



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

LETÍCIA SERPA SAMPAIO MORENO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE TENSOATIVOS
DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS FRENTE A ISOLADOS DE *CANDIDA* SPP.
RESISTENTES AO FLUCONAZOL E DE *S. AUREUS* RESISTENTES A
METICILINA**

FORTALEZA - CE

2022

LETÍCIA SERPA SAMPAIO MORENO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE TENSOATIVOS
DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS FRENTE A ISOLADOS DE *CANDIDA* SPP.
RESISTENTES AO FLUCONAZOL E DE *S. AUREUS* RESISTENTES A
METICILINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutora em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Helio Vitoriano Nobre Junior

Coorientadora: Profa. Dra. Cecília Rocha da Silva

FORTALEZA - CE

2022

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)

- M842 Moreno, Leticia Serpa Sampaio Moreno.
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE TENSOATIVOS DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS FRENTE A ISOLADOS DE CANDIDA SPP. RESISTENTES AO FLUCONAZOL E DE S. AUREUS RESISTENTES A METICILINA / Leticia Serpa Sampaio Moreno Moreno. – 2022.
117 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Junior.
Coorientação: Profa. Dra. Cecília Rocha da Silva.
1. Candida spp.. 2. Staphylococcus aureus. 3. tensoativos. 4. resistência a medicamentos. 5. biofilme.
I. Título.
-

CDD 616.9

A Deus.

A minha família.

AGRADECIMENTO

À Deus, que me sustenta, conduz e, com sua bondade, permitiu a conclusão deste trabalho. À Virgem Santíssima por tamanho carinho e cuidado com minha vida.

À São Padre Pio, que intercedeu firme e fielmente, constringendo-me por vezes, para que tudo se realizasse da melhor maneira.

Ao meu amado esposo, que me faz ver além. Por seu apoio e amor constantes. Não seria possível se não fosse pelas suas palavras e incentivos. E à nossa filha, que participou da escrita deste trabalho, acompanhando-me por meses, e ajudando-me a bem viver o últimos anos de doutorado.

Aos meus pais e irmãos, por todo amor, carinho, paciência e ajuda.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Ao Professor Dr. Hélio Vitoriano Nobre Junior, pelas oportunidades oferecidas de crescimento profissional e orientação ao longo dos últimos 10 anos. Aos amigos do LABIMAN, pela convivência alegre e crescimento profissional os quais me proporcionaram.

Aos professores participantes da banca examinadora pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

À Professora Dra. Lourdes Perez, por ter cedido as moléculas para análise, por valorosa contribuição na pesquisa e na escrita dos artigos. Assim como ao Dr. Anderson Silva, pela excelente contribuição nos experimentos e escrita do artigo.

Aos Professores Dr. Bruno Coêlho Cavalcanti e Dr. Emmanuel Silva Marinho pelas contribuições na parte experimental deste trabalho.

À Central Analítica da Universidade Federal do Ceará pela colaboração na realização dos testes de Microscopia Eletrônica.

“O heroísmo do trabalho está em “acabar” cada tarefa. ”

São Josemaria Escrivá

RESUMO

Nos últimos anos, tem sido relatado um aumento na incidência de infecções sanguíneas causadas por fungos *Candida* spp., bem como por bactérias *Staphylococcus aureus*, estando relacionados à alta morbidade e mortalidade entre pacientes hospitalizados. Diante disso, faz-se necessária à busca por novas opções terapêuticas e, nesse contexto, os tensoativos derivados de aminoácidos, tem se destacado por suas características biodegradáveis e seu potencial antimicrobiano. Nesse estudo foi realizada a avaliação da atividade antimicrobiana de dois produtos sintetizados quimicamente, derivados da fenilalanina-arginina (LPAM) e do triptofano-arginina (LTAM), pelo *Consejo Superior de Investigaciones Científicas* (CSIC) frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol e a cepas de *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA), na forma plantônica e em biofilme formado, bem como seus prováveis mecanismos de ação, utilizando técnicas de citometria de fluxo, e docagem molecular para avaliar sua interação com enzimas de *S. aureus*. Os compostos foram avaliados também sob parâmetros ADMET, considerando absorção, distribuição, metabolismo, excreção, toxicidade com a finalidade de prospectar seu potencial para desenvolvimento de novos fármacos. A avaliação do efeito antimicrobiano foi realizada com os produtos testados isoladamente, utilizando o teste de microdiluição em caldo. Em cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol foi analisada a interação com a anfotericina B, através do Cálculo da Concentração Inibitória Fracionada (FICI). As cepas utilizadas apresentaram CIM para os produtos LPAM e LTAM que variaram de 8,12-16,24 µg/mL para *Candida* spp e MRSA. Quando combinado com anfotericina B, observou-se uma ação sinérgica em todas as cepas de *Candida* spp.. Em relação à atividade anti biofilme, os produtos apresentaram atividade frente a biofilme de *Candida* spp. resistente a fluconazol e não apresentaram atividade frente a biofilme de MRSA. Os ensaios de citometria indicaram que os produtos LPAM e LTAM isolados causam redução na viabilidade celular de *Candida* spp. e de MRSA, causam alteração do potencial de membrana de *Candida* spp., produção de espécies reativas de oxigênio e externalização de fosfatidilserina em *Candida* spp. e dano ao DNA reduzido em *Candida* spp. e significativo em MRSA. Nos ensaios *in silico* foram evidenciadas ligações moleculares do tipo pontes de hidrogênio principalmente com o DNA e através dos ensaios ADMET concluiu-se que os compostos LPAM e LTAM são princípios ativos farmacológico promissores contra agentes microbianos.

Palavras-chave: *Candida* spp., *Staphylococcus aureus*, tensoativos, resistência a medicamentos, biofilme.

ABSTRACT

In recent years, an increase in the incidence of blood infections caused by *Candida* spp. as well as *Staphylococcus aureus*, being related to high morbidity and mortality among hospitalized patients. Therefore, it is necessary to search for new treatments, and, in this context, due to toxicological and environmental concerns, the amino acid-based surfactants have attracted special attention for its biodegradable characteristics and its antimicrobial potential. This study was evaluated the antimicrobial activity of two chemically synthesized products, derived based on phenylalanine-arginine (LPAM) and tryptophan-arginine (LTAM), by the *Consejo Superior de Investigaciones Científicas* (CSIC) against *Candida* spp. resistant to fluconazole strains and methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains, in the planktonic form and in the formed biofilms, as well as their probable mechanisms of action, using flow cytometry techniques and molecular docking to evaluate their interaction with enzymes of *S. aureus*. The compounds were also evaluated under ADMET parameters, considering absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity in order to explore their potential for the development of new drugs. The evaluation of the antimicrobial effect was carried out with the tested products, using the broth microdilution test. The interaction with amphotericin B against *Candida* spp. resistant to fluconazole strains was analyzed through the Fractional Inhibitory Concentration Calculation (FICI). The strains used presented MIC for LPAM and LTAM products that ranged from 8.12-16.24 $\mu\text{g/mL}$ for *Candida* spp and MRSA. When combined with amphotericin B, a synergistic effect was observed in all strains of *Candida* spp. Regarding anti biofilm activity, the products showed activity against *Candida* spp biofilm and show no activity against MRSA biofilm. Cytometry analysis indicated that LPAM and LTAM products cause a reduction in the cell viability of *Candida* spp. and MRSA, cause alteration of the membrane potential of *Candida* spp., production of reactive oxygen species and externalization of phosphatidylserine in *Candida* spp. and reduced DNA damage in *Candida* spp. and significant in MRSA. *In silico* assays revealed the existence of molecular bonds such as hydrogen bonds and through ADMET assays it was concluded that LPAM and LTAM compounds are promising pharmacological active principles against microbial agents.

