

Letícia de Queiroz Mozaner

**Atividade Antifúngica de Derivados Anfifílicos de Quitosana sobre
agentes etiológicos de dermatomicoses**

São José do Rio Preto

2024

Letícia de Queiroz Mozaner

**Atividade Antifúngica de Derivados Anfifílicos de Quitosana sobre
agentes etiológicos de dermatomicoses**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Nome do Programa, junto ao Programa de Pós-Graduação em Nome do Programa, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Margarete Teresa
Gottardo de Almeida

São José do Rio Preto

2024

M939a Mozaner, Leticia de Queiroz
Atividade Antifúngica de Derivados Anfífilos de quitosana sobre
agentes etiológicos de dermatomicoses / Leticia de Queiroz Mozaner.
-- São José do Rio Preto, 2024
86 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio
Preto
Orientadora: Margarete Teresa Gottardo de Almeida

1. Dermatomicoses. 2. Antimicrobianos. 3. Derivados de quitosana.
I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Letícia de Queiroz Mozaner

**Atividade Antifúngica de Derivados Anfífilos de Quitosana sobre
agentes etiológicos de dermatomicoses**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Nome do Programa, junto ao Programa de Pós-Graduação em Nome do Programa, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Margarete Teresa Gottardo de Almeida

UNESP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Marcia Maria Costa Nunes Soares

Instituto Adolfo Lutz – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Elza Maria Castilho

FAMERP- São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Mariela Domiciano Ribeiro

FAMERP – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Cátia Rezende

UNIFEV – Votuporanga

São José do Rio Preto

23 de Fevereiro de 2024

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pois sei que onde estou só foi possível porque Ele me guiou até aqui.

À minha família e namorado, pois eles deram o apoio emocional necessário para eu alcançar meus objetivos.

À minha orientadora, uma pessoa maravilhosa profissionalmente e pessoalmente, sempre me acolheu e estava disponível para as dúvidas e problemas.

Aos meus colegas de trabalho, ou melhor, amigos, pois são pessoas extraordinárias que pretendo ter o resto da vida.

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

RESUMO

As infecções fúngicas afetam milhares de pessoas com ocorrências superficiais e/ou invasivas. Nos últimos anos, tem sido observado que as infecções são causadas por fungos com padrão resistente aos antimicrobianos. A terapêutica delas estão cada vez mais prolongadas e com altas taxas de recorrência. As micoses cutâneas ou dermatomicoses apresentam variedade de agentes etiológicos, tais como dermatófitos, leveduras e fungos filamentosos não dermatófitos. A busca por compostos não tóxicos, inibidores do crescimento de fungos, tem impulsionado a pesquisa nesta área. Nesse cenário, a quitosana é considerada um agente antimicrobiano promissor, cuja atividade tem sido parcialmente atribuída à interação eletrostática com a parede celular e membrana celular dos microrganismos. Estudos recentes têm mostrado que a estrutura da quitosana pode ser modificada para potencializar seus efeitos. Nesse sentido, o presente projeto teve por objetivo investigar a atividade antimicrobiana dos derivados, com conteúdos fixos de grupos dietilaminoetil (DEAE) ou grupos quaternários de amônio e dodecil (DD), com massas moleculares variadas. Esses derivados foram selecionados devido as suas atividades de inibição comprovadas contra os fungos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Alternaria alternata*, *Alternaria solanica*, *Penicillium expansum*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, entre outros. Busca-se otimizar a atividade antimicrobiana contra fungos de grande impacto na área da saúde, especificamente, contra cepas padrão e isolados clínicos de *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Candida* e *Fusarium*. Foram determinadas as Concentrações Inibitórias Mínima (CIM) e Fungicida Mínima (CFM) para todos os derivados e a cinética de morte (*time-kill*) para derivados selecionados. Além disso, foi testada a toxicidade dos derivados selecionados pelo modelo de *Galleria mellonella*. Os derivados apresentaram CIM e CFM entre 100-2000 µg/mL. Os polímeros substituídos com DEAE, e com DEAE e DD, de baixa massa, inibiram totalmente todas as cepas, no máximo, em 12 horas. Os menores tempos de ação (1 hora) foram observados com esses polímeros contra *Candida krusei* ATCC, *Candida krusei* 6347, *Candida parapsilosis* 6272, *Candida parapsilosis* 6186 e *Candida parapsilosis* ATCC. Todos os polímeros testados contra *Trichophyton rubrum* inibiram totalmente em 8 horas de contato. Os ensaios de toxicidade com *Galleria mellonella* demonstraram baixa toxicidade dos derivados.

Palavras-chave: Onicomicoses, antimicrobianos, *Galleria mellonella*, quitosana

ABSTRACT

Fungal infections affect thousands of people with superficial and/or invasive occurrences. In recent years, it has been observed that infections are caused by fungi with a pattern resistant to antimicrobials. Their therapy is increasingly prolonged and with high rates of recurrence. Cutaneous mycoses or dermatomycoses have a variety of etiological agents, such as dermatophytes, yeasts and non-dermatophyte filamentous fungi. The search for non-toxic compounds that inhibit fungal growth has driven research in this area. In this scenario, chitosan is considered a promising antimicrobial agent, whose activity has been partially attributed to the electrostatic interaction with the cell wall and cell membrane of microorganisms. Recent studies have shown that the structure of chitosan can be modified to enhance its effects. Then, the present project aimed to investigate the antimicrobial activity of derivatives with fixed contents of diethylaminoethyl groups (DEAE) or quaternary ammonium and dodecyl groups (DD), with varied molecular weights. These derivatives were selected due to their proven inhibition activities against the fungi *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Alternaria alternata*, *Alternaria solanae*, *Penicillium expansum*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, among others. The aim is to optimize the antimicrobial activity against fungi with a great impact on health, specifically against standard strains and clinical isolates of *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Candida* and *Fusarium*. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Fungicide Concentration (MFC) were determined for all derivatives and time-kill for selected derivatives. In addition, the toxicity of derivatives selected by the *Galleria mellonella* model was tested. Derivatives showed MIC and MFC between 100-2000 µg/mL. DEAE, DEAE and DD substituted polymers totally inhibited all strains within 12 hours at most. The shortest action times (1 hour) were observed with these polymers against *Candida krusei* ATCC, *Candida krusei* 6347, *Candida parapsilosis* 6272, *Candida parapsilosis* 6186 and *Candida parapsilosis* ATCC. All polymers tested against *Trichophyton rubrum* were completely inhibited within 8 hours of contact. Toxicity tests with *Galleria mellonella* showed low toxicity of the derivatives.

Keywords: Onychomycosis, antimicrobial, *Galleria mellonella*, chitosan

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1

Figura 1 – <i>Layout</i> das placas de microdiluição.....	23
Figura 2 – Placa de Ágar Sabouraud após a realização do procedimento.....	25
Figura 3 – Esquema do procedimento de <i>time-kill</i>	26
Figura 4. Derivados da série 1 contra <i>Candida tropicalis</i> ATCC.....	28
Figura 5 – Gráficos log UFC/mL vs tempo contra <i>Candida</i> spp.....	32
Figura 6 – Gráficos log UFC/mL vs tempo contra filamentosos.....	35
Figura 7: Gráfico da taxa de sobrevivência (%) das larvas de <i>Galleria mellonella</i> inoculadas com os derivados de quitosana.....	37

Capítulo 2

Figura 1 - Esquema de determinação da cinética de morte.....	43
--	----

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 – Estrutura e propriedades dos polímeros da série 1.....20

Tabela 2 – Estrutura e propriedades dos polímeros da série 2.....21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABD	Agar Batata Dextrose
ASD	Agar Sabouraud Dextrose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>
CS	Caldo Sabouraud Dextrose
M	Molar
mL	Mililitro
RPMI	<i>Rosen Park Memorial Institute</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
µg	Microgramas

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	11
1.INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1. Infecções fúngicas: dermatomicoses e agentes etiológicos.....	13
2.2.Terapêutica.....	14
2.3. A quitosana e suas aplicações.....	16
3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	17
4. OBJETIVOS.....	19
4.1. Objetivos específicos.....	19
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
5.1. Derivados anfífilos.....	21
5.2. Ensaios Microbiológicos.....	20
5.2.1. Cepas.....	21
5.2.2. Determinação de CIM.....	21
5.2.3. Determinação de CFM.....	24
5.2.4. Determinação da cinética de morte (<i>time-kill</i>).....	25
5.3. Teste de toxicidade em <i>Galleria mellonella</i>	26
6.RESULTADOS.....	27
6.1.CIM.....	27
6.2.CFM.....	31
6.3. Avaliação da cinética de morte (<i>time-kill</i>).....	31
6.4. Teste de toxicidade em <i>Galleria mellonella</i>	37
CAPÍTULO 2:artigo I.....	38
Resumo.....	39
Introdução.....	39
Objetivos.....	40
Metodologia.....	40
Resultados.....	42
Discussão e conclusão.....	43
Referências.....	46
CAPÍTULO 3: artigo II.....	49
Abstract.....	50
Introduction.....	50
Lay summary.....	51
Materials and Methods.....	54
Results.....	54
Discussion and conclusion.....	55
References.....	57
7.CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS.....	60
APÊNDICE A.....	66
APÊNDICE B.....	72
APÊNDICE C.....	79

CAPÍTULO 1

1.INTRODUÇÃO

As dermatomicoses são micoses superficiais que acometem grande parte da população, tornando-se uma causa importante de morbidade. Apesar de, na maioria das vezes, apresentarem risco de vida apenas em pacientes com comorbidades, geram efeitos debilitantes, diminuindo a qualidade de vida, ocasionando vários problemas psicossociais, além de grandes despesas em saúde pública (VLAHOVIC, 2016; GUPTA et al., 2020).

Aquelas de ocorrência mais comum são as dermatofitoses ou tineas, infecções resultantes do acometimento de fungos aos tecidos queratinizados da pele, pelos e unhas. Leveduras comensais da pele, como *Malassezia furfur* e *Candida* spp. também são importantes agentes causais de dermatomicoses. A onicomicose é uma das ocorrências fúngicas mais comuns, definida como infecção fúngica das unhas, que representa mais de 50% de todas as onicopatias e cerca de 30% de todas as infecções superficiais. Três gêneros são a causa principal de onicomicose com 80 a 90% das ocorrências: *Trichophyton*, *Epidermophyton* e alguns casos *Microsporum* (GHANNOUM; ISHAM, 2014; BABAYANI. et al., 2018).

A terapêutica das dermatomicoses geralmente envolvem antifúngicos orais, como terbinafina, itraconazol e fluconazol, que possuem altas taxas de efetividade, porém, podem apresentar efeitos adversos severos como danos hepatotóxicos. Os antifúngicos tópicos, tais como efinaconazol, tavaborol, ciclopirox e amorolfina, possuem menos efeitos adversos, mas são de baixa permeação devido à alta queratinização dos tecidos atingidos, obtendo-se baixas taxas de cura (PERUSINHA, C.; ROSADO, C.; LENCASTRE, A., 2019; GUPTA, A.K. et al., 2020).

A baixa permeabilidade dos antifúngicos utilizados topicamente devido aos locais acometidos que possuem alta queratinização, atuando assim como uma barreira, e a toxicidade de antifúngicos sistêmicos como a terbinafina que pode causar náusea, vômito, perda do paladar, eczema, cefaleia, visão turva, pancitopenia, entre outros efeitos adversos, contribuem para baixa adesão aos tratamentos e alta reincidência. Por esse motivo a busca por novos fármacos é crescente. Nesse sentido, os derivados de

quitosana são polímeros que apresentam características únicas e atrativas: biodegradabilidade, baixa toxicidade, efeitos antimicrobianos, antioxidantes, capacidade de formar biofilmes, entre outros, que os faz serem explorados em diversas pesquisas, para diferentes objetivos (RUIZ-CRUZ, S. et al., 2019; SANTOS, V.S., et al., 2021; EL-ADLY, A.M., 2022).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecções fúngicas: dermatomicoses e agentes etiológicos

As dermatomicoses são micoses que atingem os tecidos queratinizados, como pele, unhas e cabelo, podem ser causadas por fungos filamentosos dermatófitos, não dermatófitos ou leveduras. Atingem cerca de 25% da população do mundo, e vem sendo observado aumento da frequência de casos, tal fato pode ser justificado por diversos fatores: como o uso de calçado oclusivo, higiene inadequada, nível socioeconômico, ocupação, mudança climática, fatores predisponentes (como imunossupressão/deficiência e diabetes) e melhorias nos testes diagnósticos e cuidados médicos (MARTINEZ-ROSSI, N.M. et al., 2021).

Os dermatófitos são fungos queratinofílicos, ou seja, possuem a queratina como substrato principal e compreendem três gêneros clássicos: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, no entanto, em estudo recente foram observados outros seis gêneros: *Arthroderma*, *Nannizzia*, *Ctenomyces*, *Lophophyton*, *Guarromyces* e *Paraphyton*. são responsáveis pela maioria das infecções superficiais em várias áreas do corpo, principalmente os tecidos queratinizados como couro cabeludo, pele e unhas, afetando milhares de pessoas. As doenças causadas por tais fungos são denominadas de dermatofitoses ou tineia, a transmissão dessas infecções ocorre pelo contato direto com humanos ou animais infectados ou indireto por fômites contaminados, e as formas clínicas variam de acordo com o agente etiológico e o sítio anatômico acometido. Recentemente, há um aumento da ocorrência de dermatomicoses recalcitrantes, devido provavelmente ao mal uso dos antifúngicos, ocasionando mutações e desenvolvimento de cepas resistentes aos antifúngicos convencionais (INOUE et al., 2016; HOOG, G.S. et al., 2017; GAURAV, V. et al., 2021).

Os fungos do gênero *Candida* estão presentes na microbiota natural em humanos: na boca, trato gastrointestinal e na vagina, em mulheres, entretanto, algumas alterações biológicas, que comprometam o sistema imune, podem os tornar patogênicos, devido sua adaptabilidade à diferentes nichos do hospedeiro. Sete espécies são consideradas as mais importantes, por serem responsáveis por maior parte das doenças, são elas: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. stellatoidea* e *C. kefyr*. A *C. albicans* é a mais frequente em infecções invasivas, entretanto, a incidência de infecções causadas por espécies não albicans tem crescido nos últimos anos. As espécies *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. guillier-mondii* também são predominantemente encontradas em infecções superficiais das unhas, as onicomicoses, em alguns casos sendo o principal agente causador da infecção (KHOSRAVI et al., 2013; SARDI et al., 2013; LIMA et al., 2016; OTAŠEVIĆ et al., 2016).

A *Candida* é considerada um importante patógeno por sua versatilidade e habilidade de viver em diferentes locais anatômicos, é consensual que este microrganismo é ativo na fisiopatologia do processo da doença, atuando através de diversos mecanismos de agressão denominados fatores de virulência. Os principais fatores de virulência são a formação de biofilmes e secreção de enzimas hidrolíticas (fosfolipases, proteases e hemolisinas), entretanto, embora muito foi estudado sobre fatores patogênicos em fungos, principalmente *C. albicans*, pouco se sabe sobre as espécies não-albicans. *Candida não-albicans* afetam principalmente pacientes imunocomprometidos, ou que estão expostos aos patógenos por meio de lesões (ANDRÉS, T.; ALEXANDRO, B., 2020; SARDI et al., 2013).

A distribuição dos patógenos e os agentes etiológicos variam de acordo com a geografia, clima e migração da população da região. Geralmente, em infecções de unhas (onicomicoses), os agentes etiológicos mais encontrados são os dermatófitos: *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, mas também há uma quantidade significativa de fungos filamentosos não dermatófitos, tais como: *Scopulariopsis brevicaulis*, *Aspergillus* spp., *Acremonium*, *Fusarium* spp., *Alternaria alternate*, e *Neoscytalidium* e as leveduras (*Candida* spp.). As micoses de pele (tinea pedis) também são frequentes e pouco exploradas, atingem cerca de 70% da população, como por exemplo, o “pé-de-atleta”, e a etiologia conhecida é similar às onicomicoses. O *T. rubrum* e *T. interdigitale* prevalecem mas não é em todas as regiões, em certos locais há prevalência de *M. canis* e *T. verrucosum*, conforme dito

anteriormente, a etiologia irá variar de acordo com o clima, classe social, entre outros fatores (HOOG, G.S. et al., 2017; GUPTA, A.K. et al., 2020; NOWICKA, D.; NAWROT, U., 2021).

No trabalho realizado por Montarin (2015), foram coletadas amostras de pacientes com suspeita clínica de onicomicose, no Hospital de Base de São José do Rio Preto. Do total de 589 amostras, 426 (72%) teve diagnóstico positivo para onicomicose, entre essas 77% são do sexo feminino, e o maior número de casos a idade estava compreendida entre 36 e 60 anos. Em relação aos agentes etiológicos dessas amostras, 69% foram leveduras, 20% dermatófitos e 11% fungos filamentosos não dermatófitos, sendo que em 68 amostras foram encontradas mais de uma espécie de fungo responsável pela onicomicose. Das amostras de leveduras, a *Candida parapsilosis* foi a espécie mais prevalente, dos dermatófitos o *Trichophyton rubrum* e dos fungos filamentosos não dermatófitos o *Fusarium* sp.

2.2.Terapêutica

Embora as dermatomicoses, geralmente, não serem fatais, demora-se para erradicá-las, necessitando longos e dispendiosos tratamentos. Além disso, a quantidade cada vez maior de pessoas com comorbidades e o envelhecimento da população contribuem para o agravamento de infectados por esses fungos. Algumas vezes, as infecções superficiais causadas pelos dermatófitos podem evoluir para invasivas, geralmente através de lesões ou ruptura de folículos infectados na derme. Entretanto, há poucos agentes para tratar tais infecções e os antifúngicos disponíveis, na maioria das vezes, possuem pouca eficácia e efeitos adversos graves (OUF, S.A. et al., 2018; LIPNER, S.R. et al., 2021).

Nos últimos anos, as infecções causadas por esses fungos vêm se tornando cada vez mais recalcitrantes, embora a quantidade de antifúngicos utilizados para o tratamento clínico dessas infecções pareçam ser numerosos, poucos são realmente eficazes na morte do microrganismo, além da seleção crescente de cepas resistentes. Os antifúngicos normalmente utilizados são os azóis, polienos, alilaminas, hidroxipiridonas, benzofurano heterocíclico e equinocandinas, porém, para as dermatomicoses são mais utilizados os medicamentos que possuem mecanismos de inibição em alguma etapa na via de síntese

do ergosterol, impedindo a formação correta da membrana fúngica ou agem na inibição de compostos essenciais na formação da parede celular. Entretanto, muitos desses antifúngicos possuem uma baixa biodisponibilidade oral, imidazol e itraconazol, por exemplo, alguns apresentam alta toxicidade na administração sistêmica (azóis de primeira geração), outros como o fluconazol, possuem boa biodisponibilidade oral, porém, ao descontinuar o tratamento, pode haver retorno da infecção, sugerindo baixa aversez de ligação (MARTINEZ-ROSSI, N.M. et al., 2021; KHURANA, SARDANA, CHOWDHARY, 2019).

