FERNANDA WALT MENDES DA SILVA DE BASTIANI

Sistemas de liberação para anfotericina B e miltefosina no tratamento das candidíases

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

FERNANDA WALT MENDES DA SILVA DE BASTIANI

Sistemas de liberação para anfotericina B e miltefosina no tratamento das candidíases

Dissertação apresentada ao Programa de Pósgraduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Ishida

Versão original

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Bastiani Walt Mendes da Silva, Fernanda Sistemas de liberação para anfotericina B e miltefosina no tratamento das candidíases / Fernanda de Bastiani Walt Mendes da Silva; orientadora Kelly Ishida. -- São Paulo, 2018. 112 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

Candidíases. 2. Galleria mellonella. 3.
 Miltefosina. 4. Nanopartículas. 5. Microemulsões. I.
 Ishida, Kelly, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Fer	nanda Walt Mendes da Silva de Bastiani
Título da Disserta tratamento das ca	ção: Sistemas de liberação para anfotericina B e miltefosina no andidíases
Orientador: Prof. I	Ora. Kelly Ishida
_	padora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em alizada a, considerou o(a) candidato(a):
() Aprovado(a) () Reprovado(a)
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantă, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000 CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-maii: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Atividade antifúngica in vitro e in vivo da miltefosina encapsulada em sistema nanoestruturado de alginato sobre espécies de Candida", registrado sob o protocolo nº 72/2016, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em 11/10/2016 pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de 4 ano(s) a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: Dr.(a.) Kelly Ishida
- Departamento: Microbiologia
- Membros da Equipe: Cristina de Castro Spadari (Pós-graduando), Fernanda Walt Mendes da Silva (Pós-graduando), Aline Luiza Duarte de Freitas (Iniciação científica)

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, relatório final de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "In vitro and in vivo antifungal activity of miltefosine encapsulated in nanostructured alginate system against Candida species", protocol nº 72/2016, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for Scientific Research Purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on 10/11/2016 by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for 4 year(s) from the date of approval.

- Principal Investigator: Dr.(a.) Kelly Ishida
- Team members: Cristina de Castro Spadari (Graduate Student), Fernanda Walt Mendes da Silva (Graduate Student), Aline Luiza Duarte de Freitas (Undergraduate Student).

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	Baib-C	Fêmea/female	6-8 semanas/weeks	240
Widd Middedidd	Baib-C	Macho/Male	8 semanas/weeks	240

São Paulo, 14 de outubro de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes** Coordenador CEUA-ICB/USP Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento Secretária CEUA-ICB/USP





Declaro, para os devidos fins, que

Fernanda Walt Mendes da Silva

concluiu o Curso "Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos", realizado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 27 abril 2016 (Declaração válida por 5 anos)

Helayne Freitas Presidente da Comissão de Resíduos Químicos Prof. Dr. Jackson Cioni Bittencourt Diretor do ICB

Instituto de Ciências Biomédicas | USP Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 • Cidade Universitária *Armando Salles Oliveira" • Butantã — São Paulo — SP • CEP 05508-900

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de amor infinito.

"Quem tem Deus nada falta. Só Deus basta" - Santa Teresa d'Ávila

Ao meu pai Adalberto, por todo apoio, por sempre estar ao meu lado e por tudo o que fez e faz por mim. Você é meu herói, te amo.

À minha avó Neiva, pelo seu amor e exemplo de vida, me mostrando que sempre é possível superar dificuldades. Obrigada por tudo, amo você!

Ao meu irmão João, pela amizade. Você é o melhor irmão do mundo. Sei que sempre posso contar contigo. Te amo maninho!

Ao meu marido, Alexandre, amor da minha vida. Obrigada por todo incentivo, por toda ajuda e por sempre acreditar na minha capacidade. Eu não teria conseguido chegar até aqui sem você. Juntos somos mais fortes! Te amo para sempre!

À minha mãe, por ter me incentivado a seguir a carreira farmacêutica e ir em busca dos meus ideais.

Aos meus sogros Sabino e Arlete, por todo auxílio. Sou grata por tudo o que fizeram por mim.

À minha orientadora, Profa. Dra. Kelly Ishida, por essa grande oportunidade. Sem dúvida essa foi a minha melhor experiência profissional. Através disso, eu pude descobrir que rumo seguir. Muito obrigada pela confiança, dedicação, aprendizado, atenção e paciência. Sou muito contente por ter sido orientada por você.

À minha colega, Cristina Spadari, por ter sido solícita e ter me auxiliado em experimentos científicos ao longo deste trabalho.

À técnica do Laboratório de Quimioterapia Antifúngica (LQA), Zita Maria pela dedicação ao laboratório, contribuindo com a organização e rotina do LQA. Agradeço pela atenção e amizade. Sentirei saudades.

À Profa. Dra. Luciana B. Lopes, pela colaboração, por ter permitido frequentar e utilizar equipamentos do seu laboratório que de forma *sine qua non* contribuiu para execução desse trabalho. Agradeço por todo aprendizado.

Aos meus colegas de laboratório, Aline, Bruna, Gaby, Lucas, Luciana, Nádia Catalina, Flávio e Pietro, pela ajuda e convivência. Cada um colaborou de alguma forma, tornando possível a realização deste trabalho.

Às pós-doutorandas Luciana Thomaz e Jane Kaiano, pelo auxílio durante a padronização do modelo de *Galleria mellonella* no LQA.

À mestranda Giovanna Salata, pelo acompanhamento na realização do experimento de imageamento em modelo murino.

Ao Prof. Dr. Márcio Dias, por abrir as portas do seu laboratório nos momentos em que precisei.

À funcionária Gisele da Secretaria de Pós-Graduação da Microbiologia (ICB-II, USP) e ao funcionário Marco (biotério), pela organização, atenção e serviços prestados.

Ao meu amigo Marcelo Barreto Oliveira, pela amizade e companhia.

A Universidade de São Paulo e ao Departamento de Microbiologia (ICB-II, USP), pela oportunidade e utilização das instalações.

A todos aqueles que, de alguma forma (direta ou indireta) contribuíram com esse trabalho.

AGRADECIMENTO À INSTITUIÇÃO DE FOMENTO

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (Processo no. 1645602, período 2016 - 2018) pelo suporte financeiro na forma de bolsa de estudo durante os 2 anos de mestrado. Por conta disso, a realização desse trabalho foi possível, contribuindo com a minha formação.



RESUMO

DE BASTIANI FWMS. **Sistemas de liberação para anfotericina B e miltefosina no tratamento das candidíases.** 2018, 112 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

As leveduras de Candida spp. fazem parte da microbiota humana, entretanto podem causar tanto micoses superficiais quanto sistêmicas. As opções terapêuticas para as candidíases incluem três principais classes, os agentes poliênicos, azólicos e equinocandinas; no entanto, a maioria deles apresentam desvantagens de toxicidade e/ou farmacocinética, custos relativamente altos e aumento de isolados resistentes aos antifúngicos. A miltefosina (MFS), um composto alquilfosfocolina, é atualmente usada no tratamento de câncer de mama e de leishmanioses. Estudos prévios apontam a MFS como potencial alternativa para o tratamento das infecções fúngicas, porém possui elevada toxicidade. Dessa forma, este trabalho visa avaliar alternativas para o tratamento de candidíases. MFS e seus análogos sintéticos; nanopartículas de alginato e microemulsões como sistemas de liberação de MFS e/ou anfotericina B (AMB) foram avaliados quanto a atividade antifúngica in vitro e in vivo usando modelos de Galleria mellonella e modelo murino de candidíase vaginal. Dos análogos estruturais da MFS o composto 1 foi o mais ativo, apresentando efeito fungicida de maneira dose e tempo dependente; com a presença de ergosterol exógeno os valores de CIM de MFS e do composto 1 aumentam quando a concentração de ergosterol aumenta no meio de cultura, sugerindo que MFS e o composto 1 possam interagir com o ergosterol resultando em alteração da permeabilidade de membrana. Em ensaios de susceptibilidade in vitro a MFS livre foi mais efetiva que a MFS incorporada nanopartículas de alginato (MFS.Alg) para de Candida spp. testadas. Em contrapartida, larvas de G. mellonella infectadas com C. albicans (SC 5314 ou IAL-40) foram protegidas da infecção guando tratadas com MFS.Alg (100 mg/Kg) em que houve redução das taxas de mortalidade e de morbidade, bem como redução da carga fúngica e do processo de filamentação do fungo. A AMB e a MFS foram efetivas no modelo larvário em doses de 1 e 20 mg/kg, respectivamente. Importantemente, a MFS em nanocarreador de alginato foi menos tóxica quando comparado com a sua forma livre. Adicionalmente, microemulsões (ME) foram produzidas para a incorporação de AMB e MFS. A formação de um sistema monofásico semelhante a um gel é visualizada com absorção de água após 4 horas de incubação em que agregados bem estruturados são formados indicando a fase hexagonal. Em modelo murino de candidíase vaginal as formulações de AMB e MFS em sistemas de liberação [MFS.Alg (1x), MFS-ME (3x), AMB-ME (3x)] foram comparadas com a formulação em creme [MFS-CR (6x) e AMB-CR (6x)], e todas foram capazes de reduzir a carga fúngica do tecido vaginal, porém as formulações em sistema de liberação foram as mais vantajosas comparadas com a formulação em creme tendo em vista a redução do custo e do número de aplicações levando a maior comodidade do paciente durante o tratamento da candidíase vaginal. Os resultados obtidos mostram dentre os análogos da MFS o Composto 1 foi o que melhor apresentou atividade antifúngica; e que a AMB e/ou MFS incorporadas em sistemas de liberação controlada (nanopartículas de alginato e microemulsões) foram capazes de reduzir efeitos colaterais (no caso da MFS) e de reduzir a carga fúngica nos tecidos infectados, podendo ser alternativas terapêuticas para o tratamento das candidíases.

Palavras-chaves: Candida. Candidíases. Galleria mellonella. Miltefosina. Anfotericina B. Nanopartículas. Alginato. Microemulsões.

ABSTRACT

DE BASTIANI FWMS. Release systems for amphotericin B and miltefosine in the treatment of candidiasis. 2018, 112 p. Dissertation (Master in Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The yeasts of Candida spp. are part of the human microbiota; however, they can cause both superficial and systemic mycoses. Therapeutic options for candidiasis include three main classes, polyenes, azoles and echinocandins; however, most of them exhibit disadvantages of toxicity and/or pharmacokinetics, relatively high costs and increase of antifungal resistant isolates. Miltefosine (MFS), an alkylphosphocholine compound, is currently used in the treatment of breast cancer and leishmaniasis. Previous studies indicate MFS as an alternative potential for the fungal infections treatment, but it has high toxicity. Thus, this study aims to evaluate alternatives for the treatment of candidiasis. MFS and its synthetic analogs; alginate nanoparticles and microemulsions such as release systems for MFS and / or amphotericin B (AMB) were evaluated for antifungal activity in vitro and in vivo using Galleria mellonella model and murine model of vaginal candidiasis. Among the analogs of MFS, compound 1 was the most active, showing a fungicidal effect in a dose-dependent manner: with the presence of exogenous ergosterol the MIC values of MFS and compound 1 increase when the concentration of ergosterol increases in the culture medium, suggesting that MFS and compound 1 may interact with ergosterol resulting in an altered membrane permeability. In vitro susceptibility assays the free MFS was more effective than the MFS incorporated in alginate nanoparticles (MFS.Alg) against all strains of Candida spp. tested. In contrast, *C. albicans*-infected *G. mellonella* larvae (SC 5314 or IAL-40) were protected from infection when treated with MFS.Alg (100 mg/kg) in which mortality and morbidity rates were reduced, as well as reduction of the fungal load and filamentation. AMB and MFS were effective in the larval model at doses of 1 and 20 mg/kg, respectively. Importantly, MFS in alginate nanocarrier was less toxic when compared to its free form. In addition, microemulsions (ME) were produced for the incorporation of AMB and MFS. The formation of a single-phase gel-like system is visualized with water absorption after 4 hours of incubation in which well-structured aggregates are formed indicating the hexagonal phase. In the murine model of vaginal candidiasis, formulations of AMB and MFS incorporated in release systems [MFS.Alg (1x), MFS-ME (3x), AMB-ME (3x)] were compared with the cream formulation [MFS-CR 6x) and AMB-CR (6x), and all formulations were able to reduce the fungal load of vaginal tissue, but the release-system formulations were the most advantageous compared to the cream formulation in order to reduce the cost and number of applications leading to greater patient comfort during the treatment of vaginal candidiasis. The results obtained show that among the analogs of MFS, compound 1 was the one that presented the best antifungal activity; and that AMB and/or MFS release systems (alginate nanoparticles incorporated in controlled microemulsions) were able to reduce side effects (in the case of MFS) and reduce fungal load in infected tissues, and they could be therapeutic alternatives for treatment of the candidiasis.

Key-words: Candida. Candidiasis. Galleria mellonella. Miltefosine. Amphotericin B. Nanoparticles. Alginate. Microemulsions

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da miltefosina e seus análogos sintéticos44
Figura 2 - Desenho experimental do modelo murino de candidíase vaginal e
tratamentos com formulações de anfotericina B e miltefosina54
Figura 3 - Caracterização morfológica da microemulsão por microscopia de luz
polarizada57
Figura 4 - Sistema de intumescimento das microemulsões contendo 0% e 10% de
água destilada58
Figura 5 - Efeito da miltefosina (MFS) e anfotericina B (AMB) na permeabilidade da membrana celular de leveduras de <i>Candida albicans</i> SC5314.
Figura 6 - Viabilidade de <i>Candida albicans</i> SC5314 tratadas com anfotericina B (AMB), miltefosina (MFS) e composto 1 (C1)65
Figura 7 - Análise da fluorescência do composto 1 em leveduras de <i>Candida albicans</i> SC 5314
Figura 8 - Ciclo de vida do inseto Galleria mellonella
Figura 9 - Virulência de de Candida spp. testadas em larvas de Galleria mellonella.
70
Figura 10 - Toxicidade da anfotericina B (AMB), miltefosina livre (MFS) e MFS em
nanopartículas de alginato (MFS.Alg) sobre as larvas de <i>Galleria mellonella</i> 71
Figura 11 - Toxicidade da miltefosina livre (MFS) e MFS em nanopartículas de alginato (MFS.Alg) sobre as larvas de <i>Galleria mellonella</i> 72
Figura 12 - Curvas de sobrevivência de larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas com leveduras <i>Candida albicans</i> SC5314 (5x10 ⁵ UFC/larva) e tratadas após 30 minutos da infecção com anfotericina B (AMB), miltefosina (MFS) e miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS.Alg)
Figura 13 - Índice de saúde de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas com <i>Candida albicans</i> SC5314 (5x10 ⁵ UFC/larva) e tratadas após 30 minutos da infecção com anfotericina B (AMB), miltefosina (MFS) e miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS.Alg)
· · · · · ·

Figura 15 - Índice de saúde de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas com <i>Candida albicans</i> IAL-40 (5x10 ⁵ UFC/larva) e tratadas após 30 minutos da infecção com anfotericina B (AMB), miltefosina (MFS) e miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS.Alg)
Figura 16 - Carga fúngica em larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas com <i>Candida albicans</i> (SC5314 e IAL-40) e tratadas com anfotericina B (AMB), miltefosina livre (MFS) e miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS.Alg).
Figura 17 - Cortes histopatológicos de larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas com <i>Candida albicans</i> SC 5314 não tratadas e tratadas com anfotericina B (AMB), miltefosina livre (MFS), miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS.Alg).
Figura 18 - Cortes histopatológicos de larvas de <i>Galleria mellonella</i> infectadas com <i>Candida albicans</i> IAL-40 não tratadas e tratadas com anfotericina B (AMB), miltefosina livre (MFS), miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS.Alg).
Figura 19 - Carga fúngica no tecido vaginal de camundongos BALB/c fêmeas infectados com leveduras de <i>Candida albicans</i> SC 5314 e tratadas com anfotericina B e miltefosina incorporada em creme vaginal (AMB-CR e MFS-CR), em microemulsão (AMB-ME e MFS-ME) e em nanopartículas de alginato (MFS.Alg).
Figura 20 - Cortes histopatológicos do tecido vaginal de camundongos BALB/c fêmeas tratadas com anfotericina B e miltefosina em creme vaginal (AMB-CR e MFS-CR), em microemulsões (AMB-ME e MFS-ME) e MFS em nanopartículas de alginato (MFS.Alg).
Figura 21 - Imageamento do tecido vaginal de camundongos BALB/c fêmeas89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nota do índice de saúde de larvas de <i>Galleria mellonella</i> (LOH et al., 2013)51
Tabela 2 - Análise semi-quantitativa de carga fúngica e filamentação de <i>Candida albicans</i> nos cortes histológicos (baseado em QUINTELLA et al., 2011)51
Tabela 3 – Grupos experimentais usado no modelo murino de candidíase vaginal53
Tabela 4 - Dados das características físicas (tamanho, polidispersão e potencial zeta) das nanopartículas de alginato vazias (Nano.Alg) e com miltefosina incorporada (MFS.Alg)
Tabela 5 - Susceptibilidade de <i>Candida</i> spp. aos antifúngicos padrões. As menores concentrações que inibem 50% e 90% do crescimento fúngico (Cl $_{50}$ e Cl $_{90}$, respectivamente) e a concentração fungicida mínima (CFM) foram determinadas. Os valores estão expressos em μg/mL. R: resistente; SDD: susceptibilidade dose dependente
Tabela 6 - Susceptibilidade de <i>Candida</i> spp. a miltefosina livre (MFS), em nanopartículas de alginato (MFS.Alg) e a seus análogos sintéticos (compostos 1, 2 e 4). As menores concentrações que inibem 50% e 90% do crescimento fúngico (CI ₅₀ e CI ₉₀ , respectivamente) e a concentração fungicida mínima (CFM) foram determinadas. Os valores estão expressos em μg/mL.
Tabela 7 - Efeito da presença de ergosterol exógeno na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da anfotericina B (AMB), miltefosina (MFS) e composto 1 (C1) sobre leveduras de <i>Candida albicans</i> SC531463
Tabela 8 - Análise semi-quantitativa da presença de carga fúngica e filamentação de <i>C. albicans</i> (SC5314 e IAL-40) em larvas de <i>Galleria mellonella</i> não tratadas e tratadas com anfotericina B (AMB), miltefosina livre (MFS) e miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS.Alg)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT Alanina aminotransferase

AMB Anfotericina B desoxicolato

AMB-CR Anfotericina B 1,25% (creme)

AMB-ME Anfotericina B a 1,25% (microemulsão)

AST Aspartato Aminotransferase

C1 Composto 1

CDC Centers for Disease Control and Prevention

CEUA Comitê de Ética no Uso de Animais

CIM Concentração inibitória mínima

CFM Concentração fungicida mínima

Cm Centímetro

CNA Candida não-albicans

Composto 1 [MT 11C BDP ou 11-(4,4-Difluoro-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-

3a,4a-diaza-s-indacen-2-il) *n*-undecilfosfatidilcolina)]

Composto 2 [MT 6Et BDP ou 11-(4',4'-Difluoro-6'-ethyl-1',3',5',7'-tetramethyl-

4'-bora-3'a,4'a-diaza-s-indacen-2'-yl)-undecylphosphocholine]

Composto 4 (MT PTRI ou miltefosina-5c-feniltrienino)

COX Citocromo oxidase

CR-Alexa Creme com Alexa Fluor 647

CVV Candidíase vulvovaginal

CVVR Candidíase vulvovaginal recorrente

DMSO Dimetilsulfóxido

Dz Diâmetro médio

FLZ Fluconazol

(G) α- L-gulurônico

HE Hematoxilina e eosina

ICB Instituto de Ciências Biomédicas

Kg Quilograma

LQA Laboratório de Quimioterapia Antifúngica

(M) Ácido β-D-manurônico

μm Micrômetro

μL Microlitro

MBL2 Lectina de ligação à manose

ME Microemulsões

ME-Alexa Microemulsão com Alexa Fluor 647

MFS.Alg - Alexa Miltefosina em nanopartículas de alginato com Alexa Fluor 647

MFS Miltefosina

MFS.Alg Miltefosina em nanopartículas de alginato

MFS-CR Miltefosina 2% (creme)

MFS-ME Miltefosina a 2% (microemulsão)

Mg Miligrama

Nano.Alg Nanopartículas de alginato

NIS Nistatina

PBS Phosphate buffered saline

Pdi Polidispersão

PG Propilenoglicol

PG-Alexa Propilenoglicol com Alexa Fluor 647

SIDA Síndrome da imunodeficiência adquirida

UFC Unidades formadoras de colônia

UFC/g Unidades formadoras de colônia por grama

UFC/mL Unidades formadoras de colônias por mililitro

USP Universidade de São Paulo

UTIs Unidades de Terapia Intensiva

Veet® Creme depilatório Veet

 (ζ) Potencial zeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO22
2	OBJETIVOS24
2.1	Objetivo geral24
2.2	Objetivos específicos24
3	REVISÃO DE LITERATURA25
3.1	Candida spp25
3.1.1	Candidíase vaginal26
3.1.2	Candidíase sistêmica e candidemia28
3.2 3.2.1	Tratamento das candidíases
3.3	Novas alternativas35
3.3.1	Sistemas de liberação de fármacos37
3.3.1.	1 <i>Alginato</i> 37
3.3.1.	2 Microemulsão39
3.4	Modelo de invertebrado40
4	MATERIAIS E MÉTODOS43
4.1	Micro-organismos43
4.2	Compostos 43
4.3	Produção das formulações45
	Produção da miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS.Alg)
4.3.2	Produção de miltefosina e anfotericina B em creme (CR) e em microemulsões
(MF)	45

4.4 Determinação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> da miltefosina em nanopartículas de alginato e análogos sintéticos sobre <i>Candida</i> spp46	
4.5 Determinação do efeito do ergosterol exógeno na Concentração Inibitória Mínima (CIM) da miltefosina e do composto 147	
4.6 Efeito da miltefosina e do composto 1 na permeabilidade da membrana e na viabilidade celular47	
4.7 Efeito do composto 1 sobre a morfologia de <i>C. albicans</i> SC531448	
4.8 Modelo experimental de Galleria mellonella48	
4.8.1 Criação e manutenção de Galleria mellonella48	
4.8.2 Avaliação da virulência de isolados de Candida spp. em modelo de Galleria mellonella49	
4.8.3 Toxicidade da miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS.Alg) em larvas de Galleria mellonella49	
4.8.4 Avaliação da eficácia antifúngica da miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS.Alg) em modelo de candidíase em larvas de Galleria mellonella49	
4.8.4.1 Avaliação da mortalidade e da morbidade de larvas de Galleria mellonella	
4.8.4.2 Análise da carga fúngica em larvas de Galleria mellonella50	
4.8.4.3 Histopatologia50	
4.9 Modelo murino de candidíase vaginal52	
4.9.1 Animais52	
4.9.2 Infecção vaginal52	
4.9.3 Tratamento52	
4.9.4 Análise da carga fúngica e histopatológica do tecido vaginal	
4.9.5 Imageamento do canal vaginal54	

4.10	Análise estatística55
5	RESULTADOS56
5.1 	Produção e caracterização da miltefosina em nanopartículas de alginato
5.2	Caracterização da microemulsão como sistema de liberação para fosina e anfotericina B56
5.3 Fung	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração icida Mínima (CFM)59
5.4	Efeito do ergosterol exógeno na Concentração Inibitória Mínima (CIM)
5.5 celula	Efeito da miltefosina e da anfotericina B na permeabilidade da membrana ar de leveduras de <i>Candida albicans</i> SC531463
5.6 leved	Efeito da miltefosina, anfotericina B e composto 1 na viabilidade de uras de <i>Candida albicans</i> SC531464
5.7	Efeito do composto 1 sobre a morfologia de Candida albicans SC5314
5.8 5.9	Criação e manutenção das larvas de <i>Galleria mellonella</i>
5.10 <i>Galle</i>	Toxicidade da miltefosina em nanopartículas de alginato em larvas de ria mellonella70
	Avaliação da eficácia antifúngica da miltefosina em nanopartículas de ato em modelo de candidíase em larvas de <i>Galleria mellonella</i> 73
	1 Análise das Curvas de mortalidade e morbidade de larvas de Galleria nella73
5.11.2	2 Análise da carga fúngica em larvas de Galleria mellonella79
5.11.3	3 Análise histopatológica81

5.12	Modelo murino de candidíase vaginal	85
6	DISCUSSÃO	90
7	CONCLUSÃO	99
	REFERÊNCIAS	101

1 INTRODUÇÃO

As espécies de *Candida* são micro-organismos comensais sendo encontradas na pele e mucosas do trato gastrointestinal e geniturinário. Entretanto, essas leveduras apresentam uma grande capacidade de colonização e são considerados patógenos oportunistas, afetando principalmente pacientes imunocomprometidos, podendo causar desde infecções superficiais até sistêmicas (SARDI et al., 2013).

Dentre as infecções superficiais no trato genital feminino a candidíase vulvovaginal (CVV) é umas das enfermidades mais frequente que afetam mulheres em idade reprodutiva atingindo 75% delas ao menos uma vez na vida (DE BERNADIS, et al., 2018; CASSONE, 2014). Além disso, *Candida* spp. é considerada a quarta causa mais comum de infecções da corrente sanguínea depois de patógenos bacterianos (SANGLARD, 2016). As infecções hematogênicas levam a hospitalização prolongada dos pacientes; refletindo em aumento dos custos hospitalares; além de apresentar elevadas taxas de mortalidade, de aproximadamente 50% (DOI et al., 2016). Essas infecções da corrente sanguínea estão relacionadas à capacidade do fungo em formar biofilmes em superfícies abióticas, como os cateteres e sondas, sendo fonte de contaminação (SARDI et al., 2013; DESAI et al., 2014).

O tratamento da CVV não severa pode ser feito a partir de formulações tópicas que incluem: imidazóis (buteconazol, clotrimazol e miconazol), triazóis (terconazol) e agente poliênico (nistatina) (SOONG; EINARSON, 2009; CDC, 2015). Já para a forma mais severa da doença (candidíase vulvovaginal recorrente - CVVR) caracterizada por mais de quatro episódios da infecção CVV em um ano, requer tratamento prolongado, na maioria dos casos o fármaco de escolha é o fluconazol. Assim como *C. albicans*, as espécies de *Candida* não-*albicans* também podem causar infecções de CVVR em mulheres e as terapias antifúngicas convencionais não são tão eficazes contra essas espécies (DOVNIK et al., 2015; FEUERSCHUETTE et al., 2010; CDC, 2015). Como opção, a anfotericina B intravaginal é utilizada em alguns casos; por apresentar amplo espectro antifúngico além disso poucos isolados de *Candida* spp. são resistentes a este fármaco (CI et al., 2018). Já as opções terapêuticas para as candidíases sistêmicas incluem três classes, o agente poliênico anfotericina B, agentes triazólicos e equinocandinas; no entanto, a maioria apresenta elevada toxicidade e custos relativamente altos. Além da toxicidade, algumas espécies de *Candida* vêm

apresentando resistência a estes antifúngicos. Em vista disso, é necessário que novas moléculas com atividade antifúngica e/ou novas formulações farmacêuticas sejam desenvolvidas (ROEMER, KRYSAN, 2014).