Keywords: *Candida* spp., *Staphylococcus aureus*, Surface-active agents, Drug Resistance, biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fatores de risco para candidemia.....	23
Figura 2 - Fatores de risco para infecções por MRSA	25
Figura 3 - Mecanismo de ação principais antifúngicos	31
Figura 4 - Estrutura química dos surfactantes derivados de aminoácidos. LPAM (A) e LTAM (B).	38
Figura 5 - Fluxograma da metodologia utilizada.....	41
Figura 6 - Atividade antibiofilme de LPAM, LTAM isoladas e combinadas com anfotericina B contra: <i>C. parapsilosis</i> resistente a FLC (A), <i>C. albicans</i> (B) e <i>C. tropicalis</i> (C) cepas após 24h.....	59
Figura 7 - Redução no número de células viáveis de <i>Candida</i> spp. após tratamento com LPAM e LTAM.....	59
Figura 8 - Avaliação do potencial transmembrana mitocondrial de células de <i>Candida</i> spp. após tratamento com LPAM e LTAM.....	60
Figura 9 - Geração de espécies reativas de oxigênio em células de <i>Candida</i> spp. após tratamento com LPAM e LTAM.....	61
Figura 10 - Externalização de fosfatidilserina em células de <i>Candida</i> spp. após tratamento com LPAM e LTAM.....	62
Figura 11- Dano ao DNA em células de <i>Candida</i> spp. após tratamento com LPAM e LTAM.	63
Figura 12 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de células de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina (MRSA).	Erro! Indicador não definido.
Figura 13 - Efeito de LPAM e LTAM contra biofilme formado de MRSA de acordo com o ensaio de MTT.....	59
Figura 14 - Efeito de LPAM e LTAM no número de células não viáveis na cepa representativa de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina (MRSA) avaliada por citometria de fluxo.....	60
Figura 15 - Complexos de interação entre o ligante LPAM com os receptores <i>S. aureus</i> gyrase complex with DNA (a), <i>S. aureus</i> gyrase (b), Wild-type <i>S. aureus</i> DHFR (c), Acyl- PBP2a from MRSA residue (d) e DNA (5'- D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') (e)	77
Figura 16 - Complexos de interação entre o ligante LTAM com os receptores <i>S. aureus</i> gyrase complex with DNA (a), <i>S. aureus</i> gyrase (b), Wild-type <i>S. aureus</i> DHFR (c), Acyl-	

PBP2a from MRSA residue (d) e DNA (5'- D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') (e)	81
Figura 17- LPAM 1 e LTAM 2: (A) Distribuição das microespécies e (B) coeficientes de distribuição e solubilidade em função da variação do pH; (C) Aproximação ao espaço físico-químico de segurança do conjunto de dados da Pfizer.....	83
Figura 18 - Reação de O-desalquilação da LPAM (A) e LTAM(B) conduzida por CYP3A4.	87
Figura 19 - Farmacóforos associados a atividade biológica de LPAM (1) e LTAM (2)	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fatores relacionados à resistência aos antifúngicos	34
Tabela 2 - Mecanismos de resistência associado aos principais antifúngicos.....	34
Tabela 3 - Alguns mecanismos moleculares relacionados à resistência em <i>S. aureus</i>	35
Tabela 4 - Valores de CIM obtidos para os tensoativos catiônicos puros, AMB e as misturas de tensoativo / AMB contra <i>Candida</i> spp.	58
Tabela 5 - Valores de CIM obtidos para os tensoativos catiônicos frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilina (MRSA) e <i>S.aureus</i> sensíveis a metilina.	65
Tabela 6 - Valores de energia de afinidade e RMSD dos complexos formados após simulações de docking, organizados a partir da energia de afinidade.....	73
Tabela 7 - Interações do ligante LPAM com os receptores <i>S. aureus</i> gyrase complex with DNA ^a , <i>S. aureus</i> gyrase ^b , Wild-type <i>S. aureus</i> DHFR ^c , Acyl-PBP2a from MRSA ^d e DNA (5'-D (*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') ^e	75
Tabela 8 - Interações do ligante LTAM com os receptores <i>S. aureus</i> gyrase complex with DNA ^a , <i>S. aureus</i> gyrase ^b , Wild-type <i>S. aureus</i> DHFR ^c , Acyl-PBP2a from MRSA ^d e DNA (5'-D (*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') ^e	79
Tabela 9 - Pontuações de bioatividade com diversas classes de alvos biológicos	82
Tabela 10 - Propriedades físicas-químicas aplicadas aos critérios de “druglikeness” da empresa Pfizer, Inc	84
Tabela 11 - Parâmetros farmacocinéticos do conjunto de dados in vitro dos servidores preADMET e pkCSM.....	85
Tabela 12 - Parâmetros farmacocinéticos de volume de distribuição e acesso ao SNC do conjunto de dados in vitro e <i>in vivo</i> dos servidores preADMET e pkCSM	86
Tabela 13 - Parâmetros de metabolismo, excreção e toxicidade (MET) da LPAM e LTAM ..	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
AMB	Anfotericina B
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion Broth</i>
CAMHB	Caldo Mueller Hinton de cátion ajustado
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
COVID-19	Coronavírus 19
CYP	Citocromo P450 oxidase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
E.P.M	Erro Padrão da Média
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
EPS	Substancia Polimérica Extracelular
EROS	Espécies Reativas de Oxigenio
FICI	<i>Fractional Inhibitory Concentration Index</i>
FITC	Fluoresceína
FLC	Fluconazol
GPCR	Receptores Acoplados a Proteína-G
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IND	Indiferente
IP	Iodeto de Propídeo
ITS	<i>International Transcribed Spacer</i>
LGA	<i>Lamarckian Genetic Algorithm</i>
LogBB	Coefficiente de concentração cérebro-sangue
LPAM	Coefficiente de Partição de uma Substancia em Sistema Octanol/ Água
LTAM	Surfactante catiônico à base de fenilalanina-arginina
MDR	Surfactante catiônico à base triptofano-arginina
MEV	<i>Multi Drug Resistance</i>