Os medicamentos orais mais utilizados são o fluconazol, terbinafina e itraconazol, destes a terbinafina é considerada de primeira linha. O tratamento via oral é utilizado em casos mais graves, uma vez que pode estar associado com reações medicamentosas, distúrbios do olfato/paladar, reações alérgicas e hepatotoxicidade. A via tópica é comum em casos pediátricos e em adultos com doença leve/moderada ou que tomam medicamentos concomitantes e com outras contraindicações ao tratamento oral (LIPNER S, R. et al., 2021).

Foram relatados diversos casos de resistência da *Candida* spp. e dermatófitos a esses antifúngicos, devido ao amplo uso e muitas vezes de forma profilática e incorreta. Os mecanismos de resistência molecular existentes e recém emergentes se espalham rapidamente nas populações de fungos, eles são diversos e dependem do fármaco, porém de forma geral são: diminuição da concentração intracelular do antifúngico, diminuição da afinidade/processividade alvo deste, e contração do seu efeito. Dessa maneira, o tratamento de infecções causadas por tais fungos, como as dermatomicoses, torna-se difícil de administrar com sucesso, necessitando de um longo prazo e combinações de terapias para que seja possível uma pequena melhora na qualidade de vida dos pacientes, e ainda assim, alguns ainda não são curados ou permanecem curados por longo período de tempo (SPAMPINATO, LEONARDI, 2013; VLAHOVIC, 2016; HOKKEN et al., 2019; MONOD, 2019).

Como citado anteriormente, o tipo de tratamento irá depender do grau de infecção e se o paciente possui outras comorbidades ou utiliza outros medicamentos concomitantemente. A terbinafina e o itraconazol são os medicamentos orais mais comuns com altas taxas de cura, geralmente o tratamento dura 12 semanas. A terbinafina e alilaminas são eficazes contra dermatófitos e possuem alguma ação contra não-

dermatófitos, porém não são tão eficazes como os azóis contra *Candida* spp. Existem efeitos colaterais associados à medicação, predominantemente sintomas gastrointestinais, hepatotoxicidade, dores de cabeça e erupções cutâneas, mas geralmente não são consideradas graves o suficiente para interromper o tratamento. Os pacientes podem experimentar raramente perda ou alteração do paladar. O itraconazol é um triazol e tem ação contra dermatófitos, não-dermatófitos e *Candida* spp., a dose é de 200mg por dia por 12 semanas para as unhas dos pés. O tratamento também pode causar efeitos colaterais, geralmente são distúrbios intestinais, dores de cabeça, infecção das vias respiratórias superiores e em casos mais sérios hipertrigliceridemia, transaminases elevadas e uma forma de lesão hepática em que 0,5-1% dos pacientes desenvolvem hepatite. O fluconazol é uma alternativa aos dois fármacos, porém, em alguns países ainda não é aprovado sua utilização como tratamento pela FDA, como nos Estados Unidos e no Canadá. Além disso, esses medicamentos não são indicados para grávidas (GUPTA, A.K. et al., 2020; LIPNER, S.R. et al., 2021)

Portanto, é essencial a busca de novos tratamentos e antifúngicos que são realmente eficazes na inibição desses fungos e apresentam baixa toxicidade para os pacientes, a fim de obter sucesso na cura e melhora da qualidade de vida. Ultimamente, pesquisas estão sendo realizadas para a utilização de lasers, terapias fotodinâmicas e desenvolvimento de antifúngicos com novos alvos para a inibição das células fúngicas GUPTA, A.K. et al., 2020; LIPNER, S.R. et al., 2021).

2.3.A quitosana e suas aplicações

A quitosana é o nome dado à polímeros de quitina parcialmente ou completamente desacetilados, a quitina é o segundo polímero mais abundante na natureza pois é encontrado no exoesqueleto de crustáceos, na parede celular de fungos, insetos, em anelídeos, moluscos e celenterados. Esses polímeros apresentam características únicas e atrativas, tais como: biodegradabilidade, baixa toxicidade, antioxidante e efeitos antimicrobianos (KONG et al., 2010; PEDRO et al., 2013).

O homopolímero é uma base fraca, com pKa em torno de 6,2-7,0 e por isso é insolúvel em pH neutro ou alcalino, já em pH ácido é solúvel já que os grupos aminos

estarão carregados e a quitosana estará na sua forma catiônica, sendo a forma associada às suas características antimicrobianas, pois é capaz de realizar interações eletrostáticas com a parede celular de fungos e bactérias. Entretanto, a solubilidade em água, em pH neutro, é importante para as suas aplicações, logo, se faz necessário modificações em sua estrutura, geralmente realizadas no grupo amina do carbono C2 e nos grupos hidroxilas dos carbonos C3 e C6, para torná-la solúvel em uma maior faixa de pH (estrutura em tabela 1 e 2) (PEDRO et al., 2013; DIAS et al., 2018).

Os derivados de quitosana vêm sendo estudados em diferentes aplicações, tanto na área médica, contra uma diversidade de bactérias e fungos (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida* spp.) na área agrícola, contra os principais causadores de doenças em frutas e vegetais (*Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Alternaria alternata*, *Alternaria solan*ie, *Penicillium expansum*). Além de outras aplicações na preservação de alimentos, embalagens, utilização como suplementos alimentares, entre outros, e demonstraram bons resultados (DIAS, 2017; LIU et al., 2018; ALVES, 2019; CHEN, W. et al., 2022; CHEN, Y. et al., 2023).

Diversos estudos (PEDRO, 2013; DIAS, 2018; LIU, W. et al., 2018; SABAA, M.W. et al., 2018) mostraram que as modificações estruturais na quitosana, além de melhorar sua solubilidade em pH neutro, afetam a sua atividade antimicrobiana. No trabalho realizado por Sabaa et al. (2018), foi demonstrado pelo método de ágar difusão, na qual mediu-se o halo de inibição, que os derivados de quitosana substituídos com bases de 17ornal apresentam um maior potencial de inibição quando comparado com a quitosana pura, sem modificação na sua estrutura, contra bactérias Gram-positivas (*Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*), Gram-negativas (*Escherichia coli*) e também contra fungos (*Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Geotricum candidum*).

Gabriel, Tiera e De Oliveira Tiera et al. (2015) demonstraram que a atividade antifúngica de derivados anfifílicos de quitosana, com conteúdos fixos de grupos dietilaminoetil (DEAE) e dodecil (DD) exibiu uma forte dependência com a massa molecular (Mw) dos polímeros. Os ensaios in vitro demonstraram que os grupos hidrofóbicos têm um papel central na atividade antifúngica destes anfifílicos e que o estudo da Mw foi essencial para alcançar maior inibição do crescimento fúngico. Os estudos mostraram que as interações polímero-polímero e fungo-polímero são

concomitantes e que, pelo aumento de Mw, as interações polímero-polímero são fortalecidas, diminuindo a atividade antifúngica. Recentemente, Dias et al. (2018) a partir do estudo da interação com modelos de membranas, notou-se que os anfifílicos se ligam fortemente à superfície da membrana celular e que essa adsorção é muito reforçada pela presença de lipídios carregados negativamente, que também são encontrados na composição da membrana do fungo *Aspergillus flavus*. Os estudos demonstraram também que a agregação de constituintes da parede celular, induzida pelo anfifílico, e observada por microscopia eletrônica de transmissão permitiu propor o comprometimento da parede celular.

Os resultados da literatura indicam também que seus derivados possuem uma faixa ótima de valor de Mw e o balanço hidrofílico/hidrofóbico das modificações na cadeia polimérica, o que podem explicar a maior eficiência do polímero contra diferentes microrganismos com diferentes propriedades de membranas (KONG et al. 2010; KUMAR, VIMAL, KUMAR, 2016).

Poucos trabalhos são encontrados na literatura que estudam a atividade antifúngica dos derivados de quitosana contra os principais agentes etiológicos causadores das dermatomicoses. Visto que derivados de quitosana modificados com grupos carregados positivamente já apresentaram boa inibição contra outros fungos (*Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Alternaria alternata*, *Alternaria solan*ie *Penicillium expansum*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*) é promissor estudar esses derivados contra agentes etiológicos das dermatomicoses (DIAS, 2017; LIU et al., 2018; ALVES, 2019).

3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

As infecções fúngicas estão se tornando cada vez mais recalcitrantes, com tratamentos prolongados e com efeitos adversos, e antifúngicos não tão eficazes. Além dos sintomas físicos, as limitações psicológicas e sociais causadas pelas dermatomicoses prejudicam a vida pessoal e profissional da pessoa acometida, afetando a sua qualidade de vida.

A utilização dos derivados de quitosana são promissores para o desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que são biodegradáveis, são atóxicos, são biocompatíveis e

apresentam atividades antimicrobianas. Modificações estruturais na quitosana, bem como a variação da sua massa molecular demonstraram potencializar os seus efeitos contra vários tipos de fungos (GABRIEL et al., 2015; DIAS et al., 2018; ALFARO et al. 2018; DRAGOSTIN et al., 2016).

Assim, considerando o potencial de aplicação dos derivados de quitosana e a importância das dermatomicoses, é algo inovador o teste desses novos compostos contra as infecções superficiais.

4. OBJETIVOS

O presente projeto teve como objetivo geral estudar a atividade antifúngica de diferentes derivados anfífilos de quitosana contra os principais agentes etiológicos de micoses superficiais.

4.1. Objetivos específicos

- i) Determinou-se as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de duas séries de derivados de quitosana, previamente sintetizados e caracterizados, contra cepas padrão e isolados clínicos de diferentes espécies de *Trichophyton* spp., *Epidermophyton* spp., *Microsporum* spp., *Candida* spp e *Fusarium* spp. Em cada série alterou-se parâmetros estruturais dos derivados tais como: conteúdo hidrofóbico, conteúdo hidrofílico e massa molecular.
- ii) Determinou-se as Concentrações Fungicidas Mínimas (CFM) das duas séries de derivados de quitosana, previamente sintetizados e caracterizados, contra cepas padrão e isolados clínicos de diferentes espécies de *Trichophyton* spp., *Epidermophyton* spp., *Microsporum* spp., *Candida* spp e *Fusarium* spp.
- iii) Caracterização da cinética de morte (*time-kill assays*) de derivados e cepas selecionados, que apresentaram melhores inibições.
- iv) Avaliou-se a toxicidade dos derivados selecionados com o modelo *Galleria mellonella*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Derivados anfifílicos

Foram utilizadas duas séries de derivados anfifílicos, sintetizados e caracterizados por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) e estão disponíveis no laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia do IBILCE-UNESP. A série 1 apresenta substituição com Dietilaminoetil (DEAE), que é o grupo hidrofílico, e Dodecil (DOD), que é hidrofóbico, variando-se a porcentagem desses e a massa molecular do polímero. A série 2 apresenta massa molecular e grupo hidrofóbico (DOD) constante e varia-se a porcentagem de grupo hidrofílico (pentiltrimetilamônio (PENTIL)). Na tabela 1 e 2 estão listados as propriedades e estruturas da série DEAE (1) e da série PENTIL (2).

Tabela 1 – Estrutura e propriedades dos polímeros da série 1

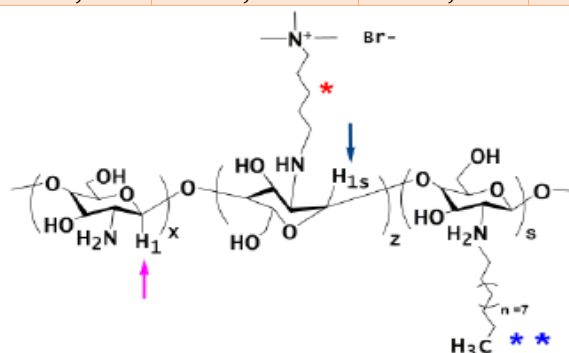
Polímero	Mw (kDa)	Mn (kDa)	Pdi*(Mw/Mn)	DDA**(%)	DS _{DEAE} ⁺ (%)	DS _{DD} ⁺⁺ (%)
CHC ^A	208	108	1,92	77	-	-
CHC ^B	282	208	1,36	75	-	-
CH _L	11	4,3	2,56	97	-	-
DEAE-CH _L	14	5,6	2,51	53	44	-
DEAE-CH _L -DD	14	-	-	29	44	24
DEAE-CHC ^B	267	150	1,78	35	40	-
DEAE-CH-DD ¹¹⁶	116	41,3	2,81	37	40	20
DEAE-CH-DD ¹³⁶	136	45,8	2,97	37	40	20

* Índice de polidispersividade; ** Grau de desacetilação; ⁺Grau de substituição pelos grupos DEAE; e

⁺⁺Grau de substituição por grupos dodecil. Mw: peso molecular.

Tabela 2 – Estrutura e propriedades dos polímeros da série 2

Polímero	Mw (kDa)	Mn (kDa)	Pdi*(Mw/Mn)	DDA**(%)	DS _{PENTIL} ⁺ (%)	DS _{DD} ⁺⁺ (%)
QD4DD5PE	137	70,9	1,93	82,2	4,8	4
QD4DD13PE	137	68,2	2,01	90,3	12,7	4
QD4DD46PE	137	64,3	2,13	46,7	46,3	4



* Índice de polidispersividade; ** Grau de desacetilação; ⁺Grau de substituição pelos grupos PENTIL; e

⁺⁺Grau de substituição por grupos dodecil. Mw: peso molecular.

5.2. Ensaios Microbiológicos

5.2.1. Cepas

Foram utilizadas linhagens clínicas e cepas de referência ATCCs (*American Type Culture Collection*) de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida Krusei*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* e *Fusarium solani*, pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP – Brasil. O uso dessas linhagens foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) para fins de pesquisa acadêmica.

5.2.2. Determinação de CIM

5.2.2.1. Preparo das soluções estoque dos derivados

As soluções estoques de cada polímero foram preparadas na concentração de 2 mg/mL em solução aquosa 10% de ácido acético para os testes com leveduras e 10% de DMSO nos testes com filamentosos. A fim de dissolução, permaneceu sob agitação em

agitador magnético por 24 horas. Em seguida, realizou-se as diluições (1 mg/mL; 0,75 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,1 mg/mL) com o meio de cultura líquido a ser utilizado para o teste (RPMI-1640).

5.2.2.2. Preparação dos inóculos para as cepas clínicas e ATCC

Para as cepas de *Candida* spp., primeiramente foi realizado o repique, com alças estéreis para uma placa de Ágar Sabouraud Dextrose (AS) e incubado por 24 horas à 35°C, em seguida, uma alçada dessa cultura foi suspensa em 5 mL de salina estéril. Ajustou a turbidez, adicionando-se levedura ou salina estéril até obter a transmitância equivalente de uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5, em comprimento de onda 530 nm, de acordo com a metodologia M27-S4E *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2012). Esse procedimento fornece uma suspensão-padrão de levedura contendo 1.10^6 a 5.10^6 células/mL.

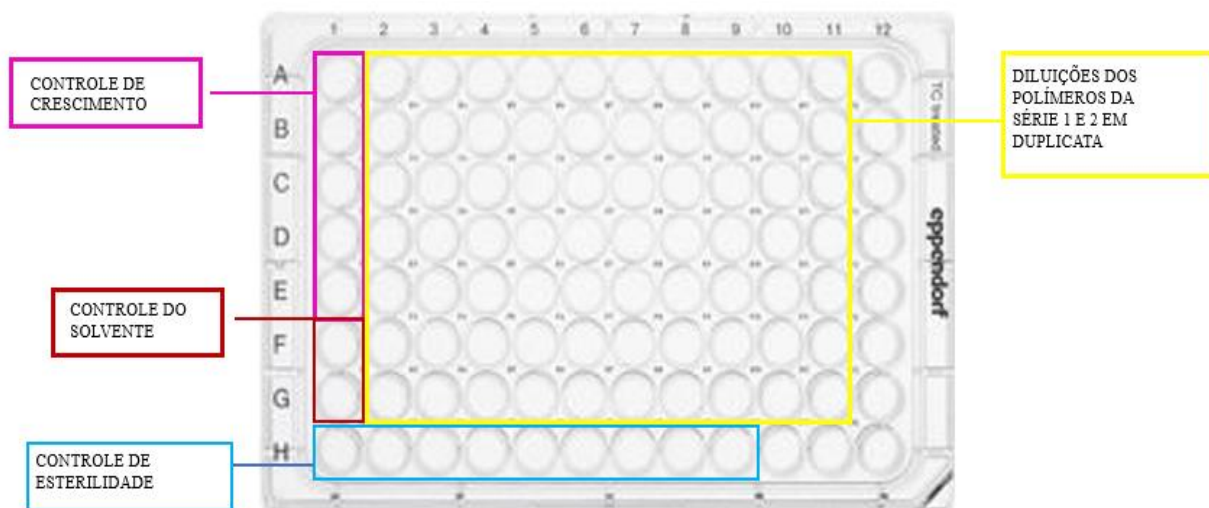
Para as cepas de fungos dermatofíticos, o repique foi realizado com alças estéreis para uma placa contendo Ágar Batata Dextrose (AB) e incubado por 7 dias à 35°C, em seguida, as superfícies das colônias foram cobertas com 5 mL de salina estéril e raspadas com ponteira estéril. A mistura de conídios e fragmentos de hifas foi transferida para um tubo estéril, permitindo a precipitação de estruturas mais pesadas. Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para novo tubo estéril com homogeneização em vórtex por 15 segundos e a turbidez ajustada em espectrofotômetro com leitura a 530 nm, de acordo com a metodologia M38-A2, seguido de diluição das amostras na proporção 1:50, correspondendo a um inóculo final de 0,4 a 5×10^4 unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/mL). O mesmo procedimento foi realizado para as cepas de *Fusarium* spp., entretanto, foram incubadas por 48 a 72 horas a 35°C e depois até o 7º dia a 28°C (CLSI, 2008).

5.2.2.3. Preparo das placas de microdiluição

As CIM foram determinadas pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com o documento (modificado) M27-S4E (CLSI, 2012) para as cepas de leveduras e de acordo com o documento (modificado) M38-A2 (CLSI 2008) para os fungos filamentosos. As placas de microdiluição foram preparadas em diferentes concentrações

de cada derivado de quitosana (1 mg/mL; 0,75 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,1 mg/mL) e com poços de esterilidade (0,2 mL de RPMI), controle do solvente (0,2 mL de solução 10% ácido acético ou DMSO) e controle de crescimento (contendo apenas inóculo e RPMI), como pode ser observado no *layout* (Figura 1). Portanto, foi utilizada uma placa para cada microrganismo.

Figura 1 – *Layout* das placas de microdiluição



Fonte: Elaborado pelo autor

5.2.3. Determinação de CFM

Para a determinação das CFM, após a obtenção das CIMs (item 4.2.2.3), alíquotas de cada poço foram transferidas para placa de petri contendo AS, de acordo com o mesmo *layout*. A transferência do conteúdo dos poços da placa de microdiluição foi realizada utilizando-se palitos estéreis. A CFM foi definida como a menor concentração do derivado que mesmo na ausência em solução não permitiu o crescimento de colônias, possuindo ação fungicida.

