* e *C. albicans*, como uma alternativa aos tratamentos empregados atualmente. A nanoemulsão foi desenvolvida contendo como fase oleosa o ácido oleico, uma mistura de polioxietileno 20 cetil éter (Brij® 58) e fosfatidilcolina de soja na proporção 2:1 como sistema tensoativo e tampão fosfato (PBS) pH 7,4 como fase aquosa. Os ensaios biológicos mostram que a nanoemulsão com micafungina incorporada não apresentou atividade antifúngica frente à cepa clínica de *C. auris*, contudo, a solução com micafungina livre demonstrou atividade com uma CIM de 0,333 µg/mL. Para a cepa padrão de *C. albicans* foi obtido a mesma CIM de 0,0103 µg/mL tanto para nanoemulsão contendo micafungina quanto para a solução com este fármaco livre, evidenciando assim que há atividade fungicida da nanoemulsão contendo micafungina (NEMICA) para essa cepa utilizada. Nos ensaios em presença de sorbitol houve aumento dos valores de CIM de micafungina para as duas cepas utilizadas, elucidando o possível mecanismo de ação, enquanto que nos ensaios com exógenos de ergosterol não houve alteração dos valores de concentração inibitória. Não foi observada atividade antifúngica frente aos biofilmes das cepas utilizadas. Os resultados referentes ao índice de citotoxicidade (IC<sub>50</sub>) de micafungina, da formulação base (NE) e da nanoemulsão contendo micafungina (NEMICA) frente à linhagem celular L929 são de 60 µg/mL para a MICA e NEMICA, e 80 µg/mL para a formulação base. Quanto ao ensaio de toxicidade aguda em larvas de *G. mellonella*, as dosagens 5, 10, 25, 50 100, 200, 500, 1000 e 2000 mg/kg de micafungina livre e incorporada em nanoemulsão não foram capazes de induzir morte nas larvas utilizadas. Nos ensaios terapêuticos de infecção por *C. auris* e *C. albicans* em modelos alternativos *in vivo* de *G. mellonella*, para *C. albicans*, todos os grupos experimentais

tiveram um perfil de sobrevivência positivo após a infecção. Para *C. auris*, a maior porcentagem de sobrevivência nos grupos 3 e 4 sugere que o tratamento com micafungina livre e incorporada foi capaz de prevenir um número maior de mortes dos grupos amostrais, apontando uma possível ação sobre a infecção causada nas larvas.

**Palavras-chave:** *Candida auris*; *Candida albicans*; nanoemulsões; micafungina; biofilmes.

## ABSTRACT

An evaluation of the biological activity of using a nanoemulsion containing micafungin on biofilms formed by *C. auris* and *C. albicans* was carried out, as an alternative to the treatments currently used. The nanoemulsion was developed containing oleic acid as the oily phase, a mixture of polyoxyethylene 20 cetyl ether (Brij® 58) and soy phosphatidylcholine in a 2:1 ratio as surfactant system and phosphate buffer (PBS) pH 7.4 as aqueous phase. Biological assays show that the nanoemulsion with incorporated micafungin did not show antifungal activity against the clinical strain of *C. auris*, however, the solution with free micafungin showed activity with a MIC of 0.333 µg/mL. For the standard strain of *C. albicans*, the same MIC of 0.0103 µg/mL was obtained both for the nanoemulsion containing micafungin and for the solution with this free drug, thus showing that there is fungicidal activity of the nanoemulsion containing micafungin (NEMICA) for this strain used. In the tests in the presence of sorbitol, there was an increase in the MIC values of micafungin for the two strains used, elucidating the possible mechanism of action, while in the tests with exogenous ergosterol there was no change in the inhibitory concentration values. No antifungal activity was observed against the biofilms of the strains used. The results regarding the cytotoxicity index (IC<sub>50</sub>) of micafungin, the base formulation (NE) and the nanoemulsion containing micafungin (NEMICA) against the L929 cell line are 60 µg/mL for MICA and NEMICA, and 80 µg/mL for the base formulation. As for the acute toxicity test on *G. mellonella* larvae, dosages 5, 10, 25, 50, 100, 200, 500, 1000 and 2000 mg/kg of free and incorporated micafungin in nanoemulsion were not able to induce death in the larvae used. In therapeutic trials of *C. auris* and *C. albicans* infection in alternative in vivo models of *G. mellonella*, for *C. albicans*, all experimental groups had a positive survival profile after infection. For *C. auris*, the highest percentage of survival in groups 3 and 4 suggests that treatment with free and incorporated micafungin was able to prevent a greater number of deaths in the sample groups, pointing to a possible action on the infection caused in the larvae.

**Keywords:** *Candida auris*; *Candida albicans*; nanoemulsions; micafungin; biofilms.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Mecanismo de ação dos agentes antifúngicos conforme seu alvo de atuação.....                                                                                         | 18 |
| Figura 2 – Estrutura química da micafungina.....                                                                                                                                | 18 |
| Figura 3 – Diagrama de fases ternário.....                                                                                                                                      | 32 |
| Figura 4 - Fotomicrografias das formulações analisadas.....                                                                                                                     | 33 |
| Figura 5 - Reogramas das formulações NE (formulação sem o princípio ativo) e NEMICA (nanoemulsão contendo micafungina) .....                                                    | 40 |
| Figura 6 - Comportamento reológico em fluxo oscilatório das formulações NE e NEMICA.....                                                                                        | 42 |
| Figura 7 - Curvas de morte microbiana obtidas para a atividade antifúngica de micafungina e NEMICA para <i>C. auris</i> (A) e <i>C. albicans</i> (B) nas concentrações CFM..... | 43 |
| Figura 8 - Larvas viáveis ao início do tratamento (à esquerda) e larvas mortas após injeção de etanol (à direita).....                                                          | 48 |

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

|                                                                                                                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Grupos experimentais dos experimentos de sobrevivência e terapia de infecção sistêmica em modelo alternativo <i>in vivo</i> de infecção por <i>C. auris</i> e <i>C. albicans</i> em <i>G. mellonella</i> ..... | 30 |
| Tabela 2 - Composição e características das formulações selecionadas.....                                                                                                                                                 | 32 |
| Tabela 3 - Valores das médias e desvio-padrão do tamanho hidrodinâmico médio, PDI e PZ...                                                                                                                                 | 34 |
| Tabela 4 - Valores das médias e desvio-padrão dos diâmetros das gotículas e IPD nos tempos 0, 1, 2 e 3.....                                                                                                               | 35 |
| Tabela 5 - Valores das médias e desvio-padrão do PZ nos tempos 0, 1, 2 e 3 em módulo.....                                                                                                                                 | 38 |
| Tabela 6 - Valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) encontrados para a nanoemulsão com micafungina incorporada e para micafungina livre através da revelação com TTC (2%).....                                                 | 43 |
| Tabela 7 - Valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) encontrados para a nanoemulsão com micafungina incorporada e para micafungina livre através da revelação com TTC (2%) em meio RPMI suplementado com 0,8 M de sorbitol..... | 45 |
| Tabela 8 - Resultados da determinação do potencial citotóxico <i>in vitro</i> (IC <sub>50</sub> ) de micafungina livre e incorporada em nanoemulsão e da formulação base (sem o fármaco).....                             | 46 |

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ASD - Ágar Sabouraud Dextrose

ATCC – *American Type Culture Collection*

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – *Clinical Laboratory Standard Institute*

FA – Fase Aquosa

FO – Fase Oleosa

IC<sub>50</sub> – Índice de Toxicidade Mediana

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

NE – Nanoemulsão

NEMICA – Nanoemulsão contendo micafungina

PDI - Índice de polidispersidade

PZ – Potencial Zeta

RPMI 1640 – *Roswell Park Memorial Institute Medium*

SF – Separação de Fases

SLO – Sistema Líquido Opaco

SLT – Sistema Líquido Transparente

SVO – Sistema Viscoso Opaco

SVST – Sistema Viscoso Semitransparente

SVT – Sistema Viscoso Transparente

T – Tensoativo

TTC – Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio

UFC – Unidade Formadora de Colônia

XTT - 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[carbonilo(fenilamino)]-2H-tetrazólio-hidróxido

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                              |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Introdução.....</b>                                                                                                                    | <b>14</b> |
| <b>2. Revisão de Literatura .....</b>                                                                                                        | <b>16</b> |
| 2.1 Infecções fúngicas.....                                                                                                                  | 16        |
| 2.2 <i>Candida auris</i> .....                                                                                                               | 17        |
| 2.3 <i>Candida albicans</i> .....                                                                                                            | 18        |
| 2.4 Tratamento e desafios.....                                                                                                               | 18        |
| 2.5 Nanotecnologia.....                                                                                                                      | 22        |
| <b>3. Objetivo .....</b>                                                                                                                     | <b>24</b> |
| 3.1 Objetivos específicos .....                                                                                                              | 24        |
| <b>4. Materiais e Métodos.....</b>                                                                                                           | <b>24</b> |
| 4.1 Desenvolvimento da nanoemulsão.....                                                                                                      | 25        |
| 4.1.1 Ensaios de caracterização.....                                                                                                         | 25        |
| 4.1.1.1. Tamanho de gotícula, PDI e potencial zeta .....                                                                                     | 25        |
| 4.1.1.2. Ensaios reológicos.....                                                                                                             | 26        |
| 4.2 Ensaios biológicos.....                                                                                                                  | 27        |
| 4.2.1. Determinação do potencial inibitório in vitro .....                                                                                   | 27        |
| 4.2.1.1. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....                                                                            | 27        |
| 4.2.2. Determinação da cinética fungicida .....                                                                                              | 28        |
| 4.2.2. Interação ergosterol – sorbitol.....                                                                                                  | 28        |
| 4.2.3. Ensaio de inibição de biofilmes .....                                                                                                 | 28        |
| 4.3. Determinação do potencial citotóxico .....                                                                                              | 29        |
| 4.4. Determinação do potencial tóxico agudo em modelo in vivo alternativo .....                                                              | 30        |
| 4.5. Ensaios terapêuticos de infecção por <i>C. auris</i> e <i>C. albicans</i> em modelos alternativos in vivo de <i>G. mellonella</i> ..... | 31        |
| <b>5. Resultados e Discussão .....</b>                                                                                                       | <b>33</b> |
| 5.1 Diagrama de fases ternário.....                                                                                                          | 33        |
| 5.1.1 Escolha das formulações para as análises farmacotécnicas .....                                                                         | 34        |
| 5.2 Ensaios farmacotécnicos e caracterização das formulações selecionadas.....                                                               | 34        |
| 5.2.1 Microscopia de luz polarizada .....                                                                                                    | 35        |
| 5.2.2 Tamanho de partícula, Índice de polidispersidade e potencial Zeta .....                                                                | 35        |

|                                                                                                                                                      |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.2.3 Dispersão de luz dinâmica e estabilidade .....                                                                                                 | 36        |
| 5.2.3.1. Potencial Zeta.....                                                                                                                         | 39        |
| 5.3. Ensaio reológico da nanoemulsão.....                                                                                                            | 40        |
| 5.3.1 Análise reológica contínua.....                                                                                                                | 40        |
| 5.3.1 Análise reológica oscilatória.....                                                                                                             | 42        |
| 5.4. Ensaio biológico.....                                                                                                                           | 44        |
| 5.4.1 Potencial inibitório <i>in vitro</i> e Concentração Fungicida Mínima.....                                                                      | 44        |
| 5.4.2 Cinética Fungicida.....                                                                                                                        | 45        |
| 5.4.3 Interação ergosterol – sorbitol.....                                                                                                           | 46        |
| 5.4.4 Ensaio de inibição de biofilmes.....                                                                                                           | 48        |
| 5.5 Determinação do Potencial Citotóxico.....                                                                                                        | 48        |
| 5.6 Determinação do potencial tóxico agudo em modelo <i>in vivo</i> alternativo.....                                                                 | 49        |
| 5.7 Ensaio terapêuticos de infecção por <i>C. auris</i> e <i>C. albicans</i> em modelos alternativos<br><i>in vivo</i> de <i>G. mellonella</i> ..... | 49        |
| 6. Conclusões.....                                                                                                                                   | 51        |
| <b>7. Referências .....</b>                                                                                                                          | <b>54</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

A resistência microbiana é indiscutivelmente uma das maiores ameaças e desafios para a medicina clínica e a saúde pública neste século. Microrganismos resistentes a antimicrobianos, particularmente bactérias e fungos, estão sendo relatados cada vez mais em ambientes de saúde e comunitários, com altas morbidades, mortalidades e custos associados à saúde que chegam a milhões de dólares (SEKYERE, 2018). Neste contexto, a espécie *C. auris* representa um risco substancial em instalações de saúde e unidades de terapia intensiva.