MM	Microscopia Eletrônica de Varredura
MMFF	Massa Molecular
MOPS	<i>Merck Molecular Force Field</i>
MTT	3-(N-Morpholino)propanesulfonic Acid Brometo de difeniltetrazólio –[3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
PBP	brometo]
PBS	Proteína de Ligação a Penicilina
PCR	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDB	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	<i>Protein Data Bank</i>
PIA	Potencial Hidrogeniônico
PS	Polissacarídeo Intracelular Adesina
PSA	Fosfatidilserina
QS	Área de Superfície Polar
QSAR	<i>Quorum Sensing</i>
RMSD	Relações Quantitativas entre a estrutura e atividade
RPMI	<i>Root Mean Square Deviation</i>
MDCK	Roswell Park Memorial Institute
MRSA	Células renais caninas Madin-Darby
SCIM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
SCCmec	Concentração Inibitória Mínima em Biofilme
SIN	Cassete Estafilocócica Mec do Cromossomo
TSB	Sinergismo
UFC	<i>Trypticase Soy Broth</i>
UTI	Unidades formadoras de colônia
YNB	Unidade de Terapia Intensiva
YPD	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
$\Delta\psi_m$	<i>Yeast Peptone Dextose</i> Potencial Transmembrana Mitocondrial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1 Gênero <i>Candida</i>.....	22
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina	24
2.3 Epidemiologia.....	26
2.3.1 <i>Candida</i> spp.	26
2.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina	27
2.4 Patogênese	28
2.4.1 <i>Candida</i> spp.	28
2.4.2 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina	28
2.5 Biofilme.....	29
2.6 Tratamento.....	30
2.6.1 <i>Candida</i> spp.	30
2.6.1.1 Azólicos	31
2.6.1.2 Poliênicos	32
2.6.1.3 Equinocandinas.....	32
2.6.2 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina	32
2.7 Resistência aos antimicrobianos.....	33
2.7.1 <i>Candida</i> spp.	33
2.7.2 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina	35
2.8 Novas estratégias terapêuticas.....	35
2.9 Surfactante derivado de aminoácidos	36
3 HIPÓTESES.....	39
4 OBJETIVOS	40
5 METODOLOGIA.....	41
5.1 Microorganismos	41
5.2 Produtos.....	42

5.3	Teste de sensibilidade antifúngica.....	42
5.3.1	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos produtos isolados.....	42
5.3.2	Avaliação do sinergismo pela técnica de microdiluição em caldo - checkerboard.....	43
5.3.3	Análise de dados.....	43
5.4	Avaliação da atividade frente a biofilme fúngico	44
5.4.1	Avaliação da atividade dos produtos isolados e associados a anfotericina B em biofilme formado de <i>Candida</i> spp.	44
5.5	Ensaio de citometria de fluxo.....	45
5.5.1	Preparo de suspensões de células de <i>Candida</i> spp.	45
5.5.2	Tratamento de células de <i>Candida</i> spp.	45
5.5.3	Determinação da viabilidade celular em células de <i>Candida</i> spp.....	45
5.5.4	Determinação do potencial transmembranico ($\Delta\psi_m$) em células de <i>Candida</i> spp.....	45
5.5.5	Detecção de Espécies Reativas de Oxigenio (EROS) em células de <i>Candida</i> spp.	46
5.5.6	Determinação da externalização de fosfatidilserina em células de <i>Candida</i> spp.....	46
5.5.7	Análise de dados.....	46
5.6	Avaliação citotoxicidade.....	46
5.6.1	Ensaio do cometa	46
5.6.1.1	Análise de dados.....	47
5.6.2	Inibição da proliferação de células L929 usando o teste MTT.....	47
5.7	Avaliação da atividade antibacteriana frente a cepas de <i>S. aureus</i> resistentes a meticilina (MRSA).....	48
5.7.1	Teste de sensibilidade antibacteriana	48
5.7.1.1	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos produtos isolados.....	48
5.7.1.2	Microscopia eletrônica de varredura em células planctônicas.....	49
5.8	Avaliação da atividade frente a biofilme bacteriano	50
5.8.1	Avaliação da atividade em biofilme formado de MRSA.....	50
5.8.2	Análise de dados.....	50
5.9	Citometria de fluxo.....	51
5.9.1	Preparo e tratamento de suspensões de células de MRSA.....	51
5.9.2	Avaliação da integridade de membrana	51

5.9.3 Avaliação do dano ao DNA.....	51
5.10 Docagem molecular	52
5.10.1 Procedimentos computacionais	52
5.10.1.1 Códigos usados.....	52
5.10.1.2 Design e otimização dos ligantes.....	52
5.10.1.3 Procedimentos gerais de docagem molecular	52
5.11 ADMET	54
5.11.1 Triagem Virtual de Bioatividade com Classes de Alvos	54
5.11.2 Caracterização da Lipossolubilidade.....	54
5.11.3 Validação da Semelhança com Medicamentos (Druglikeness).....	55
5.11.4 Previsão da Farmacocinética Pelos Modelos de ADMET.....	55
6 RESULTADOS	57
6.1 Atividade antifúngica dos produtos LPAM e LTAM frente a cepas planctônicas de <i>Candida</i> spp. resistencias ao Fluconazol.....	57
6.1.1 Avaliação da atividade dos produtos LPAM e LTAM combinados a anfotericina B frente a cepas de <i>Candida</i> spp. resistencias ao Fluconazol.....	57
6.2 Atividade dos produtos LPAM e LTAM frente a biofilme de <i>Candida</i> spp.....	59
6.2.1 Avaliação da atividade dos produtos LPAM e LTAM combinados a Anfotericina B frente a biofilme de <i>Candida</i> spp.	59
6.3 Avaliação do tipo de morte celular em <i>Candida</i> spp. após exposição aos produtos LPAM e LTAM	59
6.3.1 Redução da viabilidade celular de <i>Candida</i> spp. após exposição aos produtos LPAM e LTAM	59
6.3.2 Despolarização mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em células de <i>Candida</i> sp. causadas após exposição aos produtos LPAM e LTAM.....	60
6.3.3 Produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROS) em células de <i>Candida</i> sp. causadas após exposição aos produtos LPAM e LTAM	61
6.3.4 Externalização de fosfatidilserina (PS) em células de <i>Candida</i> sp. causadas após exposição aos produtos LPAM e LTAM.....	62
6.3.5 Avaliação de danos ao DNA em células de <i>Candida</i> spp. causadas após exposição aos produtos LPAM e LTAM	63