Figura 2 – Placa de Ágar Sabouraud após a realização do procedimento



Fonte: foto tirado pelo autor

5.2.4. Determinação da cinética de morte (*time-kill*)

Para a determinação da cinética de morte foi utilizada a metodologia modificada de Toledo et al. (2016). O preparo das soluções dos derivados de acordo com o descrito no item 5.2.2.1.

5.2.4.1. Preparo do inóculo

O repique do microrganismo a ser testado foi realizado de acordo com a metodologia M38-A2 e M27-S4E (CLSI, 2012; CLSI, 2008). Preparou-se a suspensão de inóculo a partir da adição de 50 µL de inóculo padronizado (0,5 da escala de McFarland, em comprimento de onda de 530 nm) em 4,95 mL de Caldo Sabouraud Dextrose.

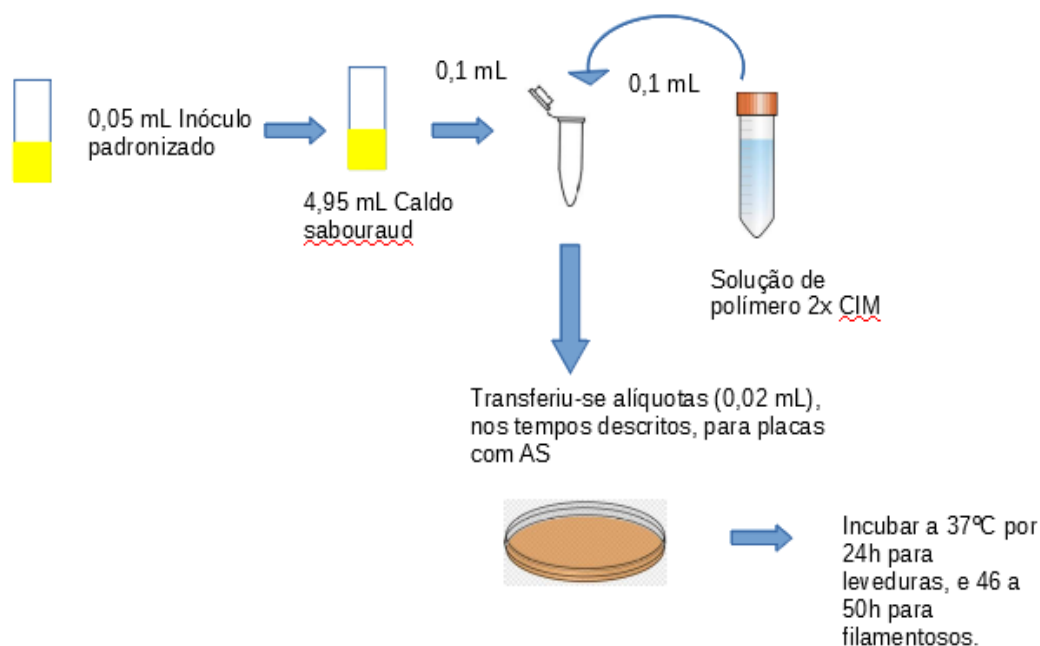
5.2.4.2. Procedimento para a análise da cinética de morte

Em microtubos estéreis, adicionou-se 100 µL do inóculo padronizado e então 100 µL da solução de polímero em concentração 2x maior que a CIM. O tempo para retirada das alíquotas começou a ser contado a partir da adição dos polímeros.

Para as leveduras, alíquotas de 20 µL foram retiradas após 1, 8, 12 e 24 horas, transferiu-se cada uma delas para placa contendo AS e distribuiu-se com alça de Drigalski, por fim, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. No caso de filamentosos, as alíquotas foram retiradas após 8, 24 e 48 horas, distribuindo-se com alça de Drigalski e, por fim, incubadas a 37°C por 46 a 50 horas. O esquema está descrito na Figura 3.

Após o tempo de incubação, contou-se as UFC das placas de cada polímero e do controle de crescimento (ausência de polímero) para realização do gráfico log UFC/mL vs tempo.

Figura 3 – Esquema do procedimento de *time-kill*



Fonte: elaborado pelo autor

5.3. Teste de toxicidade em *Galleria mellonella*

Para caracterizar o perfil de toxicidade dos derivados de quitosana adotou-se o modelo de inóculo segundo protocolo estabelecido por Renwick (2006) – adaptado, em *Galleria mellonella* (RENEWICK et al., 2006). Devido à semelhança ao sistema imune inato de insetos e mamíferos, esse modelo tem sido utilizado para a investigação de virulência em diversos organismos e toxicidade de novos compostos potenciais antimicrobianos (BINDER; MAURER; LASS-FLÖRL, 2016).

As larvas foram mantidas a 28°C no escuro, em recipiente de vidro de 30cm x 20cm, até alcançarem o peso entre 200-250 mg. Após o completo desenvolvimento, foram privadas de alimentação e separadas em grupos de 10 unidades em placa de Petri de vidro para cada condição e diluição dos derivados.

Todas as larvas inoculadas receberam 5 µl de cada derivado testado neste ensaio, além dos controles. Como controle do inóculo, utilizou-se dimetilsulfóxido- DMSO 10% e etanol 100% para o controle positivo de toxicidade.

A inoculação artificial em larvas de *G. mellonella* foi realizada com micro seringa de Hamilton para cromatografia gasosa modelo 7000.5KH de 10 µL. Para cada larva, inoculou-se no centro da ventosa da última pró-pata direita, no sentido anteroposterior para alcançar a hemocele.

Após a fase de inoculação artificial, as larvas foram incubadas a 28°C, privadas de ração e iluminação direta. O mesmo foi feito para os controles de DMSO e etanol 100%. Durante todo o período experimental, a cada 24 h as larvas foram retiradas da pré-pupa, a fim de retardar sua metamorfose. Os dados foram anotados diariamente. A confecção dos gráficos e análises estatística por meio do método Log-rank (Mantel-Cox) foram realizadas no software GraphPad Prism 5.

6.RESULTADOS

6.1 CIM

A CIM dos derivados da série 1 contra *Candida spp.* é mostrada na Tabela 3 no apêndice A. Os controles de crescimento e solvente apresentaram resultados satisfatórios.

Os valores de CIM ficaram entre 100-2000 µg/mL. Foi calculada a média geométrica de cada espécie a fim de atribuir os menores e maiores valores para tais.

Os menores valores, em geral, foram atribuídos às cepas de *Candida tropicalis* e os maiores às de *Candida albicans*. Tais valores atingiram inibição igual ou maior que 90% para as cepas testadas. A *Candida spp.* é considerada um importante patógeno por sua versatilidade e habilidade de viver em diferentes locais anatômicos, é consensual que estes microrganismos são ativos na fisiopatologia do processo da doença, atuando através de diversos mecanismos de agressão denominados fatores de virulência. Os principais fatores de virulência são a formação de biofilmes e secreção de enzimas hidrolíticas (fosfolipases, proteases e hemolisinas), principalmente em *C. albicans* devido à ampla exposição aos antifúngicos. Tal fato provavelmente explica a maior resistência das cepas de *C.albicans*.

A preocupação em relação aos isolados clínicos de *C.tropicalis* é crescente, uma vez que o número de cepas resistentes aos ázóis está sendo significativo. Autores atribuem

essa resistência à superexpressão de transportadores (CDR1 , CDR2 , CDR3 e MDR1), genes da via de biossíntese de ergosterol (ERG1 , ERG2 , ERG3 e ERG11), fatores de transcrição (TAC1 e UPC2) e genes responsivos ao estresse (HSP90 e MKC1). A *C.krusei* possui resistência intrínseca ao fluconazol e desenvolve rapidamente resistência adquirida à outros fármacos, portanto, os menores valores de atividade antifúngica dos derivados de quitosana associados à essas espécies são vantajosos e promissores.

No trabalho de Lindberg et al. (2019), em que foram analisados isolados de pacientes com candidemia, observou-se suscetibilidade reduzida de *C.glabrata* ao fluconazol (CIM 90= 16 µg/ml). Os dados foram comparados com os valores de MIC expostos no EUCAST (EUCAST, 2012).

Apesar dos valores encontrados de MIC para os derivados de quitosana serem maiores que os valores para os antifúngicos convencionais, a vantagem é que todos os derivados são atóxicos nessas concentrações e inibem 90% ou mais dos microrganismos. Além disso, estudos demonstram que a combinação de derivados de quitosana ou outros fármacos com uma menor concentração do fármaco convencional, como fluconazol, diminui o valor do MIC, potencializando os efeitos (LEMES, T. et al., 2023; GRISIN, T et al., 2017).

Figura 4. Derivados da série 1 contra *Candida tropicalis* ATCC



Fonte:foto tirado pelo autor

A CIM dos derivados da série 1 contra espécies de filamentosos dermatófitos e *Fusarium* spp. é mostrada na Tabela 4 no apêndice A. Os controles de crescimento e solvente apresentaram resultados satisfatórios. Os valores de CIM ficaram entre 100-2000 µg/mL. Foi calculada a média geométrica de cada espécie a fim de atribuir os menores e maiores valores para tais.

Os menores valores, em geral, foram obtidos para *F. solani*, exceto com o derivado CHC_a, e os maiores para *T. rubrum*. Entretanto, os seguintes polímeros: DEAE_CHL_DD; DEAE_CH_DD¹¹⁶ e DEAE_CH_DD¹³⁶ também atingiram os menores valores de CIM (100 µg/mL) contra E.F.6117, E.F.6069, T.M. 7389, T.M.5419, T.M.6007, M.C. 7422 e M.C. ATCC.

A CIM dos derivados da série 2 contra espécies de filamentosos dermatófitos e *Fusarium* spp. é mostrada na Tabela 5 no apêndice A. Os controles de crescimento e solvente apresentaram resultados satisfatórios. Os valores de CIM ficaram entre 100-2000 µg/mL. Foi calculada a média geométrica de cada espécie a fim de atribuir os menores e maiores valores para tais.

Os menores valores, em geral, foram obtidos para *F.solani* e os maiores para *T.rubrum* sp. Porém, os seguintes polímeros: CH4DD13PE; CH4DD46PE obteve-se os menores valores de CIM (100 µg/mL) contra T.M. 5419 e T.M. 7389.

Os valores variáveis de CIM encontrados para as cepas clínicas e ATCC da mesma espécie deve-se, possivelmente, ao fato de ser amostras coletadas de diferentes locais anatômicos, a possibilidade das cepas desenvolverem mutações gênicas, aos diferentes antifúngicos expostos de cada cepa e a resposta clínica de cada indivíduo (GAURAV, V., 2021; LEMES, T. et al, 2023).

Segundo Garauv (2021), a recalcitrância das cepas isoladas de dermatofitoses, como as de *Trycophyton* se deve, principalmente, ao uso indiscriminado dos antifúngicos convencionais, que colabora para diferentes fatores de virulência, adaptabilidade ao hospedeiro ou variação de susceptibilidade aos fármacos (incluindo mecanismos de resistência, como a presença de sistemas de efluxo e formação de biofilmes).

No trabalho de Goy (2016) também foi observada boa atividade antifúngica dos derivados de quitosana de média massa molecular substituídos com N,N,N-trimetil contra cepas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, demonstrando que esses derivados de quitosana substituídos com grupos hidrofílicos e hidrofóbicos possuem ação contra diversos microrganismos. Essa atividade da quitosana tem sido atribuída principalmente à adsorção das cadeias de quitosana na parede celular e na membrana celular, desencadeada principalmente por interações eletrostáticas (ALVES, A.C.R.S., et al, 2019).

6.2 Determinação de CFM

Todos os resultados obtidos de CFM dos derivados das séries 1 e 2 contra as cepas de *Candida* spp, filamentosos dermatófitos e *Fusarium* são iguais aos respectivos valores de CIM. Tal fato mostra que os derivados apresentam ação fungicida contra os fungos, uma vez que na sua ausência eles não tornam a crescer.

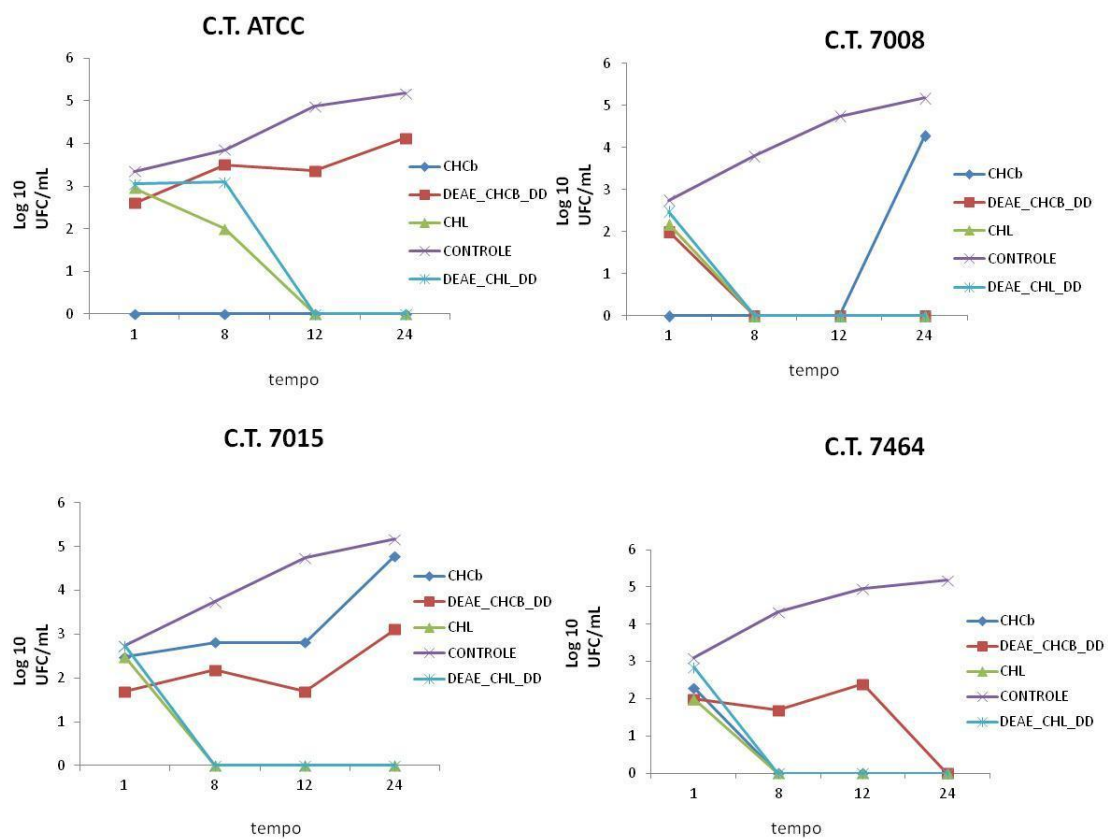
6.3 Avaliação da cinética de morte (*time-kill*)

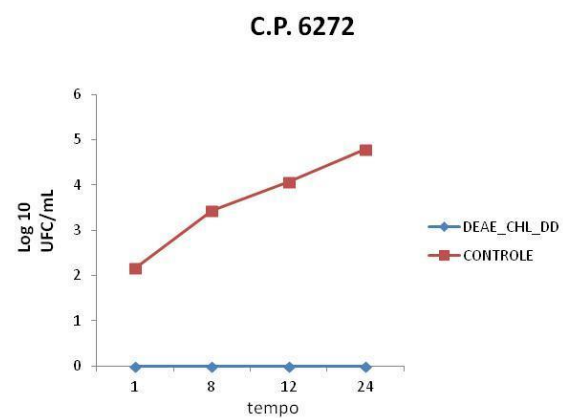
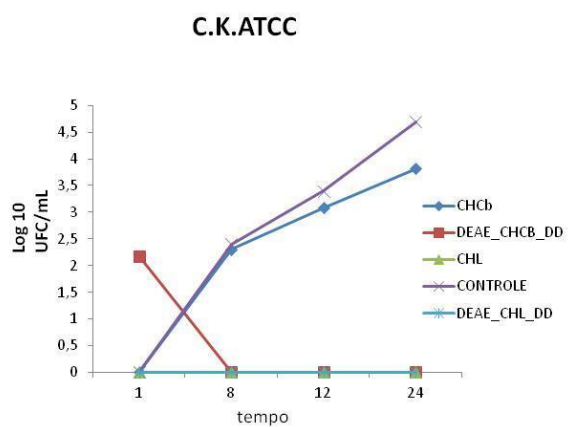
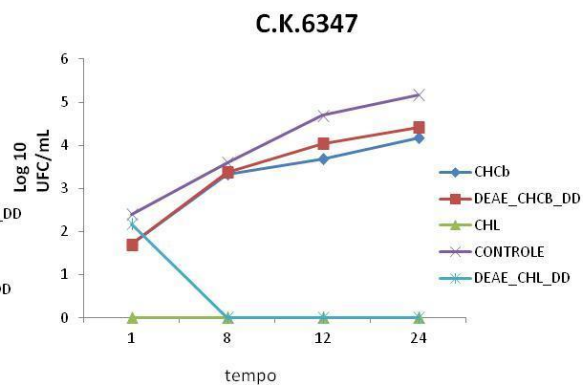
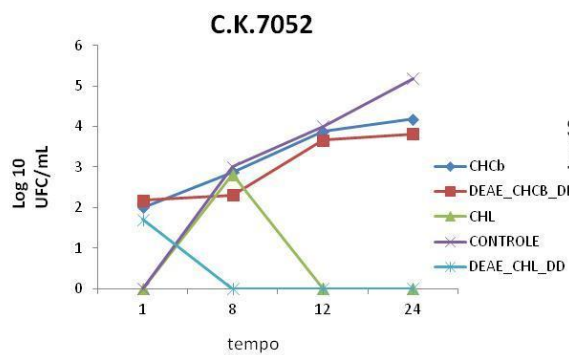
O seguinte ensaio foi realizado para polímeros selecionados, que apresentaram melhores resultados de CIM, a fim de obter os gráficos de log UFC/mL VS tempo. O ensaio foi conduzido até 24 horas para leveduras e 48h para filamentosos. Foram expostos à uma concentração 2x à CIM, e dessa maneira, foi possível determinar o tempo máximo necessário de ação dos polímeros para os fungos selecionados.

A figura 5 mostra os valores para as cepas de *Candida tropicalis*, *krusei* e *parapsilosis* contra os polímeros selecionados. Os polímeros CHL e DEAE_CHL_DD inibiram totalmente todas as cepas, no máximo, em 12 horas. Os menores tempos de ação (1 hora) foram observados com esses polímeros contra C.K.ATCC, o CHL contra C.K.6347 e DEAE_CHL_DD contra C.P.6272, C.P.6186 e C.P. ATCC. O polímero CHCb inibiu totalmente algumas cepas (C.T. ATCC e C.T. 7464), em no máximo 8 horas, outras, porém, tornam a crescer após 12 horas, provavelmente ocorra a precipitação ao passar do tempo, perdendo a sua ação inibitória. O polímero DEAE_CHCb_DD inibiu totalmente as cepas C.T. 7008 e C.K. ATCC em no máximo 8 horas. A figura 6 mostra os valores para as cepas de *T.rubrum*, *T.mentagrophytes*, *M.canis*, *E. floccosum* e *F.solani*.

