



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA β - LAPACHONA
FRENTE A CEPAS DE *CANDIDA* SPP. RESISTENTES A DERIVADOS AZÓLICOS
NA FORMA PLANCTÔNICA E EM ISOLADOS FORMADORES DE BIOFILME**

Cecília Rocha da Silva

FORTALEZA – CEARÁ

2016

Cecília Rocha da Silva

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA β -LAPACHONA
FRENTE A CEPAS DE *CANDIDA* SPP. RESISTENTES A DERIVADOS AZÓLICOS NA
FORMA PLANCTÔNICA E EM ISOLADOS FORMADORES DE BIOFILME**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação
em Microbiologia Médica da Faculdade de
Medicina da Universidade Federal do Ceará,
como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em
Microbiologia Médica

Orientador: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre
Júnior

FORTALEZA – CEARÁ

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S579a Silva, Cecília.

AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA β -LAPACHONA FRENTE A CEPAS DE *CANDIDA* SPP. RESISTENTES A DERIVADOS AZÓLICOS NA FORMA PLANCTÔNICA E EM ISOLADOS FORMADORES DE BIOFILME / Cecília Silva. – 2016.

105 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, , Fortaleza, 2016.

Orientação: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.

1. *Candida* spp.. 2. β -lapachona. 3. Resistência. 4. Citometria de fluxo. 5. Biofilmes. I. Título.

CDD

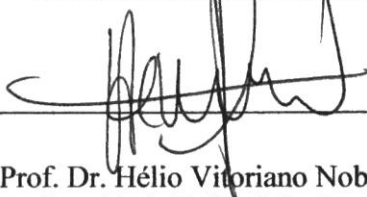
Cecília Rocha da Silva

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA β -LAPACHONA
FRENTE A CEPAS DE *CANDIDA* SPP. RESISTENTES A DERIVADOS AZÓLICOS
NA FORMA PLANCTÔNICA E EM ISOLADOS FORMADORES DE BIOFILME**

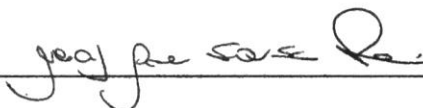
Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação
em Microbiologia Médica da Faculdade de
Medicina da Universidade Federal do Ceará,
como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em
Microbiologia Médica

Aprovada em: 12/07/2016

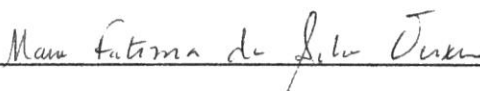
BANCA EXAMINADORA



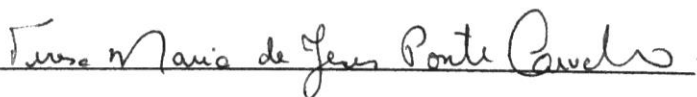
Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dra. Mary Anne Sousa Lima
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dra. Maria Fátima da Silva Teixeira
Universidade Estadual do Ceará (UECE)



Prof. Dra. Teresa Maria De Jesus Ponte Carvalho
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

A Deus

e a minha família

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua luz e seu olhar sobre a minha vida...

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior, pela oportunidade concedida, confiança depositada, orientação, dedicação, conselhos sábios, coragem, incentivo e amizade que muito contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti, pela dedicação e contribuição para realização deste trabalho e pela sempre disponibilidade em ajudar.

À Dra. Marina Duarte Pinto Lobo e sua equipe, pela contribuição e auxílio para realização deste trabalho.

À todos os amigos e integrantes do LABEL que me ajudaram direta ou indiretamente na realização desse projeto. Em especial, a Rosana Campos, Bruna Nascimento, Letícia Serpa, João Batista e Daniel Domingues pelas inúmeras conversas divertidas e incentivos que tornaram a convivência diária mais leve.

Aos meus pais, Pedro e Terezinha, que com todo amor e carinho me ensinaram a cultivar valores importantes como os da amizade, caráter, respeito e amor. Além do incentivo e apoio nessa caminhada.

Às minhas irmãs, Carol e Camila, aos meus cunhados, Márcio e André que me acompanharam nessa caminhada com todo carinho, amor e confiança. E a Laurinha, que veio para abrilhantar ainda mais a nossa família. Família é tudo!

Às agências de financiamento, Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), a Fundação Estadual de Pesquisa e Desenvolvimento (FUNCAP) pelo apoio financeiro.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), em especial a todo corpo docente do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica, pela formação acadêmica de excelência oferecida durante esses 6 anos em que estive como discente na instituição.

À todos aqueles, que, mesmo não mencionados, estiveram ao meu lado, contribuindo para a minha formação e para a realização deste estudo, o meu mais sincero agradecimento.

“Eu sou parte de uma equipe. Então, quando venço, não sou eu apenas quem vence. De certa forma termino o trabalho de um grupo enorme de pessoas!”

Ayrton Senna

RESUMO

Nos dias atuais, observa-se um aumento significativo das infecções fúngicas oportunistas, principalmente em pacientes imunocomprometidos. A candidíase tem sido a mais documentada e muitas vezes estão associadas à formação de biofilmes. Os agentes antifúngicos disponíveis no mercado são restritos a um pequeno número de fármacos quando comparados aos agentes antibacterianos. Esses fatos associados ao aumento da frequência de resistência de espécies de *Candida*, demonstram a necessidade de buscar por novas estratégias terapêuticas, onde os produtos naturais se destacam. Diversos trabalhos já demonstram diferentes atividades biológicas de β -lapachona (naftoquinona), incluindo antifúngica. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial antifúngico da β -lapachona sobre o crescimento de *Candida* spp. resistentes a derivados azólicos, nas formas planctônicas e biofilme, bem como elucidar os seus possíveis mecanismos de ação. Para isso, a avaliação do efeito antifúngico da β -lapachona foi realizada em 22 cepas de *Candida* spp. utilizando microdiluição em caldo. Posteriormente, parâmetros como viabilidade celular, geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), danos na mitocôndria e externalização de fosfatidilserina foram avaliados por meio de análises de citometria de fluxo e os danos ao DNA pelo teste do cometa contribuindo para elucidação do provável mecanismo de ação da β -lapachona. Além disso, por meio da análise proteômica foi obtido um perfil de expressão de proteínas em uma cepa representativa de *C. albicans* após tratamento com o composto. E, por fim, a viabilidade celular dos biofilmes foi determinada por meio do ensaio de redução do sal de tetrazólio (MTT). De acordo com os resultados obtidos, β -lapachona apresentou atividade antifúngica frente a cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos, com concentração inibitória mínima (CIM) variando entre 4 - 16 $\mu\text{g/mL}$. β -lapachona alterou a permeabilidade da membrana mitocondrial, aumentou os níveis intracelulares de EROS, diminuiu a viabilidade celular de forma dose-dependente, causou danos ao DNA e, conseqüentemente, conduziu morte celular por apoptose. Dentre as proteínas identificadas, algumas estão relacionadas com o processo de tradução, metabolismo energético, processamento genético e de defesa contra espécies reativas de oxigênio. Em relação aos ensaios de biofilmes, β -lapachona apresentou efeito sobre biofilme formado (24 horas), com o isolado de *C. albicans* apresentando redução de 50% nas concentrações de 2x CIM, 10x CIM e 50x CIM, enquanto *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* nas concentrações de 10x CIM e 50x CIM ($p < 0,05$). O uso de concentrações subinibitórias foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,05$) a formação dos biofilmes de

Candida spp. Portanto, conclui-se que β -lapachona é capaz de inibir o crescimento *in vitro* de *Candida* spp. resistentes a azólicos tanto na forma planctônica como em biofilme sugerindo que esta molécula composta tem potencial para agir como agente antifúngico com atividade apoptótica.

Palavras-chave: *Candida* spp., β -lapachona, resistência, citometria de fluxo, mecanismo de ação, biofilmes.

ABSTRACT

Nowadays, we have experienced a significant increase in opportunistic fungal infections, especially in immunocompromised patients. Candidiasis has been the most documented and are often associated with the formation of biofilms. However, antifungal drugs available on the market are restricted to a small number of drugs when compared to antibacterial drugs. Therefore, these facts associated with increased resistance rate of *Candida* species, show the need to search for new therapeutic strategies. Natural products stand out in which several studies have shown the different biological activities of β -lapachone (naphthoquinone), including antifungal. The objective of this study was to evaluate the antifungal potential on the growth of azoles resistant *Candida* spp. strains in the planktonic and biofilm forms and elucidate its mechanism of action. For this, the evaluation of the antifungal effect of β -lapachone in 22 *Candida* spp. strains was performed by broth microdilution. Subsequently, parameters such as cell viability, generation of reactive oxygen species (ROS), damage the mitochondria and phosphatidylserine externalization were evaluated through analysis of flow cytometry and DNA damage by comet assay which contributed to elucidating the probable mechanism of action of β -lapachone. Furthermore, by proteomic analysis we obtained a protein expression profile for a representative strain of *Candida albicans* after treatment with the compound. Finally, cell viability of the biofilms was determined by assaying reduction of the tetrazolium salt (MTT). According to the results, β -lapachone showed antifungal activity against azoles resistant *Candida* spp. strains with the minimum inhibitory concentration (MIC) ranging from 4-16 $\mu\text{g/ml}$. β -lapachone altered mitochondrial membrane permeability, increased intracellular levels of ROS, decreased cell viability in a dose-dependent manner, damage caused to DNA that could lead to cell death by apoptosis. Among the identified proteins, some are related to the translation process, energy metabolism, genetic processing and defense against reactive oxygen species. Regarding the biofilm assays, β -lapachone had an effect on biofilm formation (24 hours), where isolate of *C. albicans* showed reduction of 50% in 2x MIC, 10x MIC and 50x MIC concentrations, while *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* showed in 10x MIC and 50x MIC concentrations ($p < 0.05$). The use of subinhibitory concentrations was able to reduce significantly ($p < 0.05$) the formation of biofilms of *Candida* spp. Therefore, we concluded that β -lapachone is able to inhibit the growth of azoles resistant *Candida* spp. strains in the planktonic and biofilm forms,

suggesting that this molecule has potential to act as antifungal compound with apoptotic activity.

Keywords: *Candida* spp., β -lapachone, resistance, flow cytometry, mechanism of action, biofilms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fases da formação de biofilme de <i>Candida</i> em dispositivos médicos	27
Figura 2	Agentes antifúngicos e seus alvos moleculares	32
Figura 3	Obtenção sintética de β -lapachona a partir do lapachol	39
Figura 4	Resumo enzimático do ciclo redox das quinonas	40
Figura 5	Fórmula para determinação do FICI	44
Figura 6	Efeito de β -lapachona em diferentes concentrações na viabilidade de células de <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. parapsilosis</i> resistentes a azólicos avaliados por citometria de fluxo	60
Figura 7	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em células de <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. parapsilosis</i> resistentes a azólicos	62
Figura 8	Avaliação da formação de EROs em células de <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. parapsilosis</i> resistentes a azólicos	64
Figura 9	Efeito de β -lapachona em diferentes concentrações sobre a externalização da fosfatidilserina em células de <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. parapsilosis</i> resistentes a azólicos	66
Figura 10	Dano ao DNA e lesões oxidativas (FPG) induzidas por β -lapachona em diferentes concentrações em células de <i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. parapsilosis</i> resistentes a azólicos analisadas pelo ensaio do cometa versão alcalina	68
Figura 11	Efeito de diferentes tratamentos sobre a viabilidade celular, potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), geração de EROS e externalização da fosfatidilserina em células de <i>C. albicans</i> resistente a azólicos	70
Figura 12	Efeito de β -lapachona frente ao biofilme formado em diferentes espécies de <i>Candida</i> avaliados pelo ensaio de redução do MTT	76
Figura 13	Efeito de β -lapachona sobre a inibição da formação de biofilme em diferentes espécies de <i>Candida</i> avaliados pelo ensaio de redução do MTT	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tendência de dispositivos implantáveis para a formação de biofilme de <i>Candida</i> spp..	26
Tabela 2	Efeito antifúngico de β -lapachona frente a cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes a azólicos	54
Tabela 3	Efeito da associação de β -lapachona (β -lap) com itraconazol (ITC) e fluconazol (FLC) frente a cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes a azólicos	57
Tabela 4	Efeito da associação de β -lapachona (β -lap) com voriconazol (VRZ) frente a cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes a azólicos	58
Tabela 5	Identificação de proteínas por espectrometria de massa quantitativa (NanoESI-Q-TOF) oriundo do extrato total de células de <i>Candida albicans</i> exposta a β -lapachona	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	<i>ATP Binding Cassete</i>
ANFO B	Anfotericina B
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
β -LAP	β -lapachona
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CDR	<i>Candida drug resistance</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DCF	2',7' Diclorofluoresceína
DCFH	Diclorodihidrofluoresceína não Fluorescente
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotereitol
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FICI	<i>Fractional Inhibitory Concentration Index</i>
FITC	Fluoresceína
FKS	<i>1,3-beta-glucan synthase</i>
FLC	Fluconazol
FPG	<i>Formamidopyrimidine-DNA Glycosylase</i>
GFP	<i>Glu-fibrinogen peptide</i>
H ₂ DCFDA	Diacetato de 2',7'- diclorodihidrofluoresceína
HEPES	N - (2-Hidroxietyl) piperazina-N' - (ácido 2-etanosulfônico)
IAA	Iodoacetamida
ITZ	Itraconazol
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MFS	<i>Major facilitator superfamily</i>
MOPS	<i>3-(N-Morpholino)propanesulfonic Acid</i>
MTT	Brometo de difeniltetrazólio -[3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo]

PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PI	Iodeto de propídeo
PS	Fosfatidilserina
PPB	<i>Potassium Phosphate Buffer</i>
QS	<i>Quorum sensing</i>
RH123	Rodamina 123
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SPE	Substâncias Poliméricas Extracelulares
TFA	<i>Trifluoroacetic Acid</i>
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mL
UTI	Unidade de terapia intensiva
VRZ	Voriconazol
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>
$\Delta\psi_m$	Potencial transmembrana mitocondrial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Infecções fúngicas	20
2.2 Epidemiologia e incidência de candidemias	21
2.3 Fatores de risco das infecções fúngicas	23
2.4 Fatores de virulência de espécies de <i>Candida</i>	24
2.4.1 Biofilmes	24
2.4.1.1 Formação do biofilme	25
2.4.4.2 Resistência dos biofilmes aos antifúngicos	29
2.3. Principais agentes antifúngicos	30
2.4. Resistência antifúngica	34
2.5. Produtos naturais como fonte de fármacos	36
2.5.1 Quinonas: β -lapachona	37
3. HIPÓTESES	41
4. OBJETIVOS	41
4.1 Objetivo Geral	41
4.2 Objetivos Específicos	41
5. MATERIAIS E MÉTODOS	42
5.1 Recuperação das cepas	42
5.2 Antifúngicos	42
5.3 Teste de Sensibilidade aos antifúngicos	43
5.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antifúngicos	43
5.3.2 Teste do sinergismo por microdiluição em caldo: <i>checkerboard</i>	43
5.3.3 Análise dos dados	44
5.4 Testes utilizando citometria de fluxo	44
5.4.1 Preparo das suspensões de células de <i>Candida</i> spp.	44
5.4.2 Tratamento das células de <i>Candida</i> spp.	45
5.4.3 Determinação da viabilidade celular	45
5.4.4 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial em células de <i>Candida</i> spp.	45
5.4.5 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) em células de <i>Candida</i> spp.	46

5.4.6 Determinação da externalização de fosfatidilserina em células de <i>Candida</i> spp.	46
5.4.7 Análise dos dados	47
5.5 Ensaio do Cometa	47
5.5.1 Análise da oxidação de bases purinas do DNA	48
5.5.2 Análise dos dados	48
5.6 Análise proteômica em células de <i>C. albicans</i> expostas a β -lapachona	49
5.6.1 Preparo e tratamento das células de <i>C. albicans</i>	49
5.6.2 Lise celular e solubilização de células de <i>C. albicans</i>	49
5.6.3 Identificação e quantificação de proteínas por espectrometria de massas	49
5.6.4 Processamento de dados e análise de expressão diferencial	51
5.7 Ensaio de biofilme	51
5.7.1 Crescimento dos isolados de <i>Candida</i> spp. no modo biofilme	51
5.7.2 Determinação da atividade de β -lapachona sobre biofilmes formado de <i>Candida</i> spp... ..	52
5.7.3 Ação da β -lapachona sobre a inibição da formação do biofilme em <i>Candida</i> spp.	52
5.7.4 Análise dos dados	53
6. RESULTADOS	54
6.1 Atividade antifúngica da β -lapachona frente a cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes a azólicos	54
6.2 Efeito da combinação entre azólicos e β -lapachona frente a cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes a azólicos	56
6.3 Avaliação do tipo de morte celular em <i>Candida</i> spp. após exposição a β -lapachona	59
6.3.1 Efeito da β -lapachona na viabilidade celular em células de <i>Candida</i> spp.	59
6.3.2 Efeito da β -lapachona sobre o potencial transmembrana mitocondrial de células de <i>Candida</i> spp.	61
6.3.3 Efeito da β -lapachona sobre geração de EROS em células de <i>Candida</i> spp.	63
6.3.4 Detecção da externalização de fosfatidilserina induzida por β -lapachona em células de <i>Candida</i> spp.	65
6.3.5 β -lapachona promove danos no DNA de células de <i>Candida</i> spp.	67
6.4 Efeito da β -lapachona na viabilidade celular, potencial de membrana, EROS e externalização de fosfatidilserina em células de <i>C. albicans</i> após tratamento de 3h, 6 h, 12 h e 24 h	69

6.5 Identificação e quantificação por espectrometria de massas de proteínas presentes em células de <i>C. albicans</i> após exposição a β -lapachona	71
6.6 Efeito da β -lapachona sobre biofilme formado (24 horas) de <i>Candida</i> spp.	75
6.7 Efeito da β -lapachona sobre inibição da formação do biofilme em <i>Candida</i> spp.	77
7. DISCUSSÃO	79
8. CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS	89
APÊNDICES	100
ANEXOS	103

1. INTRODUÇÃO

As infecções oportunistas, como as causadas por fungos, surgiram como complicações em pacientes imunocomprometidos (quimioterapia, transplantados, diabéticos, HIV, neutropênicos) e em estado crítico. Dentre essas infecções, é importante destacar a relevância clínica dos casos de infecções de corrente sanguínea por *Candida* spp., complicação esta conhecida como candidemia (SILVA *et al.*, 2012; YAPAR, 2014). As principais espécies envolvidas nessas infecções são: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (SARDI *et al.*, 2013).

A incidência de candidemia tem aumentado mundialmente e está associada a altas taxas de morbidade e mortalidade, além de estarem associadas ao prolongamento do tempo de internação e aumento dos custos hospitalares, constituindo um importante problema de saúde pública, principalmente nos hospitais terciários (SCHMALRECK *et al.*, 2012).

As espécies de *Candida* podem existir na natureza como células livres, denominadas planctônicas, e sob a forma de biofilmes. As infecções causadas por biofilmes possuem grande relevância nos estudos científicos devido a sua patogenicidade, pois os biofilmes apresentam maior resistência não só às defesas do hospedeiro, mas também às terapias antifúngicas atualmente utilizadas, gerando implicações clínicas, terapêuticas e econômicas (NOBILE; JOHNSON, 2015; GIRARDOT; IMBERT, 2016).

Devido ao limitado arsenal terapêutico disponível para o tratamento de infecções sistêmicas associado ao aumento da resistência antifúngica e do número de infecções causadas por biofilmes, a busca por novas moléculas com potencial antifúngico se faz necessária.

Diante desse contexto, os produtos naturais se destacam, pois são bastante utilizados para obtenção de moléculas bioativas, no qual os pesquisadores têm investido na identificação dessas moléculas bem como nas suas propriedades e mecanismo de ação (SCORZONI *et al.* 2016; MARTINS *et al.*, 2015). As quinonas têm grande relevância, já que apresentam diversas propriedades, como: microbicida, tripanossomicida, viruscida e antitumoral (SILVA; FERREIRA; DE SOUZA, 2003).

Portanto, o presente estudo investigou a atividade antifúngica de β -lapachona, uma naftoquinona, principalmente por esta não apresentar ação citotóxica *in vitro* em células de mamíferos (DA SILVA JÚNIOR *et al.*, 2011). Apesar de existirem relatos da atividade

antifúngica desse composto sobre *Candida* spp. estes dados não foram encontrados na literatura nacional e internacional, relacionando a atividade da β -lapachona frente a isolados de *Candida* spp. resistentes a derivados azólicos.

Então, diante dessa temática e considerando o possível potencial antifúngico deste composto, o estudo buscou avaliar o efeito antifúngico da β -lapachona, associada ou não a antifúngicos clássicos, frente a isolados de *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistentes a azólicos tanto na forma planctônica como na forma de biofilme, buscando elucidar os seus possíveis mecanismo de ação. Para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo dentro do contexto abordado acima.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecções fúngicas

Atualmente, como resultado dos avanços obtidos nos tratamentos utilizados para doenças malignas e HIV/AIDS, bem como uma maior eficácia nas técnicas de transplantes e cuidados em unidades de terapia intensiva (UTI), muitas doenças já não representam uma ameaça para os seres humanos que tem a sua expectativa de vida prolongada (YAPAR, 2014; SILVA *et al.*, 2012).

Entretanto, infecções oportunistas, como as causadas por fungos, surgiram como complicações nos pacientes imunocomprometidos e em estado crítico. A candidíase tem sido a infecção mais documentada nos diferentes grupos de pacientes portadores de imunodeficiências, apresentando-se como infecções superficiais ou invasivas, com envolvimento de um ou múltiplos órgãos (SILVA *et al.*, 2012).

As infecções causadas por *Candida* spp. têm emergido mundialmente e resultam do aumento do tempo de internação e juntamente com as despesas médicas constituem um importante problema de saúde pública, principalmente em centros médicos terciários (SCHMALRECK *et al.*, 2012).

A candidemia é, sem dúvida, a micose invasiva mais prevalente e afeta cerca de 400.000 pessoas anualmente em todo o mundo, causando mais de 50.000 mortes (PFALLER *et al.*, 2014; KULLBERG; ARENDRUP, 2015). Além de estar associada a uma alta mortalidade, relaciona-se também com altas despesas hospitalares nos quais pacientes adultos e pediátricos podem ter gastos estimados no valor de U\$ 39.000 e U\$ 92.000, respectivamente (LOCKHART, 2014).

Atualmente, são conhecidas mais de 150 espécies de *Candida*, entretanto pouco mais de 17 espécies são consideradas patogênicas. Aproximadamente 90% das infecções fúngicas invasivas são causadas por *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (SARDI *et al.*, 2013). Esse gênero apresenta-se como o quarto e o sexto agente mais prevalente em infecções nosocomiais em estudos americanos e europeus, respectivamente (PFALLER *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2014; YAPAR, 2014). No Brasil, Sales Junior e colaboradores (2006) analisando a frequência dos agentes causadores de infecções da corrente sanguínea em pacientes internados em unidades de terapia intensiva

verificaram que as candidemias responderam por 5,2% do total das ocorrências, sendo o quinto agente mais frequente.

Apesar de *C. albicans* ser a principal causa de candidíase invasiva e representar mais de 50% de todos os casos, a epidemiologia das infecções fúngicas está mudando e o número de infecções causadas por espécies de *Candida* não *albicans*, incluindo *C. tropicalis*, *C. glabrata*, e *C. parapsilosis* estão ganhando cada vez mais importância nesse cenário (TANG *et al.*, 2014; PFALLER *et al.*, 2014; ALCAZAR-FUOLI; MELLADO, 2014).

2.2. Epidemiologia e incidência de candidemias

Ao longo das duas últimas décadas, a incidência de candidemia tem aumentado devido a muitos fatores: aumento da população idosa, uso de fármacos imunossupressores mais agressivos, nutrição parenteral de longo prazo e uso prolongado de antibióticos de largo espectro (DE ROSA *et al.*, 2015). Apesar dos avanços alcançados no diagnóstico e tratamento da candidemia, a infecção ainda provoca altas taxas de mortalidade variando de 5% a 71% (DE ROSA *et al.*, 2015; KULLBERG & ARENDRUP, 2015) podendo atingir 90% em pacientes de alto risco, como aqueles com malignidades hematológicas (ALCAZAR-FUOLI & MELLADO, 2014).

A incidência de candidemia varia geograficamente e depende das condições socioeconômicas, hábitos culturais, variações nas práticas de saúde e no padrão de resistência e uso de antibióticos, além da idade da população em estudo e da representatividade da amostra (GIACOMAZZI *et al.*, 2015; BASSETTI *et al.*, 2013; NUCCI *et al.*, 2010).

De acordo com Ng e colaboradores (2015) que realizaram um estudo prospectivo de vigilância laboratorial na Universidade de Malaya Medical Center (UCMM), Malásia, entre 2000 e 2013, obtiveram um total de 34.392 isolados de *Candida* de diversos sítios anatômicos, com 1.716 isolados oriundos de cultura do sangue (4,99%). Nesse estudo, as espécies isoladas do sangue foram predominantemente de *Candida* não *albicans* (73,14%): *C. tropicalis* (47,49%), *C. parapsilosis* (35,38%) e *C. glabrata* (11,08%) e outras espécies (6,05%). *C. albicans* representou 26,86% do total de espécies de *Candida* isoladas de cultura do sangue.

Um estudo realizado por Bassetti e colaboradores (2013) durante janeiro de 2008 a dezembro de 2010, em cinco hospitais universitários da Itália e Espanha, relataram um total

de 995 casos de candidemia, com incidência de 2,53 e 1,55 a cada 1,000 admissões, respectivamente. *C. albicans* foi a principal causa de infecção (58,4%), seguido pelo complexo *C. parapsilosis* (19,5%), *C. tropicalis* (9,3%), e *C. glabrata* (8,3%).