Dado o perfil de resistência bem documentado desta espécie e a capacidade de causar surtos hospitalares e altas taxas de mortalidade associadas, o controle dentro do ambiente hospitalar é crucial, e o estabelecimento de um modelo de tratamento se faz indispensável (CORTIGIANI et al., 2018; FASCIANA et al., 2020).

Isolados clínicos de *C. auris* exibem valores de CIM relativamente altos, o que ressalta a importância de novos estudos buscando alternativas de tratamento (SEKYERE, 2018). Ademais, a preocupação com a resistência aos agentes antifúngicos triazólicos e anfotericina B levou à recomendação para o uso de equinocandinas como tratamento empírico., uma vez que a micafungina demonstrou a maior eficácia em um modelo de candidemia por *C. auris* induzida em camundongos (JEFFERY-SMITH et al, 2018). A equinocandina em questão possui potencial fungicida conhecido contra *Candida* spp., o que indica um potencial tratamento. Em contrapartida, há relatos de isolados de *C. auris* com sensibilidade reduzida a esta classe também (CORTIGIANI et. al, 2018).

A espécie *Candida albicans* é um fungo de importância médica, uma vez que é a espécie fúngica mais prevalente da microbiota humana, sendo um patógeno oportunista e capaz de causar infecções desde a mucosa superficial até a candidíase disseminada por via hematogênica (LOPES et al, 2022).

A utilização de nanotecnologia como uma nova abordagem terapêutica classifica-se como uma estratégia promissora e amplamente utilizada, sendo consagrada na literatura nas mais diversas áreas em virtude de suas vantagens relacionadas com a diminuição de efeitos tóxicos, aumento da solubilidade de princípios ativos e aprimoramento do perfil farmacológico dos mesmos (RAMOS et al., 2018; RAMOS et al., 2020). Estes perfis contribuem efetivamente para a escolha de um sistema de liberação de fármacos (nanoemulsão lipídica) para a incorporação de micafungina, com o objetivo de propor uma nova estratégia de controle de *C. auris*, em especial na elucidação do potencial anti-biofilme.

Sistemas lipídicos nanoestruturados contendo bioativos podem promover a interação direta de antifúngicos com a estrutura complexa dos biofilmes, independentemente de seu estágio de formação. Se a interação de uma nanoemulsão contendo um antifúngico ocorrer na adesão primária, evento inicial do processo de formação de um biofilme, esta interação entre o fármaco incorporado e as membranas do microrganismo pode facilitar a entrada do quimioterápico no meio intracelular, contendo o processo contínuo de formação em andamento. O mesmo poderia ocorrer durante o evento final, a dispersão, na qual as células individuais são destacadas da matriz, aptas a reiniciar o ciclo de formação do biofilme. Ademais, há a possibilidade de ação direta dos sistemas nanoestruturados sobre a matriz polimérica do biofilme, propiciando a fusão das nanopartículas e viabilizando a desnaturação das proteínas e a fusão das bicamadas lipídicas, o que auxiliaria a entrada das nanopartículas dentro do biofilme, barreira a qual dificultava o contato do fármaco com as células microbianas (FORIER, 2018; RAMALINGAM et al., 2012; RAMOS et. al., 2018).

Em suma, a estratégia de incorporação de micafungina trata-se de uma abordagem inovadora, apresentando uma nova alternativa para a administração deste fármaco, o que pode ser de grande valia para o tratamento de infecções sistêmicas causadas por *C. auris* e *C. albicans*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Infecções fúngicas

As infecções por fungos são geralmente crônicas, e podem ser classificadas em função do grau de envolvimento do tecido, bem como o modo de entrada no hospedeiro. Consistem em: sistêmica, subcutânea, cutânea, superficial ou oportunista. Micoses sistêmicas são infecções fúngicas que não se restringem a nenhuma região particular, e possuem o potencial de afetar vários tecidos e órgãos, uma vez que o fungo se dissemina por via hematogênica (FASCIANA, 2020).

A incidência de infecções fúngicas continua a crescer em todo o mundo, principalmente em pacientes imunossuprimidos, prioritariamente internados em unidades de terapia intensiva, as quais são reconhecidas como de risco para essas infecções, tendo como alvo indivíduos transplantados, neutropênicos, diabéticos, submetidos a administração de antibióticos de amplo espectro, internação prolongada, entre outros (SEKYERE, 2018). Trata-se, portanto, de um agente oportunista o qual necessita de condições para se manifestar.

A *Candida* spp. é a levedura mais comumente envolvida nessas doenças sistêmicas, muitas vezes associadas a um alto índice de resistência antifúngica e a fatores de virulência como a formação de biofilmes, o que dificulta o tratamento dessas infecções, especialmente a nível sistêmico, sendo então denominadas candidemias. Infecções por espécies de *Candida* spp. em corrente sanguínea são uma importante causa de morbidade e mortalidade hospitalar. Estudos demonstram que a incidência de episódios de candidemia vem aumentando no decorrer dos anos. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 250.000 pessoas são afetadas anualmente, com mais de 50.000 mortes resultantes (BIDAUB et al., 2018; PAPPAS et al., 2018). Na última década, uma espécie emergente de *Candida* spp. tem causado casos graves de candidemia e outros tipos de infecções fúngicas, mormente associadas a surtos do patógeno responsável (LOCKHART et al., 2017).

## 2.2 *Candida auris*

A espécie *C. auris* foi isolada em 2009 no Japão, a partir de uma cultura da região auricular de um paciente diagnosticado com candidemia severa e, posteriormente, relatos do isolamento desta espécie foram divulgados em diversos países, tais como na Coreia do Sul e Brasil. Atualmente, abrange todos os continentes, e é provável que o número de pacientes afetados seja significativamente maior do que a literatura sugere (CORTIGIANI et al., 2018; KEAN et al., 2019; HAN DU et al., 2020).

*C. auris* está associada a graves infestações em ambientes de terapia intensiva, e a transmissão, apesar da implementação de medidas de prevenção e controle de infecção, é uma preocupação particular. Tal fato pode estar associado à capacidade de sobrevivência em diferentes superfícies por um longo período de tempo, por meio de diferentes mecanismos de aderência, como a agregação e a formação de biofilme, resultando nesta irrupção de infecções invasivas em ambientes hospitalares, associadas à alta mortalidade (DAS, 2018).

Classificada como uma espécie multirresistente a medicamentos, demonstra padrões de resistência variáveis a diversas classes de antifúngicos usados para tratar infecções por *Candida* spp. (SHERRY, 2017; LOCKHART, 2018). Estudos demonstraram que a produção de fosfolipase e secreção de proteinases por *C. auris* é dependente da cepa, com a maioria dos isolados sendo não produtores de fosfolipase e não secretores de proteinases (LARKIN et al., 2017).

Problemas com a identificação de *C. auris* usando técnicas fenotípicas e moleculares elevam as preocupações sobre a detecção da verdadeira dimensão deste problema iminente, uma vez que devido ao seu ineditismo, muitas vezes seu diagnóstico é confundido com outras espécies, tal como *C. albicans*, o que gera falhas na escolha da terapia (SMITH et al., 2018).

Como os casos de *C. auris* continuam a ser encontrados em todo o mundo, há necessidade de melhores diagnósticos, terapias antifúngicas e medidas de controle de infecção.

### **2.3 *Candida albicans***

*Candida albicans* é a espécie mais prevalente do gênero *Candida*, causando infecções que variam de membranas mucosas a infecções sistêmicas, essas estão associadas a altas morbidade e mortalidade nos pacientes afetados. Constitui uma levedura diploide que se multiplica por brotamento e, em determinadas situações, pode produzir tubo germinativo e então crescer como pseudo-hifa ou hifa verdadeira (PEREIRA, 2021).

Enquanto outros fungos, como por exemplo, *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis* se encontram na natureza na fase filamentosa e se convertem em levedura nos tecidos humanos causando doenças, *C. albicans*, comporta-se de outra forma, uma vez que as hifas possuem maior capacidade de aderir e penetrar nas células epiteliais humanas do que os blastoconídios. Assim, na forma de hifa, *C. albicans* é invasiva e patogênica, enquanto que na forma de levedura é comensal e não patogênica (WITCHLEY, 2019).

A patogenicidade de *C. albicans* é dependente de dois principais aspectos: o estado imune do hospedeiro e os fatores de virulência desse patógeno. Nas últimas três décadas foram identificadas uma grande quantidade de fatores de virulência: capacidade de adesão, desenvolvimento de biofilmes, produção de enzimas hidrolíticas, e transição morfológica (KEAN et al., 2019).

### **2.4 Tratamento e desafios**

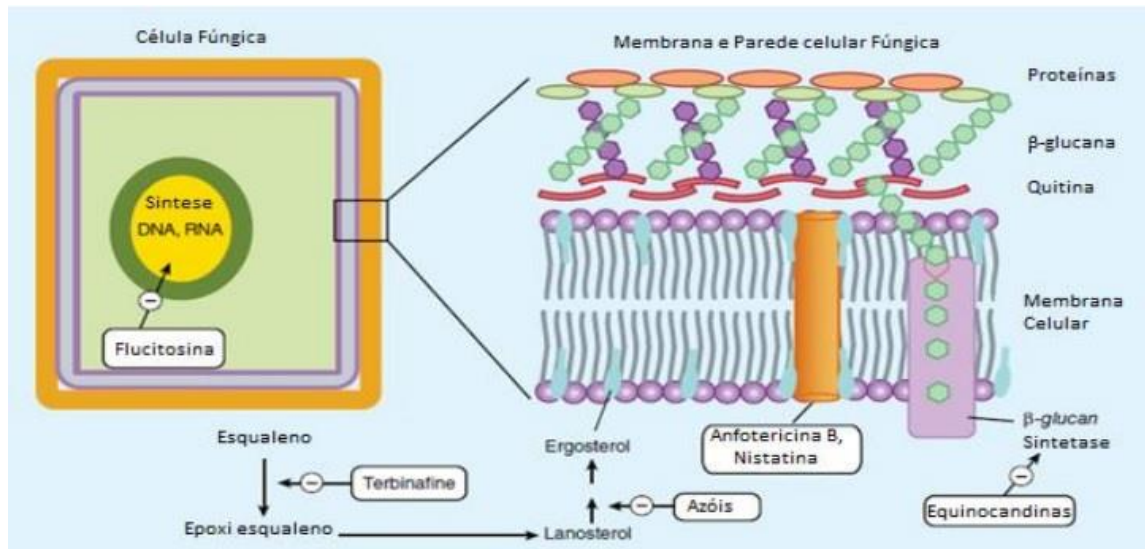
As principais abordagens terapêuticas para infecções fúngicas invasivas causadas por *C. auris* baseiam-se na utilização de fármacos integrantes de três classes de compostos com ação antifúngica, os polienos, azóis e as equinocandinas (WHALEY et al., 2017; KEAN, 2019).

A classe dos polienos é composta por antifúngicos com espectro de ação tais como os fármacos anfotericina B (AmB) e nistatina. Estas moléculas possuem características anfipáticas, e aderem-se ao ergosterol presente na membrana da célula fúngica, resultando na formação de complexos fármaco-lipídeo que se intercalam na membrana celular do fungo e possibilitam a formação de poros na membrana, culminando no vazamento de íons intracelulares e na destruição do gradiente de prótons, acarretando em lise celular osmótica. O uso limitado desta classe se deve a toxicidade renal do fármaco (LOCKHART, 2018).

Os fármacos derivados dos azóis consistem na classe de antifúngicos mais utilizada na terapia de infecções fúngicas, dos quais destacam-se o fluconazol, voriconazol e posaconazol. O mecanismo de ação se baseia na inibição da enzima lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase, envolvida na biossíntese do ergosterol, além de provocar o acúmulo de um intermediário de esterol tóxico, resultando no comprometimento da integridade das membranas celulares dos fungos (PRISTOV, 2019).