Todos os polímeros testados contra *T.rubrum* inibiram totalmente em 8 horas de contato. Já para *T.mentagrophytes* todos inibiram em, no máximo, 24 horas, porém, em 8 horas o S2_13 inibiu todas as cepas. As cepas de *M.canis* e *E.floccosum* foram todas inibidas com todos os polímeros, em 48 horas. Todos os polímeros contra as cepas de *F.solani* inibiram em, no máximo, 8 horas.

Figura 5 – Gráficos log UFC/mL vs tempo contra *Candida* spp.





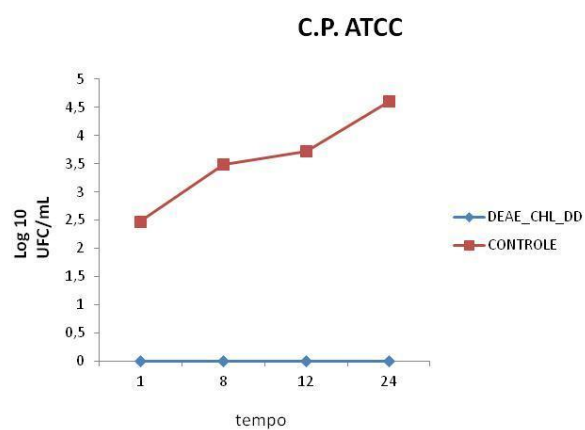
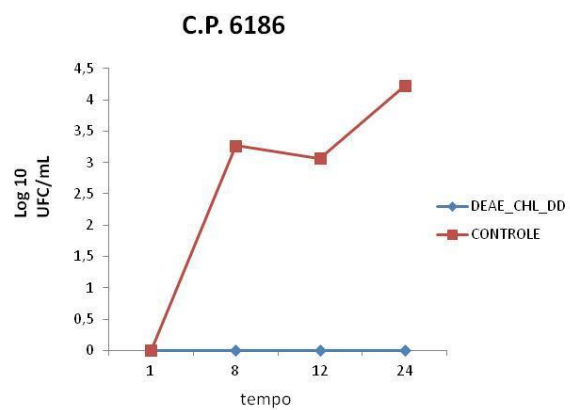
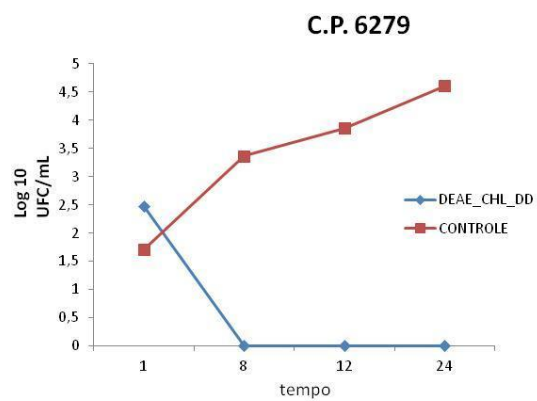
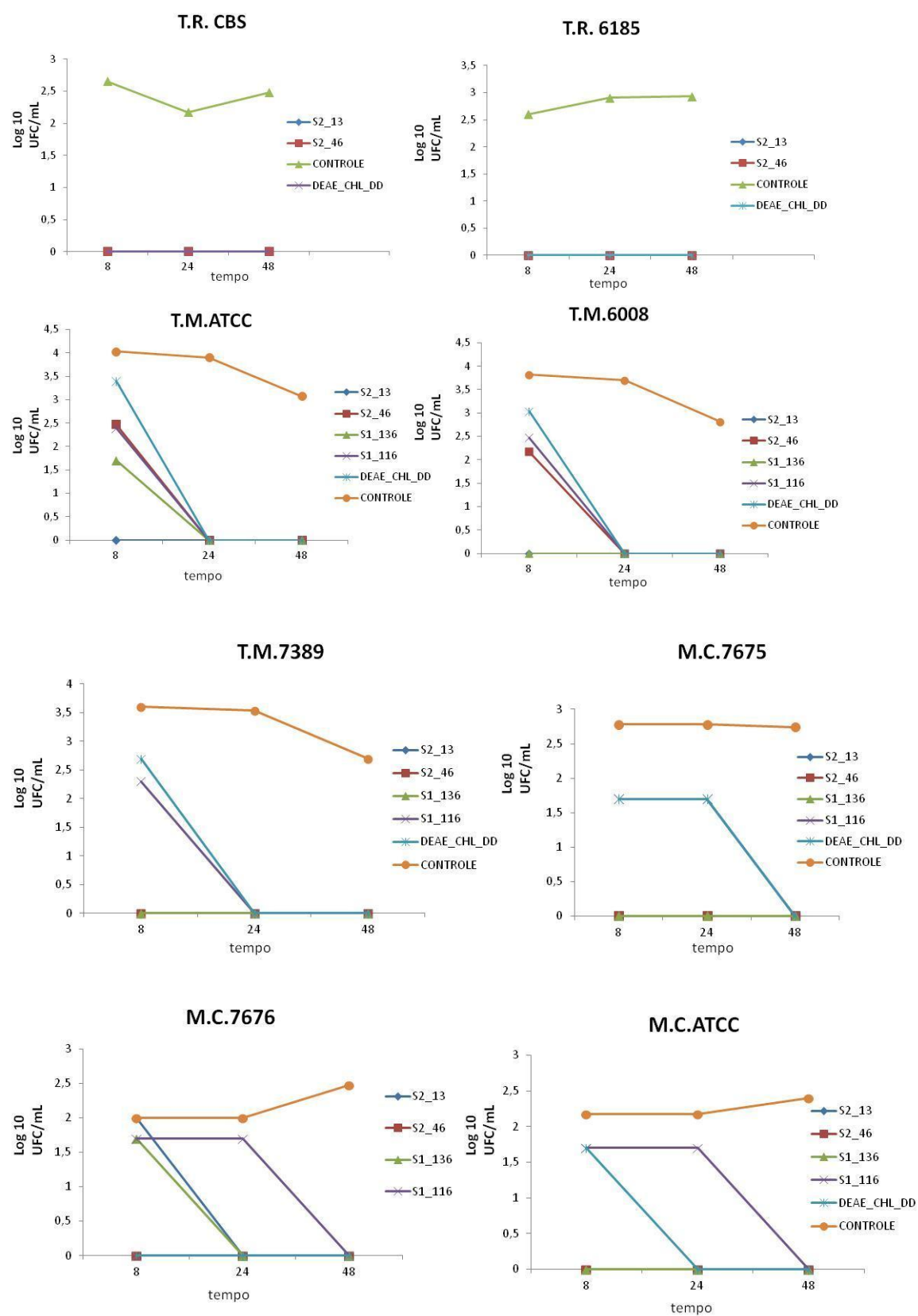
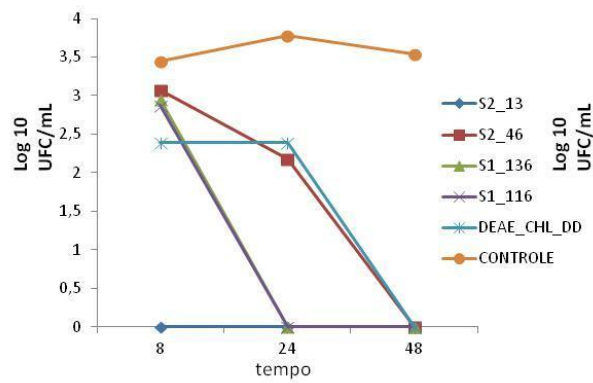
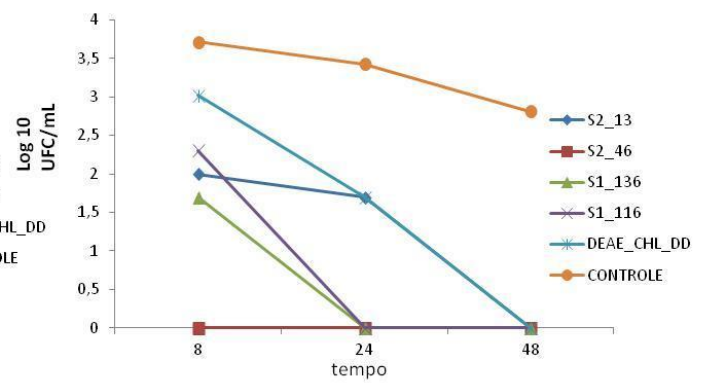
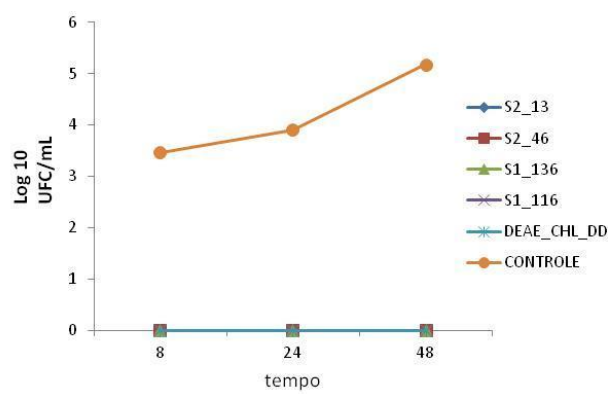
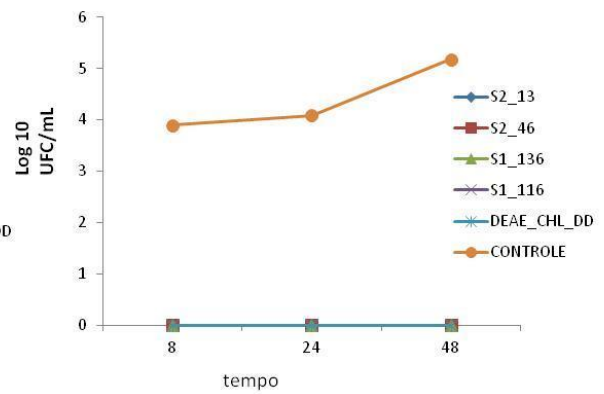
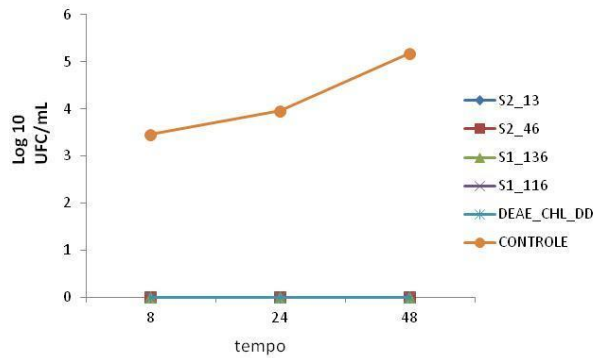


Figura 6 – Gráficos log UFC/mL vs tempo contra filamentosos



E.F. 6068**E.F. 6069****F.S. 4318****F.S. 4696****F.S. 4129**

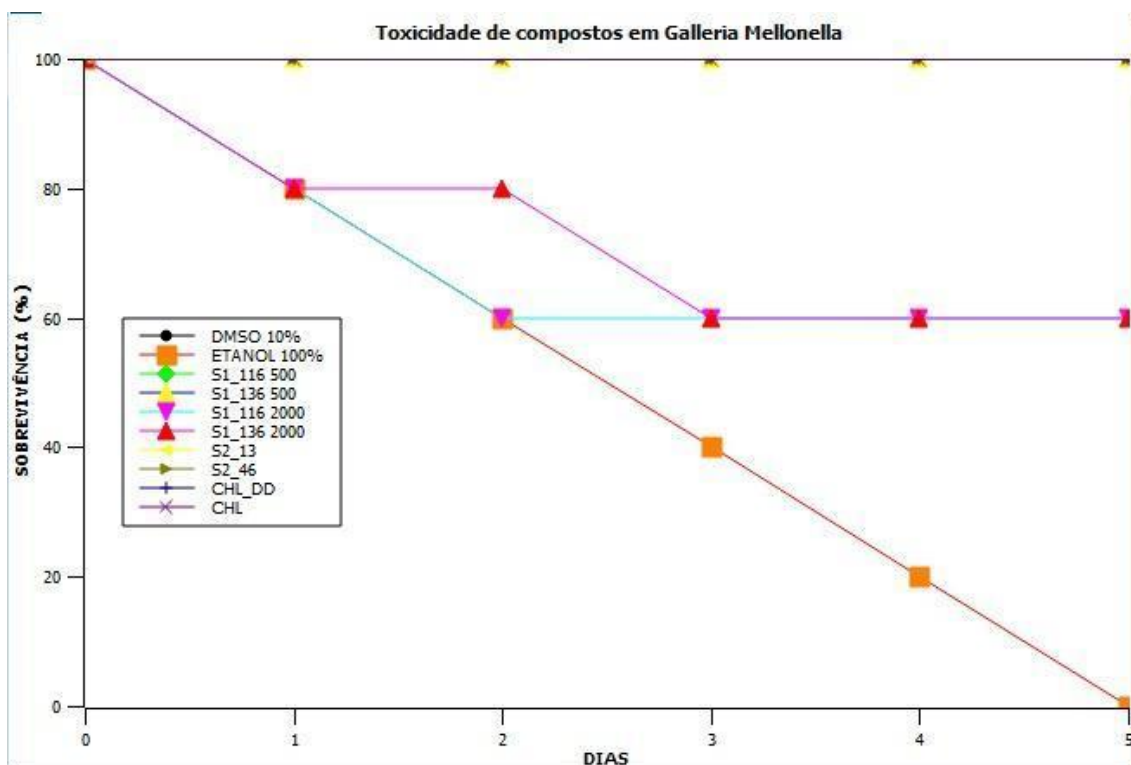
6.4. Teste de toxicidade em *Galleria mellonella*

O ensaio de atividade citotóxica utilizando-se larvas de *Galleria mellonella* foi realizado com os derivados selecionados: CHL; DEAE_CHL_DD; S1_116; S1_136; S2_13; S2_46, pois mostraram ser mais eficazes, nas concentrações de 500 e 2000 mg/mL.

Os resultados mostraram que os derivados não são tóxicos na concentração de 500 mg/mL, uma vez que as larvas apresentaram 100% de sobrevivência. Porém, com os derivados S1_116 e S1_136 na concentração de 2000 mg/mL obteve-se 60% de sobrevivência das larvas.

As larvas também sobreviveram 100% com o controle utilizado (DMSO 10%), demonstrando não haver toxicidade sobre o solvente utilizado na solubilização dos derivados.

Figura 7: Gráfico da taxa de sobrevivência (%) das larvas de *Galleria mellonella* inoculadas com os derivados de quitosana



CAPÍTULO 2: ARTIGO I

Letícia de Queiroz Mozaner¹, Taiza Maschio-Lima¹, Bianca Gottardo de Almeida¹, Natália Seron Brizzotti-Mazuchi², Mariela Domiciano Ribeiro², Maicon Henrique Caetano¹, Thiago Henrique Lemes¹, Vera Aparecida Tiera¹, João Paulo Zen Siqueira², Elza Maria Castilho², Margarete Teresa Gottardo de Almeida²

Affiliations:

¹São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, São José do Rio Preto, Brazil.

²São José do Rio Preto School of Medicine (FAMERP), Dept. of Dermatological, Infectious, and Parasitic Diseases São José do Rio Preto, Brazil.

Corresponding author:

Margarete Teresa Gottardo de Almeida

e-mail: margarete@famerp.br

Acknowledgments: Authors would like to the financial support of the National Council for the Improvement of Higher Education (CAPES) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), for the scholarships granted. We acknowledge the Multi-user Laboratory (LMU) at São Jose do Rio Preto (Famerp).

Statements & Declarations: Funding not applicable.

Resumo

As infecções fúngicas afetam milhares de pessoas com ocorrências superficiais e/ou invasivas. Nos últimos anos, tem sido observado que as infecções são causadas por fungos com padrão resistente aos antimicrobianos. A terapêutica delas estão cada vez mais prolongadas e com altas taxas de recorrência. As micoses cutâneas ou dermatomicoses apresentam variedade de agentes etiológicos, tais como dermatófitos, leveduras e fungos filamentosos não dermatófitos. A busca por compostos não tóxicos, inibidores do crescimento de fungos, tem impulsionado a pesquisa nesta área. Portanto, no presente estudo foi realizado uma série de testes para avaliar a atividade antifúngica de derivados anfifílicos da quitosana, um composto biodegradável, atóxico, antioxidante e que tem apresentado diversos resultados eficazes contra diversos microrganismos. Os derivados de quitosana com média massa molecular e com porção hidrofóbica (dodecil) e hidrofílica (dietilaminoetil ou pentiltrimetilamônio) apresentaram melhores inibições, com MIC entre 100 e 500 µg/mL para diferentes cepas de *Candida* spp.

Introdução

As micoses cutâneas ou dermatomicoses apresentam variedade de agentes etiológicos, tais como dermatófitos, leveduras e fungos filamentosos não dermatófitos. Os dermatófitos como *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* são os principais causadores de dermatomicoses, porém, a incidência de agentes não-dermatófitos tem crescido significativamente^{1,2}. Os principais agentes não dermatófitos são: *Scopulariopsis brevicaulis*, *Aspergillus* spp, *Acremonium*, *Fusarium* spp, *Alternaria alternate*, *Neoscytalidium* e *Candida* spp. A *Candida* spp. É responsável por cerca de 10-20% dos casos de onicomicoses. Os tratamentos convencionais consistem em: itraconazol, fluconazol ou terbinafinas via oral, ou ainda efinaconazol, tavaborol e ciclopirox via tópica, entretanto, os tratamentos via tópica costumam ser longos e com baixas taxas de cura permanente, enquanto os antifúngicos via oral são mais eficazes e rápidos, porém, possuem efeitos adversos como hepatotoxicidade e reações medicamentosas^{3,4}. Portanto, a busca por compostos não tóxicos, inibidores do crescimento de fungos, têm impulsionado a pesquisa nesta área. Nesse cenário, a quitosana é considerada única e promissora, pois a quitina possui grupos amino na natureza e é um composto com comprovada ação anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, entre outras, além de

ser degradável e não tóxico⁵. A desacetilação da quitina e inserção de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos potencializam a sua atividade, evidenciando o potencial dos derivados de quitosana como antifúngico^{6,7}.

Objetivo

O presente estudo avaliou a ação antifúngica de derivados anfifílicos de quitosana contra cepas de *Candida* spp., um dos principais agentes etiológicos, não dermatófitos, das dermatomicoses.

Metodologia

Microrganismos: Foram utilizados pra este estudo linhagens de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, e *Candida krusei* pertencentes a coleção do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, São Paulo, Brasil.

