



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

LETÍCIA DE QUEIROZ MOZANER

**Derivados Anfifílicos de quitosana: efeito da estrutura do polímero na
atividade contra *Candida* spp.**

São José do Rio Preto

2020

LETÍCIA DE QUEIROZ MOZANER

Derivados Anfifílicos de quitosana: efeito da estrutura do polímero na atividade contra *Candida* spp.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, 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. Vera Aparecida de Oliveira Tiera

São José do Rio Preto
2020

M939d Mozaner, Leticia de Queiroz

Derivados anfífilos de quitosana : : efeito da estrutura do polímero na atividade contra *Candida* spp. / Leticia de Queiroz Mozaner. -- São José do Rio Preto, 2020

75 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Vera Aparecida de Oliveira Tiera

1. Química orgânica. 2. Agentes anti-infecciosos. 3. Quitosana. 4. *Candida* spp.. I. Título.

LETÍCIA DE QUEIROZ MOZANER

**Derivados Anfifílicos de quitosana: efeito da estrutura do polímero na
atividade contra *Candida* spp.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Química, junto ao
Programa de Pós-Graduação em Química, 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. Vera Aparecida de Oliveira Tiera
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Tiago Casella
FAMERP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Patricia Simone Leite Vilamaior
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
11 de fevereiro de 2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de todos, à Deus, por me dar sabedoria e tudo o que foi necessário para chegar até aqui, mesmo diante das dificuldades enfrentadas, tudo que consegui foi graças à Ele.

Aos meus pais, Mônica e Alex, por sempre estarem à disposição para me ajudar, seja emocionalmente ou financeiramente, obrigada por todo o carinho e amor, e se cheguei até aqui foi porque vocês me impulsionaram sempre. Agradeço também à minha avó Jandira, que sempre faz de tudo para que não me falte nada.

Ao meu namorado Henrique, que esteve comigo e tornou mais alegre e suave essa fase da minha vida, por todo amor e apoio todos os dias.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Vera Aparecida de Oliveira Tiera que não mede esforços para ajudar, de maneira pessoal ou profissional, obrigada por todos os ensinamentos e amparo para a realização dessa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Márcio Tiera, pela ajuda e disposição sempre que possível.

À Prof^a. Dr^a. Margarette Gottardo de Almeida pela parceria e auxílio nos ensaios microbiológicos, aos alunos e funcionários do laboratório de microbiologia da FAMERP, que sempre estavam à disposição para ajudar e ensinar, especialmente aos meus amigos Thiago, Maicon, Thaiza, Natália, Veridianna e Bianca que fizeram os meus dias de análises mais felizes e fáceis.

Ao departamento de Química e Ciências Ambientais e todos os docentes, pela assistência para a realização desse trabalho.

Aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia, do IBILCE, que sempre estão à disposição para ajudar e auxiliar, em especial à Grazi, Aninha e André, que sempre me deram toda atenção quando tinha dúvidas.

Ao Laboratório Multiusuário do Instituto de Física da USP, em São Carlos (IFSC/USP), por nos ceder a utilização do microscópio confocal a laser para realização das análises.

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

Por fim, agradeço à todos que estiveram presente em minha vida durante a realização deste trabalho, que não foram citados diretamente, porém não menos importantes, pois se eu não desisti foi graças à pessoas maravilhosas que estão presentes na minha vida, me auxiliando de todas as maneiras.

“Mas os que esperam no Senhor renovarão as suas forças e subirão com asas como águias;
correrão e não se cansarão; caminharão e não se fatigarão.”

Isaías 40:31

RESUMO

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica de diferentes derivados anfifílicos de quitosana contra cepas de *Candida* sp., um fungo responsável por infecções que impactam o sistema de saúde, pois além de atingir milhares de pessoas tem se tornado cada vez mais resistente aos tratamentos usuais. Considerando a importância desse fungo e o potencial para uso tópico dos derivados de quitosana, no presente trabalho buscou-se avaliar a atividade antifúngica de diferentes séries de polímeros. Os polímeros previamente sintetizados foram divididos em duas séries: 1) derivados contendo porção hidrofóbica e hidrofílica constante (40% N,N- dietilaminaetila (DEAE) e 20% dodecil (DOD)) com diferentes massas moleculares, e 2) derivados com porção hidrofóbica e massa molecular constante (4% DOD e 137 kDa) com diferentes porcentagens de grupos quaternários (pentiltrimetilamônio). A série composta de diferentes conteúdos de grupos carregados negativamente (carboxietil) e grupo hidrofóbico (octil/dodecil) foi sintetizada e caracterizada por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN H^1). Para as 3 diferentes séries de derivados foram analisados os graus de ionização e foi observado que no pH de 6,4 (pH próximo ao sanguíneo) os polímeros das séries 1 e 2 apresentaram valores próximos a 70% e os da série 3 próximos a 80%. As citotoxicidades dos polímeros foram determinadas em concentrações crescentes e não apresentaram toxicidade, exceto os da série 1- 25 kDa e 60 kDa que apresentaram moderada inibição de células viáveis nas maiores concentrações (1 e 0,75 mg mL⁻¹). Foi avaliada a Concentração Inibitória Mínima (CIM), nas mesmas concentrações estudadas no ensaio de citotoxicidade contra: *Candida albicans* (*C. albicans*), *Candida glabrata* (*C. glabrata*), *Candida krusei* (*C.krusei*) e *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*), cepas ATCCs e de isolados clínicos de diferentes pacientes. Os resultados mostraram que os polímeros das séries 1 e 2 inibiram em até 90% o crescimento da maioria das cepas, exceto as de *Candida albicans* e os polímeros da série 3 não apresentaram inibição para as cepas estudadas. A partir dos valores de CIM para os polímeros das séries 1 e 2, foram realizados estudos para determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM). Os derivados das séries 1 e 2, que apresentaram menores valores de CFM, foram estudados para determinação do time kill com todas as cepas. A inibição total foi atingida no período máximo de 5 horas para todas as cepas e derivados testados. A microscopia confocal permitiu verificar alteração na morfologia da célula, possivelmente devido ao rompimento da parede celular.

Palavras-chave: Concentração Inibitória Mínima, quitosana, *Candida* spp, ação fungicida

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the antifungal activity of different amphiphilic derivatives of chitosan against *Candida* sp., a yeast responsible for infections that impact the public health because reaches thousands of people and has become increasingly resistant to the treatments. Considering the importance of this fungus and the potential for topical use of chitosan derivatives, the present study aimed to evaluate the antifungal activity of a groups of previously synthesized polymers and synthesize new group. The polymers previously synthesized were divided into two groups: derivatives with constants concentrations hydrophobic and hydrophilic (40% diethylamineethyl (DEAE) and 20% dodecyl (DOD)) with different molecular weights, and derivatives with constant hydrophobic moiety and molecular weight (4% DOD and 137 kDa) with different percentages of positive charge (pentyltrimethylammonium group). The serie of amphiphilic derivatives containing different contents of negatively charged groups (carboxyethyl) and hydrophobic group (octyl / dodecyl) were synthesized and characterized by Nuclear Magnetic Resonance of Hydrogen (NMR H^1). For the three series were analized the degree of ionization and it was observed that at pH 6.4 (approximate blood pH) the derivatives of series 1 and 2 presented values close to 70% and those of series 3 near 80%. The cytotoxicity of the polymers was assessed in different concentrations and showed no toxicity, except those in the serie 1- 25 kDa and 60 kDa that showed moderate inhibition of viable cells at the highest concentrations (1 and 0.75 mg mL⁻¹). Subsequently, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was evaluate, at the same concentrations studied in the cytotoxicity assay, against *Candida albicans* (*C. albicans*), *Candida glabrata* (*C. glabrata*), *Candida krusei* (*C.krusei*) e *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*), ATCCs strains and clinical isolates. The polymers of series 1 and 2 showed 90% of inhibition against most strains, except *Candida albicans*, that showed no significant inhibition by any polymer. The derivatives of serie 3 showed no significant inhibition of any strain. From the values obtained from MICs, the Minimum Fungicidal Concentration (MFC) was determined. For the derivatives of series 1 and 2 that presented lower values of MFC, the time kill with all the strains was analyzed, and total inhibition was reached in a maximum of five hours for all strains and derivatives tested. Confocal microscopy allowed to verify the effect of antifungal on the morphology of the strains, possibly due to cell disruption and fragments.

Keywords: Minimum Inhibition Concentration, chitosan, *Candida* spp., fungicidal effect

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia dos biofilmes das espécies de <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. krusei</i> e <i>C. parapsilosis</i>	19
Figura 2 - Representação esquemática das estruturas químicas da quitina e da quitosana.....	23
Figura 3 - Estrutura dos derivados anfifílicos de quitosana. Série I: DEAE. Serie II: Pentil trimetil amônio. Serie III: N-carboxietil.....	28
Figura 4 - Esquema para preparo da solução estoque.....	31
Figura 5 - Layout 1 da placa de microdiluição.....	33
Figura 6 – Layout 2 da placa de microdiluição.....	33
Figura 7 - Placa de Ágar Sabouraud grande com o mapa para perfuração semelhante à placa de microdiluição.....	34
Figura 8 - Esquema do procedimento de time-kill.....	36
Figura 9 - Procedimento para preparo de lâminas da microscopia confocal a laser.....	37
Figura 10 - Mecanismo de reação para formação de carboxietil quitosana.....	39
Figura 11 - Mecanismo de reação de inserção de grupos octil ou dodecil na cadeia do polímero.....	40
Figura 12 - Espectro de RMN ¹ H da quitosana utilizada para a síntese da carboxietil quitosana.....	41
Figura 13 - Espectros de RMN H ¹ : a) derivado da série 3-1; b) derivado da série 3-2; c) derivado da série 3-3; d) derivado da série 3-4; e) derivado da série 3-5; f) derivado da série 3-6.....	42
Figura 14 - Graus de ionização dos derivados da série 1.....	47
Figura 15 – Graus de ionização dos derivados da série 2.....	48
Figura 16 - Graus de ionização dos derivados da série 3.....	48
Figura 17 - Reação ocorrida no método de MTS em que o sal de tetrazólio é quebrado para a formação de formazan.....	49
Figura 18 - Citotoxicidade dos derivados a) série 1 b) série 2 c) série 3. Dados representam média ± desvio padrão (n = 3).	50

Figura 19 - Placas de microdiluição dos polímeros das séries I e II contra a) <i>C. krusei</i> ATCC, b) CK1 c) CK2 d) CK3 e) CK4.....	54
Figura 20 – Placas de microdiluição dos polímeros das séries I e II contra a) <i>C. albicans</i> ATCC, b) CA1 c) CA2 d) CA3 e) CA4.....	55
Figura 21 - CFM dos polímeros das séries 1 e 2 contra cepas de a) <i>C. krusei</i> ATCC b) CK1 c) CK2 d) CK3 e) CK4.....	60
Figura 22 - Curvas de crescimento das cepas em contato com os derivados.....	62
Figura 23 - Estrutura da quitosana substituída com rodamina.....	68
Figura 24 - Imagens da microscopia da CK1 a) controle b) CK1 após ação do derivado da série 2 com 5% pentil.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estrutura química e caracterização das quitosanas modificadas.....	38
Tabela 2 - Graus de substituição dos derivados anfifílicos da série 3.....	45
Tabela 3 - Valores de CIM para os polímeros das séries 1 e 2.....	56
Tabela 4 - Valores de CFM para os polímeros das séries 1 e 2.....	59
Tabela 5 - Porcentagens de substituição de rodamina nos polímeros.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CFM= Concentração fungicida mínima

CIM= Concentração inibitória mínima

CLSI= Instituto de normas clínicas e laboratoriais

CPG= Cromatografia de permeação em gel

DEAE= Dietilaminoetil

DMEM= Dulnecco's Modified Eagle's Medium

DOD= Dodecila

FDA= Food and Drug Administration

GD= Grau de desacetilação

GI= Grau de ionização

GS= Grau de substituição

HPMC= Hidroxipropilmetil celulose

kDa= Quilodalton

MOPS= Ácido morfopropileno sulfônico

MTS= 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio

MTT= brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2, 5-difenil-2H-tetrazólio

Mw= Massa molecular

OCT= Octil

PENTIL= Pentiltrimetilamônio

PLGA= poli-lactoglicolídeo

PS= Penicilina

PVC= Policloreto de vinila

RMN ¹H= Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RPMI= Roswell park memorial institute

Sap= Proteinases aspárticas

UFC= Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1. <i>Candida</i> spp.....	16
2.1.1. Morfologia das principais cepas de <i>Candida</i>	17
2.2. Patogenicidade da <i>Candida</i>	18
2.3. Doenças causadas por <i>Candida</i>	20
2.4. Antifúngicos convencionais e mecanismos de resistência.....	21
2.5. Quitosana.....	22
2.6. Efeitos antimicrobianos da quitosana e seus derivados.....	23
2.7. Efeitos antimicrobianos dos derivados contra <i>Candida</i>	25
3. OBJETIVOS.....	27
3.1. Objetivos específicos.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1. Derivados anfifílicos.....	28
4.2. Síntese e caracterização dos derivados da série 3.....	28
4.2.1. Síntese dos derivados anfifílicos de carboxietil quitosana.....	28
4.2.2. Síntese de N-carboxietil-octil/dodecil-quitosana.....	29
4.2.3. Caracterização dos derivados anfifílicos por RMN ^1H	29
4.3. Grau de ionização dos derivados anfifílicos em função do pH.....	29
4.4. Ensaio de citotoxicidade dos polímeros.....	30
4.4.1. Preparação das soluções estoque dos derivados.....	30
4.4.2. Procedimento dos ensaios de citotoxicidade.....	30
4.5. Ensaio microbiológicos.....	31
4.5.1. Cepas de <i>Candida</i> sp	31
4.5.2. Concentração inibitória mínima (CIM).....	31
4.5.2.1. Preparo das soluções estoque dos derivados.....	31
4.5.2.2. Preparação dos inóculos.....	32

4.5.2.3. Preparo das placas de microdiluição.....	32
4.5.3. Teste da atividade antifúngica.....	34
4.5.4. Determinação da curva de morte vs tempo (time kill).....	34
4.5.4.1. Preparação do inóculo.....	35
4.5.4.2. . Procedimento o preparo da curva de morte.....	35
4.6. Análises microscópicas.....	36
4.6.1. Marcação dos derivados com rodamina.....	36
4.6.2. Microscopia confocal a laser.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1. Derivados anfifílicos previamente sintetizados e caracterizados.....	37
5.2. Síntese dos derivados de quitosana da série 3.....	38
5.3. Caracterização dos derivados da série 3 por RMN ¹H.....	40
5.4. Grau de ionização dos derivados anfifílicos em função do pH.....	46
5.5. Ensaios de citotoxicidade dos polímeros.....	49
5.6. Ensaios microbiológicos.....	52
5.6.1. CIM.....	52
5.6.2. Teste fungicida/fungistático.....	58
5.6.3. Ensaio de time-kill.....	61
5.7. Análises microscópicas.....	68
5.7.1. Marcação dos derivados com rodamina e determinação do grau de substituição.....	68
5.7.2. Microscopia confocal a laser.....	69
CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS	71

1. INTRODUÇÃO

As infecções causadas por fungos têm crescido cada vez mais nas últimas décadas, não somente em ambiente hospitalar, mas também em indivíduos com o sistema imune comprometido ou submetidos ao transplante de órgãos ou à equipamentos invasivos como cateteres, articulações artificiais e válvulas, atingindo, desta forma, milhões de pessoas em todo o mundo (MARTINS et al., 2015).

Normalmente, as infecções causadas por fungos são as principais causas de doenças hematogênicas, sendo os casos mais frequentes os fungos do gênero *Candida*, que estão presentes em qualquer pessoa saudável. Entretanto, diversos fatores os tornam patogênicos, tais como: mudanças fisiológicas características da infância (prematuridade), envelhecimento ou doenças degenerativas, neoplásicas, imunodeficiências congênitas ou adquiridas e imunodepressão, entre outras (COLOMBO, GUIMARÃES, 2003).

Várias espécies de *Cândida* são consideradas de grande importância na medicina, como *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, *Candida krusei* e *Candida kyfer*. Esse fungo é considerado o principal agente das infecções mucocutâneas, entre outras mais complicadas, como septicemia, endocardite, meningite e peritonite, sendo também responsáveis por infecções de pele e mucosas em pacientes saudáveis, como por exemplo, em mulheres que desenvolvem candidíase vaginal. A mortalidade geral de fungemias por *Candida* spp é da ordem de 40 a 60%, tornando esta complicação infecciosa um grande desafio para a medicina (COLOMBO, GUIMARÃES, 2003; MARTINS et al., 2015).

Um grande problema relacionado às infecções fúngicas é a seleção crescente de cepas resistentes aos antifúngicos convencionais, tornando os tratamentos longos e dispendiosos (SARDI et. al, 2013)

A busca por novos antifúngicos, de origem natural, tem conferido à quitosana um grande potencial de aplicação na medicina, biotecnologia, e como agentes bactericidas (SEO et al., 2008) e fungicidas (RABEA et al., 2003).

O grande potencial de aplicação se deve principalmente à sua origem natural e elevada biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade, tendo sido aprovada pela FDA para aplicação tópica, particularmente na cicatrização de feridas (KUMAR, VIMAL e KUMAR, 2016).

Um dos grandes problemas enfrentados ao trabalhar com a aplicação da quitosana como antifúngico é a sua baixa solubilidade no pH fisiológico, além disso, apresenta potencial fungicida menor que os fungicidas convencionais. Entretanto, a presença de grupos amina e hidroxila na estrutura do polímero torna a quitosana susceptível a reações de substituição nucleofílica, permitindo inúmeras modificações químicas em sua estrutura, resultando em um aumento na sua atividade antimicrobiana e na solubilidade. Dentre as possíveis modificações podemos citar as reações de acetilação, quaternização, alquilação, carboxilação, acilação, sulfonação, amidação e a formação de complexos polieletrólitos e de bases de Schiff com aldeídos e cetonas (KUMAR et al., 2004; LARANJEIRA, DE FÁVERE, 2009.).

Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa (GABRIEL et al., 2015; DIAS et al., 2018) mostraram que derivados de quitosana substituídos com grupos hidrofóbicos e hidrofílicos inibiram totalmente o crescimento das colônias de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus in vitro*, e apresentaram solubilidade em ampla faixa de pH. A atividade antifúngica dos derivados está diretamente relacionada à concentração dos polímeros no meio, ao grau de substituição dos grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, à força iônica do meio e à massa molecular do polímero.

Entretanto, os resultados encontrados na literatura são muitas vezes contraditórios. Por exemplo, Seyfarth et al. (2008) relataram que a atividade antifúngica contra espécies de *Candida* decresce com a diminuição da massa molecular, entretanto Kulikov et al. (2014) reportaram recentemente que oligoquitosanas de 2-a-20 kDa inibem eficientemente o crescimento de *Candida albicans*. Segundo Rabea et al. (2003), a anfifilicidade da quitosana deve ser precisamente controlada para maximizar sua atividade. Os resultados da literatura indicam, também, que seus derivados tem uma faixa ótima de valor de Mw e o balanço hidrofílico/hidrofóbico das modificações na cadeia polimérica podem explicar a maior eficiência do polímero contra diferentes microrganismos com diferentes propriedades de membranas, local de ação dos derivados de quitosana (KUMAR et al., KONG et al. 2010).

Frente a esses resultados, o presente trabalho de pesquisa teve como objetivo investigar a atividade antifúngica de diferentes séries de derivados de quitosana contra espécies de *Candida* que apresentam grande impacto na área da saúde.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Candida* spp.

Nos últimos anos, as infecções causadas por fungos estão se agravando, principalmente devido à resistência adquirida por estes e à baixa diversidade de antifúngicos, tornando-se um grande desafio para a medicina (SARDI et. al, 2013).

Segundo o mesmo autor, 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 torná-los patogênicos, devido sua adaptabilidade a diferentes nichos do hospedeiro.

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. A *C. glabrata* é a segunda mais frequente depois da *C. albicans*. Essa mudança de epidemiologia está sendo causada, provavelmente, devido à fatores como imunossupressão grave ou doença, exposição a antibióticos de amplo espectro e pacientes idosos. A *C. parapsilosis* é outra espécie que se tornou um patógeno importante, surgindo em várias manifestações clínicas, tais como: endoftalmite, endocardite, artrite séptica, peritonite e fungemia, geralmente associadas a procedimentos invasivos ou dispositivos protéticos, presente em pacientes de todas as idades na América Latina (SARDI et al., 2013).

Pires et al. (2011) realizaram análises em amostras de hemodiálise e, das cepas isoladas, 53% foram de *C. parapsilosis* e 47% corresponderam à *C. orthopsilosis*. De acordo com Sardi et al. (2013), a candidemia causada por *C. glabrata* também têm sido reportada. Esta espécie é intrinsecamente mais resistente aos antifúngicos convencionais (azóis), principalmente o fluconazol, assim como a *C. krusei*, e as infecções causadas por essas espécies têm sido relacionadas à profilaxias prévias ao uso deste antifúngico e neutropenia. Enfim, a preocupação quanto à alta incidência de infecções causadas por espécies não albicans e a crescente resistência dessas aos antifúngicos convencionais têm aumentado nos últimos anos pois existem poucos antifúngicos eficientes contra a *Candida* no mercado (KAUR, R. et al., 2016; MIRANDA-CADENA, K. et al., 2018; SAKAGAMI, T. et al., 2019). Além disso, a maioria não são específicos, pela dificuldade de desenvolvê-los já que o fungo e o hospedeiro são eucarióticos, portanto, é uma tarefa árdua encontrar um antifúngico que seja tóxico apenas para a *Candida* e não para o hospedeiro (TAYEL et al., 2010).

2.1.1. Morfologia das principais cepas de *Candida* sp.

A espécie mais estudada e amplamente conhecida, responsável por grande parte das infecções causadas é a *C. albicans*. É um fungo dimórfico, existindo primariamente e disseminando-se através de seu fenótipo blastóforo, também conhecido como blastoconídio. Pode estar presente em diferentes morfologias, assim como outras espécies de *Candida*, tais como levedura, pseudohifas ou hifas, as células alongadas, elipsoidais, que são ligadas umas às outras, são chamadas de pseudohifas, enquanto as células que são consideradas verdadeiras hifas são caracterizadas por uma morfologia celular cilíndrica e são separadas por paredes septais perpendiculares, tal morfologia é definida através de sinais ambientais (HANI et al., 2015).

De acordo com Whibley, Gaffen (2015), as espécies de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* não formam hifas verdadeiras mas vêm sendo reportado a formação de pseudohifas, enquanto que a *C. tropicalis* e a *C. dubliniensis* formam hifas verdadeiras assim como a *C. albicans*.

Embora as infecções causadas pelas diferentes espécies de *Candida* sejam similares, há múltiplas diferenças fenotípicas, incluindo tamanho celular, composição da parede, exigências de crescimento e fatores de virulência. A parede celular da *Candida* é composta essencialmente por quitina e β -1,3-glucano na porção mais interna e mananas associadas à proteínas na porção externa, porém, essas proteínas variam com a espécie, além da quantidade de cada composto, foi relatado que na *C. glabrata* há cerca de 50% mais proteínas, maiores quantidades de mananas e menores de glucanas total nas paredes que a *C. albicans*, contrariamente, as espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* contém mais quitina que as de *C. glabrata* e *C. krusei* (WHIBLEY, GRIFFEN, 2015).