A miltefosina, um composto alquilfosfocolina, inicialmente utilizada como um agente anticâncer, possui atividade antiprotozoária e antifúngica. Estudos anteriores têm demonstrado que a miltefosina possui efeito fungicida e um amplo espectro de ação contra fungos dimórficos, bolores de importância clínica e leveduras, incluindo espécies de Candida, demonstrando ser um fármaco em potencial para o tratamento das infecções fúngicas. Porém, a miltefosina apresenta efeitos colaterais similares aos apresentados pela anfotericina B como: hepatotoxicidade, hemólise, náuseas, vômitos e problemas gastrointestinais (WIDMER et al., 2006; DORLO et al., 2012).

Estratégias como a incorporação de fármacos em sistemas de liberação controlada pode melhorar características farmacotécnicas e farmacológicas (farmacocinética) e, também, contribuir na redução da toxicidade do fármaco; sendo uma escolha para o desenvolvimento de inovadoras opções terapêuticas contra infecções causadas por fungos.

Dentro deste contexto, a incorporação de fármacos como a anfotericina B e a miltefosina em sistemas de liberação controlada podem contribuir para a redução da toxicidade de ambos os fármacos bem como na redução de custos e doses administradas. Portanto, temos como objetivo neste trabalho produzir e avaliar a atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* da anfotericina B e da miltefosina em sistemas de liberação baseados em carreadores poliméricos e lipídicos em modelos de candidíase. Adicionalmente, análogos sintéticos da miltefosina foram avaliados *in vitro* quanto ao efeito antifúngico sobre *Candida* spp.

Diante disso, os resultados obtidos nessa pesquisa envolvendo a formulação da miltefosina em sistema nanocarreador de alginato, contribuirão para o desenvolvimento de uma formulação menos tóxica que a miltefosina livre, no qual suporta a capacidade de estocar altas doses do princípio ativo proporcionando a liberação controlada e reduzindo a posologia do mesmo. Para as formulações lipídicas (microemulsões) da miltefosina e anfotericina B, as vantagens apresentadas incluem: a fácil manipulação das microemulsões, liberação controlada e estabilidade do sistema microemulsionado. Em vista disso, essas formulações podem ser alternativas terapêuticas para o tratamento de candidíase vaginal e sistêmica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este presente trabalho visa avaliar alternativas para o tratamento de candidíases. Miltefosina e seus análogos sintéticos; nanopartículas de alginato e microemulsões como sistemas de liberação de miltefosina e/ou anfotericina B foram avaliados quanto a atividade antifúngica *in vitro* e, também, *in vivo* usando modelos de *Galleria mellonella* e modelo murino de candidíase vaginal.

2.2 Objetivos específicos

Produzir e caracterizar miltefosina encapsulada em nanopartículas de alginato;

Produzir e caracterizar microemulsões como sistema liberação para miltefosina e anfotericina B;

Determinar a atividade antifúngica *in vitro* da miltefosina em nanopartículas de alginato e análogos sintéticos sobre *Candida* spp. comparando com a miltefosina livre;

Avaliar a ação da miltefosina e de análogos sintéticos sobre a viabilidade e permeabilidade da membrana fúngica;

Determinar a virulência de cepas de *Candida* spp. em modelo de invertebrado *Galleria mellonella*;

Avaliar a toxicidade e a atividade antifúngica da miltefosina em nanopartículas de alginato em modelo de *Galleria mellonella*;

Avaliar a eficácia antifúngica da miltefosina em nanopartículas de alginato no modelo murino de candidíase vaginal;

Avaliar a eficácia antifúngica da miltefosina e anfotericina B em microemulsões no modelo murino de candidíase vaginal.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Candida spp.

Leveduras de Candida são micro-organismos eucarióticos que colonizam os humanos e outros animais de sangue quente. Naqueles, são comensais sendo encontradas na pele, mucosas do trato gastrointestinal, geniturinário, colonizando de 30 - 70% dos indivíduos saudáveis (POLKE, HUBE, JACOBSEN, 2015). Entretanto, essas leveduras apresentam uma grande capacidade de colonização e são considerados patógenos oportunistas, afetando principalmente imunocomprometidos, causando desde infecções superficiais até sistêmicas. Embora tenham sido descritas aproximadamente 200 espécies de Candida, somente 15 dessas foram isoladas de amostras humanas. As espécies mais comuns responsáveis por causar infecções são: Candida albicans associada a 65,3% dos casos, Candida glabrata (11,3%), Candida tropicalis (7,2%), Candida parapsilosis (6,0%), e Candida krusei (2,4%) (POLKE, HUBE, JACOBSEN, 2015; TURNER, BUTLER, 2014).

C. albicans é a espécie mais prevalente nos casos de candidíases, no qual possui uma enorme capacidade de habituação em diversos ambientes e hospedeiros, ou seja, ao mesmo tempo, esse micro-organismo pode ser comensal e oportunista, além disso, essa levedura tem a capacidade de apresentar dimorfismo fúngico, isto é, de leveduriformes ovais passam a produzir pseudohifas e hifas verdadeiras, fator relevante na patogênese da doença, podendo causar invasão tecidual no hospedeiro, além de apresentar resistência a fogocitose (POLKE, HUBE, JACOBSEN, 2015; MURRAY, ROSENTHAL, PFALLER, 2014; SARDI et al., 2013; CASSONE, 2014).

Para causar invasão tecidual e danos em órgãos, espécies de *Candida* podem expressar muitos fatores de virulência como a capacidade de aderir-se ao sítio alvo além de secretar enzimas hidrolíticas extracelulares relevantes no processo de aderência e invasão tecidual (SARDI et al., 2013). Recentemente foi relatado em *Candida* spp. outro fator de virulência secretado, a candidalisina, uma toxina peptídica citolítica no qual estimula o dano em células epiteliais, importante toxina responsável por danos teciduais (PAPPAS et al., 2018).

A capacidade de formar biofilmes é uma das mais importantes características para o estabelecimento de uma infecção e, também, para a disseminação fúngica pela corrente sanguínea (SILVA et al., 2009). Essas leveduras adaptam-se tanto em superfícies abióticas quanto bióticas, se proliferam e aderem-se ao substrato, formando um complexo de células embebidas em uma matriz extracelular denominado biofilme (MAYER, WILSON, HUBE, 2013). A formação de biofilmes é um processo natural de defesa dos micro-organismos contra as respostas do sistema imunológico do hospedeiro e de agentes antimicrobianos. Em vista disso, células de biofilmes são considerados como uma importante causa de infecções persistentes além de ser um fator de risco para a mortalidade dos pacientes que estão em estado crítico e em indivíduos imunocomprometidos (PANNANUSORN, FERNADEZ, RÖMLING, 2013). Espécies que possuem a capacidade de formar biofilmes como *C. albicans, C. parapsilosis, C. tropicalis e C. glabrata*, estão associadas com elevadas taxas de mortalidade em comparação com isolados que são incapazes de formar biofilmes (SILVA et al., 2009).

3.1.1 Candidíase vaginal

Depois das infecções vaginais bacterianas que acomete de 22 a 50% das mulheres, as infecções causadas por fungos são as causas mais frequentes, representando de 17 a 39% das ocorrências de infecções vaginais (DOVNIK et al., 2015; FEUERSCHUETTE et al., 2010).

Candidíase vulvovaginal (CVV) atingem mulheres em idade fértil e 50 a 75% das mulheres já sofreram de CVV ao menos uma vez na vida (CASSONE, 2014; FREITAS et al., 2018). Com relação a essa enfermidade é relevante saber que a CVV é a segunda causa mais comum de vaginite infecciosa, tornando-se um problema de saúde pública uma vez que reduz a qualidade de vida das mulheres, tanto fisicamente quanto mentalmente, incluindo sintomas como ansiedade e depressão em casos crônicos e recorrentes (BRADFORTE, RAVEL, 2017; DONDERS et al., 2017; SOBEL, 2016).

Os sinais clínicos e sintomas da doença incluem: inflamação aguda, prurido intenso, dispareunia, corrimento vaginal, vulva eritematosa, dor e irritação (CASSONE, 2014; SOBEL, 2016). Alguns fatores são predisponentes para a CVV,

tais como o uso de anticoncepcionais por via oral, gravidez, diabetes mellitus e tratamento com antibióticos de amplo espectro de ação, são alguns dos exemplos que podem alterar a microbiota vaginal e influenciar no estabelecimento da infecção por *Candida* spp. na mucosa vaginal (CASSONE, 2014).

A CVV pode ser apresentada de forma leve, normalmente sem complicações (~90%), embora existam circunstâncias em que a CVV pode ser considerada complicada como em casos de: CVV grave, associada a gravidez, diabetes mellitus descompensada e imunossupressão. A CVV pode-se manifestar esporadicamente, 3 ou menos episódios ao ano, ou, esta infecção pode ser apresentada de uma forma mais grave (candidíase vulvovaginal recorrente - CVVR), sendo evidenciada quando ocorre mais de 3 episódios ao ano (DOVNIK et al., 2015; GONÇALVES et al., 2015; ILKIT, GUZEL, 2011).

Estima-se que a CVVR acomete de 6 - 9% das mulheres, afligindo aproximadamente 138 milhões de mulheres ao ano em todo o mundo (SOBEL, 2016). O incômodo causado pela CVVR é exorbitante e a sua alta incidência está relacionada com presença de isolados menos suscetível aos agentes antifúngicos e capacidade de formar biofilmes na região vaginal, dificultando o tratamento, além disso fatores predisponentes genéticos do hospedeiro também estão relacionados a cronicidade (SOBEL, 2016; CASSONE, 2014; GONÇALVES et al., 2015). Polimorfismos em genes da imunidade inata como MBL2 (Lectina de ligação à manose), podem modificar os mecanismos de defesa contra *Candida* spp na região vaginal. MBL, é um componente sintetizado no fígado e possui a capacidade de reconhecer alguns agentes patogênicos, incluindo *Candida* spp. Ao reconhecer essa levedura, MBL ligase a fração manana localizada na parede celular fúngica reduzindo a colonização vaginal (HAMMAD et al., 2018).

O agente causador encontrado na maioria dos casos circunstanciais de CVV é a espécie *Candida albicans*, responsável por mais de 90% dos casos, e é o patógeno mais frequente em casos de CVVR (SOBEL, 2016). Das espécies de *Candida* não-albicans (CNA), Candida glabrata é a principal espécie identificada em quadros sintomáticos e assintomáticos de candidíase vaginal, afetando de 10 - 20% das mulheres. Algumas mulheres apresentam fatores de riscos para a obtenção de infecção por *C. glabrata*, alguns desses fatores devem ser salientados, como: portadoras de diabetes do tipo II, pós-menopausa e mulheres idosas (SOBEL, 2007; SOBEL, 2016). Além de que, *C. glabrata* é menos suscetível ao fluconazol. Em alguns

casos de CVV, algumas mulheres (1 - 10%) apresentam duas ou três espécies de *Candida* spp. causadoras de infecção vulvovaginal, normalmente a associação ocorre entre as espécies de *C. albicans* e *C. glabrata* (GONÇALVES et al., 2015).

Em cenários de sintomas não evidentes a colonização por *Candida* na vagina é possível mesmo sem sinais de imunossupressão, degeneração da mucosa ou qualquer outro aspecto da doença (ILKIT, GUZEL, 2011). Em 20% das mulheres portadoras assintomáticas e saudáveis, é possível isolar espécies de *Candida* (SOBEL, 2007). A espécie mais frequente na colonização é *C. albicans* e das espécies de não-albicans, *C. glabrata* é a mais comum (XIE et al., 2017).

3.1.2 Candidíase sistêmica e candidemia

A candidíase sistêmica tem se tornado um problema de saúde pública no Brasil, afetando pacientes que estão debilitados ou imunocomprometidos. Tradicionalmente, os mais afetados são aqueles em estado crítico e que estão em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs); esses pacientes apresentam fatores de risco e consequentemente demonstram maior tendência em adquirir candidíase sistêmica, como resultado da disseminação por via sanguínea e comprometimento de órgãos internos (JACOBSEN et al., 2012; MCCARTHY, WALSH, 2017).

Tratamento com imunossupressores, neutropenia, terapia com antibacterianos de amplo espectro, cirurgias com complicações, uso prolongado de cateter venoso central e a administração de nutrição parenteral total, são alguns dos fatores de risco que podem evoluir para candidemia (LI et al., 2016). Da mesma forma, não se deve preterir aqueles pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), doenças autoimunes, pacientes transplantados e passando por tratamentos quimioterápicos (PAPPAS et al., 2018).

Cerca de 8% das infecções sanguíneas nosocomiais são causadas por espécies de *Candida*, sendo considerada a quarta causa mais comum de infecções da corrente sanguínea depois de patógenos bacterianos (SANGLARD, 2016; SARDI et al., 2013). Este gênero fúngico é considerado o mais comum encontrado em humanos; entretanto essas infecções são consideradas difíceis de serem diagnosticadas, levando a hospitalização prolongada dos pacientes e obtendo elevadas taxas de mortalidade, de aproximadamente 50% (TURNER, BUTLER, 2014; DOI et al., 2016). Essas infecções da corrente sanguínea estão relacionadas à

capacidade do fungo em formar biofilmes em superfícies bióticas (como a mucosa) e abióticas (como os cateteres e sondas) sendo fonte de contaminação (MAYER, WILSON, HUBE, 2013).

Colombo et al. (2006) publicaram um estudo sobre epidemiologia de infecções sanguíneas causadas por espécies de *Candida*, este estudo foi conduzido em 11 centros médicos localizados em nove cidades brasileiras no período de março de 2003 a dezembro de 2004. Nesta avaliação *C. albicans* foi a espécie mais comum (40,9%), seguida por *Candida tropicalis* (20,9%), *Candida parapsilosis* (20,5%) e *C. glabrata* (4,9%) (COLOMBO et al., 2006). Em 2013, Nucci et al. verificaram uma leve mudança na epidemiologia das candidemias no Brasil; a espécie de *C. albicans* (40,5%) continua a mais prevalente, seguida de *C. parapsilosis* (25,8%), *C. tropicalis* (13,2%) e um aumento de isolados de *C. glabrata* (10%). Doi et al. (2016), realizaram um estudo em 16 hospitais brasileiros, distribuídos em 5 regiões do país, mostrando que *C. albicans* lidera o ranking, com 34,3% dos casos, em segundo lugar, *C. parapsilosis* (24,1%), após *C. tropicalis* (15,3%) e por último *C. glabrata* (10,2%) corroborando com dados de Nucci et al (2013). Em outros países da América Latina a distribuição dos isolados de *Candida* apresentam-se semelhantes ao Brasil (NUCCI et al., 2013).

Pfaller et al. (2007) estudaram 23 centros médicos nos Estados Unidos da América e 2 no Canadá, com o intuito de avaliar a epidemiologia de pacientes com candidemia no período de 2004 a 2008 e observaram que *C. albicans* é a espécie mais comum, responsável por causar candidemia (42,1%), seguida por *C. glabrata* (26,7%), *C. parapsilosis* (15,9%), *C. tropicalis* (8,7%) e *Candida krusei* (3,4%) (PFALLER et al., 2012).

Uma análise feita em seis nações da Europa mostrou que *C. albicans* é o agente responsável por causar mais da metade dos casos de candidemia, sendo que em regiões como a Suécia e Alemanha essa taxa é bem elevada, encarregada por 67% dos casos, e na Espanha essa porcentagem cai para 43%, enquanto que *C. parapsilosis* apresenta uma alta frequência de 30% dos casos neste país. *C. glabrata* é o segundo agente mais comum, responsável por 14%, tendo com exceção Itália e Espanha. E a espécie de *C. tropicalis* expõe taxas que variam de 2 a 10% (TORTORANO et al., 2006). A incidência pode variar de acordo com a localização geográfica, as taxas de *C. glabrata* são mais elevadas na União Europeia, Ásia e pacífico, entretanto a ocorrência de *C. tropicalis* é maior no Oriente médio e na África,

e *C. parapsilosis* é mais frequente na América do norte e América latina (TURNER, BUTLER, 2014).

Cerca de 50 a 70 % dos casos de candidíase sistêmica são atribuídas a cinco espécies, *C. albicans, C. glabrata, C. parapsilosis, C. tropicalis*, e *C. krusei*, sendo *C. albicans* ainda a espécie mais frequente (50 - 70% dos casos) (PFALLER, DIEKEMA, 2007; DOI et al., 2016); entretanto outras espécies têm emergido no cenário hospitalar, incluindo *Candida guilliermondii*, *Candida lusitaniae*, *Candida kefyr*, *Candida famata*, *Candida inconspicua*, *Candida rugosa*, *Candida dubliniensis* e *Candida norvegensis* (SANGUINETTI, POSTERARO, LASS - FLÖRL, 2015). Outros patógenos emergentes são *Candida haemulonii* e *Candida auris* (PAPPAS et al., 2018; COLOMBO, DE ALMEIDA JÚNIOR, GUINEA, 2017).

O complexo *C. haemulonii*, inclui as espécies: *Candida haemulonni*, *Candida duobushaemulonii* e *Candida haemulonii* var. vulnera. Esse complexo pode causar tanto candidemias quanto infecções superficiais, incluindo candidíase vaginal. Apesar da baixa incidência em casos de candidemia, correspondendo a menos de 0,01% numa pesquisa realizada em sete laboratórios de países da América-latina, resistências aos antifúngicos foram evidenciadas. Para anfotericina B o isolado C. *duobushaemulonii*, apresentou alta tolerância (CIM ≥1 mg/l) indicando resistência intrínseca a esse fármaco. Além disso, já foi reportado que alguns isolados de *C. haemulonii* apresentaram resistência a classe das equinocandinas e foi visto a redução da atividade do fluconazol (COLOMBO, DE ALMEIDA JÚNIOR, GUINEA, 2017).

A outra espécie emergente, *C. auris* foi isolada pela primeira vez em 2009 no Japão, e tem sido isolada nos últimos anos em diferentes países como Japão, Índia, Paquistão, Reino Unido, Espanha, Colômbia, Venezuela, África do Sul, Coreia do Sul, Oman, Kuwait, Israel e Estados Unidos da América (PAPPAS et al., 2018; SEKYERE, 2017). Em 2016, houve um surto mundial em ambientes hospitalares envolvendo *C. auris,* responsável por causar candidíase invasiva. Dos 316 casos confirmados em diferentes países, a taxa de mortalidade chegou a 29,75% (SEKYERE, 2017). Esse agente patogênico está relacionado à elevadas taxas de mortalidade, além de apresentar alto nível de resistência às três classes de agentes antifúngicos de uso corrente para as candidíases: triazólicos, equinocandinas e poliênicos, em vista disso, pode-se afirmar que este cenário de espécies resistentes as classes terapêuticas é

um desafio para a prática clínica (MCCATHY, WALSH, 2017; KU, WALRAVEN, LEE, 2018).

3.2 Tratamento das candidíases

O tratamento das candidíases superficiais e invasivas por *Candida* spp. é baseado na utilização de antifúngicos poliênicos, azólicos (imidazóis e triazóis) e equinocandinas (PAPPAS et al., 2016).

Os agentes poliênicos (anfotericina B e nistatina) foram desenvolvidos na década de 1950; esses agentes possuem amplo espectro de ação contra leveduras e bolores e efeito fungicida, no entanto a grande limitação inclui como efeito colateral notável a nefrotoxicidade (STONE et al., 2016). O mecanismo de ação na célula fúngica dos poliênicos é a complexação com o ergosterol, perturbando a membrana plasmática fúngica resultando no extravasamento do conteúdo citoplasmático levando a morte celular (MORIO et al., 2017). Por esta característica fungicida são raros os relatos de resistência de *Candida* spp. aos agentes poliênicos. Dentre estes, isolados de *C. lusitaniae* e *C. haemulonii* exibem resistência intrínseca à Anfotericina B, assim como em isolados clínicos de outras espécies como *C. albicans e C. tropicalis* em que foram constatadas resistência adquirida (MORIO et al., 2017). Os principais mecanismos de resistência observados ocorrem devido as alterações na via do ergosterol envolvendo mutações no gene ERG2, ERG3, ERG11 e ERG5 (MORIO et al., 2017).

A grande emergência por fármacos azóis de uso oral, cresceu com a pandemia da SIDA (PAPPAS et. al., 2009). Os azóis são ativos contra *Candida* spp., possuindo uma ação fungistática por inibir a enzima C14-alfa lanosterol demetilase, essencial na via de síntese de ergosterol, principal esterol das membranas fúngicas. Esta enzima pertence ao complexo P450 do citocromo fúngico, e em consequência, os agentes azólicos também inibem o complexo P450 do citocromo humano, levando a interações medicamentosas e relevantes efeitos colaterais hepáticos (CHARLIER et al., 2006).

O fluconazol é um agente triazol descoberto por Richardson et al. em pesquisas iniciadas em 1978 pela indústria farmacêutica Pfizer, Inglaterra (CHARLIER et al., 2006). O fluconazol é classificado como agente triazol devido a presença de três átomos nitrogênios na posição 1, 2 e 4 no anel triazol (PAPPAS et. al., 2009). Esse antifúngico é extremamente utilizado em protocolos de profilaxia das candidemias e,

também, no no tratamento das candidíases; é eficaz para o tratamento de grande parte das infecções por *Candida*, porém, algumas espécies demonstram resistência intrínseca a este fármaco, como, *C. krusei*, e além disso, em torno de 50% dos isolados de *C. glabrata* são resistentes ou possuem susceptibilidade dose dependente ao fluconazol (SLAVIN et al., 2004). Além de selecionar isolados de *Candida* não-albicans, que apresentam resistência intrínseca, também tem relatos de resistência adquirida (*C. parapsilosis* e *C. tropicalis*) a este agente (TYCZKOWSKA-SIERON et al., 2014). Outros derivados triazólicos (itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol) evidenciam eficácia antifúngica melhor que o fluconazol contra a maioria das espécies de *Candida*, e principalmente por apresentar efeito inibitório sobre *C. krusei* e *C. glabrata* (PAPPAS et al. 2009).

Xu et al. (2008) identificaram *C. albicans* em 68,6% dos isolados clínicos, dessas foi observado que 5,1% das cepas foram resistentes ao fluconazol. Lockhart et al. (2017) conduziram um estudo com cepas de *C. auris* proveniente de 54 pacientes de países como: Paquistão, Índia, África do Sul e Venezuela, no período de 2012 - 2015. Nesta pesquisa, foi relatado que 93% das cepas isoladas foram resistentes ao fluconazol (PAPPAS et al., 2018; LOCKHART et al., 2017).

Resistência de *Candida* aos agentes azólicos pode surgir devido a uma modificação na enzima alvo, redução do acesso do fármaco ao alvo, ou a combinação desses mecanismos. Mutações pontuais no gene ERG11 (codifica a enzima C14-alfa lanosterol demetilase), leva a alteração da enzima alvo, diminuindo a afinidade pelos azóis. Com a superexpressão do gene ERG11, a célula consegue produzir elevadas concentrações da enzima alvo, ocasionando uma necessidade de altas concentrações intracelular do fármaco para inibir as enzimas presentes na célula. Embora este mecanismo seja mais raro, mutações no gene ERG3 também podem ocorrer e desencadear resistência ao fluconazol e outros azóis, evitando a formação de esteróis tóxicos para célula (PFALLER et al., 2010). Outras modificações podem ocorrer, como a superexpressão de bombas de efluxo (transportadores ABC e MDR), que leva a diminuição da concentração intracelular dos azóis (XU et al., 2015).

A classe antifúngica mais recente é indicada para a terapia de candidíases invasivas e candidemias são as equinocandinas, os fármacos pertencentes a esta classe agem de forma fungicida contra leveduras (*Candida* spp.) e são fungistáticos para os fungos filamentosos (*Aspergillus* spp.), inibindo o crescimento das hifas. As

equinocandinas são constituídas de lipopeptídeos semissintéticos que inibem a síntese de um importante componente da parede celular fúngica, 1,3-β-D-glucose, pela inibição da 1,3 β-D glucana sintetase, resultando na morte celular de Candida spp. Estes fármacos são administrados somente por via endovenosa e possuem a vantagem de não possuir resistência cruzada com outros antifúngicos; por outro lado podem causar efeitos danosos ao sistema gastrointestinal e são quimicamente instáveis (JABRA-RIZK, FALKLER, MEILLER, 2004; LEWIS, 2011). Cada medicamento dessa classe (caspofungina, anidulafungina e micafungina) mostraram ser efetivos em aproximadamente 70 - 75 % dos casos (PAPPAS et al., 2018). A taxa de resistência às equinocandinas é baixa (< 3%) para C. albicans e a maioria das espécies de Candida não-albicans, porém para C. glabrata o cenário é diferente e a porcentagem de cepas resistentes é bem superior. Amostras analisadas no período de 2006 - 2010, pelo Programa Vigilância Antimicrobiana SENTRY, foi reportado que 8,0 - 9,3% dos isolados de C. glabrata verificadas foram resistentes as equinocandinas. Outro fator observado é que 36% das cepas de C. glabrata resistentes a essa classe terapêutica também apresentaram resistência ao fluconazol (PERLIN, 2015). Da mesma forma cerca de 7% das cepas de C. auris mostram-se resistentes às equinocandinas (PAPPAS et al., 2018). Mutações no gene FSK2 em duas regiões conservadas, hotspot (HS1 e HS2), em C. glabrata, indicam resistência às equinocandinas (PERLIN, 2015; PAPPAS et al., 2018).

3.2.1 Tratamento da candidíase vaginal

O tratamento da CVV pode ser diferenciado da terapia aplicada na CVVR. Para tratar CVV as formulações usadas com maior frequência são os agentes azólicos intravaginais, geralmente, a duração do tratamento é de curto prazo (DOVNIK et al. 2015). Para a terapia de CVV os antifúngicos considerados de primeira escolha são os imidazólicos (clotrimazol e miconazol) em formulações tópicas por aproximadamente 7 dias (SHARON et al., 2018). Quando ocorre falhas terapêuticas na administração desses agentes micóticos de uso local uma alternativa são os antifúngicos de uso oral, como fluconazol 150 mg em dose única (DOVNIK et al. 2015; SHARON et al., 2018). Porém, em casos de mulheres que estão amamentando, essas opções são delimitadas devido que, esses medicamentos são secretados no leite materno (LOPEZ, 2015). Ademais, o fluconazol apresenta diversas interações

medicamentosas, e seu uso deve ser evitado em terapias com antiácidos, anticonvulsivantes hipoglicemiantes, anticoagulantes, е por exemplo (FEUERSCHUETTE et al., 2010). Em relação a eficácia dos azóis de uso oral (fluconazol e itraconazol) comparados com os de uso intravaginal (clotrimazol, miconazol e econazol), ambos possuem a mesma eficácia (LOPEZ, 2015). Na prática clínica, o uso do miconazol é indicado a 2% em creme vaginal ou em supositórios contendo 100 mg do fármaco, a posologia indicada é por 7 dias, uso intravaginal, à noite ou pode ser empregado na dose de 200 mg com o tratamento feito por 3 dias. Apesar de ser eficiente nos casos de CVV, este agente apresenta alguns efeitos adversos tais como: ardência no local, comichão, irritação vaginal, febre e mau odor. Além disso, a falha terapêutica por conta do abandonamento do tratamento é comum devido essas reações adversas, assim, a reinfecção é uma realidade (SALAH, AWAD, MAKHLOUF, 2018; BARNHAR, 2005);

C. albicans é o isolado mais frequente em quadros de candidíase vaginal, resultando em 90% dos casos, porém, outras espécies como: C. glabrata, C. tropicalis, C. krusei e C. parapsilosis também são causadoras de CVV. Entretanto, essas espécies de Candida não -albicans mostraram susceptibilidade diferenciada aos antifúngicos, além de que, algumas espécies apresentarem resistência aos azólicos (MTIBAA et al., 2017). Nesses casos, o tratamento com azólicos pode ser prolongado e intensivo, com o uso de fármacos de uso oral e/ou de uso tópico. Além disso, diferentes agentes antifúngicos podem ser empregados, como ácido bórico 600 mg/dia intravaginalmente, durante 14 dias. (PALMEIRA-DE-OLIVEIRA R, PALMEIRA-DE-OLIVEIRA A, MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, 2015; FEUERSCHUETTE et al., 2010).