Obtenção dos derivados de quitosana: Foram utilizadas duas séries de derivados anfifílicos, sintetizados e caracterizados por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) e Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) e estão disponíveis no laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia do IBILCE-UNESP. A série 1 apresenta substituição com dietilaminoetil (DEAE) e dodecil (DOD), variando-se a porcentagem desses e a massa molecular do polímero. A série 2 apresenta massa molecular e grupo hidrofóbico (DOD) constante e varia-se a porcentagem de grupo hidrofílico pentiltrimetilamônio (PENTIL). Na tabela 1 e 2, no apêndice B, estão listados as propriedades e estruturas da série DEAE (1) e da série PENTIL (2).

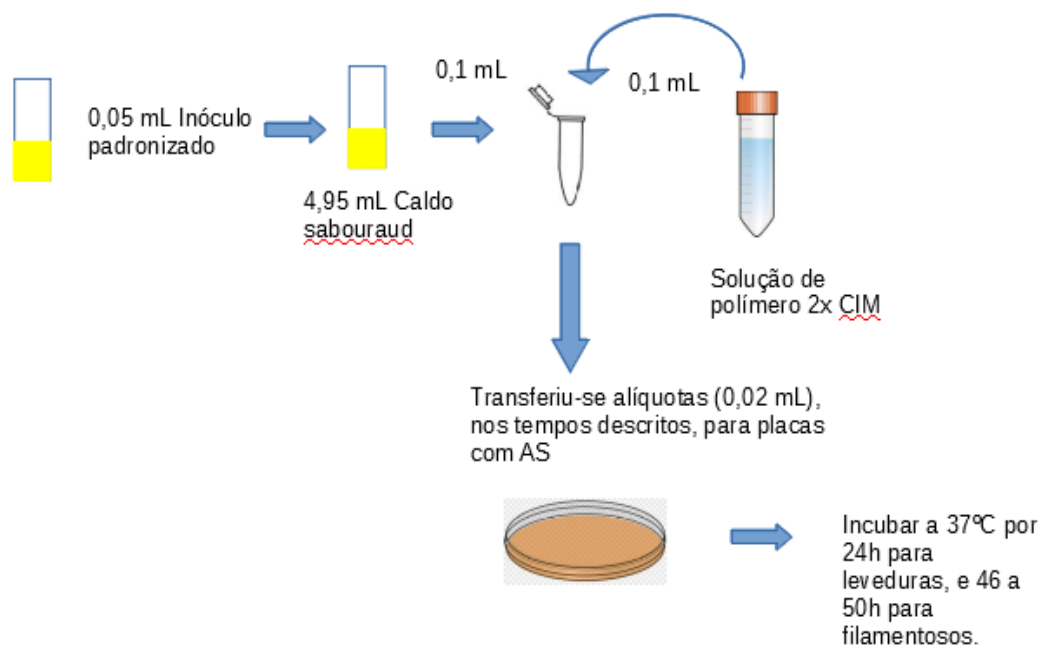
Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM):

As soluções estoque de cada polímero foram preparadas na concentração de 2 mg/mL em solução aquosa 10% de ácido acético. A fim de dissolução, permaneceu sob agitação em agitador magnético por 24 horas. Em seguida, realizou-se as diluições (1 mg/mL; 0,75 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,1 mg/mL) com o meio de cultura líquido a ser utilizado para o teste (RPMI-1640). Primeiramente foi realizado o repique, com alças estéreis para uma placa de Ágar Sabouraud Dextrose (AS) e incubado por 24 horas à 35°C, em seguida, uma alçada dessa cultura foi suspensa em 5 mL de salina estéril. Ajustou a turbidez, adicionando-se levedura ou salina estéril até obter a transmitância

equivalente de uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5, em comprimento de onda 530 nm, de acordo com a metodologia M27-S4E *Clinical and Laboratory Standard Institute*⁶. Esse procedimento fornece uma suspensão-padrão de levedura contendo 1.10^6 a 5.10^6 células/mL. As CIM foram determinadas pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com o documento (modificado) M27-S4E6. As placas de microdiluição foram preparadas em diferentes concentrações de cada derivado de quitosana (1 mg/mL; 0,75 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,1 mg/mL) e com poços de esterilidade (0,2 mL de RPMI), controle do solvente (0,2 mL de solução 10% ácido acético ou DMSO) e controle de crescimento (contendo apenas inóculo e RPMI). Para a determinação das CFM, após a obtenção das CIMs, as alíquotas de cada poço foram transferidas para placa de petri contendo Ágar Sabouraud. A transferência do conteúdo dos poços da placa de microdiluição foi realizada utilizando-se palitos estéreis. A CFM foi definida como a menor concentração do derivado que mesmo na ausência em solução não permitiu o crescimento de colônias, possuindo ação fungicida.

Time-kill: Em microtubos estéreis, adicionou-se 100 µL do inóculo padronizado e então 100 µL da solução de polímero em concentração 2x maior que a CIM. O tempo para retirada das alíquotas começou a ser contado a partir da adição dos polímeros. Alíquotas de 20 µL foram retiradas após 1, 8, 12 e 24 horas, transferiu-se cada uma delas para placa contendo AS e distribuiu-se com alça de Drigalski, por fim, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. O esquema está descrito na Figura 1.

Figura 1. Esquema de determinação da cinética de morte



Citotoxicidade (in vivo): Para caracterizar o perfil de toxicidade dos derivados de quitosana adotou-se o modelo de inóculo segundo protocolo estabelecido por Renwick (2006) – adaptado, em *Galleria mellonella*. Devido à semelhança ao sistema imune inato de insetos e mamíferos, esse modelo tem sido utilizado para a investigação de virulência em diversos organismos e toxicidade de novos compostos potenciais antimicrobianos. Após a fase de inoculação artificial, as larvas foram incubadas a 28°C, privadas de ração e iluminação direta. O mesmo foi feito para os controles de DMSO e etanol 100%. Durante todo o período experimental, a cada 24 h as larvas foram retiradas da pré-pupa, a fim de retardar sua metamorfose. Os dados foram anotados diariamente. A confecção dos gráficos e análises estatística por meio do método Log-rank (Mantel-Cox) foram realizadas no software GraphPad Prism 5.

Resultados: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A CIM dos derivados da série 1 contra *Candida spp.* é mostrada na Tabela 2 no apêndice B. Os controles de crescimento e solvente apresentaram resultados satisfatórios.

Os valores de CIM ficaram entre 100-2000 µg/mL. Foi calculada a média geométrica de cada espécie a fim de atribuir os menores e maiores valores para tais.

Os menores valores, em geral, foram atribuídos às cepas de *Candida tropicalis* e os maiores às de *Candida albicans*. Tais valores atingiram inibição igual ou maior que 90% para as cepas testadas.

Quanto a CFM, todos os resultados obtidos são iguais aos respectivos valores de CIM. Tal fato mostra que os derivados apresentam ação fungicida contra os fungos.

Determinação da cinética de morte (time-kill): O seguinte ensaio foi realizado para polímeros selecionados, que apresentaram melhores resultados de CIM, a fim de obter os gráficos de log UFC/mL VS tempo. O ensaio foi conduzido até 24 horas. Foram expostos à uma concentração 2x à CIM, e dessa maneira, foi possível determinar o tempo máximo necessário de ação dos polímeros para os fungos selecionados. A Figura 2 no apêndice B mostra os gráficos de tempo x log 10 de Unidade Formadora de Colônias (UFC) por mL para as cepas com cada derivado.

Perfil de toxicidade com *Galleria melonella*: O ensaio de atividade citotóxica utilizando-se larvas de *Galleria mellonella* foi realizado com os derivados selecionados: CHL; DEAE_CHL_DD; S1_116 (DEAE_CH_DD¹¹⁶); S1_136 (DEAE_CH_DD¹³⁶), pois mostraram ser mais eficazes, nas concentrações de 500 e 2000 mg/mL. Os resultados mostraram que os derivados não são tóxicos nas concentrações analisadas, conforme pode-se analisar na Figura 3 no apêndice B.

Discussão e Conclusão: As dermatomicoses são micoses que atingem os tecidos queratinizados, como pele, unhas e cabelo, podem ser causadas por fungos filamentosos dermatófitos, não dermatófitos ou leveduras. Atingem cerca de 25% da população do mundo, e vem sendo observado aumento da frequência de casos⁸. A distribuição dos patógenos e os agentes etiológicos variam de acordo com a geografia, clima e migração da população da região. Geralmente, em infecções de unhas (onicomicoses), os agentes etiológicos mais encontrados são os dermatófitos: *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, mas também há uma quantidade significativa de fungos filamentosos não dermatófitos, tais como: *Scopulariopsis brevicaulis*, *Aspergillus* spp., *Acremonium*, *Fusarium* spp., *Alternaria alternate*, e *Neoscytalidium*. Assim como as leveduras (*Candida* spp.) são responsáveis por 10%-20% dos casos de onicomicoses⁹. A incidência dos casos de onicomicoses por leveduras é maior em casos de pacientes idosos, com diabetes e

imunocomprometidos, pois as leveduras como a *Candida* spp. Estão presente na microbiota normalmente, porém, devido algum desequilíbrio nesta se tornam patogênicas. O manejo da onicomicose induzida por *Candida* spp. Ainda é desafiador devido à complexidade da etiologia da doença, que requer uma formulação adequada e um potente antifúngico¹⁰.

Diversos estudos mostraram que diferentes modificações na estrutura polimérica da quitosana afetam sua solubilidade em água e sua atividade antimicrobiana^{6,7,11,12}. Além disso, a atividade antifúngica de derivados anfifílicos de quitosana, com conteúdo fixos de grupos dietilaminoetil (DEAE) e dodecil (DD) exibiu uma forte dependência com a massa molecular (Mw) dos polímeros¹³.

Em Alves et al. (2019)¹⁴ polímeros com DEAE e DOD apresentaram altos valores de inibição contra *Aspergillus flavus* e excelentes condições na formação de biofilmes com esses derivados. A ação dos derivados de quitosana sobre diferentes microrganismos é complexo e depende de vários fatores, por exemplo, o peso molecular do derivado, o tamanho da cadeia, o grau de acetilação, o pH do meio, entre outros fatores¹⁵. O grau de desacetilação, polidispersão e massa da quitosana são os parâmetros mais significativos que influenciam em suas propriedades biológicas, físico-químicas, mecânicas e, consequentemente, sua aplicação pois influenciam na solubilidade, reatividade, comportamento ácido-base, comportamento eletrostático, flexibilidade, conformação do polímero, viscosidade, cristalinidade, porosidade, resistência à tração, condutividade, capacidade de quelar metais e fotoluminescência. Dessa forma, as atividades biológicas da molécula são alteradas, uma vez que depende de tais características para reagir com enzimas, proteínas, parede celular, DNA, RNA, células tumorais etc¹⁶.

Nesse sentido, o presente estudo avaliou derivados de moléculas de quitosana, variando-se a proporção de moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas e sua massa molecular. Os polímeros que possuem o grupo hidrofílico (DEAE) e o grupo hidrofóbico (DOD) foram os que apresentam menores valores da média geométrica de CIM e CFM contra todas as cepas testadas, e entre esses os de menor massa molecular apresentaram os menores valores contra as cepas de *C.tropicalis* (311,2 µg/mL) e *C.krusei*. (500 µg/mL).

A preocupação em relação aos isolados clínicos de *C.tropicalis* é crescente, uma vez que o número de cepas resistentes aos azóis está sendo significativo. Autores atribuem essa resistência à superexpressão de transportadores (CDR1, CDR2, CDR3 e MDR1),

genes da via de biossíntese de ergosterol (ERG1 , ERG2 , ERG3 e ERG11), fatores de transcrição (TAC1 e UPC2) e genes responsivos ao estresse (HSP90 e MKC1)^{17,18}.

A incidência de doenças causadas por *Candidas não-albicans* cresceu significativamente, e a *C.krusei* é uma das responsáveis. As infecções causadas por *Candida krusei* podem ser um risco de vida em pacientes imunocomprometidos, além disso, ela possui resistência intrínseca ao fluconazol e desenvolve rapidamente resistência adquirida à outros fármacos¹⁹.

Em conclusão, os derivados anfifílicos de quitosana, principalmente os de baixa e média massa molecular apresentaram resultados promissores contra a *Candida* spp., principalmente *C.tropicalis* e *C.krusei*. Dessa maneira, é de alto potencial o estudo dessas moléculas para outros agentes etiológicos e posterior formulação com esses fármacos.

Referências

1. LEUNG AKC, Lam JM, Leong KF, Hon KL, Barankin B, Leung AAM, Wong AHC. Onychomycosis: An Updated Review. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 2020;14(1):32-45. Doi: 10.2174/1872213X13666191026090713. PMID: 31738146; PMCID: PMC7509699.
2. VEIGA FF, de Castro-Hoshino LV, Rezende PST, Baesso ML, Svidzinski TIE. Insights on the etiopathogenesis of onychomycosis by dermatophyte, yeast and non-dermatophyte mould in ex vivo model. *Exp Dermatol.* 2022 Jul 12. Doi: 10.1111/exd.14643. Epub ahead of print. PMID: 35818750.
3. GUPTA AK, Carviel J, Shear NH. Onychomycosis and Chronic Fungal Disease: Exploiting a Commensal Disguise to Stage a Covert Invasion. *J Cutan Med Surg.* 2018 May/Jun;22(3):318-322. Doi: 10.1177/1203475417745827. Epub 2017 Dec 1. PMID: 29191054.
4. Gupta AK, Carviel J, Shear NH. Antibiofilm Treatment for Onychomycosis and Chronic Fungal Infections. *Skin Appendage Disord.* 2018 Aug;4(3):136-140. Doi: 10.1159/000480023. Epub 2017 Oct 11. PMID: 30197888; PMCID: PMC6120382.
5. PEDRO, R. O. et al. Synthesis, characterization and antifungal activity of quaternary derivatives of chitosan on *Aspergillus flavus*. **Microbiol.Res**, v. 168, p. 50–55, 2013.

6. DIAS, A.M. et al. Insights on the Antifungal Activity of Amphiphilic Derivatives of Diethylaminoethyl Chitosan against *Aspergillus Flavus*. **Carbohydr. Polym.**, v. 196, p. 433–444, 2018.
7. SABAA, M.W. et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of Schiff bases modified chitosan-graft-poly(acrylonitrile). **International Journal of Biological Macromolecules**, v.109, p. 1280–1291, 2018.
8. PERUSINHA, C.G.; ROSADO, C. LENCASTRE, A. Novos avanços no tratamento da onicomicose. *Revista SPDV*, v. 3, p.239-243, 2019.
9. MARTINEZ-ROSSI, N.M. et al. State-of-the-Art Dermatophyte Infections: Epidemiology Aspects, Pathophysiology, and Resistance Mechanisms. **Journal of Fungi**, v. 7, p. 629, 2021.
10. SOUZA, S.M.A et al. Polishing the Therapy of Onychomycosis Induced by *Candida* spp.: Amphotericin B–Loaded Nail Lacquer. *Pharmaceutics*. 2021 May 24. Doi: 10.3390/pharmaceutics13060784.
11. LIU, W. et al. Synthesis, characterization and antifungal efficacy of chitosan derivatives with triple quaternary ammonium group. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 942-949, 2018.
12. SOUZA, R.H.F.V. et al. Hydrophobic Effect of Amphiphilic Derivatives of Chitosan on the Antifungal Activity against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Molecules**, v. 18, p. 4437-4450, 2013.
13. GABRIEL, J.D.S.; TIERA, M.J.; DE OLIVEIRA TIERA, V.A. Synthesis, Characterization, and Antifungal Activities of Amphiphilic Derivatives of Diethylaminoethyl Chitosan against *Aspergillus flavus*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 63, p. 5725–5731, 2015.
14. ALVES, A.C.R.S, et al. Biopolymeric Films of Amphiphilic Derivatives of Chitosan: A Physicochemical Characterization and Antifungal Study. **International journal of Molecular Sciences**, v.20, p.4173, 2019.

15. GOY, G.C., et al. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, p.122-127, 2015.
16. PHILIBERT T., LEE B.H., FABIEN N. Current Status and New Perspectives on Chitin and Chitosan as Functional Biopolymers. **Biochem. Biotechnol.** 2017.
17. PANDEY, N et al. Overexpression of efflux pump transporter genes and mutations in ERG11 pave the way to fluconazole resistance in *Candida tropicalis*: A study from a North India region. **Journal of global antimicrobial resistance**, v.22, p.374-378, 2020.
18. PAUL,S. Dynamics of in vitro development of azole resistance in *Candida tropicalis*. *Journal of global antimicrobial resistance*, v.22,p.553-561, 2020.
19. JAMIU, A.T. J et al. Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. *Medical Mycology*, v..59, p. 14–30, 2021.

CAPÍTULO 3: ARTIGO II**Antifungal effect, *in vitro*, of chitosan derivatives against etiological agents of
dermatomycosis**

Letícia de Queiroz Mozaner¹, Taiza Maschio-Lima¹, Bianca Gottardo de Almeida¹,
Natália Seron Brizzotti-Mazuchi², Mariela Domiciano Ribeiro², Maicon Henrique
Caetano¹, Thiago Henrique Lemes¹, Vera Aparecida Tiera¹, Márcio Tiera,¹ João Paulo
Zen Siqueira², Elza Maria Castilho², Margarete Teresa Gottardo de Almeida²

Affiliations:

¹São Paulo State University (UNESP), Institute of Biosciences, Humanities and Exact
Sciences, São José do Rio Preto, Brazil.

²São José do Rio Preto School of Medicine (FAMERP), Dept. of Dermatological,
Infectious, and Parasitic Diseases São José do Rio Preto, Brazil.

Corresponding author:

Margarete Teresa Gottardo de Almeida

e-mail: margarete@famerp.br

Statements & Declarations: Funding not applicable.

Abstract

Fungal infections affect thousands of people with both superficial and invasive occurrences. In recent years, it has been observed that these infections are caused by fungi with antimicrobial-resistant patterns. Their therapies are becoming increasingly prolonged with high recurrence rates. Cutaneous mycoses or dermatomycoses have a variety of etiological agents, such as dermatophytes, yeasts, and non-dermatophyte filamentous fungi. The search for non-toxic compounds that inhibit fungal growth has driven research in this area. Therefore, the present study conducted a series of tests to evaluate the in vitro antifungal activity of amphiphilic derivatives of chitosan, a biodegradable, non-toxic, antioxidant compound that has shown various effective results against various etiological agents. The derivatives showed geometric mean of MIC and MFC values against strains of filamentous dermatophytes and non-dermatophytes ranging from 100-500 mg/mL. The kinetics demonstrated that all polymers against *F. solani* and *T. rubrum* strains inhibited within a maximum of 8 hours of contact, while for *T. mentagrophytes*, all inhibited within a maximum of 24 hours.