A morfogênese fúngica envolve alterações na composição da parede celular e, portanto, os diferentes morfotipos expõem fatores de reconhecimento diversos. Tais fatores são bem reconhecidos na *C. albicans* mas pouco estudados nas outras espécies de *Candida*. No entanto, é plausível que as diferentes morfologias das espécies não-*albicans* também impulsionem respostas e por isso é uma via de pesquisa importante. As células epiteliais também respondem diferentemente a leveduras e hifas de *C. albicans*. As células de levedura promovem uma resposta celular epitelial tolerogênica, enquanto a resposta inflamatória é estimulada pelo reconhecimento de hifas invasivas. Enfim, a forma leveduriforme e a de hifas apresentam respostas diferentes de reconhecimento (WHIBLEY, GRIFFEN, 2015).

2.2. Patogenicidade da *Candida*

O principal mecanismo de patologia da *Candida* spp. é através da candidemia endógena, em que diversas espécies presentes na microbiota natural em vários locais do organismo aproveitam-se de fraquezas do hospedeiro e tornam-se patógenos oportunistas. O segundo principal mecanismo é exógeno, geralmente através da contaminação de materiais de saúde como cateteres e soluções intravenosas contaminados (SENEVIRATNE, JIN, SAMARANAYAKE, 2008; TAYEL et al., 2010; SARDI et al., 2013).

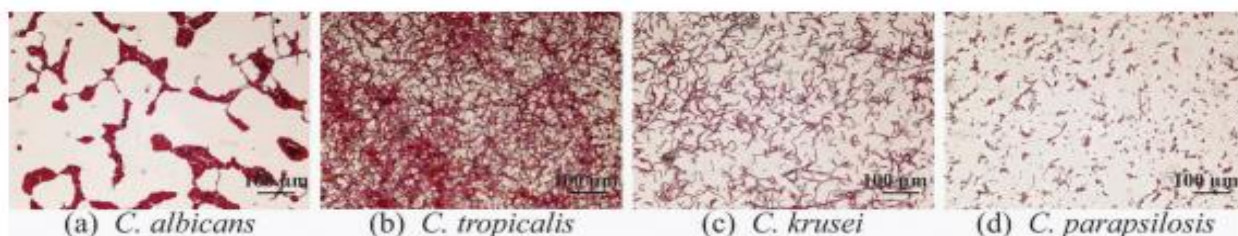
A *Candida* é considerada um importante patógeno por sua versatilidade e habilidade de viver em diferentes locais anatômicos. É consensual que estes microrganismos são ativos na fisiopatologia do processo da doença, atuando através de diversos mecanismos de agressão denominados fatores de virulência. Os principais fatores de virulência são aqueles para aderência nos tecidos e dispositivos médicos hospedeiros, biofilmes e secreção de enzimas hidrolíticas (fosfolipases, proteases e hemolisinas). Entretanto, embora muito foi estudado sobre fatores patogênicos em fungos, principalmente de *C. albicans*, pouco se sabe sobre as espécies não-albicans (SENEVIRATNE, JIN, SAMARANAYAKE, 2008; TAYEL et al., 2010; SARDI et al., 2013).

O primeiro fator na colonização fúngica é a aderência nos tecidos humanos, que ocorre através de uma cascata de sinalizações. O ataque inicial da *Candida* é mediado a partir de fatores não específicos (forças eletrostáticas e hidrofóbicas). Em seguida, é promovido por adesinas específicas presentes nas células fúngicas que interagem com proteínas do hospedeiro, fibrogênio e fibronectina. A adesão também é realizada por essas proteínas da parede fúngica que se ligam à aminoácidos e açúcares das células hospedeiras ou promovem a aderência à superfícies abióticas. Além disso, a *Candida* é capaz de formar um biofilme para aderir melhor ao hospedeiro. Esses biofilmes são definidos como comunidades microbianas envoltas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares e exibem características fenotípicas que diferem de suas contrapartes planctônicas ou flutuantes, possuindo alta resistência aos antifúngicos (SENEVIRATNE, JIN, SAMARANAYAKE, 2008; TAYEL et al., 2010; SARDI et al., 2013).

A formação de biofilme é um dos fatores de virulência mais importantes da espécie. O biofilme varia de acordo com cada espécie e depende de diversos fatores como a hidrofobicidade da superfície celular, a presença de adesinas específicas, a estabilidade

arquitetônica e a matriz. Os biofilmes formados por *C. albicans* formam agregados distintos de células de leveduras, com poucas células existindo na forma de hifas, formando um arcabouço estrutural para a aderência de leveduras. Por outro lado, o biofilme de *C. tropicalis* é denso e forma entrelaçados com pseudo-hifas e elementos de hifas por toda a parte, enquanto que na *C. krusei* os agregados e microcolônias no biofilme são bem menores, as células são distribuídas de forma mais homogênea na superfície do substrato. Na *C. parapsilosis* são compostos de agregados escassos (Figura 1) (KUMARI et al., 2015).

Figura 1 - Morfologia dos biofilmes das espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*



Fonte: KUMARI, A. et al., 2015

De acordo com Seneviratne, Jin e Samaranayake (2008), foram estudados os fatores que afetam o crescimento do biofilme, tais como: substrato, quantidade de oxigênio disponível, e a espécie. Dessa forma, é possível determinar os fatores que impedem ou favorecem o crescimento do biofilme, a fim de evitá-los. Por exemplo, foram testados diversos materiais como modelo (acrílico, discos de cateter de elastômero de silicone, filtros cilíndricos de celulose, polimetilmetacrilato, plástico e vidro) para o desenvolvimento dos biofilmes, já que as propriedades do substrato interferem na adesão e posterior crescimento. De acordo com Seneviratne, Jin e Samaranayake (2008 apud Hawser e Douglas, 1994), foram determinados que cateteres urinários de látex, seguido por PVC e poliuretano, propiciaram o crescimento dos biofilmes de *Candida*. Já aqueles que eram 100% silicone foi observado significativa diminuição no crescimento.

As enzimas hidrolíticas mais importantes na ação da *Candida* são as proteases e fosfolipases. Dez proteinases aspárticas (Sap) (isoenzimas) são principais na atividade da *C. albicans*. Elas possuem massa molecular entre 35 e 50 kDa e são codificadas de SAP1-10 genes. Foi relatado que as SAP1-6 estão relacionadas à adesão, dano tecidual e mudanças nas respostas imunológicas. Essas Sap proteinases também foram encontradas nas espécies de *C. tropicalis*,

C. parapsilosis e *C. guilliermondii*. A produção de hemolisina é outro fator importante na virulência desse fungo. Essa proteína é responsável pela quebra das células vermelhas do sangue, que permite a captação de ferro, um elemento essencial no processo infeccioso (SARDI et al., 2013).

2.3. Doenças causadas por *Candida*

Na maioria das vezes, as infecções causadas por *Candida* spp. acontecem sem um motivo aparente, sendo difícil de determinar a causa e também evitá-la. Geralmente, ocorrem nas seguintes situações: no uso de antibióticos, que inibem microrganismos benéficos do nosso corpo, permitindo a maior replicação da *Candida*, e propiciando a candidíase; alterações que prejudiquem o mecanismo de defesa do hospedeiro, tais como mudanças fisiológicas características da infância (prematuridade) e envelhecimento; doenças degenerativas ou neoplásicas; imunodeficiências congênitas ou adquiridas; procedimentos médicos invasivos, ou o comprometimento de barreiras anatômicas (COLOMBO, GUIMARÃES, 2003; TAYEL et al., 2010).

As micoses causadas por esses fungos possuem um amplo espectro de manifestações clínicas, podem ser superficiais, como nas infecções cutâneas e mucosas, ou profundas, graves e generalizadas, que é o caso da candidíase invasiva.

De acordo com Rasch et al. (2018), os casos de candidemia são responsáveis por cerca de 60% da mortalidade causada por *Candida*, e tal caso pode ocorrer em pacientes com diversas doenças. Em pacientes com necrose pancreática, por exemplo, a frequência de infecções causadas por esses fungos é alta. Portanto, o risco de candidemia é recorrente. No total de 136 pacientes, 54 desenvolveram infecções causadas por *Candida* e 7 dessas era candidemia. As espécies mais frequentes foram as de *C. albicans* e *C. glabrata*. No estudo realizado por Lindberg et al. (2019), em que foi analisado o espectro de espécies em pacientes com candidemia, pois o padrão de suscetibilidade antifúngica entre elas varia, também observou a maior frequência da *C. albicans*, seguida da *C. glabrata* e *C. parapsilosis*.

De acordo com Otasevic et al. (2018), a *Candida* também está muito presente em infecções superficiais, que são uma das infecções mais recorrentes no mundo todo, com prevalência de 22-25%. Portanto, possui elevada importância para a saúde pública de humanos e animais. Nos últimos anos têm aumentado o número dos fatores de risco dessas infecções na pele, cabelo e unha, desde diabetes à terapia biológica, embora tais doenças não apresentem risco de vida e são consideradas por muitos como trivial, elas afetam a morbidade e qualidade

de vida dos pacientes. As espécies não-*albicans* tornaram-se importantes agentes dessas infecções. O espectro das espécies presentes depende muito da geologia, economia e ecologia da região em que foi diagnosticada. No estudo realizado por Otasevic et al. (2018), na região do sudeste da Sérvia, foi observado que as unhas foi o local mais comum para a infecção causada por espécies de *Candida não-albicans*, sendo que a espécie que prevalece nesses materiais provenientes de infecções de unha são a *C. parapsilosis*.

Segundo Sardi et al. (2013), a candidíase oral é uma das doenças mais comuns causadas por *Candida albicans*. Ela é capaz de interagir cooperativamente com outros microrganismos na cavidade oral, principalmente bactérias na placa dentária, tornando-se patogênica e provocando a candidíase. O caso pode se agravar se houver leveduras na cavidade subgengival, sendo possível causar uma candidemia. Outros fatores também podem favorecer a candidíase, por exemplo, o uso de dentaduras.

Infecções por *Candida* spp também pode ocorrer em pessoas saudáveis, que apresentam alterações locais de resposta, como é o caso do desenvolvimento de candidíase vaginal (COLOMBO, GUIMARÃES, 2003). Segundo Freitas et al. (2018), a candidíase vulvovaginal é a segunda infecção vaginal mais comum, cerca de 50-75% das mulheres apresentam essa infecção em alguma etapa de sua vida. No estudo realizado por Tulasidas et al. (2018), cepas isoladas de mulheres diagnosticadas com candidíase vulvovaginal, na idade reprodutiva, foram analisadas a fim de determinar as principais espécies, e foi observado que a *C. albicans* é a mais frequente, seguida da *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Dessas espécies, a de *C. glabrata* apresentou alta resistência ao fluconazol (100%).

As espécies de *Candida*, podem estar presentes em infecções superficiais como pele, unha e mucosas, ou atingir a corrente sanguínea e afetar órgãos, denominada candidíase invasiva, que está geralmente relacionada a pacientes de cirurgias (abdominal, principalmente), queimaduras, tratamentos de longo prazo, e à administração prévia de antibióticos e imunossupressores. As espécies responsáveis por mais de 90% das infecções invasivas são *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (SARDI, J.C.O. et al., 2013; TULASIDAS, S. et al., 2018).

2.4. Antifúngicos convencionais e mecanismos de resistência

Embora a quantidade de antifúngicos utilizados para tratamentos clínicos pareçam ser numerosos, poucos deles são eficazes para infecções causadas por *Candida* spp. Podemos

destacar os azóis, que agem através da inibição da biossíntese de ergosterol, que é análogo ao colesterol das membranas celulares em animais, portanto, age interrompendo a formação das membranas fúngicas e não apresenta reação cruzada com as células hospedeiras, uma vez que a estrutura do colesterol e do ergosterol apresentam diferenças suficientes. Nessa classe estão inclusos os imidazóis (miconazol, econazol, clotrimazol e cetoconazol) e triazóis (fluconazol, itraconazol) e, o mais recente agente, voriconazol (derivado triazólico sintético de segunda geração do fluconazol) e posaconazol (análogo hidroxilado do itraconazol). Muitos deles são amplamente utilizados tanto para uso tópico quanto para tratamento e profilaxia de infecções invasivas. Outra classe de antifúngicos amplamente utilizada é a das equinocandinas (casposfungina, micafungina e anidulafungina), elas são lipopeptídicas e impedem a formação da parede celular fúngica através da inibição da síntese de (1,3)- β -D-glucano. A concentração que possui ação fungicida desses compostos irá depender da espécie de *Candida* (SPAMPINATO, LEONARDI, 2013).

Os polienos como a nistatina e a anfotericina B são antifúngicos que também interagem com o ergosterol, impedindo a perfeita produção da membrana celular fúngica. Por fim, temos os análogos de nucleosídeos, por exemplo, a flucitosina, que é um análogo de pirimidinas, impedindo a síntese de RNA/DNA (SPAMPINATO, LEONARDI, 2013).

De acordo com o mesmo autor, infelizmente, esses antifúngicos estão sendo amplamente utilizados, aumentando a seletividade e a resistência. Os mecanismos utilizados por esses fungos são diversos e dependem do fármaco, porém, de forma geral são: diminuição da concentração intracelular do antifúngico, diminuição da afinidade/processividade alvo deste, e redução do seu efeito. Foram reportados diversos casos de resistência aos azóis em pacientes com HIV infectados com candidíase faríngea. Além disso, as espécies não-albicans, tais como *C. glabrata* e *C. Krusei*, desenvolveram uma resistência intrínseca à esses compostos.

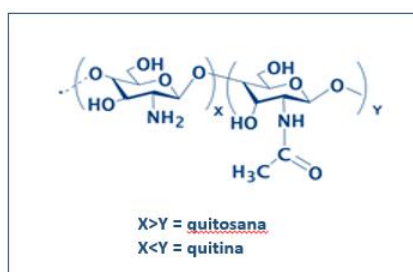
2.5. Quitosana

A quitosana é o nome dado a 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, em insetos, em anelídeos, moluscos e celenterados. A estrutura da quitina e da quitosana (Figura 2) é formada por unidades de 2-acetamida-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-amina-2-deoxi-D-glicopirranose, respectivamente, ligadas por ligações glicosídicas β (1 $\rightarrow$ 4). Logo, a diferença entre a quitina e a quitosana são

os grupos acetamida, na qual a quitosana possui em menor porcentagem (PEDRO, et al., 2013). Esses polímeros apresentam características únicas e atrativas, tais como: biodegradabilidade, baixa toxicidade e efeitos antimicrobianos e, por isso, várias aplicações estão sendo estudadas, na agricultura, área médica e farmacêutica, alimentar, têxtil, tratamento de água, cosméticos, entre outras (KONG et al., 2010).

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 uma vez que os grupos aminos estarão carregados e a quitosana estará na sua forma catiônica, sendo a forma associada à suas características antimicrobianas, pois é capaz de realizar interações eletrostáticas com a parede celular de fungos e bactérias. Entretanto, a solubilidade em água, que possui 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 torna-la solúvel em uma maior faixa de pH (LIM, HUDSON, 2004; DIAS, 2017; PEDRO et al., 2013).

Figura 2 - Representação esquemática das estruturas químicas da quitina e da quitosana.



Fonte: elaborado pelo autor

2.6. Efeitos antimicrobianos da quitosana e seus derivados

A quitosana possui características muito atrativas para diversas aplicações, entre elas, o potencial antimicrobiano, mas devido sua baixa solubilidade em água no pH neutro, é necessário realizar modificações na sua estrutura, sintetizando diversas variações de quitosana, denominadas derivados de quitosana. De acordo com Kong et al. (2010), a quitosana e seus derivados apresentaram efeitos antimicrobianos contra um amplo espectro de bactérias Gram-

positivas e Gram-negativas, fungos filamentosos e leveduras, e sem apresentar toxicidade em células de mamíferos.

Segundo o mesmo autor, o potencial antimicrobiano da quitosana e seus derivados, dependem de alguns fatores, tais como: espécie e idade do microrganismo, características da quitosana (massa molecular, concentração, densidade de carga positiva, grupos hidrofílicos/hidrofóbicos, capacidade de quelação, entre outros), estado físico e fatores ambientais (pH, força iônica do meio, temperatura e tempo de reação).

Diversos estudos (NO et al., 2002; DEVLIEGHERE et al., 2004; SABAA et al., 2018; LIU et al., 2018) mostraram que as modificações estruturais na quitosana, como a inserção de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, 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 Schiff 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*).

No estudo realizado por No et al. (2002), em que derivados de quitosana com diferentes pesos moleculares foram testados contra quatro bactérias Gram-negativas e sete bactérias Gram-positivas, foi possível observar que os de alta e média massa molecular apresentaram baixa atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas. Entretanto, foi muito efetivo contra bactérias Gram-positivas. Já os de baixa massa molecular apresentaram efeitos opostos, demonstrando que o peso molecular e o microrganismo em questão afetam o potencial antimicrobiano.

No trabalho de Gabriel, Tiera e Tiera (2015), na qual o efeito inibitório do crescimento de *Aspergillus flavus* foi testado com derivados de quitosana de diferentes massas moleculares (alta, média e baixa) e diferentes porcentagens de grupo hidrofílico (dietilaminoetil (DEAE)) e grupo hidrofóbico (Dodecil (DOD)), foi possível verificar que os derivados sintetizados a partir da quitosana de baixa massa molecular apresentaram índices de inibição maiores e que a inserção de grupos DEAE e DOD foi efetiva no aumento da atividade antifúngica, já que o derivado com massa molecular de 15 kDa e substituído com 43% DEAE e 39% DOD apresentou inibição de 100% do crescimento micelial do fungo, na concentração de 1 g L⁻¹.

Tal fato foi confirmado no trabalho de Dias (2017), na qual os derivados de quitosana substituídos com 40% DEAE e 20% DOD e diferentes massas moleculares foram testados

contra o *Aspergillus flavus*, e aqueles com menores massas (8 e 15 kDa) foram mais efetivos, na concentração de 1 g L⁻¹ atingiu inibição de 100% e 51,55%, respectivamente.

No estudo de Kulivov et al. (2014), as oligoquitosanas de 2-20 kDa apresentaram atividade inibitória eficiente contra o crescimento de *Candida albicans*. Já no trabalho de Liu et al. (2018), quitosanas com massa molecular média (150 kDa) e substituídas com três grupos de amônio quaternário apresentaram índice de inibição de 91,94% contra o fungo *Rhizoctonia solani* e 87,18% contra o fungo *Phytophthora capsici*, o que indica elevada atividade antifúngica de derivados com carga positiva e massa molécula média. Em Seyfarth et al. (2008), derivados de cloridrato de quitosana de alta massa molecular apresentaram uma concentração inibitória mínima (CIM) menor que os derivados de baixa massa molecular contra o fungo *Candida albicans*, indicando uma atividade inibitória mais efetiva dos derivados de alta massa. Portanto, há muitos efeitos que devem ser considerados ao analisar a atividade antifúngica dos derivados de quitosana, deve-se avaliar individualmente os parâmetros estruturais de cada derivado e as características fisiológicas do microrganismo em questão.

Em Devlieghere et al. (2004) foi observado o efeito do pH na atividade antimicrobiana da quitosana, pois ao realizar os ensaios de inibição com difentes microrganismos, em pH 4,0-6,0 obteve-se diferentes resultados. Por exemplo, na concentração de 0.005% (w/v) de quitosana, o crescimento da *Candida lambica* foi completamente inibido em pH 4,0, enquanto que em pH 6,0 houve apenas uma pequena redução na taxa de crescimento.

2.7. Efeitos antimicrobianos dos derivados contra *Candida*

A atividade antimicrobiana da quitosana geralmente envolve dois tipos de interação com o microrganismo que depende da massa molecular, em diversos estudos realizados, se a quitosana for de alta massa, provavelmente irão se aderir na parede celular do microrganismo, enquanto que as de baixa massa irá penetrar na célula, inibindo várias enzimas e desregulando a síntese de proteínas (KULIKOV et al., 2014).

Em Perinelli et al. (2018) foi testado a eficácia de nanopartículas de quitosana e quitosana livre dispersas em hidrogéis aquosos ou dispersos de 5,5% de hidroxipropilmetil celulose (HPMC), em diferentes porcentagens (0,1%, 0,5%, 1%), contra oito diferentes cepas de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. lusitanae*, isoladas de pacientes com candidíase vaginal. Os hidrogéis com 1% de quitosana livre apresentaram elevada atividade contra todas as cepas de *Candida*, mostrando no teste de disco difusão inibição de 12 ± 0,78 mm a 13 ± 0,27 mm,

enquanto a solução 1% de nanopartículas de quitosana não apresentaram inibição contra as cepas de *C. albicans*, mas apresentaram atividade semelhante ao hidrogel com quitosana livre contra as cepas não-*albicans* testadas. As nanopartículas dispersas no hidrogel de HPMC apresentaram inibição contra todas as cepas, porém as nanopartículas preparadas na proporção 12:1 (maior tamanho) apresentaram atividade relativamente maior que aquelas com relação 6:1 (menor tamanho).

Contudo, no trabalho de Aksungur et al. (2004), em que foi testado o gel da quitosana com diferentes massas moleculares (alta e baixa), para aplicação com nistidina, *in vivo e in vitro*, no tratamento de candidíase oral, foi observado que o gel da quitosana de baixa massa molecular com a nistidina, promoveu uma melhor aplicação do medicamento, pois melhora a adesão na cavidade bucal e aumenta o tempo para a concentração do fármaco decair, permitindo uma ação mais prolongada, além de possuir ação contra *Candida*, potencializando os efeitos.

No estudo realizado por Anush et al. (2018), uma série de derivados de quitosana foi sintetizada a partir da reação da quitosana com diferentes pirazol-4-carbaldeídos substituídos em meio ácido, a fim de analisar a CIM desses derivados obtidos (5-Cloro-3-metil-1-fenil-1H-pirazol-4-carbaldeído; 1-fenil-3-metil-5-o-cresiloxi-1H-pirazol-4-carbaldeído; 1-fenil-3-metil-5 (-2-cloro-fenil) -1H-pirazol-4-carbaldeído; 1-fenil- 3-metil-5(-p-nitro fenil)-1H-pirazol-4-carbaldeído e 3-metil-1-fenil-5(piperidina) -1H-pirazol-4-carbaldeído) e da quitosana comercial, para fins comparativos, contra a *C. albicans*. Foi observado que os derivados apresentaram atividade antifúngica similar ou melhor em concentrações bem menores que a da quitosana comercial ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Tal fato pode ser atribuído à densidade de cargas positivas na cadeia do polímero, massa molecular e hidrofobicidade, pois, de acordo com o autor, os principais mecanismos responsáveis pela atividade antimicrobiana são: a interação eletrostática entre as cargas positivas da cadeia polimérica e cargas negativas na superfície celular do fungo, ligação da quitosana com o DNA microbiano impedindo a síntese de mRNA e proteínas, quelação de metais essenciais para o crescimento fúngico pela quitosana. Os derivados com maior massa e conteúdo hidrofóbico apresentaram melhores atividades contra a *C. albicans* (ANUSH et al., 2018).

Grisin et al. (2017), foi realizada a síntese de derivados de quitosana a partir da reação com ácido oleico a fim de obter derivados hidrofobicamente modificados contendo grupos ácido desoxicólico e avaliar sua atividade contra a *C.glabrata*. Os hidrogeis formados com micropartículas de oleoilquitosana foram misturados com anfotericina B e observou-se uma redução de 1,5 vezes na concentração capaz de inibir totalmente o fungo. O mecanismo proposto pelo autor para a potencialização do efeito da anfotericina quando misturada com

micropartículas de quitosana é a interação eletrostática com a membrana a partir da superfície plana das micropartículas, o que causaria a ruptura desta e facilitaria a ação da anfotericina B.