Para o tratamento de casos mais graves de CVVR, a terapêutica é realizada com fluconazol 150 mg, uso oral, a dose é administrada a cada 72 horas por três vezes, ou pode-se usar um agente azólico de uso intravaginal, nesse caso o tratamento varia de 7 a 14 dias (DOVNIK et al., 2015; FEUERSCHUETTE et al., 2010). Após o tratamento inicial, pode ser feito tratamento de manutenção, administrando o fluconazol 150 mg/por semana ou clotrimazol intravaginal uma ou duas vezes por semana (FEUERSCHUETTE et al., 2010). Porém, em casos de espécies de *C. glabrata* e/ou *Candida* não-*albicans* resistentes aos azólicos, o tratamento pode ser feito com ácido bórico durante 14 dias, podendo obter sucesso terapêutico de 65 - 70% dos casos, em situações de falhas, é indicado o uso da

nistatina 100.000 UI, via vaginal, por 90 a 180 dias, diariamente (FEUERSCHUETTE et al., 2010). A nistatina é um agente poliênico, indicado no tratamento de infecção por Candida spp. É um fármaco de uso tópico, apresenta um amplo espectro de ação e age interferindo na membrana fúngica, a desvantagem é que as aplicações são frequentes e por longos períodos de administração (MARTÍN-VILLENA et al., 2012). Entretanto, em outras situações, quando há falhas nos tratamentos envolvendo agentes azólicos em espécies de Candida não-albicans, outra alternativa é o uso de anfotericina B (FEUERSCHUETTE et al., 2010). Phillips, 2009 avaliou a ação de supositórios contendo anfotericina B no tratamento de Candida não -albicans em pacientes que não tiveram sucesso na terapia convencional. Nesse estudo, 32 pacientes foram identificadas com Candida não-albicans e tratadas com a terapia de uso padrão. Dessas, 10 mulheres não obtiveram sucesso no tratamento. Sendo assim, foi testada a anfotericina B (50 mg) de uso intravaginal, por 14 dias dose diária a noite. Foi observado que a anfotericina B foi eficaz em 70% dessas pacientes, além disso, a anfotericina B mostrou mínimos efeitos adversos, apresentando-se como uma medicação segura por essa via (PHILLIPS, 2009).

De modo geral, os antifúngicos convencionais descritos aqui são fármacos que possuem um espectro de ação limitado, são altamente tóxicos para o hospedeiro, possuem baixa estabilidade química, financeiramente não são acessíveis, são disponíveis poucas opções medicamentosas de uso oral, além de haver problemas de resistência aos antifúngicos (WIDMER et al., 2006; PAPPAS et al., 2015). Dessa forma, faz-se necessário a busca de novas alternativas aos antifúngicos de uso corrente no tratamento das infecções fúngicas.

3.3 Novas alternativas

A miltefosina (MFS), conhecida como hexadecilfosfocolina, foi inicialmente desenvolvida com o intuito de tratar pacientes com câncer, porém, também foi verificado que este fármaco possui atividade contra leishmaniose (DORLO et al., 2012). Com a sua excelente atividade anticancerígena e antiprotozoária, a MFS foi manipulada em uma formulação tópica para o tratamento de metástases cutâneas em pacientes com câncer de mama e formulação oral para leishmanioses (DORLO et al., 2012). Outros trabalhos também têm mostrado outras atividades farmacológicas da

MFS como antibacteriana, antiviral e antifúngica (revisado por DORLO et al., 2012). Os estudos mostram que MFS possui um amplo espectro de ação contra diversos fungos, em concentrações entre 2 e 8 μg/mL, age nos seguintes patógenos: *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Aspegillus* spp., *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Sporothrix* spp; *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides posadasii* e *Paracoccidioides* spp. e dermatófitos (revisado por DORLO et al., 2012; IMBERT et al., 2014; BRILHANTE et al., 2015; BORBA-SANTOS et al., 2015; ROSSI et al., 2017; SPADARI et al., 2018).

Vila et al. (2013, 2015) apontam que a MFS é ativa contra biofilme de *C. albicans* em modelos *in vitro* sobre a superfícies de cateteres venoso central e sobre unhas. Além disso, a MFS também apresentou atividade antibiofilme sobre espécies de *Candida* não-*albicans* (VILA et al., 2016). Em modelo murino a MFS tem demonstrado atividade inibitória em modelo de criptococose disseminada causada por *Cryptococcus neoformans* em doses efetivas de 7,2 e 3,6 mg/kg/dia, mostrando aumento da sobrevida e redução da carga fúngica no cérebro e nos pulmões dos animais quando comparado com grupo controle infectado não tratado (WIDMER et al., 2006). Vila et al. (2015) mostraram que um pré-tratamento (24 horas antes da infecção) com uma suspensão de MFS de 2 mg/mL conseguiu prevenir o quadro de candidíase oral por *C. albicans* em camundongos (VILA et al., 2015).

Os mecanismos de ação da MFS em fungos ainda são desconhecidos, mas sabe-se que em *C. neoformans* a MFS inibe a fosfolipase B1, que é um importante fator de virulência desta levedura. Pesquisas realizadas com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, mostraram que a MFS penetra na membrana interna mitocondrial e desequilibra o potencial de membrana celular, o que causa inibição do citocromo oxidase C e apoptose celular (ZUO et al., 2011). Em 2014, Biswas et al. demonstraram que o efeito fungicida em *S. cerevisiae* é causado pela quebra do potencial de membrana mitocondrial e morte celular por apoptose via subunidade Cox9p do citocromo oxidase c (COX). Além disso, Borba-Santos et al. (2015) e Brilhante et al. (2015) observaram alteração na morfologia e permeabilidade de membrana plasmática de fungos dimórficos (*S. brasiliensis*, *H. capsulatum* e *C. posadasii*); e presença de grânulos de melanina em leveduras de *S. brasiliensis* e *Paraccoccioides* spp. tratadas com MFS, sugerindo que esteja interferindo no metabolismo da melanina (BORBA-SANTOS et al., 2015; ROSSI et al., 2017).

Recentemente nosso grupo de pesquisa avaliou a ação da MFS em leveduras de *C. neoformans* e *C. gattii* e foi observando que a MFS aumenta a permeabilidade de membrana no plasma interagindo diretamente com o ergosterol além de reduzir o potencial de membrana mitocondrial, aumentando a produção de ROS e causando a fragmentação e condensação do DNA levando a morte celular por apoptose (SPADARI et al., 2018).

Embora a MFS seja um fármaco indicado para o tratamento de câncer de mama, leishmanioses e tenha apresentado atividade fungicida e amplo espectro de ação contra os fungos de interesse médico; esse fármaco apresenta elevada toxicidade, o que pode dificultar a sua utilização no tratamento das infecções fúngicas disseminadas e que requerem períodos prolongados de terapia. Os principais efeitos colaterais são os gastrointestinais (náuseas, vômito, diarreia); que estão relacionados com a administração oral da MFS e das propriedades detergente desse fármaco que afetam a mucosa gastrointestinal; danos renais e hepáticos também são reportados, como alteração de níveis séricos de creatinina e de ambas enzimas hepáticas como alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Adicionalmente, observa-se efeito teratogênico e elevada atividade hemolítica (similar a anfotericina B deoxicolato) (revisado por DORLO et al., 2012).

Com intuito de reduzir os efeitos colaterais da MFS algumas estratégias têm sido aplicadas como a síntese de análogos da MFS (CALOGEROPOULOU et al., 2008) e a incorporação da MFS em sistemas carreadores nanoparticulados baseadas em lipídeos (BITTERCOURT et al., 2016; EISSA et al., 2015) e em polímero sintético PLGA–PEG (KUMAR et al., 2016).

3.3.1 Sistemas de liberação de fármacos

3.3.1.1 *Alginato*

Os polímeros em formulações nanoestruturadas tem sido utilizado como uma ótima opção para controlar a liberação dos fármacos para o organismo, aprimora a distribuição de fármacos, oferecendo muitos benefícios tais como, uma distribuição contínua para os tecidos, ação em um sítio específico e, principalmente, redução de efeitos colaterais. Além disso, os fármacos são preservados e quando encapsulados

são estáveis e protegidas contra a ação de algumas enzimas e efeito do pH quando administradas por via oral (JIAO et al., 2002).

O alginato é um polímero aniônico, constituído por resíduos de α- L-gulurônico (G) e ácido β-D-manurônico (M), é linearmente ligado por ligações 1,4-glicosídicas. Este polímero é produzido por algas e bactérias, a composição e a sequência dos resíduos M e G dependem da fonte utilizada, pois isto pode influenciar as propriedades do alginato. Atualmente o alginato está sendo utilizado em várias aplicações biomédicas pois possui muitas vantagens pelo fato de não ser tóxico, biodegradável, biocompatível, possui baixo custo, é mucoadesivo e não apresenta imunogenicidade (CHENG et al., 2012; PAQUES et al., 2014).

O alginato forma estruturas tridimensionais quando entra em contato com cátions divalentes, esse mecanismo de geleificação é explicado pelo modelo "eggbox", isso ocorre quando um cátion divalente interage com 4 grupos de carboxilas formando uma estrutura tridimensional e assim fármacos podem ser incorporados dentro desta estrutura podendo ser da escala micro- ou nanométrica (SOSNIK et al., 2014). As nanopartículas possuem diâmetros que variam de 10 - 1000 nm, possuindo a capacidade de envolver fármacos, enzimas e outros componentes (PAQUES et al., 2014; SPADARI, LOPES, ISHIDA, 2017).

Alguns antifúngicos convencionais das classes poliênicos e azólicos têm sido incorporados nos últimos anos em sistemas nanocarreadores a base de alginato com objetivos de aumentar a eficácia antifúngica, melhorar a biodisponibilidade, reduzir dose e posologia, diminuir os efeitos colaterais, além de permitir o desenvolvimento de compostos com a forma farmacêutica por via oral (revisado por SPADARI et al., 2017).

Adicionalmente, outras moléculas com potencial antifúngico têm sido incorporadas em polímeros de alginato. Um exemplo desse sistema de encapsulamento é o óleo de açafrão, proveniente do rizoma da *Curcuma longa*. Lertsutthiwong et al. (2008) encapsularam o óleo do açafrão em sistema de alginato mantendo as suas propriedades antifúngica, antibacteriana, antioxidativa e antimutagênica. Além disso, Lertsutthiwong e Rojsitthisak (2011) produziram nanocápsulas de alginato e quitosana contendo o óleo de açafrão. Essa combinação ampliou a permeabilidade do óleo na pele, sendo superior a uma outra solução

etanólica englobando o óleo. Esse estudo foi muito importante para demonstrar que o alginato é um biopolímero eficaz para a encapsulação de óleos essenciais, assim como apresenta a capacidade de manter a estabilidade física desse nanocarreador quando estocadas a 4º C.

3.3.1.2 Microemulsão

As microemulsões (ME) são sistemas opticamente transparentes, possuem uma estabilidade termodinâmica, são estáveis, de fácil manipulação, compostas de líquidos imiscíveis (água e óleo), tensoativos e/ou co-tensoativos que são incluídos no preparo com o objetivo de reduzir a tensão interfacial, esta deve estar próxima a zero. Geralmente de 3 a 5 compostos são usados para a manipulação das ME. Esses sistemas, são formados por agregados esféricos, com diâmetros de 100 a 1400 °A. Gotículas compõem o interior das ME, essas possuem um tamanho bem pequeno, formando-se espontaneamente (FORMARIZ et al., 2005). Em certas situações, pode ocorrer o aumento do volume da fase interna da cadeia apolar dos tensoativos, por conta da absorção de água, levando a modificação da estrutura interna das ME, formando fases hexagonais (FORMARIZ et al., 2005; SANTOS, 2017). A fase hexagonal, é caracterizada por cilindros micelares disposto como hexágono. Quando ocorre a fase hexagonal reversa, permite-se que fármacos sejam incorporados dentro do sistema das ME, obtendo uma liberação controlada da substância incorporada. Outro aspecto relevante é que sistemas apresentados em fase hexagonal possuem lipídios na composição como a monoleína (MO) (PHELPS, BENTLEY, LOPES, 2011).

Lopes et al (2006), prepararam um sistema líquido cristalino de forma hexagonal reversa, contendo monoleína e ácido oleico, para aumentar a penetração da ciclosporina A na pele sem causar irritação. Nesse estudo os autores observaram que a ciclosporina A penetrou na pele e que não houve alterações histopatológicas dos animais tratados com essa formulação, demonstrando que a fase hexagonal promove a liberação controlada da ciclosporina A sem causar irritação cutânea (LOPES et al., 2006). Em outro estudo, Lopes et al (2007) avaliaram *in vitro* a penetração cutânea da vitamina K numa formulação lipídica de fase hexagonal contendo monoleína e visualizaram que a eficácia de vitamina K foi melhorada usando esse sistema (LOPES et al., 2007).

A via de administração intravaginal possui uma série de vantagens quando comparada a via oral no tratamento de infecções vaginais. Alguns dos exemplos são: exclui o contato gastrointestinal e o efeito de primeira passagem no fígado, são aplicadas topicamente interagindo com o sítio específico, além de que, o medicamento pode conter altas doses do princípio ativo sem causar toxicidade (LEYVA-GÓMEZ et al., 2018; BACHHAV; PATRAVALE, 2009). As formas farmacêuticas usadas nessa via incluem: géis, cremes, óvulos, cápsulas, tabletes entre outras. Apesar dessa variedade, a maior desvantagem é o fato da liberação do fármaco não ser prolongada (LEYVA-GÓMEZ et al., 2018; BACHHAV; PATRAVALE, 2009). Em vista disso, as microemulsões podem ser uma boa alternativa para contornar esse empecilho, com o uso desse sistema pode-se incorporar fármacos tanto hidrofílicos quanto lipofílicos, aumentar a solubilidade dos fármacos incorporados, reduzir a dose administrada, além de, promover a liberação controlada (FORMARIZ et al., 2005; DALMORA et al, 2001).

3.4 Modelo de invertebrado

Distintos modelos de roedores foram desenvolvidos para reproduzir diferentes formas clínicas de candidíase e modelos murinos são considerados padrão ouro para estudar patogênese e analisar a eficácia do tratamento antifúngico (AMORIM-VAZ et al., 2015). No entanto, considerações econômicas, logísticas, e éticas podem limitar o uso de mamíferos em experimentos de infecção (AMORIM-VAZ et al., 2015).

Como uma abordagem alternativa modelos de invertebrados vêm sendo padronizados e utilizados nesses estudos, dentre eles a fase larvária do inseto *Galleria mellonella* (AMORIM-VAZ et al., 2015). Este inseto pertence a ordem *Lepidoptera*, família *Pyralidae* e quando comparado ao modelo experimental tradicional de mamíferos, como aos de roedores, *G. mellonella* é de fácil manuseio, baixo custo e não necessita de equipamentos especiais no laboratório para a manutenção (TSAI; LOH; PROFT, 2016). É um modelo considerado ético, econômico e de fácil manutenção e manipulação. É utilizado como ferramenta em triagem nos estudos de antifúngicos, tendo com o intuito reduzir custos, minimizar a utilização de modelo de mamíferos e, sobretudo, transferir os resultados obtidos neste modelo de

invertebrado para o modelo mamíferos, resultados tais como virulência, patogenicidade, toxicidade do fármaco e dosagem efetiva (AMORIM-VAZ et al., 2015).

Este modelo larvário tem sido muito utilizado nos estudos de virulência de micro-organismos como bactérias e fungos (CHAMPION; WAGLEY; TITIBALL, 2016). A resposta imunológica inata desta larva é dividida entre a resposta celular e humoral. A resposta celular ocorre por células fagocíticas, designadas hemócitos. A função desta célula não está associada somente ao processo de fagocitose, mas, também, na encapsulação e coagulação da partícula. A encapsulação é uma resposta imunológica contra uma variedade de micro-organismos (bactérias, fungos e protozoários) e, também, nematóides (MESA-ARANGO et al., 2013; GAGO et al., 2014; TSAI; LOH; PROFT, 2016). A resposta humoral é harmonizada por moléculas efetoras solúveis, que imobilizam ou matam o patógeno e isto inclui peptídeos antimicrobianos presentes na hemolinfa e produção de melanina (TSAI; LOH; PROFT, 2016). A melanização é uma resposta que ocorre devido a presença de agentes invasores, e pode ser manifestada com a síntese e deposição da melanina com o intuito de encapsular patógenos na região da ferida, ocorrendo em seguida a coagulação da hemolinfa e opsonização. O processo de melanização é ativado pela catalização da fenoloxidase, no qual é produzida pela inativação da pro-fenoloxidase nos hemócitos, sendo uma importante proteína da imunidade inata, devido ao seu envolvimento na defesa celular e humoral (TSAI; LOH; PROFT, 2016).

Estudos têm mostrado similaridade entre o modelo de *G. mellonella* e de murinos no processo de patogênese por *Candida* spp. (BRENNAN et al., 2002) sugerindo que o modelo murino possa ser substituído pelo modelo de *G. mellonella* para avaliação da virulência (AMORIM-VAZ et al., 2015); e por essa razão trabalhos mostrando eficácia de antifúngicos e novos compostos tem sido realizado. Li et al. (2013) demonstram que, fluconazol, anfotericina B e 5-flucitosina apresentam eficácia antifúngica; e, o efeito sinérgico entre a anfotericina B e a 5-flucitosina em modelo de infecção com *G. mellonella* infectada por *C. albicans*. Os resultados indicam que este modelo de invertebrado é de confiança para a avaliação dos agentes antifúngicos, e é considerado seguro possibilitando realizar triagem de novas moléculas em com ação antifúngica (LI et al., 2013).

Tendo em vista a grande necessidade de ter no mercado alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções fúngicas, novas moléculas bem como os

fármacos antifúngicos associados a nanocarreadores podem ser opções para melhorar características de farmacodinâmica, farmacocinética, e redução de efeito colateral.

Dentro deste contexto, nosso grupo de pesquisa tem trabalhado no desenvolvimento de uma formulação da MFS carreado em sistema nanoestruturado de alginato com o principal objetivo de reduzir a toxicidade deste fármaco e manter a eficácia antifúngica em modelos de estudos *in vitro* e *in vivo*. O presente projeto visa avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de análogos da miltefosina e da miltefosina incorporada em nanopartículas de alginato sobre diferentes isolados clínicos *Candida* spp., e avaliar a toxicidade e a eficácia desta formulação em modelos de candidíases em animal invertebrado (larvas de *G. mellonella*). Adicionalmente, avaliar as nanopartículas de alginato e microemulsões como sistemas de liberação para os antifúngicos miltefosina e anfotericina B em modelo murino de candidíase vaginal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos

Isolados clínicos "IAL" e cepas padrão ATCC de Candida spp. [Candida albicans (SC5314 e IAL-40), Candida parapsilosis (ATCC 22019 e IAL-17), Candida tropicalis (ATCC 200956 e IAL-01), Candida glabrata (ATCC 2001 e IAL-23) e Candida krusei (ATCC 6258 e IAL-30)] foram utilizadas na avaliação da atividade antifúngica in vitro e in vivo da miltefosina e de seus análogos bem como das formulações. As cepas "ATCC" foram cedidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Segurança (INCQS, Fiocruz, Rio de Janeiro/RJ, Brasil) e a os isolados clínicos "IAL" foram gentilmente cedidos pela Dra. Márcia de Souza Carvalho Melhem (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo/SP, Brasil).

As leveduras foram estocadas em caldo BHI com 20% de glicerol em *freezer* a - 80°C e recuperadas em meio Sabouraud dextrose. Durante os ensaios, as amostras foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose (SDA, Difco) a 4°C e subcultivadas no mesmo meio pelo menos 2 vezes a 35°C por 24 - 48 h para obtenção de um ótimo crescimento fúngico.

4.2 Compostos

Miltefosina (MFS, Cayman Chemical Company, Figura 1A) foi utilizada nos testes *in vitro* e *in vivo*; Nistatina (NIS), Anfotericina B desoxicolato (AMB) e Fluconazol (FLZ) (Sigma Aldrich Co., MO, USA) foram utilizados nos testes com antifúngicos padrões. A MFS e FLZ foram diluídos em água destilada estéril e a AMB e NIS em dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo soluções estoque 100 x concentrado; todos foram estocados a -20°C para serem utilizados nos ensaios.

Os análogos sintéticos da MFS foram cedidos pelo Prof. Dr. Amando Ito do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (USP, Ribeirão Preto/SP) e avaliados quanto a atividade antifúngica *in vitro*: **Composto 1** [MT 11C BDP ou 11-(4,4-Difluoro-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-2-il) *n* undecilfosfatidilcolina)], **Composto 2** [MT 6Et BDP ou 11-(4',4'-Difluoro-6'-ethyl-1',3',5',7'-tetramethyl-4'-bora-3'a,4'a-diaza-s-indacen-2'-yl)-undecylphosphocholine] e **Composto 4** (MT PTRI ou miltefosina-5c-feniltrienino) (Figuras 1B-D). Os três compostos foram estocados em DMSO a -20 °C.

Figura 1 - Estrutura química da miltefosina e seus análogos sintéticos.

Α

Figura A) Estrutura química da miltefosina; **Figura B)** Estrutura química do Composto 1: [MT 11C BDP ou 11-(4,4-Difluoro-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-2-il) *n*-undecilfosfatidilcolina)]; **Figura C)** Estrutura química do Composto 2: [MT 6Et BDP ou 11-(4',4'-Difluoro-6'-ethyl-1',3',5',7'-tetramethyl-4'-bora-3'a,4'a-diaza-s-indacen-2'-yl) -undecylphosphocholine]; **Figura D)** Estrutura química do Composto 4: (MT PTRI ou miltefosina-5c-feniltrienino).

4.3 Produção das formulações

4.3.1 Produção da miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS.Alg)

As nanopartículas de alginato foram preparadas pelo método de emulsificação/gelificação externa, no qual foi misturado alginato de sódio 1% (m/v) com tensoativo SPAN 80 a 3% (m/v) em óleo de girassol. Esta mistura foi homogeneizada e sonicada por 10 min. Em seguida, solução de CaCl₂ 0,2 mM foi gotejada com 0,5% de Polaxamer sobre a emulsão sob agitação constante. Em seguida, a amostra foi sonicada por 5 min, agitada e centrifugada; o sobrenadante foi descartado e a amostra ressuspendida em trealose 10% para liofilização. A incorporação da MFS (3 mg) foi realizada pela adição do fármaco na suspensão de alginato. As nanopartículas de alginato com e sem a MFS (MFS.Alg e Nano.Alg, respectivamente) foram liofilizadas e o pó armazenado a -20 °C (Depósito da Patente no INPI sob no. BR 10 2017 018011 5, data: 23/08/2017).

Como controle de qualidade da produção da MFS incorporada em nanopartículas de alginato (MFS.Alg), parâmetros como o diâmetro médio (Dz), distribuição de tamanhos ou polidispersão (Pdi) e potencial zeta (ζ) foram monitoradas pela técnica de espectroscopia de correlação de fótons no equipamento ZetaPals-Zeta Potential Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY), equipado com um laser de 677 nm e *dynamic light-scattering* (DLS) a 90°.

Para os ensaios *in vitro* e em modelo de *G. mellonella*, MFS.Alg ou Nano.Alg liofilizados foram ressuspendidos em PBS estéril até atingir a concentração de trabalho da MFS no momento dos experimentos. Para os ensaios em modelo murino de candidíase vaginal, MFS.Alg (2% de MFS) foi incorporado em gel de alginato a 1%.

4.3.2 Produção de miltefosina e anfotericina B em creme (CR) e em microemulsões (ME)

A anfotericina B 1,25% (AMB-CR) e miltefosina 2% (MFS-CR) foram incorporadas em creme vaginal (formulação convencional), contendo os seguintes componentes: 10% de cera Polawax (Auto-emulsionante não-iônico), 2% de óleo

mineral, 5% de propilenoglicol, 84% de água destilada e pH 4,5 (FREITAS et al., 2018).

As microemulsões foram preparadas misturando os seguintes componentes: propilenoglicol (20%), fosfatidilcolina (24,8%), tricaprilina (5,6%) e monoleína (49,6%), deixados em banho-Maria a 37 °C para a completa dissolução; seguido pela adição da Anfotericina B a 1,25% (AMB-ME) ou Miltefosina a 2% (MFS-ME).

Foi feita a caracterização morfológica da microemulsão por microscopia de luz polarizada. É importante ressaltar que as microemulsões apresentam-se em um sistema monofásico e opticamente transparentes com uma viscosidade semelhante a um gel. Para isso foram preparadas alíquotas contendo 100 mg da microemulsão (0% de água) sem fármaco em microtubos, posteriormente foram adicionados 100 µL de água destilada e incubados em banho-Maria a 37 °C; e nos tempos de 1, 2, 3, 4, 6, 24 e 48 horas a água em excesso foi retirada e uma pequena amostra da microemulsão foi recolhida para ser visualizada no microscópio de luz polarizada no aumento de 400x (Leica DMC 2900, São Paulo). Além disso, também foi feito o teste de intumescimento das microemulsões com 0% e 10% de água, em que alíquotas de 100 mg da microemulsão foram distribuídas em microtubos e, posteriormente, foram adicionados 500 µL de água destilada em cada tubo e incubado em banho-Maria a 37 °C. Nos tempos de 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24, 30 e 48 horas; o sobrenadante (água excedente) foi descartado e a pesagem dos tubos com a microemulsão foi feita para determinar a massa de água destilada (em mg) absorvida pelo sistema.

Ambas as formulações em creme e em microemulsões foram utilizadas no tratamento de candidíase vaginal em modelo murino.

4.4 Determinação da atividade antifúngica *in vitro* da miltefosina em nanopartículas de alginato e análogos sintéticos sobre *Candida* spp.

A concentração inibitória mínima foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo, descrita no documento M27-A3 e M27-S4 (CLSI, 2008 e CLSI, 2012, respectivamente). Alíquota de 100 µL de meio RPMI 1640 tamponado com MOPS 0,16 M, foi distribuída em cada poço da microplaca de 96 poços e, posteriormente, diluições seriadas dos compostos foram realizadas a fim de obter concentrações finais

de 0,03 a 16 μg/mL para MFS, AMB, NIS e Compostos 1, 2 e 4; 0,25 a 128 μg/mL para FLZ; e 1,17 a 600 μg/mL para MFS em nanopartículas de alginato (MFS.Alg). Posteriormente, um volume de 100 μL de uma suspensão de leveduras de *Candida* spp. (1-5 x 10³ UFC/mL) foi dispensado em cada poço e as microplacas incubadas a 35 °C por 48 h.