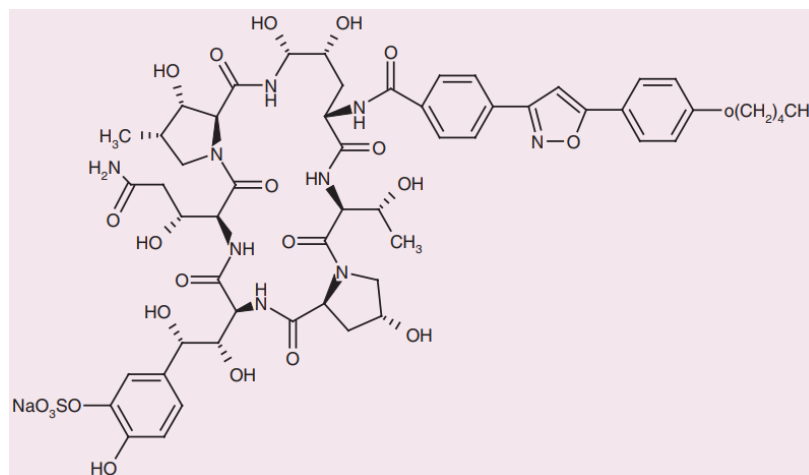
A classe das equinocandinas incluem fármacos como a caspofungina, micafungina e anidulafungina. As equinocandinas exercem seu efeito inibindo a enzima 1,3- $\beta$ -glicano sintase e comprometendo a síntese de glicanas e, consequentemente, a integridade da parede celular, culminando em lise celular. São particularmente fungicidas frente a infecções causadas por espécies de *Candida* spp. (ZHENG, 2018).

**Figura 1** – Mecanismo de ação dos agentes antifúngicos conforme seu alvo de atuação



**Fonte:** KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2012.

A micafungina é um composto semissintético solúvel que é sintetizado por modificação química de um produto de fermentação de *Coleophoma empetri*. É um antifúngico de primeira opção para o tratamento de candidemia e candidíase invasiva em pacientes adultos e pediátricos, incluindo neonatos, além de ser utilizada como profilaxia de infecções por *Candida* spp. em pacientes imunocomprometidos. Dentre as equinocandinas, apresenta menor solubilidade em água. Os efeitos adversos mais comuns associados à micafungina são diarreia, náuseas, vômitos, pirexia, trombocitopenia e dor de cabeça. (WASMANN, 2018).

**Figura 2** – Estrutura química da micafungina

**Fonte:** HIGASHIYAMA; KOHNO, 2004.

Embora existam alternativas terapêuticas aplicadas ao controle de tratamento de infecções por *Candida* spp., a resistência intrínseca relaciona-se a uma característica inata do patógeno em impossibilitar a ação do fármaco, o que pode se dar de diversas formas, seja pela inativação da molécula, pelo influxo diminuído ou efluxo aumentado, ou pela baixa afinidade do alvo terapêutico pelo fármaco. A resistência adquirida, em contrapartida, é resultado de respostas adaptativas do microrganismo frente ao tratamento, o que pode se dar por meio de mutações, aumento da expressão do alvo molecular, ativação de vias compensatórias ou aquisição de genes exógenos (PERLIN, 2017).

A infecção por cepas resistentes, tais como a *C. auris* reduz a possibilidade de um tratamento eficaz e eleva não apenas a morbidade e mortalidade de infecções comuns, mas também os gastos de saúde associados, que podem chegar a cifras de bilhões por ano. E, embora a resistência continue a surgir, a taxa de desenvolvimento de novos fármacos diminuiu drasticamente nas últimas três décadas, com nenhuma nova classe terapêutica descoberta desde a década de 1980 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014; SPIVAK, 2018).

Dado o risco de transmissão nosocomial desse patógeno multirresistente, medidas de controle de infecção são de extrema importância para desacelerar a disseminação de *C. auris*.

(SEARS; SCHUARTZ, 2017). Uma alta porcentagem de cepas clínicas de *C. auris* demonstram resistência ao fluconazol e apresentam resistência variável a outros antifúngicos pertencentes às três principais classes de antifúngicos disponíveis clinicamente (azóis, polienos, equinocandinas), limitando assim as opções de tratamento (BIDAUD et al., 2018; PRISTOV, 2019; KEAN 2019).

A preocupação com a resistência aos agentes antifúngicos azólicos e anfotericina B levou à recomendação para o uso de equinocandinas como tratamento empírico. A micafungina demonstrou a maior eficácia em comparação com fluconazol e anfotericina B em um modelo de candidemia por *C. auris* induzida em camundongos (JEFFERY-SMITH et al, 2018). Corroborando com estas evidências, um modelo de camundongo tratado com terapia antifúngica em nove cepas de *C. auris* sugeriu que a micafungina possui potencial fungicida (LEPAK et al., 2017-). Contudo, com o uso difundido de equinocandinas, há relatos de isolados de *C. auris* com sensibilidade reduzida a esta classe também (SHARMA et. al, 2016).

Ademais, resultados mostraram que as cepas testadas de *C. auris* têm a capacidade de formar biofilmes, importante fator de virulência. No entanto, esses biofilmes são significativamente mais finos do que os biofilmes formados por *C. albicans*. Essa característica pode ser decorrente da presença majoritária de células de levedura aderidas ao material do cateter no biofilme formado por *C. auris*, em contraste à estrutura heterogênea de biofilmes de *C. albicans*, que apresentam células de levedura e a presença de hifas embutidas na matriz extracelular (LARKIN et. al, 2017).

## **2.5 Nanotecnologia**

Em virtude das dificuldades na terapia de infecções por *C. auris*, o uso de ferramentas que visem aprimorar o desempenho de fármacos disponíveis na prática clínica são de extrema importância para o incremento do arsenal terapêutico frente à essa espécie.

Uma estratégia amplamente utilizada e cada vez mais recorrida como abordagem terapêutica é a utilização de sistemas de liberação de fármacos baseados em nanotecnologia, em particular como forma de evitar a incursão de microrganismos multirresistentes e de modo a prevenir e erradicar biofilmes. Considerando que a candidíase invasiva está associada à presença de biofilmes em nichos corporais e superfícies abióticas de dispositivos médicos, (PAPPAS et al., 2018), a aplicabilidade desses sistemas torna-se de grande interesse.

Sistemas lipídicos nanotecnológicos de liberação de fármacos, tais como os lipossomas, microemulsões, nanoemulsões entre outros, em geral, são utilizados como nanocarreadores para fármacos e biomoléculas. (BELOQUI, 2015).

Dentre esses, destacam-se as nanoemulsões, as quais são classificadas como sistemas formados pela dispersão de dois líquidos imiscíveis por meio da aplicação de força, e estabilizados pela presença de um tensoativo, o qual possui a função reduzir a tensão superficial da fase dispersa, originando gotículas de tamanhos variáveis - entre 1 e 100 nm. Essas podem ser dispersões coloidais do tipo óleo em água (O/W) bem como água em óleo (W/O), a depender da fase em que as gotículas estão dispersas. As nanoemulsões possuem notoriedade por múltiplos fatores, tais como facilidade na preparação, estabilidade termodinâmica, baixa toxicidade, biocompatibilidade, capacidade de carrear diversos princípios ativos, redução da toxicidade de fármacos, menores doses de quimioterápicos necessárias, aumento da biodisponibilidade oral de fármacos fortemente lipofílicos, além de possibilitar diversas aplicações, incluindo administração intravenosa (SINGH, 2017; LIMA; RAMOS et al, 2020).

Estudos confirmaram melhor atividade anti-biofilme de fármacos encapsulados em lipídios e polímeros (FORIER, 2014).

Os mecanismos que justificam o aumento dessa atividade incluem a fusão das estruturas lipídicas com as células microbianas, proteção do fármaco contra a degradação enzimática, prevenção da inativação por meio de ligação aos componentes circundantes do biofilme,

aumento do transporte da nanoformulação para o biofilme e aumento do tempo de contato entre o microrganismo e o antimicrobiano (RAMOS et. al., 2018).

### 3. OBJETIVO

Este trabalho se propôs a avaliar o potencial de uma nanoemulsão para a incorporação de micafungina e verificar seu desempenho contra *C. auris* e *C. albicans*, com ênfase na inibição de biofilmes e tratamento sistêmico.

#### 3.1. Objetivos específicos

- ✓ Desenvolver e caracterizar uma nova nanoemulsão para administração do antifúngico micafungina e promover a incorporação de micafungina à nanoemulsão desenvolvida;
- ✓ Avaliar o perfil inibitório in vitro de micafungina livre e incorporada sobre cepa de *C. auris* e *C. albicans* e sobre a formação de biofilmes de *C. auris* e *C. albicans*;
- ✓ Determinar a cinética fungicida de micafungina livre e incorporada sobre células planctônicas de *C. auris* e *C. albicans*;
- ✓ Avaliar o possível mecanismo de ação de micafungina livre e incorporada em relação à síntese da parede celular (interação sorbitol) e com a permeabilidade de íons à membrana (interação ergosterol).
- ✓ Avaliar o perfil de toxicidade de micafungina livre e incorporada em modelo de alternativo de toxicidade aguda em *G. mellonella* e em linhagem celular L929;
- ✓ Avaliar a eficácia terapêutica in vivo de micafungina livre e incorporada em modelo experimental alternativo de infecção sistêmica causada por *C. auris* e *C. albicans* em modelo de *G. mellonella*.

### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1. Desenvolvimento da nanoemulsão

Para o desenvolvimento da nanoemulsão, utilizou-se a metodologia baseada no trabalho de Ramos et al. (2019) com adaptações. De início, foram desenvolvidas 36 formulações contendo como fase oleosa o ácido oleico, uma mistura de polioxietileno 20 cetil éter (Brij® 58) e fosfatidilcolina de soja na proporção 2:1 como sistema tensoativo e tampão fosfato (PBS) pH 7,4 como fase aquosa. Após a mistura dos componentes, as diferentes regiões foram sonicadas usando sonicador de haste (Q500 da QSonica®), potência de 500 watts, amplitude de 20%, modo descontínuo, por 10 minutos com intervalo de 30 segundos a cada 59 segundos de sonicação, com banho de gelo durante todo o processo de sonicação. Consequentemente, 36 formulações com diferentes aspectos de acordo com a variação das fases foram obtidas. Assim, as regiões dos sistemas foram classificadas visualmente como sistemas viscosos ou líquidos opticamente translúcidos ou opacos, ou ainda separação de fases. Desse modo, foi possível delimitar as diferentes regiões no diagrama de fases, para então, selecionar a região do sistema para a incorporação de micafungina.

#### **4.1.1. Ensaios de caracterização**

##### **4.1.1.1. Tamanho de gotícula, PDI e potencial zeta**

O diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersidade (IPD) das gotículas contendo micafungina incorporadas ou não em nanoemulsão foram analisados utilizando método de espalhamento de luz dinâmica (DLS - *Dynamic Light Scattering*) usando o equipamento Zetasizer Nano NS (Malvern Instruments, Malvern, UK). No mesmo equipamento, foi obtido o potencial zeta (PZ) por meio de mobilidade eletroforética.

Foi calculado o raio hidrodinâmico das partículas coloidais da equação de Stokes-Einstein:  $D = \frac{KT}{6\pi\eta R_h}$ , sendo que: D: coeficiente de difusão das partículas; K: constante de Boltzmann ( $1,3807 \times 10^{-23}$  NmK<sup>-1</sup>); T: temperatura absoluta (293,15 K);  $\pi$ : 3,141592;  $\eta$ : viscosidade ( $1,002 \times 10^{-3}$  NM<sup>-2</sup>s);  $R_h$ : raio hidrodinâmico.

As formulações foram analisadas na célula eletroforética de modo que o feixe de laser atravessasse a dispersão em toda a sua extensão. A temperatura do sistema foi mantida a 25°C, o comprimento de onda do laser foi de 532 nm e o índice de refração de acordo com o índice observado para cada amostra analisada.

Foram realizadas 3 determinações do diâmetro hidrodinâmico médio e do IPD das gotículas. O PZ foi realizado por determinação da mobilidade eletroforética. Antes da medição, todas as amostras foram previamente diluídas (100 µL da amostra em 900 µL de água destilada) para produzir uma intensidade de dispersão adequada. Por fim, para cada amostra, 3 determinações do potencial de superfície foram realizadas, calculando a média e o desvio padrão. As análises foram realizadas com o uso do equipamento Zetasizer 3000HSa (DA SILVA et al., 2015).