6.4 Avaliação da citotoxicidade dos produtos LPAM e LTAM frente a células L929	64
6.5 Atividade antibacteriana dos produtos LPAM e LTAM frente a cepas planctônicas de <i>S. aureus</i> resistentes a metilina (MRSA).....	64
6.5.1 Avaliação de cepas planctônicas de <i>S. aureus</i> resistentes a metilina (MRSA) tratados com os produtos LPAM e LTAM por MEV	66
6.6 Biofilme.....	59
6.7 Avaliação preliminar do mecanismo envolvido na ação antibacteriana dos produtos LPAM e LTAM contra uma cepa de MRSA	60
6.7.1 Integridade de membrana.....	60
6.7.2 Análise de fragmentação de DNA	60
6.8 Docagem molecular	73
6.9 ADMET	82
6.9.1 Lipofilicidade e solubilidade	82
6.9.2 Características de <i>druglikeness</i>	84
6.9.3 Avaliação dos Parâmetros Farmacocinéticos.....	85
6.9.4 Metabolismo, excreção e toxicidade.....	86
7 DISCUSSÃO	86
8 CONCLUSÃO.....	100
REFERÊNCIAS.....	101
ANEXOS.....	115

1 INTRODUÇÃO

Fungos do gênero *Candida*, bem como bactérias *S. aureus* fazem parte da microbiota humana e se tornam patogênicos quando ocorre uma queda no sistema imune do hospedeiro, podendo causar infecções superficiais ou sistêmicas. Nos últimos anos, associado ao aumento de indivíduos imunocomprometidos, como pacientes com câncer, transplantados, infectados com HIV e crescimento da população idosa, houve um incremento na prevalência de infecções oportunistas causadas por esses microorganismos (LEE *et al.*, 2021; PATERNINA-DE LA OSSA *et al.*, 2018)

Infecções fúngicas afetam cerca de 80 % da população mundial e anualmente, gênero *Candida* causa cerca de 400.000 infecções sanguíneas, com taxa de mortalidade excedendo 40 % (BROWN *et al.*, 2012). *Candida albicans* continua sendo a espécie mais encontrada, porém nas últimas décadas houve um aumento na incidência de espécies não-*albicans*, como: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* (DU *et al.*, 2020). De acordo com o programa de vigilância antimicrobiana, SENTRY, no período de 1997- 2016, um total de 20 788 isolados de *Candida* spp. coletados na América do Norte, Europa, América Latina e Ásia, 46,9% foram *C. albicans*, 18,7 % *C. glabrata* 15,9 % , *C. parapsilosis* e 9,3 % *C. tropicalis*, sendo encontrado também outras espécies de *Candida* (PFALLER *et al.*, 2019).

Staphylococcus aureus é uma bactéria comensal, presente em cerca de 30% da população mundial e um dos principais patógenos humanos, com uma elevada taxa de mortalidade, em virtude de sua elevada capacidade de desenvolver resistência a vários medicamentos (PATERNINA-DE LA OSSA *et al.*, 2018). A detecção do gene *mecA* e resistência a cefaloxina caracteriza cepas de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA), que estão associados a infecções hospitalares com taxa de mortalidade de 20%, caracterizando um sério problema de saúde pública com elevados custos hospitalares (CAVALCANTE *et al.*, 2017). De acordo com o SENTRY, no período de 1997 a 2016, de um total de 191.460 isolados de *S. aureus* coletados na América do Norte, Europa, América Latina e Ásia,, 77.146 (40,3 %) foram MRSA (DIEKEMA *et al.*, 2019).

Com relação a infecções por *Candida* sp em hospitais no Brasil, atualmente, o fluconazol é uma das principais drogas de escolha para o tratamento de candidemia, por conta de estar relacionado a poucos efeitos colaterais e a um baixo custo (OLIVEIRA *et al.*, 2014; PAUL *et al.*, 2020). Em relação ao tratamento de infecções por MRSA é principalmente dado seguimento com a utilização de glicopeptídeos, como vancomicina. Porém, nos últimos anos

tem se relatado um aumento na incidência de cepas resistentes ao tratamento convencional (HASSOUN; LINDEN; FRIEDMAN, 2017).

A problemática envolvida com a incidência dessas infecções está associada ao fato de que fungos do gênero *Candida*, bem como *S. aureus* resistente a meticilina são capazes de desenvolver mecanismos de resistência contra os principais antimicrobianos utilizados na prática clínica, além de formar biofilme, cuja estrutura confere proteção contra antimicrobianos e sistema imunológico do hospedeiro (LEE *et al.*, 2021; ROSSATO *et al.*, 2020).

Diante do exposto, faz-se necessária a busca por novas opções terapêuticas com atividade frente a esses patógenos, alcançando assim sucesso terapêutico, reduzindo a taxa de mortalidade e os custos hospitalares.

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse pelo estudo de surfactantes, cujas moléculas são capazes de modificar interações interfaciais, tendo muitas aplicações na indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética e têxtil. O estudo de surfactantes catiônicos derivados de aminoácidos representa a busca por moléculas com atividades antimicrobianas e com baixo custo e baixo impacto ambiental (PINAZO *et al.*, 2016).

Sob o contexto da prospecção de moléculas que atuem nas membranas celulares, nesse estudo foram utilizadas duas moléculas, LPAM e LTAM, quimicamente sintetizadas pela Profa. Dra. Lourdes Perez, do *Consejo Superior de Investigaciones Científicas* (CSIC), tendo como objetivo avaliar sua atividade antimicrobiana frente a cepas planctônicas e em biofilme formado de *Candida* spp resistente ao fluconazol e *S. aureus* resistente a meticilina, avaliando também o possível mecanismo de ação desses compostos utilizando técnicas de citometria de fluxo. Técnicas de docagem molecular foram aplicadas para avaliar o potencial desses compostos frente a cepas de *S. aureus* resistente a meticilina e para avaliar o potencial no desenvolvimento de novos fármacos foram utilizadas técnicas ADMET.