No trabalho de Ludwig et al. (2018) foram desenvolvidas nanopartículas de polilactoglicolídeo (PLGA) revestidas com quitosana contendo anfotericina B a fim de diminuir a toxicidade desse fármaco e viabilizar a via oral como liberação. Essas nanopartículas de PLGA revestidas de quitosana contendo anfotericina foram testadas contra isolados clínicos de candidíase vulvovaginal (*C. albicans* e *C. glabrata*), infecções da corrente sanguínea (*C. albicans* e *C. tropicalis*), e do trato urinário (*C. albicans* e *C. glabrata*, *C. guilhermondii*) e foi observada a diminuição da toxicidade, evidenciando que o polímero de quitosana é biocompatível, não tóxico, mucoadesivo e auxilia nas interações com a parede celular do fungo.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral estudar a atividade antifúngica de diferentes derivados anfifílicos de quitosana contra cepas de *Candida* sp., um fungo que afeta milhões de pessoas no Brasil.

3.1. Objetivos específicos

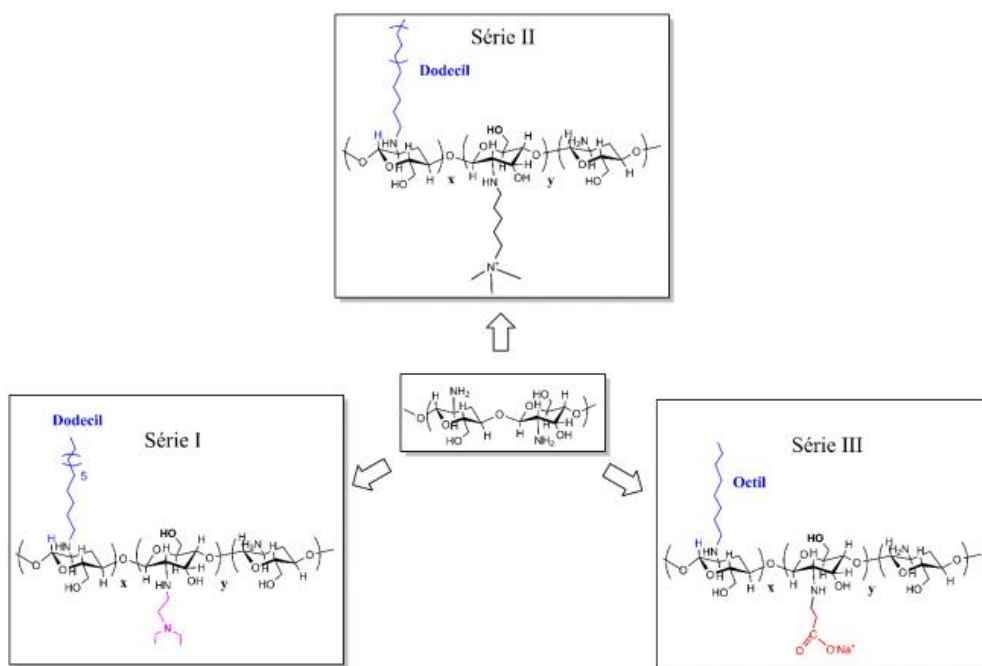
- i) Sintetizar e caracterizar uma série de derivados zwitteriônicos com diferentes densidades de cargas e conteúdos hidrofóbicos (série III).
- ii) Avaliar a atividade antifúngica de três séries de derivados de quitosana contra cepas padrão e isolados clínicos de diferentes espécies de *Candida*.
- iii) Analisar em microscopia confocal a laser o efeito do derivado de quitosana com maior ação antifúngica sobre a morfologia e a parede celular de *Candida* spp.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Derivados anfifílicos

Foram utilizados derivados anfifílicos de quitosana mostrados na figura 3. Os polímeros das séries 1 e 2, foram sintetizados e caracterizados por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) e estavam disponíveis no laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia do IBILCE-UNESP. Os polímeros da série 3 foram sintetizados e caracterizados na execução deste trabalho.

Figura 3 - Estrutura dos derivados anfifílicos de quitosana. Série I: DEAE. Serie II: Pentil trimetil amônio. Serie III: N-carboxietil



Fonte: elaborado pelo autor

4.2. Síntese e caracterização dos derivados da série 3

4.2.1. Síntese dos derivados anfifílicos de carboxietil quitosana

Os derivados de carboxietilquitosana foram preparados segundo metodologia descrita por SASHIWA et al. (2003).

Primeiramente, foi realizada a inserção dos grupos hidrofílicos aniônicos (carboxietil) a partir da quitosana desacetilada (QD). Para tal reação a QD foi solubilizada em água deionizada à 50°C, sob agitação, e adicionou-se o ácido acrílico, a reação ocorreu por 48 horas. Após decorrido esse tempo, adicionou-se NaOH à mistura para ajustar o pH no valor de 10-12 a fim de converter o ácido carboxílico no sal de sódio. Posteriormente, a mistura foi dialisada contra água deionizada por dois dias, utilizando-se membranas de diálise, para remover o excesso de sal formado. Por fim, o derivado foi recuperado por liofilização.

4.2.2. Síntese de N-carboxietil-octil/dodecil-quitosana

A reação para alquilação dos derivados hidrofílicos consistiu em duas etapas, primeiramente, a reação dos grupos amino de quitosana com dodecil aldeído ou octil aldeído para formação da base de Schiff, seguida da redução utilizando-se borohidreto de sódio, adaptando-se o método descrito por Gabriel (2013). Para a reação solubilizou-se os derivados de carboxietil em água deionizada e ajustou-se o pH para 7,6, em seguida, adicionou-se octil aldeído ou dodecil aldeído, sob agitação. Decorrido 1 hora da reação, adicionou-se borohidreto de sódio na proporção 3:1 e manteve-se sob agitação por 24 horas. O produto foi purificado por diálise contra água deionizada por 3 dias, trocando-se a água 3 vezes ao dia, e foi recuperado por liofilização. O procedimento foi repetido para todos os derivados obtidos, modificando-se apenas as quantidades de octil aldeído ou dodecil aldeído na reação.

4.2.3. Caracterização dos derivados anfifílicos por RMN H^1

As amostras analisadas por RMN H^1 foram preparadas pela solubilização de aproximadamente 10 mg do polímero, previamente seco em estufa à vácuo por 4 horas, em 650 μ L de óxido de deutério e 20 μ L de cloreto de deutério, a solução permaneceu em agitação por 4 horas. Após isso, foram transferidas para tubos específicos para RMN. Os espectros foram obtidos à temperatura de 70°C sem supressão de água.

4.3. Grau de ionização dos derivados anfifílicos em função do pH

O grau de ionização (GI) foi obtido por titulação potenciométrica, o que permite avaliar a densidade de cargas em função do pH do meio. Para tal, pesou-se 40 mg do polímero, previamente seco em estufa à vácuo, e adicionou-se 10 mL de HCl 0,0998 mol/L padronizado,

permaneceu sob agitação por 14 a 20 horas para solubilização completa. Em seguida, titulou-se com NaOH 0,0995 mol/L padronizado, sendo o pH constantemente monitorado a cada adição de 100 μL ou 50 μL , dependendo da variação do pH, a fim de obter uma curva sigmoide, finalizando-se quando o pH aproxima-se de 12, a fim de obter a curva potenciométrica. O GI pode ser determinado a partir da primeira derivada do gráfico obtido da titulação potenciométrica, utilizando-se os picos indicativos de início e término do processo de desprotonação.

4.4. Ensaios de citotoxicidade dos polímeros

4.4.1. Preparação das soluções estoque dos derivados

Pesou-se 5 mg dos polímeros para preparo das soluções estoque (2,5 mg mL^{-1}), adicionou-se 200 μL de HCl 0,1 mol L^{-1} e manteve sob agitação, em agitador magnético, por 24 horas. Após esse período adicionou-se 2 mL de meio *Dulnecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM - Sigma Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS – Sigma Aldrich) e 1% de penicilina (PS – Sigma Aldrich) para obter a concentração da solução estoque. As diluições para as concentrações desejadas (1; 0,75; 0,5; 0,25 e 0,1 mg mL^{-1}) foram realizadas na placa de microdiluição utilizando o meio como solvente.

4.4.2. Procedimento dos ensaios de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade dos polímeros foram realizados a partir do método calorimétrico com MTS para analisar a viabilidade das células, utilizando-se o protocolo do fabricante, com a cultura de células de fibroblastos de camundongo NIH/3T3, que é uma célula que não indica riscos (nível 1) e atende às necessidades do ensaio. O ensaio é realizado em 3 dias: no primeiro dia, realizou-se a contagem das células na câmara de Neubauer e diluiu-se a quantidade necessária para possuir 10.000 cel/poço, foram cultivadas por 24 horas em 200 μL /poço de DMEM (Sigma Aldrich) suplementado, nas seguintes condições: 37°C, 95% O_2 , 5% CO_2 . Durante o segundo dia, o meio DMEM (Sigma Aldrich) suplementado foi retirado e adicionou-se as soluções de polímero em diferentes volumes a fim de obter as concentrações finais desejadas, e permaneceu nas mesmas condições anteriores por 24 horas. Por fim, no terceiro dia, retirou-se as soluções de polímero da placa e adicionou-se 120 μL /poço de PMS (100 μL DMEM + 20 μL MTS) $25 \cdot 10^{-6} \text{mol L}^{-1}$. A manipulação foi feita no escuro. Em seguida,

incubou-se por 3 horas nas mesmas condições anteriores. Após 3 horas foi realizada a leitura da absorbância em 490 nm. A viabilidade celular foi calculada ajustando-se as células sem tratamento (controle) como 100%. O teste foi realizado em triplicata para análise de dados.

4.5. Ensaios microbiológicos

4.5.1. Cepas de *Candida* sp

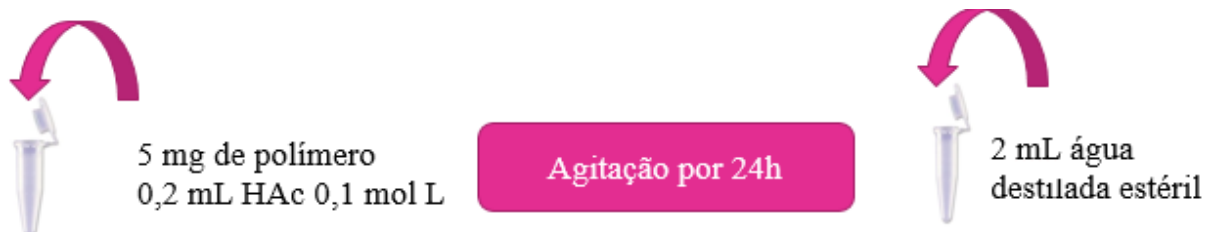
Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia (LMIC) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP). Foram utilizadas cepas de *Candida* sp. disponibilizadas pelo Laboratório de Microbiologia: a) *C. albicans* ATCC 90028 e quatro isolados clínicos de *C. albicans* de diferentes pacientes (CA1, CA2, CA3, CA4); b) *C. glabrata* ATCC 2001, e três isolados clínicos de *C. glabrata* de diferentes pacientes (CG1, CG2, CG3); c) *C. krusei* ATCC 10147 e quatro isolados clínicos (CK1, CK2, CK3, CK4); e d) *C. parapsilosis* ATCC 22019 e também quatro isolados clínicos (CP1, CP2, CP3, CP4). 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 – protocolo A45A7A6.

4.5.2. Concentração inibitória mínima (CIM)

4.5.2.1. Preparo das soluções estoque dos derivados

Preparou-se as soluções estoque de cada polímero na concentração de 2 mg/mL em solução aquosa 10% de ácido acético. Posteriormente, 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 utilizado para o teste (RPMI-1640).

Figura 4 – Esquema para preparo da solução estoque



Fonte: Elaborado pelo autor

4.5.2.2. Preparação dos inóculos

Primeiramente, realizou-se o repique, com alças estéreis, da levedura desejada para uma placa de ágar Sabouraud-dextrose e incubou-se por 24 horas à 35°C. Em seguida, uma alçada dessa cultura foi suspensa em 5 mL de salina estéril. Em seguida, ajustou-se 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 CLSI M27-S4E, 2012. Esse procedimento fornece uma suspensão-padrão de levedura contendo 1.10^6 a 5.10^6 células/mL.

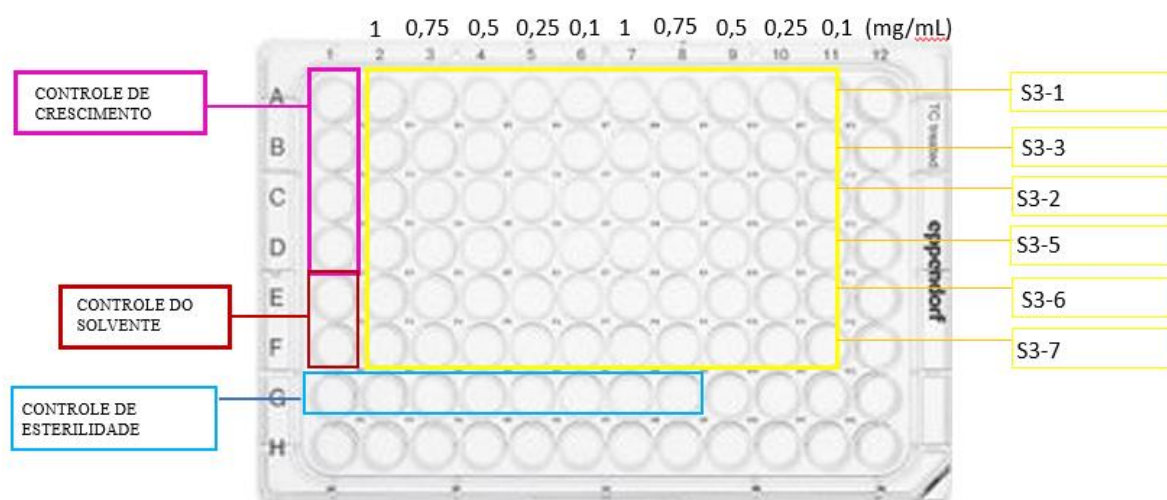
4.5.2.3. Preparo das placas de microdiluição

Os testes da atividade antifúngica foram realizados pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com o documento (modificado) M27-A4.

As placas de microdiluição foram preparadas em diferentes concentrações de cada polímero (1 mg/mL; 0,75 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,1 mg/mL). Para cada cepa do microorganismo foi utilizada 2 placas (layouts), descritas nas Figuras 5 e 6. Para a diluição dos derivados de quitosana foi utilizado o meio de cultura líquido RPMI-1640 tamponado com ácido morfopropileno sulfônico (MOPS) e suplementado com glicose 2%, ajustando-se o pH em 7,0 com ácido clorídrico. Foi adicionado 100 µL do inóculo padronizado em cada poço contendo o RPMI e os derivados em diferentes concentrações, da coluna 2 à 11, na qual a coluna 1 foi utilizada como controle de crescimento até a linha E no layout 1, e até a linha D no layout 2, na linha F e G do layout 1, e a linha E e F do layout 2 foram realizados o controle do solvente, nas quais foram adicionadas apenas o ácido acético na porcentagem utilizada para solubilização dos polímeros a fim de analisar se a atividade antifúngica não era causada por este. Portanto, na coluna 1 não foram adicionados os derivados de quitosana, exceto nas linhas H (coluna 1 a 9) e G (coluna 1 a 8) que foram utilizadas para controle de esterilidade dos polímeros e do RPMI, nos layouts 1 e 2, respectivamente.

Figura 5 - *Layout 1* da placa de microdiluição

Fonte: elaborado pelo autor

Figura 6 – *Layout 2* da placa de microdiluição

Fonte: elaborado pelo autor

As placas foram incubadas por 24 horas à 37°C. Em seguida, realizou-se a leitura em leitor de placas, por densidade ótica, no comprimento de 530 nm. A menor concentração capaz de produzir inibição do crescimento do fungo em relação ao poço controle-positivo foi identificada como a CIM (Concentração Inibitória Mínima) do polímero para esta amostra. Todas as diluições dos diferentes polímeros e grupos de controle foram testadas em duplicata.

4.5.3. Teste da atividade antifúngica

Para a realização do teste na qual foi analisado se o polímero, em questão, é um antifúngico fungicida ou fungistático na CIM, após a realização e leitura das placas mencionadas no item 4.5.2., decorridas as 24 horas, o conteúdo foi transferido de cada poço em uma placa grande de Ágar Sabouraud, de acordo com o mesmo layout 1 e 2, conforme mostrado na Figura 7. A transferência do conteúdo dos poços da placa de microdiluição para a placa de Ágar Sabouraud foi realizado utilizando-se de palitos esterilizados em autoclave, onde homogeneizou-se bem o conteúdo do poço com o palito e perfurou-se o ágar na área correspondente ao poço na placa.

Figura 7 - Placa de Ágar Sabouraud grande com o mapa para perfuração semelhante à placa de microdiluição



Fonte: foto tirada pelo autor

4.5.4. Determinação da curva de morte vs tempo (time kill)

Foi realizado o ensaio de time-kill a fim de obter o tempo de morte do microrganismo a partir do contato com o antifúngico. Foi utilizada a metodologia modificada de Toledo et al. (2016).

O preparo das soluções dos derivados foi realizado de acordo com o descrito no item 4.5.2.1, entretanto, calculou-se a massa de polímero para que a concentração final (em 10 mL de solução) seja igual à CIM de cada derivado com as diferentes cepas, mostradas no item 4.5.2.

4.5.4.1. Preparação do inóculo

No dia anterior o microrganismo a ser testado foi incubado a 37°C em 5 mL de Caldo Sabouraud-dextrose, para crescimento por 24 horas. A preparação da suspensão de inóculo a ser utilizada para o teste foi realizada 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.

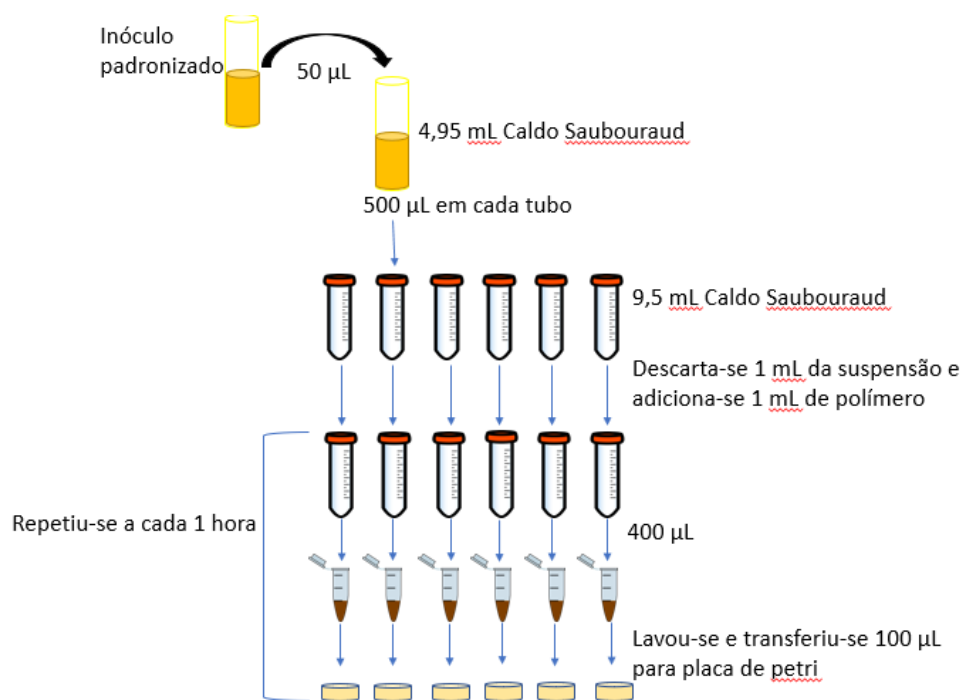
4.5.4.2. Procedimento para o preparo da curva de morte

Foram preparados 9,5 mL de Caldo Sabouraud Dextrose em tubos falcon de 10 mL (um tubo para cada polímero + um tubo para controle de crescimento), posteriormente, adicionou-se 500 µL da suspensão de inóculo, preparada no item 4.5.4.1, em cada tubo falcon, homogeneizou-se e descartou-se 1 mL da solução (caldo + inóculo) a fim de adicionar 1 mL da solução de polímero em cada tubo e o volume final ser 10 mL. O tempo começou a ser contado a partir da adição do polímero.

Retirou-se alíquotas de 400 µL a cada uma hora (1,2,3,4,5,6,7,8 horas), centrifugou-se a fim de decantar as células e lavá-las, com o intuito de não ocorrer mais ação do polímero no microrganismo após o tempo, portanto, retirou-se 300 µL do sobrenadante após a centrifugação e adicionou-se 300 µL de Caldo Sabouraud-dextrose limpo. Homogeneizou-se e retirou-se 100 µL transferindo-se para placa de Ágar-Sabouraud e distribuindo com alça de Drigalski, por fim, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. O procedimento está esquematizado na Figura 8.

Ao decorrer as 24 horas de cada tempo, contou-se as Unidades Formadoras de Colônias (UFC) das placas de cada polímero e do controle de crescimento (ausência de polímero), para realização do gráfico UFC/mL vs tempo.

Figura 8 – Esquema do procedimento de time-kill



Fonte: elaborado pelo autor

4.6. Análises microscópicas

4.6.1. Marcação dos derivados com rodamina

Primeiramente, os derivados das séries 1 e 2 foram marcados com rodamina para análise da estrutura na microscopia confocal a laser. Para tal, 200 mg de cada derivado foi pesado e solubilizado por 24 horas em 25 mL de água deionizada e 25 µL de ácido acético 0,1 mol L⁻¹. Em seguida, o pH foi ajustado para 6,2 com solução de NaOH e foi mantida em agitação sob atmosfera de N₂, e então dissolveu-se 12 mg de isotiocianato de rodamina B em 6 mL de metanol e adicionou-se lentamente à solução de quitosana sob agitação. A reação foi mantida sob agitação em atmosfera de N₂ por 18 horas, em temperatura ambiente.

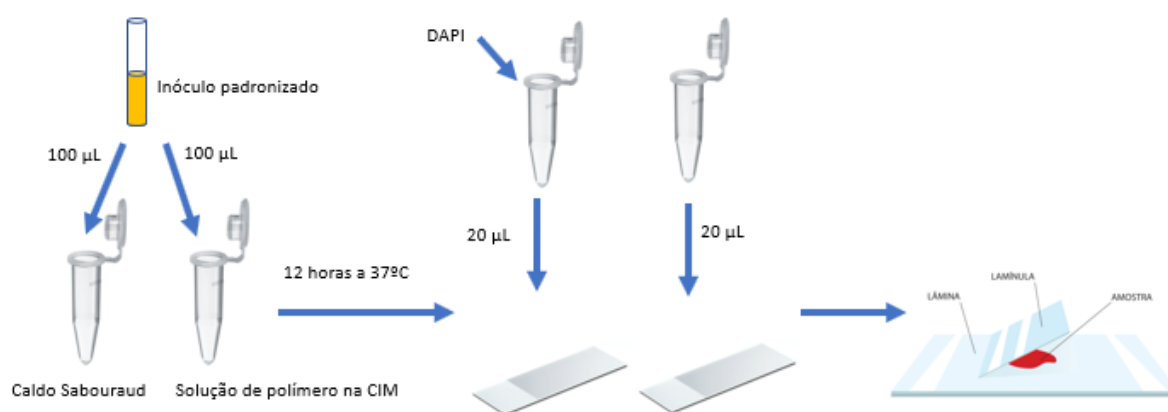
Após 18 horas, a mistura reacional foi dialisada contra solução de NaOH 0,05 mol L⁻¹ em membrana Spectrapore de 14 kDa por 24 horas, e contra água deionizada por 5 dias. Posteriormente, o derivado marcado com rodamina foi recuperado por liofilização. Todo o procedimento foi realizado na ausência de luz (MA, et al., 2008).