#### **4.1.1.2. Ensaios reológicos**

##### **4.1.1.2. 1. Análise reológica contínua**

Foram obtidos reogramas das formulações escolhidas empregando reômetro AR2000ex (TA Instruments) no modo *fluency (flow)*, e de acordo com a consciência de cada formulação, utilizou a geometria cone/placa, a temperatura de 37 °C. Cuidadosamente, foi colocado uma pequena amostra do sistema em análise sobre a base inferior do reômetro, aguardando três minutos em repouso, para ambientalização da amostra com a temperatura do equipamento. A taxa de cisalhamento para a curva ascendente foi de 0 a 100 1/s.

Após a obtenção dos reogramas, foram calculados os valores de  $n$  para verificar o comportamento de fluxo e o valor de  $k$  para verificar a viscosidade do material conforme índice de escoamento.

##### **4.1.1.2.2. Análise reológica oscilatória**

Neste experimento foram empregadas as mesmas condições de geometria de placa, temperatura e equipamento utilizados nos ensaios de reologia contínua. No entanto, para a realização do teste de varredura de tensão, colocou-se o reômetro no modo *amplitude sweep*, podendo assim determinar a região viscoelástica. Utilizou uma faixa de tensão de cisalhamento de 0 a 50 Pa e frequência de 1rad/s. Posteriormente, com a determinação da tensão de 1 Pa da região viscoelástica, adicionou-se o reômetro no modo *frequency sweep* para a realização do teste de varredura de frequência, para a determinação do módulo elástico ( $G'$ ) e módulo viscoso ( $G''$ ). Nesse teste foi utilizado a faixa de frequência de 0 a 10Hz, à tensão de 1 Pa.

## **4.2. Ensaios biológicos**

### **4.2.1. Determinação do potencial inibitório *in vitro***

O potencial anti-*C. auris in vitro* foi avaliado através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de diluição em microplacas, de acordo com as considerações do protocolo M27-A3 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017) com modificações. Inicialmente, 100  $\mu$ L da solução de micafungina livre e incorporada na nanoemulsão foi diluída seriadamente (16 a 0,003  $\mu$ g/mL) em placas de 96 poços contendo meio RPMI 1640 (100  $\mu$ L).

Uma suspensão (100  $\mu$ L) padronizada contendo  $1 \times 10^6$  células/mL obtida do crescimento em Caldo Sabouraud Dextrose - CSD (24 h, 37 ° C) de *C. auris* CDC B11903 e *C. albicans* ATTC 18804 foram adicionadas às microplacas contendo as amostras previamente diluídas. As microplacas foram incubadas por 48 h à 37 ° C, após este período a CIM foi determinada por análises visuais, espectrofotometria a 595 nm (para confecção da curva de inibição microbiana) e por meio do ensaio de redução do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) (RAMOS et al., 2016)

Os controles de crescimento fúngico, esterilidade das amostras, meio de cultura, solventes e nanoemulsão sem a presença dos fármacos foram empregados.

#### **4.2.1.1. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)**

Posteriormente ao período de incubação (item 4.2.1), alíquotas representativas de cada um dos poços foram repicadas em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e incubadas por 48 h à 37 ° C. Ao final deste período a CFM foi considerada como a menor concentração capaz de matar o microrganismo (ausência de crescimento no ASD).

#### **4.2.2. Determinação da cinética fungicida**

A partir dos valores de CFM atribuídos à micafungina livre e incorporada, foi determinada a cinética de ação fungicida sobre células de *C. auris* e *C. albicans*. Em um tubo contendo  $1 \times 10^6$  cél/mL foram adicionados os compostos na concentração da CFM. Alíquotas representativas foram coletadas e diluídas adequadamente para serem cultivadas em ASD nos tempos de 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 e 48 horas e posterior incubação nas mesmas condições. Ao final, o número de UFC/mL foi quantificado para a confecção da curva de morte microbiana (RAMOS et al., 2016).

#### **4.2.3 Interação ergosterol – sorbitol**

Microplacas foram preparadas da mesma maneira que descrita no item 4.2.1., de acordo com o protocolo M27-A3 (CLSI, 2017). As amostras de micafungina livre e incorporada foram adicionadas aos poços das microplacas em concentrações de 100 µg/mL a 0,024 µg/mL. Foram adicionados 100 µL da suspensão de *C. auris* e *C. albicans* ( $10^3$  células/mL) preparadas em meio RPMI 1640 suplementado com 0,8 M de sorbitol. As microplacas foram incubadas à 37° C e leituras foram realizadas após o período de 48 horas e 7 dias (DE CASTRO et al., 2015). O mesmo procedimento foi realizado no teste com ergosterol; entretanto, a suspensão de *C. auris* e *C. albicans* foram suplementadas com concentrações de exógenos de ergosterol de 200 µg/mL para posterior incubação à 37° C por 48 horas (FREIRES et al., 2014).

#### **4.2.4. Ensaio de inibição de biofilmes**

#### 4.2.4.1. Ensaio de inibição da formação de biofilmes

Os biofilmes de *Candida* foram formados sobre as superfícies de poços de microplacas de 96 orifícios, de acordo com as considerações feitas por Toledo et al. (2016) com algumas modificações. *C. auris* CDC B11903 foi cultivada por 48 horas em CSD a 37 ° C e padronizada na concentração de  $1,0 \times 10^7$  cél/mL. Foram adicionados 200 µL desta suspensão aos poços de microplacas e submetidas à rotação (80 rpm) à 37 °C por 4 horas para estabelecer adesão inicial do biofilme. Ao final deste período os poços foram cuidadosamente lavados com solução salina (0.9%) estéril e diferentes concentrações de micafungina livre e incorporada adequadamente preparadas em meio de cultura RPMI 1640 e depositadas à camada de células aderidas à superfície dos poços. As microplacas contendo as camadas de células fúngicas aderidas e os compostos avaliados foram incubados por 24 horas. Ao final do período de incubação, o sobrenadante foi completamente removido e as superfícies foram cuidadosamente lavadas com solução salina (0.9%) estéril para a determinação da viabilidade celular dos mesmos pelo ensaio de redução do 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5- [carbonilo (fenilamino)]-2H-tetrazólio-hidróxido (XTT®). Após o período de revelação com o XTT foram realizadas leituras espectrofotométricas a 490 nm, nas quais foram considerados como a concentração inibitória, aquela que for capaz de reduzir 50% da opacidade em comparação com o controle de crescimento.

#### 4.2.4.2. Inibição de biofilmes maduros

Para a formação dos biofilmes maduros foram empregados os mesmos procedimentos descritos no item 4.2.3.1. Entretanto, após o período de adesão inicial, 200 µL de meio de cultura foram adicionados aos poços contendo as células aderidas para proceder-se a incubação por 24 horas. Após este período, o meio de cultura foi removido e substituído por um novo meio fresco para que seja procedido mais 24 horas de incubação (período de formação total = 48

horas). Às superfícies contendo os biofilmes maduros formados (48 horas) foram depositados 100 µL do meio de cultura e em seguida 100 µL das amostras nas concentrações avaliadas (concentração inicial de 10 vezes o valor da CIM e oito diluições a partir desta). As microplacas foram incubadas por 24 horas nas mesmas condições. Foi realizado também o controle positivo e negativo de crescimento, esterilidade do meio de cultura, esterilidade das amostras, controles negativos com os solventes e nanoemulsão sem a presença de micafungina. Após o período de contato das amostras com os biofilmes maduros, as mesmas foram removidas e o biofilme foi lavado com solução salina 0,9%. A viabilidade dos biofilmes foi obtida por meio da atividade metabólica pelo ensaio de redução do XTT, bem como com a re-suspensão dos biofilmes em solução salina para posterior cultivo em ASD. Com este procedimento foi possível quantificar o número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) resultantes após o tratamento. A caracterização da atividade anti-biofilme foi elucidada por meio da comparação entre os tratamentos e o controle positivo de crescimento (não tratados).

#### **4.3. Determinação do potencial citotóxico**

A linhagem L929 de fibroblastos murinos foi utilizada na determinação da citotoxicidade (IC<sub>50</sub>). As células foram mantidas em garrafas de cultura com 5% de CO<sub>2</sub>, contendo 10 mL de cultura DMEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino, sulfato de gentamicina (50 mg/L) e anfotericina B (2 mg/L), a 37 °C. As células foram suspensas utilizando uma solução de tripsina/EDTA, centrifugadas (2000 rpm por 5 min) e contadas em câmara de Neubauer ajustando para  $3,4 \times 10^5$  células/mL em meio DMEM. Desta suspensão, foram depositados 200 µL em cada orifício de uma microplaca de 96 orifícios obtendo uma concentração celular de  $6,8 \times 10^4$  células/poço e incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas para aderência celular a microplaca. A seguir foram preparadas diluições seriadas de micafungina livre e incorporada, de maneira a se obter concentrações de 16 a 0,003 µg/mL.

Foram adicionadas aos poços das microplacas após a retirada de todo o meio e das células que não aderiram, sendo novamente incubadas por 24 horas. A citotoxicidade dos compostos foi determinada pela adição de 30 µL do revelador resazurina (0,01%) e leitura após 6 horas de incubação. A leitura foi realizada no leitor de microplacas, utilizando-se filtros de excitação e emissão nos comprimentos de ondas de 530 e 590 nm respectivamente. A citotoxicidade (IC<sub>50</sub>) foi definida como a maior concentração do composto capaz de permitir a viabilidade de pelo menos 50% das células (FUKUSHIMA; WEIMER; KUNZ, 2003).

#### **4.4. Determinação do potencial tóxico agudo em modelo *in vivo* alternativo**

O ensaio de determinação da toxicidade aguda foi realizado empregando larvas da espécie *Galleria mellonella* de acordo com as considerações de Ignasiak e Maxuell com modificações (IGNASIAK; MAXWELL, 2017). O experimento contou por grupos experimentais compostos por 10 larvas (n=10). As amostras de micafungina livre e incorporada foram avaliadas inicialmente nas concentrações de 5, 10, 25, 50 100, 200 mg/kg. Adicionalmente, se a dose tóxica fosse superior a 200, o experimento seria continuado até que a concentração letal fosse estabelecida (dose máxima= 2000 mg/kg). Cada etapa do procedimento incluiu três grupos de controle: controle não tratado, controle traumatizado (a cutícula foi perfurada com uma agulha) e controle injetado.

#### **4.5. Ensaios terapêuticos de infecção por *C. auris* e *C. albicans* em modelos alternativos *in vivo* de *G. mellonella***

##### **4.5.1. Desenvolvimento da infecção sistêmica**

O ensaio foi desenvolvido empregando larvas da espécie *G. mellonella* com peso entre 0,2 a 0,4 mg para compor grupos experimentais compostos por 10 larvas em cada grupo (n=10). As larvas foram alojadas em compartimentos estéreis e cultivadas com ração adequada em temperatura de 27 °C em estufa de B.O.D. (*Biochemical Oxygen Demand*). Para a infecção, um inóculo de *C. auris* foi padronizado em solução salina estéril (0,85%) empregando a escala 1

de McFarland ( $5 \times 10^4$  células/larva). O total de 10  $\mu$ L do inóculo leveduriforme foi injetado na ultima proleg esquerda de cada larva usando uma seringa Hamilton Microliter <sup>TM</sup> para posterior incubação (ARIAS et al., 2020).

#### 4.5.2. Ensaio de sobrevivência à terapêutica de infecção por *C. auris* e *C. albicans* em modelo alternativo de *G. mellonella*.

O ensaio de sobrevivência foi desenvolvido a fim de verificar se os tratamentos empregados não iriam ocasionar o óbito ou malefícios às larvas. Para isso, os grupos experimentais foram infectados conforme descrito acima e os tratamentos foram iniciados após 2 horas da administração do inóculo de *C. auris*.

A Tabela 1 apresenta as especificações dos grupos experimentais envolvidos nos experimentos de sobrevivência e quantificação da atividade terapêutica.