A concentração inibitória mínima (CIM) de cada antifúngico sobre *Candida* spp. foi definida como menor concentração da droga capaz de inibir 90% (para AMB, NIS, MFS e seus análogos; Cl₉₀) e 50% do crescimento fúngico (para FLZ; Cl₅₀) após a leitura no espectrofotômetro a 492 nm (Epoch microplaca reader, Biotek). Subsequente, uma alíquota de 10 μL de cada concentração que foi capaz de inibir o crescimento fúngico foi cultivada em ágar Sabouraud dextrose livre de fármaco por 48 h a 35 °C para determinar a concentração fungicida mínima (CFM). Segundo PFALLER et al. (2004), um antifúngico apresenta atividade fungicida se o seu CFM for igual ou 4x maior que a CIM, se o CFM constar maior do que 4x CIM o efeito antifúngico é considerado como fungistático.

4.5 Determinação do efeito do ergosterol exógeno na Concentração Inibitória Mínima (CIM) da miltefosina e do composto 1

Durante o ensaio de determinação da CIM (CLSI, 2008) foi realizado um ensaio de competição utilizando ergosterol exógeno em diferentes concentrações (50, 100 e 200 µg/mL) (MENDES DE TOLEDO et al., 2015). Para o monitoramento, a CIM das respectivos compostos foram analisadas na ausência do ergosterol. A CIM foi determinada após 48 horas de incubação a 35°C para *C. albicans* SC5314.

4.6 Efeito da miltefosina e do composto 1 na permeabilidade da membrana e na viabilidade celular

Suspensão fúngica de *C. albicans* SC5314 padronizada a 1 x 10⁷ UFC/mL foram expostas às concentrações de 1x CIM, 2x CIM e 4x CIM de MFS, AMB e composto 1, diluídas em PBS e incubadas à 35°C. Leveduras não tratadas foram utilizadas como controle de integridade da membrana celular. Após os períodos de 1, 4, 8 e 24 horas de incubação, as leveduras foram coletadas por centrifugação a 13.000

g por 8 minutos e o sobrenadante analisado no espectrofotômetro (Nanodrop 200, Thermo scientific) para quantificação do DNA (260 nm) e de proteínas (280 nm) (modificado de Aguiar Cordeiro et al., 2014). Paralelamente, as amostras foram diluídas serialmente 1:10 e plaqueadas em ágar Sabouraud dextrose, incubadas por 48 horas à 35°C, para a contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL).

4.7 Efeito do composto 1 sobre a morfologia de C. albicans SC5314

Os análogos da MFS, estudados aqui, são moléculas fluorescentes pois na síntese foi acoplado o fluorocromo BODIPY. Dessa forma, *C. albicans* SC5314 a 1 x 10⁷ UFC/mL tratadas com diferentes concentrações do composto 1 (1xCIM, 2xCIM e 4xCIM) por 24 horas a 35°C foram observadas no Microscópio de Fluorescência (EVOS) para observar os efeitos morfológicos de *C. albicans*.

4.8 Modelo experimental de Galleria mellonella

4.8.1 Criação e manutenção de Galleria mellonella

Para implantar o processo de criação do inseto *G. mellonella* no Laboratório de Quimioterapia Antifúngica (Departamento de Microbiologia, USP), as mariposas foram doadas pelo Prof. Dr. Carlos Peleschi Taborda (Departamento de Microbiologia, USP). As mariposas foram incubadas dentro de recipiente plástico com papel filtro em uma câmara incubadora a 30°C. Todos os dias, durante a fase do acasalamento foi realizada a troca do papel filtro, com o objetivo de recolher os ovos depositados e efetuar a limpeza do ambiente retirando as mariposas mortas. Os papéis filtro com os ovos depositados foram transferidos para outro recipiente contendo pólen e cera de abelha. Diariamente foi inspecionado o crescimento das lagartas até atingir o peso e o tamanho ideal para os experimentos. Durante este período, os recipientes foram trocados, pólen e cera repostos, os resíduos (fezes) removidos, e com o auxílio de uma pinça, a seda formada e os casulos mais finos foram retirados dos recipientes de cultivo das lagartas. Durante esse processo, foi estimado o tempo de cada etapa do ciclo do invertebrado *G. mellonella* e as melhores condições de cultivo.

4.8.2 Avaliação da virulência de isolados de Candida spp. em modelo de Galleria mellonella

Leveduras previamente cultivadas em caldo Sabouraud dextrose foram lavadas em PBS e o inóculo foi ajustado para a concentração de 5x10⁷ UFC/mL de PBS. As lagartas de *G. mellonella* no último estágio larval (2,0 cm a 2,5 cm de comprimento e peso corporal de 150 mg a 200 mg) foram submetidas a assepsia com álcool 70° GL antes da infecção. Foram inoculados 10 μL da suspensão do inóculo fúngico (5x10⁵ UFC/larva), na última *pro-leg* das lagartas, com o auxílio de seringas Hamilton. Em lagartas do grupo controle foi injetado 10 μL de PBS estéril. As lagartas foram mantidas em placas de Petri de poliestireno descartáveis 140 x 15mm, contendo pólen e cera de abelha e incubadas a 37 °C. Todos os grupos de *G. mellonella* (n = 18 larvas/grupo) foram monitorados a cada 24 horas após a inoculação durante 5 dias. Após a contagem de sobreviventes obtidos em cada dia, uma curva de sobrevida foi construída e os dados analisados estatisticamente.

4.8.3 Toxicidade da miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS.Alg) em larvas de Galleria mellonella

Foram utilizadas lagartas *G. mellonella* no final do estágio do desenvolvimento larval (2,0 cm a 2,5 cm de comprimento e 150 mg a 200mg de peso corporal). A toxicidade da AMB, MFS e MFS.Alg em diferentes doses foram avaliadas injetando 10 µL dos antifúngicos na última *pro-leg* das lagartas com o auxílio de seringas Hamilton (FRENKEL et al., 2016). Lagartas que receberam nanopartículas de alginato (Nano.Alg) e PBS (ambos veículos) foram incluídas no ensaio como grupos controles (n = 18 larvas/grupo). As larvas foram incubadas a 37°C e observadas diariamente por 5 dias para a construção da curva de sobrevida. Os experimentos foram repetidos em 3 momentos distintos.

4.8.4 Avaliação da eficácia antifúngica da miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS.Alg) em modelo de candidíase em larvas de Galleria mellonella

Larvas no final do estágio do desenvolvimento larval (2,0 cm a 2,5 cm de comprimento e 150 mg a 200 mg de peso corporal) foram infectadas com *Candida albicans* SC 5314 ou *Candida albicans* IAL-40, previamente cultivados em caldo Sabouraud dextrose por 24 h a 35 °C, aplicando 10 μL da suspensão fúngica em PBS (5x10⁵ UFC/larva) na última *pro-leg* das lagartas com o auxílio de seringas Hamilton

(FRENKEL et al., 2016). Após 30 minutos da infecção foi iniciado o tratamento com a administração de 10 μL de AMB, MFS e MFS.Alg em diferentes doses, incubadas a 37°C por 5 dias. Grupos tratados com Nano.Alg e PBS (ambos veículos) foram incluídas no ensaio (n = 18 - 22 larvas/grupo); e os experimentos repetidos pelo menos em 3 momentos distintos.

4.8.4.1 Avaliação da mortalidade e da morbidade de larvas de Galleria mellonella

A sobrevivência das larvas foi monitorada a cada 24 horas por até 5 dias após a infecção e tratamentos para a construção da curva de sobrevida. Paralelamente, as larvas sobreviventes foram avaliadas quanto a sua movimentação, formação de casulo e a melanização; e a curva de morbidade foi construída seguindo o modelo de notas em que o índice de saúde das larvas é calculado como a somatória dos critérios avaliados como mostrado na Tabela 1. Quanto maior o índice de saúde (nota máxima de 10) mais saudável está a larva (LOH et al., 2013).

4.8.4.2 Análise da carga fúngica em larvas de Galleria mellonella

A análise da carga fúngica foi realizada no 2º dia após o início do tratamento das larvas. Para isso, 6 - 8 larvas de cada grupo foram pesadas e o tecido foi macerado e homogeneizado em 1 mL de PBS estéril seguido por diluições seriadas dos homogenatos e plaqueadas em ágar Sabouraud dextrose contendo cloranfenicol (50 mg/L), incubadas a 37ºC por 48 horas para obtenção do número de unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de larva (UFC/g).

4.8.4.3 Histopatologia

No 2º dia após o início do tratamento, 2 larvas de cada grupo foram fixadas com formaldeído 10% em PBS para a preparação do corte histológico e coloração com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico no aumento de 400x (DM750, Leica, São Paulo), e critérios como filamentação e carga fúngica foram observadas e semi-quantificados de acordo com a escala: 0) nenhum; +) limitado; ++) médio; +++) alto e ++++) muito alto (Tabela 2) (QUINTELLA et al., 2011).

Tabela 1 - Nota do índice de saúde de larvas de Galleria mellonella (LOH et al., 2013).

Categoria	Descrição	Nota
	sem movimento	0
Atividade	movimento mínimo ao estímulo	1
Atividade	movimento quando estimulada	2
	movimento sem estímulo	3
formação de casulo	sem casulo	0
	casulo parcial	0.5
	casulo total	1
	larva preta	0
	larva preta com pontos marrons	1
Melanização	≥3 pontos em larva bege	2
	<3 pontos em larva bege	3
	sem melanização	4
Sobrevivência	Morta	0
Sonrevivencia	Viva	2

Tabela 2 - Análise semi-quantitativa de carga fúngica e filamentação de *Candida albicans* nos cortes histológicos (baseado em QUINTELLA et al., 2011).

Carga fúngica	Critérios
Filamentação	
0	Sem fungos / filamentação
+	Até cinco elementos por secção
++	De seis elementos por secção a cinco por campo com
	alta ampliação (x400)
+++	De 6 a 50 por campo com alta ampliação (x400)
++++	Mais de 50 por campo em alta ampliação (x400)

4.9 Modelo murino de candidíase vaginal

4.9.1 Animais

Foram usados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, idade de 6-8 semanas, mantidos em condições livres de patógenos no Biotério de Experimentação Animal do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Foram fornecidos alimentos e água "ad libitum" e todos os animais foram tratados de acordo com as práticas definidas pelos órgãos nacionais competentes do bem-estar animal. Este projeto foi analisado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais deste Instituto (CEUA-ICB, USP) antes da execução das experimentações e foi aprovado sob no. 6439.

4.9.2 Infecção vaginal

A fase de pseudoestro foi previamente induzida pela administração subcutânea de 0,5 mg de 17-β-valerato-estradiol dissolvido em 1 mL de óleo de gergelim 3 dias antes da infecção vaginal. A fase de pseudoestro é de grande importância para o estabelecimento da infecção por *Candida* spp. (HAMAD; ABU-ELTEEN; GHALEB; 2004).

Antes da infecção os camundongos fêmeas foram anestesiadas com uma solução de cloridrato de xilazina 10 mg/kg e cloridrato de cetamina 80 mg/kg (ambos Syntec) por via intraperitoneal. Anestesiadas, a infecção vaginal foi realizada intravaginalmente com o auxílio de uma micropipeta inoculando-se 3 x 10⁶ leveduras de *C. albicans* SC 5314 suspendidas em 10 µL de PBS estéril.

4.9.3 Tratamento

Os animais foram divididos em 10 grupos contendo 7 animais em cada como descritos na Tabela 3. Após 24 horas da infecção, os animais foram tratados com MFS ou AMB incorporadas em diferentes formulações: creme (AMB-CR e MFS-CR), microemulsão (AMB-ME e MFS-ME) e nanopartículas de alginato (MFS.Alg), com um volume aproximado de 30 µL aplicado topicamente no canal vaginal. Os grupos controles, também, foram incluídos nos experimentos: não tratado, tratado com a ME sem fármaco e nanopartículas de alginato vazias (Nano.Alg) (Tabela 3 e Figura 2).

Após 7 dias da infecção fúngica, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e o tecido vaginal foi coletado para análise micológica e histopatológica.

4.9.4 Análise da carga fúngica e histopatológica do tecido vaginal

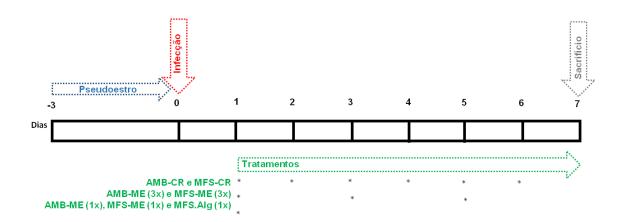
Após o sacrifício dos animais, as vaginas de 5 animais foram extirpadas, pesadas e o tecido foi macerado e homogeneizado em 1 mL de PBS estéril seguido por diluições seriadas 1:10 dos homogenatos e plaqueadas em ágar Sabouraud dextrose contendo cloranfenicol (50 mg/L), incubadas a 35°C por 48 horas para obtenção do número de UFC por grama de tecido (UFC/g).

Para análise histopatológica, as vaginas de 2 animais foram extirpadas, fixadas com formaldeído 10% em PBS para preparação dos cortes histológicos e coloração com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico no aumento de 400x, e critérios como filamentação e carga fúngica foram observadas e semi-quantificadas de acordo com a escala: 0) nenhum; +) limitado; ++) médio; +++) alto e ++++) muito alto (QUINTELLA et al., 2011) (Ver Tabela 2).

Tabela 3 – Grupos experimentais usado no modelo murino de candidíase vaginal.

Grupos	Descrições
(n = 7 animais/grupo)	
NT	Não tratado
AMB-CR (6x)	AMB 1,25% em creme, 6 doses (uma por dia)
AMB-ME (3x)	AMB 1,25% em microemulsão, 3 doses (uma a cada 48h)
AMB-ME (1x)	AMB 1,25% em microemulsão, dose única
MFS-CR (6x)	MFS 2% em creme, 6 doses (uma por dia)
MFS-ME (3x)	MFS 2% em microemulsão, 3 doses (uma a cada 48h)
MFS-ME (1x)	MFS 2% em microemulsão, dose única
MFS.Alg (1x)	MFS 2% em nanopartículas de alginato, dose única
ME	Microemulsão sem fármaco
Nano.Alg	Nanopartículas de alginato sem fármaco

Figura 2 - Desenho experimental do modelo murino de candidíase vaginal e tratamentos com formulações de anfotericina B e miltefosina.



A fase de pseudoestro foi induzida com 17-β-valerato-estradiol 3 dias antes da infecção. A infecção de *C. albicans* SC5314 (3 x 10⁶ leveduras) foi realizada por via intravaginal, e após 24 horas iniciou-se o tratamento com as formulações da anfotericina B e miltefosina em creme (AMB-CR e MFS-CR), em microemulsões (AMB-ME e MFS-ME) e em nanopartículas de alginato (MFS.Alg). Os dias em que as formulações foram administradas intravaginalmente estão representadas pelo símbolo asterisco (*). O sacrifício de todos os animais ocorreu no 7° dia após a infecção e o tecido vaginal coletado para análise micológica e histopatológica.

4.9.5 Imageamento do canal vaginal

Os camundongos foram anestesiados com isoflurano (Cristália, São Paulo, Brasil), e logo após a região abdominal foi depilada com creme depilatório Veet (Veet®). Os animais ficaram em observação por trinta minutos após a remoção dos pelos para verificar se não ocorreram sinais de irritação da pele.

Para avaliação da permanência das formulações no canal vaginal foi utilizado o corante fluorescente Alexa Fluor® 647 (no. Catálogo A 20106, Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA) e foram incluídos nos experimentos os seguintes grupos: ME sem Alexa Fluor 647 [ME (controle)], Propilenoglicol com Alexa Fluor 647 (PG + A.F.), Creme com Alexa Fluor 647 (CR + A.F.), ME com Alexa Fluor 647 (ME + A.F.) e MFS.Alg com Alexa Fluor 647 (MFS.Alg +A.F.), sendo um animal para cada grupo. Anestesiadas com isoflurano esses animais receberam 30 µL de cada formulação via intravaginal e o excesso removida da parte externa à vagina com auxílio de uma gaze. Após 1 hora da administração, o imageamento dos camundongos foi feito usando o

sistema de bioimagem (Sistema de Espectro IVIS, Perkin-Elmer Life Sciences, Waltham, MA) para a observação da presença das formulações no canal vaginal. As imagens dos animais foram obtidas, também, após 24, 48, 72, 144, 168 horas da administração (MIGOTTO et al., 2018).

4.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Graphpad Prism 5.0 (GraphPad, La Jolla, CA) com intervalo de confiança de 95%. As curvas de sobrevida foram analisadas pelo método de Kaplan-Meier e os valores de carga fúngica tecidual (UFC/g) foram comparados com o grupo não-tratado usando Anova one-way (Dunnett´s test). A morbidade das larvas de *G. mellonella* foi analisada por 2-way Anova. O decaimento da fluorescência das substâncias no tecido vaginal foi analisado por Anova seguido pelo teste de Tukey através do programa Graphpad Prism 5.0 (GraphPad, La Jolla, CA).

5 RESULTADOS

5.1 Produção e caracterização da miltefosina em nanopartículas de alginato

As nanopartículas de alginato foram produzidas e caracterizadas pelo tamanho médio, polidispersão e potencial zeta. As nanopartículas de alginato vazias (Nano.Alg) bem como a miltefosina incorporada em nanopartículas de alginato (MFS.Alg) foram caracterizadas obtendo valores de tamanho médio entre 300 e 400 nm, Pdi < 0,3 e potencial zeta de aproximadamente - 25 mV para ambas as formulações corroborando com os dados previamente obtidos por outros integrantes do grupo de pesquisa (Tabela 4).

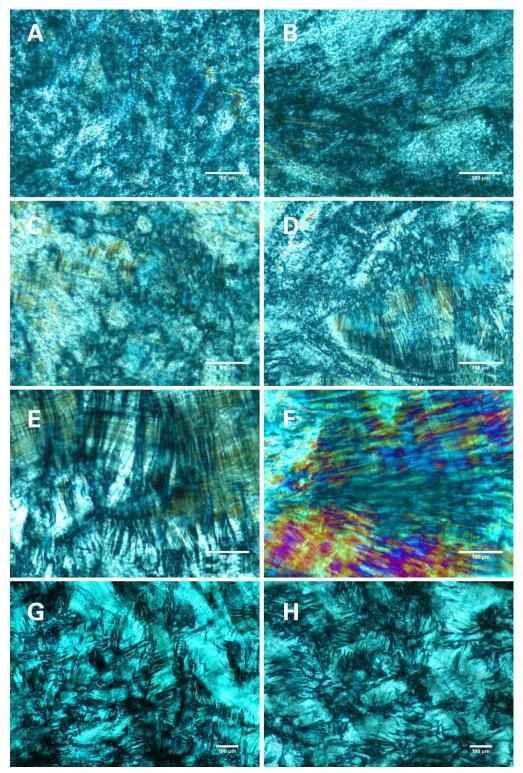
Tabela 4 - Dados das características físicas (tamanho, polidispersão e potencial zeta) das nanopartículas de alginato vazias (Nano.Alg) e com miltefosina incorporada (MFS.Alg).

	Tamanho (nm)	Pdi	Potencial zeta (mV)
Nano.Alg	330,3 ± 20,6	0.35 ± 0.05	-25,3 ± 4,07
MFS.Alg	$314,0 \pm 32,6$	0,31 ±0,05	$-27,2 \pm 3,01$

5.2 Caracterização da microemulsão como sistema de liberação para miltefosina e anfotericina B

As amostras de microemulsão em contato com água destilada foram avaliadas quanto a morfologia após 1, 2, 3, 4, 6, 24 e 48 horas de incubação a 37° C. É possível observar a formação do sistema de liberação das microemulsões após 4 horas de contato com a água destilada em que agregados bem estruturados são formados indicando a fase hexagonal (figura 3D); isto é, uma estrutura bidimensional contendo arranjos cilíndricos longos é estruturada em contato com a água e essa formação se mantém até o tempo de 48 horas (figuras 3G-H).

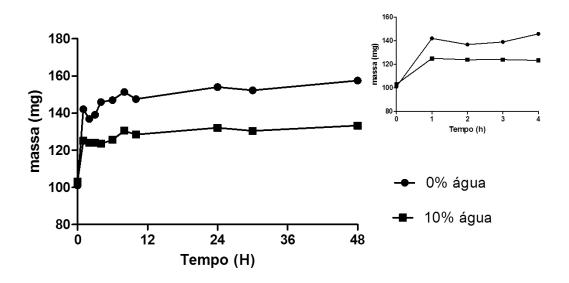
Figura 3 - Caracterização morfológica da microemulsão por microscopia de luz polarizada.



Microemulsões foram avaliadas após diferentes tempos de incubação em contato com água destilada a 37° C: **A)** 1 h; **B)** 2 h; **C)** 3 h; **D)** 4 h; **E)** 6 h; **F)** 24 h e **G e H)** 48 h. Na figura D pode-se notar a formação da fase hexagonal, indicando a formação de géis de fase líquido-cristalina, um sistema de liberação de fármacos. A fase hexagonal é mantida até 48 horas (figuras G e H).

Paralelamente, o perfil de intumescimento das microemulsões (0% e 10% de água destilada) foi determinada avaliando a massa de água incorporada na formulação. Em 1 hora de incubação pode-se observar que ambas as formulações (0% e 10% de água) intumescem em decorrência da absorção de água. Nos tempos seguintes observa-se o nivelamento dessas duas opções em um platô; entretanto a formulação da ME 0% de água apresentou maior intumescimento (figura 4). Esse ensaio foi decisivo para a escolha de um sistema manipulado com água ou sem água. Nota-se que a opção de 0% água na ME possui um comportamento parecido com 10% de água. Visualmente o sistema com 0% água consiste em um sistema monofásico semelhante a um gel, já o sistema contendo 10% de água, forma uma emulsão homogênea mais rígida do que a anterior. Em vista disso, foi escolhido trabalhar com o sistema 0% água, devido a facilidade de aplicação, maior intumescimento, sendo este formado *in situ* quando aplicado no canal vaginal.

Figura 4 - Sistema de intumescimento das microemulsões contendo 0% e 10% de água destilada.



A alíquotas de 100 mg de cada formulação foram distribuídas em microtubos e, posteriormente, foram adicionados 500 µL de água destilada, incubados em banho-Maria a 37 °C. Em diferentes tempos de incubação o sobrenadante (água excedente) foi descartado e os tubos pesados para a determinação da massa de água absorvida pelo sistema (em mg).

5.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Os valores de Cl₅₀ e Cl₉₀ de FLZ variaram de 1 - > 64 µg/mL; sendo um exemplar de cada espécie classificada como sensível e resistente/suscetível dosedependente segundo critérios estabelecidos pelo documento M27-S4 (2012) (Tabela 5). Os valores de Cl₉₀ obtidos para AMB variaram de 0,12 - 2 µg/mL para todas as cepas testadas; todas foram consideradas sensíveis à AMB, exceto *C. tropicalis* ATCC 200956 pois valores de CIM ≥ 2 µg/mL é classificado como resistente (NGUYEN et al., 1998) (Tabela 5). Com relação a NIS que pertence a classe dos agentes poliênicos assim como a AMB, os valores de Cl₉₀ foram de 2 a 4µg/mL para todos os isolados avaliados tendo como exceção a cepa de *C. tropicalis* ATCC 200956 que mostrou valor de Cl₉₀ igual a 32 µg/mL (Tabela 5). A atividade fungicida foi observada para os agentes poliênicos AMB e NIS para todas as cepas testadas, exceto *C. krusei* IAL-30 e *C. tropicalis* ATCC 200956 para NIS (Tabela 5). Por outro lado, o FLZ apresentou atividade fungicida para *C. albicans* SC5314, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. tropicalis* IAL-01 (Tabela 5).

Para a MFS livre os valores de Cl₉₀ ficaram na faixa de 0,5 a 2 μg/mL para todas as cepas de *Candida* spp. apresentando atividade inibitória similar a AMB. Em contrapartida, a MFS incorporada em sistema nanoparticulado de alginato (MFS.Alg) apresentou menor atividade antifúngica usando este modelo experimental quando comparado a MFS livre. A espécie mais suscetível à formulação (MFS.Alg) foi *C. glabrata* IAL-23 (18,75 a 37,5 μg/mL), seguida por *C. glabrata* ATCC 2001 (150 μg/mL) e por seguinte os outros isolados (300 a 600 μg/mL) (Tabela 6). É importante relatar que a nanopartícula de alginato vazia (Nano.Alg) não inibiu o crescimento dos fungos avaliados (dado não mostrado).

Dentre os análogos sintéticos da MFS, o Composto 1 apresentou melhor atividade antifúngica (CIM de 1 a >16 μg/mL) sendo que a espécie mais suscetível foi *C. tropicalis*. A cepa *C. tropicalis* ATCC 200956 foi inibida em 90% em concentrações de 1 μg/mL e *C. tropicalis* IAI-01 em 4 μg/mL (Tabela 6). Já as cepas de *C. glabrata* ATCC 2001, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. krusei* IAL-30, *C. parapsilosis* IAL-17 foram menos suscetíveis ao Composto 1 (Cl₉₀ > 16 μg/mL). Os compostos 2 e 4 foram ativos somente em concentrações acima de 16 μg/mL sobre *Candida* spp., exceto *tropicalis* ATCC 200956 (Cl₉₀ = 1 μg/mL do composto 2) (Tabela 6).

A MFS apresentou efeito fungicida para todas as cepas testadas. Porém dentre os análogos da MFS, somente o Composto 1 apresentou atividade fungicida para a maioria das cepas: *C. albicans* SC5314, *C. albicans* IAL -40, *C. glabrata* IAL-23, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. tropicalis* ATCC 200956 e *C. tropicalis* IAL-01; enquanto o Composto 2 foi fungicida apenas para a cepa de *C. tropicalis* ATCC 200956 (Tabela 6).

5.4 Efeito do ergosterol exógeno na Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Foi avaliado o efeito do ergosterol exógeno sobre o efeito inibitório da MFS e seu análogo composto 1 sobre o crescimento de *C. albicans* SC5314 em comparação com a AMB, sabidamente um fármaco que se complexa diretamente com a molécula do ergosterol. A MFS em meio contendo ergosterol apresentou um aumento do valor de CIM quando comparado com o resultado sem o ergosterol (32xCIM); o mesmo comportamento foi observado para a AMB (64xCIM) quando exposto com a maior concentração de ergosterol (200 μg/mL) (Tabela 7). Em contraste, o valor de CIM para o composto 1 foi o mesmo para as três concentrações do ergosterol (16 μg/mL, aumento de 2xCIM) (Tabela 7).

Tabela 5 - Susceptibilidade de *Candida* spp. aos antifúngicos padrões. As menores concentrações que inibem 50% e 90% do crescimento fúngico (Cl₅₀ e Cl₉₀, respectivamente) e a concentração fungicida mínima (CFM) foram determinadas. Os valores estão expressos em μg/mL. R: resistente; SDD: susceptibilidade dose dependente.