4.6.2. Microscopia confocal a laser

O preparo das lâminas a serem examinadas por microscopia confocal a laser foi realizado a partir de adaptação do método descrito por Sharma et al. (2018). Primeiramente, foi padronizado o inóculo (0,5 da escala de McFarland, em comprimento de onda de 530 nm) e adicionou-se 100 μ L do inóculo padronizado em cada tubo eppendorf: a) 200 μ L de caldo Sabouraud estéril, sem adição de polímero (controle) e b) 200 μ L da solução de polímero diluído em caldo Sabouraud na CIM, e em seguida, deixou na estufa a 37°C por 12 horas.

Após 12 horas, foi transferido 20 μ L de cada suspensão, preparada anteriormente, para as lâminas e espalhou-se com as lamínulas, selando com esmalte. O controle foi marcado com DAPI, conforme DAPI Protocol for Fluorescence Imaging (TERMOFISHER SCIENTIFIC Inc., 2016). A Figura 9 ilustra tal procedimento. As microscopias foram realizadas no Laboratório Multiusuário do Instituto de Física da USP, em São Carlos (IFSC/USP).

Figura 9 – Procedimento para preparo de lâminas da microscopia confocal a laser



Fonte: elaborado pelo autor

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Derivados anfifílicos previamente sintetizados e caracterizados (Série I e II)

Trabalhos anteriores desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa mostraram que derivados anfifílicos de quitosana modificados com dietiletilamino (DEAE) e pentiltrimetilamônio exibem excelente potencial como biofungicida contra os fungos

Aspergillus flavus (GABRIEL et al., 2015, DIAS et al., 2018, TAKAKI et al., 2014). Frente a estes resultados, no presente trabalho foram utilizadas diferentes séries destes polímeros com a finalidade de aplicação contra *Candida* spp., um fungo de grande interesse na área médica. Na tabela 1, são listadas as propriedades e estruturas dos polímeros utilizados para a série I (DEAE) e para a série II (pentiltrimetilamônio).

Tabela 1 – Estrutura química e caracterização das quitosanas modificadas.

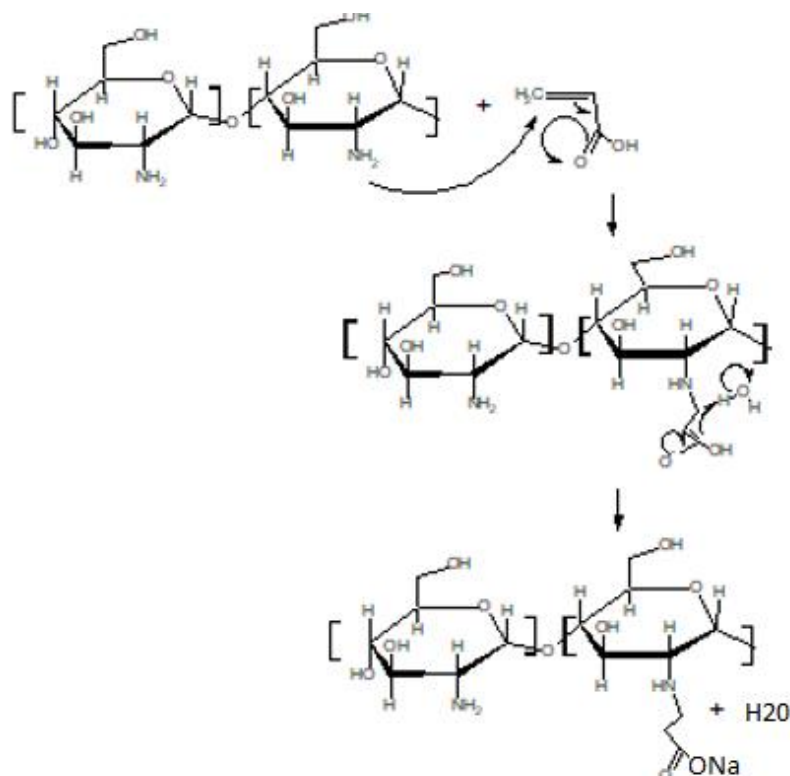
Polímero	GD ¹ (%)	GS _{DD} ² (%)	GS _{DEAE} ³ (%)	Mw ⁴ (kDa)
SÉRIE I				
40DEAE20DOD25KDA	97	20	40	25
40DEAE20DOD60KDA	97	20	40	60
40DEAE20DOD116KDA	97	20	40	116
40DEAE20DOD136KDA	97	20	40	136
SÉRIE II				
	GD ¹ (%)	GS _{DD} ² (%)	GS _{PE} ³ (%)	Mw ⁴ (kDa)
QD4DD5PE	97,3	4,0	4,8	137
QD4DD13PE	97,3	4,0	12,7	137
QD4DD57PE	97,3	4,0	46,3	137
				

¹Grau de desacetilação. ²Grau de substituição com grupos dodecila. ³Grau de substituição com grupos pentiltrimetilamônio ou DEAE. ⁴Massa molecular estimada por cromatografia de permeação em gel.

5.2. Síntese dos derivados de quitosana da série III

Na primeira etapa da reação, a inserção dos grupos carboxietil à quitosana desacetilada, foi realizada utilizando-se a reação de adição de Michael entre o ácido acrílico e o nitrogênio do grupo amina da quitosana, conforme descrito na Figura 10. Método adaptado de Sashiwa et al (2003).

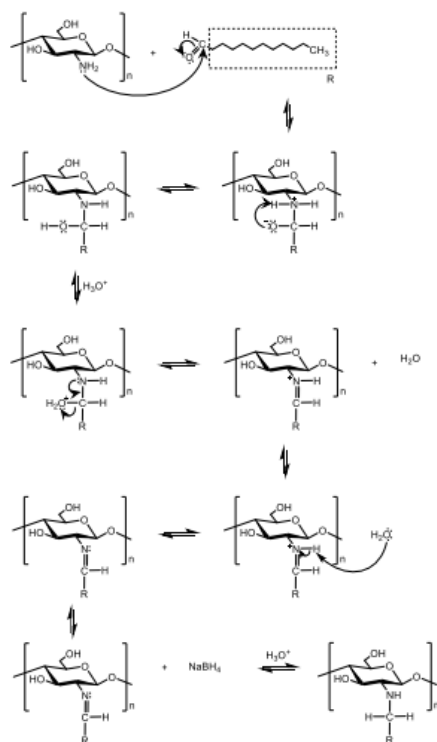
Figura 10 - Mecanismo de reação para formação de carboxietil quitosana



Fonte: Elaborado pelo autor

Posteriormente, realizou-se a alquilação dos derivados hidrofílicos utilizando-se octil aldeído ou dodecil aldeído. A reação ocorre por meio do ataque nucleofílico do nitrogênio do grupo amina da quitosana ao grupo carbonila do aldeído formando uma imina, que é reduzida, resultando em uma ligação covalente simples do grupo octil ou dodecil à quitosana, tal mecanismo está representado na Figura 11, de acordo com Dias (2017).

Figura 11- Mecanismo de reação de inserção de grupos octil ou dodecil na cadeia do polímero.



Fonte: DIAS, 2017

*Foi considerado uma unidade monomérica para exemplificar como ocorre a reação.

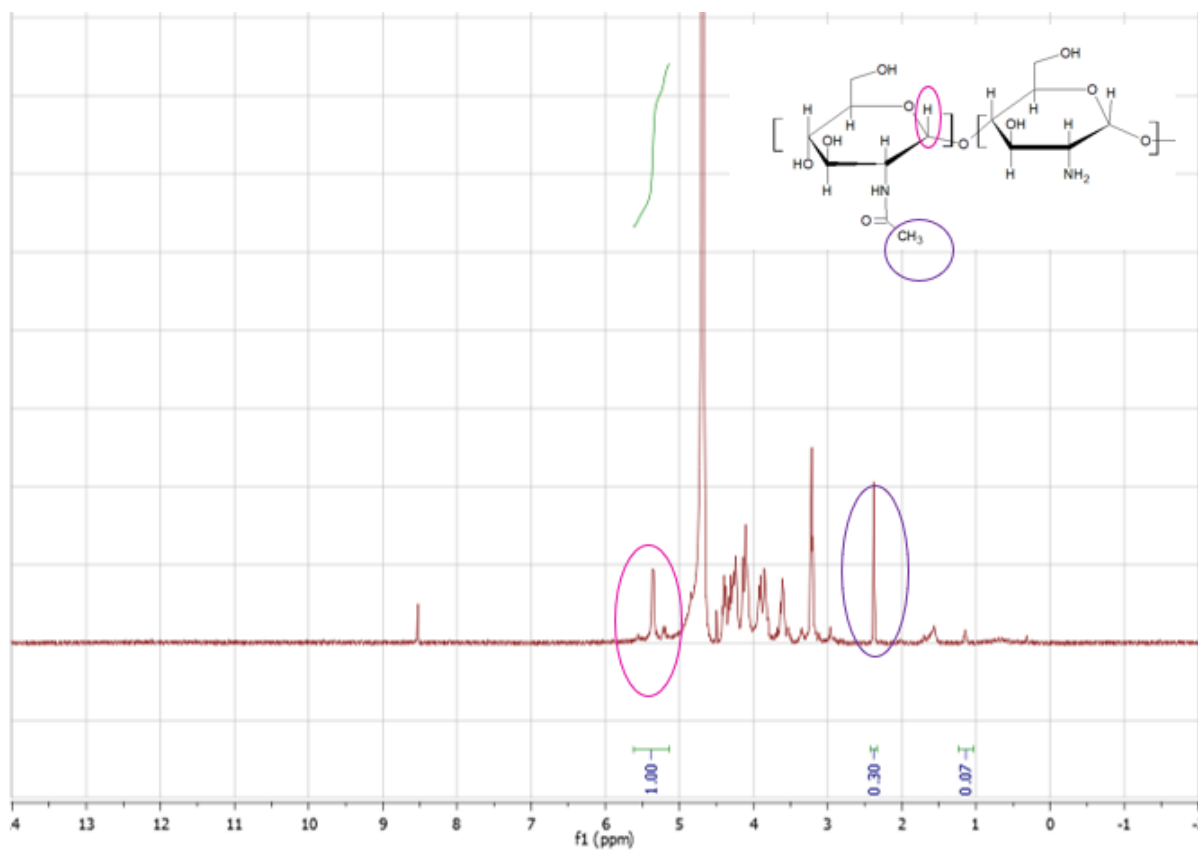
As reações foram realizadas da mesma maneira, repetidas vezes, com diferentes quantidades de ácido acrílico e octil aldeído ou dodecil aldeído, para a obtenção de diversos derivados anfifílicos substituídos com diferentes porcentagens de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos.

5.3. Caracterização dos derivados da série 3 por RMN ^1H

Primeiramente, o grau de desacetilação da quitosana utilizada para a síntese dos derivados foi determinado por RMN ^1H , a partir da área de integração dos picos dos hidrogênios anoméricos (A an) e da área de integração dos picos dos hidrogênios do grupo acetamida, (A ac), como descrito na equação 1. O pico dos hidrogênios anoméricos aparecem entre 5,0 e 5,4 ppm, e os hidrogênios do grupo acetamida ocorrem na região de 2,5 ppm, como pode ser observado na Figura 12 (GABRIEL, et al., 2013).

$$GD = \left(1 - \frac{A_{ac}}{3 A_{an}} \right) * 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Figura 12 - Espectro de RMN ^1H da quitosana utilizada para a síntese da carboxietil quitosana

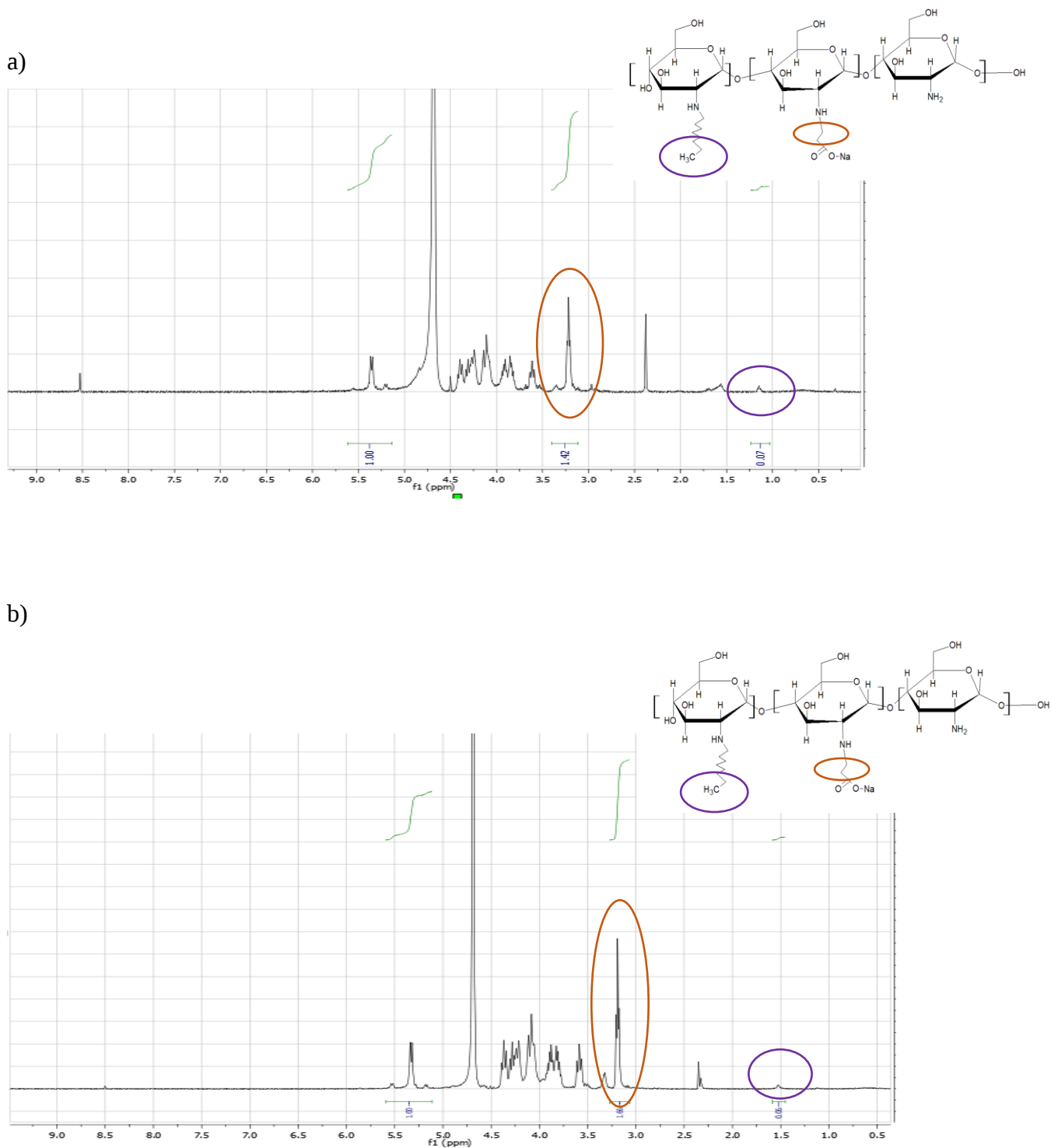


Fonte: elaborado pelo autor

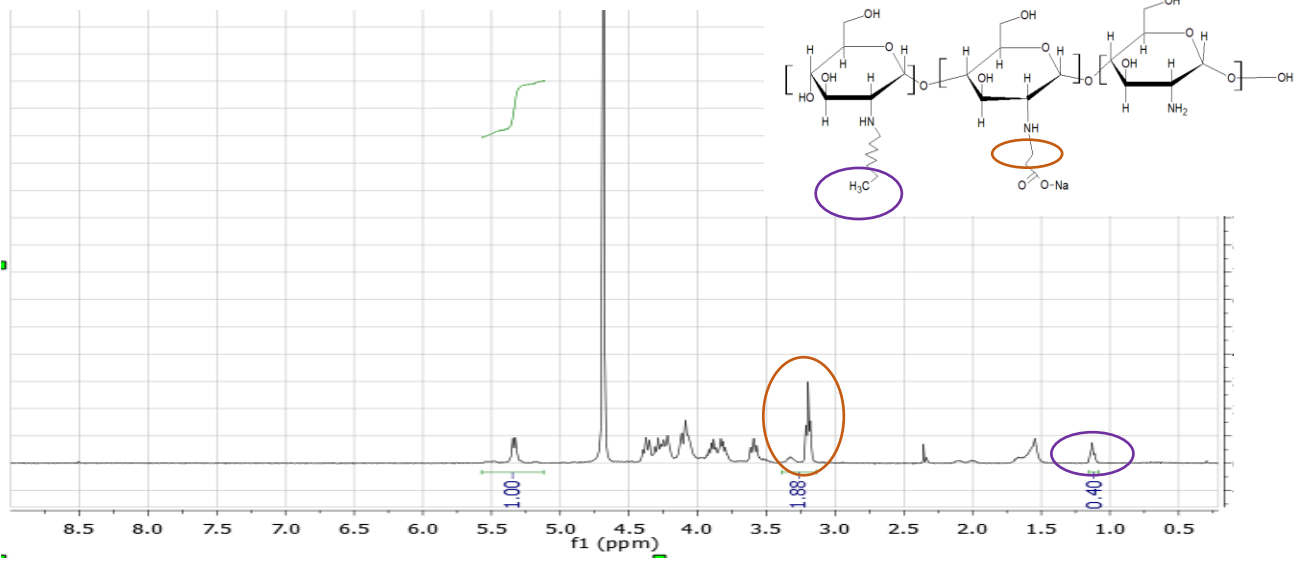
A partir do espectro de RMN H^1 e da equação 1, foi possível calcular o valor do grau de desacetilação da quitosana usada para as sínteses; obteve-se 90% de grupos desacetilados.

Figura 13 - Espectros de RMN H^1 : a) derivado da série 3-1; b) derivado da série 3-2; c) derivado da série 3-3; d) derivado da série 3-4; e) derivado da série 3-5; f) derivado da série 3-

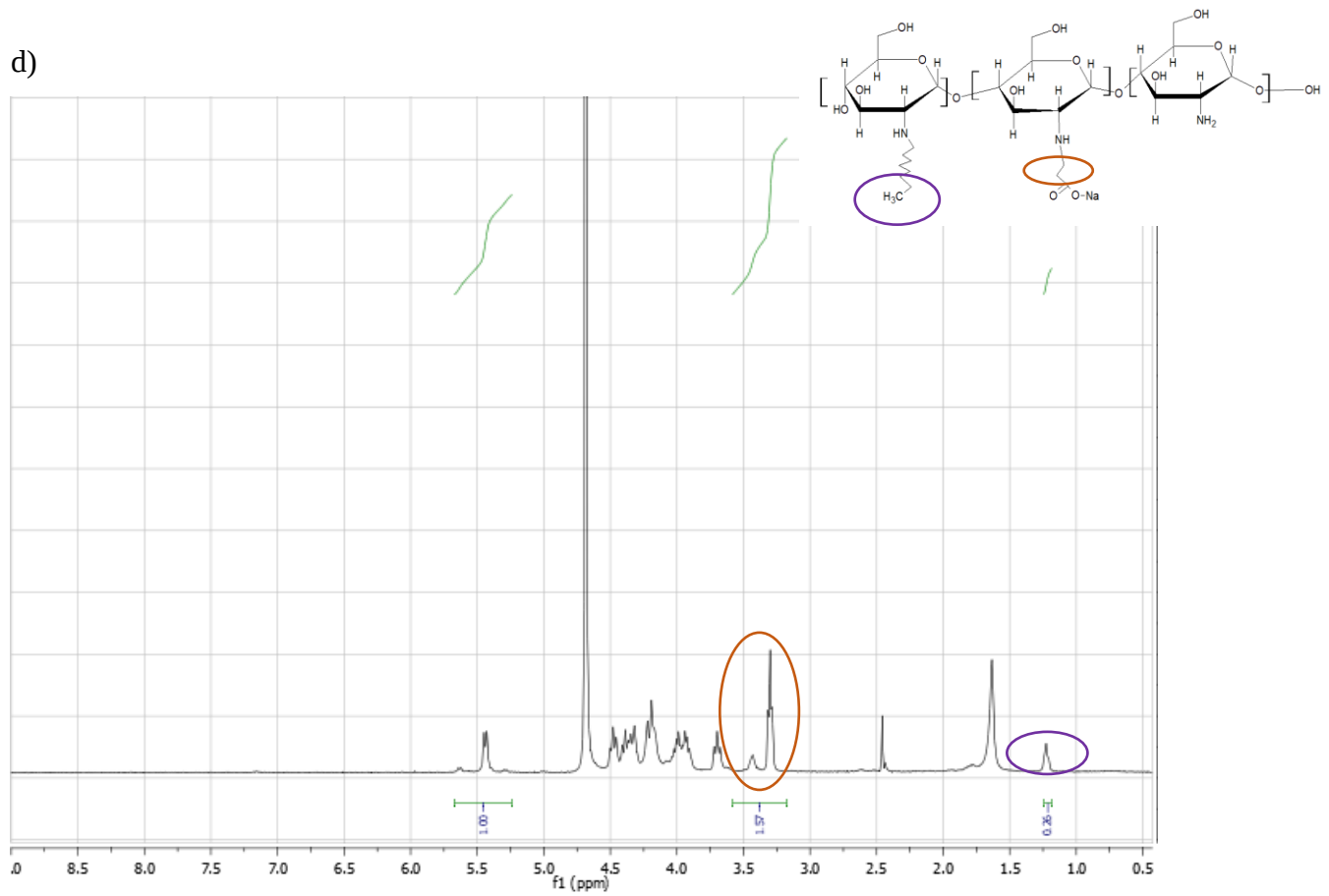
6



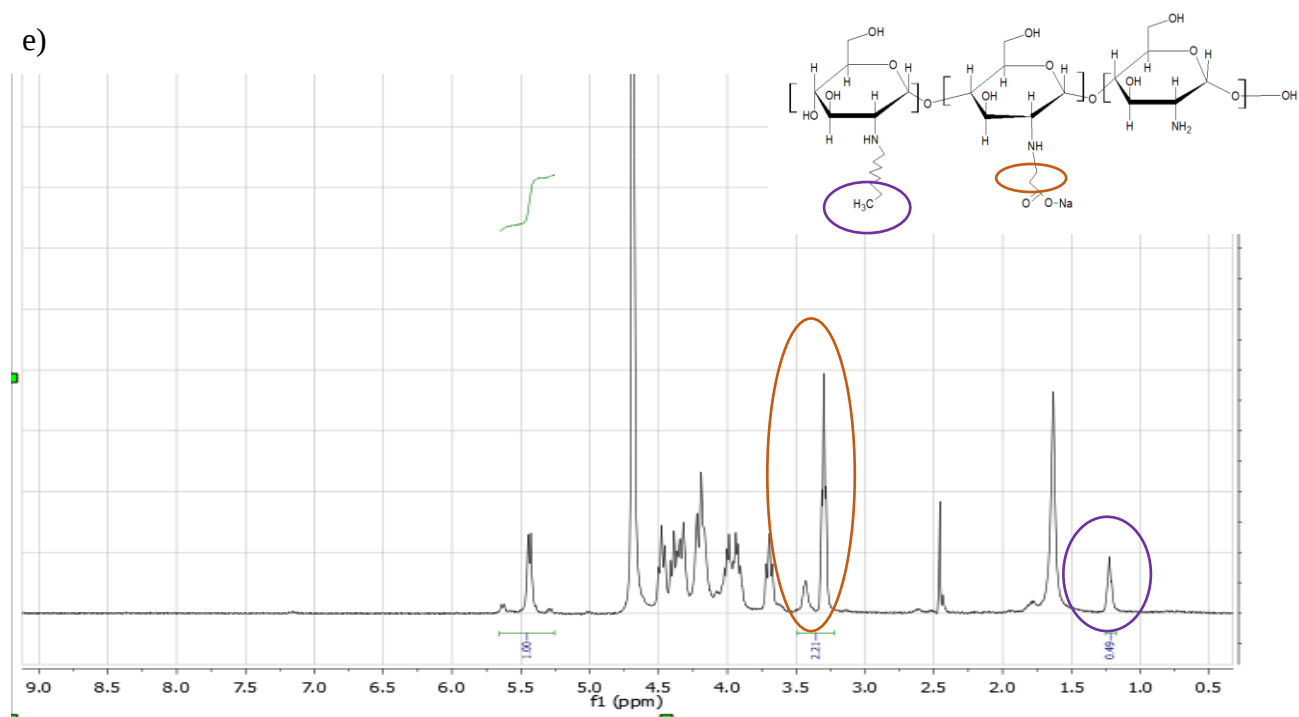
c)