Nos Estados Unidos, Wisplinghoff e colaboradores (2014) reuniram dados da Vigilância e Controle de Patógenos de Importância Epidemiológica (SCOPE) envolvendo 52 hospitais terciários de várias regiões dos Estados Unidos. Durante o período de 1998 a 2006, foram relatados 2.029 casos de candidemia. *Candida albicans* foi a espécie mais prevalente, sendo responsável por 611 (50,7%) de todos os isolados, seguida por *C. parapsilosis* (17,4%), *C. glabrata* (16,7%) e *C. tropicalis* (10,2%).

O primeiro estudo epidemiológico amplo realizado em sete países da América Latina (Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Equador, Honduras e Venezuela) contemplando 21 hospitais terciários entre novembro de 2008 e outubro de 2010, mostrou 672 casos de candidemia. A incidência global foi de 1,18 casos por 1.000 admissões, com maior incidência na Colômbia (1,96/1000 admissões) e menor no Chile (0,33/1000 admissões). Os principais agentes foram: *C. albicans* (37,6%), *C. parapsilosis* (26,5%) e *C. tropicalis* (17,6%) com grande variabilidade na distribuição das espécies nos diferentes países (NUCCI *et al.*, 2013).

Como no Brasil nenhuma infecção fúngica está inserida na lista de doenças de notificação compulsória, há uma dificuldade na aquisição de dados epidemiológicos e isto pode mascarar a real incidência de infecções fúngicas superficiais e/ou invasivas. Além disso, a grande extensão territorial permite apenas dados fragmentados das regiões do país (GIACOMAZZI *et al.*, 2015; HOFFMAN-SANTOS *et al.*, 2013). Giacomazzi e colaboradores (2015) através do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS) relataram que em apenas um ano foram registrados 2.816.298 casos de candidíase (incluindo candidemia, candidíase esofágica e candidíase vulvovaginal recorrente).

Da Costa e colaboradores (2014) avaliaram todos os casos de candidemia no hospital universitário de Londrina durante os períodos de Janeiro a Dezembro de 2007 e de Janeiro de 2010 a Dezembro de 2011. Dos 108 casos registrados, 71,3% eram espécies de *C. não albicans*. *C. tropicalis* (30,5%) e *C. albicans* (28,7%) foram as duas espécies mais isoladas, seguida por *C. parapsilosis* (24,1%), *C. glabrata* (8,3%), *C. krusei* (1,8%) e todas as outras espécies (6,6%).

Em outro estudo realizado em um hospital pediátrico terciário na cidade de São Paulo durante os anos de 2007 a 2010, 104 casos de candidemia foram relatados. Nesse período, a

frequência total de espécies de *Candida* identificadas foi: 37,5% de *C. albicans*, 24,03% de *C. tropicalis*, 22,11% de *C. parapsilosis*, 4,8% de *C. guilliermondii*, 2,88% de *C. krusei* e 8,68% de outras espécies (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Hoffman-Santos e colaboradores (2013) realizaram um estudo retrospectivo em dois hospitais universitários de Cuiabá, Mato Grosso, durante os anos de Janeiro de 2006 a Dezembro de 2011. Identificaram 130 episódios de candidemia com uma prevalência de 1,8/1000 admissões e uma taxa de mortalidade de 0,9/1000 admissões. As espécies de *Candida* mais isoladas foram: *C. parapsilosis* (n=50), seguida de *C. albicans* (n=45) e *C. tropicalis* (n=25).

Em um hospital terciário de Recife, Nordeste do Brasil, entre Setembro de 2003 e Março de 2004, Hinrichsen e colaboradores (2008) investigaram a incidência de candidemia e distribuição de espécies. No total, 21 episódios foram observados, com incidência de 3,9/1000 admissões. Espécies de *Candida* não *albicans* representaram mais de 50% dos casos, predominando *C. parapsilosis* (33%) e *C. tropicalis* (24%).

Um estudo conduzido por Nucci e colaboradores (2010) comparou as taxas de incidências (/1000 admissões) de candidemia no Brasil com outros países. A Rede Nacional de Vigilância de Candidemia relatou uma incidência global de 2,49 casos em contraste com uma incidência menor nos Estados Unidos (0,28-0,96), Canadá (0,45), Europa (0,20-0,38), França (0,17), Noruega (0,17), Hungria (0,20-0,40), Suíça (0,27).

Recentemente, devido a esse alto número de casos não só no Brasil como no restante do mundo, fez com que a comunidade científica reconhecesse que as infecções fúngicas são doenças negligenciadas internacionalmente (BROWN *et al.*, 2012).

2.3. Fatores de risco das infecções fúngicas

Os fatores de risco podem ser atribuídos tanto ao hospedeiro como estar relacionados aos cuidados de saúde. Quanto ao hospedeiro, podemos destacar: uso de antibióticos de largo espectro, presença de cateter vascular central, nutrição parenteral, hemodiálise, uso de glicocorticóide ou quimioterapia para o câncer, neutropenia, pancreatite aguda, doença maligna hematológica, transplante e tumores de órgãos sólidos e idade. Especificamente para crianças e neonatos, a prematuridade, baixo peso ao nascer, e malformações congênitas constituem os principais fatores de risco para o aparecimento de infecções fúngicas nessa

população. Em relação aos cuidados de saúde, a hospitalização prolongada ou a permanência em unidades de terapia intensiva (UTI) são listadas como os principais fatores para o estabelecimento da infecção (YAPAR, 2014; KULLBERG; ARENDRUP, 2015).

No entanto, as particularidades de cada uma das espécies de *Candida* podem ser influenciadas por fatores de risco específicos. *C. albicans* é a espécie mais frequente em pacientes com idade até 18 anos e, de maneira geral, a principal causadora de candidemia. Já a frequência de *C. parapsilosis* diminui com a idade e normalmente as infecções causadas por ela são adquiridas de uma fonte exógena e acomete pacientes com câncer, jovens adultos e recém-nascidos na UTI, geralmente em associação à colonização de cateteres venosos e nutrição parenteral. *C. tropicalis* é a menos provável de ocorrer entre as crianças com menos de um ano de idade, mas é mais provável de ocorrer em pacientes com câncer ou neutropenia e está fortemente associada com a presença de biofilmes em cateteres urinários (GUINEA, 2014; QUINDÓS, 2014; YAPAR, 2014).

2.4 Fatores de virulência de espécies de *Candida*

Há várias décadas, acreditava-se que as leveduras participavam passivamente do processo de patogênese para o estabelecimento da infecção fúngica. Assim, um hospedeiro imunocomprometido era considerado o único fator responsável pelo estabelecimento de infecção oportunista. Entretanto, esse conceito foi modificado e atualmente, sabe-se que os microorganismos participam ativamente desse processo usando mecanismos de agressão chamados fatores de virulência (SARDI *et al.*, 2013).

A patogenicidade de espécies de *Candida* é atribuída a alguns fatores de virulência, tais como a capacidade de iludir as defesas do hospedeiro, a produção de enzimas hidrolíticas que danificam tecidos, tais como proteinases, fosfolipases e hemolisinas e a adesão e formação de biofilme (no tecido do hospedeiro e em dispositivos médicos) (SARDI *et al.*, 2013; KOTHAVADE; RAJENDRA; PANTHAKI, 2010).

2.4.1 Biofilmes

Biofilme é uma comunidade de microorganismos sésseis caracterizada por células que estão ligadas irreversivelmente a um substrato (biótico ou abiótico) incorporado numa matriz

de substâncias poliméricas extracelulares (SPE) produzidas por eles. Além disso, essas células exibem um fenótipo alterado com respeito à taxa de crescimento e a transcrição de genes (DONLAN; COSTERTON, 2002). Portanto, percebe-se que as características fenotípicas das células em modo biofilme são, notoriamente, diferentes das células que vivem em modo planctônico (SENEVIRATNE; JIN; SAMARANAYAKE, 2008).

O ambiente hospitalar representa um importante reservatório para a formação de biofilmes fúngicos que podem estar envolvidos na persistência ou agravamento de várias doenças inflamatórias crônicas, bem como infecções agudas ou sistêmicas causadas por *Candida* spp. Atinge principalmente pacientes que possuem biomateriais, cateteres ou implantes temporários ou permanentes (RAMAGE; ROBERTSON; WILLIAMS, 2014; SARDI *et al.*, 2013) e representam um grave problema de saúde devido as altas taxas de morbidade e mortalidade associado aos elevados custos (GIRARDOT; IMBERT, 2016). Uma visão geral do risco de infecção associado com dispositivos médicos implantáveis causados por biofilme de *Candida* está exposta na Tabela 1 (ver página 26).

Tem sido relatado que estirpes de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* capazes de formar biofilmes provocam altos níveis de mortalidade (25 - 50%) em comparação com isolados clínicos incapazes de formar biofilmes (CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2012b).

Nos Estados Unidos, mais de cinco milhões de cateteres venosos centrais são colocados a cada ano (dados obtidos de 1992 a 2001) e mesmo com o melhoramento das abordagens clínicas, as infecções por biofilmes ocorrem em mais de 50 % desses cateteres. Além disso, são responsáveis por cerca de 100.000 mortes e despesas médicas extras da ordem de US\$ 6,5 bilhões gerando conseqüências graves para a saúde e economia (NOBILE; JOHNSON, 2015).

2.4.4.1 Formação do biofilme

Os biofilmes podem se desenvolver em quase todas as superfícies e a sua formação é resultado de vários processos de natureza física e biológica. Caracterizam-se por uma sequência de eventos complexos, que didaticamente, é dividido em quatro etapas: (A) adesão de microorganismos a uma superfície; (B) formação discreta de colônias e organização de células; (C) secreção de SPE e maturação do biofilme e (D) destacamento de células do

biofilme maduro (Figura 1, ver página 27) (SENEVIRATNE; JIN; SAMARANAYAKE, 2008).

Tabela 1 - Tendência de dispositivos implantáveis para a formação de biofilmes de *Candida* spp.

Dispositivo médico	Uso por ano (EUA)	Risco de infecção (%)	Espécies envolvidas
Cateteres venosos centrais e periféricos	5 milhões	3 - 8	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. parapsilosis</i>
Cateteres de diálise peritoneal e hemodiálise	240.000	1 - 20	<i>C. albicans</i> <i>C. parapsilosis</i>
Cateteres urinários	Milhões	10 - 30	<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>C. glabrata</i>
Tubos endotraqueais	Milhões	10 - 25	<i>C. albicans</i>
Dispositivos intracardíacos	400.000	1 - 3	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. tropicalis</i>
Articulações protéticas	600.000	1 - 3	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. parapsilosis</i>
Shunts neurocirúrgicos	40.000	6 - 15	<i>C. albicans</i>
Próteses vocais	Centenas	50 - 100	<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i>
Dentaduras	1 milhão	5 - 10	<i>C. albicans</i> <i>C. glabrata</i>

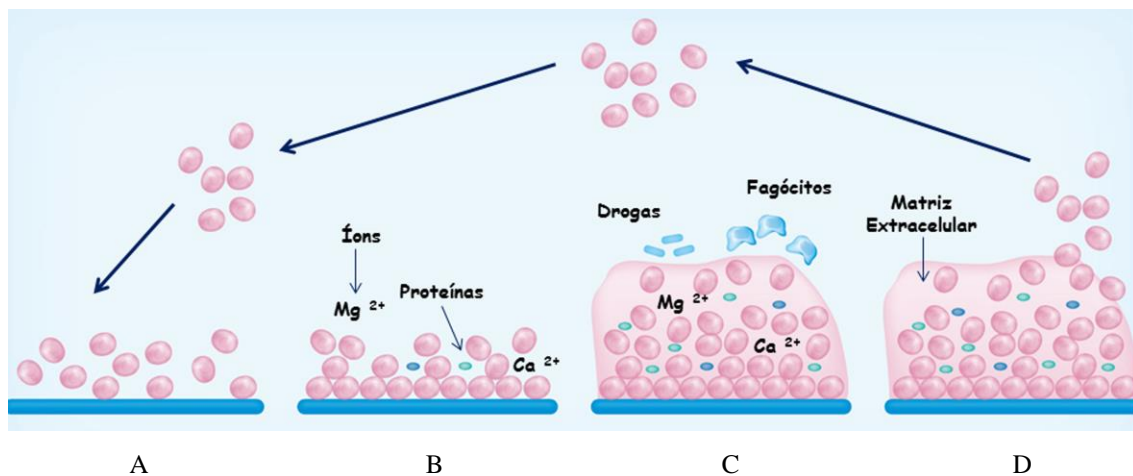
Fonte: Adaptado de Coenye *et al.*, 2011

A fase A é caracterizada pela adesão do microorganismo a uma superfície, onde esse processo é inicialmente mediado por interações não específicas, tais como forças eletrostáticas e hidrofóbicas entre as células e o substrato. Após esse contato inicial, uma série de proteínas da parede celular (adesinas) é expressa com a finalidade de aumentar a adesão entre as superfícies, facilitando a expansão vertical e horizontal do biofilme (PRESS; SHIELDS; CLANCY, 2014).

Na fase B ocorre uma agregação de células que se organizam na forma de microcolônias sobre a superfície, propiciando um ambiente favorável para o estabelecimento

de gradientes de nutrientes, transferência de material genético e *quorum sensing* (MARTINEZ; FRIES, 2010). Alguns íons, como Ca^{2+} e Mg^{2+} também são requeridos nesta etapa por *Candida* spp. para auxiliar na adesão a superfícies inertes propiciando uma ligação irreversível e influenciando na estrutura do biofilme de modo dependente da concentração desse íons (CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2012a).

Figura 1: Fases da formação de biofilme de *Candida* em dispositivos médicos



Fonte: Adaptado de Cuéllar-Cruz *et al.*, 2012a

Essa etapa também é caracterizada pelo início da produção de proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e lipídios extracelulares pelas células, os quais se organizam para formar a matriz extracelular polimérica. A composição da matriz é fortemente dependente da estirpe e das condições ambientais (composição do meio, pH e oxigênio) (PRESS; SHIELDS; CLANCY, 2014). Esses componentes são altamente hidratados, formando uma matriz que mantém as células do biofilme unidas. Essa capacidade de imobilizar e mantê-las em estreita proximidade permite interações intensas, incluindo a comunicação célula-célula (*quorum sensing*) e a formação de sinergismo microbiano. A matriz também atua como uma barreira de proteção, mantendo todos os componentes das células lisadas disponíveis, além de proteger *microorganismos* contra dessecação, biocidas, oxidantes, antibióticos e radiação ultravioleta (FLEMING; WINGENDER, 2010).

As células de bactérias ou fungos que formam biofilmes são capazes de coordenar suas atividades através da secreção de fatores de sinalização e responder a estes fatores (BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006). Esse fenômeno é conhecido como *quorum sensing*

(QS) e pode ser definido como um mecanismo de comunicação entre os microorganismos, por meio da produção e difusão de pequenas moléculas químicas ou sinalizadoras capazes de induzir diversas alterações como a regulação da expressão de genes dependentes da densidade celular (SOLA *et al.*, 2012).

Esse sistema está envolvido na regulação de uma série de fenótipos, incluindo a bioluminescência, produção de antibióticos, formação de biofilmes, mecanismos de diferenciação celular, motilidade em superfícies, crescimento, esporulação, produção de pigmentos, transferência de plasmídeos, produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, toxinas e expressão de genes de virulência (ANTUNES, 2003; SOLA *et al.*, 2012, ALBUQUERQUE; CASADEVALL, 2012).

Em células de *C. albicans*, o farnesol e o tirosol (moléculas do QS) agem de forma antagonica no processo de morfogênese. Enquanto o farnesol inibe o crescimento de hifas e o início do processo de formação do biofilme, o tirosol estimula a filamentação das células e favorece o crescimento do biofilme em resposta às diferentes alterações ambientais (ALBUQUERQUE; CASADEVALL, 2012).

Na fase C, obtém-se o biofilme maduro o qual exibe uma arquitetura tridimensional complexa constituída por uma mistura de diferentes formas morfológicas (levedura, hifas e pseudohifas) envoltas por uma matriz extracelular espessa, permeados por canais de água. Esses canais funcionam como um sistema circulatório de entrega de nutrientes, da interface para o interior do biofilme e de remoção de restos metabólitos (DONLAN; COSTERTON, 2002). A diferenciação na morfologia é dependente da espécie de *Candida*, onde células de *C. albicans* alteram a sua morfologia de levedura para hifas, enquanto *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* para a forma de pseudohifas (CUÉLLAR - CRUZ *et al.*, 2012a). Embora o processo de morfogênese não seja um pré requisito absoluto para a formação do biofilme, o mesmo é necessário para a aquisição de uma estrutura espacial organizada, uma vez que a presença de hifas fornece integridade estrutural e uma arquitetura com múltiplas camadas, característica de um biofilme maduro. Além disso, alterações na expressão gênica, principalmente quanto à resistência a fármacos são percebidas em *Candida* spp. (PRESS; SHIELDS; CLANCY, 2014).

Por fim, a etapa final (fase D) no desenvolvimento do biofilme consiste na dispersão de células leveduriformes não aderentes, as quais são liberadas das comunidades microbianas para o meio exterior, podendo iniciar a formação de um novo biofilme ou se disseminar para

outros tecidos do hospedeiro (CUÉLLAR-CRUZ *et al.*, 2012a; PRESS; SHIELDS; CLANCY, 2014).

2.4.4.2 Resistência dos biofilmes aos antifúngicos

A formação de biofilme está associada com infecção persistente, uma vez que os biofilmes são mais resistentes aos mecanismos de defesa do hospedeiro e a terapia antimicrobiana. Biofilmes de *Candida* são de 30 a 2000 vezes mais resistentes aos agentes antifúngicos (anfotericina B, fluconazol, itraconazol, cetoconazol) do que quando na forma planctônica, indicando que alguns dos mecanismos envolvidos na resistência dos biofilmes aos antifúngicos diferem dos mecanismos responsáveis pela resistência de fungos aos mesmos agentes (MARTINEZ; FRIES, 2010; SENEVIRATNE; JIN; SAMARANAYAKE, 2008). Por isso, doenças envolvendo biofilmes são geralmente crônicas e difíceis de tratar (TRENTIN; GIODARNI; MACEDO, 2013).

Diversos fatores têm sido postulados para explicar a baixa sensibilidade aos antifúngicos de células na forma de biofilme, incluindo a presença da matriz extracelular, expressão de genes de bomba de efluxo e a existência de uma subpopulação de células dentro do biofilme (conhecido como persistentes) que são preservadas pela pressão antimicrobiana (MARTINEZ; FRIES, 2010; MÜLLER, 2014; NOBILE; JOHNSON, 2015).

A matriz extracelular formada contribui tanto para a resistência do biofilme aos agentes antifúngicos na qual atua como uma barreira física à penetração de fármacos como contribui para manter a integridade estrutural do biofilme. Alguns estudos relatam que a beta-1,3-glucana, um dos componentes importantes da matriz, pode seqüestrar antifúngicos azólicos e poliênicos impedindo que esses agentes tenham acesso às células do biofilme, comprometendo assim a sua toxicidade celular e as respostas transcricionais associadas (NOBILE; JOHNSON, 2015; MARTINEZ; FRIES, 2010; MÜLLER, 2014; TAFF *et al.*, 2013). Tem sido demonstrado também que a tolerância aos antifúngicos ocorre muito rapidamente após a fase de aderência, ou seja, mesmo antes da produção da matriz extracelular ser iniciada. Portanto, a variação na quantidade da matriz em biofilmes de *Candida* spp. pode ter pouco impacto sobre a sua tolerância aos antifúngicos (BONHOMME; D'ENFERT, 2013; TAFF *et al.*, 2013).

Ramage e colaboradores (2002) demonstraram que a transcrição dos genes MDR1 e CDR1 foram supereguladas durante a formação e desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* do que em culturas planctônicas na mesma idade (24 horas). Os autores deletaram os genes MDR1, CDR1 e/ou CDR2 para investigar a contribuição das bombas de efluxo para a resistência do biofilme. Os isolados mutantes que cresceram na forma planctônica apresentaram hipersensibilidade ao fluconazol, mas os mesmos mantiveram o fenótipo de resistência durante o crescimento do biofilme. Portanto, acredita-se que a resistência em biofilmes de *Candida* spp. seja um fenômeno complexo que não pode ser explicado por um único mecanismo.

Há poucos anos, outro mecanismo de resistência chamou a atenção da comunidade científica: a teoria das células persistentes (dormentes). Essas células formam um subconjunto no interior do biofilme que se caracterizam por serem células metabolicamente inativas que surgem aleatoriamente como variantes fenotípicas e são extremamente resistentes aos agentes antifúngicos. Essas células já foram encontradas em biofilmes de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* como sendo altamente resistente à anfotericina B (NOBILE; JOHNSON, 2015; MARTINEZ; FRIES, 2010; MÜLLER, 2014). Apesar do pouco conhecimento sobre a formação e funções das células persistentes em biofilme de *Candida*, sabe-se que a resistência aos antifúngicos nessas células é independente da expressão de bombas de efluxo e a composição da membrana celular (NOBILE; JOHNSON, 2015).

Embora os fatores acima citados contribuam para um possível entendimento da baixa sensibilidade das células na forma de biofilme, cada fator isoladamente não suporta a ideia de que os biofilmes fúngicos são mais resistentes do que as células planctônicas. Assim, nota-se que a resistência dos biofilmes é multifatorial e complexa, já que a vida em biofilme permite que as células respondam a diferentes alterações ambientais (MÜLLER, 2014).

2.3. Principais agentes antifúngicos

O número de agentes disponíveis para tratar infecções fúngicas aumentou em 30% desde o ano de 2000, mas, somente pouco mais de 15 agentes estão aprovados para uso clínico atualmente. Portanto, apesar dos avanços significativos na busca por novos antifúngicos, o arsenal terapêutico ainda é restrito (THOMPSON; CADENA; PATTERSON, 2009; KATHIRAVAN *et al.*, 2012), principalmente nos hospitais públicos brasileiros, onde

só existem três agentes antifúngicos (anfotericina B, fluconazol e itraconazol) disponíveis para tratamento de micoses sistêmicas (BRASIL, 2010).

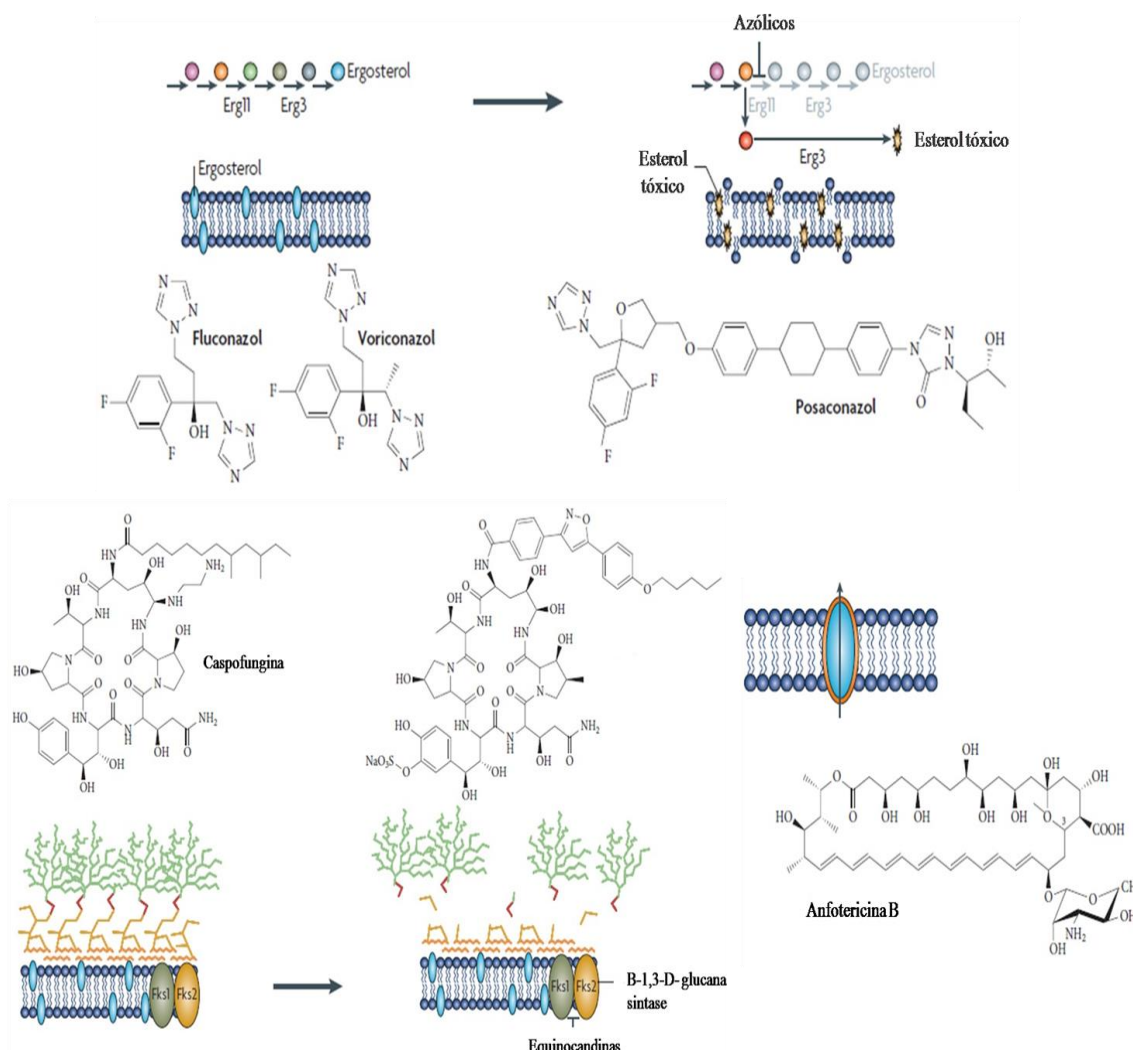
Os fármacos antifúngicos mais utilizados para o tratamento das micoses sistêmicas são classificados em poliênicos, azólicos e equinocandinas (KATHIRAVAN *et al.*, 2012).