		Anfotericin	а В		Nistatina			Fluconazo	
Cepas	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM	CI ₅₀	Cl ₉₀	CFM	CI ₅₀	CI ₉₀	CFM
C. albicans	0,12	0,12	0,12	2	2	4	2	2	4
SC5314									
C. albicans	0,06	0,12	0,12	2	4	8	64 ^R	>64	>64
IAL-40									
C. glabrata	0,12	0,12	0,25	1	2	2	16 ^R	>64	>64
ATCC 2001									
C. glabrata	0,12	0,12	0,25	2	4	4	8 ^{SDD}	32	>64
IAL-23									
C. krusei	0,12	0,5	0,5	2	4	4	64 ^R	>64	>64
ATCC 6258									
C. krusei	0,03	0,25	0,5	0,5	4	>128	64 ^R	>64	>64
IAL-30									
C. parapsilosis	0,03	0,12	0,25	1	2	16	2	4	4
ATCC 22019									
C. parapsilosis	0,06	0,25	0,25	0,25	2	4	>64 ^R	>64	>64
IAL-17									
C. tropicalis	1	2 ^R	2	16	32	128	>64 ^R	>64	>64
ATCC 200956									
C. tropicalis	0,06	0,25	0,25	2	4	4	2	4	16
IAL-01									

Tabela 6 - Susceptibilidade de *Candida* spp. a miltefosina livre (MFS), em nanopartículas de alginato (MFS.Alg) e a seus análogos sintéticos (compostos 1, 2 e 4). As menores concentrações que inibem 50% e 90% do crescimento fúngico (Cl₅₀ e Cl₉₀, respectivamente) e a concentração fungicida mínima (CFM) foram determinadas. Os valores estão expressos em μg/mL.

	N	liltefos	ina		MFS.Alç]	Co	ompos	to 1	Co	ompost	o 2	Co	ompost	o 4
Cepas	CI ₅₀	CI 90	CFM		CI 90	CFM	CI ₅₀	CI 90	CFM	CI ₅₀	CI 90	CFM		CI 90	CFM
C. albicans	1	1	1	300	300	600	8	8	8	>16	>16	>16	>16	>16	>16
SC5314															
C. albicans	1	1	1	600	600	>600	4	8	8	>16	>16	>16	>16	>16	>16
IAL-40															
C. glabrata	0,06	0,5	0,5	150	150	>600	2	>16	>16	8	>16	>16	>16	>16	>16
ATCC 2001															
C. glabrata	0,5	0,5	1	18,75	37,5	>600	4	8	8	8	>16	>16	>16	>16	>16
IAL-23															
C. krusei	1	2	4	150	600	>600	2	>16	>16	4	>16	>16	4	>16	>16
ATCC 6258															
C. krusei	1	1	1	300	600	>600	4	>16	>16	>16	>16	>16	16	>16	>16
IAL-30															
C. parapsilosis	1	1	1	600	600	>600	4	8	8	4	>16	>16	16	>16	>16
ATCC 22019															
C. parapsilosis	0,25	2	2	600	600	>600	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16	>16
IAL-17															
C. tropicalis	1	1	2	600	600	>600	1	1	2	1	1	2	16	16	16
ATCC 200956															
C. tropicalis	1	2	2	300	300	>600	2	4	4	8	>16	>16	16	>16	>16
IAL-01															

Tabela 7 - Efeito da presença de ergosterol exógeno na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da anfotericina B (AMB), miltefosina (MFS) e composto 1 (C1) sobre leveduras de *Candida albicans* SC5314.

		CIM (µg/mL)	
Ergosterol (μg/mL)	AMB	MFS	C1
0	0,25	0,5	8
50	0,25	4	16
100	0,5	4	16
200	16	16	16

Dados representam resultados realizados em dois momentos distintos.

5.5 Efeito da miltefosina e da anfotericina B na permeabilidade da membrana celular de leveduras de *Candida albicans* SC5314

Valores de 1x CIM, 2x CIM e 4x CIM de MFS e de AMB foram avaliadas quanto ao efeito da permeabilidade da membrana celular de *C. albicans*. Efeito tempo e dose dependente para a AMB foi observado, mostrando maior extravasamento de DNA na maior concentração após 24 horas de tratamento (Figura 5A). Por outro lado, não houve mudança na concentração de DNA/proteínas no sobrenadante após o tratamento das leveduras com diferentes concentrações da MFS (Figuras 5B e 5D). Para o composto 1 não foi possível quantificar o DNA e proteínas no sobrenadante pois este composto apresenta coloração e, também, fluorescência, fatores que influenciaram na leitura da absorbância a 260 nm e 280 nm.

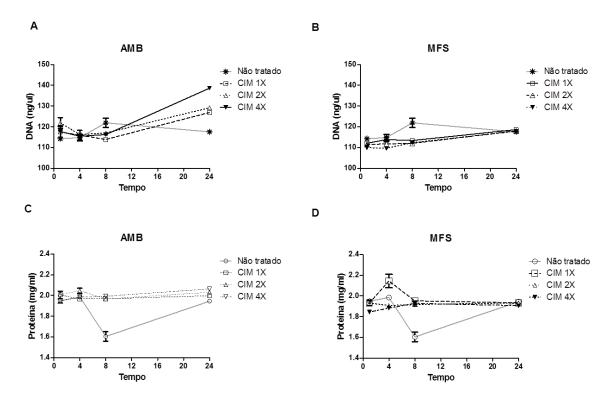


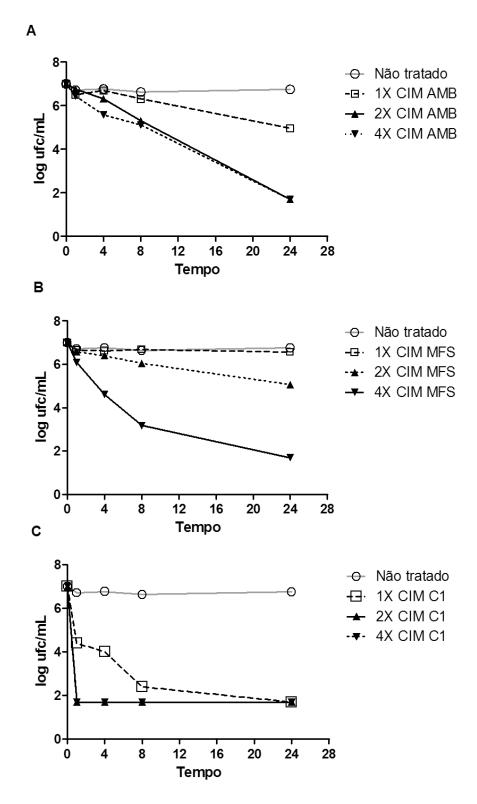
Figura 5 - Efeito da miltefosina (MFS) e anfotericina B (AMB) na permeabilidade da membrana celular de leveduras de *Candida albicans* SC5314.

Leveduras de *Candida albicans* SC5314 tratadas ou não com anfotericina B -AMB (A e C) e miltefosina – MFS (B e D) e incubadas a 35°C por 24 h. DNA e proteínas livres no sobrenadante foram quantificados em diferentes tempos de incubação usando comprimento de onda de 260 nm e 280 nm, respectivamente. Experimento realizado em duplicata e em dois momentos distintos.

5.6 Efeito da miltefosina, anfotericina B e composto 1 na viabilidade de leveduras de *Candida albicans* SC5314

A perda da viabilidade das leveduras tratadas com 4x CIM de MFS e AMB é observada em 4 horas de incubação. Após 24 horas foi possível observar 100% de mortalidade de 4x CIM para a MFS e para a AMB nas concentrações de 2x CIM e 4X CIM (Figuras 6A-B). Para o composto 1, 2x CIM e 4x CIM foram capazes de causar perda total da viabilidade das leveduras após 1 hora de incubação. Interessantemente, o composto 1 em 1x CIM levou a 100% de morte das leveduras após 24 de incubação, enquanto a MFS em 1x CIM não apresentou efeito fungicida (Figura 6B-C).

Figura 6 - Viabilidade de *Candida albicans* SC5314 tratadas com anfotericina B (AMB), miltefosina (MFS) e composto 1 (C1).



Viabilidade de leveduras *Candida albicans* SC5314 não tratadas e tratadas com diferentes concentrações (1xCIM, 2xCIM e 4xCIM, sendo CIM o valor de concentração inibitória mínima) de AMB (A), MFS (B) e composto 1 (C) foram avaliadas em diferentes tempos de incubação por até 24 h a 35°C. Experimentos realizado em duplicata em dois momentos distintos.

5.7 Efeito do composto 1 sobre a morfologia de Candida albicans SC5314

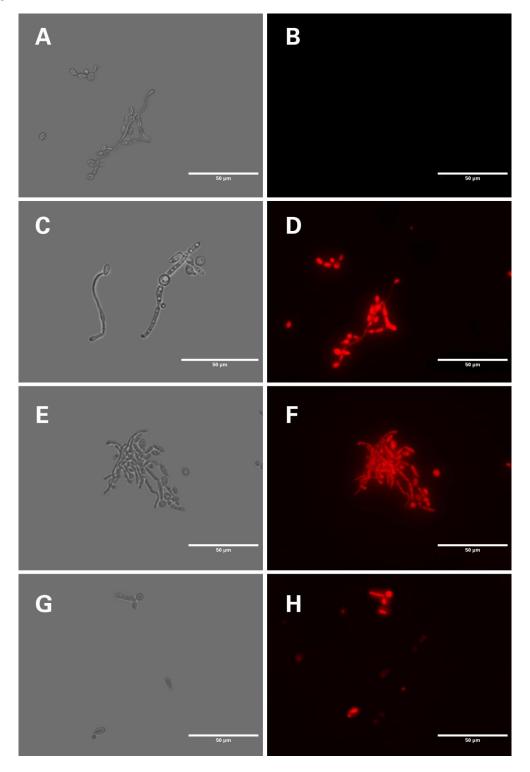
Leveduras de *C. albicans* não tratadas e tratadas com diferentes concentrações do Composto 1 por 24 horas foram observadas no microscópio de campo claro e de fluorescência com objetivo de detectar possíveis alterações na morfologia do fungo bem como a emissão de fluorescência provocada pelo Composto 1. Células não tratadas com o composto 1 apresentam-se na forma de leveduras e pseudohifas/hifas; e não emitiram fluorescência (Figuras 7A-B). Todos as células tratadas com o composto 1 emitiram fluorescência (Figuras 7D, F e H) mesmo com a perda da viabilidade (Figura 6C). Adicionalmente, o composto 1 conseguiu reduzir o processo de filamentação de *C. albicans* quando tratadas com 4xCIM (Figuras 7G-H).

5.8 Criação e manutenção das larvas de Galleria mellonella

Foi padronizado o cultivo das larvas de *G. mellonella*. Fatores como alimentação e temperatura de incubação foram fundamentais para a produção de larvas de boa qualidade. A ração (pólen e cera de abelha) e a temperatura de incubação a 30°C foram as condições estabelecidas para a reprodução e manutenção das lagartas de *G. mellonella* conforme previamente descritas (KAVANAGH; FALLON, 2010).

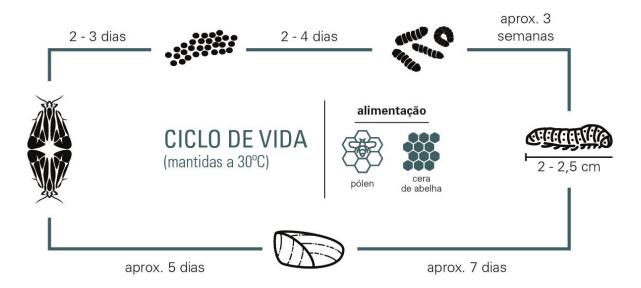
As mariposas acasalam e as fêmeas depositam os ovos de coloração creme nas frestas do papel filtro posto no recipiente de acasalamento dentro de ~4 dias. Neste estágio as mariposas não são alimentadas pois estas não possuem a região bucal. Dentro de outro recipiente, contendo 15g de pólen e 20g de cera, os ovos eclodem após 2-4 dias da oviposição. Após a eclosão, as larvas passam por 7 instares de desenvolvimento; a partir da quarta ou quinta instar as larvas já podem ser manipuladas para efetuar o processo de limpeza do recipiente. Na última instar as lagartas são utilizadas para o experimento, medindo de 2,0 - 2,5 cm de comprimento (fase larvária de ~5 semanas). Quando atingem esta fase, as larvas produzem casulos e se preparam para entrar em pupa, e em seguida ocorre a metamorfose para mariposa. O ciclo total do inseto *G. mellonella* ocorre em torno de 40 dias nas condições citadas (Figura 8), podendo variar de acordo com a temperatura e alimentação das lagartas.

Figura 7 - Análise da fluorescência do composto 1 em leveduras de *Candida albicans* SC 5314.



Micrografias de campo claro (esquerda) e de fluorescência (direita) de células de *Candida albicans* SC5314 tratadas e não tratadas com o composto 1 (análogo sintético da miltefosina) em diferentes concentrações (1xCIM, 2xCIM e 4xCIM, sendo CIM o valor de concentração inibitória mínima) após 24 h de incubação a 35°C. **A-B:** não tratadas (controle); **C-D:** 1xCIM; **E-F:** 2xCIM, **G-H:** 4xCIM. Barras = 50 μm.

Figura 8. Ciclo de vida do inseto Galleria mellonella.



As larvas de *Galleria mellonella* foram mantidas em estufa a 30 °C. As mariposas depositam os ovos após 2 - 3 dias do acasalamento, esses ovos eclodem após 2 - 4 dias e as larvas atingem a última instar após 3 semanas (comprimento de 2,0 - 2,5 cm), fase larvária ideal para serem usadas nos experimentos. As larvas que não são utilizadas para experimentação, continuam o ciclo de vida do inseto com a formação do casulo após 7 dias e, logo mais a metamorfose com o aparecimento das mariposas (fase adulta). O ciclo de vida completo do inseto ocorre em média de 40 dias.

5.9 Virulência de isolados de *Candida* spp. em larvas de *Galleria mellonella*

Foram utilizadas larvas de *G. mellonella* para avaliar a virulência de *C. albicans* SC 5314, *C. albicans* IAL - 40, *C. glabrata* ATCC - 2001, *C. glabrata* IAL - 23, *C. krusei* ATCC 6258, *C. krusei* IAL - 30, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. parapsilosis* IAL-17, *C. tropicalis* ATCC 200956 e *C. tropicalis* IAL-01 (Figura 9). Após este ensaio foi possível avaliar as melhores cepas para realizar o tratamento com os antifúngicos e miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS.Alg).

Pode-se observar que a cepas de *C. albicans* foram as mais virulentas; a cepa IAL - 40 leva a 100% de mortalidade das larvas no quinto dia de infecção e a cepa SC5314 leva a 100% de mortalidade no quarto dia após a inoculação (5 x 10⁵ UFC/larva), mostrando que houve diferença estatística de P < 0,0001 para ambas as cepas em relação ao controle não infectado (grupo PBS) (Figura 9).

Para *C. glabrata* pode-se observar que a cepa ATCC 2001 apresentou 90% de larvas vivas no quinto dia, enquanto que a cepa IAL - 23 não causou mortalidade, sendo responsável por 100% das larvas vivas, não apresentando diferença estatística para as cepas em comparação com o controle (Figura 9).

A cepa de *C. krusei* ATCC 6258 apresentou 55,55 % de sobrevivência e foi mais virulenta que a cepa de *C. krusei* IAL - 30, mostrando 88,88% de sobrevivência no final do quinto dia. Além disso, a cepa *C. krusei* ATCC 6258 foi a única que obteve diferença estatística comparada com o controle PBS (P value 0,0016) (Figura 9).

A cepa de *C. parapsilosis* ATCC 22019 apresentou 84,70% de sobrevivência e foi menos virulenta que a cepa de *C. parapsilosis* IAL-17, com 75,00% de sobrevida e ocorreu uma diferença estatística de P value 0,0182 em relação ao grupo PBS (Figura 9).

Já para a cepa de *C. tropicalis* IAL - 01 foi a mais virulenta que *C. tropicalis* ATCC 200956, por apresentar somente 45% de larvas vivas no quinto dia após infecção (P= 0,0001 quando com o grupo PBS), enquanto a cepa ATCC 200956, apresentou 90% de larvas vivas (Figura 9).

Comparando todas as cepas de *Candida* spp., podemos observar que *C. albicans* (SC5314 e IAL-40) foram as mais virulentas seguidas de *C. tropicalis* IAL-01, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* IAL-17; enquanto os demais foram considerados menos virulentos (Figura 9).

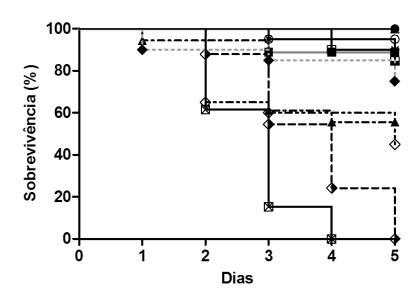


Figura 9 - Virulência de de Candida spp. testadas em larvas de Galleria mellonella.

PBS	C. albicans	C. glabrata	C. krusei	C. parapsilosis	C. tropicalis
→ PBS	-8- SC5314* -◆· IAL-40*	→ ATCC 2001 → IAL - 23	- ≜ - ATCC 6258* - ■ - IAL-30	→ ATCC 22019	→ ATCC 200956 -

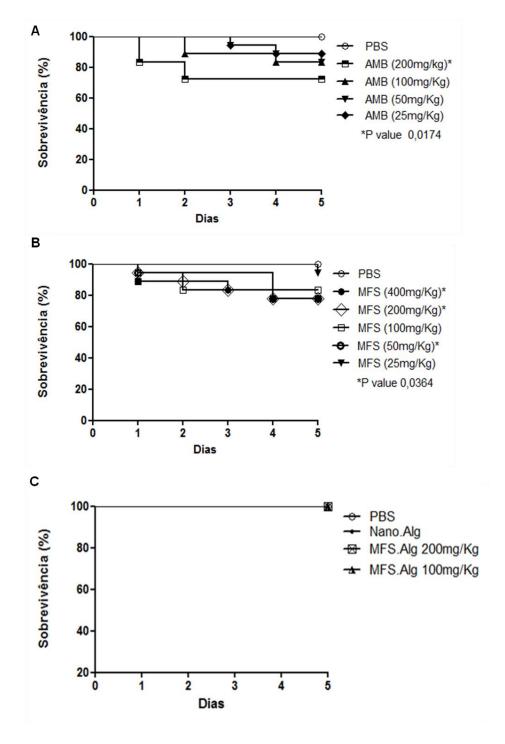
Curvas de sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com 5x10⁵ UFC/larva de leveduras de *Candida* spp., incubadas a 37⁰ C por 5 dias. Larvas inoculadas com PBS foram incluídas no estudo como grupo controle negativo da infecção fúngica. *P<0,05 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o grupo PBS [Log-rank (Mantel-Cox) Test].

5.10 Toxicidade da miltefosina em nanopartículas de alginato em larvas de Galleria mellonella

Diferentes doses de Miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS.Alg), Miltefosina livre (MFS) e Anfotericina B (AMB) foram avaliadas sobre as larvas.

Ao final do quinto dia de tratamento foi possível observar que a porcentagem de larvas sobreviventes para a dose 25 mg/kg de AMB foi de 88,88%. Para ambas as doses (50 mg/kg e 100 mg/kg), 83,33% das larvas permaneceram vivas após o tratamento e, somente 72,22% das larvas sobreviveram com a maior dose de AMB (200 mg/kg) sendo estatisticamente diferente do grupo controle sem tratamento (P = 0,0174) (Figura 10).

Figura 10 - Toxicidade da anfotericina B (AMB), miltefosina livre (MFS) e MFS em nanopartículas de alginato (MFS.Alg) sobre as larvas de *Galleria mellonella*.



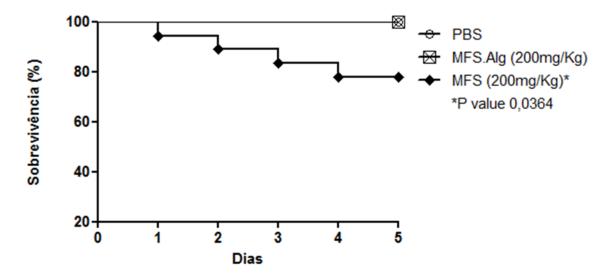
As larvas foram tratadas com diferentes doses de **A** - Anfotericina B (AMB – 25 a 200 mg/kg); **B.** Miltefosina livre (MFS – 25 a 400 mg/kg); e **C.** Miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS.Alg – 100 a 200 mg/kg), incubadas a 37°C por 5 dias. Observações diárias foram realizadas para a contagem de larvas sobreviventes e construção da curva de sobrevida. *P<0,05 foi considerado estatisticamente significativo quando comparado com o grupo sem tratamento - PBS [Log-rank (Mantel-Cox) Test].

A menor dose da MFS (25 mg/kg) foi responsável pela maior sobrevivência de 94,44% das lagartas; em contraste, doses acima, 50 a 400 mg/kg de MFS, levaram a 77,77% a 83,33% de larvas sobreviventes, havendo diferença estatística comparando com o grupo PBS (P = 0,0364) (Figura 10B).

Interessantemente, a MFS em nanocarreador de alginato (MFS.Alg, doses de 100 e 200 mg/kg) não apresentou efeito tóxico sobre as larvas de *G. mellonella*, indicando que a MFS nesta formulação não é tóxica para este modelo de invertebrado (Figura 10C). Adicionalmente, nanopartículas de alginato vazias (Nano.Alg) não causaram nenhum efeito tóxico sobre as larvas (Figura 10C).

Comparando a toxicidade da MFS livre com a MFS.Alg, na dose de 200 mg/kg de MFS para ambas as formulações, observa-se que a forma nanoparticulada é estatisticamente menos tóxica quando comparada a sua forma livre (P = 0,0364) (Figura 11).

Figura 11 - Toxicidade da miltefosina livre (MFS) e MFS em nanopartículas de alginato (MFS.Alg) sobre as larvas de *Galleria mellonella*.



MFS carreado em nanopartículas de alginato é estatisticamente menos tóxica quando comparado com a MFS livre, na maior dose de 200 mg/kg de MFS (p=0,0364).

5.11 Avaliação da eficácia antifúngica da miltefosina em nanopartículas de alginato em modelo de candidíase em larvas de *Galleria mellonella*

5.11.1 Análise das Curvas de mortalidade e morbidade de larvas de Galleria mellonella

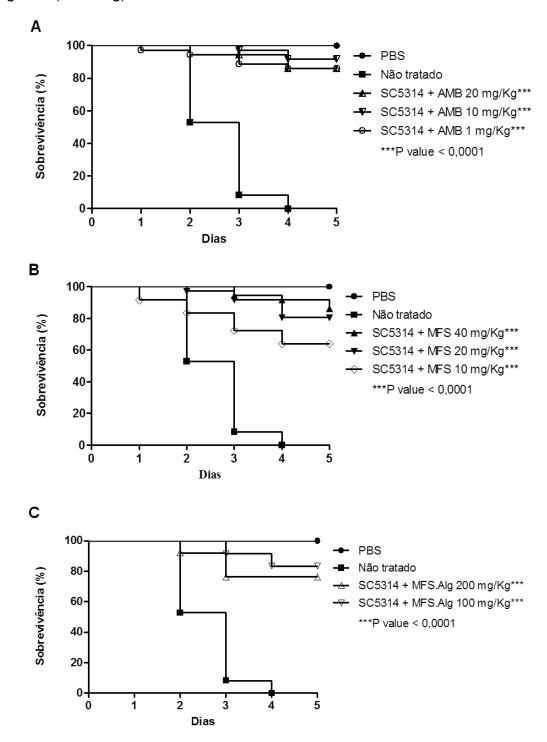
Larvas infectadas com *Candida albicans* SC5314 (5x10⁵ UFC/larva) levou 100% de mortalidade após o quarto dia da infecção (P < 0,0001 comparado com o grupo PBS) (Figura 12). A eficácia do tratamento das larvas infectadas por *C. albicans* SC5314 usando o antifúngico padrão AMB apresentou-se de maneira dose dependente. As doses de 20 mg/Kg e 1 mg/Kg protegeram 86,11%, enquanto que AMB 10 mg/Kg protegeu 91,66% das larvas havendo diferença estatística (P < 0,0001) em comparação com o grupo infectado e não tratado (Figura 12A).

O grupo de larvas infectadas e tratadas com a MFS (40 mg/Kg) mostrou 86,11% de larvas sobreviventes, havendo diferença estatística em comparação com o grupo não tratado (P < 0,0001). Para a dose de 20 mg/Kg houve 80,55% de larvas sobreviventes com diferença estatística em comparação com o grupo controle (larvas infectadas e não tratadas) (P < 0,0001). No entanto, a menor dose da MFS (10 mg/kg) foi a que teve menor eficácia, com somente 63,88% de sobrevida, sendo esta proteção estatisticamente significativa quando comparado ao grupo infectado e não tratado (P < 0,0001) (Figura 12B).

Para a maior dose da MFS em sistema nanoparticulado de alginato - MFS.Alg (200 mg/Kg), 76,31% das larvas sobreviveram com diferença estatística de (P < 0,0001) e para a menor dose de MFS.Alg (100 mg/Kg), 83,33% de larvas permaneceram vivas, com diferença estatística de (P < 0,0001) em comparação ao grupo controle de larvas infectadas e não tratadas. Apesar da menor dose (100 mg/Kg) apresentar uma maior taxa de sobrevida quando comparada com a dose de (200 mg/kg), não houve diferença estatística entre as mesmas.

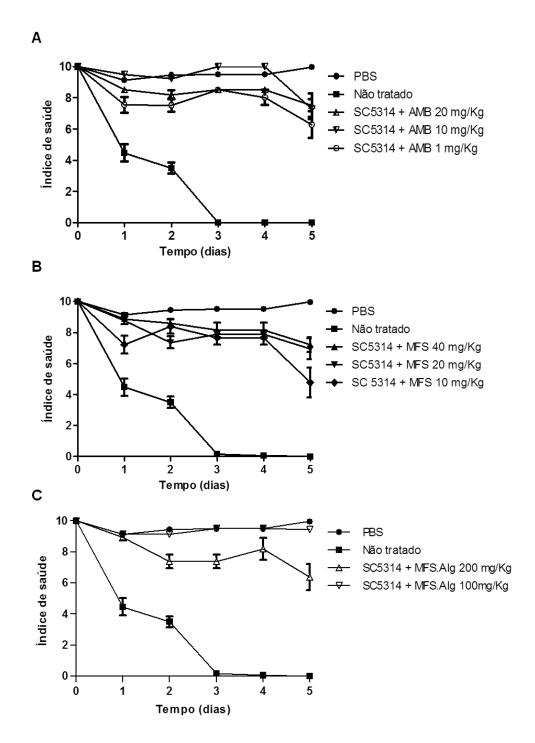
Concomitantemente com à avaliação da curva de sobrevida das larvas de *G. mellonella* foi realizado a avaliação da da curva de morbidade de *C. albicans* SC 5314, em que o índice de saúde de cada grupo foi determinado diariamente. Como resultado pode-se notar que os gráficos da curva de sobrevida e morbidade corroboram entre si (Figuras 12 e 13).

Figura 12 - Curvas de sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com leveduras *Candida albicans* SC5314 (5x10⁵ UFC/larva) e tratadas após 30 minutos da infecção com anfotericina B (AMB), miltefosina (MFS) e miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS.Alg).