Introduction

Dermatomycoses are superficial fungal infections which affect the skin, hair and nails of humans and animals. Male and female patients of all ages are affected by this condition. The main etiological agents of dermatomycoses are the dermatophytes fungi of the genera *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton*, while the main yeasts belong to the genera *Candida*, *Malassezia* and *Trichosporon* and also non-dermatophytic fungi, such as: *Scopulariopsis brevicaulis*, *Aspergillus spp*, *Acremonium*, *Fusarium spp*, *Alternaria alternate*, *Neoscytalidium*^{1,2,3}. Chitosan is a biopolymer derived from chitin, which is present in the exoskeletons of crustaceans, mollusks, algae, insects, and fungal cell walls. Its broad applications span various fields, including food, medicine, pharmaceuticals, healthcare, agriculture, industry, and environmental pollution protection. This is attributed to its reactive amino and hydroxyl groups, providing chitosan with diverse functional properties such as polyelectrolyte, antimicrobial, antioxidant, gel-forming, biocompatibility, metal chelating, and ease of processing⁴. The deacetylation of chitin and the introduction of hydrophilic and hydrophobic groups enhance its activity, highlighting the potential of chitosan derivatives as antifungals^{5,6}.

Lay summary

The present study assessed the antifungal action of amphiphilic chitosan derivatives against the primary etiological agents of superficial mycoses, dermatomycoses.

Materials and methods

Microrganisms

For this study, strains of *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* e *Fusarium solani* from the collection of the Microbiology Laboratory at the School of Medicine of São José do Rio Preto – FAMERP, São Paulo, Brazil, were used.

Chitosan Derivatives

Two series of amphiphilic derivatives, synthesized and characterized by techniques such as Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR) and Gel Permeation Chromatography (GPC), are available in the Biomaterials and Nanotechnology Laboratory at IBILCE-UNESP. Series 1 features substitution with diethylaminoethyl (DEAE) and dodecyl (DOD), varying the percentage of these and the molecular weight of the polymer. Series 2 has a constant molecular weight and a hydrophobic group (DOD), with varying percentages of the hydrophilic pentyltrimethylammonium (PENTIL) group. Table 1 and 2 list the properties and structures of the DEAE (1) and PENTIL (2) series.

Table 1 – Structure and Properties of series 1

Polymer	Mw (kDa)	Mn (kDa)	Pdi*(Mw/Mn)	DDA**(%)	DS _{DEAE} *(%)	DS _{DD} *(%)
CH _C ^A	208	108	1.92	77	-	-
CH _C ^B	282	208	1.36	75	-	-
CH _L	11	4.3	2.56	97	-	-
DEAE-CH _L	14	5.6	2.51	53	44	-
DEAE-CH _L DD	14	-	-	29	44	24

DEAE-CH_c^B	267	150	1.78	35	40	-
DEAE-CH-DD¹¹⁶	116	41.3	2.81	37	40	20
DEAE-CH-DD¹³⁶	136	45.8	2.97	37	40	20

R = dodecyl

Table 2 – Structure and Properties of series 2

Polymer	Mw (kDa)	Mn (kDa)	Pdi*(Mw/Mn)	DDA** (%)	DSPENTIL+ (%)	DSDD++ (%)
CH4DD5PE	137	70,9	1,93	82,2	4,8	4
CH4DD13PE	137	68,2	2,01	90,3	12,7	4
CH4DD46PE	137	64,3	2,13	46,7	46,3	4

R = dodecyl

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC):

Stock solutions of each polymer were prepared at a concentration of 2 mg/mL in a 10% aqueous solution of acetic acid. To ensure dissolution, they were stirred on a magnetic stirrer for 24 hours. Subsequently, dilutions were made (1 mg/mL; 0.75 mg/mL; 0.5 mg/mL; 0.25 mg/mL; 0.1 mg/mL) with the liquid culture medium to be used for the test (RPMI-1640). Initially, subculturing was performed using sterile loops onto Potato Dextrose Agar (PDA) plates and incubated for 7 days at 35°C. Subsequently, the colony surfaces were covered with 5 mL of sterile saline and scraped with a sterile pipette tip. The conidia and hyphal fragments mixture was transferred to a sterile tube, allowing the precipitation of heavier structures. Later, the supernatant was transferred to a new sterile tube with vortex homogenization for 15 seconds, and turbidity was adjusted on a spectrophotometer with a reading at 530 nm, following the M38-A2 methodology.

Samples were then diluted at a ratio of 1:50, resulting in a final inoculum of 0.4 to 5×10^4 colony-forming units per milliliter (CFU/mL). The same procedure was carried out for *Fusarium* spp. strains, although they were incubated for 48 to 72 hours at 35°C and then up to the 7th day at 28°C ⁷.

MICs were determined using the microdilution technique in broth, following the (modified) M27-S4E6 document. Microdilution plates were prepared with different concentrations of each chitosan derivative (1 mg/mL; 0.75 mg/mL; 0.5 mg/mL; 0.25 mg/mL; 0.1 mg/mL) and included wells for sterility (0.2 mL of RPMI), solvent control (0.2 mL of 10% acetic acid or DMSO solution), and growth control (containing only inoculum and RPMI).

For the determination of MFC, after obtaining MIC, aliquots from each well were transferred to a Petri dish containing Sabouraud Agar. The contents of the microdilution plate wells were transferred using sterile sticks. The MFC was defined as the lowest concentration of the derivative that, even in the absence of a solution, did not allow the growth of colonies, demonstrating fungicidal action.

Time-kill

In sterile microtubes, 100 μL of the standardized inoculum was added, followed by 100 μL of the polymer solution at a concentration 2 times higher than the MIC. The time for collecting aliquots began counting from the addition of the polymers. Aliquots of 20 μL were withdrawn after 8, 24 and 48 hours, each of them was transferred to a plate containing Sabouraud Agar and distributed with a Drigalski loop. Finally, the plates were incubated at 37°C for 46 to 50 hours.

Cytotoxicity (in vivo)

To characterize the toxicity profile of the chitosan derivatives, the inoculum model as per the protocol established by Renwick (2006) - adapted for *Galleria mellonella* was adopted. Due to the resemblance to the innate immune system of insects and mammals, this model has been used for investigating virulence in various microorganisms and the toxicity of potential new antimicrobial compounds. After the artificial inoculation phase, the larvae were incubated at 28°C , deprived of food and direct light, following the same procedure for the DMSO and 100% ethanol controls. Throughout the experimental

period, every 24 hours, the larvae were removed from the pre-pupal stage to delay their metamorphosis. Data were recorded daily. Graph construction and statistical analyses using the Log-rank (Mantel-Cox) method were carried out using GraphPad Prism 5 software.

Results

The MIC (Minimum Inhibitory Concentration) of derivatives from series 1 against filamentous dermatophyte species and *Fusarium* spp. is shown in Table 3. The growth and solvent controls yielded satisfactory results. The MIC values ranged between 100-2000 µg/mL. The geometric mean was calculated for each species to assign the smallest and largest values.

In general, the lowest values were obtained for *F. solani*, except for the CHCa derivative, and the highest values were for *T. rubrum*. However, the following polymers: DEAE_CHL_DD; DEAE_CH_DD¹¹⁶, and DEAE_CH_DD¹³⁶ also achieved the lowest MIC values (100 µg/mL) against E.F.6117, E.F.6069, T.M. 7389, T.M.5419, T.M.6007, M.C. 7422, and M.C. ATCC.

The MIC of derivatives from series 2 against filamentous dermatophyte species and *Fusarium* spp. is shown in Table 4. The growth and solvent controls yielded satisfactory results. The MIC values ranged between 100-2000 µg/mL. The geometric mean was calculated for each species to assign the smallest and largest values.

In general, the lowest values were obtained for *F. solani*, and the highest for *T. rubrum* sp. However, the following polymers: CH4DD13PE and CH4DD46PE achieved the lowest MIC values (100 µg/mL) against T.M. 5419 and T.M. 7389.

As for MFC, all the obtained results are close to their respective MIC values. This fact demonstrates that the derivatives exhibit fungicidal action against the fungi.

The time-kill assay was conducted for selected polymers that showed the best MIC results in order to obtain log CFU/mL vs. time graphs (Figure 1). The assay was carried out for up to 48 hours. They were exposed to a concentration 2 times the MIC, allowing for the determination of the maximum required action time of the polymers for the selected fungi.

All the polymers tested inhibited *T. rubrum* completely within 8 hours of contact. For *T. mentagrophytes*, they all inhibited within a maximum of 24 hours; however, CH4DD13PE inhibited all strains within 8 hours. Strains of *M. canis* and *E. floccosum* were all inhibited by all polymers within 48 hours. All polymers against *F. solani* strains inhibited within a maximum of 8 hours.

The cytotoxicity assay using *Galleria mellonella* larvae was performed with the selected derivatives: CHL; DEAE_CHL_DD; DEAE_CH_DD¹¹⁶; DEAE_CH_DD¹³⁶; CH4DD13PE and CH4DD46PE, as they proved to be more effective at concentrations of 500 and 2000 mg/mL. The results indicated that the derivatives are non-toxic at the analyzed concentrations (Figure 2).

Discussion and conclusion

Dermatomycoses are fungal infections that affect keratinized tissues such as skin, nails, and hair. They can be caused by filamentous dermatophytes, non-dermatophytes, or yeasts. These infections affect approximately 25% of the world's population, and there has been an observed increase in the frequency of cases. This can be attributed to various factors, including the use of occlusive footwear, poor hygiene, socioeconomic status, occupation, climate change, predisposing factors (such as immunosuppression/deficiency and diabetes), and improvements in diagnostic tests and medical care⁸.

The antifungals commonly used include azoles, polyenes, allylamines, hydroxypyridones, heterocyclic benzofurans, and echinocandins. The mechanisms of action of these drugs generally involve inhibiting some step in the ergosterol synthesis pathway, preventing the proper formation of the fungal membrane, or acting on the inhibition of essential compounds in the formation of the cell wall. However, many of these antifungals have low oral bioavailability; for example, imidazole and itraconazole exhibit high toxicity upon systemic administration (first-generation azoles). Others, like fluconazole, have good oral bioavailability; however, upon discontinuation of treatment, there may be a recurrence of infection, suggesting low binding avidity^{9,10}.

Therefore, various studies have shown that different modifications in the chitosan polymer structure affect its water solubility and antimicrobial activity. Additionally, the antifungal activity of amphiphilic chitosan derivatives with fixed contents of

diethylaminoethyl (DEAE) and dodecyl (DD) groups showed a strong dependence on the polymer's molecular weight (Mw)^{11,12,13}.

The literature results also indicate that its derivatives have an optimal range of molecular weight (Mw) values and a hydrophilic/hydrophobic balance of modifications in the polymeric chain. This may explain the greater efficiency of the polymer against different microorganisms with varying membrane properties^{14,15}. From the study of interaction with membrane models, it was observed that amphiphiles strongly bind to the surface of the cell membrane, and this adsorption is greatly enhanced by the presence of negatively charged lipids, which are also found in the composition of the *Aspergillus flavus* fungus membrane. Studies have also shown that the amphiphile-induced aggregation of cell wall constituents, observed through transmission electron microscopy, allowed for the proposal of compromising the cell wall integrity¹².

In this study, was observed the lowest values were obtained for *F. solani*, and the highest values were for *T. rubrum*. The recalcitrance of isolated strains of dermatophytosis, such as those of *Trichophyton*, is primarily due to the indiscriminate use of conventional antifungals, contributing to various virulence factors, host adaptability, or variation in drug susceptibility (including resistance mechanisms, such as the presence of efflux systems and biofilm formation)¹⁶.

In conclusion it was observed that low and medium molecular weight derivatives with hydrophobic (DD) and hydrophilic (PE or DEAE) groups showed higher efficiency against the majority of tested strains demonstrating the importance of the hydrophobic and hydrophilic balance on the antifungal activity of the derivatives against various etiological agents and are non-toxic, as demonstrated in the *Galleria* model.

References

1. LEUNG AKC, Lam JM, Leong KF, Hon KL, Barankin B, Leung AAM, Wong AHC. Onychomycosis: An Updated Review. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov.* 2020;14(1):32-45. doi: 10.2174/1872213X13666191026090713. PMID: 31738146; PMCID: PMC7509699.
2. VEIGA FF, de Castro-Hoshino LV, Rezende PST, Baesso ML, Svidzinski TIE. Insights on the etiopathogenesis of onychomycosis by dermatophyte, yeast and non-dermatophyte mould in ex vivo model. *Exp Dermatol.* 2022 Jul 12. doi: 10.1111/exd.14643. Epub ahead of print. PMID: 35818750.
3. SILVA-ROCHA WP, et al. Epidemiology and fungal species distribution of superficial mycoses in Northeast Brazil. *Journal De Mycologie Médicale* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.08.009>
4. PELLIS A.; GUEBITZ, G. M.; NYANHONGO G.S. Chitosan: Sources, Processing and Modification Techniques. *Gels* 2022, 8, 393. <https://doi.org/10.3390/gels8070393>
5. DIAS, A.M. et al. Insights on the Antifungal Activity of Amphiphilic Derivatives of Diethylaminoethyl Chitosan against *Aspergillus Flavus*. **Carbohydr. Polym**, v. 196, p. 433–444, 2018.
6. SABAA, M.W. et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of Schiff bases modified chitosan-graft-poly(acrylonitrile). **International Journal of Biological Macromolecules**, v.109, p. 1280–1291, 2018.
7. CLSI. M38-A2 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard—Second Edition. **Clinical and Laboratory Standard Institute**, v. 28, n. 16, p. 29, 2008.

8. MARTINEZ-ROSSI, N.M. et al. State-of-the-Art Dermatophyte Infections: Epidemiology Aspects, Pathophysiology, and Resistance Mechanisms. **Journal of Fungi**, v. 7, p. 629, 2021
9. KHURANA, A.; SARDANA, K.; CHOWDARY, A. Antifungal resistance in dermatophytes: Recent trends and therapeutic implications. **Fungal Genetics and biology**, v.132, p. 103255, 2019.
10. SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. Candida Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. **BioMed Research International**, 2013.
11. PEDRO, R. O. et al. Synthesis, characterization and antifungal activity of quaternary derivatives of chitosan on *Aspergillus flavus*. **Microbiol.Res**, v. 168, p. 50–55, 2013.
12. DIAS, A.M. et al. Insights on the Antifungal Activity of Amphiphilic Derivatives of Diethylaminoethyl Chitosan against *Aspergillus Flavus*. **Carbohydr. Polym**, v. 196, p. 433–444, 2018.
13. LIU, W. et al. Synthesis, characterization and antifungal efficacy of chitosan derivatives with triple quaternary ammonium group. **International journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 942-949, 2018.
14. KUMAR, A.; VIMAL, A. & KUMAR, A. Why Chitosan? From properties to perspective of mucosal drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 91, p. 615-622, 2016.
15. KONG, M. et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*. v. 144, p. 51–63, 2010.
16. GAURAV, V. et al. Terbinafine resistance in dermatophytes: Time to revisit alternate antifungal therapy. *J Mycol Md*. 2021 Mar;31(1):101087. doi: 10.1016/j.mycmed.2020.101087. Epub 2020 Nov 19. PMID: 33360137.

7.CONCLUSÃO

Os derivados apresentaram CIM e CFM entre 100-2000 µg/mL, entre eles, os derivados: CHL, DEAE_CHL_DD, S1_116, S1_136, S2_13 E S2_46 foram os mais eficazes, com médias geométricas de CIM e CFM contra cepas de *Candida*, filamentosos dermatófitos e *Fusarium* entre 100-500 mg/mL.

A cinética de morte estudada contra as cepas de *Candida* comprovou que os polímeros CHL e DEAE_CHL_DD inibiram totalmente todas as cepas, no máximo, em 12 horas e os menores tempos de ação (1 hora) foram observados com esses polímeros contra C.K.ATCC, o CHL contra C.K.6347 e DEAE_CHL_DD contra C.P.6272, C.P.6186 e C.P. ATCC. Para os filamentosos, a cinética demonstrou que todos os polímeros contra as cepas de *F.solani* e *T.rubrum* inibiram em, no máximo, 8 horas de contato, enquanto para *T.mentagrophytes* todos inibiram em, no máximo, 24 horas, porém, em 8 horas o S2_13 inibiu todas as cepas.

Os polímeros citados demonstram boa atividade antifúngica e são atóxicos, como demonstrado no modelo com *Galleria*. Os derivados que apresentam em sua estrutura uma porção hidrofílica (DEAE ou PENTIL) e outra hidrofóbica (Dodecil), de baixa e média massa molar, foram os com melhores atividades antifúngicas.

REFERÊNCIAS

ALFARO, L. et al. Development of water-soluble chitosan powder and its antimicrobial effect against inoculated *Listeria innocua* NRRL B-33016 on shrimp. **Food Control**, v. 85, p. 453-458, 2018.

ALVES, A.C.R.S. **Síntese, Caracterização e Atividade Antimicrobiana de Filmes Biopoliméricos de Derivados de Quitosana**. 2019. 98 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto, 2019.

ANDRÉS, T.; ALEXANDRO, B. Candida Onychomycosis: an Old Problem in Modern Times. **Current Fungal Infection Reports**, v.14, p.209–216, 2020.

BABAYANI, M. et al. Onychomycosis due to dermatophytes species in Iran Prevalence rates, causative agents, predisposing factors and diagnosis based on microscopic morphometric findings. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 28, p. 45-50, 2018

BIASI-GARBIN, R.P. Antifungal potential of plant species from Brazilian caatinga against dermatophytes. **Rev. Ins. Med. Trop. São Paulo**, v. 58, p.18, 2016.

CLSI. M38-A2 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard—Second Edition. **Clinical and Laboratory Standard Institute**, v. 28, n. 16, p. 29, 2008.

CLSI. M27-S4E. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Second Edition. **Clinical and Laboratory Standard Institute**, v. 28, n. 16, p. 29, 2012.

DE AGUIAR PERES, N. T. et al. Dermatófitos: Interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 657–667, 2010.

DE TOLEDO, L.G. et al. Essential Oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: A Strategy to Combat Fungal Infections Caused by *Candida* Species. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 1252, 2016.

DEMBSKEY, N.; ABRAHAMSE, H. Laser Therapy for the Treatment of Onychomycosis: Best Evidence Based Practice or Not?. **Clin Res Foot Ankle**, v. 4, p.21, 2016.

DIAS, A.M. Derivados anfifílicos de quitosana como agentes antimicrobianos: estudo da atividade e mecanismo de ação. 2017. 86f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto, 2017.

DIAS, A.M. et al. Insights on the Antifungal Activity of Amphiphilic Derivatives of Diethylaminoethyl Chitosan against *Aspergillus Flavus*. **Carbohydr. Polym**, v. 196, p. 433–444, 2018.

DRAGOSTIN, O. M. et al. New antimicrobial chitosan derivatives for wound dressing applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 141, p. 28-40, 2016.

ESQUENAZI, D. et al. The influence of surface carbohydrates during in vitro infection of mammalian cells by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 144-153, 2004.

EL-ADLY, A.M. et al. Evaluation of chitosan and silver nanoparticles Against isolated pathogens from Mulberry Silkworm, *Bombyx mori* L.(Lepidoptera: Bombycidae) under laboratory conditions. **Braslian Journal of Microbiology**, v. 82, 2022.

GABRIEL, J.D.S.; TIERA, M.J.; DE OLIVEIRA TIERA, V.A. Synthesis, Characterization, and Antifungal Activities of Amphiphilic Derivatives of Diethylaminoethyl Chitosan against *Aspergillus flavus*. **J. Agric. Food Chem**, v. 63, p. 5725–5731, 2015.