Os poliênicos (anfotericina B e suas formulações lipídicas) representam os agentes antifúngicos mais antigos, possuem ação fungicida e amplo espectro de atividade sendo considerado “padrão ouro” para o tratamento de muitas infecções fúngicas invasivas (LARRU; ZAOUTIS, 2013; KATHIRAVAN *et al.*, 2012).

Anfotericina B é um macrolídeo poliênico que foi isolada de *Streptomyces nodosus* em 1956. Atua ligando-se irreversivelmente ao ergosterol resultando na formação de poros na membrana da célula com a perda de íons K^+ e Na^+ , que leva à diminuição do equilíbrio osmótico e conseqüentemente à morte celular (Figura 2). Achados recentes mostraram que a exposição à anfotericina B induz a produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio, o que eventualmente provoca a morte celular (MARTINEZ, 2006; KATHIRAVAN *et al.*, 2012; GONÇALVES *et al.*, 2016). Embora tenha um largo espectro de atividade, esse fármaco antifúngico é altamente tóxico para o hospedeiro. A nefrotoxicidade é o principal efeito secundário, que tem limitado o seu uso clínico (GONÇALVES *et al.*, 2016).

Apesar da resistência de *Candida* spp. a anfotericina B ser rara, alguns estudos já relatam esse fenômeno, principalmente envolvendo as espécies de *C. lusitaniae*, *C. krusei* e *C. glabrata* (DA MATTA *et al.*, 2007; FAVEL *et al.*, 2003; POUND *et al.*, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2016). Embora os mecanismos genéticos responsáveis pela resistência ainda não tenham sido elucidados, mutações nos genes envolvidos na via de biossíntese de ergosterol (ERG2, ERG3, ERG5, ERG6 e ERG11) podem levar à diminuição da concentração de ergosterol e a formação de esteróis intermediários na membrana da célula fúngica. Estas alterações quantitativas e qualitativas em esteróis da membrana plasmática diminuem a afinidade de anfotericina B por seus sítios alvo e constituem os principais mecanismos de resistência de isolados de *Candida* a este fármaco (POUND *et al.*, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2016).

Figura 2. Agentes antifúngicos e seus alvos celulares



Fonte: Adaptado de Cowen, 2008

Os azólicos constituem a classe de antifúngicos mais utilizados mundialmente e os principais representantes utilizados para tratamento de micoses sistêmicas são: itraconazol e fluconazol (triazólicos de primeira geração); voriconazol, posaconazol e isavuconazol (triazólicos de segunda geração) (PAIVA; PEREIRA, 2013). Esses triazólicos atuam sobre enzimas do citocromo P450 (14- α -desmetilase) impedindo a conversão de lanosterol em ergosterol. Este mecanismo resulta no acúmulo de metilesteróis tóxicos e inibição do crescimento e replicação da célula fúngica (Figura 2) (THOMPSON; CADENA;

PATTERSON, 2009). Também agem modificando a síntese de lipídeos e inativando enzimas do processo oxidativo dos fungos (MARTINEZ, 2006). Eles exercem ação apenas fungistática e possuem atividade *in vitro* semelhante contra a maioria das espécies de *Candida*, tendo uma sensibilidade diminuída contra *C. krusei* e *C. glabrata* (THOMPSON; CADENA; PATTERSON, 2009; MCCARTY; PAPPAS, 2016).

A resistência aos azólicos em isolados de *Candida* parece estar associada com três mecanismos moleculares principais: (i) diminuição da concentração do fármaco intracelular através das bombas de efluxo (transportadores ABC ou MFS); (ii) mudanças no sítio de ação do fármaco através de mutações no gene ERG11 (lanosterol 14- α -desmetilase) e (iii) aumento da produção de ergosterol devido à superexpressão do gene ERG 11 (GONÇALVES *et al.*, 2016).

As equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina) são lipopeptídeos semi sintéticos que foram obtidos a partir dos fungos *Coleophoma empetri* e *Glarea lozoyensi* no início dos anos 2000 (KATHIRAVAN *et al.*, 2012). Atualmente, representam a terapia de primeira linha para candidíase invasiva, incluindo aqueles isolados resistentes aos azólicos (PAIVA; PEREIRA, 2013). Elas têm como alvo a parede celular, inibindo a enzima ligada à síntese de beta 1,3-D glucana que é um dos principais componentes da parede celular fúngica (Figura 2). O bloqueio de sua síntese resulta em desequilíbrio osmótico, prejudicando a viabilidade do microorganismo (MARTINEZ, 2006). Esses antifúngicos são seguros, bem tolerados e têm poucas interações medicamentosas (PAIVA; PEREIRA, 2013).

O principal mecanismo de resistência encontrado em isolados de *Candida* spp. envolve a ocorrência de mutações pontuais no gene Fks1 e/ou Fks2, resultando em alterações conformacionais na enzima glucana sintase, diminuindo assim a afinidade do fármaco pela enzima, e gerando a resistência (GONÇALVES *et al.*, 2016). O aumento da síntese de quitina também tem sido descrito como um importante mecanismo de resistência. Isolados de diversas espécies de *Candida* quando expostos a baixas concentrações de equinocandinas induzem a expressão de genes que codificam quitina sintases que, por sua vez, aumentam a concentração de quitina na parede celular provocando uma diminuição na atividade do antifúngico (WALKER *et al.*, 2008).

Em relação ao tratamento de biofilmes, um dos métodos mais eficazes de erradicar infecções associadas a dispositivos é remover o cateter permanente. Entretanto, em algumas situações isso não é possível devido ao estado clínico do paciente, e então a utilização da

terapia antifúngica deve ser considerada (RAMAGE; ROBERTSON; WILLIAM, 2014). Como não existem medicamentos específicos, o tratamento é feito com os mesmos antifúngicos já relatados acima, principalmente com equinocandinas e formulações lipídicas de anfotericina B, já que os azólicos têm pouco efeito sobre os biofilmes maduros, embora sejam utilizados para impedir a dispersão e propagação do biofilme (PRESS; SHIELDS; CLANCY, 2014; MÜLLER, 2014).

2.4. Resistência antifúngica

O aparecimento de resistência aos medicamentos é um processo evolutivo que se baseia na seleção de microorganismos que têm uma maior capacidade de sobreviver e reproduzir na presença de um fármaco (COWEN, 2008). A competição natural para a sobrevivência manifesta-se por meio da capacidade dos microorganismos em produzir e processar metabólitos tóxicos para outros microorganismos, e ao mesmo tempo, implementar uma série de estratégias para resistir a ação dessas substâncias (MORACE; PERDONI; BORGHI, 2014).

Por mais de cinco décadas, o problema de como conter a resistência antimicrobiana ainda persiste e atualmente, isso tem se tornado um problema de preocupação global com consequências graves. Esse fenômeno é uma ameaça crescente para a saúde humana e tem um significativo impacto sócio econômico nos sistemas nacionais de saúde (KOK *et al.*, 2015; DELARZE; SANGLARD, 2015).

Um estudo realizado por O'Neill (2014) estimou que as infecções resistentes a fármacos já matam milhares de pessoas por ano em todo o mundo, podendo atingir 10 milhões em 2050. Além disso, o custo econômico também será significativo, podendo alcançar gastos em torno de US\$ 100 trilhões, caso nenhuma providência seja tomada.

As ações tomadas para combater a resistência aos medicamentos continuam sendo insuficientes e a resistência aos agentes antifúngicos tem recebido menos atenção quando comparadas aos antibióticos (COWEN, 2008; DELARZE; SANGLARD, 2015; KOK *et al.*, 2015). Fato este que não pode ser desprezível, já que 1,7 bilhões de pessoas ao redor do mundo são infectadas por fungos patogênicos, dos quais 1,5 milhões morrem a cada ano (BROWN *et al.*, 2012).

A resistência pode ser classificada como microbiológica ou clínica. A microbiológica é definida pela presença de um mecanismo de resistência mutacional ou adquirido e é dividido em: (i) primária ou inata, quando os fungos se apresentam resistentes antes mesmo da exposição ao fármaco e (ii) resistência secundária ou adquirida, que aparece em resposta à exposição ao fármaco. Já a resistência clínica é denominada como falha do tratamento (ALCAZAR-FUOLI; MELLADO, 2014).

Existem várias maneiras dos fungos desenvolverem resistência aos fármacos, e dentre as três principais classes de antifúngicos, os azólicos se destacam por apresentarem elevada predisposição à resistência através de vários mecanismos, mais especificamente a superexpressão de bombas de efluxo e alterações na enzima alvo (SRINIVASAN; LOPEZ-RIBOT; RAMASUBRAMANIAN, 2014).

As espécies de *Candida* exibem diferentes graus de sensibilidade aos antifúngicos mais comumente utilizados. Por exemplo, enquanto *C. krusei* é intrinsecamente resistente ao fluconazol, com uma taxa de resistência global de 78,3%, *C. glabrata* exibe reduzida sensibilidade dose dependente com uma taxa de resistência de 15,7%. A resistência primária ao fluconazol é menor para *C. albicans* (1,4 % - 4 %), *C. parapsilosis* (1% – 7,5%) e *C. tropicalis* (4,1% - 22 %), nos Estados Unidos e Europa (ZHANG *et al.*, 2015; GONÇALVES *et al.*, 2016).

Entretanto, no Brasil, um estudo realizado por Neves-Júnior e colaboradores (2015) em um hospital universitário de Minas Gerais, observaram que dos 93 isolados clínicos de *Candida* spp. testados, 31 % apresentaram um fenótipo de resistência ao fluconazol, com o envolvimento das espécies de *C. albicans* (38%), *C. tropicalis* (45%), *C. glabrata* (13,8 %) e *C. krusei* (3,4%). Dessas, 76 % estavam relacionadas com o envolvimento de resistência por bombas de efluxo.

Bruder-Nascimento e colaboradores (2010) realizaram um estudo em um hospital universitário de São Paulo e verificaram que dos 212 isolados de *Candida*, 31 (14,7%) eram resistentes ao fluconazol, incluindo *C. glabrata* (68%), *C. albicans* (7.1%), *C. tropicalis* (18.4%), *C. parapsilosis* (1.5%) e *C. guilliermondii* (10%).

A resistência cruzada também é encontrada entre antifúngicos azólicos (fluconazol x voriconazol) e já foi relatada em muitas espécies de *Candida*, incluindo *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLORL, 2015).

Já a resistência a poliênicos é relativamente rara, embora já se tenha relatos que espécies de *Candida* não *albicans*, tais como *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. lusitaniae* apresentam resistência intrínseca ou uma maior propensão a desenvolver resistência (ZHANG *et al.*, 2015; GONÇALVES *et al.*, 2016).

Pouco tempo após a introdução das equinocandinas na prática clínica, observou-se uma mudança no aspecto epidemiológico, com um aumento de isolados de *C. parapsilosis* menos sensíveis a essa classe farmacológica (ZHANG *et al.*, 2015). Além disso, nos Estados Unidos, nos últimos dez anos, a resistência aumentou de 4,9% a 12,3% em isolados de *C. glabrata* (ARENDRUP; PERLIN, 2014). Isso é particularmente preocupante, pois as opções de tratamento se tornam limitadas, já que *C. glabrata* geralmente é resistente a azólicos também, tendo a anfotericina B como única alternativa terapêutica (ZHANG *et al.*, 2015).

Uma série de estratégias para prevenir o surgimento e a propagação de resistência aos agentes antifúngicos está sendo adotada, como: tentativa de reduzir o impacto negativo da imunossupressão, implementação de regimes terapêuticos a fim de evitar a exposição do paciente a concentrações subinibitórias do fármaco, desenvolvimento de protocolos para a profilaxia e/ou terapia preventiva, monitoramento da resistência para detectar mudanças nos padrões de sensibilidade dos antifúngicos e elaboração de diretrizes sobre o uso de agentes antifúngicos (SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLORL, 2015).

Apesar das medidas adotadas para evitar a resistência, a busca por novas estratégias terapêuticas faz-se necessário devido o limitado arsenal terapêutico disponível para tratamento das infecções fúngicas associado ao acelerado fenômeno da resistência.

2.5. Produtos naturais como fonte de fármacos

O desenvolvimento de novos antifúngicos é um desafio particularmente interessante, pois os fungos são organismos eucariontes, tais como mamíferos. Com exceção da parede celular, as células fúngicas partilham diversas semelhanças com o hospedeiro levando a uma escassez de alvos específicos de fungos que podem ser explorados para o desenvolvimento de novos agentes. Como consequência é que existe um número limitado de classes de antifúngicos além do que a utilidade da maioria desses agentes é comprometida devido à toxicidade para o hospedeiro (SRINIVASAN; LOPEZ-RIBOT; RAMASUBRAMANIAN, 2014; SCORZONI *et al.* 2016).

Com isso, novas estratégias farmacológicas estão sendo adotadas, tais como: (i) desenvolvimento de novas formulações de antifúngicos, como as formulações lipídicas da anfotericina B, (ii) as terapias de combinação de um ou mais compostos antifúngicos, (iii) sinergismo entre agentes antifúngicos e compostos não antimicrobianos e (iv) utilização de novos princípios ativos obtidos a partir de diferentes fontes, como os produtos naturais (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

Apesar da descoberta de novas moléculas e da disponibilidade de novas formulações para reduzir a toxicidade e aumentar a biodisponibilidade, a pesquisa de novos agentes antifúngicos e a caracterização de novos alvos são uma necessidade continuada (SCORZONI *et al.* 2016), já que é bastante claro que o ritmo de desenvolvimento de medicamentos antifúngicos não acompanha o ritmo das necessidades clínicas, especialmente no que tange ao desenvolvimento da resistência (ROEMER; KRYSAN, 2014).

A maioria dos agentes antifúngicos utilizados hoje foram descobertas a partir de fontes naturais (SCORZONI *et al.* 2016). Um levantamento realizado entre os anos de 2001 a 2010 mostrou que o perfil dos fármacos utilizados obtidas a partir de fontes naturais (plantas, microorganismos marinhos e terrestres, animais terrestres e outros) não alterou significativamente (61,5% para 61,7%), confirmando que as plantas continuam sendo a principal fonte de novas moléculas representando 61% de todas as moléculas descobertas e promissoras de todo o mundo (KINGHORN *et al.*, 2011). Por isso, as plantas têm recebido um grande destaque pelos pesquisadores que têm estudado e utilizado uma ampla variedade de plantas para a identificação de moléculas bioativas, bem como suas propriedades e mecanismo de ação (SCORZONI *et al.* 2016; MARTINS *et al.*, 2015).

Os principais grupos de compostos com atividade antimicrobiana incluem: alcalóides, taninos, flavonóides, quinonas, proteínas, peptídeos, glicoproteínas, ácidos fenólicos e os óleos essenciais que normalmente apresentam atividade contra *C. albicans*, incluindo também espécies emergentes de *Candida* não *albicans* (RAJESHKUMAR; SUNDARARAMAN, 2012; SCORZONI *et al.* 2016).

2.5.1 Quinonas: β -lapachona

As quinonas representam uma ampla e diversificada família de metabólitos de plantas. Nos últimos anos intensificou-se o interesse nessa classe química, não só devido à sua

importância nos processos bioquímicos vitais, como também ao destaque cada vez maior que apresentam em variados estudos farmacológicos. Na natureza, as quinonas estão envolvidas em etapas importantes do ciclo de vida de seres vivos, principalmente nos níveis da cadeia respiratória e da fotossíntese, como por exemplo, as ubiquinonas e as plastoquinonas como também possuem ação controladora da coagulação sanguínea, como vitamina do tipo K (SILVA; FERREIRA; DE SOUZA, 2003; MOURA *et al.*, 2012).

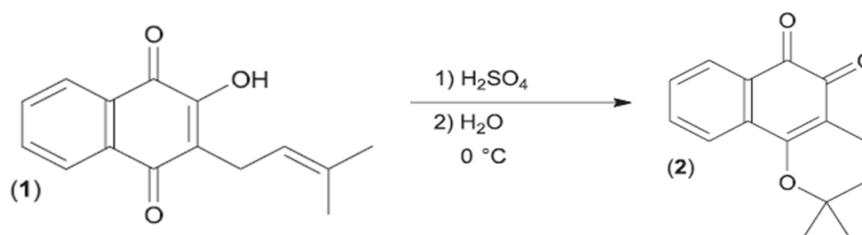
Em estudos farmacológicos, as quinonas mostram variadas bioatividades, destacando-se, dentre muitas, as propriedades microbicidas, tripanossomicidas, viruscidas, antitumorais e inibidoras de sistemas celulares reparadores, processos nos quais atuam de diferentes formas (SILVA; FERREIRA; DE SOUZA, 2003).

A principal ação deletéria de quinonas em sistemas biológicos é a promoção do estresse oxidativo, um processo que provoca danos irreversíveis alterando os componentes celulares vitais. Uma consequência desse mecanismo é a destruição de membranas biológicas, resultante da peroxidação dos componentes lipídicos. Além disso, quinonas podem interferir com uma variedade de vias biossintéticas, incluindo a destruição de proteínas, danos nas estruturas de ácidos nucléicos e de quebras na cadeia de DNA (MOURA *et al.*, 2012).

Com base na sua estrutura molecular, as quinonas são divididas em diferentes grupos, utilizando-se como critério o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinonóidico: benzoquinonas – um anel benzênico; naftoquinonas - um anel naftalênico; antraquinonas - um anel antracênico linear ou angular.

Dentre as naftoquinonas, destaca-se a β -lapachona (7,8-benzo-2,2-dimetil-3,4-diidro-5,6-oxo-2H-cromeno), uma *orto*-naftoquinona encontrada como constituinte minoritário do cerne de árvores do gênero *Tabebuia* (*Bignoniaceae*), nativa das Américas Central e do Sul e conhecidas no Brasil como ipês (MATA-SANTOS *et al.*, 2015; AIRES *et al.*, 2014). Entretanto, pode ser facilmente obtida por semisíntese a partir do lapachol através de uma reação de ciclização intramolecular promovida em meio ácido, a baixas temperaturas (Figura 3) (CAVALCANTI *et al.*, 2015), já que essa ferramenta surgiu para promover modificações estruturais a fim de modular as propriedades biológicas desses produtos puramente naturais (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Figura 3. Obtenção sintética de β -lapachona (2) a partir do lapachol (1)



Fonte: (Adaptado de Souza *et al.*, 2008)

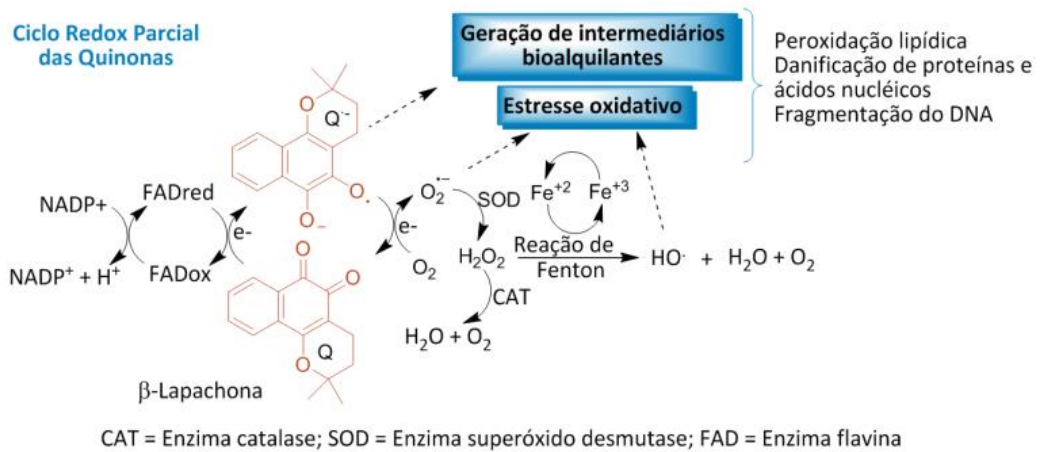
A β -lapachona tem atraído cada vez mais atenção devido à vasta gama de atividades biológicas, incluindo antiprotozoária contra *Giardia lamblia* e atuando sobre diferentes fases do *Schistosoma mansoni* (CORRÊA *et al.*, 2009; AIRES *et al.*, 2014); atividade antibacteriana contra isolados de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina quando associada a antibióticos clássicos (MACEDO *et al.*, 2013), antihelmíntica contra larvas de *Toxocara canis* (MATA-SANTOS *et al.*, 2015), anticancerígena contra células de câncer gástrico, pancreático e de pulmão (YU *et al.*, 2014; BRETON *et al.*, 2015; MA *et al.*, 2015) e antifúngica contra *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* (KWOK *et al.*, 2010; CAVALCANTI *et al.*, 2015). É importante ressaltar que a β -lapachona desperta interesse devido a ausência de citotoxicidade *in vitro* em células de mamíferos (DA SILVA JÚNIOR *et al.*, 2011), tornando esse composto um bom candidato para estudo anti- *Candida*.

Além disso, outro grande interesse no estudo, incluindo a elucidação dos mecanismos de ação dos compostos com estrutura quinoidal é devido aos seus múltiplos alvos biológicos e a sua presença generalizada na natureza envolvendo principalmente o ciclo redox (AIRES *et al.*, 2014; SILVA; FERREIRA; DE SOUZA, 2003).

O ciclo redox das quinonas onde o substrato quinonoídico (Q) sofre biorredução por um ou dois elétrons, catalisada pelas enzimas NADPH, dentre outras, forma o ânion radical semi quinona ($\text{Q}\cdot^-$) *in situ*. Na presença de oxigênio molecular (O_2), esse ânion radical ($\text{Q}\cdot^-$) transfere um elétron e gera o radical superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$). O radical superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) sofre a ação da enzima superóxido desmutase gerando peróxido de hidrogênio, e paralelamente uma reação de Fenton catalisada por Fe^{+2} produz o radical hidroxila (Figura 4). Esses radicais são os responsáveis pela condição descrita como estresse oxidativo no interior da célula, causando

danos irreversíveis em alguns de seus componentes, podendo levar à morte celular programada (apoptose) (FERREIRA *et al.*, 2010). Embora muito complexo, com etapas ainda desconhecidas, o ciclo redox continua sendo a ferramenta atual de que se valem os farmacologistas para obter conhecimentos sobre a ação citotóxica das naftoquinonas (SILVA; FERREIRA; DE SOUZA, 2003).

Figura 4 – Resumo esquemático do ciclo redox das quinonas



Fonte: Ferreira *et al.* (2010)

3. HIPÓTESES

3.1 β -lapachona apresenta atividade antifúngica *in vitro* frente a cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos.

3.2 β -lapachona exerce efeito antifúngico sobre o biofilme de *Candida* spp. resistentes a azólicos.

3.3 β -lapachona induz apoptose nas cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da β -lapachona associada ou não a antifúngicos clássicos sobre o crescimento de *Candida* spp. resistentes a derivados azólicos, nas formas planctônicas e biofilme, buscando elucidar possíveis mecanismos de ação.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) para β -lapachona frente a cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos pertencentes à micoteca do Laboratório de Bioprospecção e Experimentação em leveduras (LABEL) da Universidade Federal do Ceará;

4.2.2 Avaliar por meio do método de *checkerboard*, a associação entre β -lapachona e derivados azólicos (itraconazol, fluconazol e voriconazol) frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol;

4.2.3 Determinar o potencial antifúngico da β -lapachona contra biofilme de *Candida* spp. resistentes a azólicos;

4.2.4 Investigar possíveis mecanismos de ação da β -lapachona frente a cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos, através de técnicas de citometria de fluxo e ensaio do cometa;

4.2.5 Identificar o perfil de expressão proteômico de uma cepa de *C. albicans* resistente a azólicos quando tratadas com β -lapachona.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Recuperação das cepas

Neste estudo foram utilizadas 22 cepas de *Candida* spp. (9 *C. albicans*, 7 *C. tropicalis*, 6 *C. parapsilosis*) oriundas de amostras clínicas e identificadas molecularmente. Além disso, utilizamos 2 cepas padrão ATCC (*C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019). Todos os isolados pertencem à micoteca do Laboratório de Bioprospecção e Experimentação em Leveduras (LABEL) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

As cepas estavam estocadas em ágar Sabouraud dextrose (HiMedia, Mumbai, Índia) acrescido de glicerol (Dinâmica, São Paulo, Brasil) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para avaliação da viabilidade celular, as culturas foram ressuspensas em caldo Sabouraud (HiMedia, Mumbai, Índia) e incubadas por 24 horas a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. No dia seguinte, foram semeadas em ágar Sabouraud e incubadas por até 48 horas a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, verificou-se o crescimento de cada isolado em meio cromogênico HiCrome *Candida* Differential Agar (HiMedia, Mumbai, Índia), os quais foram incubados sob as mesmas condições afim de confirmar a pureza das colônias (DA SILVA *et al.*, 2013; NETO *et al.*, 2014). Todo o procedimento foi realizado sob normas de biossegurança nível 2.

5.2. Antifúngicos

Os agentes antifúngicos utilizadas neste estudo foram: fluconazol (FLC), itraconazol (ITZ), voriconazol (VRZ) e anfotericina B (Anfo B) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA); e o composto beta lapachona (β -lap) cedido pelo prof. Eufrânio Nunes da Silva Júnior da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). As soluções de ITZ, VRZ, Anfo B e β -lap foram diluídas em DMSO (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e o FLC foi diluído em água destilada (CLSI, 2008). As concentrações dos fármacos testadas variaram de 0,125 a 64 $\mu\text{g/mL}$ para FLC e β -lap e de 0,0313 a 16 $\mu\text{g/mL}$ para ITC, VRZ e Anfo B (CLSI, 2008).