A) AMB (20, 10 e 1 mg/kg); **B)** MFS (40, 20 e 10 mg/kg) e **C)** MFS.Alg (200 e 100 mg/kg). Grupos infectados e não tratados (PBS) e tratados com a nanopartícula de alginato (Nano.Alg) (ambos veículos) foram incluídos.

Figura 13 - Índice de saúde de larvas de *G. mellonella* infectadas com *Candida albicans* SC5314 (5x10⁵ UFC/larva) e tratadas após 30 minutos da infecção com anfotericina B (AMB), miltefosina (MFS) e miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS.Alg).



A) AMB (20, 10 e 1 mg/kg); **B)** MFS (40, 20 e 10 mg/kg) e **C)** MFS.Alg (200 e 100 mg/kg). Para todos os grupos (A, B e C) houve diferença estatística, valor de P = ***p<0.001 quando comparados com o grupo não tratado (2-way ANOVA).

Larvas infectadas com *Candida albicans* IAL - 40 (5x10⁵ UFC/larva) levou 100% de mortalidade no quinto dia da infecção havendo diferença estatística (P < 0,0001) em relação ao grupo não infectado (PBS) (Figura 14).

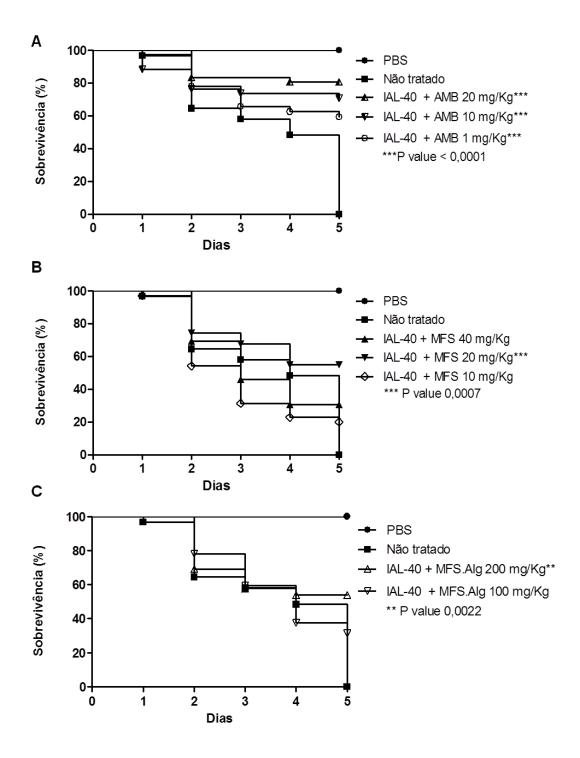
A eficácia do tratamento das larvas infectadas por *C. albicans* IAL - 40 usando o antifúngico padrão anfotericina B apresentou-se de maneira dose dependente. As doses de 20 mg/Kg, 10 mg/Kg e 1 mg/kg protegeram as larvas da infecção em 80,55%, 70,58% e 59,37% respectivamente, apresentando diferença estatística em comparação com o grupo infectado e não tratado para todas as doses de AMB (P < 0,0001) (Figura 14A).

O tratamento com MFS 40 mg/Kg e 20 mg/Kg protegeram as larvas da infecção em 30,76% a 54,83% com diferença estatística em comparação com o grupo não tratado (P = 0,0007). Por outro lado, a dose de 10 mg/Kg protegeu somente 20% das larvas (Figura 14B).

Quando as larvas foram tratadas com a MFS carreado em nanopartículas de alginato (MFS.Alg) na dose de 200 mg/Kg, 53,84% das larvas sobreviveram com diferença estatística (P = 0,0022), e para a menor dose (100 mg/Kg) somente 31,25% das larvas permaneceram vivas. Esses resultados foram muito semelhantes a MFS livre, porém uma das vantagens da MFS.Alg é a ausência de toxicidade da formulação (Figura 15C).

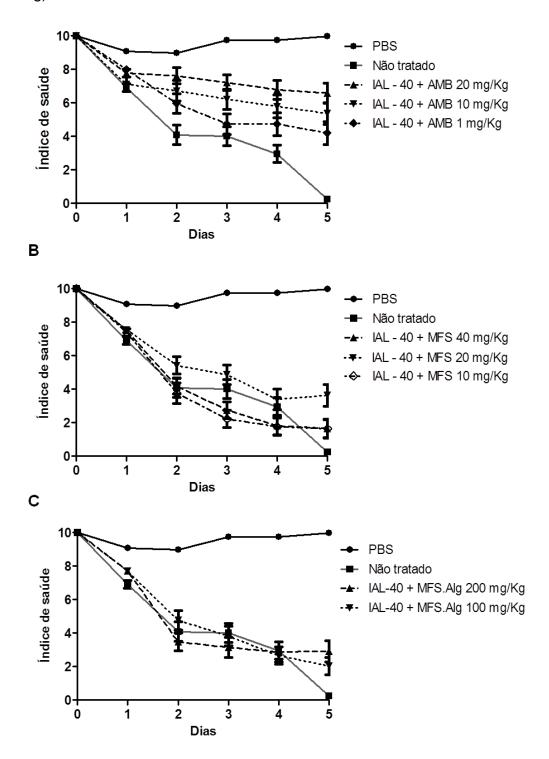
Concomitantemente com à avaliação da curva de sobrevida das larvas de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* IAL-40 e tratadas foi realizado o ensaio da curva de morbidade, verificando diariamente o índice de saúde de cada grupo testado. Como resultado pode-se notar que os gráficos da curva de sobrevida e morbidade corroboram entre si (Figuras 14 e 15).

Figura 14 - Curvas de sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com leveduras *Candida albicans* IAL-40 (5x10⁵ UFC/larva) e tratadas após 30 minutos da infecção com anfotericina B (AMB), miltefosina (MFS) e miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS.Alg).



A) AMB (20, 10 e 1 mg/kg) **B)** MFS (40, 20 e 10 mg/kg) e **C)** MFS.Alg (200 e 100 mg/kg). Grupos infectados e não tratados (PBS) e tratados com a nanopartícula de alginato (Nano.Alg) (ambos veículos) foram incluídos.

Figura 15 - Índice de saúde de larvas de *G. mellonella* infectadas com *Candida albicans* IAL-40 (5x10⁵ UFC/larva) e tratadas após 30 minutos da infecção com anfotericina B (AMB), miltefosina (MFS) e miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS.Alg).



A) AMB (20, 10 e 1 mg/kg); **B)** MFS (40, 20 e 10 mg/kg) e **C)** MFS.Alg (200 e 100 mg/kg). Para o grupo (A) houve diferença estatística, valor de P = *** P<0,01; grupo C valor de P = *P<0,05, quando comparados com o grupo não tratado (2-way ANOVA).

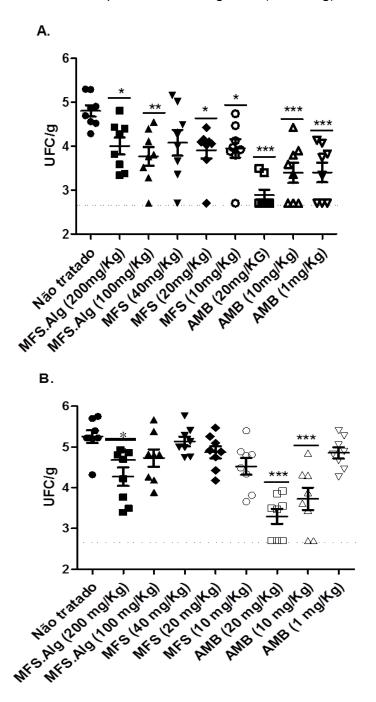
5.11.2 Análise da carga fúngica em larvas de Galleria mellonella

Larvas de *G. mellonella infectadas* com 5x10⁵ UFC/larva de *C. albicans* SC5314 (figura 16A) ou *C. albicans* IAL - 40 (figura 16B) foram tratadas 30 minutos após a infecção com os seguintes antifúngicos: MFS.Alg (100 e 200 mg/kg), MFS (10, 20 e 40 mg/kg) e AMB (1, 10 e 20 mg/kg), sacrificadas no segundo dia para avaliação da carga fúngica (UFC/g).

Na figura A, é possível constatar que houve redução na carga fúngica dos grupos tratados com MFS.Alg em ambas as doses testadas (P < 0,01), enquanto a MFS livre, apenas as doses de 20 mg/kg e 10 mg/kg foram capazes de reduzir significativamente a carga fúngica (P < 0,05). Para as três doses administradas da AMB, foi possível observar que todas levam a redução significativa de UFC/g.

Na figura B, quando o agente infeccioso foi a cepa de *C. albicans* IAL - 40, resistente ao fluconazol, somente a MFS.Alg 200 mg/Kg foi responsável pela redução significativa da carga fúngica (P < 0,01), contrastando com o resultado da MFS livre, que não apresentou eficiência em reduzir a carga fúngica nas larvas. A AMB reduziu a carga fúngica nas duas maiores doses avaliadas (20 mg/kg e 10 mg/kg) enquanto a menor dose 1 mg/kg não foi capaz de reduzir a carga fúngica da cepa em questão.

Figura 16 - Carga fúngica em larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *Candida albicans* (SC5314 e IAL-40) e tratadas com anfotericina B (AMB), miltefosina livre (MFS) e miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS.Alg).



Larvas de *Galleria mellonella* foram infectadas com 5x10⁵ leveduras/larva de *Candida albicans* SC 5314 (A) e *Candida albicans* IAL - 40 (B), e tratadas após 30 minutos com: MFS.Alg (200 e 100 mg/Kg); MFS (40, 20 e 10 mg/Kg); AMB (20, 10 e 1 mg/Kg). Depois de 2 dias, as larvas foram sacrificadas para a determinação da carga fúngica. *P<0,05; **P<0,01 e ***p<0,001 quando comparados com o grupo não tratado (oneway ANOVA seguido por Dunnett's test). A linha tracejada representa o limite de detecção da técnica (± 2,7 CFU/g).

5.11.3 Análise histopatológica

A coloração de hematoxilina e eosina do tecido das larvas de *G. mellonella*, revelou que larvas infectadas por *C. albicans* SC 5314 e IAL-40 (tabela 8, figuras 17A-B e 18A-B,) apresentaram carga fúngica elevada (++++) com filamentação (+++) espalhadas por todo o corte histológico.

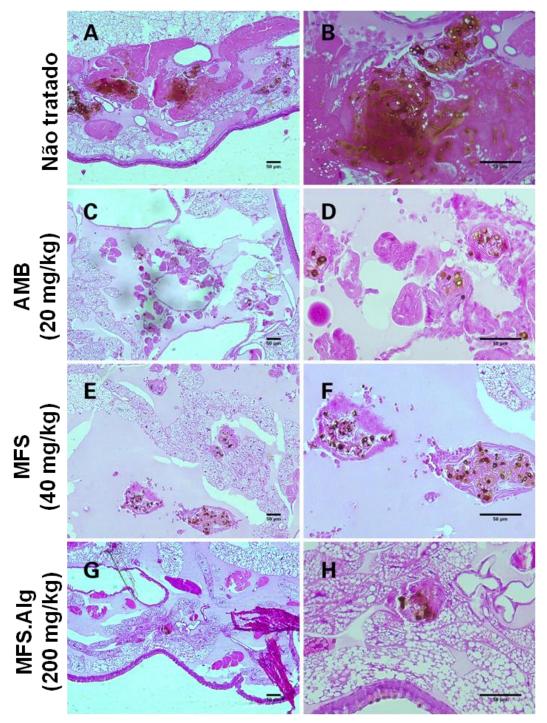
O tratamento com MFS.Alg (100 e 200 mg/kg), nota-se que houve uma redução drástica da carga fúngica (+ a ++) e ausência de filamentação para ambas as cepas testadas (tabela 8, figuras 17G-H e 18G-H,). Em relação ao grupo infectado com *C. albicans* SC 5314 e tratado com MFS (10-40 mg/kg) foi possível observar que houve a redução da carga fúngica (++) e uma diminuição da filamentação (++) quando comparada com o grupo infectado não tratado (tabela 8, figuras 17E-F); porém para a cepa de IAL-40 a MFS não foi capaz de conter a infecção quando comparado com o controle não tratado nem mesmo na maior dose usada (40 mg/kg) (tabela 8, figuras 18E-F).

No caso das larvas infectadas com *C. albicans* SC 5314 e tratadas com AMB 10-20 mg/kg, é possível constatar que ocorreu uma diminuição da carga fúngica (+) e ausência de filamentação comparável à eficiência da MFS em nanopartículas de alginato (MFS.ALg, 100-200 mg/kg); enquanto para a cepa de *C. albicans* IAL – 40 a AMB foi menos efetiva, mas também foi capaz de reduzir a carga fúngica (++) e filamentação (++ a +++) (tabela 8, figuras 17C-D e 18C-D).

Tabela 8 - Análise semi-quantitativa da presença de carga fúngica e filamentação de *C. albicans* (SC5314 e IAL-40) em larvas de *Galleria mellonella* não tratadas e tratadas com anfotericina B (AMB), miltefosina livre (MFS) e miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS.Alg).

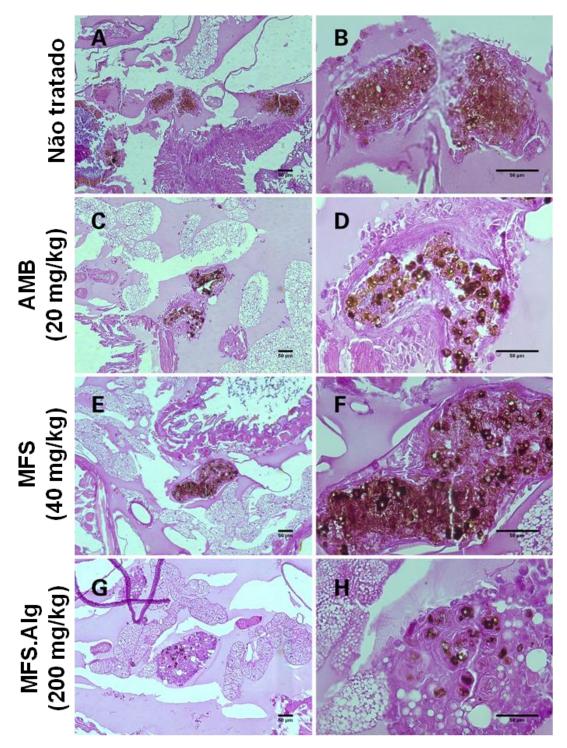
Grupos	Carga Fúngica	Filamentação
Candida albicans SC 5314		
SC 5314 não tratado	++++	+++
SC 5314 + MFS.Alg 200 mg/Kg	+	0
SC 5314 + MFS.Alg 100 mg/Kg	+	0
SC 5314 + MFS 40 mg/Kg	++	++
SC 5314 + MFS 20 mg/Kg	++	++
SC 5314 + MFS 10 mg/Kg	++	++
SC 5314 + AMB 20 mg/Kg	+	0
SC 5314 + AMB 10 mg/Kg	+	+
SC 5314 + AMB 1 mg/Kg	++	++
Candida albicans IAL - 40		
IAL – 40 não tratado	++++	+++
IAL - 40 + MFS.Alg 200 mg/Kg	+	0
IAL - 40 + MFS.Alg 100 mg/Kg	++	++
IAL - 40 + MFS 40 mg/Kg	+++	+++
IAL - 40 + MFS 20 mg/Kg	+++	+++
IAL - 40 + MFS 10 mg/Kg	+++	+++
IAL - 40 + AMB 20 mg/Kg	++	++
IAL - 40 + AMB 10 mg/Kg	++	++
IAL - 40 + AMB 1 mg/Kg	+++	++

Figura 17 - Cortes histopatológicos de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *Candida albicans* SC 5314 não tratadas e tratadas com anfotericina B (AMB), miltefosina livre (MFS), miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS.Alg).



Carga fúngica e filamentação de *C. albicans* SC 5314 em larvas de *Galleria mellonella* não tratadas (**A-B**) e tratadas com AMB 20 mg/kg (**C-D**), MFS livre 40 mg/kg (**E-F**) e MFS.Alg 200 mg/kg (**G-H**). Figuras da coluna direita é uma região aumentada em 400 x das imagens da coluna esquerda obtidas em aumento de 100X. Barras = 50 µm.

Figura 18 - Cortes histopatológicos de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *Candida albicans* IAL-40 não tratadas e tratadas com anfotericina B (AMB), miltefosina livre (MFS), miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS.Alg).



Carga fúngica e filamentação de *C. albicans* IAL-40 em larvas de *Galleria mellonella* não tratadas (**A-B**) e tratadas com AMB 20 mg/kg (**C-D**), MFS livre 40 mg/kg (**E-F**) e MFS.Alg 200 mg/kg (**G-H**). Figuras da coluna direita é uma região aumentada em 400 x das imagens da coluna esquerda obtidas em aumento de 100X. Barras = 50 µm.

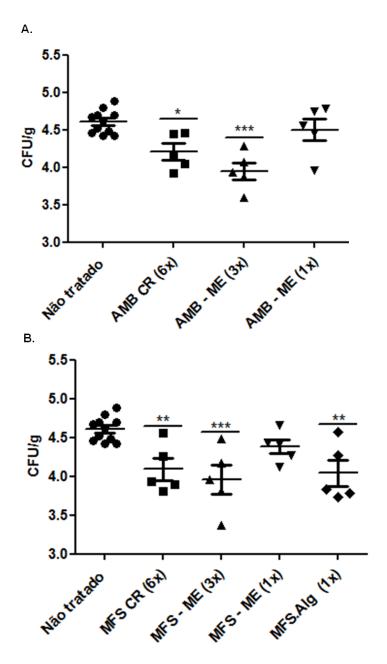
5.12 Modelo murino de candidíase vaginal

Camundongos de linhagem BALB/c fêmeas foram infectadas com leveduras de C. albicans SC 5314 (3x106 UFC no canal vaginal) e tratadas após 24 horas da infecção com AMB e MFS incorporadas em creme (formulação convencional) e em sistemas de liberação sustentada (microemulsão e/ou nanopartículas de alginato) em diferentes regimes de doses. No sétimo dia após o início da terapia, os animais foram sacrificados e a carga fúngica do tecido vaginal foi quantificada (figura 19). Nota-se que houve uma redução estatisticamente significativa da carga fúngica no tecido vaginal dos animais tratados com as seguintes formulações: AMB-CR (6x), AMB-ME (3x), MFS-CR (6x), MFS-ME (3x) e MFS.Alg (1x). Entre as formulações de AMB (figura 19A), a microemulsão [AMB-ME (3x)] apresentou-se mais eficaz em relação a formulação em creme AMB-CR (6x). No caso das formulações de MFS (figura 19B) ocorreu redução da carga fúngica das vaginas quando tratadas com MFS-CR (6x), MFS-ME (3x) e MFS.Alg (1x); interessantemente, dentre essas formulações, a mais vantajosa foi a MFS.Alg (1x) por ter sido usada como terapia de dose única, além disso, mostrou uma redução da carga fúngica muito semelhante ao da formulação em creme (MFS-CR 6x), que, para esta ter tal efeito, foi necessário a administração diária por 6 dias.

A análise semi-quantitativa do tecido vaginal corrobora com os achados de carga fúngica (tabela 9 e figura 20), em que podemos observar uma redução da carga fúngica nos animais tratados com as diferentes formulações destacando o tratamento com AMB-ME (3x). Das formulações envolvendo a MFS, houve uma redução da carga fúngica muito semelhante para todas as formulações testadas [MFS-ME (3x), MFS-ME (1x), MFS-Alg (1x) e MFS-CR (6x)].

Analisando o sistema das microemulsões pelo método de imageamento e decaimento da fluorescência (Figura 21 A e B), pode-se observar que a microemulsão (ME) ficou retida no canal vaginal até o final do sétimo dia de experimento, apresentando diferença estatística com os demais controles [ME (sem marcação), Propilenoglicol (PG) e creme (CR)].

Figura 19 - Carga fúngica no tecido vaginal de camundongos BALB/c fêmeas infectados com leveduras de *Candida albicans* SC 5314 e tratadas com anfotericina B e miltefosina incorporada em creme vaginal (AMB-CR e MFS-CR), em microemulsão (AMB-ME e MFS-ME) e em nanopartículas de alginato (MFS.Alg).

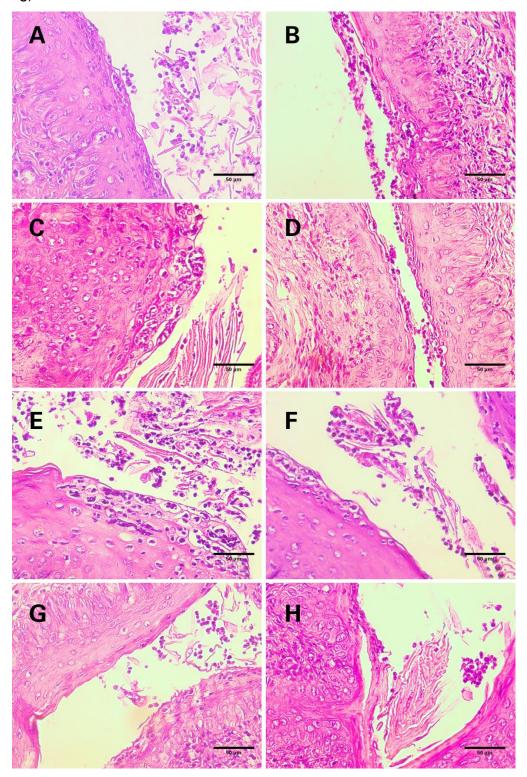


Os Animais foram infectadas por via vaginal com leveduras de *Candida albicans* SC5314 (3x10⁶ UFC/animal), tratadas: AMB-CR (6x), AMB-ME (3x) e AMB-ME (1x) (figura A); MFS-CR (6x), MFS-ME (3x), MFS-ME (1x) e MFS.Alg (1x) (figura B). No sétimo dia após a infecção, os animais foram sacrificados e a carga fúngica no tecido vaginal determinada como a razão de unidades formadoras de colônias por grama de tecido (UFC/g). *P < 0,05; **P<0,01 e ***p<0,001 quando comparados com o grupo não tratado (one-way ANOVA seguido por Dunnett's test).

Tabela 9 - Análise semi-quantitativa da carga fúngica e filamentação de *Candida albicans* SC5314 no tecido vaginal de camundongos BALB/c fêmeas não tratadas e tratadas com anfotericina B e miltefosina em creme vaginal (AMB-CR e MFS-CR), em microemulsões (AMB-ME e MFS-ME) e MFS em nanopartículas de alginato (MFS.Alg).

Carga Fúngica
++++
++
+
++
+++
+++
+++
+++

Figura 20 - Cortes histopatológicos do tecido vaginal de camundongos BALB/c fêmeas tratadas com anfotericina B e miltefosina em creme vaginal (AMB-CR e MFS-CR), em microemulsões (AMB-ME e MFS-ME) e MFS em nanopartículas de alginato (MFS.Alg).



Carga fúngica de *C. albicans* SC 5314 em tecidos vaginal de camundongos BALB/c fêmeas não tratadas ($\bf A$) e tratadas com AMB-CR (6x) ($\bf B$), AMB-ME (3X) ($\bf C$), AMB-ME (1X) ($\bf D$), MFS-CR (6x) ($\bf E$), MFS-ME (3X) ($\bf F$), MFS-ME (1X) ($\bf G$) e MFS.Alg (1x) ($\bf H$). Figuras aumentadas em 400 x. Barras = 50 μ m.

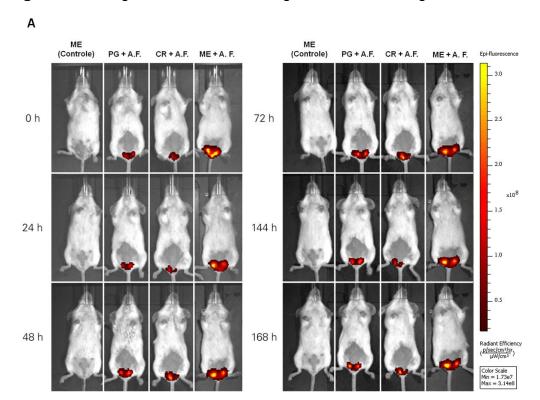
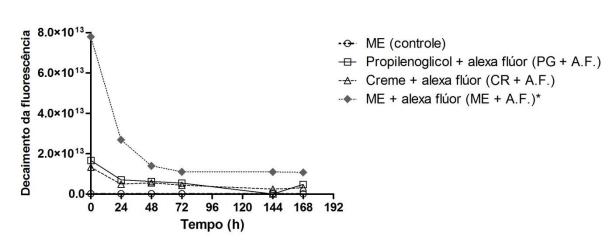


Figura 21 - Imageamento do tecido vaginal de camundongos BALB/c fêmeas.





A) Imageamento dos camundongos nos tempos 0, 24, 48, 72, 144 e 168 horas após a administração intravaginal de 30 μL de: microemulsão sem alexa flúor [ME (controle)], Propilenoglicol com alexa flúor (PG + A.F.); Creme com alexa flúor (CR + A.F.); ME com alexa flúor (ME + A.F.); **B)** Decaimento da fluorescência como uma função de tempo de cada grupo avaliado em A. n = 1 animal por grupo e a média de intensidade de fluorescência foi obtida de 5 imagens de cada tempo; * p<0,05 quando comparado com ME (controle) versus ME + A.F. (ANOVA seguido por teste de Tukey).

6 DISCUSSÃO

Nas últimas duas décadas houve um aumento na incidência de candidemia em várias regiões do mundo, esta doença é responsável por altas taxas de mortalidade sendo um agravante em pacientes imunocomprometidos por apresentarem fatores de riscos (FALAGAS; ROUSSOS; VARDAKAS, 2010). Algumas cepas de Candida vêm apresentando resistência aos antifúngicos de primeira escolha contribuindo com altas taxas de mortalidade (~40%) (CHAPMAN et al., 2016). O medicamento mais utilizado para o tratamento de micoses sistêmicas causada por leveduras é o fluconazol, fármaco sintético pertencente a classe dos azóis (FRANCESCO et al., 2017). Algumas espécies de Candida não - suscetíveis ao fluconazol apresentam resistência intrínseca a este azol, as espécies, tais como C. krusei, C. glabrata, Candida guilliermondii, Candida inconspicua, Candida norvegensis, Candida rugosa, Candida lipolytica, Candida palmioleophila e Candida auris (JENSEN., 2016; MORIO et al., 2017). Em vista disso, neste presente estudo, cepas de Candida spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol foram avaliadas a fim de avaliar novas moléculas e/ou formulações alternativas para o desenvolvimento de novas terapias antifúngicas contra as cepas resistentes ao fluconazol.

A MFS é um composto alquilfosfocolina, possui diferentes ações farmacológicas, incluindo a atividade antifúngica, porém exibe uma elevada toxicidade (DORLO et al., 2012). Dessa forma, estratégias como sintetizar análogos estruturais da MFS bem como incorporá-la em sistemas nanoestruturados podem ser alternativas importantes para reduzir os efeitos colaterais do fármaco. O encapsulamento da MFS em nanopartículas de alginato, por exemplo, pode contribuir para melhorar o perfil farmacológico e, também, agir como um agente carreador reduzindo a toxicidade do fármaco.