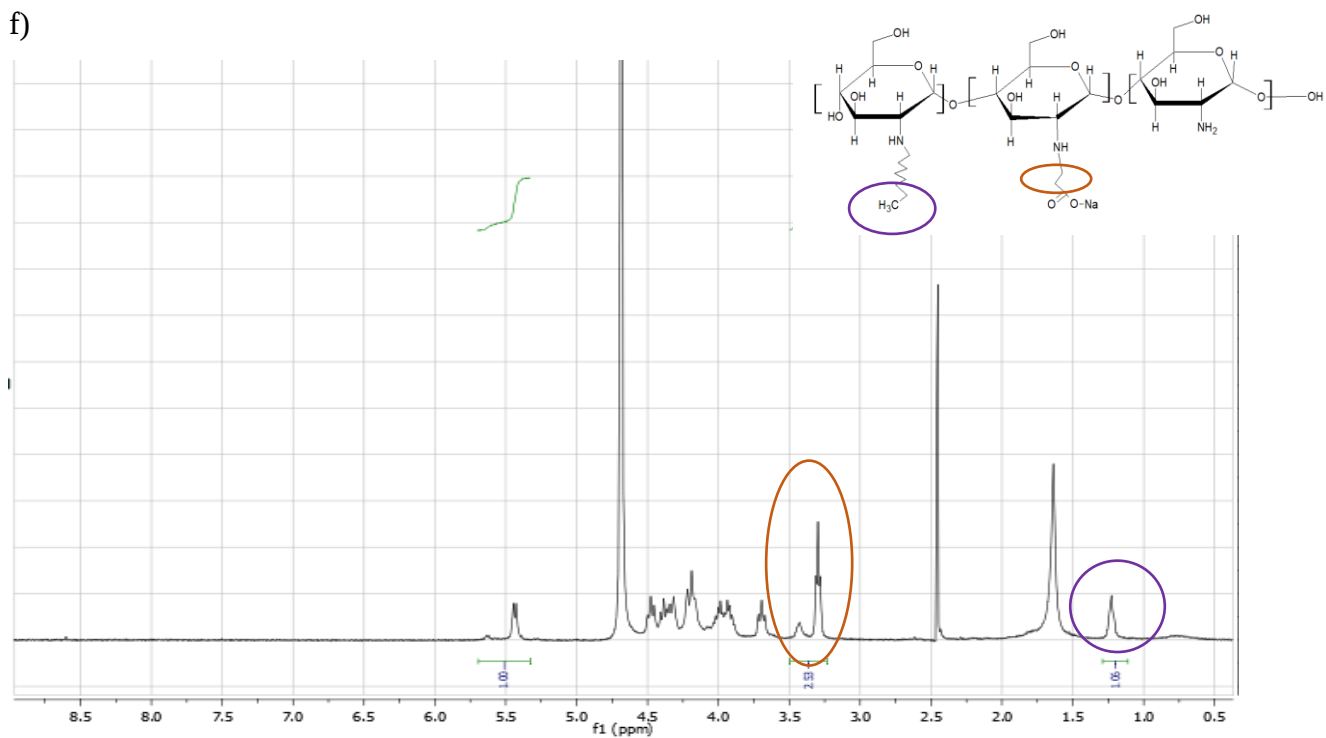
d)



e)



f)



Fonte: Elaborado pelo autor

Os graus de substituição dos grupos carboxietil e dodecil ou octil foram obtidos a partir dos espectros de RMN H^1 (Figura 13). O sinal referente ao grupo carboxietil pode ser visto na região de 3,4 ppm, que corresponde aos hidrogênios dos grupos etila. Portanto, é possível calcular o grau de substituição de carboxietil (GS carboxi) a partir da área do pico dos hidrogênios etílicos e da área dos hidrogênios anoméricos (equação 2). Já o pico referente ao dodecil ou octil ocorre na região de 1,3 ppm, que é devido à ressonância dos hidrogênios dos grupos metila. Da mesma maneira, calcula-se o grau de substituição de dodecil ou octil (GS dod/oct) a partir das áreas dos picos dos hidrogênios metílicos e anoméricos (equação 3).

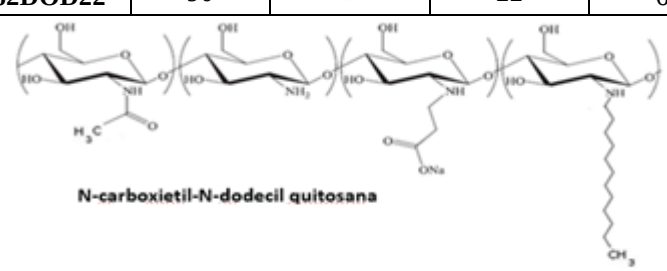
$$GS_{\text{carboxi}} = \left(\frac{A_{\text{etila}}}{4 A_{\text{an}}} \right) * 100 \text{ (Equação 2)}$$

$$GS_{\text{DOD/OCT}} = \left(\frac{A_{\text{metila}}}{3 A_{\text{an}}} \right) * 100 \text{ (Equação 3)}$$

Os valores calculados a partir dos espectros para cada derivado da série 3 estão apresentados na tabela 2. Obteve-se uma quantidade variável de grupos hidrofóbicos e de 40-60% de grupos hidrofílicos, o que nos permite avaliar as propriedades anfifílicas e densidade de cargas dos polímeros e relacionar com sua atividade.

Tabela 2 - Graus de substituição dos derivados anfifílicos da série 3

Polímero	GD ¹ (%)	GSocT ² (%)	GS _{DD} ² (%)	GS _{CARBOX} ³ (%)	Mw ⁴ (kDa)
1-CARBOX36OCT2,3	90	2,3	-	36	35
2-CARBOX47OCT2,3	90	2,3	-	47	35
3-CARBOX47OCT14	90	14	-	47	35
4-CARBOX47OCT7	90	7	-	47	35
5-CARBOX55DOD32	90	-	32	55	35
6-CARBOX62DOD22	90	-	22	62	35



N-carboxietil-N-dodecil quitosana

¹Grau de desacetilação. ²Grau de substituição com grupos octila ou dodecila. ³Grau de substituição com grupos carboxetil. ⁴Massa molecular estimada por cromatografia de permeação em gel.

5.4. Grau de ionização dos derivados anfifílicos em função do pH

Os graus de ionização dos derivados anfifílicos foram obtidos a partir de titulação potenciométrica, na qual foram realizadas monitorando-se o pH para determinar o início e o fim da desprotonação dos grupos ionizáveis, como descrito no item 4.3. O grau de ionização foi obtido a partir da equação 4, sendo que V_i é o volume inicial (primeiro pico da derivada) onde se inicia a desprotonação dos grupos amina, V_f corresponde ao volume final (segundo pico da derivada) na qual todos os grupos amina estão desprotonados, V_x são os volumes intermediários entre os dois picos (OLIVEIRA, F.P.P. et al., 2013).

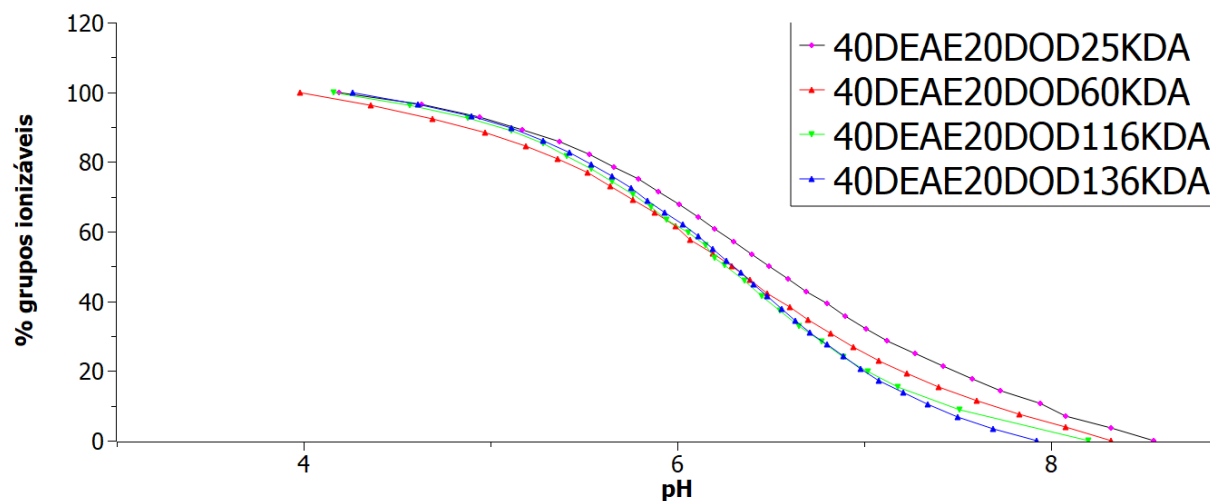
$$\% \text{ grau de ionização} = \left[1 - \left(\frac{V_x - V_i}{V_f - V_i} \right) \right] * 100 \text{ (equação 4)}$$

De acordo com Oliveira et al. (2013), para a quitosana sem grupos substituintes o grau de ionização é 100% em pH 4,0-5,0 e próximo de zero em pH 7,0. Ao inserir grupos substituintes também ionizáveis, as curvas sigmóides são gradualmente deslocadas para faixas de pH maiores com o aumento do grau de substituição, dessa maneira, tem-se grupos carregados em uma faixa mais ampla de pH.

Segundo Sahariah e Másson (2017), a presença de carga catiônica na cadeia da quitosana é essencial para a atividade antimicrobiana. Foi realizado um estudo da atividade da quitosana contra *S.aureus* em pH 7,2 e o MIC foi de 8192 µg/mL, enquanto que em pH 5,5 foi de 64 µg/mL. Tal fato ocorre pois nesse pH os grupos amina estão protonados, e em pH 7,2 o grau de ionização da quitosana já é praticamente zero, logo os grupos amina estão desprotonados e sem carga. Portanto, esse aumento da atividade devido a presença de grupos catiônicos se deve à interação com grupos aniônicos presentes na parede microbiana (SAHARIAH, MÁSSON, 2017).

As Figuras 14, 15 e 16 mostram os graus de ionização, calculados a partir da equação 4, dos derivados da série 1, que possuem 40% de grupos DEAE e diferentes valores de massa molecular; os da série 2, que apresentam conteúdos crescentes do grupo PENTIL na cadeia polimérica e os da série 3 com quantidades variadas do grupo carboxietil. Todos os derivados foram modificados com diferentes conteúdos de grupos dodecil ou octil.

Figura 14 - Graus de ionização dos derivados da série 1

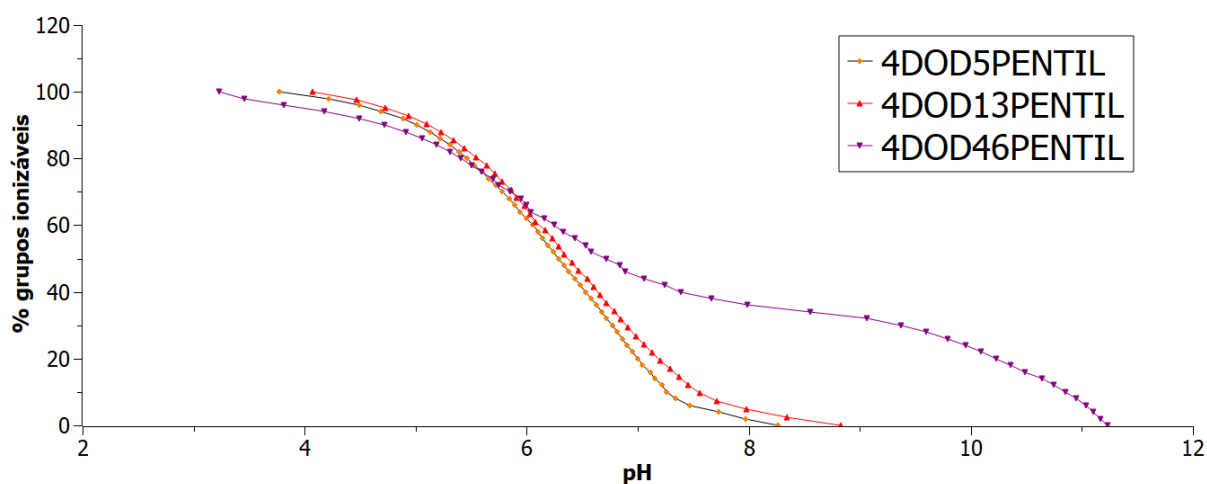


Fonte: elaborado pelo autor

Observa-se que o derivado de quitosana substituído com 40%DEAE e 20%DOD aumentou a faixa de pH para a total desprotonação da quitosana. Em pH acima de 6,5, a quitosana comercial (comprada sem modificações na estrutura) se encontra com grau de ionização próximo a 0%, enquanto a quitosana de 25 kDa substituída com 40%DEAE e 20%DOD tem grau de ionização de aproximadamente 70% nesse pH. Tal fato também é observado por Oliveira et al. (2013), na qual a quitosana comercial, com 15% DEAE e 100%DEAE obtinham grau de ionização de 0; 0,3 e 0,7, respectivamente, no pH de 7,4.

No presente trabalho, os polímeros substituídos com DEAE e DOD mostraram que a curva sigmoide do grau de ionização se estendeu para pH maiores com o decréscimo da massa molecular, uma vez que o derivado com massa molecular de 136 kDa apresentou 0% de ionização em pH 7,8, enquanto o derivado com 25 kDa apresentou com 20% de grupos ionizáveis no mesmo valor de pH, como pode ser observado na Figura 14.

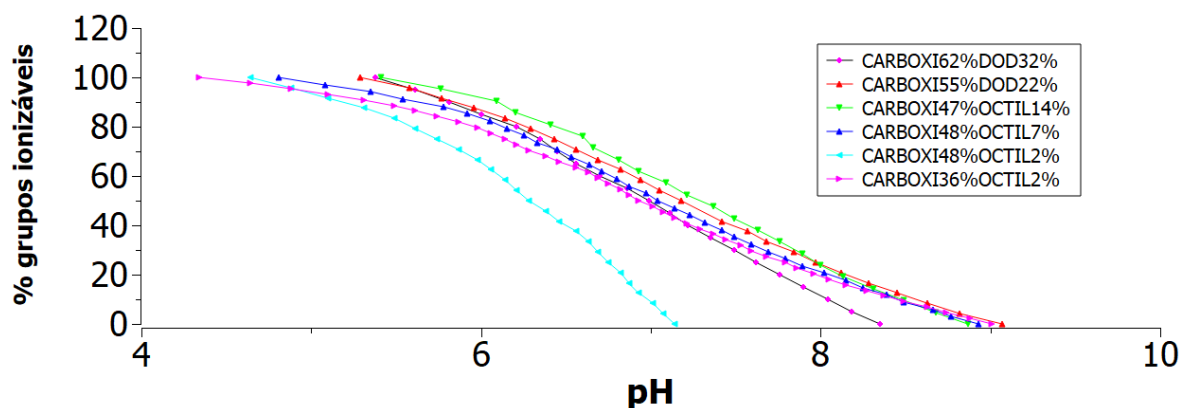
Figura 15 - Graus de ionização dos derivados da série 2



Fonte: elaborado pelo autor

Para os derivados da série 2 podemos observar nitidamente que o aumento do grau de substituição por grupos PENTIL aumentou significativamente a porcentagem de grupos ionizáveis no pH de 7,4. Nesse pH, os derivados substituídos com 5% e 13% de grupos PENTIL obteve-se 8% e 14% de grupos ionizáveis, respectivamente, enquanto o derivado substituído com 46% de grupos PENTIL observou-se aproximadamente 50% de grupos ionizáveis. Tal fato está de acordo com o observado em Oliveira et al. (2013), em que com o aumento do grau de substituição, o grau de ionização aumenta proporcionalmente devido a presença de mais grupos ionizáveis na cadeia polimérica, observado na Figura 15.

Figura 16 - Graus de ionização dos derivados da série 3



Fonte: elaborado pelo autor.

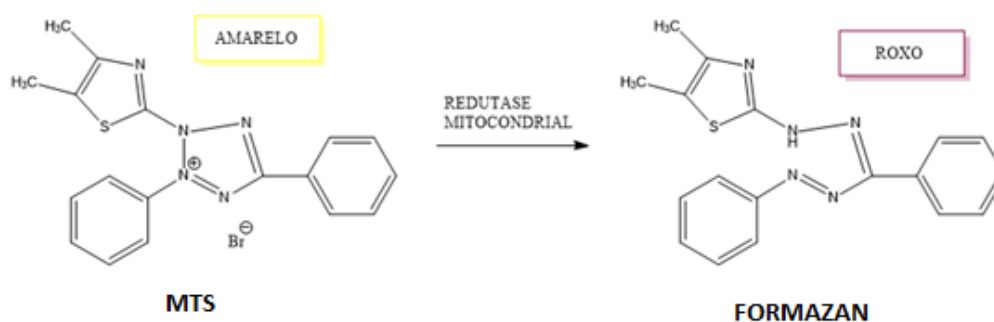
Para os derivados da série 3, a porcentagem de substituição de grupos carboxietil não se observa uma grande variação, aproximadamente 40-60%, provavelmente esse grupo não interfere no aumento da quantidade de grupos ionizáveis em pH 7,4, uma vez que o pKa do grupo carboxila é de aproximadamente 4. Logo, em 7,4 os grupos carboxilas já estarão totalmente desprotonados.

Portanto, a curva sigmoide se estende para valores de pH mais altos devido a presença dos grupos amina decorrentes da alta desacetilação da quitosana e que são desprotonados em pH maiores. Observa-se também que com o aumento da porção hidrofóbica (OCTIL ou DOD), na cadeia de quitosana, a quantidade de grupos ionizáveis aumentou no pH de 7,4, até a substituição de 22%. Entretanto, no derivado substituído com 32% de DOD o grau de ionização diminuiu, possivelmente devido à agregação do polímero por interações hidrofóbicas entre si.

5.5. Ensaios de citotoxicidade dos polímeros

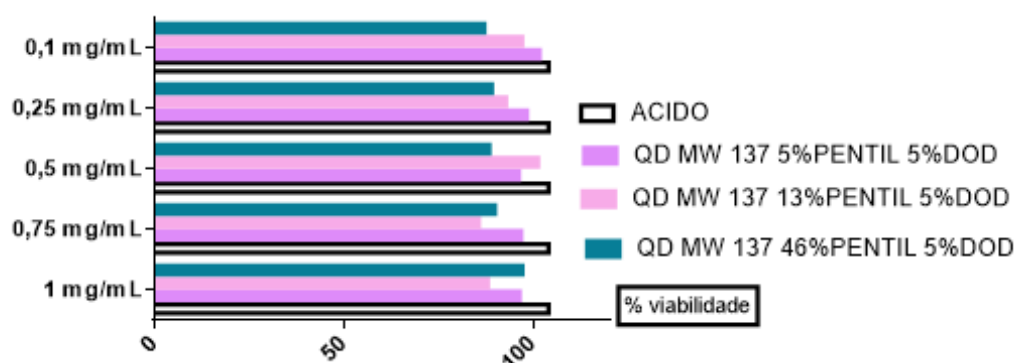
Segundo HUANG, KHOR e LIM (2004) e MOSMANN (1983), o estudo da citotoxicidade utilizando MTS é um método colorimétrico quantitativo baseado na quebra do sal de tetrazólio (MTS) por células biologicamente ativas. As células vivas são capazes de reduzir o MTS para formar um complexo colorido. Acredita-se que essa redução seja realizada por enzimas desidrogenases NADH dependentes. O composto formado pode ser determinado quantitativamente na absorbância de 490-500 nm (MTS ASSAY KIT (CELL PROLIFERATION) (COLORIMETRIC) (AB197010).

Figura 17- Reação ocorrida no método de MTS em que o sal de tetrazólio é quebrado para a formação de formazan

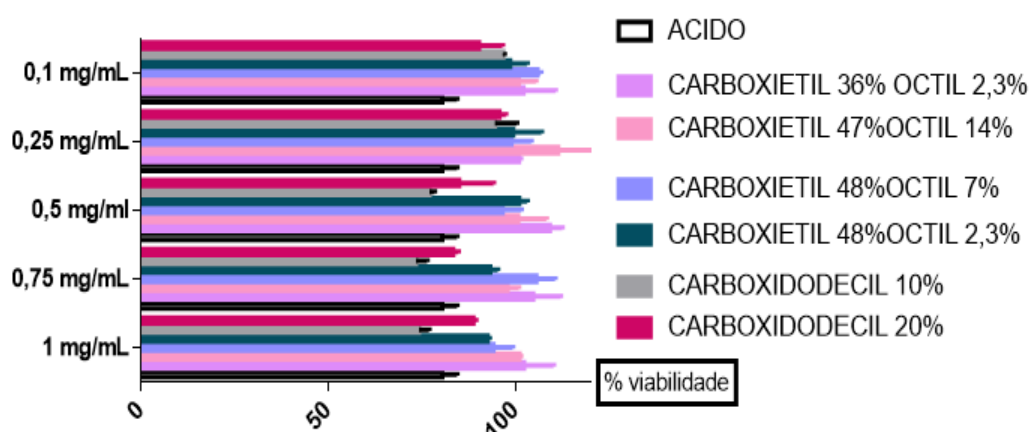


Fonte: elaborado pelo autor

b)



c)



Fonte: elaborado pelo autor

Assis et al. (2012), foi analisado a citotoxicidade de oligoquitosanas em cultura de fibroblastos (3T3), pelo método colorimétrico com MTT, e de acordo com os autores não foi observado efeito significativo na proliferação das células, com 80% de viabilidade.

No trabalho de Felice et al. (2015), o qual foi testada a citotoxicidade de derivados quaternários de quitosana em cultura de células de fibroblastos, nas concentrações de 5-100 $\mu\text{g/mL}$, verificou-se que na concentração igual ou inferior a 10 $\mu\text{g/mL}$ os derivados com massa molecular de 590 kDa não apresentaram toxicidade, e para os derivados com massa molecular de 32 kDa sua toxicidade foi baixa mesmo em 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. No presente trabalho, os polímeros quaternários (série 2) com massa molecular de 137 kDa não apresentaram toxicidade mesmo na concentração 1 mg mL^{-1} , superior à concentração do trabalho mencionado.

Em Anitha et al. (2009), foram realizados os testes de citotoxicidade com nanopartículas, de 40-80 nm, de carboximetil quitosana e não foi observada toxicidade nas concentrações de 0,4, 0,8 e 1 mg mL^{-1} em células de câncer de mama (MCF-7).