**Tabela 1.** Grupos experimentais dos experimentos de sobrevivência e terapia de infecção sistêmica em modelo alternativo *in vivo* de infecção por *C. auris* e *C. albicans* em *G. mellonella*

| Grupos experimentais* | Especificação                                | Número de larvas | Tratamento                                                                                                                          |
|-----------------------|----------------------------------------------|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Grupo 1</b>        | Positivo de infecção                         | 10               | 10 $\mu$ L de solução salina estéril                                                                                                |
| <b>Grupo 2</b>        | Negativo de infecção (larvas não infectadas) | 10               | 10 $\mu$ L de solução salina estéril                                                                                                |
| <b>Grupo 3</b>        | Tratamento com solução de micafungina        | 10               | 10 $\mu$ L de solução de micafungina a 1,65 mg/mL para <i>C. auris</i> e 0,05 mg/mL para <i>C. albicans</i> (5*MIC)                 |
| <b>Grupo 4</b>        | Tratamento com micafungina incorporada       | 10               | 10 $\mu$ L de micafungina incorporada na nanoemulsão a 1,65 mg/mL para <i>C. auris</i> e 0,05 mg/kg para <i>C. albicans</i> (5*MIC) |
| <b>Grupo 5</b>        | Controle da nanoemulsão                      | 10               | 10 $\mu$ L da nanoemulsão livre (sem a presença de fármaco)                                                                         |
| <b>Grupo 6</b>        | Controle do furo                             | 10               | Furadas diárias da mesma forma realizada nos tratamentos.                                                                           |
| <b>Grupo 7</b>        | Controle de morte                            | 10               | 10 $\mu$ L de etanol absoluto                                                                                                       |

\*Grupos experimentais iguais nos experimentos de sobrevivência e terapia.

Após serem infectadas, as larvas dos respectivos grupos experimentais receberam os tratamentos específicos diariamente (dose única) durante cinco dias, através da administração de 10  $\mu$ L dos mesmos na ultima proleg esquerda de cada larva usando uma seringa Hamilton

Microliter™. Durante o período do processo experimental (5 dias) foram monitorados a morte e o comportamento (aspectos físicos, como cor,  $\gamma$  Surfactante ou perda total de mobilidade) das larvas frente ao tratamento (ARIAS et al., 2020; BHATTACHARYA et al., 2019). A morte foi considerada quando não houve evidências de reação à estimulação física após as administrações das amostras livres e incorporadas, assim como os lipossomas o controle solvente (infecção + solvente), controle de furo (apenas furo sem infecção), controle positivo de infecção salina (infecção + salina), controle negativo de infecção (sem infecção) e controle positivo de morte (infecção + etanol absoluto).

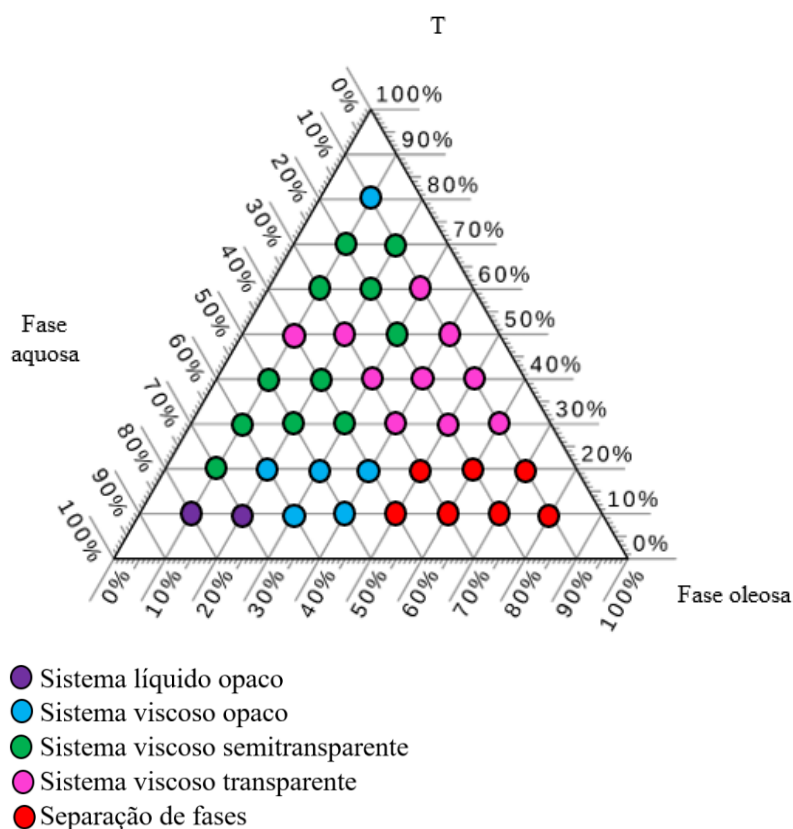
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Diagrama de fases ternário

Uma vez realizado o desenvolvimento de cada uma das 36 formulações e suas respectivas classificações visuais, foi obtido um diagrama de fases ternário, no qual foram utilizadas diferentes concentrações da fase aquosa (PBS - Phosphate Buffered Saline, pH 7,4), fase oleosa (ácido oleico) e dos surfactantes polyoxyethylene (20) cetyl ether (Brij 58®) e fosfatidilcolina de soja (2:1).

Os sistemas foram classificados como: Sistema Líquido Opaco (SLO), Sistema Viscoso Opaco (SVO), Sistema Viscoso Transparente (SVT), Sistema Viscoso Semitransparente (SVST) e Separação de Fases (SF). Dentre as 36 formulações desenvolvidas, 30,6% são sistemas viscosos semitransparentes, 27,8% são sistemas viscosos transparentes, 19,4% apresentaram separação de fases, 16,7% foram classificados como sistema viscoso opaco e 5,6% são sistemas líquidos opacos.

**Figura 3** - Diagrama de fases ternário



**Fonte:** elaborado pela autora.

### 5.1.1 Escolha das formulações para as análises farmacotécnicas

A partir da análise possibilitada pelo diagrama de fases, duas formulações foram selecionadas para a realização das análises de caracterização estrutural e posteriormente as análises biológicas, considerando a sua posterior administração sistêmica. As composições das formulações eleitas estão representadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Composição e características das formulações selecionadas

| Formulação | Surfactante | Fase oleosa | Fase aquosa | Classificação |
|------------|-------------|-------------|-------------|---------------|
| F1         | 10%         | 10%         | 80%         | SLO*          |
| F2         | 10%         | 20%         | 70%         | SLO*          |

\*Sistema líquido opaco

**Fonte:** elaborado pela autora.

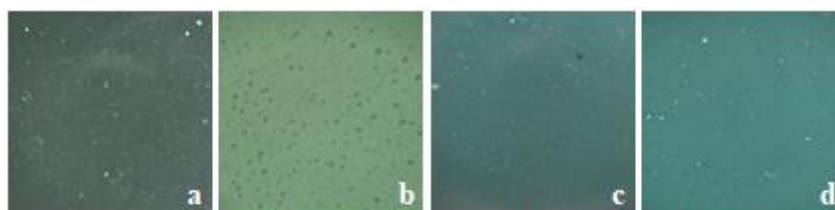
## 5.2 Ensaios farmacotécnicos e caracterização das formulações selecionadas

As análises farmacotécnicas foram primeiramente realizadas com as formulações escolhidas sem o fármaco micafungina incorporado.

### 5.2.1 Microscopia de luz polarizada

As fotomicrografias das formulações F1 e F2 estão demonstradas na Figura 2.

**Figura 4** - Fotomicrografias das formulações analisadas.



As imagens a e b correspondem à formulação F1 nos aumentos de 10 vezes e 50 vezes, respectivamente. As imagens c e d pertencem à formulação F2, nos aumentos de 10 vezes e 50 vezes, respectivamente.

**Fonte:** elaborado pela autora.

A partir da análise das imagens obtidas por meio da microscopia de luz polarizada foi possível observar campos escuros para ambas as formulações, o que indica que não foram aptas a desviar o plano de luz incidido e, conseqüentemente, aponta a ausência de estruturas cristalinas, como observado nas figuras. Tais resultados suportam os dados obtidos com a classificação visual, demonstrando que são sistemas líquidos opacos.

### 5.2.2 Tamanho hidrodinâmico médio, Índice de polidispersidade (PDI) e Potencial Zeta (PZ)

Os valores das médias e desvio-padrão dos tamanhos de partícula, o índice de polidispersidade e potencial zeta para as formulações F1 e F2 são apresentados na Tabela 3. A análise foi realizada 72 horas após o preparo das formulações.

**Tabela 3.** Valores das médias e desvio-padrão do tamanho hidrodinâmico médio, PDI e PZ

| <b>Formulações</b> | <b>Tamanho das partículas (nm)</b> | <b>IPD</b>    | <b>PZ</b>     |
|--------------------|------------------------------------|---------------|---------------|
| <b>F1</b>          | 177,6 ± 9,958                      | 0,286 ± 0,021 | -13,6 ± 1,067 |
| <b>F2</b>          | 415,1 ± 10,780                     | 0,468 ± 0,030 | -2,7 ± 0,141  |

Nm = nanômetro; PDI = Índice de polidispersão; PZ = potencial zeta.

**Fonte:** elaborado pela autora.

Considerando os resultados obtidos, os ensaios biológicos, ensaios complementares de caracterização e a incorporação foram realizados na formulação F1, uma vez que esta apresentou menor tamanho de partículas dentro do intervalo de 10-250 nm (100-2500 Å) (SINGH et al, 2017). O índice de polidispersidade aponta a homogeneidade entre os tamanhos das partículas, sendo o menor valor correspondente a maior uniformidade das partículas (GOYAL et. al, 2012). A formulação F1 apresentou menor IPD ( $0,286 \pm 0,021$ ) sendo a melhor candidata para os posteriores ensaios. O potencial zeta obtido foi negativo em ambas as formulações, fator esperado em decorrência dos grupamentos ésteres livres presentes na estrutura do lipídio dos fosfolipídios como a fosfatidilcolina (DA SILVA et al., 2016).

A escolha da formulação F1 para incorporação de micafungina deu-se em função dos parâmetros relatados, tais como o menor tamanho de partícula e menor índice de polidispersão, a fim de selecionar uma formulação com maior estabilidade. A partir da escolha e incorporação da formulação, nomeou-se NE para a formulação sem o fármaco (anteriormente F1), e NEMICA para a formulação contendo micafungina.

### 5.2.3 Dispersão de luz dinâmica e estabilidade

A Tabela 4 e o Gráfico 1 apresentam os dados obtidos referentes ao tamanho das partículas do sistema e o IPD das formulações com e sem micafungina. Foram realizadas as análises em diversos tempos: após o preparo das formulações e incorporação do fármaco (tempo 0), 30 dias (tempo 1), 60 dias (tempo 2) e 90 dias (tempo 3) após armazenamento em temperatura ambiente e sob refrigeração a fim de avaliar a estabilidade do sistema.

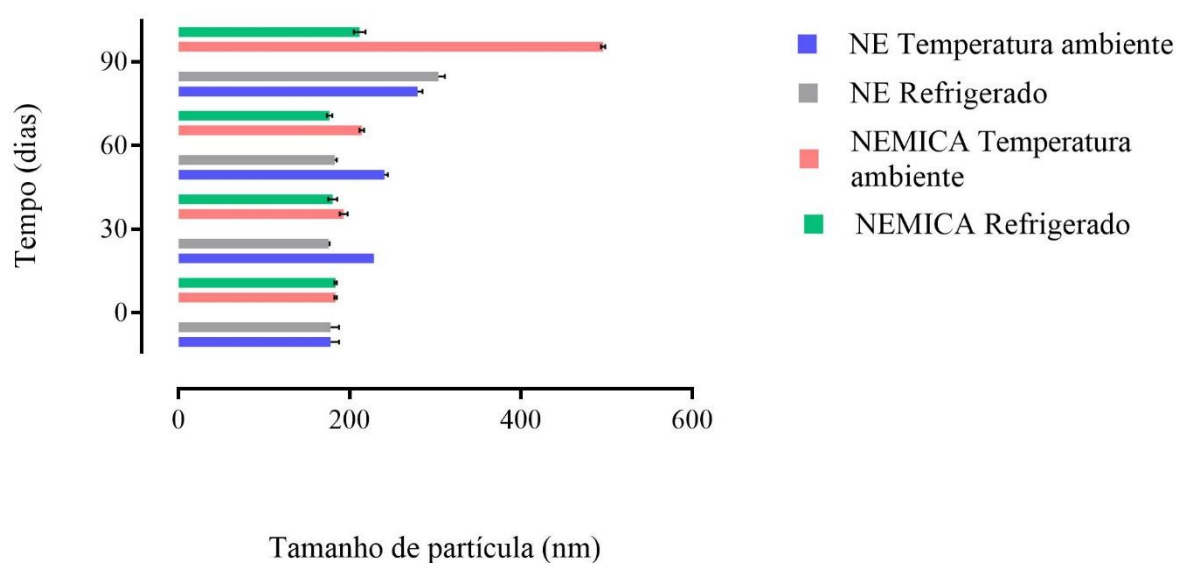
**Tabela 4.** Valores das médias e desvio-padrão dos diâmetros das gotículas e IPD nos tempos 0, 1, 2 e 3.