Os estudos mostram que MFS possui um amplo espectro de ação contra diversos gêneros de fungos, em concentrações entre 0,12 e 8 µg/mL, como: *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Aspegillus* spp., *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp., *Sporothrix* spp; *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides posadasii e Paracoccidioides* spp. (revisado por DORLO et al., 2012; IMBERT et al., 2014; BRILHANTE et al., 2015; BORBA-SANTOS et al., 2015; ROSSI et al., 2017). Assim como Widmer et al. (2006) e Vila et al. (2015) obtivemos dados de atividade inibitória

similares sobre leveduras de *Candida* spp. (Valores de Cl₅₀ e Cl₉₀ entre 0,06 a 2 μg/mL) e efeito fungicida em concentrações próximas de Cl₅₀ e Cl₉₀ (1 a 2 μg/mL), incluindo os isolados resistentes ao fluconazol.

Além da MFS possuir ação antifúngica com efeito fungicida e de ser uma molécula em potencial para seu uso no tratamento de candidíases, o seu análogo Composto 1 avaliado neste trabalho, mostrou os melhores valores de CIM em comparação com os outros análogos (Compostos 2 e 4); entretanto com ação inferior quando comparado a MFS. Ravu et al. (2013) sintetizaram análogos da MFS modificando a unidade estrutural da colina e o comprimento da cadeia de alquil da MFS. sendo análogo (N-benzyl-N, N-dimethyl-2-0 {[(hexadecyloxy)hydroxyphosphinyl]oxy}ethanaminium inner salt) o composto de menor citotoxicidade e atividade antifúngica similar quando comparado a MFS (CIM entre 2,5 a 5,0 μg/mL) para os seguintes fungos testados: C. albicans, C. glabrata, C. krusei, A. fumigatus, e C. neoformans. Vila et al (2013) mostraram que análogos da MFS (TCAN26 e TC19) apresentaram atividade antifúngica sobre células planctônicas e de biofilmes de C. albicans. Borba-Santos et al. (2016) testaram análogos da miltefosina (TCAN26, TC19 e TC70) contra leveduras da espécie S. schenckii, o análogo TCAN26 apresentou valores de CIM (0,5 μg/mL) similar a MFS (1 μg/mL) sendo fungicida contra esta levedura (BORBA-SANTOS et al., 2016). Além disso, estes análogos foram menos tóxicos que a MFS para células de mamíferos, sendo o TCAN26 mais seletivo para os fungos do que a MFS (VILA et al., 2013; BORBA-SANTOS et al., 2016).

A ação da MFS está relacionada com apoptose e com a perturbação das membranas celulares e das vias de sinalização de células dependentes de lipídeos em células tumorais e de protozoário (DORLO et al., 2012). Em estudos com linhagens de células neoplásicas, a MFS tem sido relatada por desencadear vias de sinalização que levam a célula fúngica a apoptose e, por inibir enzimas envolvidas no metabolismo dos fosfolipídeos, tais como: proteína kinase C, fosfolipases A2, C e D (ZUO et al., 2011). Ensaios feitos com altas concentrações da MFS, tiveram como observação que a droga forma estruturas parecidas com poros na membrana celular, ocasionando a liberação do conteúdo intracelular e interferência na homeostase celular (WIDER et al., 1999; ZUO et al., 2011).

Com essas informações pode-se indicar que a MFS provavelmente age na membrana plasmática do fungo, tendo em vista os ensaios realizados no presente trabalho, sugere-se que a MFS interage com o ergosterol exógeno, reduzindo a disponibilidade do fármaco e, portanto, diminuindo a ação antifúngica já que o composto se liga no ergosterol externo e não no ergosterol da célula. Nossos dados demonstram que a MFS, o seu análogo (Composto 1) e o antifúngico padrão AMB apresentaram ação fungicida em *C. albicans* SC5314. Assim, os dados do ensaio de competição com ergosterol exógeno, extravasamento de DNA/proteínas e de viabilidade fúngica sugerem que a MFS e seu análogo estejam interagindo diretamente com o ergosterol presente na membrana celular fúngica, resultando em morte celular da levedura por alterar a permeabilidade de membrana. Recentemente, Spadari et al., (2018) observou que o efeito fungicida da MFS sobre leveduras de Cryptococcus spp. está relacionado ao processo de apoptose induzida pelo aumento da permeabilidade da membrana e alteração do potencial da membrana mitocondrial acarretando no aumento da produção de ROS e consequente danos no DNA (SPADARI et al., 2018).

Diferentes modelos de roedores foram desenvolvidos para reproduzir diferentes formas clínicas de candidíase e modelos murinos são considerados padrão ouro para estudar patogênese e analisar a eficácia do tratamento antifúngico. No entanto, considerações econômicas, logísticas, e éticas limitam o uso de mamíferos em experimentos de infecção (AMORIM-VAZ et al., 2015). Como uma abordagem alternativa modelos de invertebrados vêm sendo padronizados e utilizados, dentre eles a fase larvária do inseto *G. mellonella* (AMORIM-VAZ et al., 2015). A larva de *G. mellonella* é encontrada naturalmente em colméias de abelhas e se alimentam de cera, mel e pólen; entram em contato com diversos micro-organismos e com isso, possuem respostas imunológicas desenvolvidas (FUCHS et al., 2010). O ciclo de vida deste lepidóptero é de aproximadamente 8 semanas. Após a eclosão dos ovos, a lagarta dispõe de 6 estágios larvais previamente da última instar, isso ocorre entre a quinta e sexta semana, armazenadas a temperatura de 25 - 28°C. Posteriormente sucede o período pré-pupa e pupa, e em duas semanas as mariposas aparecem (WOJDA, 2016).

Foi padronizado a produção das larvas de *G. mellonella* no Laboratório de Quimioterapia Antifúngica (LQA). Fatores como alimentação, e temperatura de incubação foram fundamentais para a cultivação de larvas de boa qualidade. Além da

ração, foi padronizada a utilização de cera de abelha e pólen para a obtenção de um bom crescimento e uma boa reprodução dos insetos. A temperatura ótima de incubação para o desenvolvimento larval é de 29-33°C (WARREN; HUDDLESTON., 1962; NIELSEN; BRISTER,.1979; KWADHA et al., 2017). No laboratório de pesquisa a temperatura implantada para a reprodução e manutenção das larvas foi de 30°C como previamente recomendado por outros grupos de pesquisa do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os insetos adultos de *Galleria mellonella* são as mariposas. As larvas de *G. mellonella* ficam no estágio larval (prépupa) de aproximadamente 28 dias a 6 meses (KWADHA et al., 2017). O ciclo completo do inseto *G. mellonella* em nosso laboratório ocorre em torno de 40 dias em estufa com a temperatura a 30°C usando pólen e cera de abelha como alimento; e este tempo pode variar de acordo com a temperatura, estação do ano e alimentação.

Estudos de virulência têm demonstrado que para a utilização das larvas em modelo experimental, estas devem estar grandes com cerca de 2,0 cm de comprimento, aproximadamente 180 mg e apresentar coloração creme. A rota mais comum de infecção é feita pela *pro-leg* esquerda da larva. Após a infecção, as lagartas podem ser mantidas em temperaturas de 37°C correspondendo com a temperatura fisiológica dos mamíferos (LIONAKIS, 2011; DALTON et al., 2017).

Cotter, Doyle e Kavanagh (2000), estudaram a patogênese de diferentes espécies de Candida utilizando o modelo de invertebrado de G. mellonella, a pesquisa foi feita para distinguir cepas patogênicas de não patogênicas e diferenciar a virulência. Como conclusão, observaram que os isolados de C. albicans possuem uma grande habilidade de matar as larvas de G. mellonella devido a expressão dos fatores de virulência dessa levedura. Além disso, visualizaram que existe uma hierarquia entre as espécies na capacidade de matar as larvas, a ordem inicia-se por C. albicans. seguida por C. tropicalis, C. parapsilosis, Candida pseudotropicalis, C. krusei e C. glabrata indicando que este modelo pode ser empregado para diferenciar a virulência de cepas fúngicas e ser aplicado como um experimento de triagem. Corroborando com Cotter, Doyle e Kavanagh (2000), nossos dados indicam que os isolados da espécie de C. albicans apresentaram maior virulência em comparação com C. tropicalis e C. glabrata utilizando o modelo de invertebrado G. mellonella.

As larvas de G. mellonella têm sido utilizadas em muitos estudos para avaliar a virulência de outros agentes fúngicos patogênicos, incluindo C. neoformans, F. oxysporum, A. fumigatus, H. capsulatum e P. lutzii (GAGO et al., 2014). Essas larvas podem ser mantidas a temperatura de 37°C correspondendo com a temperatura fisiológica dos mamíferos (LIONAKIS, 2011). Tendo em vista que alguns fatores de virulência de alguns micro-organismos são regulados pela temperatura, e isto se torna um elemento interessante para estudo da patogênese e para a avaliação de agentes antifúngicos, tornando este modelo atraente (LI et al., 2013). Portanto, os estudos têm mostrado que o sistema imunológico de G. mellonella possui uma semelhança estrutural e funcional com o sistema imunológico inato de mamíferos (FRENKEL et al., 2016), mostrando similaridade entre o modelo de G. mellonella e de murinos no processo de patogênese por Candida spp. (BRENNAN et al., 2002). Esta correlação pode nortear a substituição do modelo murino pelo modelo de invertebrado G. mellonella para triagem de estudos de virulência, patogênese e triagem de agentes antifúngicos (AMORIM-VAZ et al., 2015). Portanto, antes da utilização do modelo experimental em murinos, é importante a utilização alternativa de um outro modelo, com o intuito de reduzir custos e, também, por motivos éticos, ressaltando os princípios dos três "Rs" (Refining, Reduction e Replacement) (HARTUNG., 2010; SINGULANI et al., 2016).

Inicialmente, foi realizado o ensaio da toxicidade da AMB, MFS livre e MFS em nanopartículas de alginato (MFS.Alg) em modelo de invertebrado de *G. mellonella*. A MFS livre apresentou resultados de toxicidade semelhantes ao encontrado para a AMB. Nas maiores doses da MFS (400 mg/Kg e 200 mg/Kg) houve 77,77% de larvas sobreviventes e para a AMB (200 mg/Kg), 72,22% das larvas sobreviveram no final do experimento. Por outro lado, MFS.Alg foi significativamente menos tóxica que a MFS livre, apresentando 100% de sobrevida nas doses de 200 mg/kg e 100 mg/kg.

Após a avaliação da toxicidade, foi avaliada a eficácia antifúngica da MFS.Alg em larvas de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* e comparando com MFS livre e o antifúngico padrão AMB. A padronização desse ensaio foi baseada no estudo de Li et al. (2013) em que avaliaram a eficácia antifúngica da AMB em larvas infectadas com diferentes isolados de *C. albicans* sensíveis e resistentes ao fluconazol. Como conclusão, foi observado que a AMB apresentou uma eficácia dose-dependência, isto é a maior dose (6,4 mg/Kg) foi responsável por maiores taxas de sobrevida enquanto

que a menor dose do fármaco (0,4 mg/Kg) resultou em 100% de mortalidade das larvas (LI et al., 2013). Usando as mesmas condições experimentais (5×10⁵ UFC/larva) e tratamento antifúngico após 30 minutos da infecção, nossos dados corroboram com Li et al. (2013), em que a AMB agiu de maneira semelhante apresentando o perfil dose dependente. Para a MFS livre, houve maiores taxas de sobrevivência nas seguintes nas doses de 40 mg/Kg e 20 mg/Kg. Já para a nanopartícula encapsulada com a miltefosina (MFS.Alg) houve maior proteção das larvas de *G. mellonella* para a dose de 200 mg/kg.

A MFS consiste em apresentar ação antifúngica, porém causa efeitos tóxicos para o hospedeiro, incluindo problemas no trato gastrointestinal, renal, hepático e ação hemolítica (DORLO et al., 2012). Devido a isso, estudos têm sido realizados para encontrar novas alternativas para diminuir os efeitos fármaco. Bitencourt et al. (2016) associaram a MFS a nanopartículas lipídicas contendo colesterol, essa estratégia de formulação foi avaliada em camundongos BALB/c fêmeas indicando a redução da irritação epitelial no trato gastrointestinal quando comparadas com a MFS livre. Em testes in vitro a formulação lipídica mostrou redução nos efeitos hemolíticos concluindo que essa nova estratégia é promissora para o tratamento da leishmaniose (BITENCOURT et al., 2016). El-Mostemany et al. (2016) utilizaram uma nova alternativa da MFS associada a nanopartículas lipídicas com o intuito de um tratamento por via oral em casos de esquistossomose causada pelo parasita Schistosomiasis mansoni. Nesse estudo foi observada a redução do parasita em estágio invasivo de 91,6% para 76,8% em modelo murino, indicando que esta forma de terapia é promissora e pode ser uma alternativa para o tratamento desta doença (EL-MOSTEMANY et al., 2016). Outro estudo por Eissa et al., (2015), associaram a MFS em nanocápsulas lipídicas para o tratamento de Schistosomiasis mansoni por administração oral, dose única. Em modelo murino, foi verificado redução dos efeitos hepáticos e sucesso terapêutico, eliminando significativamente a carga total de vermes (EISSA et al., 2015).

Dentro deste contexto, a incorporação da MFS em carreadores poliméricos; como nanopartículas de alginato usadas neste trabalho; pode contribuir para a redução da toxicidade da MFS atuando como um sistema de liberação controlada como demonstrados em experimentos prévios (Depósito da Patente no INPI sob no. BR 10 2017 018011 5, data: 23/08/2017). Apesar do tratamento com a formulação

MFS.Alg ter sido utilizada em dosagens 10x maiores que a da MFS livre em modelo de invertebrado de *G. mellonella*, a formulação não apresentou toxicidade para as larvas, resultando em 100% de sobrevivência no final da observação em doses de até 200 mg quando nanocarreado. A MFS livre foi eficiente devido a sua ação imediata, já a formulação (MFS.Alg) promove uma liberação controlada e sustentada da MFS para o meio aquoso. Essa característica de liberação controlada pode ser vantajosa pois além de reduzir a toxicidade, como visto aqui, pode-se aumentar o intervalo da administração do fármaco.

Em modelo murino de candidíase vaginal a MFS.Alg (2% de MFS, dose única), foi a mais eficiente dentre as formulações de MFS testadas. Com apenas uma dose administrada via intravaginal 24 horas após a infecção, foi possível observar a redução da carga fúngica do tecido vaginal no 7º dia após o início do tratamento. O alginato é um polímero que possui uma importante propriedade mucoadesiva e de acordo com os dados obtidos nesse estudo, pode-se dizer que a MFS.Alg proporcionou o efeito mucoadesivo e a liberação controlada da MFS neste sistema nanoparticulado.

Com relação ao sistema de liberação microemulsionado contendo MFS (MFS-ME 2%) ou AMB (AMB-ME 1,25%), o tratamento com 3 administrações em dias intercalados também foi eficiente, com redução estatística da carga fúngica do tecido vaginal dos camundongos. A microemulsão forma um sistema líquido-cristalino por conter monoleína e contato com a água; em estudos Geraghty e colaboradores (1995) (1996) verificaram que in vitro a monoleína num sistema de gel líquido cristalino promoveu a liberação controlada de substâncias por cerca de 18 horas. Em outro estudo, os autores verificaram que a monoleína em gel permanece retida no canal vaginal por no mínimo 6 horas (GERAGHTY el al, 1995; GERAGHTY et al, 1996; GANEM-QUINTANAR, QUINTANAR-GUERRERO, BURI, 1996). Esses dados corroboram com os nossos obtidos através do ensaio de imageamento do tecido vaginal, tendo em vista que as microemulsões permaneceram na região vaginal dos animais por até 168 horas. Além disso, sistemas microemulsionados permitem a solubilização de fármacos lipofílicos e hidrofílicos (FORMARIZ et al, 2005). Durante a manipulação das microemulsões (MFS-ME e AMB-ME) ambos os fármacos foram bem solubilizados nesse sistema, outra vantagem identificada é que a manipulação das microemulsões são extremamente fácil, simples e rápida.

No caso da AMB em creme, o processo foi mais trabalhoso pois a solubilização desse composto foi realizada usando DMSO para que ocorresse a incorporação no creme. Ambas as formulações em creme da MFS e AMB, com administração diária por 6 dias, mostraram redução da carga fúngica no tecido vaginal, porém as formulações em sistemas de liberação controlada [MFS.Alg(1x), MFS-ME (3x) e AMB-ME (3x)] apresentaram melhores resultados do que as formulações em creme, devido às propriedades mucoadesivas, solubilização dos fármacos, liberação controlada e sustentada e permanência no canal vaginal por um longo período (no caso das microemulsões). Dados de imageamento da formulação de MFS.Alg em gel de alginato 1% está sendo realizado para observar a permanência dessa formulação no canal vaginal.

Nos testes de susceptibilidade *in vitro*, verificamos que a MFS em nanopartículas de alginato (MFS.Alg) mostrou valores de CIM elevados, entre 37,5 - 600 µg/mL, esses valores encontrados são consideravelmente altos quando comparado aos valores obtidos para a MFS livre. Vale ressaltar que o principal objetivo do nosso projeto é de diminuir os efeitos colaterais da MFS pela liberação controlada e sustentada da MFS, e, manter a atividade antifúngica similar a MFS livre.

Dados da literatura têm demonstrado que alguns antifúngicos (Ex. Anfotericina B) carreados em partículas (nano- ou micro-) podem apresentar menor atividade antifúngica *in vitro* quando comparado com a formulação convencional; por outro lado, em modelo animal a atividade antifúngica apresenta-se similar ou melhor, e também, diminui os efeitos toxicológicos associados ao antifúngico na formulação convencional e/ou diminui os intervalos da administração do fármaco (KHAN et al., 2016; SALDANHA et al., 2016; TESSA et al., 2016) (exemplos: Khan et al. Antifungal efficacy of amphotericin B encapsulated fibrin microsphere for treating *Cryptococcus neoformans* infection in Swiss albino mice. braz j infect dis 2 0 1 6;2 0(4):342–348; Saldanha et al Antifungal Activity of Amphotericin B Conjugated to Nanosized Magnetite in the Treatment of Paracoccidioidomycosis. PLoS Negl Trop Dis 2016, 10(6): e0004754; Tessa et al. Characterization of a Polyethylene Glycol-Amphotericin B Conjugate Loaded with Free AMB for Improved Antifungal Efficacy. PLoS ONE 2016, 11(3): e0152112).

Em contrapartida, apesar do insucesso da MFS.Alg *in vitro*, nos modelos *in vivo* de *G. mellonella* e de murino foi possível observar a sua eficácia antifúngica,

confirmando o seu propósito. Além da redução da toxicidade observado em modelo de *G. mellonella*, foi visto a proteção das larvas em sistêmico e sucesso da terapia em dose única em modelo murino de candidíase vaginal. Com isso, pode-se dizer que os dados verificados *in vitro* não refletem os efeitos observados *in vivo*, indicando que os modelos *in vivo* são de grande importância e relevância para confirmar a ação farmacológica de um composto testado.

7 CONCLUSÃO

- A miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS.Alg) foram caracterizadas obtendo valores de tamanho médio entre 300 e 400 nm, Pdi< 0,3 e potencial zeta de -27,2 mV.
- A fase hexagonal da microemulsão forma-se em 4 horas, com a formação desse sistema é possível obter a liberação controlada da miltefosina ou anfotericina B quando incorporadas nesse veículo.
- Miltefosina mostrou ação fungicida contra todas as cepas de *Candida* spp. testadas, incluindo os isolados resistentes ao fluconazol; dentre os análogos da MFS testados (Composto 1, 2 e 4) o Composto 1 apresentou melhor atividade antifúngica.
- Anfotericina B, Miltefosina e Composto 1 apresentaram efeito fungicida de maneira tempo e dose dependente;
- A Anfotericina B, miltefosina e o composto 1 podem interagir com o ergosterol da membrana plasmática alterando a permeabilidade de membrana e reduzindo a viabilidade celular.
- Foi estabelecido a criação e manutenção do inseto *Galleria mellonella* completando o ciclo de vida em aproximadamente 40 dias.
- Nos ensaios de virulência utilizando o modelo de invertebrado de *Galleria mellonella*, observou-se que as cepas mais virulentas foram as de *C. albicans*.
- A miltefosina em nanopartículas de alginato (MFS.Alg) possui menor efeito tóxico que a miltefosina livre no modelo de *Galleria mellonella*.
- No modelo sistêmico de candidíase em *Galleria mellonella* MFS.Alg reduziu as taxas de mortalidade e morbidade de larvas infectadas por *Candida albicans* bem como reduziu a carga fúngica e a filamentação do fungo no tecido larvário. Dados similares foram observados para a miltefosina livre e para o antifúngico padrão anfotericina B.
- No modelo murino de candidíase vaginal as formulações da miltefosina e anfotericina B em creme [MFS-CR (6x) e AMB-CR (6x), microemulsões (MFS-ME (3x), AMB-ME (3x)] e em nanopartículas de alginato [MFS.Alg (1x)] foram eficientes em reduzir a carga fúngica.

- No ensaio de imageamento dos camundongos, foi possível observar que a microemulsão manteve-se no canal vaginal até 7 dias.

Dessa forma, demonstramos que novas alternativas podem ser desenvolvidas para contornar dificuldades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de um fármaco. Os resultados obtidos mostram o potencial antifúngico da miltefosina, e dentre os seus análogos o Composto 1 foi o que melhor apresentou atividade antifúngica. Os sistemas de liberação controlada de fármacos (nanopartículas de alginato e microemulsões) foram capazes reduzir efeitos colaterais e reduzir a carga fúngica nos tecidos infectados, podendo ser alternativas terapêuticas para o tratamento de candidíase vaginal e sistêmica.

REFERÊNCIAS*

AMORIM-VAZ S, DELARZE E, ISCHER F, SANGLARD D, COSTE AT. Examining the virulence of *Candida albicans* transcription factor mutants using *Galleria mellonella* and mouse infection models. Front. microbiol., v. 6, p. 367, 2015.

BACHHAV YG, PATRAVALE VB. Microemulsion-Based Vaginal Gel of Clotrimazole: Formulation, In Vitro Evaluation, and Stability Studies. AAPS PharmSciTech, v. 10, no. 2, 2009.

BARNHART, K. Safety and efficacy of bedtime versus daytime administration of the miconazole nitrate 1200 mg vaginal ovule insert to treat vulvovaginal candidiasis. Curr. Med. Res. Opin. v. 21, p. 127–134, 2005.

BITENCOURT, J.J.G. et al. Miltefosine-loaded lipid nanoparticles: Improving miltefosine stability and reducing its hemolytic potential toward erythtocytes and its cytotoxic effect on macrophages. Biophysical Chemistry, v. 217 p. 20–31, 2016.

BRADFORT LL, RAVEL J. The vaginal mycobiome: A contemporary perspective on fungi in women's health and diseases. Virulence, v. 8, no. 3, p. 342-351, 2018.

BRENNAN M, THOMAS DY, WHITEWAY M, KAVANAGH K. Correlation between virulence of Candida albicans mutants in mice and Galleria mellonella larvae. FEMS Immunol. Med. Microbiol. v. 34, n. 2, p. 153-7, 2002.

BORBA-SANTOS LP, GAGINI T, ISHIDA K, DE SOUZA W, ROZENTAL S. Miltefosine is active against Sporothrix brasiliensis isolates with in vitro low susceptibility to amphotericin B or itraconazole. Journal Medical Microbiology, 2015.

BORBA-SANTOS LP, ISHIDA K, CALOGEROPOULOU T, SOUZA W, ROZENTAL S. Adamantylidene-substituted alkylphosphocholine TCAN26 is more active against Sporothrix schenckii than miltefosine. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 111, p.523-527, 2016.

BRILHANTE RS, MALAQUIAS AD, CAETANO EP, CASTELO-BRANCO DDE S, LIMA RA, MARQUES FJ, SILVA NF, ALENCAR LP, MONTEIRO AJ, CAMARGO ZP, BANDEIRA TDE J, RODRIGUES AM, CORDEIRO RDE A, MOREIRA JL, SIDRIM JJ, ROCHA MF. In vitro inhibitory effect of miltefosine against strains of Histoplasma capsulatum var. capsulatum and Sporothrix spp. Medical Mycology, v. 52, n. 3, p. 320-325, 2014.

^{*} De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002, 24 p.

BRILHANTE RSN, CAETANO EP, LIMA RAC, CASTELO BRANCO DSCM, SERPA R, OLIVEIRA JS, MONTEIRO AJ, ROCHA MFG, CORDEIRO RA, SIDRIM JJC. In vitro antifungal activity of miltefosine and levamisole: their impact on ergosterol biosynthesis and cell permeability of dimorphic fungi. Journal of Applied Microbiology, p. 1-8, 2015.

CALOGEROPOULOU, T. et al. Design and synthesis of potent antileishmanial cycloalkylidene-substituted ether phospholipid derivatives. Journal of medicinal chemistry, v. 51, n. 4, p. 897–908, 28 fev. 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Clifton Road Atlanta, Estados Unidos da América. Disponível em:https://www.cdc.gov/std/tg2015/candidiasis.htm. Acesso em: 07 jul. 2018.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Clifton Road Atlanta, Estados Unidos da América. Disponível em:https://www.cdc.gov/std/tg2015/candidiasis.htm. Acesso em: 07 jul. 2018.

CHAPMAN B, SLAVIN M, MARRIOTT D, HALLIDAY C, KIDD S, ARTHUR I, BAK N, HEATH CH, KENNEDY K, MORRISSEY CO, SORRELL TC, VAN HAL S, KEIGHLEY C, GOEMAN E, UNDERWOOD N, HAJKOWICZ K, HOFMEYR A, LEUNG M, MACESIC N, BOTES J, BLYTH C, COOLEY L, GEORGE CR, KALUKOTTEGE P, KESSON A, MCMULLAN B, BAIRD R, ROBSON J, KORMAN TM, PENDLE S, WEEKS K, LIU E, CHEONG E, CHEN S. Changing epidemiology of candidaemia in Australia. J Antimicrob Chemother, v. 72, p. 1103–1108, 2016.

CHAMPION OL, WAGLEY S, TITBALL RW. Galleria mellonella as a model host for microbiological and toxin research. Virulence, v. 7, p. 840-845, 2016.

CHARLIER C, HART E, LEFORT A, RIBAUD P, DROMER F, DENNING DW, LORTHOLARY O. Fluconazole for the management of invasive candidiasis: where do we stand after 15 years? Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 57, p. 384–410, 2006.

CHENG Y, YU S, ZHEN X, WANG X, WU W, JIANG X. Alginic acid nanoparticles prepared through counterion complexation method as a drug delivery system. ACS Applied Materials and Interfaces, v. 4, p. 5325-5332, 2012.

CI T., YUAN L., BAO X., HOU Y., WU H., SUN H., CAO D., KE C. Development and anti-Candida evaluation of the vaginal delivery system of amphotericin B nanosuspension-loaded thermogel. Journal of Drug Targeting, p. 1029-2330, 2018.

CLINICAL LABORATORY STANDARD INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A3. National committee for clinical laboratory standards, Villanova, Pa, 2008.

CLINICAL LABORATORY STANDARD INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement, M27-S4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Villanova, Pa, 2012.

COLOMBO AL, NUCCI M, PARK BJ, NOUE SA, ARTHINGTON-SKAGGS B, MATTA DA, WARNOCK D, MORGAN J. Epidemiology of Candidemia in Brazil: A Nationwide

Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. Journal of Clinical Microbiology, v. 44, p. 2816-2823, 2006.