Portanto, de maneira geral, os derivados de quitosana não apresentam efeitos tóxicos, o que os torna viáveis para testes adicionais e aplicação.

5.6. Ensaios microbiológicos

5.6.1. CIM

A determinação das CIM pelo método de microdiluição, descrito no item 4.5.2., foi escolhido por ser um método preciso, quantitativo e mais sensível que o método de disco difusão, que é um método qualitativo, além de ser amplamente utilizado para determinação dos índices de inibição de fármacos convencionais e ser mais prática e econômica, já que a quantidade de material utilizado é bem menor e pode-se testar a atividade de vários antifúngicos em uma só placa (LEITE, 2016).

As porcentagens de inibição foram calculadas em relação ao controle de crescimento, de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left(\frac{100 * A}{AC} \right) \text{ (equação 6)}$$

Sendo que A representa a absorbância do poço selecionado e AC representa a média das absorbâncias dos poços correspondentes ao controle de crescimento.

Os valores obtidos de absorbância do solvente, utilizado para solubilização, foram semelhantes aos valores do controle de crescimento. Portanto, a inibição obtida refere-se à ação dos derivados anfífilos.

Conforme descrito no item 4.5.1., as atividades antifúngicas dos polímeros das séries 1, 2 e 3 foram testadas contra cepas ATCC e isolados clínicos de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*.

De maneira geral, todos os polímeros das séries 1 e 2 apresentaram excelentes índices de inibição contra as cepas clínicas e ATCC de *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, principalmente para as cepas *C. krusei* (Figura 19).

Os polímeros da série 3 (aniônicos) não apresentaram atividade antifúngica significativa à nenhuma cepa, um fato semelhante foi reportado no trabalho de Seyfarth et al. (2007), na qual testou-se a atividade antifúngica de derivados de carboximetil-quitosana contra cepas de *C.*

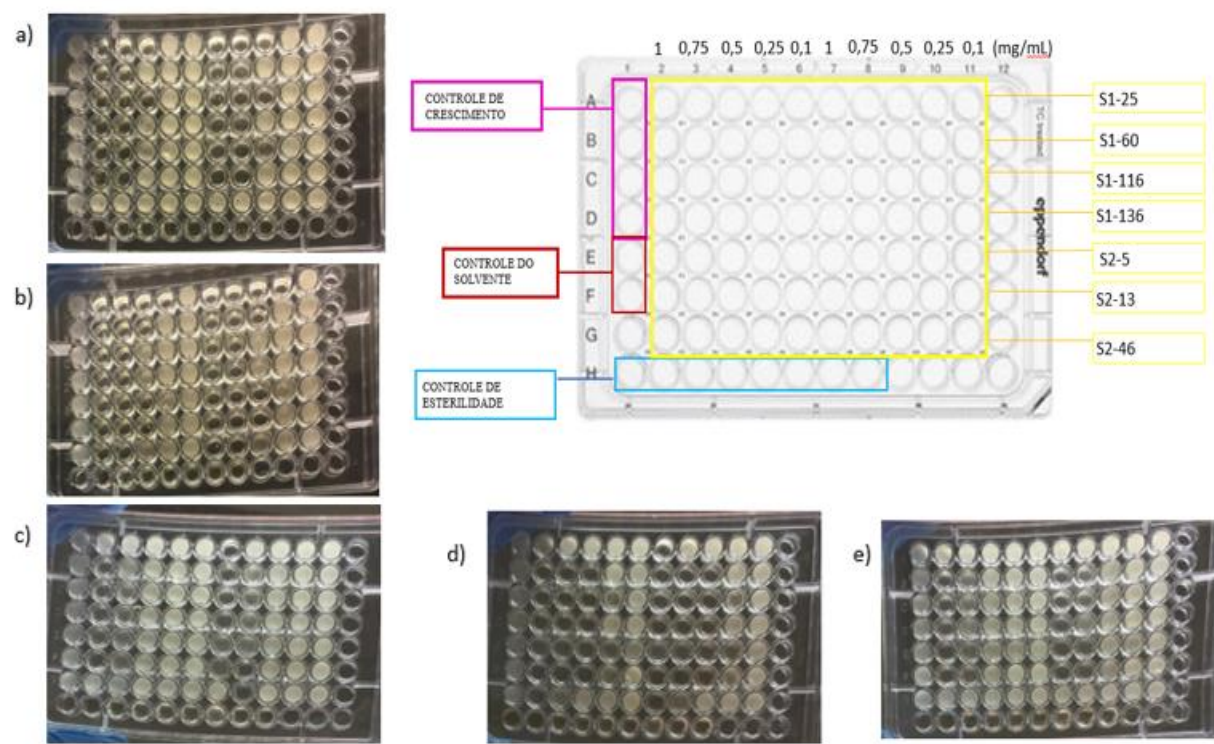
albicans, *C. glabrata* e *C. krusei* e esses derivados não apresentaram inibição significativa para nenhuma cepa, o autor justifica o ocorrido a partir da importância da densidade de cargas catiônicas na cadeia polimérica, na qual acredita-se ser um dos principais mecanismos de interação com cargas aniônicas da parede celular dos fungos (esfingolipídeos, por exemplo), ocasionando a morte. Portanto, os derivados que não apresentam caráter policatiônico devido à carboximetilação dos grupos amino livres, acabam perdendo a eficácia.

Os polímeros apresentaram baixos ou nenhum índices de inibição contra todas as cepas testadas de *C. albicans*, observado na Figura 20. Embora em alguns trabalhos (TAYEL et al., 2010; KULIKOV et al. 2014; GONDIM et al., 2018) os derivados e nanopartículas de quitosana apresentaram ação antifúngica contra *C. albicans*, fungo que apresenta maiores fatores de virulência, como a formação de hifas e biofilmes, dessa forma, ela pode estar presente na forma de levedura ou hifas; além disso, dependerá da cepa a ser testada, principalmente as clínicas, pois podem ter sido expostas a mais fatores externos, ocorrendo a seleção de cepas mais resistentes. Ganan et al. (2019), onde foram testadas oligoquitosanas contra diversas cepas de leveduras, não foi observada inibição para *C. albicans* na concentração de 5 mg mL⁻¹.

Referindo-se às outras espécies, obteve-se inibição igual ou maior a 90% na CIM com todos os polímeros das séries 1 e 2, exceto para as cepas CP2, CP3 e CP4 e as cepas CG2 e CG3 que obtiveram inibição menor com os polímeros da série 1. Entretanto, os valores de CIM considerados inibiram pelo menos 50% de cada cepa, valor referência de acordo com a CLSI M27-S4E, 2012. Os menores valores de concentrações para inibição foram os do polímero da série 2 – 5%PENTIL contra a *C. parapsilosis* ATCC, *C. krusei* ATCC, CK1, CK3 (0,25 mg mL⁻¹) e o da série 1 – 25 kDa contra a CK1, e do polímero da série 1 – 60 kDa contra a *C. krusei* ATCC (0,1 mg mL⁻¹). Todos os polímeros da série 1, exceto o de 25 kDa e os da série 2, exceto o com 46% PENTIL apresentaram inibição igual ou maior que 90% para todas as cepas de *C. krusei*, o que torna esses polímeros promissores pois a *C. krusei* apresenta resistência intrínseca contra azóis, dificultando o tratamento. Os resultados podem ser observados na Tabela 3 (SEYFARTH et al., 2007; DE TOLEDO et al., 2016).

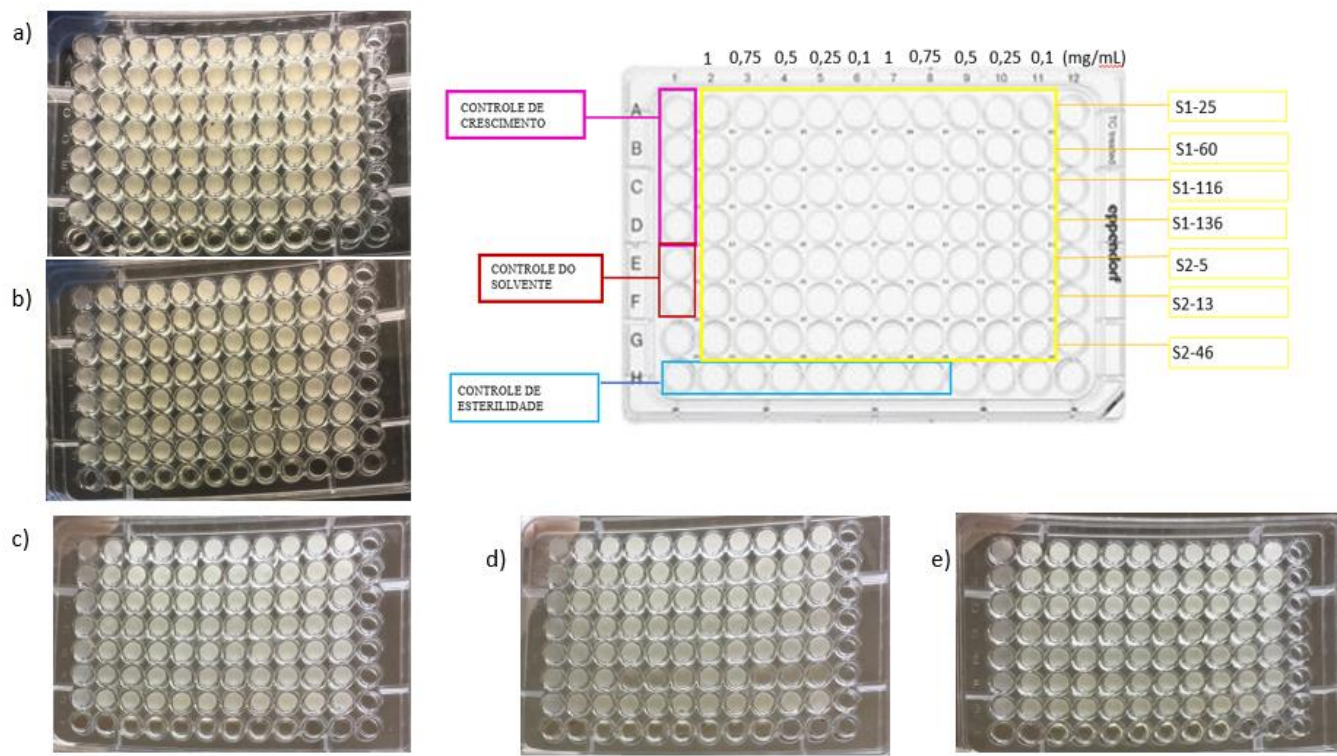
O polímero da série 2- 5% PENTIL foi o que demonstrou elevada atividade para quase todas as cepas estudadas, apenas não inibiu significativamente a CG2 e a CG3, as demais apresentaram inibição igual ou maior 90% ao polímero.

Figura 19 – Placas de microdiluição dos polímeros das séries I e II contra a) *C. krusei* ATCC, b) CK1 c) CK2 d) CK3 e) CK4



Fonte: elaborado pelo autor

Figura 20 – Placas de microdiluição dos polímeros das séries I e II contra a) *C. albicans* ATCC, b) CA1 c) CA2 d) CA3 e) CA4



Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 3 - Valores de CIM para os polímeros das séries 1 e 2

Cepa	CIM (mg mL ⁻¹)						
	Série 1 25kDa	Série 1 60kDa	Série 1 116kDa	Série 1 136kDa	Série 2 5%pentil	Série 2 13%pentil	Série 2 46%pentil
<i>C. glabrata</i> ATCC	0,5	0,75	0,5	0,75	0,75	0,75	-
CG1	0,75	0,75	0,5	0,75	0,75	0,75	-
CG2	-	-	-	1	-	-	-
CG3	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. krusei</i> ATCC	0,5	0,1	0,25	0,5	0,25	0,5	0,75
CK1	0,25	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5	-
CK2	-	1	1	1	0,75	0,75	-
CK3	-	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5	1
CK4	-	1	0,75	1	0,75	1	-
<i>C. parapsilosis</i> ATCC	1	1	1	0,5	0,25	0,25	0,5
CP1	1	1	0,75	1	0,75	1	1
CP2	-	-	-	-	0,75	1	-
CP3	-	-	-	-	1	1	-
CP4	-	-	-	1	0,75	0,75	-

Garcia et al. (2018), foi analisado o efeito da massa molecular da quitosana na atividade antifúngica em diversas cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, e determinou-se valores de CIM na faixa de 4-512 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a quitosana de baixa massa molecular e entre 16-512 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com a de alta massa molecular, sendo que para a *C. parapsilosis* a de alta massa molecular apresentou maior atividade, fato também observado no presente trabalho. De acordo com os autores, os valores irão depender muito da cepa, pois dependerá da composição e densidade de cargas negativas da parede celular de cada uma delas, sendo que um dos principais mecanismos de ação da quitosana contra *Candida* spp. é a partir da interação eletrostática das cargas positivas da cadeia polimérica com compostos negativos da parede celular (GARCIA, L.G.S. et al., 2018).

Ganan et al. (2019), testou-se oligoquitosanas contra 52 cepas de *Candida* spp avaliando-se os valores de CIM, e foi observado que os valores encontrados estão entre 9,8 e 5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, que se encontra dentro das concentrações determinadas no presente trabalho.

Alburquenque et al. (2010) também analisaram a atividade antifúngica de quitosanas com baixa massa molecular contra diversas cepas de *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. lusitaniae*, e determinou-se valores de CIM entre 4,8 e 2500 mg L^{-1} , na qual 68,6% possui valor de 4,8 mg L^{-1} . Porém, esses valores foram obtidos no pH 4,0, enquanto que no trabalho aqui apresentado o pH foi de 6,4, próximo ao pH fisiológico, uma vez que os objetivos são terapêuticos. Foi constatado, no trabalho dos autores, que a atividade aumenta com o decréscimo do pH, provavelmente, por conta da maior quantidade de grupos amina desprotonados. Entretanto, busca-se aproximar ao pH fisiológico pois a finalidade é utilizar os derivados para uso terapêutico.

De acordo com Miranda-Cadena et al. (2018), que testaram cepas de *C. glabrata* e *C. parapsilosis* isoladas de pacientes com infecção bucal, seis das quatorze cepas isoladas de *C. glabrata* apresentaram resistência contra fluconazol. Além disso, algumas cepas de *C. glabrata* e *C. parapsilosis* resistentes a miconazol também têm sido reportadas, o que ressalta a importância dos resultados encontrados neste trabalho para estas cepas.

5.6.2. Teste da atividade antifúngica (fungicida ou fungistática)

A realização desse teste teve o intuito de avaliar se há crescimento de colônias em placa de Ágar Sabouraud com os valores de CIM encontrados dos polímeros das séries 1 e 2 contra todas as cepas avaliadas (Tabela 3). É possível afirmar se o polímero é fungicida ou fungistático pois ao transferir o conteúdo da placa de microdiluição para a placa de Ágar Sabouraud com o palito não há mais a ação fungistática do polímero nesta, já que não está mais presente em solução, por isso se a ação nessa concentração for apenas fungistática a colônia da levedura tornará a crescer, enquanto se a ação for fungicida não haverá crescimento de colônias. Dessa forma, é possível determinar a concentração fungicida mínima (CFM), que pode ser igual ou maior a CIM.

Decorridas as 24 horas de incubação foi possível observar nas placas de Ágar Sabouraud se houve crescimento de colônias no local onde perfurou-se, segundo o mesmo layout 1 e 2 da placa de microdiluição (Figura 21). Foi observado, para todas as cepas, resultados muito similares aos encontrados na CIM, evidenciando que os derivados possuem ação fungicida na CIM ou muito próxima. O teste foi realizado também para os polímeros da série 3, mas de acordo com o descrito no item anterior, eles não apresentaram ação antifúngica significativa para nenhuma cepa, por isso houve crescimento de colônias em todos os casos.

Pode-se observar, assim como ocorreu no item 5.6.1., que dos polímeros da série 1 todos apresentaram ação fungicida igual ou próxima à CIM, exceto o de 25 kDa. Dos polímeros da série 2, aquele com maior porcentagem de PENTIL (46%) foi o que apresentou menor eficiência, apresentando valores maiores de CFM ou sem ação, e o polímero com 5% PENTIL foi o que apresentou maior eficiência.

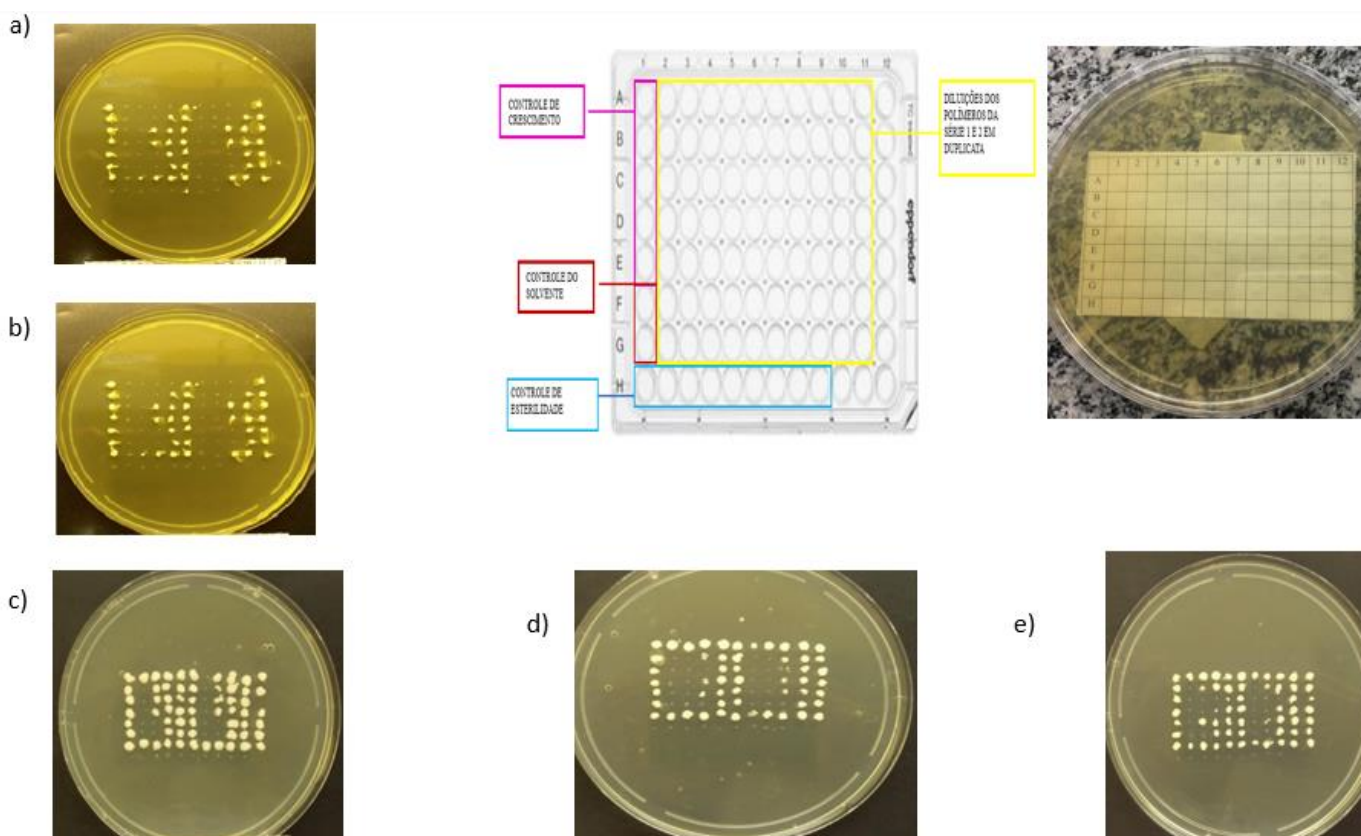
As cepas de *C. parapsilosis* foram as que apresentaram maior resistência, na qual apenas o polímero da série 2 – 5% PENTIL apresentou ação fungicida para as cepas de *C. parapsilosis* ATCC, CP1, CP2, CP3 e CP4. Para a CP1 todos os polímeros da série 1, exceto de 25 kDa e os da série 2, exceto o com 46% PENTIL, apresentaram ação fungicida, porém em concentrações mais elevadas. Os valores de CFM estão listados na Tabela 4.

Tabela 4 - Valores de CFM para os polímeros das séries 1 e 2

Cepa	CFM (mg mL ⁻¹)							
	Série 25kDa	Série 1 60kDa	Série 1 116kDa	Série 1 136kDa	Série 1 5%pentil	Série 2	Série 2 13%pentil	Série 2 46%pentil
<i>C. glabrata</i> ATCC	0,75	0,75	0,5	0,75	0,75	0,75		-
CG1	0,75	0,75	0,5	0,75	0,75	0,75		-
CG2	-	-	-	1	-	-		-
CG3	-	-	-	0,75	-	-		-
<i>C. krusei</i> ATCC	0,5	0,1	0,25	0,5	0,25	0,5		0,75
CK1	0,25	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5		-
CK2	-	1	1	1	0,75	0,75		-
CK3	-	0,75	0,5	0,75	0,75	0,5		-
CK4	-	1	0,5	0,75	1	0,75		-
<i>C. parapsilosis</i> ATCC	-	1	1	0,5	0,25	0,25		0,75
CP1	-	1	0,75	1	0,75	1		-
CP2	-	-	-	-	0,75	1		-
CP3	-	-	-	-	1	-		
CP4	-	-	-	-	0,5	-		-

De acordo com Ganan et al. (2019), a maioria dos antifúngicos amplamente utilizados para o tratamento da *Candida* spp. são azóis, e essa classe de antifúngicos são fungistáticos, ou seja, inibe o novo crescimento das células inibindo a produção de proteínas, replicação do DNA, e outros aspectos do metabolismo celular mas não mata definitivamente a célula, como no caso dos fungicidas. Por isso, são preferidos os fungicidas, principalmente para o tratamento tópico; porém, a quantidade de fármacos fungicidas é escassa, ressaltando a importância de se descobrir novos agentes fungicidas, como os derivados das séries 1 e 2 apresentados neste trabalho.

Figura 21 - CFM dos polímeros das séries 1 e 2 contra cepas de a) *C. krusei* ATCC b) CK1 c) CK2 d) CK3 e) CK4



Fonte: Elaborado pelo autor

5.6.3. Ensaio de time-kill

A partir dos testes realizados anteriormente (5.6.1 e 5.6.2), pode-se confirmar os efeitos fungicidas dos derivados das séries 1 e 2 contra as cepas de *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Por isso, foram realizados, também, curvas de crescimento das cepas com e sem (controle positivo) os derivados, a partir da primeira hora de contato até 8 horas, a fim de analisar o tempo necessário para que ocorram efeitos na curva de crescimento do fungo. Foram selecionados os derivados que apresentaram melhores resultados para todas as cepas, e o teste foi realizado nos valores de CFM. As curvas de crescimento e imagens das placas estão mostradas na Figura 22.

Foi observado, para a cepa de *C. glabrata* ATCC, a inibição do crescimento em relação ao controle positivo, para todos os derivados selecionados, entretanto; não foi observada a inibição total após 8 horas de tratamento. Possivelmente a ação fungicida dos derivados contra essa cepa ocorra após esse tempo, pois determinou-se tal ação nessa concentração (Tabela 4). Contudo, para a cepa de CG1, em 2 horas a maioria dos polímeros já havia inibido totalmente o fungo. O derivado que demorou mais para agir foi o da série 1- 60 kDa, que inibiu totalmente em 5 horas, e os derivados da série 2 inibiram totalmente em 1 hora, evidenciando uma ação mais rápida dessa série à essa cepa (Figura 22 b). Conclui-se, portanto, que a cepa de CG1 foi mais sensível que a ATCC aos polímeros. Embora o usual seja os isolados clínicos serem mais resistentes, irá depender dos fatores externos que esta foi exposta.