| <b>Tempo 0</b>       |                             |               |                             |               |
|----------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|---------------|
| Temperatura ambiente |                             |               | Refrigerado                 |               |
| <b>Formulações</b>   | Tamanho das partículas (nm) | IPD           | Tamanho das partículas (nm) | IPD           |
| <b>NE</b>            | 177,6 ± 9,958               | 0,286 ± 0,021 |                             |               |
| <b>NEMICA</b>        | 183,5 ± 1,401               | 0,231 ± 0,012 |                             |               |
| <b>Tempo 1</b>       |                             |               |                             |               |
| Temperatura ambiente |                             |               | Refrigerado                 |               |
| <b>Formulações</b>   | Tamanho das partículas (nm) | IPD           | Tamanho das partículas (nm) | IPD           |
| <b>NE</b>            | 228,1 ± 4,158               | 0,456 ± 0,018 | 175,4 ± 0,8963              | 0,288 ± 0,010 |
| <b>NEMICA</b>        | 192,8 ± 4,801               | 0,477 ± 0,007 | 180,1 ± 5,235               | 0,277 ± 0,045 |
| <b>Tempo 2</b>       |                             |               |                             |               |
| Temperatura ambiente |                             |               | Refrigerado                 |               |
| <b>Formulações</b>   | Tamanho das partículas (nm) | IPD           | Tamanho das partículas (nm) | IPD           |
| <b>NE</b>            | 240,8 ± 3,707               | 0,441 ± 0,002 | 182,4 ± 2,369               | 0,393 ± 0,014 |
| <b>NEMICA</b>        | 214,1 ± 2,747               | 0,466 ± 0,026 | 176,3 ± 3,219               | 0,399 ± 0,006 |
| <b>Tempo 3</b>       |                             |               |                             |               |
| Temperatura ambiente |                             |               | Refrigerado                 |               |
| <b>Formulações</b>   | Tamanho das partículas (nm) | IPD           | Tamanho das partículas (nm) | IPD           |
| <b>NE</b>            | 279,2 ± 5,903               | 0,602 ± 0,035 | 303,6 ± 7,351               | 0,511 ± 0,006 |
| <b>NEMICA</b>        | 495,9 ± 2,588               | 0,764 ± 0,027 | 211,4 ± 6,979               | 0,480 ± 0,013 |

NE: nanoemulsão; NEMICA: nanoemulsão contendo fármaco incorporado; nm: nanômetro

**Fonte:** elaborado pela autora.

**Gráfico 1.** Variação das médias e desvio-padrão dos diâmetros das gotículas em 0, 30, 60 e 90 dias (tempos 0, 1, 2 e 3, respectivamente).



**Fonte:** elaborado pela autora.

Comparando os dados obtidos a partir da incorporação da MICA em NE desenvolvida com os resultados obtidos apenas da formulação, observa-se um pequeno aumento no tamanho das gotículas (da média de 177,6 nm para 183,5 nm), o que pode sugerir que ocorreu a incorporação do fármaco no sistema lipídico.

Como observado no tempo 1, não ocorreram grandes alterações no tamanho das partículas nas duas formas de armazenamento das formulações, no entanto, o índice de polidispersão das amostras armazenadas em temperatura ambiente apresentou um aumento considerável, dado que aponta para uma menor uniformidade entre as partículas. Para as amostras que foram armazenadas sob refrigeração houve maior conformidade com os resultados obtidos no tempo 0, logo após o seu preparo, o que indica que a refrigeração auxiliou na preservação das características iniciais das formulações.

Os resultados observados após 60 dias do preparo das formulações para as amostras armazenadas em temperatura ambiente demonstram pouca variação das médias de tamanho de partícula e IPD em relação aos dados obtidos no tempo 1, porém, nota-se um aumento do tamanho de partícula e do índice de polidispersão. Em contrapartida, as formulações que foram

mantidas sob refrigeração no tempo 2 apresentaram resultados semelhantes aos de 30 dias, indicando que essas permaneceram estáveis.

Para 90 dias após o preparo das nanoemulsões, observa-se significativa discrepância em relação aos resultados anteriores. As amostras mantidas em temperatura ambiente apresentaram um tamanho de gotícula maior, bem como um alto índice de polidispersão, os quais indicam que durante o tempo de armazenamento ocorreram os processos de floculação e cremagem. Ademais, a nanoemulsão contendo micafungina encapsulada apresentou separação de fases, decorrente do processo de coalescência e instabilização (SINGH et al, 2017).

As amostras armazenadas sob refrigeração após 90 dias do preparo também demonstraram aumento no tamanho de partícula e índice de polidispersão.

A partir das informações apresentadas é possível inferir que a formulação se manteve estável por 30 dias quando acondicionada em temperatura ambiente, e 60 dias sob refrigeração.

### 5.2.3.1. Potencial Zeta

A Tabela 5 apresenta os valores em módulo da carga resultante das formulações sem o fármaco e com o mesmo incorporado, sendo realizadas as análises em seguida ao preparo da amostra, 30 dias (tempo 1), 60 dias (tempo 2) e 90 dias (tempo 3) após armazenamento em temperatura ambiente e sob refrigeração.

**Tabela 5.** Valores das médias e desvio-padrão do PZ nos tempos 0, 1, 2 e 3 em módulo.

| Formulações | Temperatura ambiente |               |              |               |
|-------------|----------------------|---------------|--------------|---------------|
|             | Tempo 0              | Tempo 1       | Tempo 2      | Tempo 3       |
| NE          | -15,6 ± 1,067        | -16,1 ± 0,751 | -15,7 ± 1,07 | -16,1 ± 0,404 |

|                    |               |               |               |                |
|--------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| <b>NEMICA</b>      | -17,0 ± 1,690 | -17,8 ± 0,757 | -17,4 ± 0,551 | -17,2 ± 0,603  |
| <b>Refrigerado</b> |               |               |               |                |
| <b>Formulações</b> | Tempo 0       | Tempo 1       | Tempo 2       | Tempo 3        |
| <b>NE</b>          | -             | -15,3 ± 0,603 | -16,6 ± 0,387 | -15,9 ± 0,603  |
| <b>NEMICA</b>      | -             | -15,7 ± 0,551 | -16,1 ± 0,747 | - 16,5 ± 0,643 |

**Fonte:** elaborado pela autora.

A partir dos resultados obtidos das formulações durante os períodos de análise, observa-se que não houve alteração expressiva.

### 5.3. Ensaios reológicos da nanoemulsão

#### 5.3.1 Análise reológica contínua

A análise reológica contínua permite acesso a informações referentes ao comportamento de fluxo que a formulação em análise apresenta quando submetida a uma determinada tensão. O fluxo de uma formulação é obtido por meio da correlação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento, originando curvas de fluxo representadas por diagramas. Tais curvas são oriundas do comportamento da formulação com o aumento gradativo da taxa de cisalhamento - a qual é representada pela curva ascendente, e a partir da diminuição da taxa de cisalhamento, sendo essa representada pela curva descendente do diagrama (SHEN et al., 2021).

A partir da curva ascendente é possível classificar o comportamento de fluxo das formulações em Newtoniano ou não-Newtoniano, para mais, o fluxo não-Newtoniano pode ser ainda subclassificado em pseudoplástico, dilatante ou plástico. Quanto a curva descendente, essa permite a classificação quanto à tixotropia ou reopexia de uma formulação em tixotrópica ou reopética (SCHRAMM, 2006).

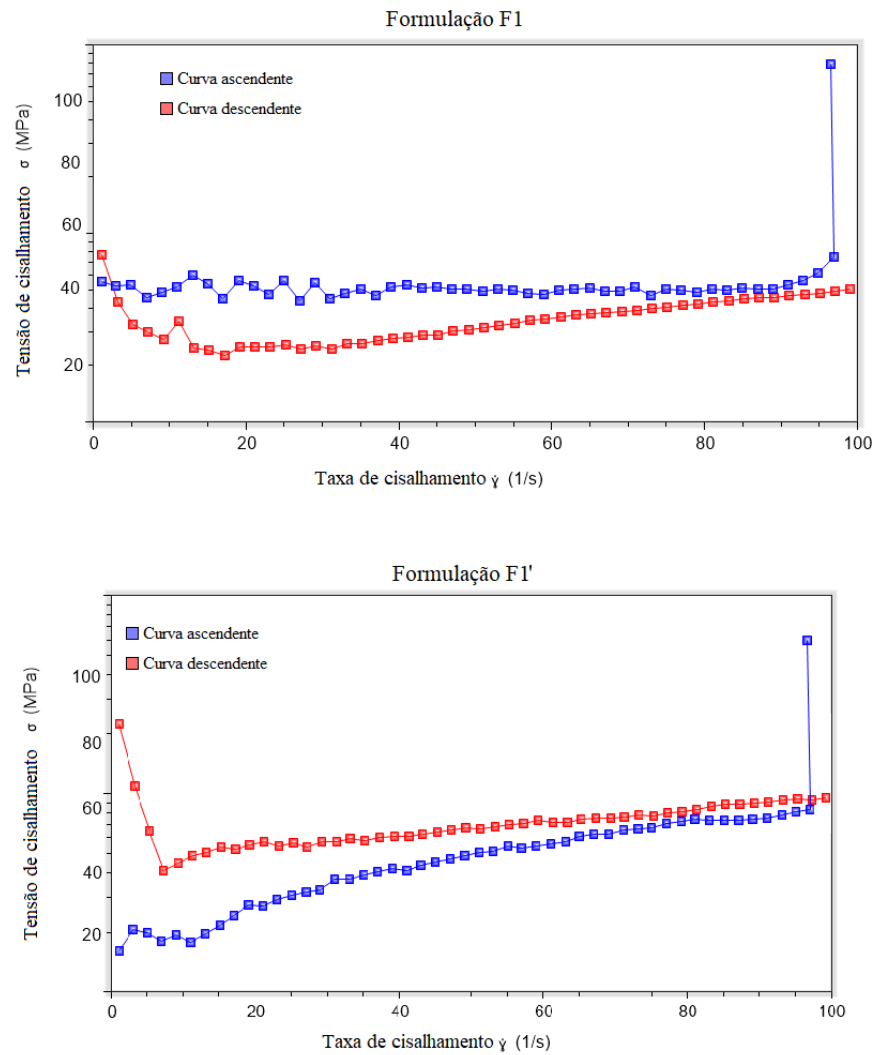
De acordo com as curvas obtidas e apresentadas na Figura 4, as nanoemulsões analisadas possuem comportamento de fluxo não-Newtoniano, uma vez que os valores correspondentes à tensão e à taxa de cisalhamento não apresentaram uma relação

constante. Ademais, é possível também inferir que as formulações são classificadas como pseudoplásticas, visto que se observa diminuição na viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento. Este aumento da taxa de cisalhamento é resultado da orientação de partículas rígidas na direção do fluxo originando o processo de afinamento por cisalhamento (SAVIC et al., 2011).

Outra característica observada é o comportamento tixotrópico das formulações, o qual é caracterizado pela diminuição da viscosidade durante a elevação da taxa de cisalhamento, e quando esta é reduzida, a viscosidade volta a aumentar, indicando a capacidade do sistema de se reestruturar (SCHRAMM, 2006).

Para a formulação NE sem a micafungina nota-se que a curva descendente volta por baixo da ascendente, indicando que a viscosidade do sistema aumenta mais lentamente do que diminui, classificando-se como tixotrópico tempo dependente. Em contrapartida, a formulação NEMICA contendo micafungina apresenta a curva descendente se sobrepondo à curva ascendente, indicativo de que o material se recupera prontamente, classificando-se como tixotrópico tempo independente. A discrepância retratada sugere que a incorporação da micafungina é benéfica em termos de estabilidade do sistema (SHEN et al., 2021).

**Figura 5.** Reogramas das formulações NE (formulação sem o princípio ativo) e NEMICA (nanoemulsão contendo micafungina).