COLOMBO AL, DE ALMEIDA JÚNIOR JN, GUINEA J. Emerging multidrug-resistant Candida species. Emerging multidrug-resistant Candida spp. v. 30, n. 6, p. 528 - 538, 2017.

COTTER G, DOYLE S, KAVANAGH K. Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeast. Immunology and Medical Microbiology, v. 27, p. 163-167, 2000.

COWEN LE, SANGLARD D, HOWARD S, ROGERS PD, PERLIN DS. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance, 2014.

DALMORA MEA, SALMORA SL, OLIVEIRA AG. Inclusion complex of piroxicam with b-cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect. Int. J. Pharm., v. 222, p. 45-55, 2001.

DALTON J. P. et al. A Novel Restraint Device for Injection of Galleria mellonella Larvae that Minimizes the Risk of Accidental Operator Needle Stick Injury. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 7, p. 99. 2017.

DE BERNARDIS F., GRAZIANI S., TIRELLI F., ANTONOPOULOU S. *Candida* vaginitis: virulence, host response and vaccine prospects. Medical Mycology, v. 56, p. 26 - 31, 2018.

DESAI JV, MITCHELL AP, ANDES DR. Fungal Biofilms, Drug Resistance, and Recurrent Infection. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, v. 4, p. 10, 2014.

DOI AM., PIGNATARI ACP, EDMOND B. M, MARRA AR, CAMARGO LFA, SIQUEIRA RA, DA MOTA VP, COLOMBO AL. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. Plos One, v.11, p. e0146909, 2016.

DOVNIK A, GOLLE A, NOVAK D, ARKO D, TAKAC I. Treatment of vulvovaginal candidiasis: a review of the literature. Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica, v. 24, p. 5-7, 2015.

DOI AM., PIGNATARI ACP, EDMOND B. M, MARRA AR, CAMARGO LFA, SIQUEIRA RA, DA MOTA VP, COLOMBO AL. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. Plos One, v.11, p. e0146909, 2016.

DORLO TPC, BALASEGARAM M, BEIJNEN JH, VRIES J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 67, p. 2576-2597, 2012.

DOVNIK A, GOLLE A, NOVAK D, ARKO D, TAKAC I. Treatment of vulvovaginal candidiasis: a review of the literature. Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica, v. 24, p. 5-7, 2015.

EISSA, M. M. et al. Miltefosine Lipid Nanocapsules for Single Dose Oral Treatment of Schistosomiasis Mansoni: A Preclinical Study. Plos One, v. 10, n. 11, p. e0141788, 2015.

EL-MOSLEMANY RM, EISSA MM, RAMADAN AA, EL-KHORDAGUI LK, EL-AZZOUNI MZ. Miltefosine lipid nanocapsules: Intersection of drug repurposing and nanotechnology for single dose oral treatment of pre-patent schistosomiasis mansoni. Acta tropica, v. 159, p. 142-148, 2016.

FALAGAS ME, ROUSSOS N, VARDAKAS KZ. Relative frequency of albicans and the various non-albicans Candida spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. International Journal of Infectious Diseases, v. 14, p. e954-e966, 2010.

FEUERSCHUETTE OHM, SILVEIRA SK, FEUERSCHUETTE I, CORRÊA T, GRANDO L, TREPANI A. Candidíase vaginal recorrente: manejo clínico Recurrent vaginal candidiasis: clinical management. Femina, v. 38 nº 2, 2010.

FERNÁNDEZ-RUIZ M, PUIG-ASENSIO M, GUINEA J, ALMIRANTE B, PADILLA B, ALMELA M, DIAZ-MARTÍN A, RODRÍGUEZ-BAÑO J, CUENCA-ESTRELLA M, AGUADO JM. *Candida tropicalis* bloodstream infection: Incidence, risk factors and outcome in a population-based surveillance. Journal of Infection, v. 71 p. 385-394, 2015.

FRENKEL M, MANDELBLAT M, ALASTRUEY- IZQUIERDO A, MENDLOVIC S, SEMIS R, SEGAL E. Pathogenicity of *Candida albicans* isolates from bloodstream and mucosal candidiasis assessed in mice and *Galleria mellonella*. Journal de mycologie medicale, v. 26, p. 1-8, 2016.

FORMARIZ TP., URBAN MCC., JÚNIOR AAS., GREMIÃO MMPD., OLIVEIRA AG. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 4, n. 3, 2005.

FUCHS BB, O'BRIEN E, EL KHOURY JB, MYLONAKIS E. Methods for using Galleria mellonella as a model host to study fungal pathogenesis. Virulence, v. 1:6, p. 475-482, 2010.

GAGO S, GARCÍA-RODAS R, CUESTA I, MELLADO E, ALASTRUEY-IZQUIERDO A. *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* virulence in the non-conventional host *Galleria mellonella*. Virulence, v. 5, p. 278-285, 2014.

GANEM-QUINTANAR, QUINTANAR-GUERRERO D, BURI P. The in vitro release of some antimuscarinic drugs from monoolein/water lyotropic liquid crystalline gels. Pharm. Res., v.13, p. 1265–1271, 1996.

GERAGHTY PB, ATTWOOD D, COLLET JH, DANDIKER Y, SMITH ARB, A monoolein lyotropic liquid crystalline system to deliver oxybutynin hydrochloride, AAPS Annual Meeting, 206 (1995).

GLÖCKNER A, CORNELY OA. Candida glabrata – unique features and challenges in the clinical management of invasive infections. Mycoses, V. 58, P. 445–450, 2015.

GONÇALVES B, FERREIRA C, ALVES CT, HENRIQUES M, AZEREDO J, SILVA S. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. Critical reviews in microbiology, v. 7828, p. 1-23, 2015.

HAMAD M, ABU-ELTEEN KH, GHALEB M. Estrogen-dependent induction of persistent vaginal candidosis in naïve mice. Mycoses, v. 47, p. 304-309, 2004.

HAMMAD NM, EL BADAWY NE, GHRAMH HA, AL KADY LM. Mannose-Binding Lectin: A Potential Therapeutic Candidate against Candida Infection. Biomed Res int, v, 2018, p. 8, 2018.

ILKIT M, GUZEL AB. The epidemiology, pathogenesis, and diagnosis of vulvovaginal candidosis: A mycological perspective. Informa Healthcare USA, v. 37(3), p. 250-261, 2011.

IMBERT S, PALOUS M, MEYER I, DANNAOUI E, MAZIER D, DATRY A, FEKKAR A. In Vitro Combination of Voriconazole and Miltefosine against Clinically Relevant Molds. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 58, n. 11, p. 6996-6998, 2014.

ISHIDA K, CASTRO RA, SANTOS LPB, QUINTELLA L, LOPES-BEZERRA LM, ROZENTAL S. Amphotericin B, alone or followed by itraconazole therapy, is effective in the control of experimental disseminated sporotrichosis by Sporothrix brasiliensis. Medical Mycology (Oxford. Print), v. 53, p. 34-41, 2015.

JABRA-RIZK MA, FALKLER WA, MEILLER TF. Fungal Biofilms and Drug Resistance. Emerging Infectious Diseases, v. 10, p. 14-19, 2004.

JACOBSEN ID, WILSON D, WÄCHTLER B, BRUNKE S, NAGLIK JR, HUBE B. Candida albicans dimorphism as a therapeutic target. Expert Rev. Anti Infect. Ther, v. 10, p. 85-93, 2012.

JENSEN RH. Resistance in human pathogenic yeasts and filamentous fungi: prevalence, underlying molecular mechanisms and link to the use of antifungals in humans and the environment. DANISH MEDICAL JOURNAL, v. 1, p. 1-34, 2016.

JIAO Y, UBRICH N, MARCHAND-ARVIER M, VIGNERON C, HOFFMAN M, LECOMPTE T, MAINCENT P. In Vitro and In Vivo Evaluation of Oral Heparin–Loaded Polymeric Nanoparticles in Rabbits. Circulation, v. 105, p. 230–235, 2002.

KAVANAGH K, FALLON J. Galleria mellonella larvae as models for studying fungal virulence. Fungal Biology Reviews, v. 24, p. 79-83, 2010.

KHAN AA, JABEEN M, ALANAZI AM, KHAN AA. Antifungal efficacy of amphotericin B encapsulated fibrin microsphere for treating Cryptococcus neoformans infection in Swiss albino mice. Braz J Infect Dis. v. 20, p. 342 - 348, 2016.

KIM JY. Human fungal pathogens: Why should we learn? Journal of Microbiology, v. 54, p. 145-148, 2016.

KUMAR, R. et al. Development of PLGA – PEG encapsulated miltefosine based drug delivery system against visceral leishmaniasis. Materials Science & Engineering C, v. 59, p. 748–753, 2016.

KWADHA C.A.et al. The Biology and Control of the GreaterWax Moth, Galleria mellonella. Insects, v. 8, p. 61, 2017.

LEPAK AL, ANDES DR. Antifungal Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. Cold Spring Harb Perspect Medicine, v. 5, p. 1-24, 2015.

LEYVA-GÓMEZ G., PIÑÓN-SEGUNDO E., MENDOZA-MUÑOZ N., ZAMBRANO-ZARAGOZA ML., MENSOZA-ELVIRA S., QUINTANAR-GUERRERO D. Approaches in Polymeric Nanoparticles for Vaginal Drug Delivery: A Review of the State of the Art. Int. J. Mol. Sci. **v.** 19, p.1549, 2018.

LEWIS RE. Current Concepts in Antifungal Pharmacology. Mayo Clinic proceedings, v.86, p. 805-817, 2011.

LI Y, DU M, CHEN L-A, LIU Y, LIANG Z. Nosocomial Bloodstream Infection Due to Candida spp. in China: Species Distribution, Clinical Features, and Outcomes. Mycopathologia, 2016.

LI DD, DENG L, HU GH, ZHAO LX, HU DD, JIANG YY, WANG Y. Using Galleria mellonella—Candida albicans Infection Model to Evaluate Antifungal Agents. Biol. Pharm. Bull, v. 36, p. 1482-1487, 2013.

LIONAKIS SM. Virulence Drosophila and Galleria insect model hosts. Virulence, v. 2:6, p. 521-5217, 2011.

LOCKHART SR, ETIENNE KA, VALLABHANENI S, FAROOQI J, CHOWDHARY A, GOVENDER NP, COLOMBO AL, CALVO B, CUOMO AC, DESJARDINS CA, BERKOW EL, CASTANHEIRA M, MAGOBO RE, JABEEN K, ASGHAR RJ, MEIS JF, JACKSON B, CHILLER T, LITVINTSEVA AP. Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant Candida auris on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. Clinical Infectious Diseases, v. 64, 2018.

LOH, J. M.; ADENWALLA, N.; WILES, S.; PROFT, T. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. *Virulence*, 4(5), 419-428, 2013.

LOPES LB., FERREIRA DA., DE PAULA D., GARCIA MTJ., THOMAZINI JA., FANTNI MCA., BENTLEY AMLB.Reverse Hexagonal Phase Nanodispersion of Monoolein and Oleic Acid for Topical Delivery of Peptides: *in Vitro* and *in Vivo* Skin Penetration of Cyclosporin A. Pharmaceutical Research, v. 23, no. 6, 2006.

LOPES LB, SPERETTA FFF, BENTLEY MVLB. Enhancement of skin penetration of vitamin K using monoolein-based liquid crystalline systems. European journal of pharmaceutical sciences, v. 32, p. 209–215, 2007.

LOPEZ JEM. Candidiasis (vulvovaginal). Clinical Evidence, v. 03, p. 815, 2015.

LUIZ RLF, VILA TVM, ISHIDA K, MELLO JCP, NAKAMURA, CV, ROZENTAL S. Effect of Condensed Tannins from Stryphnodendron adstringens on Candida albicans Biofilm Formation. BMC complementary and alternative medicine, v.15, p. 68, 2015.

MCCARTHY MW., WALSH TJ. Drugs currently under investigation for the treatment of invasive candidiasis. EXPERT OPINION ON INVESTIGATIONAL DRUGS, v. 26, p. 825–831, 2017.

MARTIN-VILLENA MJ, FERNÁNDEZ-CAMPOS F, CALPENA-CAMPMANY AC, FEBRER NB, RUIZ-MARTÍNEZ MA, CLARES-NAVEROS B. Novel microparticulate systems for the vaginal delivery of nystatin: Development and characterization. Carbohydrate Polymers, v. 94, p. 1-11, 2013.

MARTIN M, CALPENA AC, FERNÁNDEZ F, MALLANDRICH M, GÁLVEZ P, CLARES B. Development of alginate microspheres as nystatin carriers for oral mucosa drug delivery. Carbohydrate Polymers, v. 117, p. 140-149, 2015.

MAYER FL, WILSON D, HUBE B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence, v. 4, p. 119-128, 2013.

MESA-ARANGO AC †, FORASTIERO A, Í NEZ LB-M, CUENCA-ESTRELLA M, MELLADO E, ZARAGOZA O. The non-mammalian host Galleria mellonella can be used to study the virulence of the fungal pathogen Candida tropicalis and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. Medical Mycology, v. 51, p.461-472, 2013.

MORIO F, JENSEN RH, LE PAPE P, ARENDRUP MC. Molecular basis of antifungal drug resistance in yeasts. International Journal of Antimicrobial Agents, 2017.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M.A. Microbiologia Médica. 7^a ed. Elsevier Saúde, 2014. 888 p.

NIELSEN R. A.; BRISTER C. Greater wax moth: Behavior of larvae. Ann. Entomol. Soc, V. 72, P. 811-815, 1979.

MIGOTTO A, CARVALHO VFM, SALATA GC, DA SILVA FWM, YAN CYI, ISHIDA K, COSTA-LOTUFO LV, STEINER AA, LOPES LB. Multifunctional nanoemulsions for intraductal delivery as a new platform for local treatment of breast cancer. Drug Delivery, v. 25, N. 1, p. 654–667, 2018.

MTIBAA L., FAKHFAKH N., KALLEL A., BELHADJ S., SALAH NB., BADA N., KALLEL K. Vulvovaginal candidiasis: Etiology, symptomatology and risk factors. Journal de Mycologie Médicale, v. 27, p. 153—158, 2017.

NUCCI M, QUEIROZ-TELLES F, ALVARADO-MATUTE, TIRABOSCHI IN, CORTES J, ZURITA J, GUZMAN-BLANCO M, SANTOLAYA ME, THOMPSON L, SIFUENTES-OSORNIO J, ECHEVARRIA JI, COLOMBO AL. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey, Plos one, v. 8, 2013.

NGUYEN MH, CLANCY CJ, YU YC, MORRIS AJ, SNYDMAN DR, RINALDI MG. Do in vitro susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B?

Results of a prospective study of patients with Candida fungemia. J Infect Dis., v.177(2), p. 425-30, 1998.

PALMEIRA-DE-OLIVEIRA R., PALMEIRA-DE-OLIVEIRA A., MARTINEZ-DE-OLIVEIRA J. New strategies for local treatment of vaginal infections. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 92, p. 105-122, 2015.

PANDEY R, KHULLER GK. Polymer based drug delivery systems for mycobacterial infections. Current Drug Delivery v. 1, p. 195–201, 2004a.

PANDEY R, KHULLER GK. Subcutaneous nanoparticle based antitubercular therapy in an experimental model. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 54, p. 266–268, 2004b.

PANDEY R, AHMAD Z, SHARMA S, KHULLER GK. Nano-encapsulation of azole antifungals: potential applications to improve oral drug delivery. International Journal of Pharmaceutics, v. 301, p. 268-276, 2005.

PANNANUSORN S, FERNANDEZ V, RÖMLING U. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of Candida species causing bloodstream infection. Mycoses, v. 56, p. 264-272, 2013.

PAPPAS PG, KAUFFMAN CA, ANDES D, BENJAMIN DK, CALANDRA TF, EDWARDS JE, FILLER SG, FISHER JF, KULLBERG BJ, OSTROSKY-ZEICHNER L, REBOLI AC, REX JH, WALSH TJ, SOBEL JD. Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America, v.48, p. 503-535, 2009.

PAPPAS PG, KAUFFMAN CA, ANDES DR, CLANCY CJ, MARR KA, OSTROSKY-ZEICHNER L, REBOLI AC, SCHUSTER MG, VAZQUEZ JA, WALSH TJ, ZAOUTIS TE, SOBEL JD. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 1-50, 2015.

PAPPAS PG, LIONALIS MS, ARENDRO MC, OSTROSKY-ZEICHNER L, KULLBERG BJ. Invasive candidiasis. Nature Publishing Group, v. 4, p. 1 - 20, 2018.

PAQUES JP, LINDEN E, RIJN CJM, SAGIS LMC. Preparation methods of alginate nanoparticles. Advances in Colloid and Interface Science, v. 209, p. 163-171, 2014.

PFALLER MA, DIEKEMA DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. Clinical Microbiology Reviews, v. 20, p. 133-163, 2007.

PFALLER MA, ANDES BD, DIEKEMA ADJ, ESPINEL-INGROFF CA, SHEEHAN D. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and Candida: Time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. Drugs Resistance Updates, v. 13, p. 180-195, 2010.

PFALLER MA, DIEKEMA DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. Critical reviews in microbiology, v. 36, p. 1-53, 2010.

PFALLER MA, CASTANHEIRA M, LOCKHART SR, AHLQUIST AM, MESSER SA, JONES RN. Frequency of Decreased Susceptibility and Resistance to Echinocandins among Fluconazole-Resistant Bloodstream Isolates of *Candida glabrata*, Journal of Clinical Microbiology, p. 1199–1203, 2012.

PFALLER MA, CASTANHEIRA M, MESSER SA, RHOMBERG PR, JONES RN. Comparison of EUCAST and CLSI broth microdilution methods for the susceptibility testing of 10 Systemically active antifungal agents when tested against Candida spp. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v. 79, p. 198–204, 2014.

PERLIN D. Echinocandin Resistance in Candida. Suplement article, v. 61, p. 612 - 617, 2018.

PHELPS J., BENTLEY MVLB., LOPES LB. In situ gelling hexagonal phases for sustained release of an anti-addiction drug. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 87, p. 391–398, 2011.

POLKE M., HUBE B., JACOBSEN ID. Candida Survival Strategies. Advances in Applied Microbiology, p. 1 - 97, 2015.

RAMAGE G, RAJENDRAN R, SHERRY L, WILLIAMS C. Fungal biofilm resistance. International Journal of Microbiology, v. 2012, p. 14, 2012.

RAVU, R. R. et al. Synthesis and antifungal activities of miltefosine analogs. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, v. 23, n. 17, p. 4828–4831, 2013.

ROEMER T, KRYSAN DJ. Antifungal Drug Development: Challenges, Unmet Clinical Needs, and New Approaches. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, v. 4, p. 5, 2014.

ROSSI DCP, SPADARI CC, NOSANCHUK JD, TABORDA CP, ISHIDA K. Miltefosine is fungicidal to *Paracoccidioides* spp. yeast cells but subinhibitory concentrations induce melanisation. International Journal of Antimicrobial Agents, v. 49, p. 465-471, 2017.

SALAH S., AWAD GEA., MAKHLOUF IA. Improved vaginal retention and enhanced antifungal activity of miconazole microsponges gel: Formulation development and in vivo therapeutic efficacy in rats. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 114, p. 255-266, 2018.

SALDANHA CA, GARCIA MP, LOCCA DC, REBELO LG, SOUZA ACO, BOCCA AL, SANTOS MFMA, MORAIS PC, AZEVEDO RB. Antifungal Activity of Amphotericin B Conjugated to Nanosized Magnetite in the Treatment of Paracoccidioidomycosis. PLoS Negl Trop Dis, v. 10(6), 2016.

SANGEETHA S, VENKATESH DN, ADHIYAMAN R, SANTHI K, SURESH B. Formulation of Sodium Alginate Nanospheres Containing Amphotericin B for the Treatment of Systemic Candidiasis. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, v. 6, p. 653-659, 2007.

SANGLARD D. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. Frontiers in Medicine, v.3, p. 1-10, 2016.

SANGUINETTI M, POSTERARO B, LASS- FLÖRL C. Antifungal drug resistance among Candida species: mechanisms and clinical impact. Mycoses, v. 58, p. 2-13, 2015.

SANTOS AS. Desenvolvimento de microemulsões e sua transformação *IN SITU* em géis de fase líquido-cristalina como plataforma para a liberação sustentada de fármacos e seu uso no tratamento do alcoolismo. [Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo], 2017.

SARDI JCO, SCORZONI L, BERNARDI T, FUSCO-ALMEIDA AM, MENDES GIANINI MJS.Candida species: current epidemiology pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. Journal of Medical Microbiology, v. 63, p. 10 - 24, 2013.

SARIGUZEL FM, BERK E, KOC AN, SAV H, DEMIR G. Investigation of the relationship between virulence factors and genotype of Candida spp. isolated from blood cultures. The journal of infection on developing countries, v.9, p. 857-864, 2015.

SEKYERE JO. *Candida auris*: A systematic review and meta-analysis of current updates on an emerging multidrug-resistant pathogen. Microiology Open, v. 578, p. 1 - 29, 2018.

SHARON D., ROTEM R., KOREN G., LUNENFELD E., LEVY A. Vaginal antimycotics and the risk for spontaneous abortions. J Obstet Gynecol, v. 601.p.1-7, 2018.

SLAVIN MA, SZER J, GRIGG AP, ROBERTS AW, SEYMOUR JF, SASADEUZ J, THURSKY K, CHEN SC, MORRISSEY CO, HEATH CH, SORRELL T. Guidelines for the use of antifungal agents in the treatment of invasive Candida and mould infections, v. 8, p. 192-200, 2004.

SILVA S, HENRIQUES M, MARTINS A, OLIVEIRA R, WILLIAMS† D, AZEREDO J. Biofilms of non-Candida albicans Candida species: quantification, structure and matrix composition. Medical mycology, v. 47, p. 681-9, 2009.

SILVA S, NEGRIL M, HENRIQUES M, OLIVEIRA R, WILLIAMS DW, AZEREDO J. Adherence and biofilm formation of non-Candida albicans Candida species. Trends in Microbiology, v.19, p. 241-247, 2011.

SOBEL JD. Vulvovaginal candidosis. Lancet, v.369, p. 1961-1971, 2007.

SOBEL JD. Recurrent vulvovaginal candidiasis. American Journal of Obstetrics & Gynecology, p. 15 - 21, 2016.

SOONG D, EINARSON A. Vaginal yeast infections during pregnancy. Canadian Family Physician, v. 55, p. 255 - 256, 2009.

SOSNIK A. Alginate Particles as Platform for Drug Delivery by the Oral Route: State-of-the-Art. ISRN Pharmaceutics, v. 2014, p. 1-17, 2014.

SPADARI CC, ISHIDA K, LOPES LB. Potential Use of Alginate-Based Carriers As Antifungal Delivery System. Frontiers in Microbiology, v. 8, p. 1-11, 2017.

SPADARI CC, VILA T, ROZENTAL S, ISHIDA K. Miltefosine has post-1 antifungal effect and induces apoptosis in *Cryptococcus yeasts*. Antimicrob. Agents Chemother, 2018.

SPREGHINI E, ORLANDO F, TAVANTI A, SENESI S, GIANNINI D, MANSO E, BARCHIESI F. In vitro and in vivo effects of echinocandins against Candida parapsilosis sensu stricto, Candida orthopsilosis and Candida metapsilosis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.67, p. 2195-2202, 2012.

STONE NRH, BICANIC T, SALIM R, HPE W. Liposomal Amphotericin B (AmBisome?): A Review of the Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Clinical Experience and Future Directions. Drugs, v. 76, p. 485-500, 2016.

TAPIA GG, RAZONABLE RR, ECKEL-PASSOW JE, LAHR BD, AFESSA B, KEEGAN MT, CATANIA J, BADDOUR LM. A scoring model of factors associated with *Candida glabrata* candidemia among critically ill patients. Mycoses, v. 55, p. 228-236, 2012.

TESSA RMT, HOI KM, ZHANG P, NG SK. Characterization of a Polyethylene Glycol-Amphotericin B Conjugate Loaded with Free AMB for Improved Antifungal Efficacy. PLoS ONE, v. 11 (3), 2016.

TONG Z, WIDMER F, SORRELL TC, GUSE Z, JOLLIFFLE KA, HALLIDAY C, LEE OC, KONG F, WRIGHT LC, CHEN SC. In vitro activities of miltefosine and two novel antifungal biscationic salts against a panel of 77 dermatophytes. Antimicrob Agents Chemother v. 51, p. 2219–2222, 2007.

TORTORANO AM, KIBBLERB C, PEMANC J, BERNHARDTD H, KLINGSPORE L, GRILLOT R. Candidemia in Europe: epidemiology and resistance. International Journal of Antimicrobial Agents, v. 27, p. 359-366, 2006.

TSAI CJ-Y, LOH JMS, PROFT T. Galleria mellonella infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. Virulence, v. 7, p. 214-229, 2016.

TURNER SA, BUTLER G. The Candida Pathogenic Species Complex. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, v. 4, p. 1-18, 2014.

TYCZKOWSKA-SIERON E, GASZYNSKI W, TYCZKOWSKI J, GLOWACKA A. Analysis of the relationship between fluconazole consumption and non–C. albicans Candida infections. Medical Mycology, v. 52, p. 758–765, 2014.

VILA TV, ISHIDA K, DE SOUZA W, PROUSIS K, CALOGEROPOULOU T, ROZENTAL S. Effect of alkylphospholipids on *Candida albicans* biofilm formation and maturation. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 68, p. 113-125, 2013.

VILA TVM, CHATURVEDI AK, ROZENTAL S, LOPEZ-RIBOT JL. In Vitro Activity of Miltefosine against Candida albicans under Planktonic and Biofilm Growth Conditions and In Vivo Efficacy in a Murine Model of Oral Candidiasis. Antimicrob Agents Chemother, v. 59, p. 7611-7620, 2015.

XIE HY, FENG D, WEI DM, MEI L, CHEN H, WANG X, FANG F. Probiotics for vulvovaginal candidiasis in non-pregnant women. Microbiology Open, v. 578, p. 1 - 29, 2017.

XU Y, SHENG F, ZHAO J, CHEN L, LI C. *ERG11* mutations and expression of resistance genes in fluconazole resistant *Candida albicans* isolates. Archives of Microbiology, v. 197, p. 1087-1093, 2015.

ZUO X, DJORDJEVIC JT, OEI JB, DESMARINI D, SCHIBECI SD, JOLLIFFE KA, SORRELL TC. Miltefosine Induces Apoptosis-Like Cell Death in Yeast via Cox9p in Cytochrome c Oxidase. Molecular pharmacology. v. 80, p. 476-485, 2011.

WARREN L, HUDDLESTON P. Life history of the greater wax moth, Galleria mellonella L. J. Kans. Entomol, v. 35, p. 212–216, 1962.

WIDMER F, WRIGHT LC, OBANDO D, HANDKE R, GANENDREN R, ELLIS DH, SORRELL TC. Hexadecylphosphocholine (Miltefosine) Has Broad-Spectrum Fungicidal Activity and Is Efficacious in a Mouse Model of Cryptococcosis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 50, p. 414–421, 2006.

WOJDA I. Immunity of the greater wax moth Galleria mellonella. Insect science, v.00, p. 1-16, 2016.