5.3. Teste de Sensibilidade aos antifúngicos

5.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antifúngicos

O teste de sensibilidade foi realizado por meio da técnica de microdiluição em caldo segundo o documento M27-A3 (CLSI, 2008) utilizando o meio de cultura RPMI 1640 (Vitrocell Embriolife, São Paulo, Brasil) (pH $7,0 \pm 0,1$) tamponado com 0,165 M ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma, USA). Para a realização dos testes, foram utilizadas placas de 96 poços fundo U. Na coluna 2 foram adicionados 200 μL do agente e em seguida, realizou-se a diluição seriada para obter o intervalo de concentração desejado. A coluna 1 foi utilizada como controle de esterilidade do meio RPMI 1640 e a coluna 12 como controle negativo do teste (inóculo + meio). A partir de um cultivo de 24 horas dos isolados a serem testados foi preparada uma suspensão de inóculo inicial de acordo com a escala 0,5 McFarland (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil). Em seguida, foram realizadas diluições seriadas em meio RPMI para obtenção de inóculo final contendo 0,5 a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Um volume de 100 μL dessa suspensão padronizada foi adicionada em cada poço contendo o agente antifúngica. As microplacas foram incubadas por 24 horas a $35\text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 2\text{ }^\circ\text{C}$) e após esse período a leitura visual foi realizada.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração do fármaco capaz de inibir 50% do crescimento do microorganismo, em comparação com o verificado no poço controle (coluna 12) para os derivados azólicos e beta lapachona (CLSI, 2008).

Para avaliar a ocorrência de resistência aos azólicos foram levados em consideração os seguintes pontos de corte: CIM $\geq 1\text{ }\mu\text{g/mL}$ para itraconazol e voriconazol e CIM $\geq 8\text{ }\mu\text{g/mL}$ para fluconazol (CLSI, 2008; CLSI, 2012). Todo o experimento foi realizado em triplicata e foram utilizadas as cepas controle: *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258.

5.3.2 Teste do sinergismo pelo técnica de microdiluição em caldo: *checkerboard*

Após a determinação do CIM de cada fármaco isolado, foi realizada a técnica do *checkerboard* (ODDS, 2003). Nessa técnica, cada poço contém uma combinação única de diferentes concentrações dos fármacos testados, no qual se determina o percentual de inibição

do crescimento das células na presença de diferentes combinações dos fármacos em relação ao poço controle. Assim as cepas foram expostas a concentrações de β -lap e FLC (64 a 0,125 $\mu\text{g/mL}$); e ITZ e VRZ (16 a 0,03 $\mu\text{g/mL}$) quando testadas isoladamente e ITC (0,125 $\mu\text{g/mL}$), FLC (4,0 $\mu\text{g/mL}$) e VRZ (0,125 $\mu\text{g/mL}$) quando testadas em associação com a β -lap (64 a 0,125 $\mu\text{g/mL}$). A interação entre os fármacos foi realizada a partir da determinação do Índice da Concentração Inibitória Fracionária (FICI) o qual é obtido pela soma do FIC de cada fármaco, que trata-se da relação entre o CIM de cada fármaco utilizado em combinação e o CIM do mesmo fármaco utilizado sozinho (Figura 5). Dessa forma, foram considerados os seguintes parâmetros: $\text{FICI} \leq 0,5$: sinergismo, $\text{FICI} > 4,0$: antagonismo e $0,5 < \text{FICI} < 4,0$: indiferente (ODDS, 2003).

$$\text{FICI} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B \quad \text{Onde: } \text{FIC}_A = \frac{\text{CIM}_{\text{fármaco A em combinação}}}{\text{CIM}_{\text{fármaco A isoladamente}}}$$
$$\text{FIC}_B = \frac{\text{CIM}_{\text{fármaco B combinação}}}{\text{CIM}_{\text{fármaco B isoladamente}}}$$

Figura 5: Fórmula para determinação do FICI

5.3.3. Análise dos dados

Os testes de susceptibilidade *in vitro* foram realizados em triplicata em diferentes dias. Logo, as médias geométricas foram usadas estatisticamente para comparar os resultados do CIM.

5.4. Testes utilizando citometria de fluxo

5.4.1 Preparo das suspensões de células de *Candida* spp.

Para os ensaios de citometria de fluxo foram utilizados um isolado de cada espécie de *Candida*: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (ver Tabela 2). As cepas de *Candida* spp. foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose a 35 °C por 24 horas. Em seguida, as leveduras foram suspensas em 5 mL de meio YPD e reincubadas sob as mesmas condições. Posteriormente, as células foram coletadas por centrifugação (3000 g, 5 min) e lavadas três vezes com solução salina 0,85%. Por fim, as células ($\sim 10^6$ células/mL) foram ressuspensas em meio RPMI (Vitrocell Embriolife, São Paulo, Brasil) (Adaptado de DA SILVA *et al.*, 2013; NETO *et al.*, 2014).

5.4.2 Tratamento das células de *Candida* spp.

Para a determinação da viabilidade celular, avaliação do potencial transmembrana mitocondrial, detecção de espécies reativas de oxigênio e externalização de fosfatidilserina, um isolado de cada espécie de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*) resistentes a azólicos foram expostas a β -lapachona (β -lap) (CIM, 2x CIM e 4x CIM), meio de cultura RPMI que foi utilizado como controle negativo e anfotericina B (Anfo B) (4 μ g/mL). As células tratadas foram incubadas a 35 °C durante 24 horas. Posteriormente, alíquotas das células de *C. albicans* foram coletadas nos intervalos de tempo de 3, 6, 12 e 24 horas após exposição aos compostos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes.

5.4.3 Determinação da viabilidade celular

As células de *Candida* spp. após exposição a β -lapachona foram marcadas com iodeto de propídeo (PI) e analisadas por citometria de fluxo (Guava EasyCyte™ Mini System). Para cada experimento, 10.000 eventos foram avaliados. Os detritos celulares foram omitidos da análise (DA SILVA *et al.*, 2013).

5.4.4 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em células de *Candida* spp.

A rodamina 123 (Rh 123) é um corante lipofílico que é captado para o interior da mitocôndria quando esta apresenta $\Delta\Psi_m$ inalterado. Portanto, células viáveis terão maior afinidade pelo corante enquanto as mitocôndrias despolarizadas emitirão menor intensidade de fluorescência (MARCHETTI *et al.*, 1996).

As células de *Candida* spp., após exposição a β -lapachona foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS), incubadas com rodamina 123 (1 μ g/mL) (Sigma, USA) a 37 °C por 15 min no escuro. Posteriormente foram lavadas duas vezes com PBS e reincubadas a 37 °C por 30 min. A fluorescência foi determinada por citometria de fluxo. Para cada experimento, 10000 eventos foram avaliados. Os detritos celulares foram omitidos da análise (DA SILVA *et al.*, 2013; NETO *et al.*, 2014).

5.4.5 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio em células de *Candida* spp.

Para avaliar as espécies reativas de oxigênio (EROS) geradas intracelularmente utilizamos a sonda diacetato 2'7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA). Esta sonda reage com diferentes espécies reativas de oxigênio, sendo, no entanto, mais específica para os radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio. H₂DCFDA se difunde prontamente através da membrana celular e é hidrolisado por esterases intracelulares no composto não fluorescente diclorofluoresceína (DCFH), que, por sua vez, é rapidamente oxidado a um composto altamente fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (HEMPEL *et al.*, 1999). A intensidade de fluorescência do DCF é proporcional à quantidade de EROS formado intracelularmente (LEBEL, ISCHIOPOULOS, BONDY, 1992).

As células de *Candida* spp. após exposição a β-lapachona foram incubadas com H₂DCFDA (20 μM) (Sigma, USA) por 30 min no escuro a 37 °C. Em seguida, as células foram lavadas e ressuspensas em PBS e analisadas por citometria de fluxo (DA SILVA *et al.*, 2013; NETO *et al.*, 2014).

5.4.6 Determinação da externalização de fosfatidilserina em células de *Candida* spp.

A externalização da PS trata-se de um marcador de estágios iniciais de apoptose, que pode ser detectado por marcação com Anexina V, que se liga à fosfatidilserina com alta afinidade na presença de Ca²⁺ (PAROLIN; REASON, 2001; MARTIN *et al.*, 1995). Ao conjugar a Anexina V ao FITC (Isotiocianato de fluoresceína) é possível identificar e quantificar as células apoptóticas diferenciando-as das células necróticas (iodeto de propídeo). Com isso, a detecção da externalização da fosfatidilserina foi realizada utilizando anexina V conjugada com a fluoresceína e PI.

As células de *Candida* spp., após exposição a β-lapachona foram coletadas por centrifugação e digeridas com Zymolyase 20T (2 mg/mL) (Seikagaku Corporation, Japão) em tampão fosfato de potássio (PPB) (1 M pH 6,0) durante 2 horas a 30 °C. Os protoplastos de *Candida* spp. foram ressuspensos em uma solução contendo anexina V-FITC (Guava Nexin Kit, Guava Technologies, Inc., Hayward, CA, USA) e PI (Sigma, USA) na ausência de luz e a 37 °C. Após 20 min. as suspensões foram analisadas por citometria de fluxo. Para cada

experimento, 10.000 eventos foram avaliados, e os restos celulares foram omitidos da análise (DA SILVA *et al.*, 2013; NETO *et al.*, 2014).

5.4.7 Análise dos dados

Os dados obtidos foram analisados a partir da média \pm erro padrão da média (E.P.M) de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre as concentrações usadas, os dados foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) seguidos pelo Student Newman Keuls ($p < 0,05$), utilizando o programa Prism versão 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5.5. Ensaio do Cometa

O ensaio em cometa alcalino foi realizado essencialmente como descrito por Miloshev, Mihaylov e Anachkova (2002). 200 μ L de agarose 0,5% (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) foi espalhada em cada lâmina e seca a temperatura ambiente antes da aplicação da suspensão de células sobre as lâminas. As células de *Candida* spp. foram centrifugadas em uma microcentrífuga de eppendorf durante 5 min, lavadas com água destilada, e ressuspensas em tampão S (1M de sorbitol, 25 mM de KH_2PO_4 , pH 6,5). Alíquotas de aproximadamente 5×10^4 células foram misturadas com agarose de baixo ponto de fusão (37 °C) contendo Zymolyase 20T (2 mg/ mL) e espalhadas sobre as lâminas, coberto com lamínulas e incubadas durante 20 min a 30 °C para desintegrar a parede da célula de levedura e obter os esferoplastos. A fim de minimizar a atividade de enzimas celulares endógenas, todos os procedimentos que se seguem foram realizados numa sala fria de 8 a 10 °C. As lamínulas foram retiradas e as lâminas incubadas em uma solução (30 mM de NaOH, 1M de NaCl, 0,1% laurilsarcosina, 50 mM de EDTA, pH 12,3) durante 1 h para lisar os esferoplastos. As lâminas foram lavadas três vezes durante 20 min. cada em uma solução (30 mM de NaOH, 10 mM de EDTA, pH 12,4) para o desenrolamento do DNA e, em seguida, submetido a eletroforese no mesmo tampão. A eletroforese foi realizada por 20 min a 0,5 V/cm e amperagem ajustada para 24 mA. Após eletroforese, os géis foram neutralizados por submersão das lâminas em 10 mM Tris HCl pH 7,5 durante 10 min seguido por incubações consecutivas de 10 min em etanol 76% e 96%. Finalmente, as lâminas foram secas à temperatura ambiente, coradas com

brometo de etídio (1 mg/mL) e visualizadas em microscópio de fluorescência. Todos os passos acima foram realizados no escuro para evitar danos adicionais no DNA. Imagens de 100 células selecionadas aleatoriamente (50 células de cada uma das duas lâminas idênticas) foram analisadas para cada grupo experimental. A leitura é feita utilizando escores de acordo com o tamanho da cauda (de não danificado - 0 a dano máximo - 4), e o valor de índice de dano foi calculada para cada amostra de células. Assim, o índice de dano variou de 0 (completamente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4) (COLLINS *et al.*, 2004).

5.5.1 Análise da oxidação de bases purinas do DNA

Esse teste é outra versão do ensaio do cometa. Ele utiliza a enzima formamido-pirimidina-DNA glicosilase (FPG) (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA) que detecta a oxidação de bases purinas. O método é semelhante ao do cometa alcalino, mas com pequenas modificações. Resumidamente, as lâminas foram removidas da solução de lise, e lavadas três vezes em tampão enzima (40 mM de HEPES, 100 mM de KCl, 0,5 mM de Na₂EDTA, 0,2 mg/mL de BSA, pH 8), secas, e incubadas com 70 µL de FPG por 30 min a 37 °C. Imagens de 100 células selecionadas aleatoriamente (50 células de cada uma das duas lâminas idênticas) foram analisadas visualmente por grupo. A quantidade de purinas oxidadas (FPG - sensíveis) foi então determinada pela subtração da quantidade de quebras de fita (amostras incubadas somente com tampão) com a quantidade de quebras totais obtidas após incubação com FPG de acordo com Da Silva Júnior *et al.* (2011).

5.5.2 Análise dos dados

Os dados obtidos foram analisados a partir da média ± E.P.M de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre as concentrações usadas, os dados foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) seguidos pelo Student Newman Keuls (p <0,05), utilizando o programa Prism versão 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5.6. Análise Proteômica em células de *Candida albicans* expostas a β-lapachona

5.6.1 Preparo e tratamento das células de *Candida albicans*

Para este teste foi escolhida uma cepa representativa de *C. albicans* 2. A cepa em estoque foi semeada em meio ágar Sabouraud dextrose e incubada a 35 °C por 24 horas. Em seguida, a levedura foi ressuspensa em 5 mL de meio YPD e incubadas sob as mesmas condições descritas anteriormente. As células foram coletadas por centrifugação a 3000 g por 5 min e lavadas três vezes com solução salina 0,85%. Posteriormente, as células foram ajustadas de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland em meio RPMI. Por fim, foi adicionada a β -lapachona (CIM = 16 μ g/mL) e incubadas a 35 °C por 24 horas. O meio RPMI + suspensão foi utilizado com controle negativo (YOO *et al.*, 2013).

5.6.2 Lise celular e solubilização de células de *C. albicans*

Após o período de incubação, as células foram centrifugadas (3000 g por 5 min) e o *pellet* foi ressuspensa em tampão de amostra (100 mM Tris-HCL, pH 7). As suspensões celulares foram submetidas a 3 ciclos de congelamento e descongelamento para romper as membranas celulares e extrair proteínas presentes na amostra. Em seguida, as amostras foram sonicadas (3 pulsos, 1 min) e centrifugadas a (12000 g por 20 min). O sobrenadante foi removido e estocado a -80 °C até o momento da análise (YOO *et al.*, 2013).

5.6.3 Identificação e quantificação de proteínas por espectrometria de massa

De modo a preparar as amostras para a análise por espectrometria de massa, o extrato protéico obtido após a lise celular foi desnaturado na presença de 0,2% da solução do surfactante *RapiGest SF* (Waters, Milford, USA), em uma solução de NH_4CO_3 , adicionados a fração protéica e incubadas a 80 °C durante 15 min. Em seguida, foram adicionadas as amostras 5 μ L de ditionitrotol (DTT) (100 mM) a 60 °C durante 30 min, para a abertura das proteínas, facilitando o acesso para alquilação e digestão. A amostra foi colocada em chapa aquecedora a 60 °C por 30 min e em seguida, foram adicionados 5 μ L de iodoacetamida (IAA) (300 mM) para alquilação das cisteínas por 30 min à temperatura ambiente, no escuro. Após este período, 1 μ g da enzima tripsina (Promega, Madison, WI, USA) foi adicionada às

amostras a 37 °C durante 20 horas. A digestão foi interrompida pela adição de 10 µL de ácido trifluoroacético 5% (TFA) à mesma temperatura durante 90 min. Por fim, as amostras foram centrifugadas (12000 g, 30 min, 6 °C) e o sobrenadante foi transferido para frascos *vials*.

Finalmente, após a digestão os peptídeos trípticos da proteína rábica fosforilase B (PhospB; UniProt: P00489) foram adicionados a uma concentração final de 50 fmol/µL como padrão interno (CURTY *et al.*, 2014). A aquisição de dados de espectrometria de massas foi realizada utilizando de um espectrômetro de massas NanoESI-Q-TOF (Waters Corporation, Manchester, UK), acoplado a um sistema de cromatografia nanoUPLC (Waters, UK). Dessa forma, inicialmente, os peptídeos trípticos foram submetidos a um processo cromatográfico utilizando o sistema nanoACQUITY UPLC (Waters, UK) equipado com uma coluna de fase reversa C18 HSS T3 (1,8 µm, 75 µm x 20 mm). Então a cromatografia foi realizada com um gradiente de acetonitrila 0 a 40 % (v/v) contendo 0,1 % de ácido fórmico a um fluxo de 500 nL/min.

Para todas as medições, o espectrômetro de massas foi operado no modo 'V', em uma resolução de, pelo menos, 12000 m/z. Todas as análises foram realizadas utilizando ionização por electrospray no modo ESI (+) através da fonte *NanoLockSpray*. O canal de coleta da amostra analisada foi fechado a cada 30 seg para passagem do íon de referência.

O espectrômetro de massa foi calibrado com uma solução de *Glu-fibrinogen peptide* (GFP) (500 fmol/mL) injetado através do spray de referência da fonte *NanoLockSpray*. O íon duplamente carregado ($[M + 2H]^{2+}$) foi usado para a calibração de um ponto inicial (L_{teff}), e a fragmentação de íons MS/MS do GFP foi usada para obter a calibração final do instrumento. O espectrômetro foi programado para alternar automaticamente entre MS padrão (3 eV) e energias elevadas de colisão em rampa MSE (12 a 40 eV) na célula de colisão com gás argônio. A aquisição de dados após colisão foi realizada em faixa de 50 a 3000 m/z. A RF_{offset} (perfil MS) foi ajustada de forma que os dados de LC/MS foram efetivamente adquiridos de 300 a 3000 m/z, o que garante que qualquer massa observada nos dados de LC/MSE com menos 300 m/z surgiram de dissociações na célula de colisão.

5.6.4 Processamento de dados e análise de expressão diferencial

Para a coleta, processamento e análise dos dados foram utilizados os programas *MassLynx* v.4.1 e *ProteinLynx* v.2.4. Para a busca na base de dados apropriado foi usado

ProteinLynxGlobalServer (PLGs) v.2.4 contendo o programa *Expression^E* v.2.4. Os Bancos de Dados UniProtKB / Swiss-Prot 57.1 e UniProtKB / TrEMBL 40.1 foram utilizados e as condições de pesquisa foram baseados em taxonomia (*Candida albicans*) (LI *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2006).

A quantificação absoluta para cada corrida foi calculada de acordo com a média da intensidade dos três peptídeos mais intensos para cada proteína (*label-free* HI3) (SILVA *et al.*, 2006). Após a identificação e quantificação absoluta das proteínas de cada fração, algumas proteínas foram selecionadas como proteínas internas (*housekeeping*) para normalizar os níveis de expressão entre os grupos em estudo e realizar a quantificação relativa, *label-free*, de proteínas (LI *et al.*, 2009).

Da lista final de proteínas identificadas com confiança ($0,05 \geq p \geq 0,95$), aquelas que apresentaram razão (**Controle: β -Lapachona**) igual ou superior a 1,5 foram consideradas superexpressas ou *up-regulated* e aquelas que apresentaram razão igual ou inferior 0,66 foram consideradas subexpressas ou *down-regulated*. Proteínas com razões de expressão entre os valores acima estabelecidos foram consideradas sem expressão diferencial ou *unchanged*.

5.7. Ensaios de Biofilme

5.7.1 Crescimento dos isolados de *Candida* spp. no modo biofilme

A formação do biofilme foi realizada utilizando placas de microtitulação de acordo com a metodologia de Pierce e colaboradores (2008), com pequenas modificações. Para esses testes foram utilizados uma cepa boa formadora de biofilme de cada espécie de *Candida*: *C. albicans* 1, *C. tropicalis* 4 e *C. parapsilosis* 2. As cepas de *Candida* spp. foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose a 35 °C por 24 horas. Em seguida, as leveduras foram suspensas em 5 mL de meio YPD e reincubadas sob as mesmas condições. Posteriormente, as células foram coletadas por centrifugação (3000 g, 5 min) e lavadas com PBS por três vezes. As células foram ajustadas de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland em meio RPMI. Seguidamente, foram dispensados 200 μ L do inóculo em uma placa de 96 poços fundo chato. No poço 12 adicionou-se somente RPMI como controle de esterilidade. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. No dia seguinte, o sobrenadante foi aspirado e a placa foi lavada delicadamente com PBS por três vezes para remoção das células não aderentes. Por

fim, pode-se visualizar a formação de biofilme no fundo de cada poço, estando estes apropriados para a etapa seguinte.

5.7.2 Determinação da atividade de β -lapachona sobre biofilmes formados de *Candida* spp.

Após formação do biofilme, 200 μ L de β -lapachona nas diversas concentrações testadas (CIM/4, CIM/2, CIM, 2x CIM, 10x CIM e 50x CIM) foi colocada na placa. Foi preparado um controle negativo (poço sem formação de biofilme, apenas com RPMI) e um controle de 100% de crescimento (com suspensão de células em RPMI sem fármaco) e incubada a 35 °C por 24 horas. Após este período, o fármaco foi aspirada e a placa lavada com PBS por três vezes. Em seguida, adicionou-se o corante de viabilidade celular brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio (MTT) (1 mg/mL) (Sigma, USA). Após incubação de 18 a 20 horas no escuro, o corante foi removido, os poços lavados 3x com PBS e adicionado DMSO (200 μ L). Após 5 a 15 minutos, retirou-se 100 μ L de cada poço e transferiu-se para uma nova placa. A leitura foi realizada em um leitor de microplaca Biochrom Asys UVM 340 (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido) a 540 nm. A redução de crescimento foi comparada ao poço que corresponde a 100% de crescimento, livre de fármaco (PIERCE *et al.*, 2008). A concentração de β -lapachona variou de 2 a 400 μ g/mL e a anfotericina B de 16 a 0,03 mg/L. Os ensaios foram realizados em triplicata.

5.7.3. Ação de β -lapachona sobre a inibição da formação de biofilme em *Candida* spp.

As cepas de *Candida* spp. foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose a 35 °C por 24 horas. Em seguida, as células foram transferidas para YPD caldo e reincubadas sob as mesmas condições. As células foram centrifugadas (3000 g, 5 min) e lavadas três vezes com tampão PBS. Os pellets foram ressuspensos e a densidade celular ajustada para 1×10^6 células/mL em RPMI. 100 μ L do inóculo foi adicionado a placa juntamente com 100 μ L da solução de β -lapachona em concentrações inibitórias e subinibitórias (CIM/4, CIM/2, CIM, 2x CIM, 10x CIM, 50x CIM) nos poços teste. Em cada placa foi preparado um controle negativo (poço sem formação de biofilme, apenas com RPMI) e um controle de 100% de crescimento (com suspensão de células em RPMI sem fármaco). A placa foi incubada a 35 °C por 24 horas. Em seguida, o sobrenadante foi aspirado e os poços lavados três vezes com PBS para remoção das

células não aderentes. Em seguida, adicionou-se MTT (1 mg/mL) (Sigma, USA) e após incubação de 18 a 20 horas no escuro, o corante foi removido, os poços lavados 3x com PBS e adicionado DMSO (200 µL). Após 5 a 15 min, retirou-se 100 µL de cada poço e transferiu-se para uma nova placa. A leitura foi realizada em um leitor de microplaca a 540 nm. A redução de crescimento foi comparada ao poço que corresponde a 100% de crescimento, livre de fármaco (PIRES, 2010). A concentração de β-lapachona variou de 2 a 400 µg/mL e a anfotericina B de 16 a 0,03 mg/L. Os ensaios foram realizados em triplicata.

5.7.4 Análise dos dados

Os dados obtidos foram analisados a partir da média ± E.P.M de 3 experimentos independentes. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre as concentrações usadas, os dados foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) seguidos pelo testes de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o programa *GraphPad prism* versão 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

6. RESULTADOS

6.1 Atividade antifúngica da β -lapachona frente a cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos

Os testes de sensibilidade para se determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de β -lapachona e dos derivados azólicos para cada cepa (itraconazol, fluconazol e voriconazol) foram avaliados através da técnica de microdiluição em caldo. Os ensaios realizados com os antifúngicos azólicos foram feitos a fim de confirmar a resistência. Portanto, os valores da CIM para as cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. testadas frente aos derivados azólicos encontram-se no Anexo I. Com a confirmação da resistência, foram utilizadas 22 cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos divididas entre as principais espécies de relevância clínica. Após 24 horas de exposição a β -lapachona, os isolados de *Candida* spp. apresentaram CIMs variando de 4 a 16 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando assim, uma atividade antifúngica significativa, como observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Efeito antifúngico de β -lapachona frente a cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos

Cepa ^a	Origem	Nº de acesso Genbank	Fenótipo de Resistência	CIM
				Valores de CIM ^b (μ g/mL)
				β -Lapachona
<i>C. albicans</i> 1 **	Sangue	AB861479	FLC, VRZ	8,0
<i>C. albicans</i> 2 *, ¹	Sangue	KJ740179	ITC, FLC, VRZ	16
<i>C. albicans</i> 3	Sangue	KJ740175	FLC, VRZ	16
<i>C. albicans</i> 4	Sangue	AB861478	ITC, FLC	4,0
<i>C. albicans</i> 5	Sangue	KJ740176	ITC, FLC, VRZ	8,0
<i>C. albicans</i> 6	Sangue	KJ740174	ITC, FLC, VRZ	8,0
<i>C. albicans</i> 7	Sangue	AB861480	ITC, FLC	8,0
<i>C. albicans</i> 8	Sangue	AB861477	ITC, FLC	8,0
<i>C. albicans</i> 9	Sangue	AB861476	ITC, FLC	4,0
<i>C. tropicalis</i> 1*	Sangue	KJ740185	ITC, FLC, VRZ	16
<i>C. tropicalis</i> 2	Sangue	KJ740181	ITC, FLC, VRZ	4,0
<i>C. tropicalis</i> 3	Sangue	KF616840	ITC, FLC	16
<i>C. tropicalis</i> 4 **	Sangue	AB861490	ITC, FLC, VRZ	8,0
<i>C. tropicalis</i> 5	Urina	AB861491	FLC	4,0
<i>C. tropicalis</i> 6	Sangue	KJ740184	FLC, VRZ	8,0
<i>C. tropicalis</i> 7	Sangue	AB861493	FLC, VRZ	8,0
<i>C. parapsilosis</i> 1	Sangue	KJ740191	ITC, FLC	8,0
<i>C. parapsilosis</i> 2 **	Sangue	KJ740186	ITC, FLC	8,0
<i>C. parapsilosis</i> 3 *	Sangue	AB861485	ITC, FLC	8,0
<i>C. parapsilosis</i> 4	Sangue	KJ740188	ITC, FLC	8,0
<i>C. parapsilosis</i> 5	Sangue	AB861488	ITC, FLC	8,0
<i>C. parapsilosis</i> 6	Sangue	AB861487	FLC, VRZ	16
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019		-		4,0
<i>C. krusei</i> ATCC 6258		-		4,0

^a Cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos.