GHANNOUM, M.; ISHAM, N. Fungal Nail Infections (Onychomycosis): A Never-Ending Story? **PloS Pathogens**, v. 10, n. 6, p. e1004105, 5 jun. 2014.

GRANT, R.L. Primary cultures of rabbit corneal epithelial cells as an experimental model to evaluate ocular toxicity and explore modes of action of toxic injury. **Toxicology in vitro**, 2019.

GRISIN, T. et al. Cyclodextrin-mediated self-associating chitosan micro-platelets act as a drug booster against *Candida glabrata* mucosal infection in immunocompetent mice. **I.J.of pharmaceutics**, v.519, p. 381-389, 2017.

GUPTA, A. K. et al. High prevalence of mixed infections in global onychomycosis. *PloS ONE*, v. 15, n. 9 September, p. 1–8, 2020a.

GUPTA, A. K.; MAYS, R. R. The Impact of Onychomycosis on Quality of Life: A Systematic Review of the Available Literature. **Skin Appendage Disorders**, v. 1, p. 1–9, 2018.

HOKKEN, M.W.J. et al. Facilitators of adaptation and antifungal resistance mechanisms in clinically relevant fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 132, p.103254, 2019.

HOOG, G.S. et al. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 182, p.5-31, 2017.

INOUE, Y.; TOGASHI, N.; HAMASHIMA, H. Farnesol-Induced Disruption of the *Staphylococcus aureus* Cytoplasmic Membrane. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 39, n. 5, p. 653–6, 2016.

KHOSRAVI, A. R. et al. Yeasts as important agents of onychomycosis: *in vitro* activity of Propolis against yeasts isolated from patients with nail infection. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 19, n. 1, p. 57–62, 2013.

KHURANA, A.; SARDANA, K.; CHOWDARY, A. Antifungal resistance in dermatophytes: Recent trends and therapeutic implications. **Fungal Genetics and biology**, v.132, p. 103255, 2019.

KONG, M. et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*. V. 144, p. 51–63, 2010.

KULIKOV, N.S. et al. Antifungal activity of oligochitosans (short chain chitosans) against some *Candida* species and clinical isolates of *Candida albicans*: Molecular weightactivity relationship. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 74,p. 169-178, 2014.

KUMAR, A.; VIMAL, A. & KUMAR, A. Why Chitosan? From properties to perspective of mucosal drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 91, p. 615-622, 2016.

LEMES, T.H. et al. Combinatorial effect of fluconazole, itraconazole, and terbinafine with different culture extracts of *Candida parapsilosis* and *Trichophyton* spp. against *Trichophyton rubrum*. **Int Microbiol.** 2023.

LIMA, C.S. et al. Anti-Candida and anti-Cryptococcus evaluation of 15 non-alkaloidal compounds from *Pterogyne nitens*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.6, p.841-845, 2016.

LIU, W. et al. Synthesis, characterization and antifungal efficacy of chitosan derivatives with triple quaternary ammonium group. **International journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 942-949, 2018.

MARTINEZ-ROSSI, N.M. et al. State-of-the-Art Dermatophyte Infections: Epidemiology Aspects, Pathophysiology, and Resistance Mechanisms. **Journal of Fungi**, v. 7, p. 629, 2021

MONOD, M. Antifungal resistance in dermatophytes: Emerging problem and challenge for the medical community. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 29, p. 283-284, 2019.

MONTARIN, D.T.A.; DE ALMEIDA, M.T.G.; COLOMBO, T.E. Onicomycoses: estudo epidemiológico e micológico no município de São José do Rio Preto, SP. **Journal Health Sci. Inst**, v.33, p. 118-121, 2015.

MOUBASHER, A. H.; ABDEL-SATER, M. A.; SOLIMAN, Z. Incidence and biodiversity of yeasts, dermatophytes and non-dermatophytes in superficial skin infections in Assiut, Egypt. **Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology**, 2017.

NOWICKA, D.; NAWROT, U. Tinea pedis—An embarrassing problem for health and beauty—A narrative review. *Mycoses*, p. 1-11, 2021.

OTASEVIC, S. et al. Species distribution and epidemiological characteristics of superficial fungal infections in Southeastern Serbia. **Mycoses**, v. 62, p. 458-465, 2019.

PEDRO, R. O. et al. Synthesis, characterization and antifungal activity of quaternary derivatives of chitosan on *Aspergillus flavus*. **Microbiol.Res**, v. 168, p. 50–55, 2013.

PERUSINHA, C.G.; ROSADO, C. LENCASTRE,A. Novos avanços no tratamento da onicomicose. *Revista SPDV*, v. 3,p.239-243, 2019.

RAMOS, R.R. Photodynamic action of protoporphyrin IX derivatives on *Trichophyton rubrum*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 91, p. 135-140, 2016.

REIS, C.M.S. et al. Avaliação micológica das amostras ungueais de pacientes com diagnóstico clínico de onicomicos atendidos no Hospital Universitário de Brasília. **Brasília Med**, v. 47, p. 320-325, 2010.

RENEWICK, J. et al. Susceptibility of larvae of *Galleria mellonella* to Infection by *Aspergillus fumigatus* is dependent upon stage of conidial germination. **Mycopathologia**, v. 161, n. 6, p. 377–384, 2006.

RUIZ-CRUZ, S. et al. Effects of chitosan-tomato plant extract edible coatings on the quality and shelf life of chicken fillets during refrigerated storage. **Food Science and Technology**, v. 39, p. 103-11, 2018.

SABAA, M.W. et al. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of Schiff bases modified chitosan-graft-poly(acrylonitrile). **International Journal of Biological Macromolecules**, v.109, p. 1280–1291, 2018.

SANTOS, C.E.M. **Virtual InSilicoTox: plataforma de triagem toxicológica in 64ornal em tempo real e interface com laboratório virtual como método alternativo ao uso de animais**. 2019. Disponível em: <https://bv.fapesp.br/pt/auxilios/96063/virtual-insilicotox-plataforma-de-triagem-toxicologica-in-silico-em-tempo-real-e-interface-com-labo/>. Acesso em: 14 jan. 2020.

SANTOS, V.S. et al. Avaliação e caracterização de biofilme comestível de carboximetilcelulose contendo nanopartículas de quitosana e Cúrcuma longa. **Revista Matéria**, v.26, 2021.

SARDI, J.C.O. et al. Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm0 formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v.62, p.10-24, 2013.

SEELIG, V.C. **Questões relacionadas ao uso de modelos animais em pesquisa científica**. 2007. 41 f. Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SENEVIRATNE, C.J.; JIN, L.; SAMARANAYAKE, L.P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral diseases**, v.14, p.582-590, 2008.

SEYFARTH, F. et al. Antifungal effect of high- and low molecular weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida Krusei* and *Candida glabrata*. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 353, p. 139-148,

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. **BioMed Research International**, 2013.

TAYEL, A.A. et al. Anticandidal action of fungal chitosan against *Candida albicans*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, p.454-457, 2010.

TOX PLATFORM – *Machine-learning models for a new toxicology*. Disponível em: <https://www.is-tox.com/our-models>. Acesso em: 14 jan. 2020.

VLAHOVIC, T.C. Onychomycosis: Evaluation, Treatment Options, Managing Recurrence, and Patient Outcomes. **Clin. Podiatr. Med. Surg.**, v.33, p. 305-318, 2016.

WISSELINK, G.J.; VAN ZANTEN, E.; KOOISTRA-SMID, A.M.D. Trapped in keratin; a comparison of dermatophyte detection in nail, skin and hair samples directly from clinical samples using culture and real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, p. 62-66, 2011.

ZANARDI, D. et al. Avaliação dos métodos diagnósticos para onicomicose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, p. 1-7, 2008.

ZIMMERMAN-FRANCO, D.C. et al. Antifungal Activity of *Copaifera langsdorffii* Desf Oleoresin against Dermatophytes. **Molecules**, v. 18, p. 12561-12570, 2013.

APÊNDICE A

Tabela 3- Valores de CIM dos derivados da série I sobre cepas de *Candida spp.*

LINHAGENS	DEAE_CHC _b	DEAE_CHCb_DD	CHC _b	CHL	DEAE_CHL	DEAE_CHL_DD	CHC _a
CIM (µg/mL)							
<i>C. albicans</i> 7051	1000	750	750	750	2000	2000	2000
<i>C. albicans</i> 7039	2000	2000	2000	1000	2000	2000	2000
<i>C. albicans</i> 7126	2000	2000	2000	750	2000	2000	2000
<i>C. albicans</i> ATCC	2000	2000	2000	750	2000	2000	2000
média geométrica	1681,8	1565,1	1565,1	805,9	2000,0	2000,0	2000,0
<i>C. krusei</i> 6347	500	750	750	750	1000	500	1000
<i>C. krusei</i> 7052	750	750	2000	750	2000	500	2000
<i>C. krusei</i> 7015	750	750	750	500	1000	500	500
média geométrica	655,2	750,0	1040,0	655,2	1259,9	500,0	1000,0

<i>C. parapsilosis</i> 6186	2000	2000	2000	1000	750	2000	2000
<i>C. parapsilosis</i> 6272	2000	2000	2000	750	2000	2000	2000
<i>C. parapsilosis</i> 6279	2000	2000	2000	500	2000	2000	2000
<i>C. parapsilosis</i> ATCC	750	750	2000	500	2000	2000	2000
média geométrica	1565,1	1565,1	2000,0	658,0	1565,1	2000,0	2000,0
<i>C. tropicalis</i> 7008	1000	750	750	250	750	750	2000
<i>C. tropicalis</i> 7015	250	500	500	100	500	250	2000
<i>C. tropicalis</i> 7464	500	500	250	100	250	500	2000
<i>C. tropicalis</i> ATCC	100	100	100	100	100	100	2000
média geométrica	334,4	370,0	311,2	125,7	311,2	311,2	2000,0

<u>T.mentagrophytes 7389</u>	750	750	2000	2000	750	100	2000	100	100
<u>T. mentagrophytes 6007</u>	750	750	2000	2000	750	100	2000	100	100
<u>T. mentagrophytes 5419</u>	750	500	2000	2000	500	100	2000	100	100
<u>T. mentagrophytes ATCC</u>	1000	1000	2000	2000	2000	100	2000	500	500
média geométrica	805,9	728,2	2000,0	2000,0	866,0	100,0	2000,0	149,5	149,5
<i>M. canis 7422</i>	1000	750	2000	1000	2000	100	2000	100	100
<i>M. canis 7676</i>	2000	100	2000	1000	2000	100	2000	100	250
<i>M. canis 7675</i>	2000	250	2000	2000	750	1000	2000	100	250
<i>M.canis ATCC</i>	1000	1000	1000	2000	2000	100	2000	100	100
média geométrica	1414,2	370,0	1681,8	1414,2	1565,1	177,8	2000	100,0	158,1
<i>F. solani 4129</i>	750	100	250	500	750	500	2000	100	250
<i>F. solani 4318</i>	100	500	100	500	100	100	2000	100	100
<i>F. solani 4696</i>	100	100	2000	100	250	100	2000	100	100
média geométrica	195,7	171,0	368,4	292,4	265,7	171,0	2000,0	100,0	135,7

Tabela 5 – Valores de CIM dos derivados da série 2 sobre filamentosos dermatófitos e *Fusarium* spp.

LINHAGENS	CH4DD5PE	CH4DD13PE	CH4DD46PE
<i>E. floccosum</i> 6117	2000	500	500
<i>E. floccosum</i> 6068	2000	750	100
<i>E. floccosum</i> 6069	2000	500	250
média geométrica	2000,0	572,4	232,1
<i>T. rubrum</i> 6195	2000	2000	2000
<i>T. rubrum</i> 6185	1000	500	500
<i>T. rubrum</i> 6284	2000	1000	1000
<i>T. rubrum</i> CBS	2000	1000	1000
média geométrica	1681,8	1000,0	1000,0
<u><i>T. mentagrophytes</i> 7389</u>	2000	100	100
<i>T. mentagrophytes</i> 6007	2000	100	250

<i>T. mentagrophytes</i> 5419	2000	100	100
<i>T. mentagrophytes</i> ATCC	500	500	500
média geométrica	1414,2	149,5	188,0
<i>M. canis</i> 7422	2000	750	500
<i>M. canis</i> 7676	2000	250	500
<i>M. canis</i> 7675	2000	750	250
<i>M.canis</i> ATCC	2000	500	250
média geométrica	2000,0	514,9	353,6
<i>F.solani</i> 4129	100	100	100
<i>F. solani</i> 4318	100	100	100
<i>F. solani</i> 4696	100	100	100
Média geométrica	100	100	100

APÊNDICE B

Tabela 1 – Estrutura e propriedades dos polímeros da série 1

Polímero	Mw (kDa)	Mn (kDa)	Pdi*(Mw/Mn)	DDA**(%)	DS _{DEAE} ⁺ (%)	DS _{DD} ⁺⁺ (%)
CH _C ^A	208	108	1,92	77	-	-
CH _C ^B	282	208	1,36	75	-	-
CH _L	11	4,3	2,56	97	-	-
DEAE-CH _L	14	5,6	2,51	53	44	-
DEAE-CH _L -DD	14	-	-	29	44	24
DEAE-CH _C ^B	267	150	1,78	35	40	-
DEAE-CH-DD ¹¹⁶	116	41,3	2,81	37	40	20
DEAE-CH-DD ¹³⁶	136	45,8	2,97	37	40	20

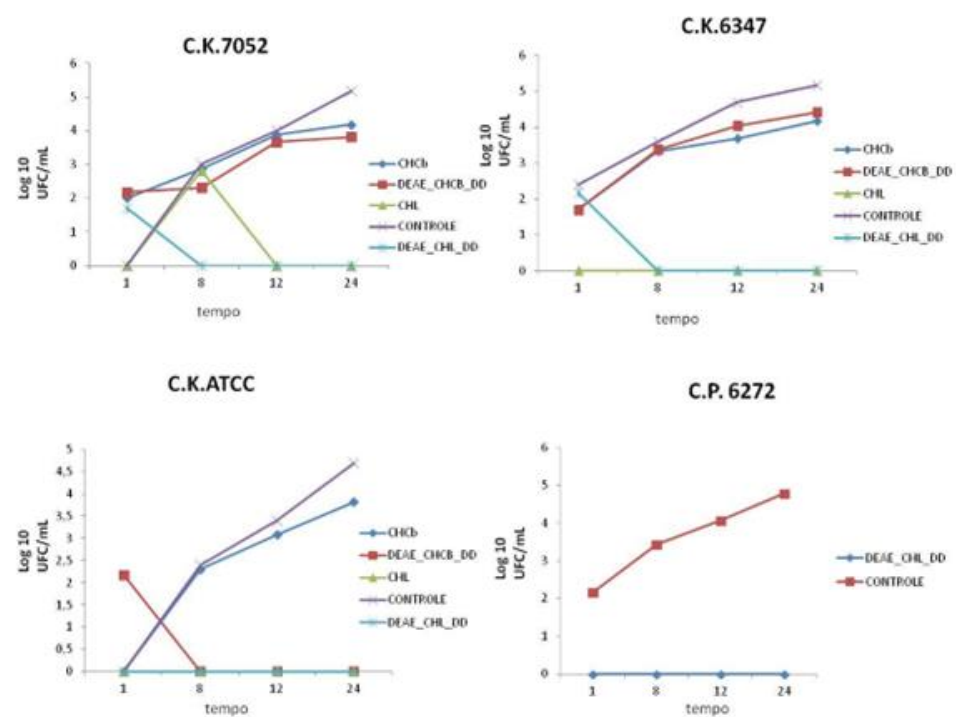
* Índice de polidispersividade; ** Grau de desacetilação; ⁺Grau de substituição pelos grupos DEAE; e ⁺⁺Grau de substituição por grupos dodecil. Mw: peso molecular.

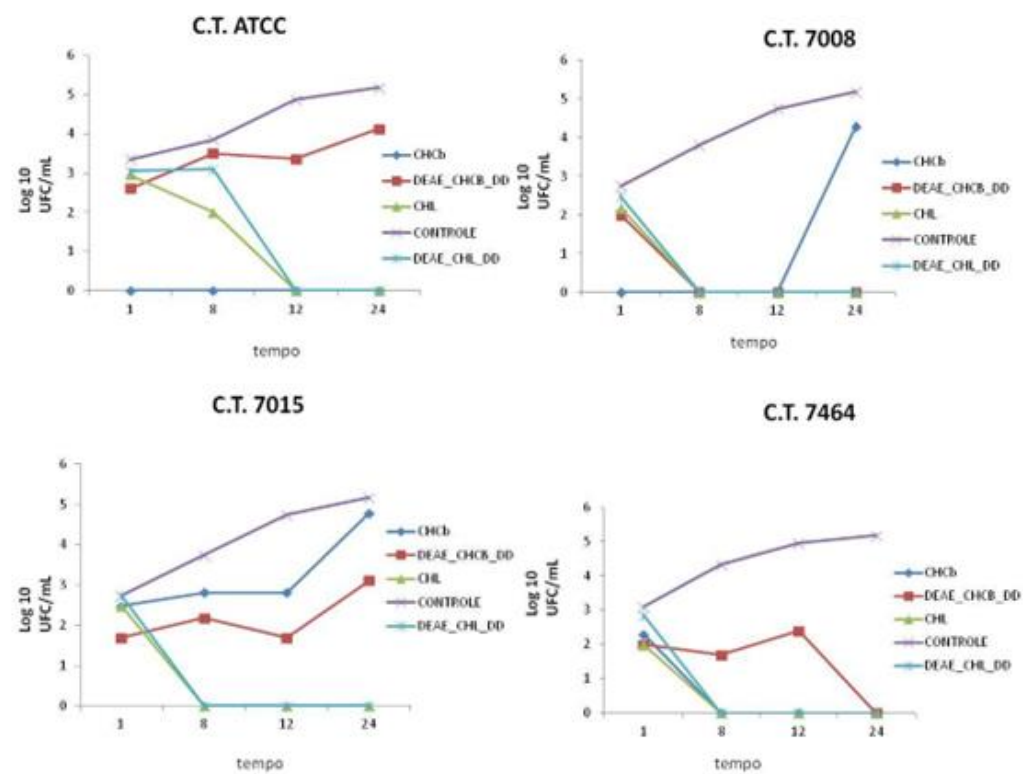
Tabela 2 – Valores de CIM dos derivados da série 1 contra *Candida* spp.