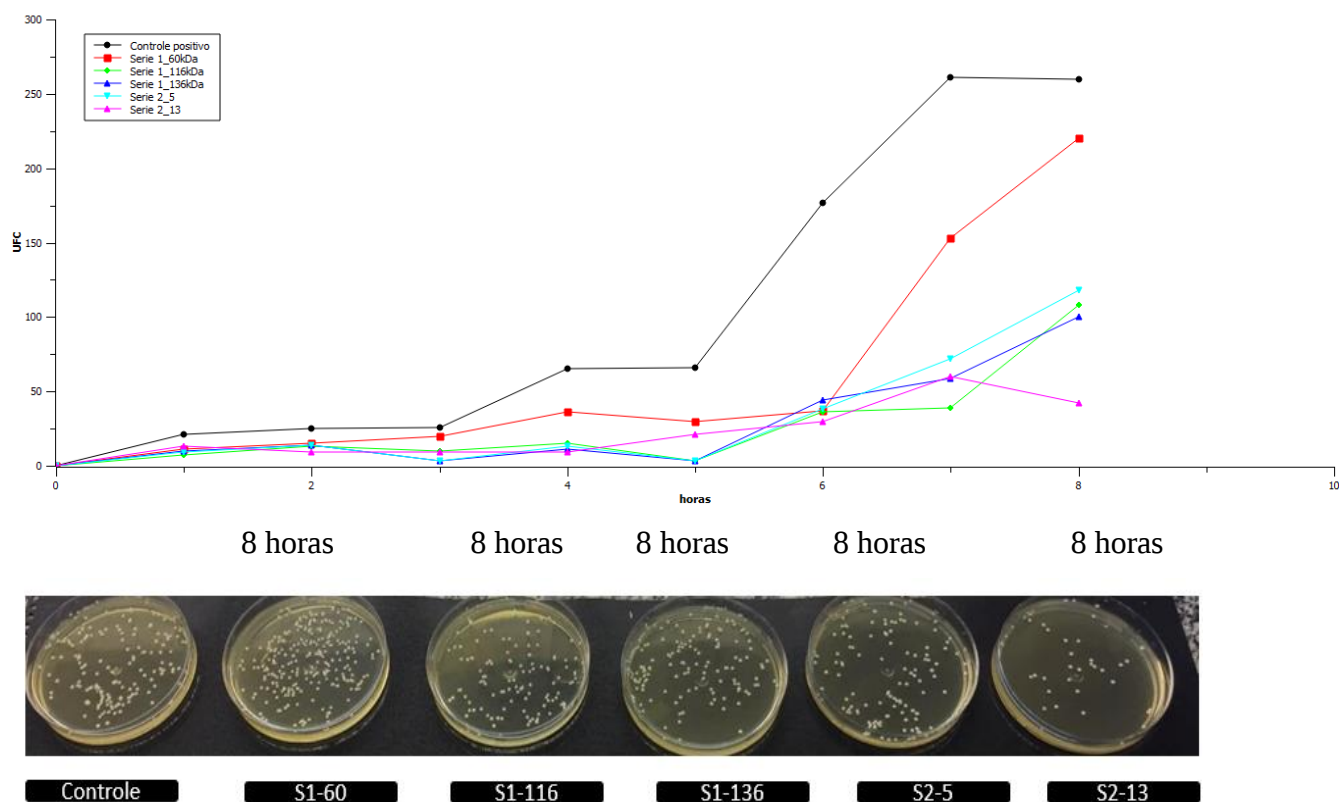
A *C. krusei* ATCC foi inibida totalmente com todos os derivados em 3 horas, no máximo, sendo aqueles que apresentaram ação mais demorada foram os derivados da série 1- 60 kDa e o da série 2 – 5% pentil; os polímeros da série 1-116 kDa e o da série 2 – 13% pentil inibiram totalmente em 1 hora (Figura 22 c). Todos os polímeros apresentaram inibição total para a cepa de CK1 em 1 hora, exceto o da série 1 – 60 kDa, que teve ação fungicida em 2 horas (Figura 22 d). Todos os polímeros inibiram totalmente a CK2 em 1 hora (Figura 22 e), a CK3 foi inibida totalmente por todos os polímeros em 5 horas, sendo o da série 1- 136 kDa o que apresentou ação mais demorada. Os restantes inibiram em 3 horas (Figura 22 f), e para a CK4, todos os polímeros inibiram em, no máximo, 3 horas, exceto o da série 1 – 136 kDa, que inibiu em 4 horas (Figura 22 g).

A inibição total para a *C. parapsilosis* ATCC e a CP1 foi obtida com todos os derivados após 1 hora de contato (Figura 22 h,i).

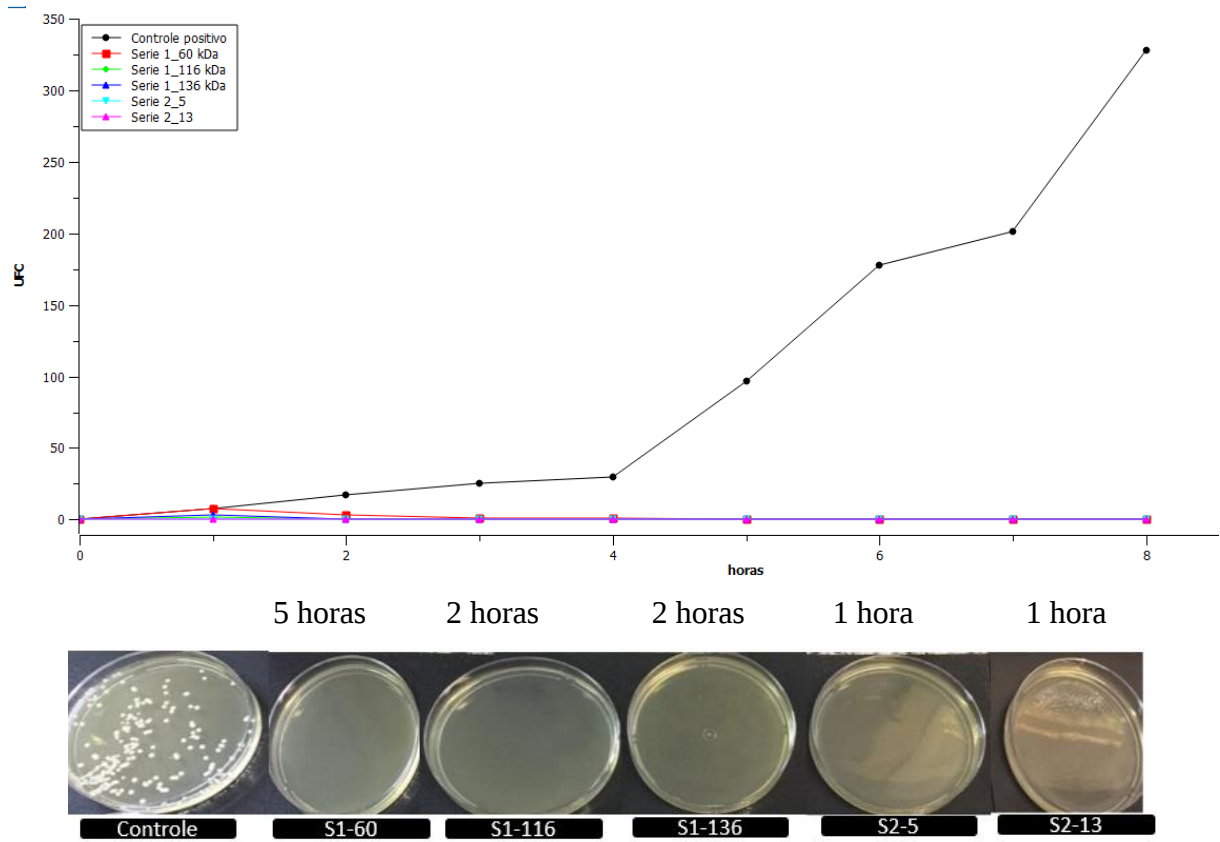
Conclui-se, portanto, que os derivados foram eficientes em inibir totalmente o crescimento das cepas em um tempo curto, pois em 2 horas ou menos ocorreu a inibição para a maioria das cepas com todos os polímeros, como pode ser observado na Figura 22. O derivado que apresentou ação mais demorada foi o derivado da série 1 – 136 kDa para a CK3, porém, até mesmo esse derivado apresentou um tempo satisfatório de inibição total, já que o intuito é a utilização para fins terapêuticos e não desinfectantes.

Figura 22 - Curvas de crescimento das cepas em contato com os derivados

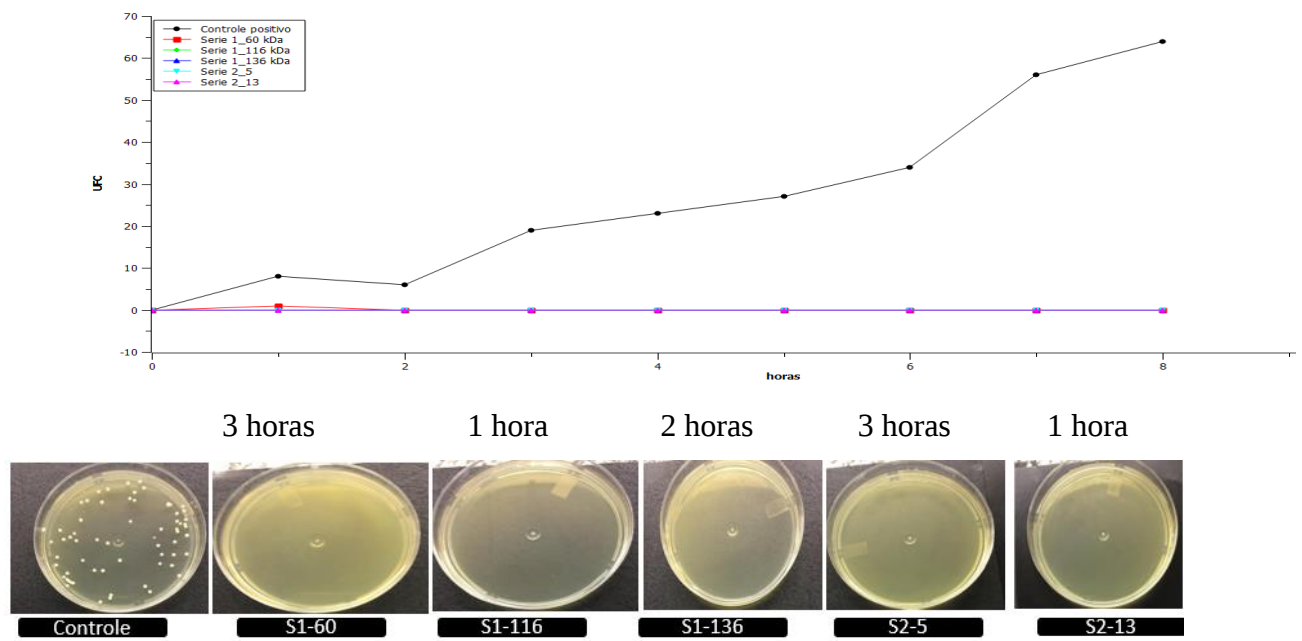
A) *C. glabrata* ATCC



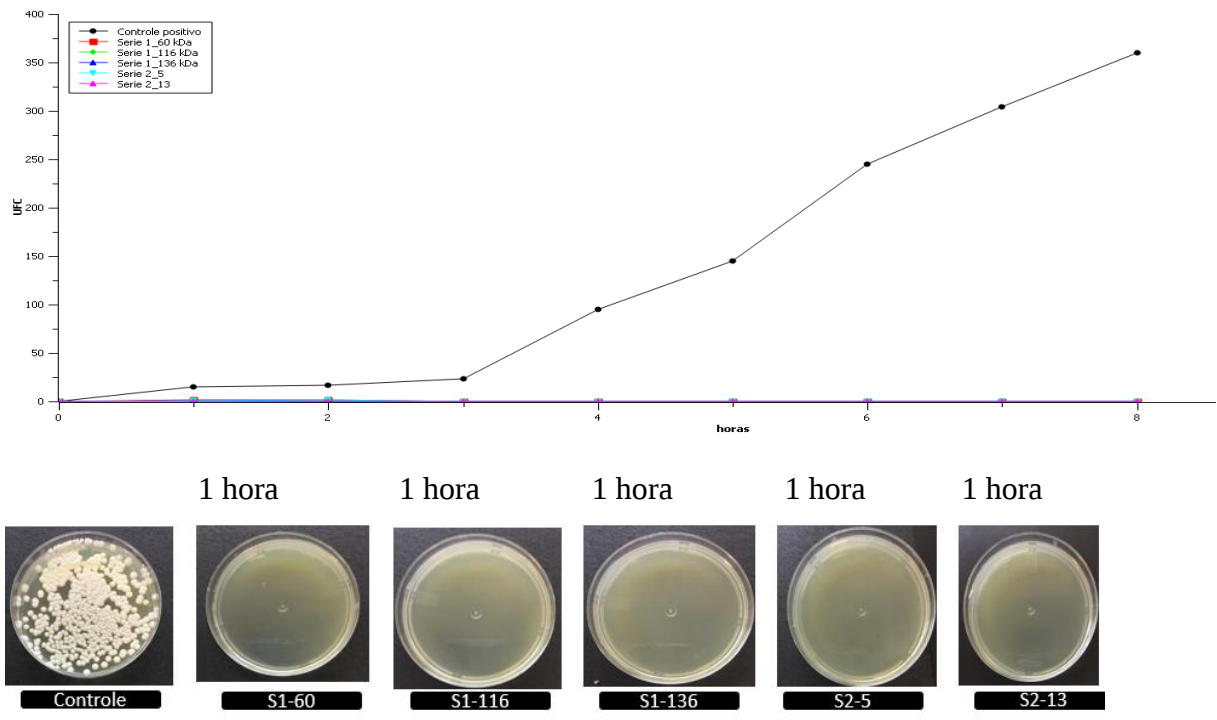
B) CG1



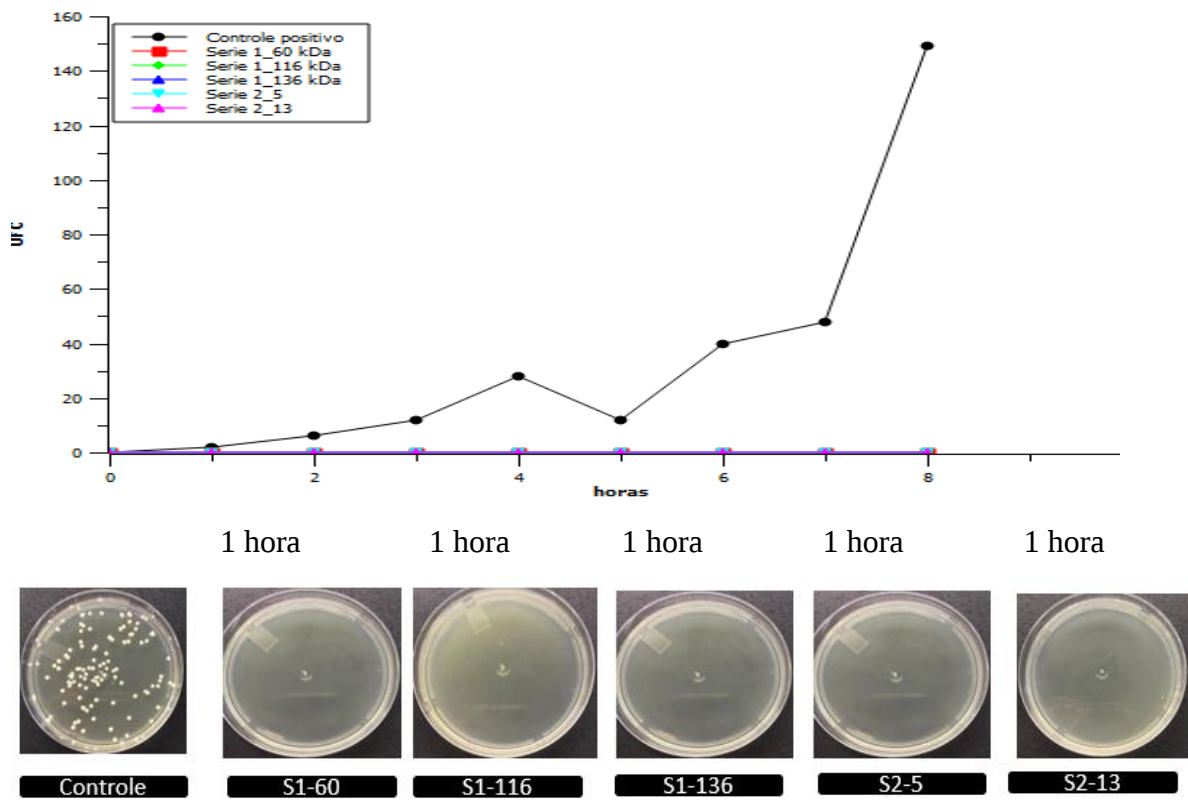
C) *C. Krusei* ATCC



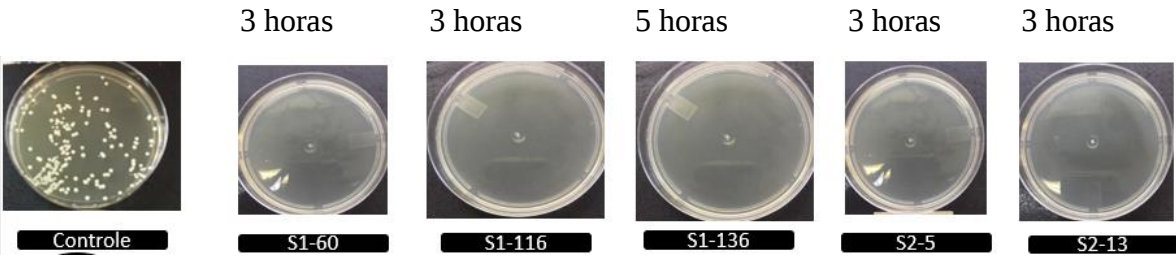
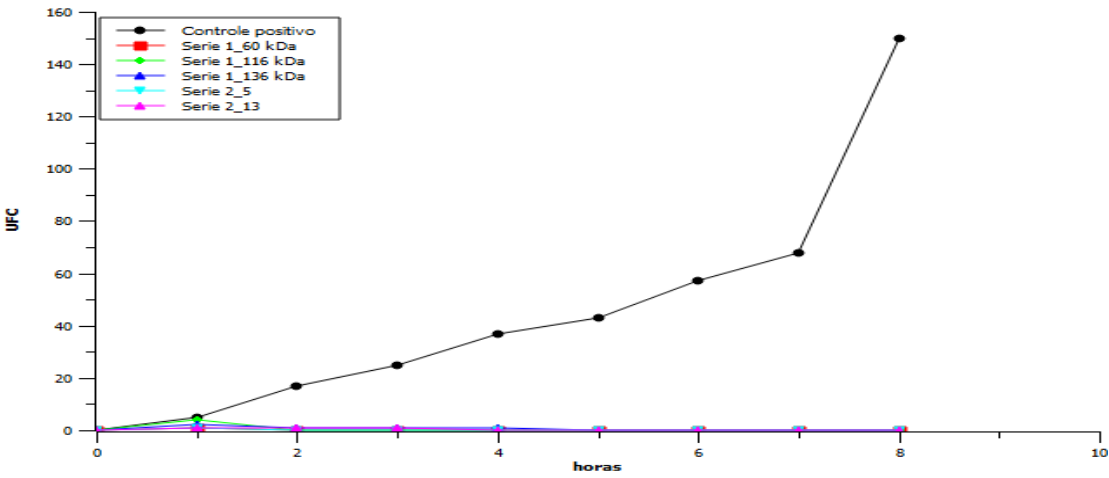
D) CK1



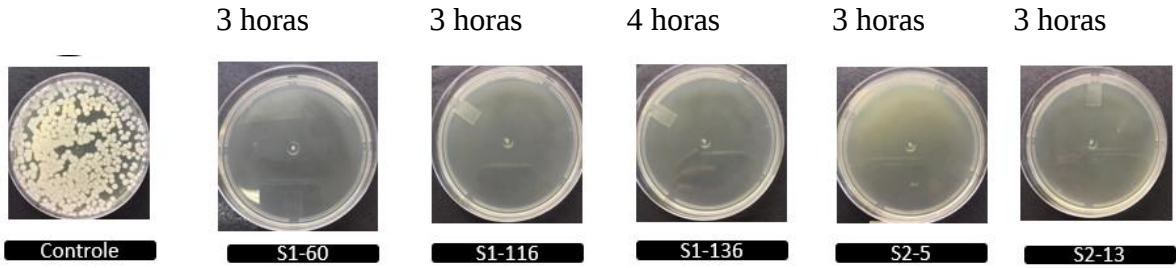
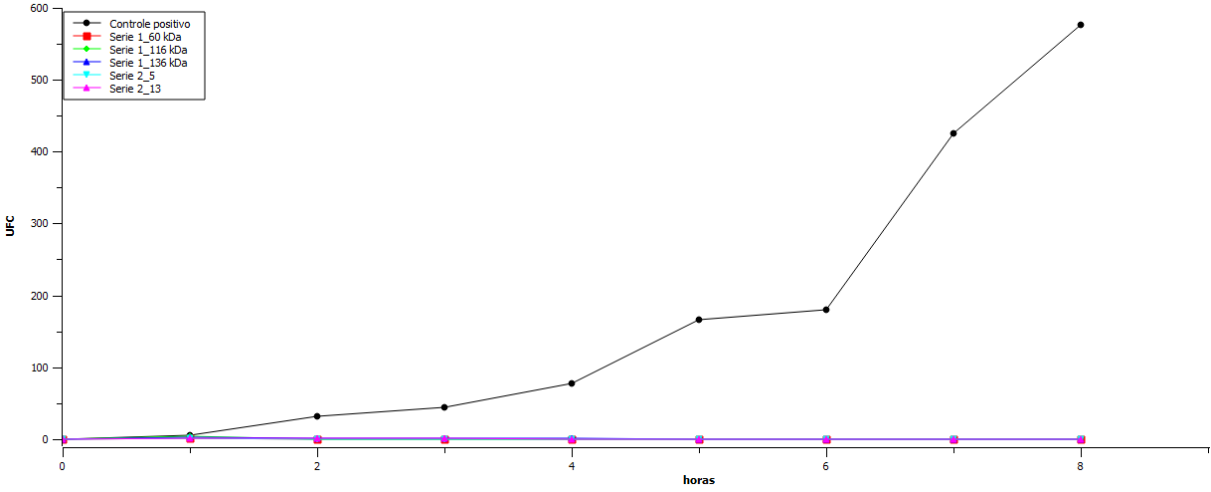
E) CK2