2 REVISÃO DE LITERATURA

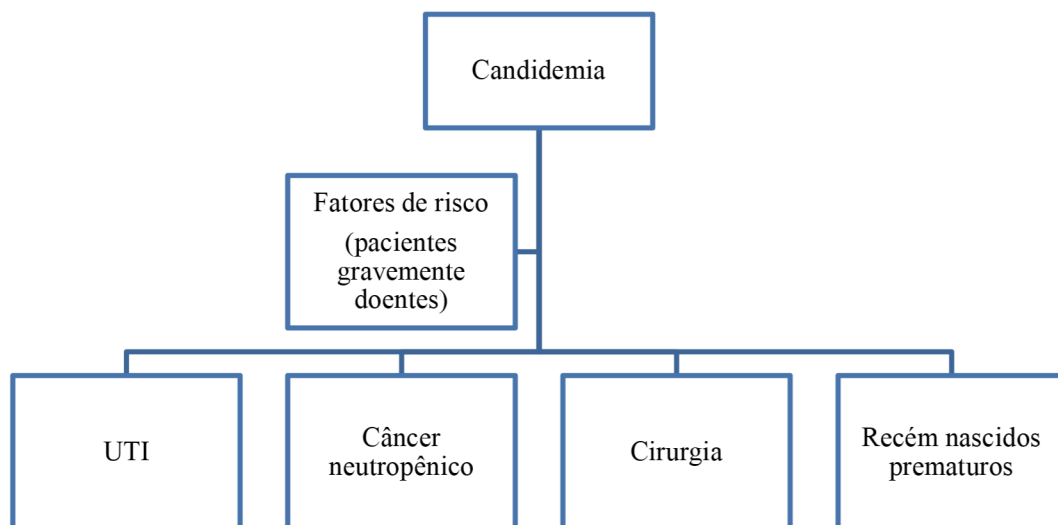
2.1 Gênero *Candida*

A descoberta de fungos do gênero *Candida* se deu em 1839 por Langenbeck ao observar *Candida albicans* em aftas bucais em paciente com tifo. Esses fungos pertencem ao filo Ascomycota, são leveduras pleomorficas, possuindo a capacidade de assumir diferentes morfologias como blastoconídeos e pseudo-hifas ou hifas verdadeiras. Fungos do gênero *Candida* fazem parte da microbiota humana e podem ser isoladas em diversos sítios anatômicos. Na boca, por exemplo, cerca de 20 a 50% dos dentes saudáveis são colonizados por *Candida* spp. podendo ser encontrados também na pele, mucosas do trato gastrointestinal, geniturinário, e vaginal de indivíduos imunocompetentes. No entanto, esses fungos são oportunistas podendo assim se tornar virulentos quando as defesas imunológicas do hospedeiro estão comprometidas (BRUNKE *et al.*, 2016; ZOMORODIAN *et al.*, 2011).

Esses microorganismos podem causar infecções nosocomiais na corrente sanguínea e até o ano 2000, *Candida* spp. era o quarto patógeno mais comum nos Estados Unidos e na Europa, com a taxa infecção de 0,20-0,38 casos por 1000 admissões hospitalares (MESINI *et al.*, 2020). Apesar de *Candida albicans* ter a maior incidência nos casos (54%), tem-se relatado na última década um aumento no isolamento de *Candida* não-*albicans* como *C.tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (MESINI *et al.*, 2020)(SHAHABUDIN; AZMI, 2020). Além dessas, uma nova espécie foi identificada pela primeira vez no Japão, em 2009, e seus casos tem aumentado nos últimos anos, *Candida auris* tem chamado atenção pela sua resistência aos principais antifúngicos disponíveis: azólicos, equinocandinas e polienicos (SATOH *et al.*, 2009).

As espécies de *Candida* podem causar infecções localizadas, a exemplo da candidíase orofaríngea, vulvovaginite, ou sistêmica, podendo causar uma candidemia, afetando principalmente pacientes em estado grave necessitados de cuidados intensivos. Essa condição é um sério problema de saúde pública, tendo impactos elevados tanto em relação aos cuidados da saúde quanto às altas taxas de mortalidade associadas a esse fator (PFALLER; CASTANHEIRA, 2016).

Figura 1 - Fatores de risco para candidemia



Adaptado de Nucci, 2011

Em estudo realizado por DA SILVA e colaboradores (2019), foi avaliado no período de Janeiro de 2015 a Julho de 2016, em um hospital do Nordeste do Brasil, os fatores de risco para incidência de candidemia em pacientes da UTI, identificando como os principais: uso de cateter

venoso central, ventilação mecânica e tubo nasointestinal. Esse estudo avaliou 1573 admissões, das quais 67 foram positivas para candidemia.

Diante da pandemia causada pelo COVID-19, muitos pacientes com essa patologia internados em UTI se encontram expostos a muitos fatores de risco à candidemia, como antibióticos, corticosteroides, cateteres venosos e diálise (RICHARDSON *et al.*, 2020). Nesse contexto, um estudo realizado por NUCCI e colaboradores (2021) num hospital terciário da cidade do Rio de Janeiro, avaliou em dois períodos a incidência de candidemia: de Janeiro de 2019 a Fevereiro de 2020 (sem COVID-19) e Março a Setembro de 2020 (com COVID-19), relatando um aumento no número de casos de candidemia coincidindo com o início da admissão de pacientes com COVID-19, com 9 dos 25 casos de candidemia ocorrendo em pacientes com COVID-19. Demonstrou-se também que no segundo período avaliado houve uma incidência de candidemia de 7,44 por 1000 admissões enquanto no primeiro período houve 1,54 por 1000 admissões.

2.2 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

A descoberta da bactéria *Staphylococcus aureus* é relatada em 1880, pelo cirurgião Alexander Ogston, na Escócia, ao investigar pacientes com úlceras. Essa bactéria pertence ao gênero *Staphylococcus*. Na coloração de Gram é revelada como gram positivo, medindo cerca de 0,8 µm de diâmetro, organizado em “cordão de uvas” quando visto no microscópio (EDWARDS; MASSEY, 2011; GARDETE; TOMASZ, 2014).

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) são patógenos humanos responsáveis por doenças infecciosas graves como: intoxicação alimentar, endocardite, osteomielite, bacteremia, pneumonia letal, infecções de pele e tecidos moles. Essas bactérias podem ser classificadas como *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (ANDRADE *et al.*, 2020).