**Fonte:** elaborado pela autora.

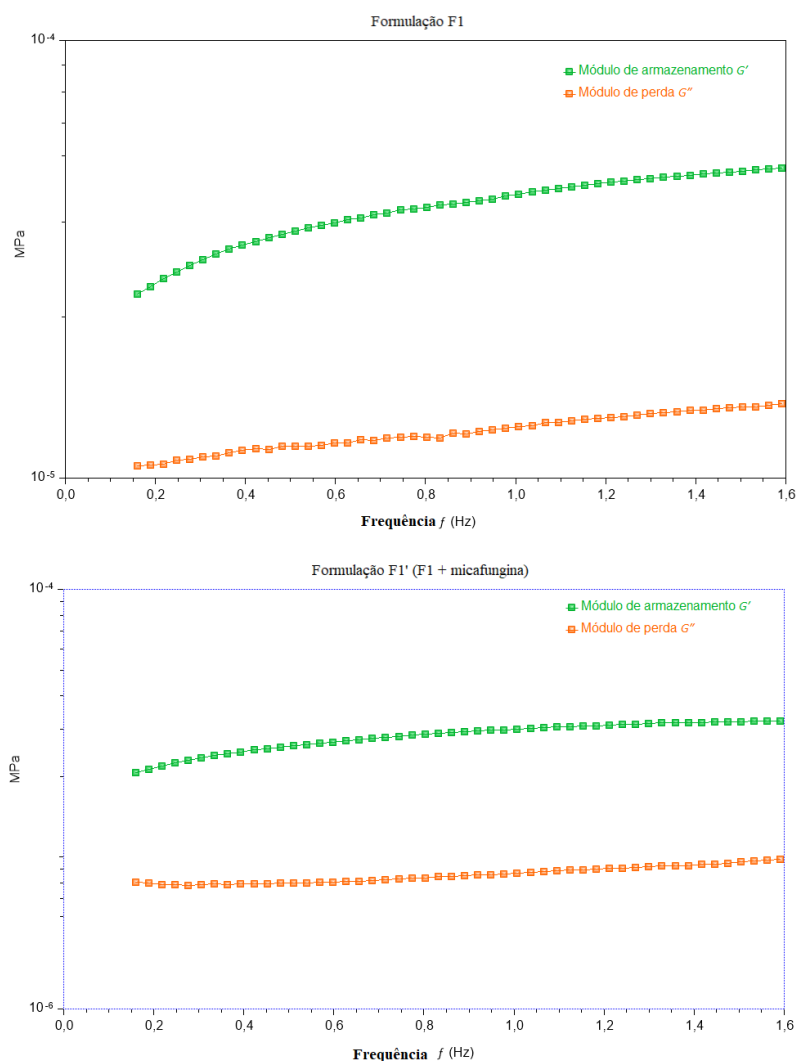
### 5.3.1 Análise reológica oscilatória

As análises reológicas oscilatórias determinam o comportamento viscoelástico das formulações através da aplicação da tensão de cisalhamento sinusoidal, a relação entre essa e a deformação obtida do material apreciado fornece informações referentes à natureza estrutural do mesmo (SHEN et al., 2021).

Preliminarmente, uma varredura de tensão na formulação é realizada para a determinação da região viscoelástica para o prosseguimento da análise e aplicação da tensão de cisalhamento na área de interesse. A partir disso, tem-se o módulo elástico ( $G'$ ) ou módulo de armazenamento - o qual representa a energia armazenada e liberada durante o aumento e diminuição da tensão aplicada, e o módulo viscoso ( $G''$ ) ou módulo de perda - este não é capaz de armazenar energia, sendo essa dissipada quando aplicada a tensão, resultando em deformação irreversível (SHEN et al., 2021).

A partir dos reogramas obtidos na Figura 5, observa-se que as formulações submetidas à análise oscilatória à temperatura de  $37 \pm 0,5$  °C demonstraram comportamento predominantemente elástico ( $G' > G''$ ) em todo intervalo de frequência analisado. Valores superiores de módulo de armazenamento sugerem que as amostras examinadas são majoritariamente elásticas e altamente estruturadas (CARVALHO et al., 2013).

**Figura 6.** Comportamento reológico em fluxo oscilatório das formulações NE e NEMICA.



**Fonte:** elaborado pela autora.

## 5.4. Ensaio biológicos

### 5.4.1. Potencial inibitório *in vitro* e Concentração Fungicida Mínima

A primeira etapa dos experimentos realizados deu-se com a elucidação do perfil inibitório do fármaco livre e incorporado em nanoemulsão sobre a cepa de *C. auris* e *C. albicans*.

Os valores de CIM obtidos estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) encontrados para a nanoemulsão com micafungina incorporada e para micafungina livre através da revelação com TTC (2%).

| Amostra/Cepa | <i>C. auris</i><br>CDC B11903 | <i>C. albicans</i><br>ATCC 18804 |
|--------------|-------------------------------|----------------------------------|
| NEMICA       | -                             | 0,0103                           |
| Micafungina  | 0,333                         | 0,0103                           |

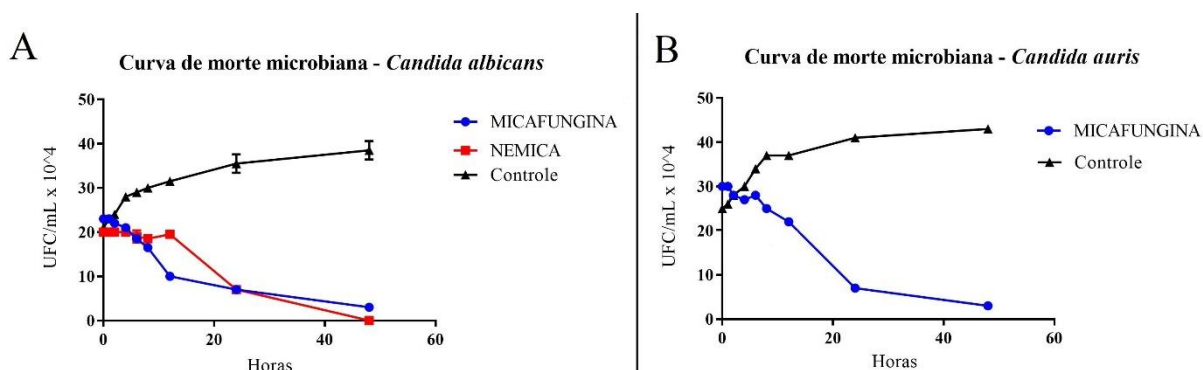
**Fonte:** elaborado pela autora.

Os resultados apresentados na tabela acima mostram que a nanoemulsão com micafungina incorporada não apresentou atividade antifúngica frente à cepa clínica de *C. auris*, porém, a solução com micafungina livre demonstrou atividade com uma CIM de 0,333  $\mu\text{g/mL}$ . Para a cepa padrão de *C. albicans* foi obtido a mesma CIM de 0,0103  $\mu\text{g/mL}$  tanto para nanoemulsão contendo micafungina quanto para a solução com este fármaco livre. As CFM encontradas coincidiram com a CIM das respectivas cepas.

#### 5.4.2. Cinética fungicida

A Figura 6 ilustra o efeito da concentração fungicida mínima (CFM) da micafungina e da nanoemulsão contendo micafungina (NEMICA) frente às cepas de *C. auris* e *C. albicans*, em todos os tempos de avaliação.

**Figura 7.** Curvas de morte microbiana obtidas para a atividade antifúngica de micafungina e NEMICA para *C. auris* (B) e *C. albicans* (A) nas concentrações CFM.



**Fonte:** elaborado pela autora.

Observa-se em A que a solução de micafungina livre apresenta efeito sobre a cinética de crescimento de *C. albicans* antes da nanoemulsão contendo micafungina, o que indica que esta demora mais tempo para liberar o princípio ativo, fato esperado considerando que este se encontra encapsulado.

Em B, para *C. auris*, podemos verificar que para a solução contendo micafungina é observado uma diminuição robusta no número de UFC/mL em comparação com o controle, essa é observada a partir de 12 horas e subsequentemente nas horas seguintes, culminando em um efeito fungicida nas últimas horas analisadas. Não foi possível obter a curva de morte microbiana para NEMICA de *C. auris* em função da ausência de uma concentração fungicida mínima (CFM).

#### **5.4.3. Interação ergosterol – sorbitol**

Duas estruturas fúngicas se apresentam como alvos fundamentais para a ação de fármacos antifúngicos: a parede celular e a membrana plasmática. Para sugerir um provável mecanismo pelo qual a nanoemulsão e a micafungina atuam, foram realizados os ensaios de interação com ergosterol e com sorbitol.

Para investigar a ação de micafungina e da nanoemulsão com micafungina na parede celular fúngica foram realizados ensaios com sorbitol, um protetor osmótico usado para estabilizar os protoplastos dos fungos. A determinação da CIM frente às cepas de *C. auris* e *C. albicans* na presença do sorbitol foram realizados pela técnica de microdiluição conforme descrito anteriormente. Os resultados são apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) encontrados para a nanoemulsão com micafungina incorporada e para micafungina livre através da revelação com TTC (2%) em meio RPMI suplementado com 0,8 M de sorbitol.

| <b>Amostra/Cepa</b> | <b><i>C. auris</i><br/>CDC B11903</b> | <b><i>C. albicans</i><br/>ATCC 188404</b> |
|---------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------|
| NEMICA              | -                                     | -                                         |
| Micafungina         | 0,666                                 | 0,166                                     |

**Fonte:** elaborado pela autora.

A principal classe farmacológica de medicamentos antifúngicos com ação na parede celular dos fungos são as equinocandinas, como a micafungina, que inibem a síntese de  $\beta$ -1,3-glicano, principal constituinte da parede celular, levando a sua desestabilização e morte celular (ZHENG, 2018). Tal efeito pode ser observado em função do aumento dos valores de CIM de micafungina para as duas cepas utilizadas, uma vez que o seu efeito antifúngico é revertido parcialmente num meio contendo um estabilizador osmótico, tais como o sorbitol. Sendo assim, o aumento dos valores inibitórios em presença do sorbitol indica que o mecanismo de ação da micafungina está associada com a rota biossintética da formação da parede celular das cepas utilizadas.

Ademais, outro ponto observado é ausência de CIM para a nanoemulsão contendo micafungina para as cepas de *C. auris* e *C. albicans*, o que pode indicar que o fármaco em questão tenha uma forte interação com a nanoemulsão, não sendo capaz de liberá-la em concentrações suficientes para a inibição do crescimento fúngico. Outra possibilidade é a dificuldade de encapsulação de altas concentrações de micafungina, que consequentemente comprometeria a ação antifúngica da nanoemulsão estudada.

Quanto aos ensaios com ergosterol, não houve alteração nos valores de CIM para as cepas de *C. auris* e *C. albicans*, demonstrando os mesmos valores de inibição em presença e ausência de exógenos de ergosterol, o que indica que o mecanismo de ação da solução de micafungina e da nanoemulsão contendo micafungina não está associado à permeabilidade de íons à membrana de *C. auris* e *C. albicans*.

#### 5.4.4. Ensaio de inibição de biofilmes

Conforme protocolo, as concentrações iniciais utilizadas foram de 20 vezes o valor de CIM encontrado, porém, essas não foram capazes de inibir o crescimento do biofilme fúngico, tanto em sua fase de formação quanto em sua forma madura. Posteriormente foram utilizadas concentrações de 100 µg/mL, 200 µg/mL, e por fim, 1000 µg/mL, contudo, não houve atividade verificada para tais concentrações, o que sugere que os biofilmes formados pelas cepas de *C. auris* e *C. albicans* são resistentes ao tratamento com micafungina bem como ao tratamento com a nanoemulsão contendo micafungina.

#### 5.5 Determinação do potencial citotóxico

Os resultados referentes ao índice de citotoxicidade (IC<sub>50</sub>) de micafungina, da formulação base (NE) e da nanoemulsão contendo micafungina (NEMICA) frente à linhagem celular L929 estão apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Resultados da determinação do potencial citotóxico in vitro (IC<sub>50</sub>) de micafungina livre e incorporada em nanoemulsão e da formulação base (sem o fármaco).

| Amostra          | IC <sub>50</sub> (µg/mL) |
|------------------|--------------------------|
| NEMICA           | 60                       |
| NE (sem fármaco) | 80                       |
| Micafungina      | 60                       |

**Fonte:** elaborado pela autora.

A incorporação de micafungina na nanoemulsão não ocasionou modificação no potencial citotóxico.

#### 5.6 Determinação do potencial tóxico agudo em modelo *in vivo* alternativo

As dosagens 5, 10, 25, 50 100, 200, 500, 1000 e 2000 mg/kg de micafungina livre e incorporada em nanoemulsão não foram capazes de induzir morte nas larvas utilizadas,

contudo, foi possível observar sinais de toxicidade tais como a melanização nas dosagens de 1000 e 2000 mg/kg em ambos os grupos de micafungina livre e incorporada. Não houve ação sobre a motilidade das larvas. Ademais, não foi observada melanização, perda de motilidade ou morte nos grupos controle não tratado, controle injetado e controle de furo.