^b O CIM foi definido como a menor concentração do fármaco que produziu 50% de redução de crescimento fúngico após 24 horas de incubação. O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo M27-S4 do CLSI. Os valores do CIM são expressos em μ g/mL. O CIM representa a média geométrica de 3 CIM determinados em diferentes dias.

* Cepas utilizadas para investigar o mecanismo de ação da β -lapachona.

** Cepas utilizadas para o teste do biofilme.

¹ Cepa representativa utilizada para análise proteômica.

6.2 Efeito da combinação entre azólicos e β -lapachona frente a cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos

Com a finalidade de investigarmos se havia sinergismo entre β -lapachona e os derivados azólicos (itraconazol, fluconazol e voriconazol) foi utilizado o método do *checkerboard* para derivação do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI). Para isso, foram selecionados oito isolados de *Candida* spp. resistentes aos azólicos. De acordo com a Tabela 3, podemos observar que apenas um isolado apresentou FICI = 4,12 frente à associação (β -lap + FLC) demonstrando um efeito antagônico. Os demais isolados interagiram de maneira indiferente frente às associações (β -lap + ITZ) e (β -lap + FLC) ($CIM \leq 0,5$ - sinergismo, $0,5 < CIM < 4,0$ - indiferente e $CIM > 4,0$ - antagonismo). Em relação à interação (β -lap + VRZ) os isolados também apresentaram efeito indiferente, como mostra a Tabela 4. Portanto, como não foram obtidos resultados sinérgicos entre as interações (β -lap + FLC; β -lap + VRZ; β -lap + ITZ) não foi dado continuidade aos ensaios seguintes com as mesmas.

Tabela 3 - Efeito da associação de β -lapachona (β -lap) com itraconazol (ITC) e fluconazol (FLC) frente a cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos

Cepas ^a	CIM isolado ^c ($\mu\text{g/mL}$)			CIM associado ^d ($\mu\text{g/mL}$)		FICI ^e – interação		
	ITC	FLC	β -lap	ITC/ β -lap	FLC/ β -lap	ITC + β -lap	FLC + β -lap	Interpretação ^f
<i>C. albicans</i> 2	4,0	64	16	0,125/16	4,0/16	1,03	1,06	I/I
<i>C. albicans</i> 4	4,0	32	4,0	0,125/8,0	4,0/16	2,03	4,12	I/A
<i>C. albicans</i> 5	4,0	32	8,0	0,125/16	4,0/16	2,03	2,12	I/I
<i>C. tropicalis</i> 1	2,0	64	16	0,125/16	4,0/16	1,06	1,06	I/I
<i>C. tropicalis</i> 3	1,0	64	16	0,125/16	4,0/16	1,12	1,06	I/I
<i>C. parapsilosis</i> 1	2,0	16	8,0	0,125/16	4,0/16	2,06	2,25	I/I
<i>C. parapsilosis</i> 2	4,0	32	8,0	0,125/16	4,0/16	2,03	2,12	I/I
<i>C. parapsilosis</i> 3	1,0	16	8,0	0,125/16	4,0/16	2,12	2,25	I/I

^a Cepas isoladas de amostras biológicas. ^b Os valores de CIM foram definidos como a menor concentração que produziu redução de 50% do crescimento de células fúngicas após 24 horas de incubação. O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo M27- S4 do CLSI 2012. ^c Foram utilizadas as faixas de β -lap e FLC (64-0,125 $\mu\text{g/mL}$); ITRA (16 - 0,03 $\mu\text{g/mL}$); VRZ (16 - 0,03 $\mu\text{g/mL}$) quando testadas isoladamente e ^d ITC (0, 125 $\mu\text{g/mL}$), FLC (4,0 $\mu\text{g/mL}$) e VRZ (0,125 $\mu\text{g/mL}$) quando testadas em associação com a β -lap (64 - 0,125 $\mu\text{g/mL}$). ^e O efeito sinérgico de ITC, FLC, VRZ associado com a β -lapachona foi calculado baseado no Índice da Concentração Inibitória Fracionária (FICI). ^f A interpretação foi de acordo com os valores de CIM: CIM \leq 0,5 - sinergismo (S); 0,5 < CIM < 4,0 - indiferente (I) e CIM > 4,0 - antagonismo (A).

Tabela 4 - Efeito da associação de β -lapachona (β -lap) com voriconazol (VRZ) frente a cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos

Cepas ^a	CIM isolado ^c (μ g/mL)		CIM associado (μ g/mL)	FICI ^e – interação	
	VRZ	β -lap		VRZ/ + β -lap	Interpretação ^f
<i>C.albicans</i> 1	2,0	8,0	0,125/8,0	1,06	I
<i>C.albicans</i> 2	2,0	16	0,125/8,0	0,56	I
<i>C.albicans</i> 3	2,0	16	0,125/8,0	0,56	I
<i>C.albicans</i> 5	2,0	8,0	0,125/8,0	1,06	I
<i>C.tropicalis</i> 1	1,0	16	0,125/8,0	0,62	I
<i>C.tropicalis</i> 6	1,0	8,0	0,125/8,0	1,12	I
<i>C. tropicalis</i> 7	1,0	8,0	0,125/8,0	1,12	I
<i>C.parapsilosis</i> 6	1,0	16	0,125/8,0	0,62	I

^a Cepas isoladas de amostras biológicas. ^b Os valores de CIM foram definidos como a menor concentração que produziu redução de 50% do crescimento de células fúngicas após 24 horas de incubação. O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo M27- S4 do CLSI 2012. ^c Foram utilizadas as faixas de β -lap e VRZ (16 - 0,03 μ g/mL) quando testadas isoladamente e ^d VRZ (0,125 μ g/mL) quando testadas em associação com a β -lap (64 - 0,125 μ g/mL). ^e O efeito sinérgico de VRZ associado com a β -lapachona foi calculado baseado no Índice da Concentração Inibitória Fracionária (FICI). ^f A interpretação foi de acordo com os valores de CIM: CIM \leq 0,5 - sinergismo (S), 0,5 < CIM < 4,0 - indiferente (I) e CIM > 4,0 - antagonismo (A).

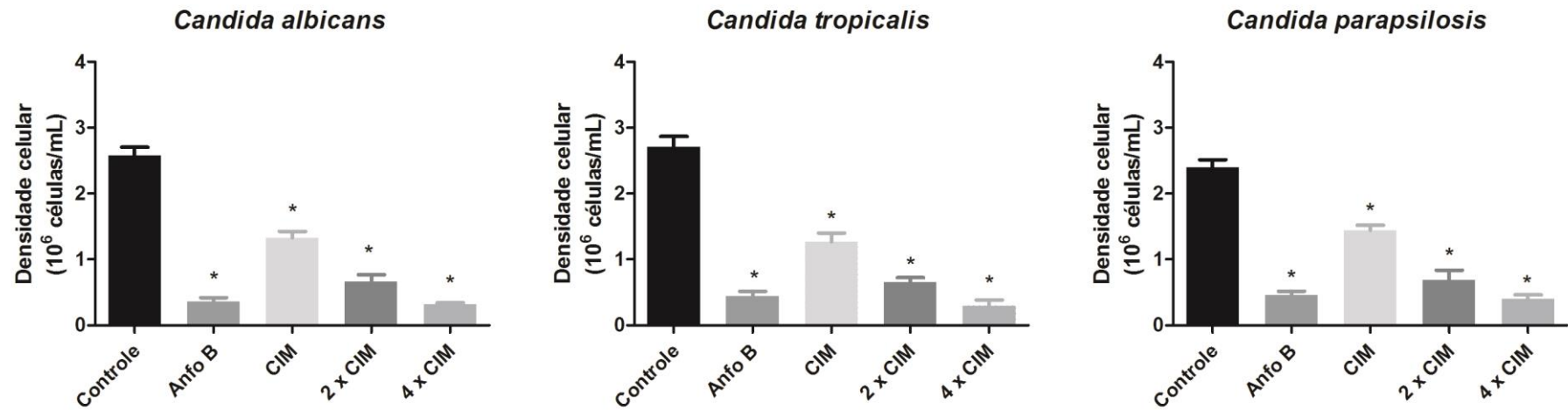
6.3 Avaliação do tipo de morte celular em *Candida* spp. após exposição a β -lapachona:

Após determinarmos o efeito antifúngico de β -lapachona frente a cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos, investigamos o possível mecanismo de morte celular. Primeiramente, foi escolhida uma cepa representativa de cada espécie de *Candida* (*C. albicans* 2, *C. tropicalis* 1, *C. parapsilosis* 3) com a finalidade de investigar se haviam diferenças nos eventos celulares analisados após exposição a β -lapachona frente a essas diferentes espécies. Portanto, para todas as análises foram utilizadas: controle negativo (RPMI), β -lapachona nas concentrações CIM, 2x CIM e 4x CIM e anfotericina B (4 μ g/mL) como controle positivo. As células de *Candida* spp. foram expostas a esses fármacos por 24 horas e, em seguida, realizados os testes por meio de citometria de fluxo e ensaio do cometa.

6.3.1 Efeito da β -lapachona na viabilidade celular em células de *Candida* spp.

De acordo com a Figura 6, quando tratadas com β -lapachona nas diferentes concentrações (CIM, 2x CIM, 4x CIM), as células de *C. albicans* ($1,33 \times 10^6$ células \pm 0,04; $0,66 \times 10^6$ células \pm 0,04; $0,32 \times 10^6$ células \pm 0,01, respectivamente), *C. tropicalis* ($1,27 \times 10^6$ células \pm 0,05; $0,65 \times 10^6$ células \pm 0,03; $0,30 \times 10^6$ células \pm 0,03, respectivamente) e *C. parapsilosis* ($1,44 \times 10^6$ células \pm 0,03; $0,68 \times 10^6$ células \pm 0,06; $0,40 \times 10^6$ células \pm 0,02, respectivamente) mostraram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na viabilidade celular demonstrando haver uma relação de efeito concentração dependente. Anfotericina B (4 μ g/mL) utilizada como controle positivo, após 24 horas de exposição, diminuiu o número de células viáveis (*C. albicans*: $0,36 \times 10^6$ células \pm 0,02; *C. tropicalis*: $0,44 \times 10^6$ células \pm 0,03; *C. parapsilosis*: $0,45 \times 10^6$ células \pm 0,02) quando comparadas com o controle.

Figura 6 - Efeito de β -lapachona em diferentes concentrações sobre viabilidade de células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistentes a azólicos avaliados por citometria de fluxo. As células foram tratadas com RPMI (controle negativo), Anfo B (4 $\mu\text{g/mL}$) e β -lapachona (CIM= 16 $\mu\text{g/mL}$, 2x CIM= 32 $\mu\text{g/mL}$, 4x CIM= 64 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas.



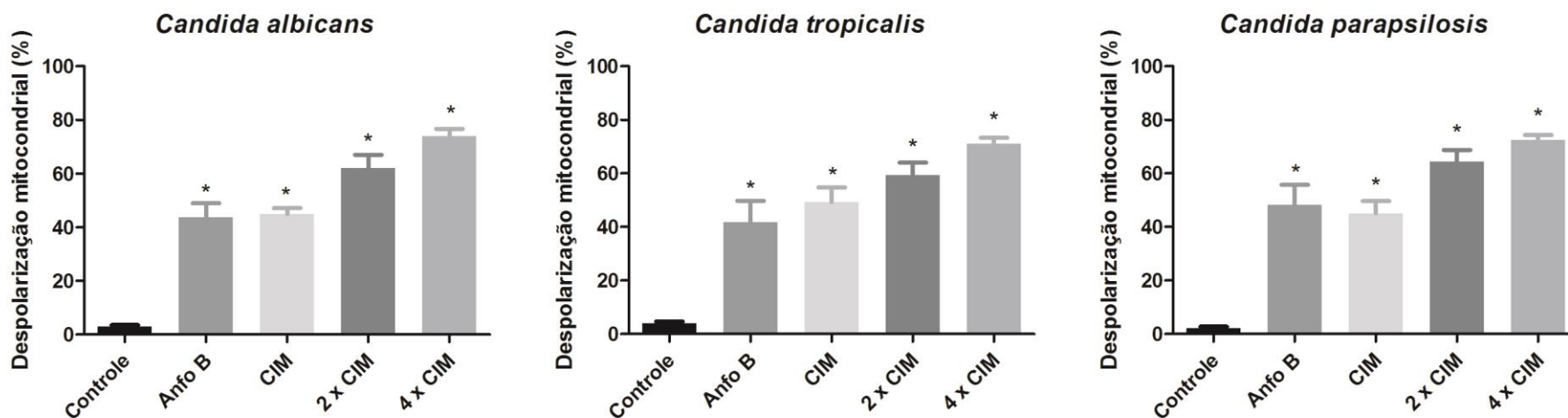
Os dados são apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M).

* $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.3.2 Efeito da β -lapachona sobre o potencial transmembrana mitocondrial de células de *Candida* spp.

Após 24 horas de exposição a β -lapachona, as células de *Candida* spp. foram marcadas com rodamina 123 afim de se detectar o percentual de células com baixo potencial elétrico transmembranar mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). A Figura 7 mostra que quando tratadas com β -lapachona nas diferentes concentrações (CIM, 2x CIM, 4x CIM), as células de *C. albicans* ($44,88 \pm 0,92\%$; $62,05 \pm 2,02\%$; $73,91 \pm 1,10\%$), *C. tropicalis* ($49,29 \pm 2,24\%$; $59,33 \pm 1,92\%$; $71,03 \pm 0,92\%$) e *C. parapsilosis* ($45,10 \pm 1,87\%$; $64,42 \pm 1,76\%$; $72,50 \pm 0,74\%$) apresentaram um aumento do percentual de células com baixo $\Delta\Psi_m$ de maneira concentração dependente quando comparadas com o grupo controle de cada espécie ($3,07 \pm 0,18\%$; $4,02 \pm 0,28\%$; $2,23 \pm 0,22\%$, respectivamente). Anfotericina B ($4 \mu\text{g/mL}$) utilizada como controle positivo aumentou a frequência número de células com baixo $\Delta\Psi_m$ nas três espécies testadas (*C. albicans*: $43,58 \pm 2,22\%$; *C. tropicalis*: $41,74 \pm 3,30\%$; *C. parapsilosis*: $48,26 \pm 3,03$) quando comparadas com o controle.

Figura 7 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistentes a azólicos. As células foram tratadas com RPMI (controle negativo), Anfo B (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e β -lapachona (CIM= 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2x CIM= 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4x CIM= 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 horas.



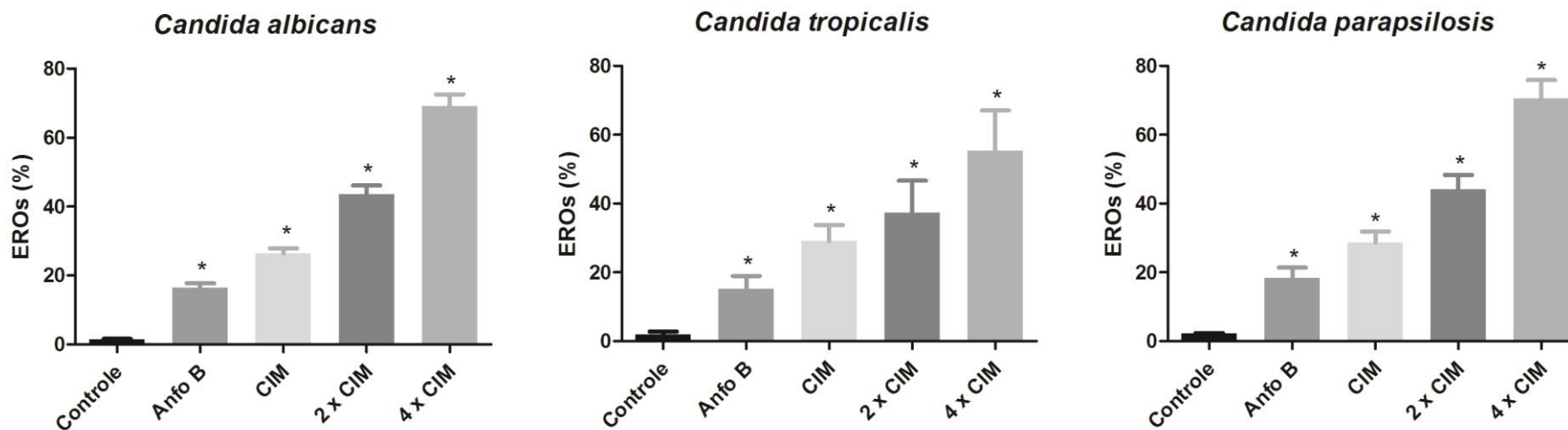
Os dados correspondem a média \pm erro padrão da média (E.P.M) de 3 experimentos independentes.

* $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.3.3 Efeito da β -lapachona sobre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) em células de *Candida* spp.

Conforme Figura 8, as células foram tratadas com β -lapachona nas diferentes concentrações (CIM, 2x CIM, 4x CIM), *C. albicans* ($26,42 \pm 0,59\%$; $43,53 \pm 1,05\%$; $69,13 \pm 1,39\%$) *C. tropicalis* ($29,05 \pm 1,93\%$; $37,36 \pm 3,77\%$; $55,29 \pm 4,79\%$) e *C. parapsilosis* ($28,63 \pm 1,33\%$; $44,19 \pm 1,68\%$; $70,54 \pm 2,18\%$) apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) na produção intracelular de EROS de maneira concentração dependente quando comparado ao controle (*C. albicans*: $1,48 \pm 0,03\%$; *C. tropicalis*: $2,02 \pm 0,29\%$; *C. parapsilosis*: $2,21 \pm 0,07\%$). É possível observar que a β -lapachona em todas as concentrações testadas e nas diferentes espécies, induziram a produção de EROS nas células de *Candida* spp. superior a anfotericina B, a qual foi utilizada como controle positivo.

Figura 8 - Avaliação da formação de EROS em células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistentes a azólicos. As células foram tratadas com RPMI (controle negativo), Anfo B (4 µg/mL) e β-lapachona (CIM= 16 µg/mL, 2x CIM= 32 µg/mL , 4x CIM= 64 µg/mL) por 24 horas.



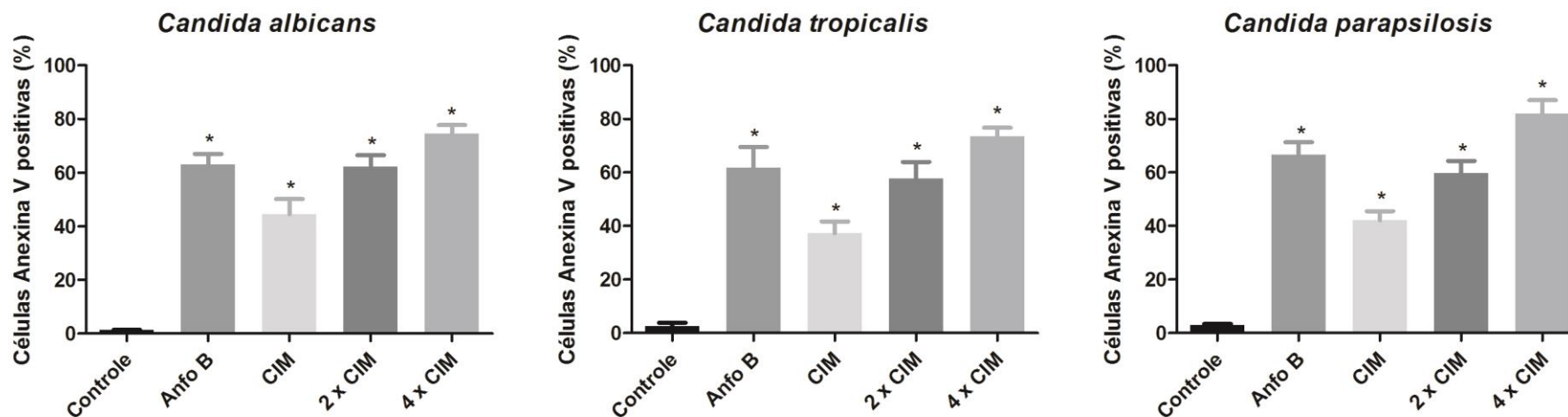
Os dados correspondem a média ± erro padrão da média (E.P.M) de 3 experimentos independentes.

*p <0,05 comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.3.4 Detecção da externalização de fosfatidilserina (PS) induzida por β -lapachona em células de *Candida* spp.

Após 24 horas de exposição, como mostrado na Figura 9, β -lapachona nas diferentes concentrações testadas (CIM, 2x CIM, 4x CIM) foi capaz de induzir aumentos significativos ($p < 0,05$) na frequência de células com PS externalizada nos isolados de *C. albicans* ($44,42 \pm 2,33\%$; $62,29 \pm 1,72\%$; $74,57 \pm 1,30\%$) *C. tropicalis* ($37,27 \pm 1,82\%$; $57,79 \pm 2,52\%$; $73,50 \pm 1,30\%$) e *C. parapsilosis* ($42,05 \pm 1,44\%$; $59,62 \pm 1,90\%$; $82,03 \pm 2,00\%$) quando comparadas com o grupo controle (*C. albicans*: $1,26 \pm 0,03\%$; *C. tropicalis*: $2,55 \pm 0,53\%$; *C. parapsilosis*: $3,05 \pm 0,15\%$, respectivamente). Anfotericina B ($4 \mu\text{g/mL}$) que foi utilizada como controle positivo provocou um percentual de células detectadas com PS externalizado de $63,08 \pm 1,62\%$, $61,74 \pm 3,17$, $66,61 \pm 1,91\%$ para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, respectivamente.

Figura 9 - Efeito da β -lapachona em diferentes concentrações sobre a externalização da fosfatidilserina em células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistentes a azólicos. As células foram tratadas com RPMI (controle negativo), Anfo B (4 $\mu\text{g/mL}$) e β -lapachona (CIM= 16 $\mu\text{g/mL}$, 2x CIM= 32 $\mu\text{g/mL}$, 4x CIM= 64 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas.



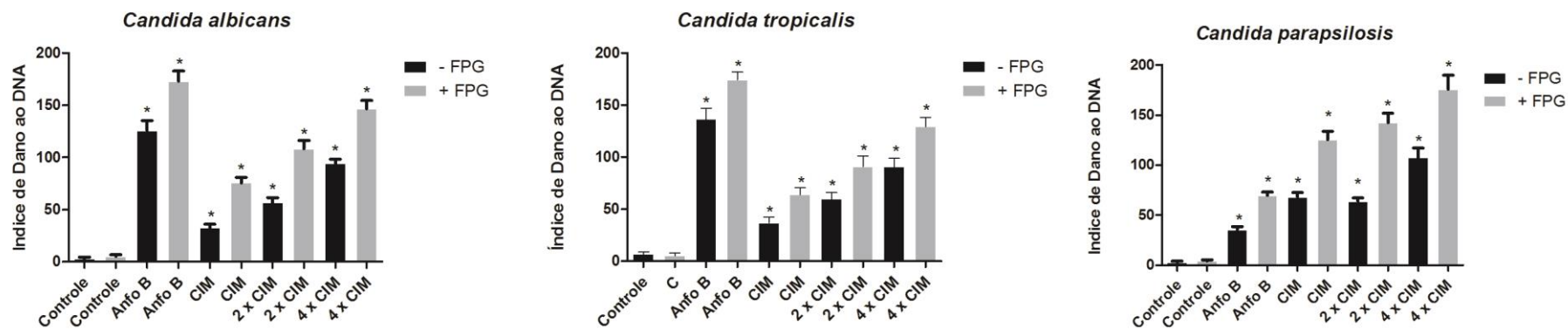
Os dados correspondem a média \pm erro padrão da média (E.P.M) de 3 experimentos independentes.

*p < 0,05 comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.3.5 β -lapachona promove danos no DNA de células de *Candida* spp.

Conforme Figura 10 (barras pretas), β -lapachona nas diferentes concentrações testadas (CIM, 2x CIM, 4x CIM) foi capaz de induzir lesões no DNA de células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* quando comparadas com o grupo controle. Adicionalmente, as células também foram incubadas com a enzima FPG que reconhece purinas oxidadas no DNA e aquelas apresentaram lesões no DNA significativamente maiores do que quando comparadas com os valores de índice de dano dos experimentos realizados na ausência da enzima (barras cinzas).