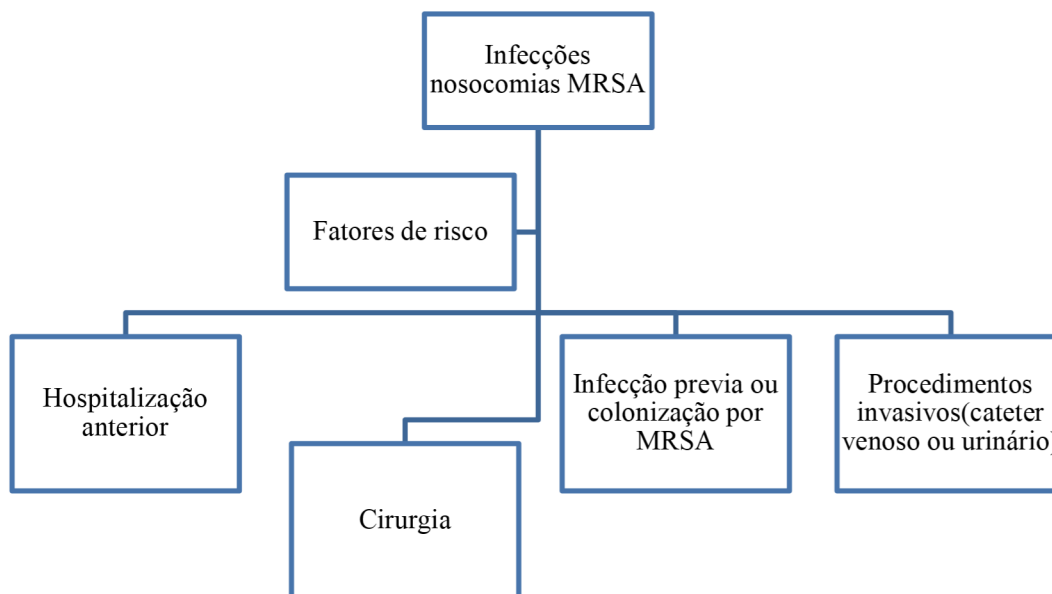
Dois anos após advento da penicilina (1940), o primeiro antibiótico utilizado na prática clínica, relatou-se a incidência de bactérias produtoras de beta-lactamase, indicando assim a resistência ao antibiótico pelo *S. aureus*, dificultando o tratamento (GUO *et al.*, 2020). Em 1961, a meticilina começou a ser usada para cepas resistentes a penicilina, porém logo foi detectada a resistência de cepas à meticilina, e clinicamente essa resistência foi identificada pela detecção do gene *mecA* e resistência a cefoxitina. O gene *mecA* codifica proteínas de ligação a penicilina (PBP-2A), que estão associadas à diminuição da afinidade com a maioria das penicilinas semissintéticas responsável por este tipo de resistência bacteriana (ALGAMMAL *et al.*, 2020).

Este gene é transportado em um elemento genético móvel (MGE) denominado Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec), estando assim relacionado o surgimento de cepas resistentes a meticilina à aquisição e inserção desses genes nos cromossomos das cepas sensíveis. (LAKHUNDI; ZHANG, 2018).

Esses microorganismos estão associados a uma importante causa de infecções nosocomiais, com taxa de mortalidade de aproximadamente 20 %. Pacientes colonizados com MRSA atuam como transmissores silenciosos, e por esse motivo a triagem de pacientes e identificação de fatores de risco para infecção por MRSA se faz importante na sua admissão de pacientes nos hospitais, reduzindo assim as taxas de infecção e os custos hospitalares (CAVALCANTE *et al.*, 2017). Na figura 2 está exposto alguns fatores de risco para infecções por MRSA.

Um estudo realizado por PATERNINA-DE LA OSSA e colaboradores (2018) avaliou pacientes admitidos no hospital universitário no Brasil, no período de janeiro de 2012 a dezembro de 2016, identificando 279 casos de infecções por *S. aureus*. Considerou os seguintes fatores de risco para infecções nosocomiais por MRSA: hospitalização anterior, cirurgia, uso de cateteres ou outros dispositivos invasivos, infecção prévia ou colonização por MRSA.

Figura 2 - Fatores de risco para infecções por MRSA



2.3 Epidemiologia

2.3.1 *Candida* spp.

A epidemiologia de espécies de *Candida* está relacionada a fatores como, por exemplo, idade do paciente. Nos últimos anos, tem-se relatado que avanço na assistência médica e cirúrgica afeta a epidemiologia de candidemias (POISSY *et al.*, 2020).

Um estudo realizado por Mesini e colaboradores (2020) avaliou a incidência de candidemia em um hospital escola na cidade de Gênova na Itália, no período de Janeiro de 2012 a Dezembro de 2016. Neste período foi relatado um aumento na incidência de candidemia na região e as principais espécies de *Candida* isoladas foram: *C. albicans* (47,4 %), *C. parapsilosis* (31,5 %), *C. glabrata* (8,5 %) e *C. parapsilosis* (6,4 %), e outras espécies (6,2 %). Demonstrando assim o aumento na incidência de *C. não albicans* na região.

Um estudo realizado Yabunaka e colaboradores (2021) avaliou a incidência de casos de candidemia no período de 2014 a 2018, num hospital escola na cidade de São Paulo, sendo documentados 27 casos, dos quais pode-se avaliar 23 casos. A taxa de incidência de candidemia foi de 0,88/1000 admissões. As espécies isoladas foram *Candida albicans* (85,2 %), e, dentre as *C. não-albicans*: *Candida tropicalis* (7,4 %), *Candida parapsilosis* (3,7 %) e *Candida* spp. (3,7 %).

Da Silva e colaboradores (2019) realizaram um estudo em 2019, analisando o período de Janeiro de 2015 a Julho de 2016, em um hospital do Nordeste do Brasil, em que foi avaliada incidência de espécies *Candida* nos pacientes assistidos na região. Houve 60 casos de candidemia documentados, dos quais *Candida* não-*albicans* foi responsável por 36 casos (60 %) e *Candida albicans* por 23 casos (38,4 %), em um caso foi identificado a presença de mais de uma espécie.

Em relação a nova cepa *Candida auris*, os primeiros dois casos no Brasil foram relatados em dezembro de 2020. Os pacientes colonizados por *C. auris* estavam na mesma unidade de terapia intensiva de COVID-19 na cidade de Salvador (DE ALMEIDA *et al.*, 2021).

2.3.2 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

Nos últimos anos, houve o aumento da incidência de cepas de MRSA na comunidade e não mais apenas em ambientes hospitalar, não sendo mais assim um patógeno nosocomial. Em 1980 relatou-se a primeira vez a incidência dessa cepa de MRSA associado à comunidade (CA-MRSA). Essas cepas são geneticamente diferentes da MRSA associado a hospitais (HA-MRSA) e são resistentes a menos antibióticos não beta-lactâmicos, possuindo uma versão menor de SCCmec e produzindo uma citotoxina chamada leucocidina Panton-Valentine (PVL) (LAKHUNDI; ZHANG, 2018).

Em 1987, no Rio de Janeiro foi reportado o primeiro isolado de MRSA no Brasil, e a partir deste ano o clone epidêmico brasileiro (BEC) e outros clones pandêmicos se tornaram epidêmicos no Brasil. Esses clones tem a capacidade de transferir genes relacionados a resistência a múltiplas drogas, contribuindo assim para o surgimentos de cepas de MRSA mais resistentes e patogênicas (ANDRADE *et al.*, 2020).

Um estudo realizado por Rana e colaboradores (2021), analisou a frequência de infecções adquiridas na UTI em pacientes com COVID-19 no período de maio de 2020 a abril de 2021, em dois hospitais terciários referencia para casos de COVID 19 em Lahore. Neste estudo foi calculada a frequência de infecções por 1000 dias na UTI em 90 pacientes, sendo isolado 4 (22,22 %) casos de MRSA no período em análise. A incidência de MRSA em pacientes na UTI é causa de complicação no tratamento e sabe-se que infecções do trato respiratório superior causadas por MRSA é responsável pelo aumento no nível de mortalidade em pacientes em UTI.