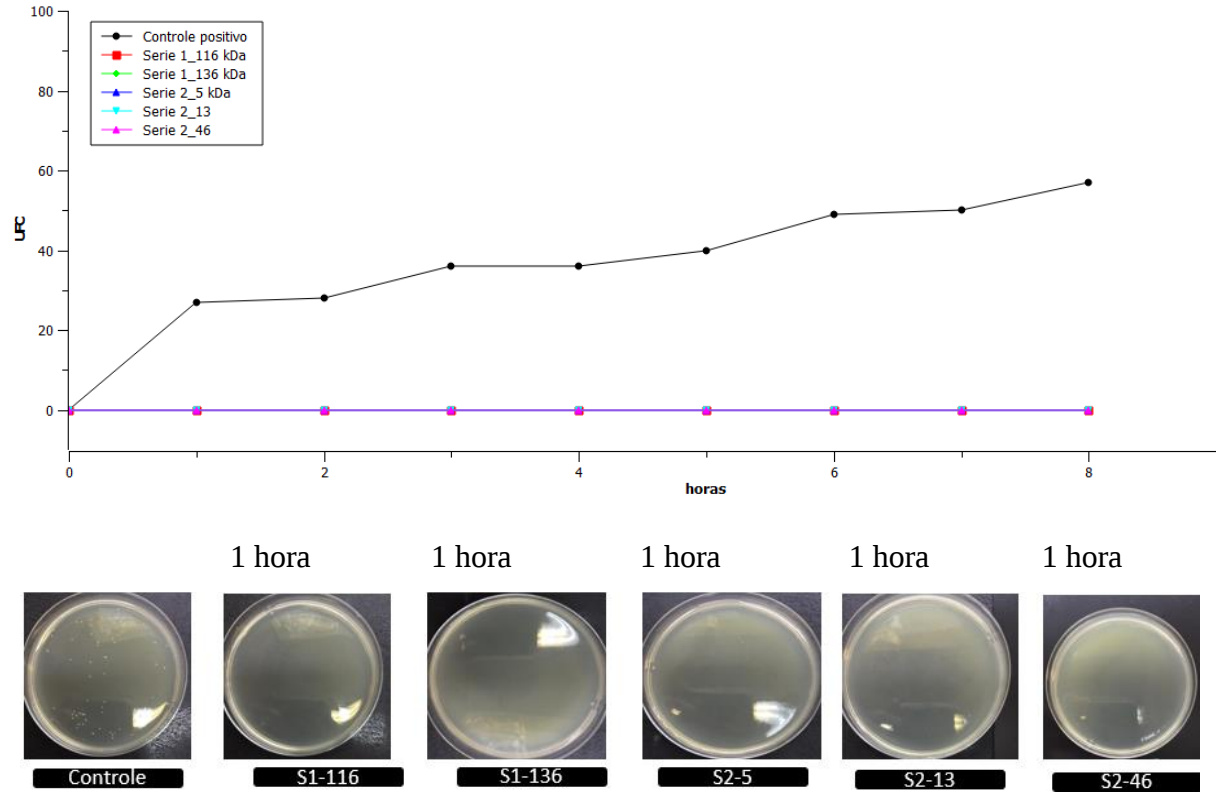
F) CK3



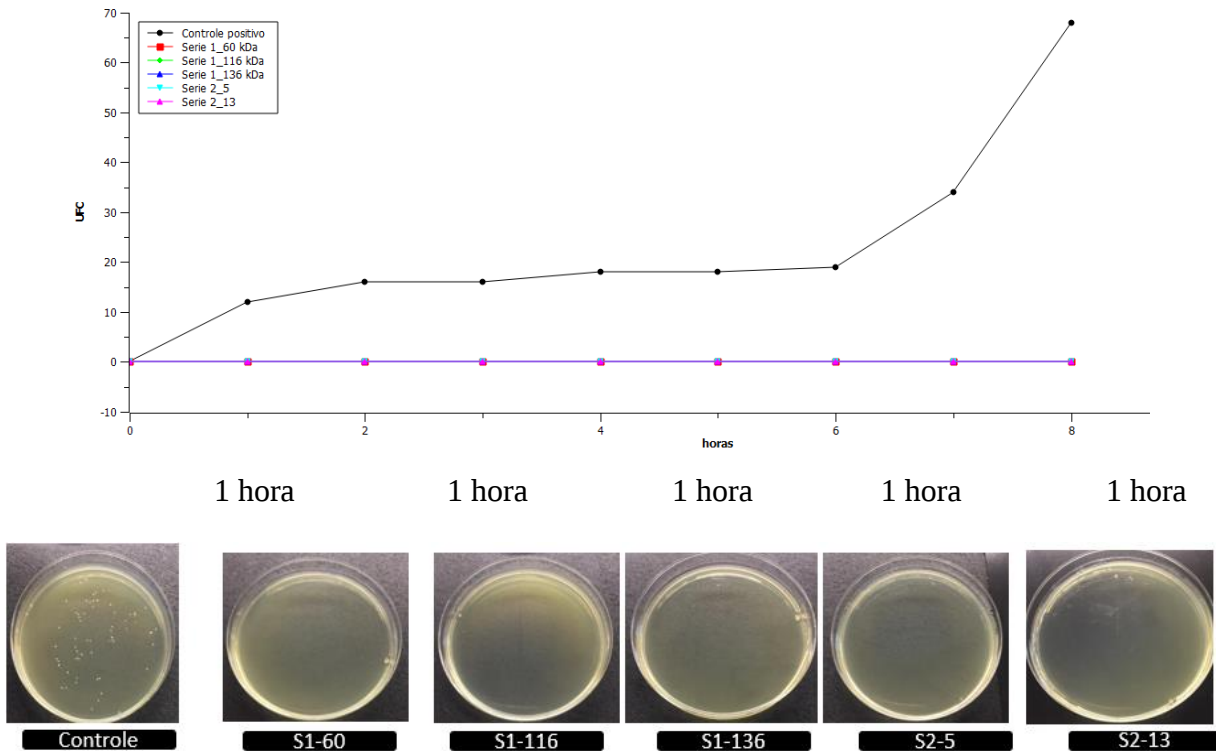
G) CK4



H) *C. parapsilosis* ATCC



I) CP1



Fonte: Elaborado pelo autor

No trabalho de Gil-Alonso et al. (2016), foi realizado a análise da curva de crescimento de duas cepas de *C. parapsilosis* ATCC após o tratamento com caspofunginas, que são equinocandinas capazes de inibir o crescimento fúngico através da inibição de uma enzima responsável pela síntese da parede celular, e vêm sendo cada vez mais utilizada como tratamento de primeira linha para candidíase invasiva. Entretanto, foi observado pelo autor que na ausência do antifúngico, já que este é retirado no método de time-kill, para não continuar atuando, as cepas de *C. parapsilosis* continuaram a crescer, não apresentando diferenças da curva de crescimento com relação ao controle positivo, dessa forma, não foi evidenciado o efeito fungicida do composto na CIM utilizada, que foi de $8 \mu\text{g mL}^{-1}$.

No estudo realizado por Rossi et al. (2009), onde foi analisada a atividade fungicida de géis termicamente sensíveis a base de derivados de quitosana contra fungos e bactérias responsáveis pela mucosite oral (entre elas, a *Candida albicans*), determinou-se que a mistura do derivado de trimetilquitosana/glicerolfosfato com 0,15% de cloridrato de benzidamina foi efetiva contra *C. albicans* no período de 6 horas, na concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Ganan et al. (2019) analisaram o efeito fungicida de oligossacarídeos de quitosana contra várias cepas de *Candida* sp., e determinou-se, a partir da curva de crescimento, a inibição total de *C. guilliermondii* no período de 8 horas, na concentração de $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Em outro estudo, realizado por Gondim et al. (2018), em que se analisou nanopartículas de quitosana com diâmetro de 30,2 nm contra biofilmes de *Candida* spp. presentes em dentaduras, no qual as espécies que prevalecem são as de *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. albicans*, observou-se, no ensaio de time-kill, que há ação fungicida das nanopartículas a partir de 2 horas, na CIM de $120,4 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Tais estudos mostram a importância e necessidade de continuar a explorar os efeitos antifúngicos dos derivados de quitosana contra *Candida* spp., uma vez que ela vem se tornando cada vez mais resistente aos fármacos amplamente utilizados, e os derivados de quitosana aqui apresentados mostram ação fungicida promissora, a depender de fatores como a estrutura do polímero e da cepa testada.

5.7. Análises microscópicas

5.7.1. Marcação dos derivados com rodamina e determinação do grau de substituição

A determinação do grau de substituição de rodamina (Figura 23) na cadeia polimérica foi realizada a partir da construção de uma curva de calibração da absorbância (554 nm) com soluções de rodamina, nas seguintes concentrações: $0,5 \cdot 10^{-5}$; $1 \cdot 10^{-5}$; $1,5 \cdot 10^{-5}$; $2 \cdot 10^{-5}$; $2,5 \cdot 10^{-5}$; $3,0 \cdot 10^{-5}$. A partir do valor determinado do coeficiente de absorvidade molar ($6,8 \times 10^4 \text{ M cm}^{-1}$) e a equação da reta, foi possível determinar as concentrações de rodamina nas soluções de derivados. A partir da concentração, foi calculado o grau de substituição utilizando a equação 7:

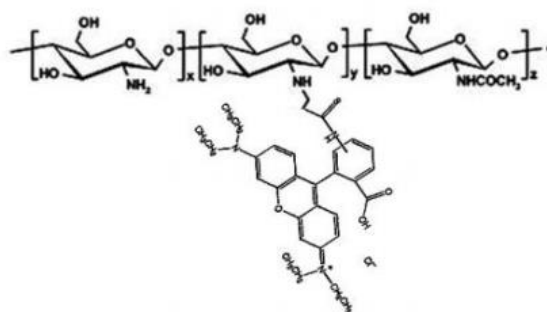
$$\% = \frac{nr}{nq} \times 100 \text{ (equação 7)}$$

Onde “nr” é o número de mols de rodamina e “nq” é o número de mols de quitosana. As porcentagens determinadas estão descritas na tabela a seguir.

Tabela 5 - Porcentagens de substituição de rodamina nos polímeros

Polímero	% de substituição
S1- 25 kDa	0,79
S1- 60 kDa	0,78
S1- 116 kDa	0,82
S1- 136 kDa	0,52
S2 – 5% PENTIL	1,1
S2 – 13% PENTL	1,2
S2 – 46% PENTIL	1,1

Figura 23 – Estrutura da quitosana substituída com rodamina



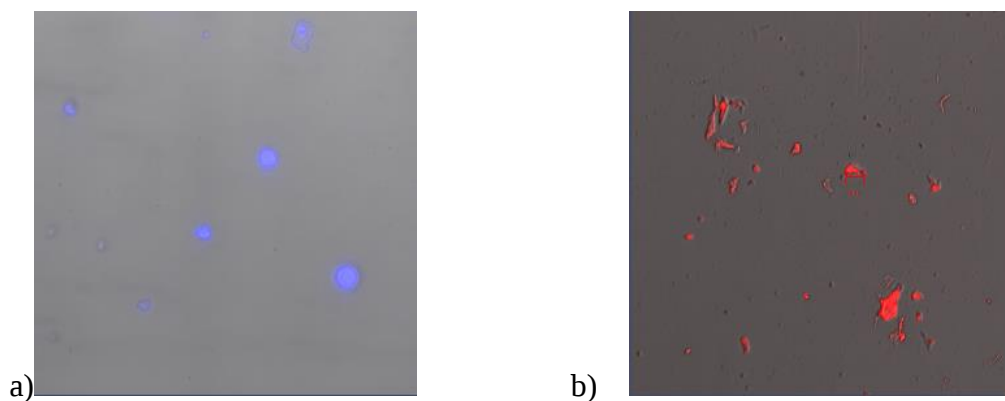
Fonte: DIAS, 2017

5.7.2. Microscopia Confocal a Laser

A microscopia confocal a laser foi utilizada para verificar alterações superficiais na morfologia da *Candida* spp., causadas pelo efeito dos polímeros. Para a análise foram escolhidos o derivado e a cepa que apresentaram melhor índice de inibição, para que fosse possível a melhor visualização do efeito em sua estrutura. Portanto, o derivado da série 2 com 5% pentil contra a CK1. As imagens do controle (cepa sem ação do antifúngico) e da cepa após a ação pode ser verificada na Figura 24.

Pode-se perceber a partir da Figura 24 que o controle possui estrutura delineada e oval, sendo possível observar claramente a fluorescência do DAPI em toda a sua estrutura. Enquanto a cepa após a ação do derivado não encontra-se mais com tal estrutura delineada e oval, mas ao invés disso, observa-se a fluorescência de vários “fragmentos”, possivelmente por conta do rompimento da célula e espalhamento do polímero marcado com a rodamina.

Figura 24 – Imagens da microscopia da CK1 a) controle b) CK1 após ação do derivado da série 2 com 5% pentil



Fonte: Elaborado pelo autor

No trabalho realizado por Sharma et al (2018), em que foi testado a atividade antifúngica de extratos metanólicos de sementes da planta conhecida como Peônia do Himalaia (espécie) contra *C. glabrata*, a morfologia das células de *Candida* foram analisadas por microscopia confocal e microscopia eletrônica após o efeito desses extratos na CIM. Foi observada alteração na morfologia das células e rompimento da membrana plasmática, o que, provavelmente, ocorreu no presente trabalho. Em seu estudo, foi utilizado um corante chamado iodeto de propídio, que é um corante de ligação ao DNA fluorescente carregado positivamente, e então, na presença de moléculas ativas na membrana, ele penetra através da permeabilidade da

membrana comprometida e fluoresce na microscopia confocal. Além disso, foi possível observar na microscopia eletrônica de transmissão, que as células sem o tratamento possuíam superfície limpa e lisa, enquanto que as tratadas com o extrato possuíam superfícies onduladas, e o aumento da rugosidade das células é indício de dano na parede celular (SHARMA, A. et al., 2018).

Portanto, possivelmente a alteração da morfologia das células da CK1 também está relacionada ao comprometimento da sua membrana e parede celular.

CONCLUSÃO

Foi possível a partir das caracterizações por RMN H^1 verificar que as reações realizadas para a síntese dos derivados da série 3, com porcentagens variadas de grupos hidrofílicos aniônicos (carboxietil) e porcentagens crescentes de grupos hidrofóbicos (octil ou dodecil) foram eficientes.

A análise do grau de ionização em função do pH mostrou que a quantidade de grupos ionizáveis aumentou no pH 6,4, em relação à quitosana comercial, pois é o pH que se aproxima da média do pKa desta, sendo que os derivados das séries 1 e 2 apresentaram valores próximos a 70%, e os derivados da série 3 próximos a 80%.

Os polímeros da série 1, com exceção do derivado de 25 kDa, e os polímeros da série 2, com exceção o de 46% pentil, apresentaram inibição de 90% para todas as cepas de *C. krusei* analisadas, e para as cepas de *C. glabrata* e *C. parapsilosis* ATCC, CG1 e CP1. Os derivados da série 3 não apresentaram inibição significativa para nenhuma cepa analisada.

A maioria dos polímeros apresentou ação fungicida na CIM ou muito próxima, exceto as cepas de *C. parapsilosis* que foram as mais resistentes, obtendo valores de CFM maiores, enquanto as de *C. krusei* foram as mais sensíveis, com menores valores.

Os polímeros mostraram ter ação fungicida com no máximo cinco horas de contato.

A partir da microscopia confocal, foi possível observar alteração na morfologia das cepas após ação com o derivado, sugerindo a inibição do fungo por rompimento das células.

Por fim, conclui-se que os polímeros da série 1-116 kDa, 136 kDa e os polímeros da série 2- 5%, 13% pentil foram os mais eficientes, sendo atóxicos e com elevada inibição antifúngica para todas as cepas, e dentre eles, o derivado com 5% pentil inibiu maior quantidade de cepas, evidenciando a importância do equilíbrio carga/hidrofobicidade.

REFERÊNCIAS

- AKSUNGUR, P. et al. Chitosan delivery systems for the treatment of oral mucositis: in vitro and in vivo studies. **Journal of Controlled Release**, v. 98, p.269-279, 2004.
- ALBURQUENQUE, C. et al. Antifungal activity of low molecular weight chitosan against clinical isolates of *Candida* spp. **Medical Mycology**, v.48, p. 1018-1023, 2010.
- AMOS, W.B., WHITE, J.G. How the Confocal Laser Scanning Microscope entered Biological Research. **Biology of the cell**, v. 95, p. 335-342, 2003.
- ANITHA, A. et al. Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carboxymethyl and N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles. **Carbohydrate polymers**, v.78, p.672-677, 2009.
- ANUSH, S.M. et al. Synthesis of pyrazole-based Schiff bases of Chitosan: Evaluation of antimicrobial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 18, 2018.
- ASSIS, C.F. et al. Chitooligosaccharides antagonize the cytotoxic effect of glucosamine. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 28, p. 1097-1105, 2012.
- BEHBEHANI, J.M. et al. Synergistic effects of tea polyphenol epigallocatechin 3-O-gallate and azole drugs against oral *Candida* isolates. **Journal de Mycologie Médicale**, v.29, p. 158-167, 2019.
- BRAKENHOFF, G.J. et al. Three-Dimensional Imaging by confocal Scanning Fluorescence Microscopy. **Journal of Microscopy**, 1989.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement. M27-S4, v. 32, 2012.
- COLOMBO, L.A.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.36, 2003.
- COTTA-PEREIRA, G.; RODRIGO, F.G.; DAVID-FERREIRA, J.F. The use of tannic acidglutaraldehyde in the study of elastic related fibers. **Stain Technology**, v. 51, p. 7–11. 1976.
- 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.
- DEVLEIGH, F. et al. Chitosan: Antimicrobial Activity, Interactions with Food Components and Applicability as a Coating on Fruit and Vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v.21,p.703-714, 2004.

DIAS, A.M. **Derivados anfílicos 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.

FELICE, F. et al. Effect of different chitosan derivatives on in vitro scratch wound assay: A comparative study. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.76, p.236-241, 2015.

FREITAS, A.L.D. et al. Proanthocyanidin polymeric tannins from *Stryphnodendron adstringen* are effective against *Candida* spp. isolates and for vaginal candidiasis treatment. **Journal of ethnopharmacology**, v.216, p. 184-190, 2018.

GABRIEL, J. S. **Síntese, Caracterização e Atividade Antifúngica de Derivados Anfílicos de Dietilaminoetil-Quitosana contra *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus***. 2013. 103f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, São José do Rio Preto, 2013.

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

GARCIA, L.G.S. et al. Effect of the molecular weight of chitosan on its antifungal activity against *Candida* spp. in planktonic cells and biofilm. **Carbohydrate Polymers**, v. 195, p. 662-669.

GANAN, M. et al. Antifungal activity of well-defined chitooligosaccharide preparations against medically relevant yeasts. **Plos One**, v. 14, 2019.

GIL-ALONSO, S. et al. Postantifungal effect of caspofungin against the *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* clades. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 86, p. 172-177, 2016.

GONDIM, B.L.C. et al. Effect of chitosan nanoparticles on the inhibition of *Candida* spp. biofilm on denture base surface. **Archives of Oral Biology**, v. 94, p. 99-107, 2018.

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

HANI, U. et al. Candidiasis: A fungal infection – Current Challenges and Progress in Prevention and Treatment. **Infectious disorders.**, v.15. p. 42-52, 2015.

HUANG, M.; KHOR, E.; LIM, L-Y. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: effects of molecular weight and degree of deacetylation. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p. 344-353, 2004.

HRUBANOVA, K. et al. How the Confocal Laser Scanning Microscope entered Biological Research. **Sensors**, v. 18, p. 4089, 2018.

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.

KAUR, R. et al. Emergence of non-albicans Candida species and antifungal resistance in intensive care unit patients. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, p. 455-460, 2016.

KULIKOV, N.S. et al. Antifungal activity of oligochitosans (short chain chitosans) against some Candida species and clinical isolates of Candida albicans: Molecular weight activity 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.

KUMARI, A. et al. Role of biofilm morphology, matrix content and surface hydrophobicity in the biofilm-forming capacity of various Candida species. **Journal of Medical Microbiology**, v.67, p. 889-892, 2018.

LARA, H.H. et al. Effect of silver nanoparticles on *Candida albicans* biofilms: an ultrastructural study. **Journal of nanobiotechnology**, v. 13, 2015.

LARANJEIRA, M. C. M; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Quím. Nova**, v.32 no.3 São Paulo. 2009.

LEITE, R. F. **Concentração inibitória mínima de extratos brutos produzidos por actinobactérias para agentes causadores de mastite bovina**. 97f. 2016. Dissertação/Tese (Mestrado/Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

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.

LIM, S.H.; HUDSON, S.M. Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group. **Carbohydrate**, v.339, p. 313–319, 2004.

LINDBERG, E. et al. species distribution and antifungal drug susceptibilities of yeasts isolated from the blood samples of patients with candidemia. **Scientific Reports**, v.9, p.3838, 2019.

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.

LUDWIG, D.B. Antifungal Activity of Chitosan-Coated Poly(lactic-co-glycolic) Acid Nanoparticles Containing Amphotericin B. **Mycopathologia**, 2018.

- MA, O. et al. Precise derivatization of structurally distinct chitosans with rhodamine B isothiocyanate. **Carbohydrate polymers**, v. 72, p. 616-624, 2008.
- MARTINS, N. et al. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. **Industrial crops and products**, v. 74, 2015.
- MIRANDA-CADENA, K et al. Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and their close-related species in oral candidiasis. **Archives of Oral Biology**, v. 95, p. 100-107, 2018.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63; 1983
- MTS ASSAY KIT CELL PROLIFERATION COLORIMETRIC. Versão 2, 2019. Disponível em: <<https://www.abcam.com/mts-assay-kit-cell-proliferation-colorimetric-ab197010.html>>. Acesso em: 15 mai. 2019.
- NO, K.H. et al. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. **International Journal of Food Microbiology**, v.74, p.65-72, 2002.
- OTASEVIC, S. et al. Species distribution and epidemiological characteristics of superficial fungal infections in Southeastern Serbia. **Mycoses**, v. 62, p. 458-465, 2019.
- OLIVEIRA, F. P. P. et al. Synthesis and Evaluation of Diethylethylamine Chitosan for Gene Delivery: Charge Density Effects on in vitro transfection. **Efficiency Nanotechnology**, v. 24, p. 55-101, 2013.
- 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.
- PERINELLI, D.R. et al. Chitosan Loaded into a Hydrogel Delivery System as a Strategy to Treat Vaginal Co-Infection. **Pharmaceutics**, v. 10, 2018.
- PIRES, R.H. et al. Anticandidal Efficacy of Cinnamon Oil Against Planktonic and Biofilm Cultures of *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis*. **Mycopathologia**, v. 172, p. 453-464, 2011.
- RABEA, E.I. et al. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, v.4, p.1457-1465, 2003.
- RASCH, S. et al. Increased risk of candidemia in patients with necrositing pancreatitis infected with candida species. **Pancreatology**, v. 18, p. 630-634, 2018.
- ROSSI, S. et al. Thermally sensitive gels based on chitosan derivatives for the treatment of oral mucositis. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 74, p. 248-254, 2010.

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

SAHARIAH, P.; MÁSSON, M. Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: A review of the structure – activity relationship. **Biomacromolecules**. v.18,p. 3846-3868, 2017.

SAKAGAMI, T. et al. Antifungal susceptibility trend and analysis of resistance mechanism for *Candida* species isolated from bloodstream at a Japanese university hospital. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 25, p. 34-40, 2019.

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

SASHIWA, H. et al. Michael Reaction of Chitosan with Acrylic Acid in Water. **Macromolecular Bioscience**, v.3, p.231-233, 2003.

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, 2008.

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

SHARMA, A. et al. Phytochemical analysis and mode of action against *Candida glabrata* of *Paeonia emodi* extracts. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 28, p. 443-451, 2018.

SILVA, M.H. **Caracterização e identificação de leveduras do gênero *Candida* em pacientes transplantados de medula óssea**. 2011. 68 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2011.

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.

TULASIDAS, S. et al. A study on biofilm production and antifungal drug resistance among *Candida* species from vulvovaginal and bloodstream infections. **Infection and drug resistance**, v. 11, p. 2443-2448, 2018.

WHIBLEY, N; GAFFEN, S. L. Beyond *Candida albicans*: Mechanisms of immunity to non-*albicans Candida* species. **Cytokine**., v. 76, p. 42-52, 2015.