Figura 10 - Dano ao DNA e lesões oxidativas (FPG) induzidas por β -lapachona em diferentes concentrações em células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistentes a azólicos analisadas pelo ensaio do cometa versão alcalina. As células foram tratadas com RPMI (controle negativo), Anfo B (4 μ g/mL) e β -lapachona (CIM= 16 μ g/mL, 2x CIM= 32 μ g/mL , 4x CIM= 64 μ g/mL) por 24 horas.



Os dados correspondem a média \pm erro padrão da média (E.P.M) de 3 experimentos independentes.

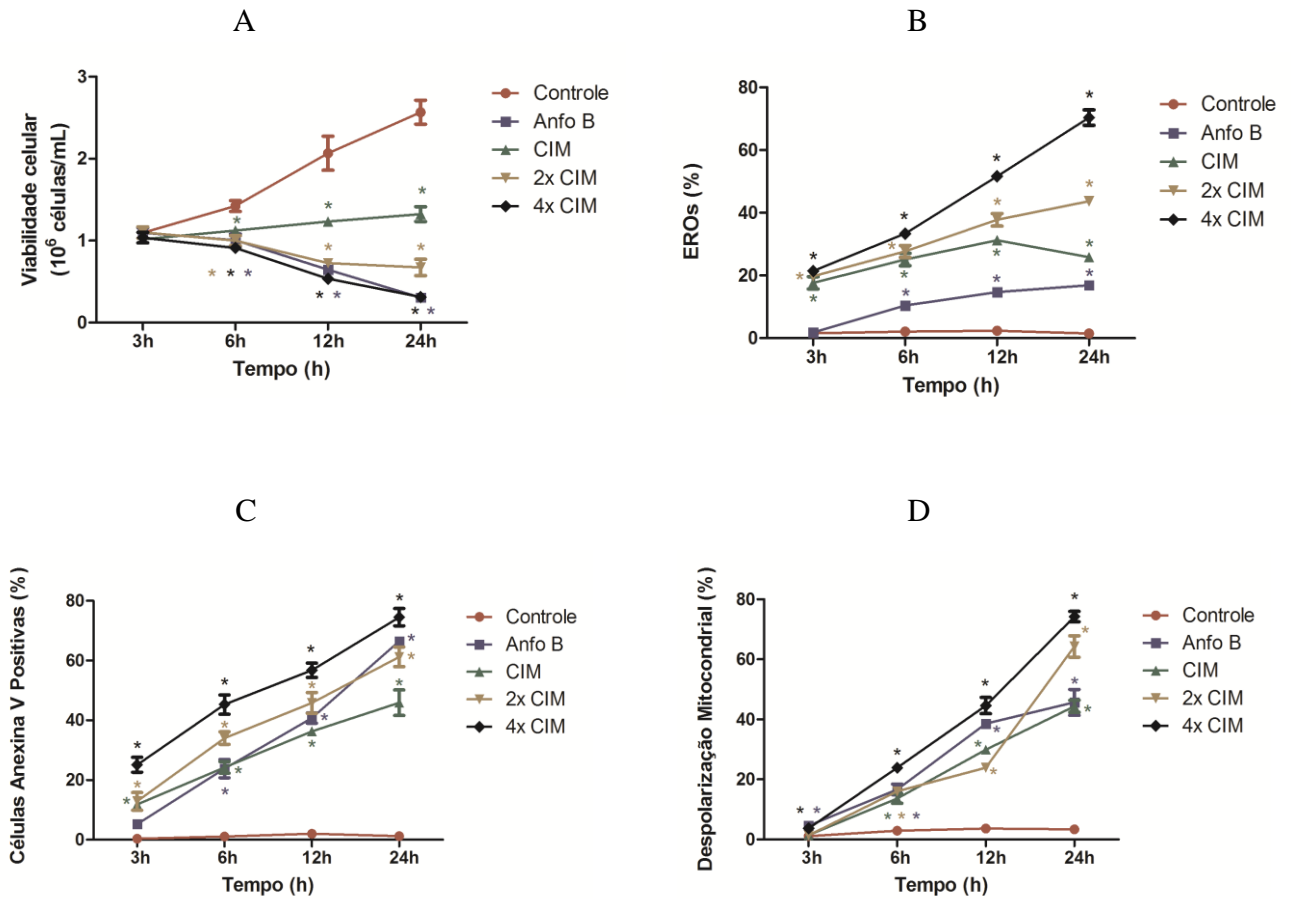
*p < 0,05 comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

Após análise da ação de β -lapachona frente às três espécies de *Candida* após 24 horas de tratamento, podemos inferir que as cepas testadas apresentaram um mesmo perfil no que tange aos eventos celulares investigados. Portanto, com a finalidade de investigar quais os eventos celulares estão ocorrendo primeiramente na célula, selecionou-se a cepa de *C. albicans* por ser a mais prevalente para avaliarmos os parâmetros anteriormente estudados por citometria de fluxo em intervalos de tempo determinados: 3, 6, 12 e 24 horas.

6.4 Efeito da β -lapachona na viabilidade celular, potencial de membrana, EROS e externalização de fosfatidilserina em células de *C. albicans* após tratamento de 3, 6, 12 e 24 horas

Inicialmente como mostra a Figura 11 A, a viabilidade de células de *C. albicans* 2 começa a apresentar uma redução significativa ($p < 0,05$) após seis horas de tratamento nas diferentes concentrações (CIM, 2x CIM e 4x CIM) de β -lapachona em relação ao controle (do respectivo tempo). Isso acontece de maneira concentração dependente. Logo nas três primeiras horas, a β -lapachona nas diferentes concentrações testadas (CIM, 2x CIM, 4x CIM) foi capaz de induzir aumentos significativos tanto na produção intracelular de EROS como na externalização da PS em *C. albicans* em relação ao controle ($p < 0,05$), como demonstra as Figuras 11 B e 11 C. Esses dois eventos celulares apresentam uma correlação forte ($\rho = 0,8775$), sendo possível inferir que a geração de EROS está intimamente ligada com a morte celular. Além disso, nas três primeiras horas, apenas a concentração 4x CIM de β -lapachona e anfotericina B (controle positivo) apresentaram um aumento significativo do percentual de células com baixo $\Delta\Psi_m$ em relação ao controle ($p < 0,05$), como mostrado na Figura 11 D. Entretanto, a partir das seis horas de tratamento, as células de *C. albicans* tratadas com β -lapachona (todas as concentrações) apresentaram níveis de EROS, frequência de células com PS externalizada e percentual de células com baixo $\Delta\Psi_m$, significativamente mais elevados em relação ao controle de maneira concentração dependente ($p < 0,05$).

Figura 11 - Efeito de diferentes tratamentos sobre a viabilidade celular (A), geração de EROS (B), externalização da fosfatidilserina (C) e potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) (D) em células de *C. albicans* resistente a azólicos. As células foram tratadas com meio RPMI (controle negativo), Anfo B (4 $\mu\text{g/mL}$) e β -lapachona (CIM, 2x CIM, 4x CIM) por 3h, 6h, 12h e 24 horas de exposição.



Os dados correspondem a média \pm erro padrão da média (E.P.M) de 3 experimentos independentes.

* $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.5 Identificação e quantificação por espectrometria de massas de proteínas presentes em células de *C. albicans* após exposição a β -lapachona

A análise de expressão diferencial levou em consideração as proteínas que apareceram em todas as três replicatas técnicas (*label-free* HI3) e com valores de confiança para $0,05 \geq p \geq 0,95$. Além disso, somente proteínas com valores de razão Controle: β -lapachona acima de 1,5 foram consideradas superexpressas (*up-regulated*) e aquelas com valores de razão Controle: β -lapachona abaixo de 0,66 foram consideradas subexpressas (*down-regulated*). As proteínas que apresentaram valores de razão entre 0,66 e 1,5 foram consideradas sem expressão diferencial (*unchanged*).

Portanto, após o estabelecimento desses critérios, um total de 36 proteínas foram identificadas com confiança após exposição a β -lapachona. As proteínas consideradas *up-regulated* foram: proteína ribossomal S18 (40S), proteína ribossomal L10 (60S) que estão envolvidas no processo de tradução; transaldolase e triose fosfato isomerase envolvidas no metabolismo energético; e proteína carreadora de ATP. Já as proteínas *down-regulated* foram: 2 proteínas não caracterizadas; chaperona molecular HtpG envolvida no processamento genético e de defesa contra espécies reativas de oxigênio; proteína ribossomal S12 (40S), proteína ribossomal S19 (40S) que estão envolvidas no processo de tradução. Além disso, foram encontradas 3 proteínas únicas que só apareceram nas células tratadas com β -lapachona, a saber: piruvato quinase, DNA polimerase e ATP sintase subunidade alfa. As proteínas identificadas estão apresentadas na Tabela 5 e estão divididas de acordo com a descrição funcional, categoria funcional, escore, razão e nível de expressão.

Tabela 5 - Identificação de proteínas por espectrometria de massa quantitativa (NanoESI-Q-TOF) oriundo do extrato total de células de *Candida albicans* exposta a β -lapachona (Controle: β -lapachona)

Acesso GenBank	Descrição da proteína	Descrição Funcional ¹	Categoria Funcional ²	Escore	Razão ³	Nível de expressão
Q59US9	Uncharacterized protein	Ligante de piridoxal fosfato e atividade transaminase	Proteína não caracterizada	726.90	0.04*	<i>Down</i>
Q5AKX0	Uncharacterized protein	Ligante de ATP		4005.79	0.58*	<i>Down</i>
A0A0A6M551	Molecular chaperone HtpG	Ligante de ATP, Resposta ao estresse e enovelamento de proteínas	Processamento de informações genéticas	2327.86	0.16*	<i>Down</i>
IF4A_CANAL	ATP-dependent RNA helicase eIF4A	Ligante de ATP; atividade helicase dependente de ATP; ligante de ácido nucléico		1111.23	0.73	<i>Unchanged</i>
HSP77_CANAL	Heat shock protein SSC1, mitochondrial	Ligante de ATP		961.40	0.79	<i>Unchanged</i>
Q5A397	Hsp75-like protein	Ligante de ATP		3019.86	0.89	<i>Unchanged</i>
NACA_CANAL	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	Proteína de transporte		882.34	1.36	<i>Unchanged</i>
Q5ADQ6	40S ribosomal protein S12	Constituinte estrutural de ribossomos	Tradução, estrutura ribossomal e biogênese	822.08	0.22*	<i>Down</i>
A0A0A6MLL6	40S ribosomal protein S19	Constituinte estrutural de ribossomos		2091.42	0.55*	<i>Down</i>
Q59LS1	60S ribosomal protein L3	Constituinte estrutural de ribossomos		357.62	0.76	<i>Unchanged</i>
EF1A1_CANAL	Elongation factor 1-alpha 1	Ligante de GTP; atividade GTPase; atividade fator de alongação transcricional		5487.27	0.77	<i>Unchanged</i>
A0A0A6MLF2	Ribosomal protein L19	Constituinte estrutural de ribossomos		5106.19	0.78	<i>Unchanged</i>
A0A0A6PT84	40S ribosomal protein S14	Constituinte estrutural de ribossomos		1367.53	0.79	<i>Unchanged</i>
A0A0A6LXJ2	40S ribosomal protein S6	Constituinte estrutural de ribossomos		1451.99	0.83	<i>Unchanged</i>
RS3A_CANAL	40S ribosomal protein S1	Constituinte estrutural de ribossomos		3886.43	1.26	<i>Unchanged</i>
Q59ZX4	60S ribosomal protein L4-B	Constituinte estrutural de ribossomos		1305.91	1.30	<i>Unchanged</i>

A0A0A6MP45	40S ribosomal protein S10-A	Constituinte estrutural de ribossomos	Tradução, estrutura ribossomal e biogênese	2422.76	1.39	<i>Unchaged</i>
A0A0A6PES8	Ribosomal protein S19	Constituinte estrutural de ribossomos		242.91	1.40	<i>Unchaged</i>
A0A0A6NUL0	40S ribosomal protein S18	Constituinte estrutural de ribossomos; ligante de RNA		2223.34	1.52*	<i>Up</i>
Q5AIB8	60S ribosomal protein L10	Constituinte estrutural de ribossomos		2265.14	1.67*	<i>Up</i>
ADH2_CANAL	Alcohol dehydrogenase 2	Ligante íon Zinco e atividade oxidoreductase	Transporte e metabolismo de carboidratos	3074.85	0.73	<i>Unchaged</i>
KPYK_CANAL	Pyruvate kinase	Ligante íon Magnésio; atividade piruvato quinase; Ligante íon potássio		4319.26	1.11	<i>Unchaged</i>
PDC1_CANAL	Pyruvate decarboxylase	Ligante íon Magnésio; ligante de tiamina pirofosfato; atividade catalítica		458.47	1.23	<i>Unchaged</i>
Q59RB8	Isocitratelase	Atividade Isocitrato liase		652.57	1.27	<i>Unchaged</i>
Q5A017	Transaldolase	Atividade Catalítica		238.13	1.60*	<i>Up</i>
TPIS_CANAL	Triosephosphate isomerase	Atividade Triose-fosfato isomerase		1006.93	1.73*	<i>Up</i>
Q59WG3	Cell division control protein 48	Ligante de GTP	Mecanismo de sinalização da transdução	173.61	0.76	<i>Unchaged</i>
A0A0A6MLX6	Ornithine-oxo-acid transaminase	Ligante piridoxal fosfato e atividade transaminase	Metabolismo de aminoácidos	734.79	0.78	<i>Unchaged</i>
METE_CANAL	5methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteinemethyltransferase	Ligante íon Zinco; atividade homocisteína metiltransferase;	Metabolismo e transporte de aminoácidos	489.33	1.25	<i>Unchaged</i>
A0A0A6MV26	ATP synthasesubunit alpha	Atividade ATPase, mecanismo rotacional; atividade ATP sintase, ligante de ATP	Transporte e metabolismo de nucleotídeos	2814.84	0.86	<i>Unchaged</i>
A0A0A6MLY5	ATP synthase subunit beta	Atividade ATP sintase; mecanismo rotacional; ligante de ATP		3880.75	1.36	<i>Unchaged</i>

A0A0A6MPS1	Plasma membrane ATPase	Ligante de ATP; Ligante íons metálicos and transportador de cátions; atividade ATPase	Conversão e produção de energia	279.59	1.16	<i>Unchanged</i>
Q5A516	ADP,ATP carrier protein	Atividade Transportadora	Processamento de informações ambientais	389.55	1.68*	<i>Up</i>
PROTEÍNAS ÚNICAS ⁴						
A0A0A6Q6F7	Pyruvatekinase	Ligante íon Magnésio; atividade piruvato quinase; Ligante íon potássio	Transporte e metabolismo de carboidratos	4312.72	**	Únicas
A0A0A6Q4Q1	DNA polymerase	Atividade DNA polimerase dirigida por DNA	Processamento de informações genéticas	207.80	**	Únicas
Q59RD8	ATP synthase subunit alpha	Atividade ATPase, mecanismo rotacional; atividade ATP sintase, ligante de ATP	Transporte e metabolismo de nucleotídeos	1525.58	**	Únicas

¹ Termos para função molecular e de processo biológico de cada proteína identificada são mostrados de acordo com o OrthoDBv8 (catálogo hierárquico de ortólogos de eucariotos) (acessado em 17 de dezembro de 2015)

² Catálogo de anotações KEGG (Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto)

³ Valores de Fold-change marcados com um asterisco (*) são considerados com expressão diferencial.

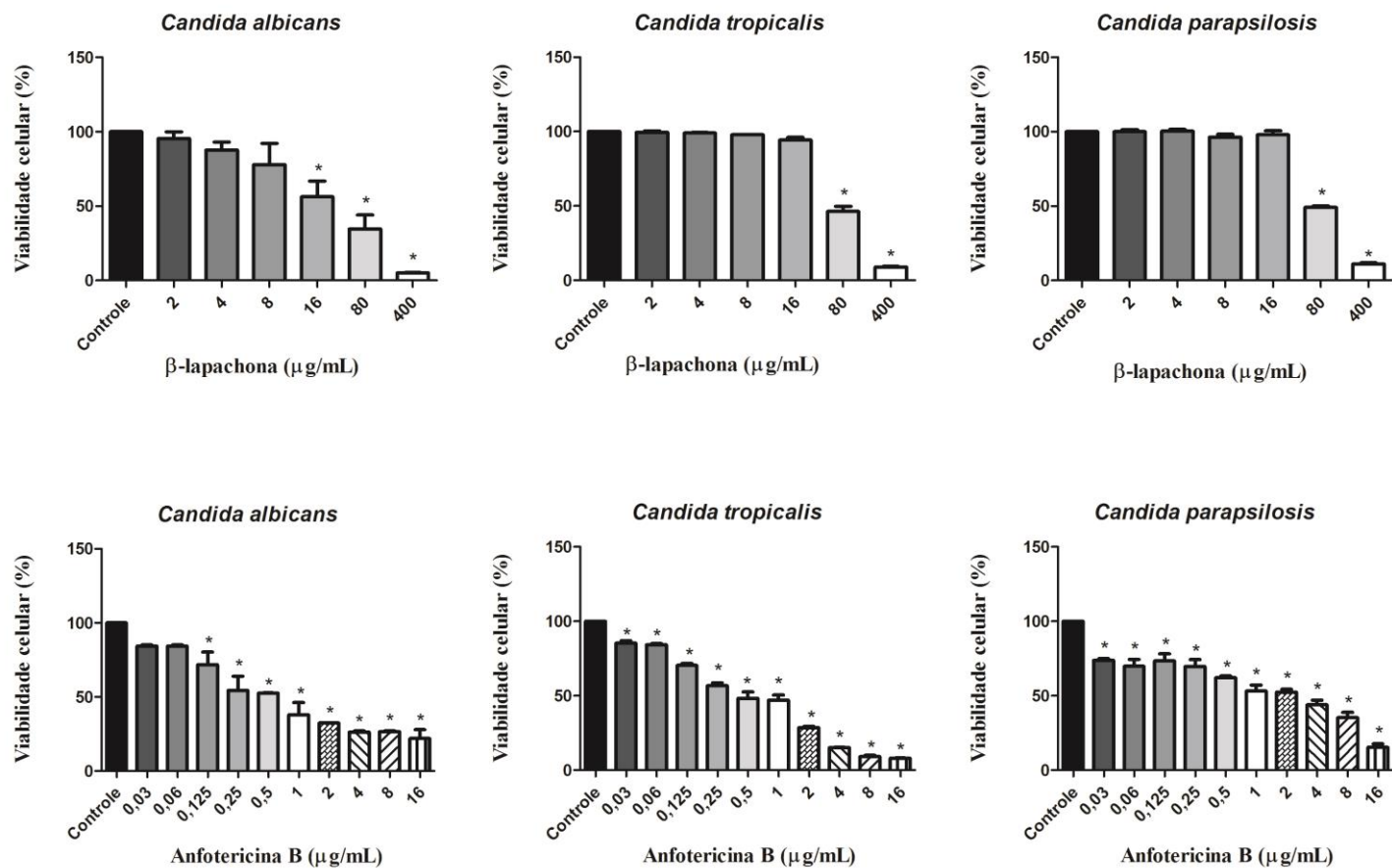
⁴ Proteínas únicas em células expostas a β -lapachona (**)

6.6 Efeito da β -lapachona sobre biofilme formado (24 horas) de *Candida* spp.

Após verificarmos a ação da β -lapachona sobre células planctônicas e esta apresentar uma potencial atividade antifúngica, testou-se também sobre células em biofilme.

Como mostra a Figura 12, β -lapachona apresentou atividade frente ao biofilme formado (24 horas) de isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* causando uma redução significativa aproximada de 50% da viabilidade celular em relação ao controle de crescimento ($p < 0,05$). O isolado de *C. albicans* apresentou essa redução nas concentrações de 2x CIM (16 $\mu\text{g/mL}$), 10x CIM (80 $\mu\text{g/mL}$) e 50x CIM (400 $\mu\text{g/mL}$) enquanto *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* apresentaram redução nas concentrações de 10x CIM (80 $\mu\text{g/mL}$) e 50x CIM (400 $\mu\text{g/mL}$). A anfotericina B foi utilizada como controle positivo e testada na faixa de 16-0,03 $\mu\text{g/mL}$. O percentual de células viáveis no biofilme formado frente aos isolados de *Candida* spp. estão expressos no Anexo II.

Figura 12 - Efeito da β -lapachona frente ao biofilme formado em diferentes espécies de *Candida* avaliados pelo ensaio de redução do MTT. As concentrações testadas de β -lapachona variaram de 2 a 400 $\mu\text{g/mL}$. A anfotericina B foi utilizada como controle positivo.

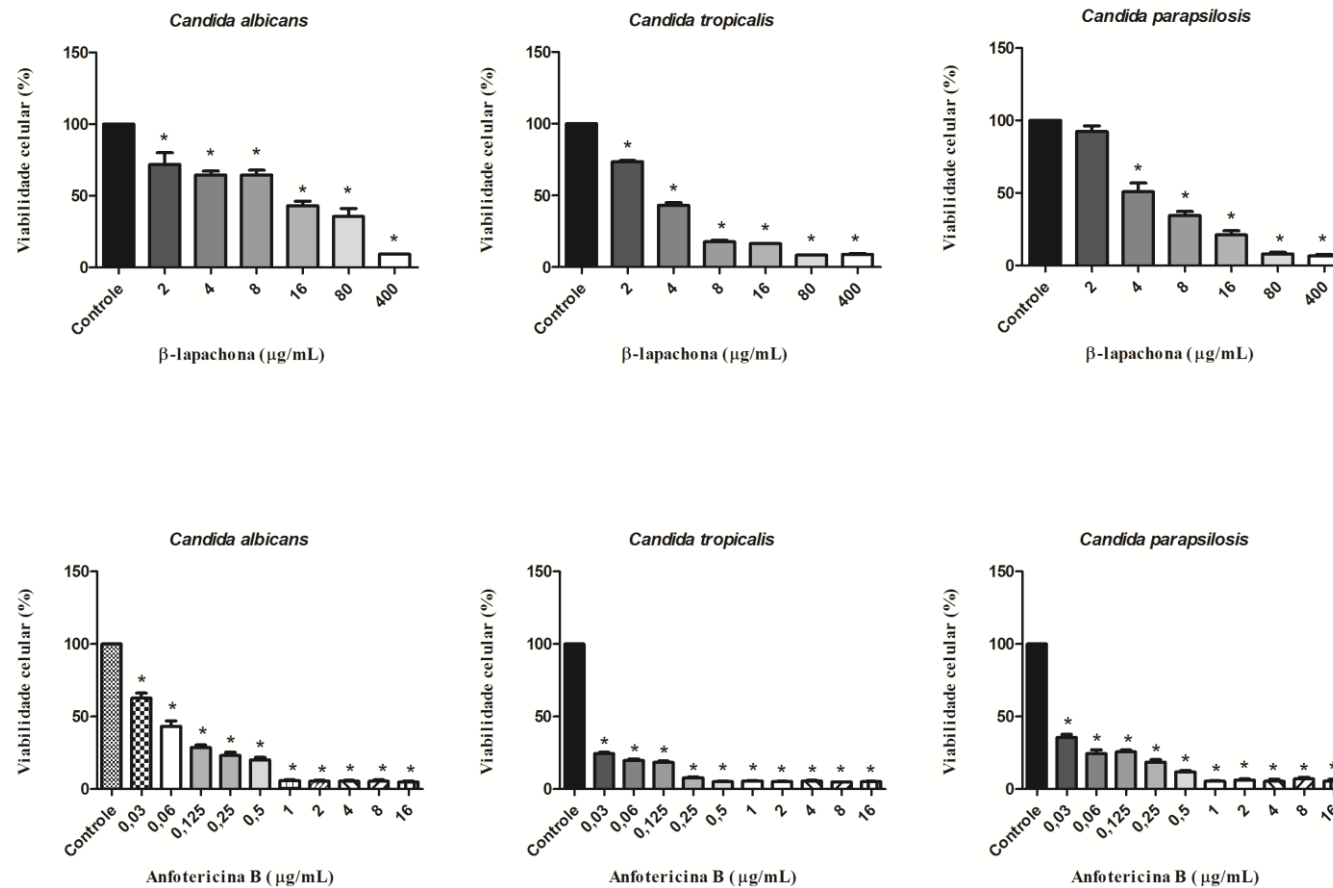


* $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

6.7 Efeito de β -lapachona sobre inibição da formação de biofilme em *Candida* spp.

Conforme Figura 13, β -lapachona apresentou efeito sobre a inibição da formação de biofilme quando testadas em concentrações subinibitórias e inibitórias (ver Tabela X). No isolado de *C. albicans*, houve uma redução significativa na viabilidade celular a partir da concentração subinibitória CIM/4 (2 $\mu\text{g/mL}$) quando comparado ao controle de crescimento ($p < 0,05$). Por outro lado, nos isolados de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, a β -lapachona apresentou efeito a partir da concentração subinibitória CIM/2 (4 $\mu\text{g/mL}$) quando comparado ao controle de crescimento ($p < 0,05$). A anfotericina B foi utilizada como controle positivo e testada na faixa de 16 - 0,03 $\mu\text{g/mL}$. O percentual de inibição da formação de biofilme frente aos isolados de *Candida* spp. estão expressos no Anexo III.

Figura 13 - Efeito da β -lapachona sobre a inibição da formação de biofilme em diferentes espécies de *Candida* avaliados pelo ensaio de redução do MTT. As concentrações testadas variaram de 2 a 400 $\mu\text{g/mL}$. A anfotericina B foi utilizada como controle positivo.



* $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Tukey.