2.4 Patogênese

2.4.1 *Candida* spp.

Candida spp. é um fungo pleomórfico que existe na microbiota normal de seres humanos e animais, e pode se tornar oportunista, quando há um comprometimento no sistema imunológico do hospedeiro, podendo provocar infecções letais. Geralmente, essas infecções são causadas por cepas endógenas, que vivem comensalmente no organismo. Porém, contaminação exógena pode ocorrer através de profissionais da saúde em hospitais ou mesmo por dispositivos médicos contaminados, por exemplo. Esse microorganismo pode causar infecções na mucosa de indivíduos saudáveis e infecções sistêmicas especialmente em pacientes imunossuprimidos (MBA; NWEZE, 2020; SIDRIM; ROCHA, 2004).

A patogênese é um processo que envolve características do hospedeiro e da cepa. A infecção se estabelece com a invasão do patógeno, sua multiplicação e sobrevivência ao sistema imunológico do hospedeiro, podendo alcançar a corrente sanguínea e se estabelecer em diferentes órgãos do corpo (MBA; NWEZE, 2020; SIDRIM; ROCHA, 2004).

A patogênese do gênero *Candida* é um processo que envolve muitos mecanismos relacionados ao hospedeiro e ao microorganismo. Infecções de pele e mucosas estão relacionadas a mudanças na hidratação, pH, concentração de nutrientes, etc. Enquanto as infecções sistêmicas estão reacionadas a uma imunossupressão ou redução da microbiota normal de pacientes internados em unidades de terapia intensiva ou expostos a antibióticos de amplo espectro (MBA; NWEZE, 2020; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Em relação ao gênero *Candida* as seguintes características estão relacionadas ao seu poder patogênico: capacidade de crescer a 37 °C; formação de estruturas filamentosas, como hifas e pseudo-hifa, representando dificuldade a fagocitose, que corresponde ao principal meio de defesa do organismo; produção de metabólitos. Em infecções graves são encontrados elevada quantidade de leveduras; produção de enzimas como lipase e proteinase; variação fenotípica, formação de biofilme, resistência antifúngica. Esses fatores podem promover uma imunossupressão com consequente desenvolvimento de uma infecção e evolução crônica (SIDRIM; ROCHA, 2004)(MBA; NWEZE, 2020).

Nesta tese serão destacadas a capacidade de formação de biofilme, bem como a resistência antifúngica de cepas de *Candida* spp.

2.4.2 *Staphylococcus aureus* resistente a metilina

S. aureus é um microorganismo comensal e um patógeno oportunista, podendo colonizar o hospedeiro sem prejudicá-lo, porém pode romper suas defesas e invadir tecidos e órgãos profundos, causando infecções superficiais ou profundas, em ambientes comunitários ou hospitalares (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2017).

Este microorganismo é um patógeno intracelular, o que contribui para persistência bacteriana, proteção contra antibióticos e evasão das defesas imunológicas. A invasão e sobrevivência deste microorganismo no hospedeiro esta relacionada aos seus fatores de virulência, como: secreção de produtos gênicos envolvidos na motilidade, adesão, secreção de toxina e evasão de defesa do hospedeiro (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2017).

São capazes de aderir às células do hospedeiro ou à matriz extracelular, fator determinante na formação de biofilmes, produzem moléculas de fibrinogênio, fibronectina, colágeno e da enzima coagulase. Em relação a capacidade de evasão da defesa do hospedeiro, produzem toxinas esfoliativas, a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST) e os polissacarídeos capsulares, os fatores relacionados com a invasão na célula do hospedeiro e a penetração nos tecidos, como hemolisinas (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2017).

2.5 Biofilme

Os cuidados de saúde foram revolucionados pelo uso de dispositivos médicos como cateteres implantados, válvulas cardíacas, marcapassos cardíacos, lentes de contato. Contudo, somado a isso, detectou-se a capacidade de alguns microrganismos aderirem nestes dispositivos formando estruturas chamadas biofilme, aumentando a taxa de morbidade e mortalidade dos pacientes. Isto por que infecções associadas a biofilme são mais complexas e com tratamento mais difícil, visto que os microorganismos agrupados na forma de biofilme produzem uma estrutura chamada matriz, formada por um material polimérico aderente extracelular, conferindo aos microorganismos características fenotípicas associadas à presença no biofilme e proteção. Essas características tornam os microorganismos mais resistentes aos agentes antimicrobianos e à resposta imune do hospedeiro do que microorganismos planctônicos (NETT; ANDES, 2020).

A formação de biofilme em cepas tanto do gênero *Candida* quanto de MRSA é um processo multifatorial. Inicialmente, ocorre adesão das células a superfície, para posterior formação de colônias, onde haverá a produção e secreção da substância polimérica extracelular (EPS). Esses componentes irão permitir a maturação da matriz extracelular tridimensional. Quando o biofilme está formado ocorre o destacamento e disseminação de cepas do biofilme

que formarão novos biofilmes. Todas as fases de formação do biofilme são reguladas pelo sistema de comunicação célula a célula, *quorum sensing* (QS) (CASCIOFERRO *et al.*, 2021; CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018).

Em relação à formação de biofilme de *Candida* spp., a adesão que é a primeira fase para formação do biofilme é um processo mediado por adesinas, proteínas da parede celular que se ligam a células epiteliais ou superfícies abióticas. Após a adesão ocorre o aumento no número de células e a produção de EPS. Vale ressaltar que cada espécie de *Candida* terá diferenças na composição do biofilme, por exemplo, *C. albicans* forma uma densa estrutura de leveduras e células filamentosas, enquanto *C. parapsilosis* forma uma estrutura compacta de leveduras e pseudo-hifas, produzindo uma matriz extracelular menor. Em relação a *C. tropicalis* observa-se um agregado de leveduras, raramente com a presença de hifas, sendo mais resistentes ao desprendimento do que biofilme de *C. albicans* (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018).

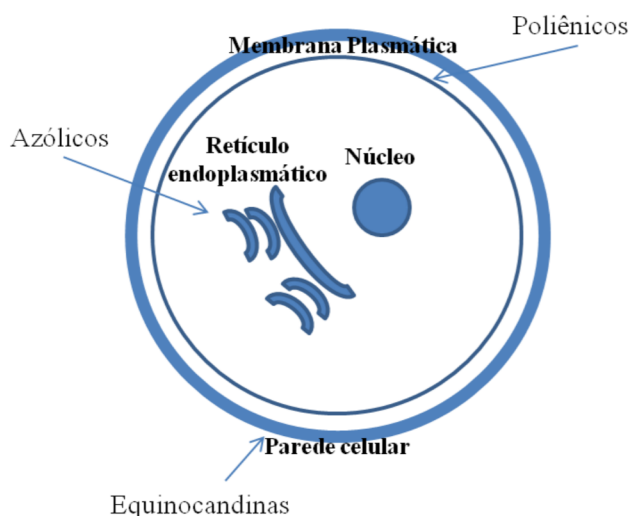
A primeira fase para formação de biofilmes de MRSA, é mediado por componentes de superfície que reconhecem moléculas adesivas (MSCRAMMs). Após adesão, ocorre a secreção de EPS, como proteínas extracelulares, DNA extracelular, lipídios, polissacarídeos e e consequente produção da matriz extracelular composta especialmente pelo polissacarídeo intracelular adesina (PIA) (SILVA *et al.*, 2021); (CASCIOFERRO *et al.*, 2021).