LINHAGENS	DEAE_CHC _b	DEAE_CHCb_DD	CHC _b	CHL	DEAE_CHL	DEAE_CHL_DD	CHC _a
CIM (µg/mL)							
<i>C. albicans</i> 7051	1000	750	750	750	2000	2000	2000
<i>C. albicans</i> 7039	2000	2000	2000	1000	2000	2000	2000
<i>C. albicans</i> 7126	2000	2000	2000	750	2000	2000	2000
<i>C. albicans</i> ATCC	2000	2000	2000	750	2000	2000	2000
média geométrica	1681,8	1565,1	1565,1	805,9	2000,0	2000,0	2000,0
<i>C. krusei</i> 6347	500	750	750	750	1000	500	1000
<i>C. krusei</i> 7052	750	750	2000	750	2000	500	2000
<i>C. krusei</i> 7015	750	750	750	500	1000	500	500
média geométrica	655,2	750,0	1040,0	655,2	1259,9	500,0	1000,0
<i>C. parapsilosis</i> 6186	2000	2000	2000	1000	750	2000	2000
<i>C. parapsilosis</i> 6272	2000	2000	2000	750	2000	2000	2000

<i>C. parapsilosis</i> 6279	2000	2000	2000	500	2000	2000	2000
<i>C. parapsilosis</i> ATCC	750	750	2000	500	2000	2000	2000
média geométrica	1565,1	1565,1	2000,0	658,0	1565,1	2000,0	2000,0
<i>C.tropicalis</i> 7008	1000	750	750	250	750	750	2000
<i>C. tropicalis</i> 7015	250	500	500	100	500	250	2000
<i>C. tropicalis</i> 7464	500	500	250	100	250	500	2000
<i>C. tropicalis</i> ATCC	100	100	100	100	100	100	2000
média geométrica	334,4	370,0	311,2	125,7	311,2	311,2	2000,0

Figura 2 - Gráfico do tempo x log₁₀ UFC/mL para derivados e cepas selecionados





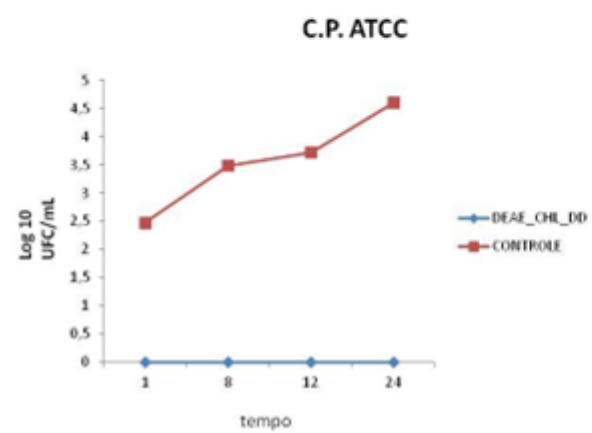
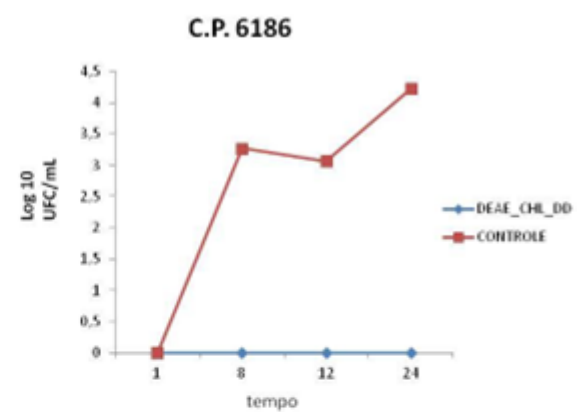
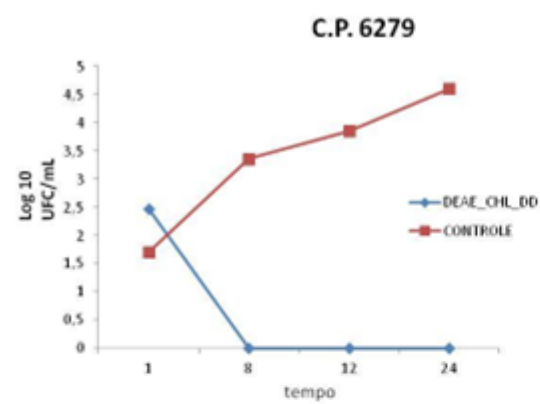
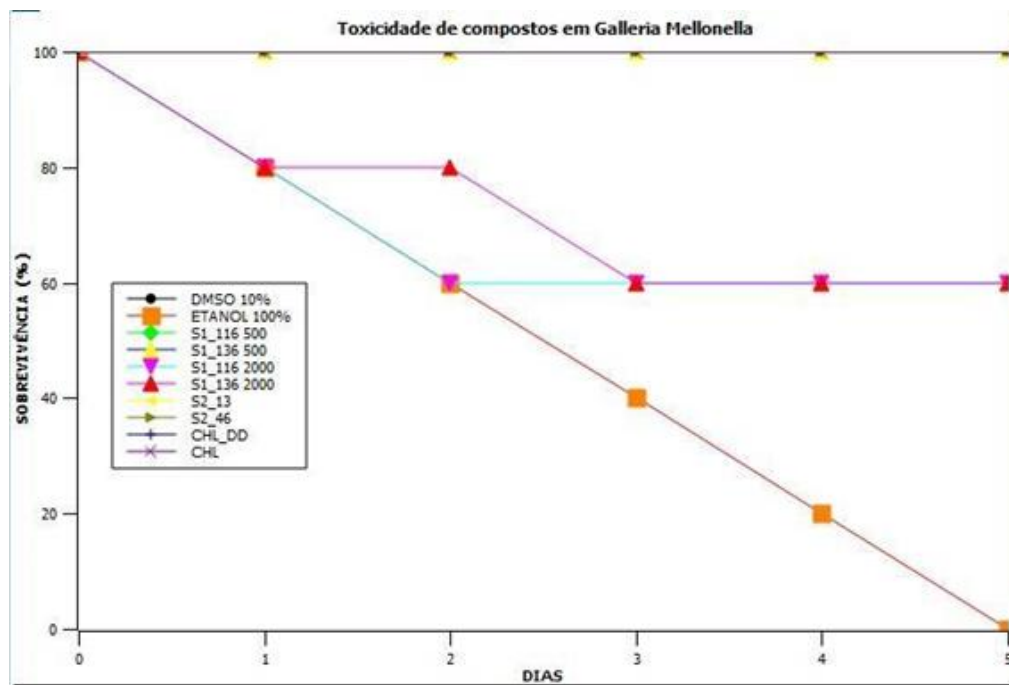


Figura 3 – Gráfico da taxa de sobrevivência (%) das larvas de *Galleria mellonella* inoculadas com os derivados de quitosana



APÊNDICE C

Table 3: MIC values of derivatives from series 1 against filamentous dermatophytes and *Fusarium* spp.

STRAINS	DEAE_CHC _b	DEAE_CHCb _DD	CHC _b	CHL	DEAE_CHL	DEAE_CHL_DD	CHC _a	DEAE-CH- DD ¹¹⁶	DEAE-CH- DD ¹³⁶
CIM (µg/mL)									
E. floccosum 6117	750	750	2000	2000	750	100	2000	100	250
E. floccosum 6068	1000	1000	2000	2000	750	750	2000	100	100
E. floccosum 6069	750	1000	2000	1000	1000	100	2000	100	100
Geometric main	825,5	908,6	2000,0	1587,4	825,5	195,7	2000,0	100,0	135,7
T.rubrum 6195	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
T. rubrum 6185	1000	750	750	2000	750	500	1000	500	750
T. rubrum 6284	2000	2000	1000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
T. rubrum CBS	2000	1000	2000	2000	2000	500	2000	1000	2000
Geometric main	1681,8	1316,1	1316,1	2000,0	1565,1	1000,0	1681,8	1189,2	1565,1

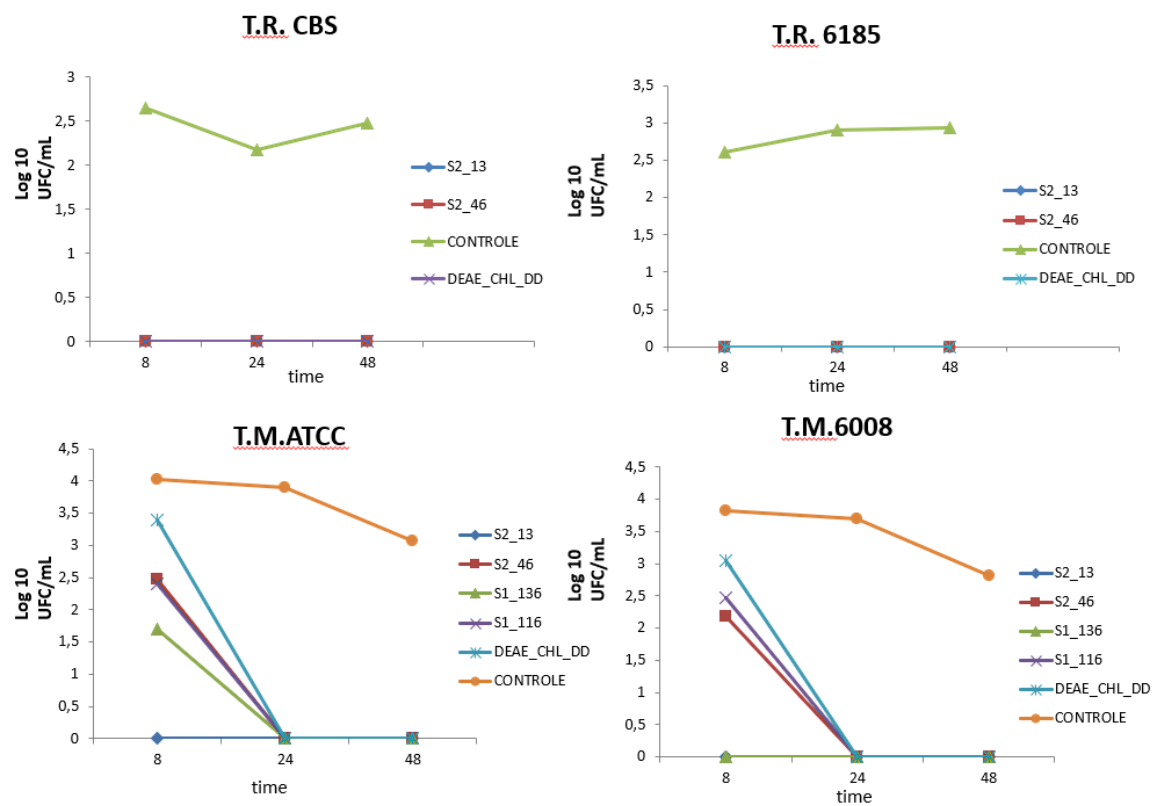
<u>T.mentagrophytes 7389</u>	750	750	2000	2000	750	100	2000	100	100
<u>T. mentagrophytes 6007</u>	750	750	2000	2000	750	100	2000	100	100
<u>T. mentagrophytes 5419</u>	750	500	2000	2000	500	100	2000	100	100
<u>T. mentagrophytes ATCC</u>	1000	1000	2000	2000	2000	100	2000	500	500
Geometric main	805,9	728,2	2000,0	2000,0	866,0	100,0	2000,0	149,5	149,5
M. canis 7422	1000	750	2000	1000	2000	100	2000	100	100
M. canis 7676	2000	100	2000	1000	2000	100	2000	100	250
M. canis 7675	2000	250	2000	2000	750	1000	2000	100	250
M.canis ATCC	1000	1000	1000	2000	2000	100	2000	100	100
Geometric main	1414,2	370,0	1681,8	1414,2	1565,1	177,8	2000	100,0	158,1
F. solani 4129	750	100	250	500	750	500	2000	100	250
F. solani 4318	100	500	100	500	100	100	2000	100	100
F. solani 4696	100	100	2000	100	250	100	2000	100	100
Geometric main	195,7	171,0	368,4	292,4	265,7	171,0	2000,0	100,0	135,7

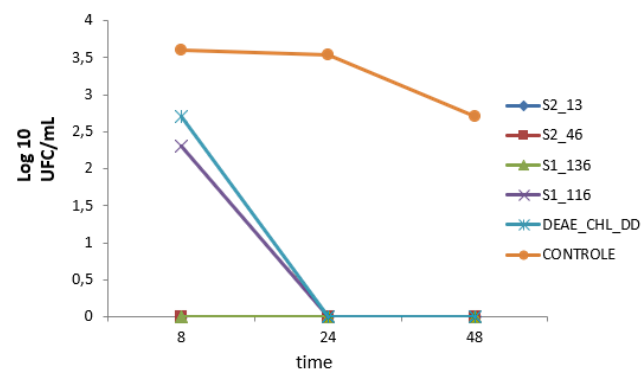
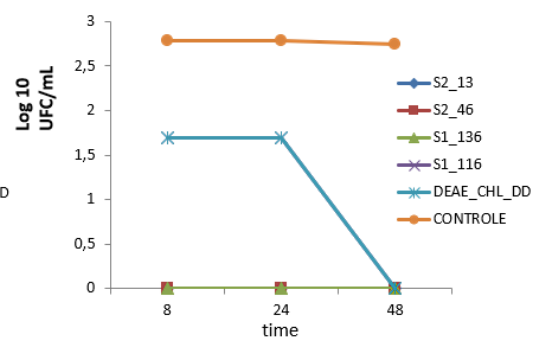
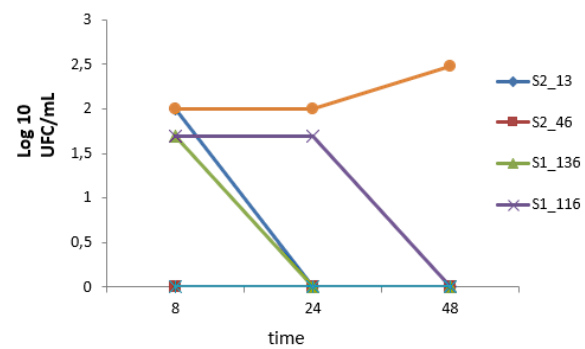
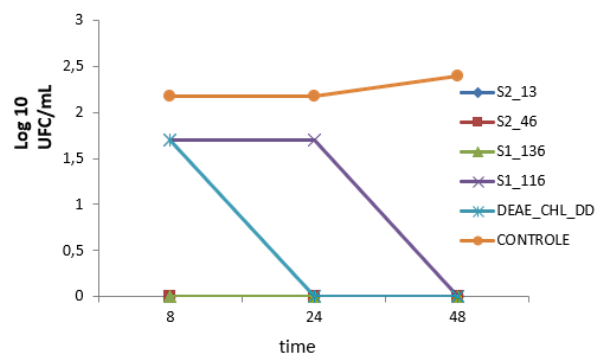
Table 4: MIC values of derivatives from series 2 against filamentous dermatophytes and *Fusarium* spp.

LINHAGENS	CH4DD5PE	CH4DD13PE	CH4DD46PE
E. floccosum 6117	2000	500	500
E. floccosum 6068	2000	750	100
E. floccosum 6069	2000	500	250
Geometric main	2000,0	572,4	232,1
T.rubrum 6195	2000	2000	2000
T. rubrum 6185	1000	500	500
T. rubrum 6284	2000	1000	1000
T. rubrum CBS	2000	1000	1000
Geometric main	1681,8	1000,0	1000,0

<u>T.mentagrophytes 7389</u>	2000	100	100
<u>T. mentagrophytes 6007</u>	2000	100	250
<u>T. mentagrophytes 5419</u>	2000	100	100
<u>T. mentagrophytes ATCC</u>	500	500	500
Geometric main	1414,2	149,5	188,0
M. canis 7422	2000	750	500
M. canis 7676	2000	250	500
M. canis 7675	2000	750	250
M.canis ATCC	2000	500	250
Geometric main	2000,0	514,9	353,6
F. solani 4129	100	100	100
F. solani 4318	100	100	100
F. solani 4696	100	100	100
Geometric main	100,0	100,0	100,0

Figure 1. Log CFU/mL vs. Contact Time Graph.



T.M.7389**M.C.7675****M.C.7676****M.C.ATCC**

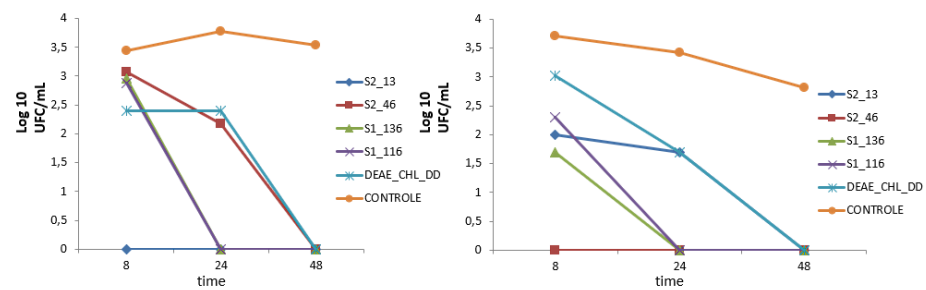
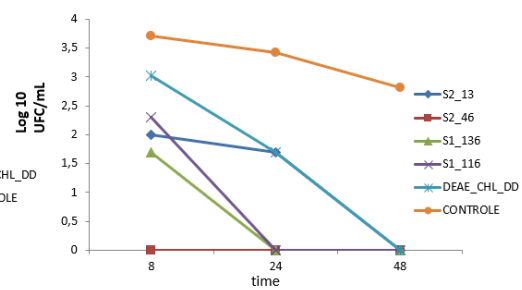
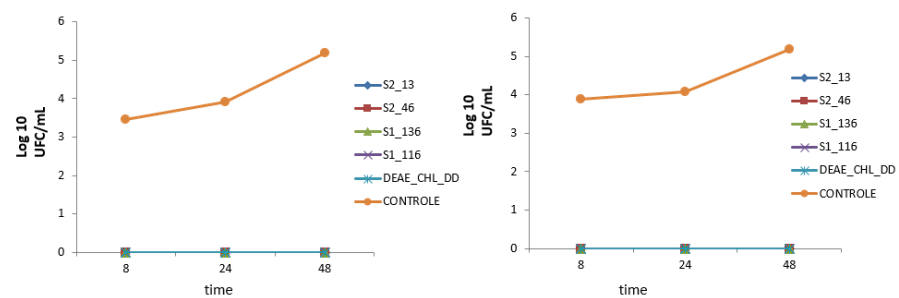
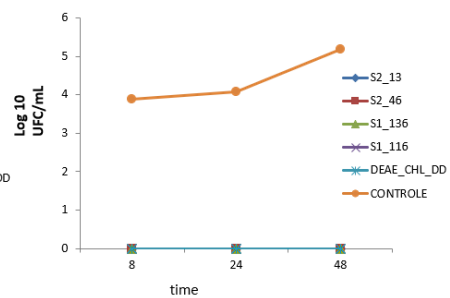
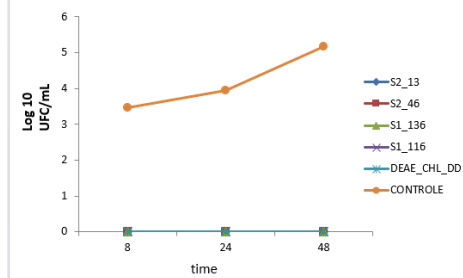
E.F. 6068**E.F. 6069****F.S. 4318****F.S. 4696****F.S. 4129**

Figure 2: Survival rate (%) graph of *Galleria mellonella* larvae inoculated with chitosan derivatives.