7. DISCUSSÃO

Inicialmente, as cepas de *Candida* spp. foram reavaliadas a fim de se certificar sobre a pureza, viabilidade e manutenção do perfil de sensibilidade aos antifúngicos azólicos. Apesar dos isolados estarem armazenados a -20 °C, as cepas mantiveram o perfil de resistência aos antifúngicos. Estudos já relatam que o congelamento e os meios de conservação utilizados podem causar alterações nas características morfológicas, metabólicas e de patogenicidade (BACELO *et al.*, 2009).

Para avaliação do potencial antifúngico de moléculas oriundas de produtos naturais, vários métodos podem ser adotados a fim de verificar a atividade antimicrobiana. Dentre estes, destaca-se a técnica de microdiluição em caldo, baseada no protocolo M27-A3 do CLSI, o qual estabelece a concentração capaz de inibir o crescimento do microorganismo. Além disso, através desta técnica é possível testar produtos de diferentes características químicas, obtendo-se dados quantitativos com boa reprodutibilidade (SCORZONI *et al.*, 2007).

No presente estudo, verificou-se que a β -lapachona isoladamente inibiu o crescimento de *Candida* spp. resistentes a azólicos na forma planctônica com CIMs variando entre 4 a 16 $\mu\text{g/mL}$. A sensibilidade de compostos naftoquinônicos também foi observada em um estudo realizado por Neto e colaboradores (2014), onde testaram três compostos contra *C. tropicalis* resistente ao fluconazol com CIMs variando entre 8 a 96 $\mu\text{g/mL}$. Sasaki, Abe e Yoshizaki (2002) testaram outros quatro derivados naftoquinônicos contra cepas de *Candida* spp. sensíveis a azólicos e exibiram CIMs variando entre 4 a 64 $\mu\text{g/mL}$. Entretanto, quando se testou frente a uma cepa de *C. albicans* resistente ao fluconazol, apresentou CIMs variando entre 32 e maior do que 64 $\mu\text{g/mL}$. Essa variação na ação citotóxica entre os resultados obtidos no presente estudo com os dados da literatura provavelmente está relacionada com a variação da estrutura dos compostos naftoquinônicos (MURAKAMI *et al.*, 2010).

Diante dos resultados promissores obtidos quando testada isoladamente no ensaio de microdiluição, a β -lapachona foi avaliada em combinação com os derivados azólicos (itraconazol, fluconazol e voriconazol) frente a oito cepas de *Candida* spp. Existe um interesse clínico no estudo da associação de compostos antifúngicos e produtos naturais já que essa combinação pode promover uma maior eficácia de cada fármaco, permitindo assim a utilização de doses mais baixas de cada composto com a

perspectiva de reduzir os efeitos secundários indesejáveis e prevenir o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos (CASTRO *et al.*, 2015; JACKSON; AGBOKE; NWOKE, 2009).

O ensaio do “*checkerboard*” é um sistema *in vitro* que determina a atividade antimicrobiana, utilizando a combinação de substância teste e/ou antifúngicos. Nessa metodologia, a resposta é interpretada como sinérgica, antagônica e indiferente, de acordo com o FICI. Com base nisto, todas as combinações avaliadas neste estudo apresentaram um efeito indiferente, exceto em uma cepa de *C. albicans* onde a associação de fluconazol e β -lapachona apresentou-se de forma antagônica. Esse efeito possivelmente está ligado à diversidade genotípica dos isolados de *C. albicans* obtidos após pressão antifúngica (COSTE *et al.*, 2007).

A elucidação dos mecanismos de ação de agentes com potencial farmacológico quer sejam de origem natural ou sintética, contribui para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas racionais, particularmente em termos de infecções causadas por microorganismos resistentes, que frequentemente requerem combinações de fármacos ou a utilização de novos fármacos quando o agente de primeira escolha não é eficaz (CASTRO *et al.*, 2015).

Apesar de existir na literatura vários estudos no sentido de elucidar os mecanismos de ação responsáveis pela citotoxicidade de β -lapachona principalmente em células cancerosas e de *Trypanosoma cruzi* (BRETON *et al.*, 2015; YU *et al.*, 2014; AIRES *et al.*, 2014); pouco se conhece acerca dos mecanismos de indução de morte celular em *Candida* spp. resistentes a azólicos. Já foi relatado que dependendo do tipo de sistema celular, a β -lapachona pode ativar mecanismos diferentes que levarão a morte celular (PARK *et al.*, 2014).

Para isso, empregou-se técnicas de citometria de fluxo e ensaio do cometa para elucidar se o efeito antifúngico de β -lapachona ocorre através de apoptose em células de *Candida* spp. resistentes a azólicos.

A apoptose é um programa de suicídio celular altamente programado, caracterizada por gerar uma resposta celular sem reação inflamatória associada. As células envolvidas nesse processo exibem fenótipos apoptóticos representativos, como externalização de fosfatidilserina, fragmentação do DNA, perda de potencial transmembrânico mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio (HWANG *et*

al., 2014; CHOI; LEE, 2015). No presente estudo, todos esses parâmetros foram analisados já que são vastamente utilizados na avaliação do tipo de morte celular.

Para esses ensaios foram analisadas uma cepa representativa de cada espécie de *Candida* resistentes a azólicos (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*). Quando estas foram expostas a β -lapachona foi observada uma diminuição significativa no número de células viáveis de maneira concentração dependente (CIM, 2x CIM e 4x CIM). Esses dados corroboram os de Neto e colaboradores (2014) que também verificaram uma diminuição no número de células dose dependente quando testaram 3 compostos naftoquinônicos em células de *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol.

Como dito anteriormente, a maioria dos fármacos derivados de quinona geram espécies reativas de oxigênio (EROS) através de ciclos redox, constituindo assim um dos principais mecanismos de ação citotóxica desse grupo químico. As células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* expostas a β -lapachona apresentaram um aumento nos níveis intracelulares totais de EROS proporcional ao aumento da concentração do composto. Esses dados corroboram com os de Miao e colaboradores (2012) que demonstraram que os níveis de EROS aumentam de maneira dependente da concentração e do tempo de exposição em isolados de *C. albicans* após o tratamento com um composto derivado de quinona, shikonina. O aumento nos níveis intracelulares de EROS pode ser explicado também pela ação de quinonas através da inibição de enzimas da respiração celular (NETO *et al.*, 2014)

Recentemente, vários estudos relataram que as EROS são necessárias e suficientes para induzir a apoptose em leveduras sendo uma das primeiras alterações implicadas nesse tipo de morte celular (HWANG *et al.*, 2014; CHOI; LEE, 2015), fato este que foi observado nas três horas iniciais de exposição a β -lapachona. Altos níveis de EROS pode causar o estresse oxidativo em células de leveduras através da formação de macromoléculas celulares oxidadas, incluindo lipídios, proteínas e DNA desencadeando assim o início da apoptose (XU *et al.*, 2010).

Muitas estruturas celulares e organelas são danificadas ou destruídas como consequência da apoptose que pode ser ativada de duas diferentes maneiras, pela via citoplasmática (extrínseca) ou pela via mitocondrial (intrínseca) (GRIVICICH; REGNER; DA ROCHA, 2007). Em particular, as mitocôndrias estão ativamente envolvidas na promoção da apoptose, e a dissipação do potencial de membrana mitocondrial interna ocorre durante as suas fases iniciais (HWANG *et al.*, 2014).

Nossos dados mostram que a função mitocondrial foi afetada em células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* tratados com β -lapachona, causando uma despolarização dose dependente no potencial de membrana mitocondrial. Este evento começou a ser encontrado após exposição de seis horas ao composto. Essa evidência corrobora os achados de Miao e colaboradores (2012) que demonstraram que a shikonina promoveu a despolarização das membranas mitocondriais em células de *C. albicans*. O desencadeamento de apoptose de leveduras está sempre ligado a disfunção mitocondrial devido à produção de EROS. Esta disfunção mitocondrial leva à despolarização da membrana mitocondrial e a translocação de fatores pró-apoptóticos das mitocôndrias para o citoplasma (citocromo C) ou para o núcleo, sendo isto considerado um ponto irreversível na cascata de eventos que levam a ativação da morte celular através da via intrínseca apoptótica (XU *et al.*, 2010; CHOI; LEE, 2015; MARINHO-FILHO *et al.*, 2010). Portanto, a formação de radicais livres parece ser um importante mecanismo de citotoxicidade causada pelo tratamento de β -lapachona em isolados de *Candida* spp. resistentes a azólicos.

A externalização de fosfatidilserina (PS) é um evento precoce de células que entram em apoptose. Em leveduras, a PS está predominantemente localizada no folheto interno da bicamada lipídica da membrana citoplasmática e é translocada para a monocamada externa durante a apoptose (XU *et al.*, 2010). Para a detecção de PS, foi utilizada a anexina V, uma proteína de ligação fosfolipídica com elevada afinidade devido à perda de polaridade, capaz de se ligar ao PS externalizado (HWANG *et al.*, 2014). Após exposição a β -lapachona nas diferentes concentrações foi observado células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* com PS externalizada conjugada com anexina V, nas primeiras três horas de exposição ao composto, confirmando ser um dos eventos iniciais na célula. Esse achado adicional corrobora com as vias de ativação sugestivas de apoptose. Devido à perda da polaridade da membrana, a PS é exposta para o ambiente externo, estimulando assim o reconhecimento e fagocitose das mesmas pelos macrófagos ou por outras células apresentadoras de antígeno (FERREIRA *et al.*, 2013).

A fragmentação extensa do DNA ocorre frequentemente nas fases iniciais de apoptose, e é um passo irreversível que conduz à morte das células (DA SILVA *et al.*, 2013). De uma forma geral, as naftoquinonas frequentemente afetam as membranas celulares, como evidenciado pela sua capacidade de induzir rupturas simples ou de

cadeia dupla em moléculas de DNA, mensurados pelo ensaio do cometa versão alcalina (NETO *et al.*, 2014).

Nossos achados evidenciam que o tratamento dos isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* com a β - lapachona promoveu danos no DNA após exposição de 24 horas. Devido o envolvimento das EROS na ação citotóxica de quinonas, investigamos os danos oxidativos ao DNA. Para isso, utilizamos o ensaio do cometa versão alcalina usando a FPG, uma enzima de reparação de excisão de bases que reconhece e remove uma ampla gama de purinas oxidadas de DNA danificado. Os resultados obtidos após incubação com a enzima mostram claramente que as EROS estão contribuindo para aumento da extensão dos danos oxidativos ao DNA, já que o índice de dano foi significativamente maior quando comparados aos dados sem enzima. De acordo com Neto e colaboradores (2014), a oxidação das bases nucleotídicas é tão importante quanto à quebra do DNA para a função global e sobrevivência da célula.

Portanto, pode-se inferir que β - lapachona induz quebras no DNA através da geração intracelular de EROS. Este achado ressalta a importância das EROS para o efeito citotóxico de β - lapachona em cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistentes a azólicos.

A análise proteômica é uma técnica que permite identificar proteínas e a partir delas obter pistas sobre o seu possível envolvimento no processo biológico em questão. (SANTOS; TEIXEIRA; SÁ-CORREIA, 2004).

No presente trabalho, células de *C. albicans* apresentaram um aumento na expressão de chaperona molecular (HSP 90) após exposição a β - lapachona que é um composto reconhecido por gerar um aumento nos níveis intracelulares de EROS, causando assim um estresse oxidativo. Tamayo e colaboradores (2013) relataram um aumento na expressão do gene HSP 90 em células de *Paracoccidioides brasiliensis* após exposição a agentes oxidantes. Eles sugerem que esse aumento pode representar um mecanismo importante na ativação de defesa contra estresse oxidativo. Além disso, já se sabe que a HSP 90 também é essencial para a viabilidade celular em *Candida albicans* (SWOBODA *et al.*, 1995). Então, levando em consideração esses resultados, sugere-se que a expressão da chaperona molecular (HSP 90) é importante para a manutenção da integridade funcional das células de *C. albicans*.

Outro grupo de proteínas identificadas estava envolvido no metabolismo energético. Após exposição a β - lapachona, células de *C. albicans* suprimiram enzimas

(transaldolase e triosefosfato isomerase) que participam do metabolismo de carboidratos (por exemplo, glicólise, a gluconeogênese, e via das pentoses fosfato). Isso sugere uma diminuição nos níveis de ATP, resultante da diminuição do potencial de membrana mitocondrial podendo levar à morte das células. Nossos dados estão de acordo com os de Kim e colaboradores (2009) que relataram que células de *C. albicans* após exposição a um derivado de protoberberina (HWY-289) suprimiram enzimas envolvidas no metabolismo energético causando uma redução nos níveis de ATP levando à morte celular. Yan e colaboradores (2007) após avaliarem um isolado de *C. albicans* resistente ao fluconazol demonstraram uma diminuição nos níveis intracelulares de ATP e no potencial de membrana mitocondrial sugerindo uma deficiência na fosforilação oxidativa e uma mudança na via de fornecimento de energia da mitocôndria para o citoplasma a fim de manter a sobrevivência da célula.

Além das enzimas expressas diferencialmente, as células de *C. albicans* expostas a β -lapachona apresentaram três proteínas únicas, a saber: DNA polimerase, ATP sintase e piruvato quinase.

As células de levedura expressam duas isoenzimas de piruvato quinase, Cdc19 e Pyk2, sendo a Cdc19 a isoforma principal, essencial para o crescimento fermentativo (TRIPODI *et al.*, 2015). Essa enzima catalisa a etapa irreversível e final da glicólise, a conversão de fosfoenolpiruvato a piruvato, que é um intermediário importante para outras vias metabólicas. O metabolismo do piruvato é uma encruzilhada entre a via fermentativa e oxidativa. O metabolismo respiratório requer o transporte de piruvato para a matriz mitocondrial onde é oxidado e utilizado no ciclo de Krebs. Em contraste, a via fermentativa utiliza o piruvato citosólico, que é descarboxilado em acetaldeído e convertido em etanol (MIERZEJEWSKA; CHREPTOWICZ, 2016). No presente estudo, identificamos a presença de piruvato quinase (Cdc 19) em células de *C. albicans* após exposição à β -lapachona. De acordo com Mierzejewska e Chreptowicz (2016), o aumento da atividade de piruvato quinase bloqueia a mudança do processo fermentativo para o metabolismo respiratório em células de leveduras.

Como dito anteriormente, a β -lapachona é capaz de causar danos ao DNA através das espécies reativas de oxigênio. DNA polimerase (pol zeta) é uma proteína que está envolvida no processamento de informações genéticas. A integridade genômica é constantemente desafiada por uma variedade de agentes endógenos ou exógenos que causam dano no DNA. Algumas lesões podem ser mais difíceis de reparar, o que pode

resultar no bloqueio da maquinaria de replicação. Para evitar o desencadeamento da apoptose oriundo desse bloqueio, as células desenvolveram um mecanismo para realizar a síntese de DNA passando por estas lesões. Esse processo é conhecido como síntese translesão e é realizado por um conjunto de DNA polimerase (WILLIANS *et al.*, 2016). Em leveduras, DNA polimerase zeta está envolvida na síntese translesão propensa ao erro (“erro-proner”) durante a replicação de DNA nuclear (BARUFFINI *et al.*, 2012). No presente estudo, identificamos a DNA polimerase (pol zeta) como proteína única em células de *C. albicans* após exposição a β - lapachona. Portanto, sugere-se que a DNA polimerase juntamente com ATP sintase, a qual está envolvida no metabolismo de nucleotídeos, possam ter um papel importante na síntese translesão de lesões oxidativas remanescente na fita de DNA, tentando impedindo assim, o bloqueio da replicação. Entretanto, mais ensaios são necessários para confirmar essa hipótese.

Por fim, as nossas evidências experimentais, indicam que o efeito antifúngico atribuído a β - lapachona gera morte celular por apoptose em células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistentes a azólicos, onde a geração e acúmulo intracelular de EROS parecem agir como estimuladores de sinalização de apoptose precoce, danificando diretamente a mitocôndria e o DNA nuclear.

A formação de biofilme por diversas espécies de *Candida* é um fator perturbador em infecções hospitalares, já que esses fungos podem se instalar em dispositivos médicos, tais como cateteres, favorecendo a disseminação fúngica via corrente sanguínea, causando fungemia grave (CURVELO *et al.*, 2015). Nestes casos, o tratamento pode ser severamente prejudicado, devido à limitação da penetração das substâncias através da matriz do biofilme e a resistência às células de defesa do hospedeiro (SILVA *et al.*, 2011).

Portanto, sabendo do efeito promissor de β - lapachona em células planctônicas de *Candida* spp., a avaliação sobre algum fator de virulência expresso por estas leveduras, ajudam a reforçar o potencial antifúngico do composto. Para isso, avaliamos o efeito de β - lapachona sobre biofilmes formados de modo a investigar a capacidade da molécula em perturbar as estruturas que já foram formadas e também sobre o processo de formação de biofilmes.

A eficácia de β -lapachona em biofilmes de *Candida* spp. foi avaliada quantitativamente usando o ensaio de redução do MTT. Neste estudo, a β - lapachona demonstrou ser capaz de inibir a viabilidade do biofilme formado de forma dependente

da concentração, podendo inferir que o composto conseguiu perturbar as estruturas internas que compõem essa comunidade microbiana. O isolado de *C. albicans* apresentou reduções significativas a partir de 16 µg/mL (2x CIM), enquanto os isolados de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* apresentaram redução em concentrações a partir de 80 µg/mL (10x CIM). Diferenças fisiológicas, tais como tamanho da célula, morfologia, bioquímica e principalmente, a composição da matriz das espécies de *Candida* spp. interferem no desprendimento e destruição do biofilme (SILVA *et al.*, 2011), justificando assim as diferenças obtidas nas concentrações necessárias para inibir o biofilme. Recentemente, um estudo realizado por Tsang e colaboradores (2012) relataram que a purpurina, uma antraquinona, também reduziu a atividade metabólica do biofilme maduro de *C. albicans* em torno de aproximadamente 37% (10 µg/mL) de um modo dependente da concentração.

Wang e colaboradores (2015) demonstraram que algumas moléculas induzem o mesmo tipo de morte celular tanto em células planctônicas como em biofilme em *C. albicans* demonstrando que alguns compostos podem apresentar efetividade nas duas formas celulares. Portanto, a capacidade que β- lapachona tem em induzir a produção de EROS em células planctônicas pode-se estender para as células em biofilme, sugerindo que as EROS podem estar participando das alterações das estruturas vitais do biofilme. Delattin, Cammue e Thevissen (2014) relataram que, de uma forma geral, a capacidade de compostos antifúngicos em induzir EROS e, em alguns casos, a apoptose em células de fungos parece ser uma estratégia muito eficaz, não somente contra as células planctônicas, mas também contra células resistentes do biofilme.

Além de avaliarmos a ação de β- lapachona sobre biofilmes formados, também foi avaliado a capacidade do composto em inibir a formação de biofilmes. Nesse experimento, a β- lapachona foi adicionada ao meio simultaneamente as células de *Candida* spp. De acordo com Khan e Ahmad (2012), se um agente é adicionado no início do experimento, este pode atuar antes da formação do biofilme e inibir o seu desenvolvimento; sendo particularmente interessante para o combate às infecções resistentes envolvendo biofilmes de *Candida*.

No presente estudo, β- lapachona demonstrou ser capaz de inibir a formação de biofilmes de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* a partir de concentrações subinibitórias. Nossos achados corroboram os de Khan e Ahmad (2012), os quais

relataram que concentrações subinibitórias de fitocompostos também inibiram a formação de biofilme de *C. albicans*.

8. CONCLUSÃO

A β - lapachona apresentou atividade antifúngica frente a isolados resistentes a azólicos de *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* exercendo seus efeitos antifúngicos através da produção de espécies reativas de oxigênio, disfunção mitocondrial e danos ao DNA, culminando na morte celular por apoptose. Portanto, o presente estudo permitiu uma possível compreensão dos mecanismos de ação de β -lapachona sugerindo que esta tem potencial para agir como composto antifúngico com atividade apoptótica. Além disso, a β - lapachona demonstrou ser capaz de diminuir a viabilidade do biofilme formado e inibir a formação de biofilmes *in vitro*, em isolados de *Candida* spp. resistentes a azólicos.

REFERÊNCIAS

- AIRES, A. L. *et al.* β -Lapachone: a naphthoquinone with promising antischistosomal properties in mice. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3, p. 261-267, 2014.
- ALBUQUERQUE, P.; CASADEVALL, A. Quorum sensing in fungi-a review. **Medical Mycology**, v. 50, n. 4, p.337-345, 2012.
- ALCAZAR-FUOLI, L.; MELLADO, E. Current status of antifungal resistance and its impact on clinical practice. **British Journal of Haematology**, v.166, n. 4, p. 471-484, 2014.
- ANTUNES, L.C.M. A linguagem das bactérias. **Ciência Hoje**, v. 33, n. 193, p. 17-20, 2003.
- ARENDRUP, M.C.; PERLIN, D.S. Echinocandin resistance: an emerging clinical problem? **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 27, n. 6, p. 484-492, 2014.
- BACELO, K.L. *et al.* Biotype stability of *Candida albicans* isolates after culture storage determined by randomly amplified polymorphic DNA and phenotypical methods. **Mycoses**, v. 53, n. 6, p. 468-474, 2009.
- BARUFFINI, E. *et al.* Overexpression of DNA polymerase zeta reduces the mitochondrial mutability caused by pathological mutations in DNA polymerase gamma in yeast. **PLoS One**, v. 7, n. 3, 2012.
- BASSETTI, M. *et al.* Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in Italy and Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 12, p. 4167-4172, 2013.
- BLANKENSHIP, J.R.; MITCHELL, A.P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 588-594, 2006.
- BONHOMME, J.; D'ENFERT, C. *Candida albicans* biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 398-403, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Formulário terapêutico nacional 2010: Rename 2010/Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos.** – 2. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010.
- BRETON, C.S. *et al.* Combinative effects of β -Lapachone and APO866 on pancreatic cancer cell death through reactive oxygen species production and PARP-1 activation. **Biochimie**, v. 116, p. 141-153, 2015.
- BROWN, G.D. *et al.* Hidden killers: human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n.165, 2012.

BRUDER-NASCIMENTO , A. *et al.* Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary hospital. **BMC Research Notes**, v. 3, n. 1, p. 1-5, 2010.

CASTRO, R.D. *et al.* Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an *in vitro* study. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.15, p. 417-424, 2015.

CAVALCANTI, I.M.F. *et al.* Antimicrobial activity of b-lapachone encapsulated into liposomes against meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Cryptococcus neoformans* clinical strains. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 3, p. 103–108, 2015.

CHOI, H.; LEE, D.G. Lycopene induces apoptosis in *Candida albicans* through reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction. **Biochimie**, v. 115, p. 108-115, 2015.

CLSI, CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard. **CLSI Document M27-A3**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

CLSI, CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement. **CLSI document M27-S4**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2012.

COENYE, T. *et al.* Prevention of *Candida albicans* Biofilm Formation. **The Open Mycology Journal**, v. 5, p. 9-20, 2011.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, p.249-261, 2004.

CORRÊA, G. *et al.* Cell death induction in *Giardia lamblia*: effect of beta-lapachone and starvation. **Parasitology International**, v. 58, n. 4, p. 424-437, 2009.

COSTE, A. *et al.* Genotypic Evolution of Azole Resistance Mechanisms in Sequential *Candida albicans* isolates. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 10, p. 1889–1904, 2007.

COWEN, L.E. The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 187-198, 2008.

CUÉLLAR-CRUZ, M. *et al.* *Candida* species: new insights into biofilm formation. **Future Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 755-771, 2012a.

CUÉLLAR-CRUZ, M. *et al.* The effect of biomaterials and antifungals on biofilm formation by *Candida* species: a review. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 10, p. 2513-27, 2012b.

CURTY, N. *et al.* Discovering the infectome of human endothelial cells challenged with *Aspergillus fumigatus* applying a mass spectrometry label-free approach. **Journal of Proteomics**, v. 97, p. 126-40. 2014.

CURVELO, J.A.R. *et al.* 3-Indol carboxaldehyde, an imidazole synthesized from naphthoquinone β -lapachone downregulates *Candida albicans* biofilm. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, n. 3, p. 1155-1161, 2015.

DA COSTA, V.G. *et al.* Nosocomial bloodstream *Candida* infections in a tertiary-care hospital in South Brazil: a 4-year survey. **Mycopathologia**, v. 178, n. 3, p. 243-250, 2014.

DA MATTA, D.A. *et al.* Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in Sao Paulo, Brazil, 1995-2003. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, p. 399–404, 2007.

DA SILVA, C.R. *et al.* Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1691-1700, 2013.

DA SILVA JÚNIOR, E.N. *et al.* Synthesis and evaluation of quinonoid compounds against tumor cell lines. **European Journal Medical Chemical**, v. 46, n. 1, p.399-410, 2011.

DE ROSA, F.G. *et al.* The effect on mortality of fluconazole or echinocandins treatment in candidemia in internal medicine wards. **PLoS One**, v. 10, n. 5, 2015.

DELARZE, E.; SANGLARD, D. Defining the frontiers between antifungal resistance, tolerance and the concept of persistence. **Drug Resistance Updates**, v. 23, p. 9-12, 2015.

DELATTIN, N.; CAMMUE, B. P.; THEVISSSEN, K. Reactive oxygen species-inducing antifungal agents and their activity against fungal biofilms. **Future Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 77-90, 2014.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-93, 2002.

FAVEL, A. *et al.* Colony morphology switching of *Candida lusitaniae* and acquisition of multidrug resistance during treatment of a renal infection in a newborn: case report and review of the literature. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 47, p. 331–339, 2003.

FERREIRA, J.R. *et al.* Induction of G₂/M arrest, caspase activation and apoptosis by α -santonin derivatives in HL-60 cells. **Toxicology In vitro**, v. 27, n. 5, p. 1458-1466, 2013.