### **5.7 Ensaios terapêuticos de infecção por *C. auris* e *C. albicans* em modelos alternativos *in vivo* de *G. mellonella***

Para *C. auris*, no grupo 1 (controle de infecção), a viabilidade foi de 40%, com alterações na motilidade e melanização das larvas ao final de 5 dias, indicando que a infecção por *C. auris* se estabeleceu e apresentou danos às larvas. O grupo 2 (negativo de infecção) todas as larvas permaneceram viáveis, sem alterações motoras e sem melanização, o que aponta que estas eram adequadas para serem infectadas e tratadas. No grupo 3 (tratamento com solução de micafungina) houve uma sobrevida de 90%, com melanização de algumas larvas, e sem mudanças na motilidade das larvas. No grupo 4 (tratamento com NEMICA) não ocorreram mortes, contudo, as larvas apresentaram melanização, o que aponta que estas passaram por estresse oxidativo. O grupo 5 (tratamento com formulação base) demonstrou uma viabilidade de 70%, com alterações nos aspectos físicos e sem mudanças motoras.

O grupo 6 (controle de furo) também não resultou em modificações na motilidade e aspecto físico das larvas, o que indica que os furos diários não são capazes de causar alterações. O grupo 7 (tratamento com etanol) ocasionou a morte de todas as larvas presentes no grupo experimental ao fim do primeiro dia, demonstrando que todo conteúdo foi inoculado.

A maior porcentagem de sobrevida nos grupos 3 e 4 sugere que o tratamento com micafungina livre e incorporada foi capaz de prevenir um número maior de mortes dos grupos amostrais, apontando uma possível ação sobre a infecção causada nas larvas.

Para *C. albicans*, todos os grupos experimentais tiveram um perfil de sobrevida positivo após a infecção. No grupo 1 (controle de infecção), a infecção não promoveu morte. Ao final

do experimento, todas as larvas permaneceram viáveis e sem alterações motoras.

O grupo 2 (negativo de infecção) foi tratado apenas com solução salina estéril e não foram observadas mortes ou alterações nos aspectos físicos e motores, o que demonstra que as larvas eram viáveis e susceptíveis à infecção e tratamento. Nos grupos 3 (tratamento com solução de micafungina), 4 (tratamento com NEMICA) e 5 (tratamento com formulação base) não ocorreram mortes, alteração na motilidade ou melanização, o que indica resultados promissores, uma vez que o tratamento com as amostras não interferiu na viabilidade das larvas.

O grupo 6 (controle de furo) também não resultou em modificações na motilidade e pigmentação das larvas, demonstrando que os furos diários não foram capazes de causar alterações. No entanto, o grupo 7 (tratamento com etanol) ocasionou a morte de 9 das 10 larvas presentes no grupo experimental ao fim do primeiro dia, além de produzir melanização na larva remanescente, a qual não sobreviveu a segunda aplicação de etanol.

**Figura 8.** Larvas viáveis ao início do tratamento (à esquerda) e larvas mortas após injeção de etanol (à direita).



**Fonte:** elaborado pela autora.

## 6. Conclusões

A formulação escolhida para incorporação de micafungina foi F1 a partir da análise de parâmetros como menor tamanho de partícula e menor índice de polidispersão, visando a escolha de uma formulação com maior estabilidade.

Considerando os dados apresentados em relação a estabilidade das amostras, é possível inferir que a formulação se manteve estável por 30 dias quando acondicionada em temperatura ambiente, e 60 dias sob refrigeração.

Quanto à reologia das formulações, as nanoemulsões analisadas possuem comportamento de fluxo não-Newtoniano. Para a formulação F1 sem a micafungina (NE) esta classifica-se como tixotrópico tempo dependente, contudo, a formulação F1' (NEMICA) contendo micafungina classifica-se como tixotrópico tempo independente. As formulações submetidas à análise oscilatória demonstraram comportamento predominantemente elástico ( $G' > G''$ ).

Os ensaios biológicos mostram que a nanoemulsão com micafungina incorporada não apresentou atividade antifúngica frente à cepa clínica de *C. auris*, porém, a solução com micafungina livre demonstrou atividade com uma CIM de 0,333 µg/mL. Para a cepa padrão de *C. albicans* foi obtido a mesma CIM de 0,0103 µg/mL tanto para nanoemulsão contendo micafungina quanto para a solução com este fármaco livre.

Nos ensaios em presença de sorbitol houve aumento dos valores de CIM de micafungina para as duas cepas utilizadas, elucidando o possível mecanismo de ação. Quanto aos ensaios com ergosterol, não houve alteração nos valores de CIM para as cepas de *C. auris* e *C. albicans*.

Não foi observada atividade antifúngica frente aos biofilmes das cepas utilizadas.

Os resultados referentes ao índice de citotoxicidade ( $IC_{50}$ ) de micafungina, da formulação base (NE) e da nanoemulsão contendo micafungina (NEMICA) frente à linhagem celular L929 são de 60 µg/mL para a MICA e NEMICA, e 80 µg/mL para a formulação base.

Quanto ao ensaio de toxicidade aguda em larvas de *G. mellonella*, as dosagens 5, 10, 25, 50 100, 200, 500, 1000 e 2000 mg/kg de micafungina livre e incorporada em nanoemulsão não foram capazes de induzir morte nas larvas utilizadas.

Nos ensaios terapêuticos de infecção por *C. auris* e *C. albicans* em modelos alternativos *in vivo* de *G. mellonella*, para *C. albicans*, conclui-se que todos os grupos experimentais tiveram um perfil de sobrevivência positivo após a infecção. Para *C. auris*, a maior porcentagem de sobrevivência nos grupos 3 e 4 sugere que o tratamento com micafungina livre e incorporada foi capaz de prevenir um número maior de mortes dos grupos amostrais, apontando uma possível ação sobre a infecção causada nas larvas.

Por fim, apesar da nanoemulsão contendo micafungina não ter apresentado melhora na atividade antifúngica em biofilmes de *C. auris* e *C. albicans*, o mesmo demonstrou resultados promissores no ensaio *in vivo* com *G. mellonella*, aumentando a sobrevivência das larvas infectadas por *C. auris*, bem como apresentando um perfil de sobrevivência positivo em *C. albicans*, o que aponta a sua potencial atividade antifúngica e ausência de toxicidade da formulação frente às larvas.

## 7. REFERÊNCIAS

- ARIAS, L. S., et al. Chitosan ameliorates candida auris virulence in a galleria mellonella infection model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 8, p. 1–13, 2020.
- BONIFÁCIO, B. V.; VILA, T. V. M.; MASIERO, et al. Antifungal Activity of a Hydroethanolic Extract From Astronium urundeuva Leaves Against Candida albicans and Candida glabrata. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. November, p. 1–12, 2019.
- CASTRO, R. D.; DE SOUZA, et al. Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against Candida species involved with infections in the oral cavity: An in vitro study. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2015.
- CLSI. **M27-A3: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2017.
- CORTIGIANI, A., et al. Epidemiology, clinical characteristics, resistance, and treatment of infections by Candida auris. **Journal of Intensive Care**, v. 6, p. 69, 2018.
- DU, H.; BING, J.; HU, T.; ENNIS, C. L.; NOBILE, C. J.; HUAN, G. Candida auris: epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. **PLoS Pathog**, v. 16, n. 10, p. e1008892, 2020.
- ELOY, J. O., et al. Co-loaded paclitaxel/rapamycin liposomes: Development, characterization and in vitro and in vivo evaluation for breast cancer therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 141, p. 74–82, 2016.
- FIRACATIVE, et al. Rearing and maintenance of galleria mellonella and its application to study fungal virulence. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 1–13, 2020.
- FORIER, K.; RAEMDOCK K; DE SMEDT SC; DEMEESTER J; COENYE T, BRAECKMANS K. Lipid and polymer nanoparticles for drug delivery to bacterial biofilms. **Journal of Controlled Release**. v. 190, p. 607-623, 2018.
- FREIRES, I. D. A.; et al. Coriandrum sativum L. (Coriander) Essential Oil: Antifungal Activity and Mode of Action on Candida spp., and Molecular Targets Affected in Human Whole-Genome Expression. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e99086, Jun. 2014.
- HIGASHIYAMA, Y.; Kohno, S. Micafungin: a therapeutic review. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 2, n. 3, p. 345–355, 2004. doi:10.1586/14787210.2.3.345.
- IGNASIAK, K.; MAXWELL, A. Galleria mellonella (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. **BMC Research Notes**, v. 10, n. 1, p. 1–8, 2017.
- JEFFERY-SMITH, A.; TAORI S. K.; SCHELENZ S. et al. Candida auris: A review of the literature. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 1, p. 1–18, 2018.
- KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Pharmacology Examination & Board Review**. 10 ed. New York (NY): Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2012. p. 420.

KEAN R., et al. Transcriptome Assembly and Profiling of *Candida auris* Reveals Novel Insights into Biofilm-Mediated Resistance. **mSphere**, v. 3, n. 4, p. 1–14, 2018.

LIMA, L. C.; RAMOS, et al. Syngonanthus nitens (Bong.) Ruhland Derivatives Loaded into a Lipid Nanoemulsion for Enhanced Antifungal Activity Against *Candida parapsilosis*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 14, p. 1556–1565, 2020.

LOCKHART, S. R.; ETIENNE K.A.; VALLABHANENI S.; FAROOQI J. et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 2, p. 134–140, 2017.

LOPES JP, Lionakis MS. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Virulence**. v. 13, n. 1, p. 89-121, Dec. 2022. doi: 10.1080/21505594.2021.2019950. PMID: 34964702; PMCID: PMC9728475.

PEREIRA, R.; DOS SANTOS FONTENELLE, R.O.; DE BRITO, E.H.S.; DE MORAIS, S.M. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. **J Appl Microbiol**. v. 131, n., p.11-22, 2021. doi:10.1111/jam.14949.

RAMOS, M. A. S.; et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 1179 - 1213, 2018.

RAMOS, M. A. S; et al. Intravaginal Delivery of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhland Fraction Based on a Nanoemulsion System Applied to Vulvovaginal Candidiasis Treatment. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 15, p. 1072–1089, 2019.

SAVIC, S. et al. An alkyl polyglucoside-mixed emulsifier as stabilizer of emulsion systems: The influence of colloidal structure on emulsions skin hydration potential. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 358, n. 1, p. 182–191, 2011.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria: Fundamentos Teóricos e Práticos**. 2 ed. São Paulo: Artliber, 2006.

SHARMA, C. et al. Whole genome sequencing of emerging multidrug resistant *Candida auris* isolates in India demonstrates low genetic variation, **New Microbes and New Infections**, v. 13, p. 77-82, 2016.

SHEN, J.; PAN, X.; BHATIA, S.R. Self-assembly and thermoreversible rheology of perfluorocarbon nanoemulsion-based gels with amphiphilic copolymers. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, v. 202, 2021, 111641.

SINGKUM, P. et al. A powerful in vivo alternative model in scientific research: *Galleria mellonella*. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 66, n. 1, p. 31–55, 2019.

SILVA, P. et al. A Nanostructured Lipid System as a Strategy to Improve the in Vitro Antibacterial Activity of Copper(II) Complexes. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 22534–22545, 2015.

TOLEDO, L. et al. Improved in vitro and in vivo anti-candida albicans activity of cymbopogon nardus essential oil by its incorporation into a microemulsion system. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 10481–10497, 2020.

WASMANN, E. R.; MUILWIJK, W. E. et. al. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Micafungin, **Clinical Pharmacokinetics**, v. 57, p. 267-286, 2018.

WITCHLEY, J.N.; PENUMETCHA, P.; ABON, N.V.; WOOLFORD, C.A.; MITCHELL, A. P.; NOBLE, S.M. Candida albicans Morphogenesis Programs Control the Balance between Gut Commensalism and Invasive Infection. **Cell Host Microbe**. v. 25, n. 3, p. 432-443, e6, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. Geneva: Switzerland, 2014. ISBN: 978-92-4-156474-8. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241564748>. Acesso em: 13 ago. 2021.

ZHENG, Y. H.; MA, Y. Y.; DING, Y.; CHEN, X. Q.; GAO, G. X. An insight into new strategies to combat antifungal drug resistance. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, n. 5, p. 3807 - 3816, 2018.