- FERREIRA, S. B. *et al.* β -Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 2, p. 140-160, 2010.
- FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 623-633, 2010.
- GIACOMAZZI, J. *et al.* The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 3, p.145-150, 2015.
- GIRARDOT, M.; IMBERT, C. Novel strategies against *Candida* biofilms: interest of synthetic compounds. **Future Microbiology**, n. 11, p. 69-79, 2016.
- GONÇALVES, S.S. *et al.* Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. **Mycoses**, n. 59, p. 198-219, 2016.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; DA ROCHA, A.B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.
- GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 5, p. 5-10, 2014.
- HEMPEL, S.L. *et al.* Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5 (and 6)-carboxy-2',7'- dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, p.146-159, 1999.
- HINRICHSEN, S.L. *et al.* Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 394-398, 2008.
- HOFFMANN-SANTOS, H.D. *et al.* Six-year trend analysis of nosocomial candidemia and risk factors in two intensive care hospitals in Mato Grosso, midwest region of Brazil. **Mycopathologia**, v. 176, n. 5, p. 409-415, 2013.
- HWANG, J.H. *et al.* Hibicuslide C-induced cell death in *Candida albicans* involves apoptosis mechanism. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 5, p. 1400-1411, 2014.
- JACKSON, C.; AGBOKE, A.; VICTOR NWOKE, V. *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of combinations of nystatin and *Euphorbia hirta* leaf extract against *Candida albicans* by the checkerboard method. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 9, p. 666-669, 2009.
- KATHIRAVAN, M.K. *et al.* The biology and chemistry of antifungal agents: a review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n.19, p. 5678-5698, 2012.
- KHAN, M.S.; AHMAD, I. Antibiofilm activity of certain phytochemicals and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 3, p. 618-621, 2012.

KIM, K.Y. *et al.* Proteomic profiling of yeast- and hyphal-specific responses of *Candida albicans* to the antifungal agent, HWY-289. **Proteomics - Clinical Applications**, v. 3, n. 4, p. 452-461, 2009.

KINGHORN, A.D. *et al.* The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 6, p. 1539-1555, 2011.

KOK, E.T. *et al.* Resistance to Antibiotics and Antifungal Medicinal Products: Can Complementary and Alternative Medicine Help Solve the Problem in Common Infection Diseases? The Introduction of a Dutch Research Consortium. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-6, 2015.

KOTHAVADE, M.M.; RAJENDRA, J.; PANTHAKI, M. H. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, p. 873–880, 2010.

KULLBERG, B.J.; ARENDRUP, M.C. Invasive Candidiasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, p. 1445-1456, 2015.

KWOK, S.C. *et al.* In vitro effect of DNA topoisomerase inhibitors on *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 48, n. 1, p. 155-160, 2010.

LARRU, B.; ZAOUTIS, T.E. Newer antifungal agents. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 25, n. 1, p. 110-115, 2013.

LEBEL, C.P.; ISCHIOPOULOS, H.; BONDY, S.C. Evaluation of the probe 2, 7-dichlorofluorescein as indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, v.5, p. 227-31, 1992.

LI, G.Z. *et al.* Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. **Proteomics**, v. 9, n. 6, p. 1696–1719, 2009.

LOCKHART, S.R. Current Epidemiology of *Candida* Infection. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 36, n. 17, p. 131-136, 2014.

MA, J. *et al.* Mitochondrial targeted β -lapachone induces mitochondrial dysfunction and catastrophic vacuolization in cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 21, p. 4828-4833, 2015.

MACEDO, L. *et al.* β -Lapachone activity in synergy with conventional antimicrobials against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Phytomedicine**, v. 21, n. 1, p. 25-29, 2013.

MARCHETTI, P. *et al.* Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 184, p. 1155-1160, 1996.

MARINHO-FILHO, J. D. *et al.* Oxidative stress induction by (+)-cordiaquinone J triggers both mitochondria-dependent apoptosis and necrosis in leukemia cells. **Chemico Biological Interaction**, v. 183, n. 3, p. 369-379, 2010.

MARTIN S. J. *et al.* Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 182, p. 1545-1556, 1995.

MARTINEZ, L.R.; FRIES, BC. Fungal Biofilms: Relevance in the Setting of Human Disease. **Current Fungal Infection Reports**, v. 1, n. 4, p. 266-275, 2010.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 5, p. 449-460, 2006.

MARTINS, N. *et al.* Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 648-670, 2015.

MATA-SANTOS, T. *et al.* Anthelmintic Activity Of Lapachol, B-Lapachone And Its Derivatives Against *Toxocara Canis* Larvae. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 3, p. 197-204, 2015.

MCCARTY, T.P.; PAPPAS, P.G. Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 103-124, 2016.

MIAO, H. *et al.* Inhibitory effect of Shikonin on *Candida albicans* growth. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, n. 11, p. 1956-1963, 2012.

MIERZEJEWSKA, J.; CHREPTOWICZ, K. Lack of Maf1 enhances pyruvate kinase activity and fermentative metabolism while influencing lipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 590, n. 1, p. 93-100, 2016.

MILOSHEV, G.; MIHAYLOV, I.; ANACHKOVA, B. Application of the single cell electrophoresis on yeast cells. **Mutation Research**, v. 513, p. 69-74, 2002.

MORACE, G.; PERDONI, F.; BORGHI, E. Antifungal drug resistance in *Candida* species. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 2, p. 254-259, 2014.

MOURA, K.C. *et al.* 1,3-Azoles from ortho-naphthoquinones: synthesis of aryl substituted imidazoles and oxazoles and their potent activity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 21, p. 6482-6488, 2012.

MÜLLER, F.M.C. Biofilm Formation and its Impact on Antifungal Therapy. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 235-241, 2014.

MURAKAMI, K *et al.* Effect of hydroxy substituent on the prooxidant action of naphthoquinone compounds. **Toxicology In vitro**, v. 24, n. 3, p. 905-909, 2010.

NETO, J.B. *et al.* Antifungal activity of naphthoquinoidal compounds *in vitro* against fluconazole-resistant strains of different *Candida* species: a special emphasis on mechanisms of action on *Candida tropicalis*. **PloS One**, v. 9, n. 5, 2014.

NEVES-JUNIOR, A. *et al.* Prevalence and Fluconazole Susceptibility Profile of *Candida* spp. Clinical Isolates in a Brazilian Tertiary Hospital in Minas Gerais, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 2, p. 1349-1359, 2015.

NG, K.P. *et al.* *Candida* species epidemiology 2000-2013: a laboratory-based report. **Tropical Medicine and International Health**, v. 20, n. 11, p.1447-1453, 2015.

NOBILE, C.J.; JOHNSON, A.D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, p. 71-92, 2015.

NUCCI, M. *et al.* Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. **PLoS One**, v. 8, n. 3, 2013.

NUCCI, M. *et al.* Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 5, p. 561-570, 2010.

O'NEIL, J. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. **Review on Antimicrobial Resistance**, WEST, 2014.

ODDS, F.C. Synergy, antagonism, and what the *checkerboard* puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, 2003.

OLIVEIRA, M.H. *et al.* Semi-síntese: uma solução para problemas farmacológicos de produtos naturais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 9, n. 1, p. 62-88, 2012.

OLIVEIRA, V.K. *et al.* Fungemia caused by *Candida* species in a children's public hospital in the city of São Paulo, Brazil: study in the period 2007-2010. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, n. 4, p. 301-305, 2014.

PAIVA, J.A.; PEREIRA, J.M. New antifungal antibiotics. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 26, n. 2, p. 168-174, 2013.

PARK, E.J. *et al.* β -Lapachone induces programmed necrosis through the RIP1-PARP-AIF-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma SK-Hep1 cells. **Cell Death Disease**, n. 5, 2014.

PAROLIN, M.B.; REASON, I.J.M. Apoptose Como Mecanismo De Lesão Nas Doenças Hepatobiliares. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, n. 2, 2001.

PFALLER, M. A. *et al.* Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-albicans species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004-2008. **PLoS One**, v. 9, 2014

PIERCE, C. G. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **NHI Public Access**, v. 3, n. 9, p. 1494–1500, 2008.

PIRES, R. H. **Formação de biofilmes e resistência a antifúngicos e biocidas em *Candida parapsilosis* e *C. orthopsilosis* isoladas de águas usadas para hemodiálise**. 2010. 172f. Tese (doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia)-Universidade Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2010.

POUND, M.W. *et al.* Overview of treatment options for invasive fungal infections. **Medical Mycology**, v. 49, n. 6, p. 561-580, 2011.

PRESS, E.G.; SHIELDS, R.K.; CLANCY, C. J. *Candida* Biofilm: Clinical Implications of Recent Advances in Research. **Current Fungal Infection Reports**, v. 8, p. 72–80, 2014.

QUINDÓS, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, n. 1, p. 42-48, 2014.

RAJESHKUMAR, R. AND SUNDARARAMAN, M. Emergence of *Candida* spp. and exploration of natural bioactive molecules for anticandidal therapy – *status quo*. **Mycoses**, v. 55, p. 60-73, 2012.

RAMAGE, G. *et al.* Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 973-980, 2002.

RAMAGE, G.; ROBERTSON, S.N.; WILLIAMS, C. Strength in numbers: antifungal strategies against fungal biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 2, p.114-120, 2014.

ROEMER, T.; KRYSAN, D. J. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 5, 2014.

SALES JUNIOR, J. A. *et al.* Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepsis em unidades de terapia intensiva brasileira. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 18, n. 1, p. 9-13, 2006.

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

SANTOS, P.M.; TEIXEIRA, M.C.; SÁ-CORREIA, I. A análise proteômica quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a estresse químico em microorganismos. **Boletim de biotecnologia**, v. 77, p. 7-17, 2004.

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

SASAKI, K.; ABE, H.; YOSHIKAWA, F. *In vitro* antifungal activity of naphthoquinone derivatives. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 5, p. 669-670, 2002.

SCHMALRECK, A. F. *et al.* Species and susceptibility distribution of 1062 clinical yeast isolates to azoles, echinocandins, flucytosine and amphotericin B from a multi-centre study for the Antifungal Susceptibility Testing (AFST) Study Group. **Mycoses**, v. 55, p. 124–137, 2012.

SCORZONI, L. *et al.* The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 391-397, 2007.

SCORZONI, L. *et al.* Searching new antifungals: The use of *in vitro* and *in vivo* methods for evaluation of natural compounds. **Journal of Microbiological Methods**, v. 123, p. 68-78, 2016.

SENEVIRATNE, C.J.; JIN, L.; SAMARANAYAKE, L.P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral Diseases**, v. 14, n. 7, p. 582-590, 2008.

SILVA, J.C. *et al.* Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Mol. Cell.* **Proteomics**, v. 5, n. 1, p. 144–56, 2006.

SILVA, J.O. *et al.* *In vitro* effect of antibiotics on biofilm formation by *Bacteroides fragilis* group strains isolated from intestinal microbiota of dogs and their antimicrobial susceptibility. **Anaerobe**, v. 28, p. 24-28, 2014.

SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; DE SOUZA, M.C.B.V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, v. 3, p. 407-416, 2003.

SILVA, S. *et al.* Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. **Trends Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 241-247, 2011.

SILVA, S. *et al.* *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 288–305, 2012.

SOLA, M.C. *et al.* Mecanismos de quorum sensing e sua relevância na microbiologia de alimentos. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 8, n. 14; p. 1419-1441, 2012.

SOUZA, M.A.A.S. *et al.* Atividade biológica do lapachol e de alguns derivados sobre o desenvolvimento fúngico e em germinação de sementes. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1670-1671, 2008.

- SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **BioMed Research International**, p. 1-13, 2013.
- SRINIVASAN, A.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; RAMASUBRAMANIAN, A.K. Overcoming antifungal resistance. **Drug Discovery Today: Technologies**, v.11, p. 65-71, 2014.
- SWOBODA, R.K. *et al.* Structure and regulation of the HSP90 gene from the pathogenic fungus *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 11, p. 4506–4514, 1995.
- TAFF, H.T. *et al.* Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. **Future Microbiology**, v. 8, n. 10, p. 1325-1327, 2013.
- TAMAYO, D. *et al.* Involvement of the 90 kDa heat shock protein during adaptation of *Paracoccidioides brasiliensis* to different environmental conditions. **Fungal Genetics and Biology**, v. 51, p. 34-41, 2013.
- TANG, H.J. *et al.* Epidemiology and prognostic factors of candidemia in cancer patients. **PLoS One**, v. 9, n. 6, 2014.
- THOMPSON, G.R.; CADENA, J.; PATTERSON, T.F. Overview of antifungal agents. **Clinics In Chest Medicine**, v. 30, n. 2, p. 203-215, 2009.
- TRENTIN, D.S.; GIODARNI, R.B.; MACEDO, A.J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.
- TRIPODI, F. *et al.* Post-translational modifications on yeast carbon metabolism: Regulatory mechanisms beyond transcriptional control. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1850, n. 4, p. 620-627, 2015.
- TSANG, P.W.; BANDARA, H.M.; FONG, W.P. Purpurin suppresses *Candida albicans* biofilm formation and hyphal development. **PLoS One**, v. 7, n. 11, 2012.
- WALKER, L.A. *et al.* Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. **PLoS Pathogens**, v.4, 2008.
- WANG, T. *et al.* *In vitro* antifungal activity of baicalin against *Candida albicans* biofilms via apoptotic induction. **Microbial Pathogenesis**, v. 87, p. 21-29, 2015.
- WILLIAMS, N.L. *et al.* *In vitro* Lesion Bypass Studies of O(4)-Alkylthymidines with Human DNA Polymerase η . **Chemical Research in Toxicology**, v. 29, n. 4, p. 669-675, 2016.
- WISPLINGHOFF, H. *et al.* Nosocomial bloodstream infections due to *Candida* spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 1, p. 78-81, 2014.

XU, C. *et al.* The anthracenedione compound bostrycin induces mitochondria-mediated apoptosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 10, n. 3, p. 297-308, 2010.

YAN, L. *et al.* Proteomic analysis reveals a metabolism shift in a laboratory fluconazole-resistant *Candida albicans* strain. **Journal Proteome Research**, v. 6, n. 6, p. 2248-2256, 2007.

YANG, Z.T. *et al.* Epidemiology, species distribution and outcome of nosocomial *Candida* spp. bloodstream infection in Shanghai. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, 2014.

YAPAR N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Journal of Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, p. 95-105, 2014.

YOO, J.I. *et al.* Proteomic Analysis of Intracellular and Membrane Proteins From Voriconazole-Resistant *Candida glabrata*. **Osong Public Health and Research Perspectives**, v. 4, n. 6, p. 293-300, 2013.

YU, H.Y. *et al.* β -lapachone-Induced Apoptosis of Human Gastric Carcinoma AGS Cells Is Caspase-Dependent and Regulated by the PI3K/Akt Pathway. **Biomolecules & Therapeutics**, v. 22, n. 3, p. 184-192, 2014.

ZHANG, L. *et al.* Development of fluconazole resistance in a series of *Candida parapsilosis* isolates from a persistent candidemia patient with prolonged antifungal therapy. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 15, p. 340-347, 2015.

APÊNDICES

Anti-biofilm and pro-apoptotic activity of β -lapachone against isolates of *Candida* spp. resistant to azoles

Cecília Rocha da Silva^{1,2}, Rosana de Sousa Campos^{1,2}, João Batista de Andrade Neto^{1,2},
Letícia Serpa Sampaio^{1,2}, Francisca Bruna Stefany Aires do Nascimento^{1,2}, Manoel O.
de Moraes³, Bruno Coêlho Cavalcanti³, Hemerson Iury Ferreira Magalhães⁴, Akenaton
Onassis Cardoso Viana Gomes⁵, Marina Duarte Pinto Lobo⁶, Eufrânio Nunes da Silva
Júnior⁷ and Hélio Vitoriano Nobre Júnior^{1,2}

1. Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmacy, Laboratory of Bioprospection and Experiments in Yeast (LABEL), Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil;

2. Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil;

3. Department of Physiology and Pharmacology, Neuropharmacology Laboratory, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil;

4. School of Pharmacy, Federal University of Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

5. Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil;

6. School of Pharmacy, University of Fortaleza, Fortaleza, CE, Brazil

7. Department of Chemistry, Institute of Exact Sciences, Laboratory of Synthetic and Heterocyclic Chemistry, Federal University of Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil

Corresponding author:

Telephone number: # 55 85 3366 8274

Fax: # 55 85 3366 8257

E-mail: label_ufc@yahoo.com.br

ABSTRACT

The incidence of candidemia has increased worldwide and is associated with antifungal resistance. It makes the search for molecules with a potential antifungal activity necessary because there are few antifungals available in the market. β -lapachone has attracted attention due to a wide range of biological activities mainly involving the production of reactive oxygen species. In view of this, we evaluated the effect of β -lapachone on the growth of *Candida* spp. resistant to azole derivatives, in planktonic and biofilm forms, through broth microdilution techniques, flow cytometry and comet assay. The cell viability of the biofilms was assessed using MTT tetrazolium salt reduction assay. The results indicate that the antifungal effect of β -lapachone generates apoptotic cell death in *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* cells resistant to azoles, where the generation and accumulation of intracellular ROS seem to act as stimulators of an early apoptosis signaling, directly damaging the mitochondria and the nuclear DNA. In addition, the compound showed an anti-biofilm activity against *Candida* spp. isolates. This study allowed a possible understanding of the mechanisms of action of β -lapachone, suggesting that the compound has a potential to act as a fungicide with an apoptotic activity. In addition, β -lapachone has been shown to decrease the viability of the formed biofilm and inhibit the formation of biofilms *in vitro* in *Candida* spp. isolates resistant to azoles.

Keywords: *Candida* spp., β -lapachone, resistance, flow cytometry, mechanism of action, biofilms.

RESUMO

A incidência de candidemia tem aumentado mundialmente e associado à resistência antifúngica torna a busca por moléculas com potencial antifúngico necessária, pois existem poucos antifúngicos no mercado. Portanto, β -lapachona tem atraído atenção devido à vasta gama de atividades biológicas envolvendo principalmente a produção de espécies reativas de oxigênio. Diante disto, avaliamos o efeito de β -lapachona sobre o crescimento de *Candida* spp. resistentes a derivados azólicos, nas formas planctônicas e biofilme, através de técnicas de microdiluição em caldo, citometria de fluxo e ensaio do cometa. A viabilidade celular dos biofilmes foi avaliada através do ensaio de redução do sal de tetrazólio MTT. Os resultados apontam que o efeito antifúngico da β -lapachona gera morte celular por apoptose em células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistentes a azólicos, onde a geração e acúmulo intracelular de EROS parecem agir como estimuladores de sinalização de apoptose precoce, danificando diretamente a mitocôndria e o DNA nuclear. Adicionalmente, o composto apresentou atividade antibiofilme contra isolados de *Candida* spp. O presente estudo permitiu uma possível compreensão dos mecanismos de ação de β -lapachona sugerindo que o composto tem potencial para agir como antifúngico com atividade apoptótica. Além disso, a β -lapachona demonstrou ser capaz de diminuir a viabilidade do biofilme formado e inibir a formação de biofilmes *in vitro*, em isolados de *Candida* spp. resistentes a azólicos.

Palavras chave: *Candida* spp., β -lapachona, resistência, citometria de fluxo, mecanismo de ação, biofilmes.

ANEXOS

Anexo I. Concentração inibitória mínima (CIM) de agentes antifúngicos frente a cepas de *Candida* spp.

Cepas ^a	Origem	Nº de acesso Genbank	CIM		
			Valores de CIM ^b (µg/mL)		
			Itraconazol	Voriconazol	Fluconazol
<i>C. albicans</i> 1	Sangue	AB861479	0,25	2,0	32
<i>C. albicans</i> 2	Sangue	KJ740179	4,0	2,0	64
<i>C. albicans</i> 3	Sangue	KJ740175	0,25	2,0	16
<i>C. albicans</i> 4	Sangue	AB861478	4,0	0,03	32
<i>C. albicans</i> 5	Sangue	KJ740176	4,0	2,0	32
<i>C. albicans</i> 6	Sangue	KJ740174	4,0	1,0	16
<i>C. albicans</i> 7	Sangue	AB861480	4,0	0,03	32
<i>C. albicans</i> 8	Sangue	AB861477	1,0	0,125	64
<i>C. albicans</i> 9	Sangue	AB861476	2,0	0,03	64
<i>C. tropicalis</i> 1	Sangue	KJ740185	2,0	1,0	64
<i>C. tropicalis</i> 2	Sangue	KJ740181	8,0	2,0	64
<i>C. tropicalis</i> 3	Sangue	KF616840	1,0	0,25	64
<i>C. tropicalis</i> 4	Sangue	AB861490	2,0	1,0	32
<i>C. tropicalis</i> 5	Urina	AB861491	0,25	0,25	32
<i>C. tropicalis</i> 6	Sangue	KJ740184	4,0	1,0	16
<i>C. tropicalis</i> 7	Sangue	AB861493	0,25	1,0	16
<i>C. parapsilosis</i> 1	Sangue	KJ740191	2,0	0,25	16
<i>C. parapsilosis</i> 2	Sangue	KJ740186	4,0	0,125	32
<i>C. parapsilosis</i> 3	Sangue	AB861485	1,0	0,125	16
<i>C. parapsilosis</i> 4	Sangue	KJ740188	4,0	0,125	16
<i>C. parapsilosis</i> 5	Sangue	AB861488	1,0	0,125	8,0
<i>C. parapsilosis</i> 6	Sangue	AB861487	0,5	1,0	32
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019		-	0,25	0,125	2,0
<i>C. krusei</i> ATCC 6258		-	0,25	0,25	16

^a Cepas de *Candida* spp. resistentes a azólicos.

^b O CIM foi definido como a menor concentração do fármaco que produziu 50% de redução de crescimento fúngico após 24 horas de incubação. O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo M27-S4 do CLSI. Os valores do CIM são expressos em µg/mL. O CIM representa a média geométrica de 3 CIM determinados em diferentes dias.

Para avaliação da ocorrência de resistência, os seguintes valores foram levados em consideração: CIM ≥ 1 µg/mL para itraconazol e voriconazol e CIM ≥ 8 µg/mL para fluconazol (CLSI, 2008; CLSI, 2012).

Anexo II. Viabilidade celular em isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* em biofilme após exposição de 24 horas a β -lapachona e anfotericina B.

β -lapachona	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Tratamento ($\mu\text{g/mL}$)	Viabilidade (%) Média \pm E.P.M (n=3)		
Controle	100	100	100
2	95,41 \pm 4,57	99,44 \pm 1,04	100,12 \pm 1,12
4	87,70 \pm 5,34	99,01 \pm 0,45	100,27 \pm 1,32
8	77,79 \pm 14,36	97,79 \pm 0,31	96,32 \pm 1,87
16	56,21 \pm 10,64	94,25 \pm 1,74	97,92 \pm 2,62
80	34,71 \pm 9,38	46,37 \pm 3,36	49,07 \pm 0,80
400	5,21 \pm 0,28	8,95 \pm 0,29	11,22 \pm 0,76

Anfotericina B	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Tratamento ($\mu\text{g/mL}$)	Viabilidade (%) Média \pm E.P.M (n=3)		
Controle	100	100	100
16	21,76 \pm 4,89	7,95 \pm 0,27	15,25 \pm 2,41
8	26,57 \pm 0,37	9,08 \pm 0,82	35,25 \pm 3,61
4	26,19 \pm 0,56	15,16 \pm 0,26	43,92 \pm 3,07
2	32,32 \pm 0,02	28,50 \pm 0,99	52,31 \pm 2,00
1	37,90 \pm 6,72	47,02 \pm 3,38	53,05 \pm 4,15
0,5	52,53 \pm 0,08	48,16 \pm 4,35	62,12 \pm 1,05
0,25	54,33 \pm 7,86	56,68 \pm 2,00	69,65 \pm 4,60
0,125	71,72 \pm 6,96	70,41 \pm 1,02	73,38 \pm 4,78
0,06	84,32 \pm 0,63	84,32 \pm 0,63	69,78 \pm 4,70
0,03	84,32 \pm 0,63	85,34 \pm 1,65	73,77 \pm 0,99

Anexo III. Inibição da formação do biofilme em isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* após exposição de 24 horas a β -lapachona e anfotericina B.

β -lapachona	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Tratamento ($\mu\text{g/mL}$)	Viabilidade (%) Média \pm E.P.M (n=3)		
Controle	100	100	100
2	64,48 \pm 5,77	73,55 \pm 0,71	100,36 \pm 0,57
4	71,86 \pm 1,92	43,07 \pm 1,79	39,75 \pm 1,55
8	70,99 \pm 2,45	17,68 \pm 1,09	32,25 \pm 2,19
16	43,12 \pm 2,20	16,48 \pm 0,01	15,11 \pm 0,51
80	35,54 \pm 3,98	8,45 \pm 0,11	5,47 \pm 0,30
400	9,15 \pm 0,06	8,84 \pm 0,71	4,93 \pm 0,25

Anfotericina B	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
Tratamento ($\mu\text{g/mL}$)	Viabilidade (%) Média \pm E.P.M (n=3)		
Controle	100	100	100
16	4,86 \pm 0,71	5,03 \pm 0,39	5,39 \pm 0,83
8	5,43 \pm 0,85	4,88 \pm 0,10	6,92 \pm 1,10
4	5,29 \pm 0,59	5,52 \pm 0,34	5,36 \pm 0,85
2	5,26 \pm 0,85	5,16 \pm 0,25	6,21 \pm 0,76
1	5,81 \pm 0,47	5,52 \pm 0,27	5,28 \pm 0,38
0,5	20,00 \pm 1,83	5,02 \pm 0,58	11,68 \pm 0,67
0,25	23,12 \pm 2,20	7,84 \pm 0,40	18,48 \pm 1,84
0,125	28,69 \pm 1,56	18,25 \pm 0,79	25,68 \pm 1,31
0,06	43,14 \pm 3,93	19,70 \pm 0,73	24,47 \pm 2,64
0,03	62,71 \pm 3,39	24,47 \pm 0,61	35,60 \pm 2,10