2.6 Tratamento

2.6.1 *Candida* spp.

O arsenal antifúngico para o tratamento de infecções causadas por *Candida* spp. é bastante limitado, incluindo medicamentos com estreito espectro de atividade e graves efeitos colaterais. Atualmente, as seguintes classes estão disponíveis para o tratamento dessas infecções: azólicos, polienicos, equinocandinas (figura 3).

Figura 3 - Mecanismo de ação principais antifúngicos



Adaptado de HOEHAMER *et al.*, 2010

2.6.1.1 Azólicos

Os azólicos correspondem à classe que antifúngicos com mais drogas disponíveis. Seu mecanismo de ação esta relacionado a capacidade de romper a membrana celular e se ligar ao grupo heme no sítio ativo da enzima lanosterol 14 α - desmetilase do citocromo P450 (*Erg11p*), enzima envolvida na biossíntese do ergostero ergosterol, o maior componente esterol da membrana fungica, análogo ao colesterol das células animais, causando também o acúmulo de esterol tóxico, que também inibe o crescimento fúngico (HOEHAMER *et al.*, 2010; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

Classe dos azólicos é formada por imidazóis (miconazol, econazol, clotrimazol e cetoconazol) e triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol), sendo os azois caracterizados pela presença de um anel imidazólico em sua estrutura molecular, com três átomos de carbono e dois de nitrogênio, enquanto os triazóis possuem em seu anel azol dois átomos de carbono e três de nitrogênio (MAERTENS, 2004).

O fluconazol é uma das principais drogas de escolha nos hospitais brasileiros para o tratamento de candidemia em virtude de seus poucos efeitos colaterais e baixo custo (OLIVEIRA *et al.*, 2014; PAUL *et al.*, 2020).

2.6.1.2 Poliênicos

Os poliênicos atuam na membrana fúngica e se ligam ao ergosterol, abrindo canais através da bicamada lipídica e consequente perda de eletrólitos, aminoácidos e outras substâncias importantes do citoplasma, além de possuírem também efeito pró-oxidante, causando dano oxidativo e consequente morte do microorganismo (HOEHAMER *et al.*, 2010; MEI *et al.*, 2020).

Essa classe é representada principalmente pela nistatina e pela anfotericina B, que possui o uso limitado, estando relacionada a efeitos adversos como: nefrotoxicidade, insuficiência renal e toxicidade relacionada a infusão (MCCARTHY; O'SHAUGHNESSY; WALSH, 2017)

2.6.1.3 Equinocandinas

Equinocandinas são representadas pela caspofungina, anidulafungina e micafungina, hexapeptídeos cíclicos acilados que atuam inibindo não competitivamente a β (1,3) – glucana sintase, enzima fundamental na síntese de parede celular fúngica. Dessa forma não há a formação de glucanos na parede e consequente morte celular (HOEHAMER *et al.*, 2010).

O uso da caspofungina é limitado na prática clínica, por ser mal absorvida por via oral e a administração por via intravenosa caracteriza um custo elevado e pode provocar reações adversas como: febre, tromboflebite e toxicidade (MEI *et al.*, 2020).

2.6.2 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

O tratamento da bacteremia causada por MRSA é realizado utilizando vancomicina e daptomicina. Sendo a vancomicina um glicopeptídeo, que atua inibindo a síntese da parede celular e a daptomicina um lipopeptídico cíclico, que atua na membrana celular de bactérias, causando despolarização e consequente morte. Porém, existem limitações no tratamento com tais drogas, por exemplo, a vancomicina possui baixa penetração nos tecidos, atividade bactericida lenta e relatos de aumento na resistência e falha terapêutica. Em relação à daptomicina, a resistência vancomicina em tratamento inicial pode-se estimular a resistência a daptomicina em tratamento seguinte, além de sua administração ser apenas intravenosa e impossibilidade de uso em pneumonia, pelo fato de ser inativada pelo surfactante pulmonar (HASSOUN; LINDEN; FRIEDMAN, 2017).

O tratamento de bacteremias causadas por MRSA deve ser inicialmente empírico, porém sua continuidade deve ser ajustada através de teste de sensibilidade a antibacterianos e repetição de culturas para confirmação de sucesso terapêutico.

2.7 Resistência aos antimicrobianos

2.7.1 *Candida* spp.

A resistência fúngica pode ser caracterizada como resistência microbiológica ou resistência *in vitro*, resistência clínica ou resistência *in vivo*. A resistência microbiológica diz respeito a não sensibilidade de um fungo a um agente antifúngico, podendo ser intrínseca, quando o fungo é previamente resistente à droga a exemplo de *C. krusei* (intrinsecamente resistente ao fluconazol) e *C. auris* (possui elevados CIMs para azóis, equinocandinas e polienos); ou adquirida quando é desenvolvida após exposição à droga, estando envolvidas nessa resistência as cepas MDR (*multi drug resistance*). Enquanto a resistência clínica está relacionada à falha no tratamento determinado após teste de sensibilidade, tendo atividade *in vitro* frente ao microorganismo (ARENDRUP; PATTERSON, 2017).

De modo geral, alguns fatores expostos na tabela 1 estão relacionados à resistência aos antifúngicos. Na tabela 2 está exposto os principais mecanismos de resistência relacionados aos antifúngicos.

Um mecanismo de resistência diz respeito a mutações nos genes que codificam as bombas de efluxo, ocorrendo assim a diminuição do acúmulo de antifúngicos na célula, visto que as bombas de efluxo compõem a membrana de todos os organismos vivos, sendo responsáveis por expulsar componentes das células (LEE *et al.*, 2021).

O fungo pode desenvolver uma diminuição na afinidade da droga pelo alvo, através de mutação ou superexpressão de gene responsável pela codificação da enzima-alvo. O gene *ERG11* codifica a lanosterol 14 –desmetilase e quando sofre mutação ocorre a diminuição da capacidade de ligação do azol com o alvo. Em polienicos, o mecanismo de resistência esta está relacionado a mutação no gene *ERG 2, 3, 6 e 11*, causando a diminuição dos níveis de ergosterol. Em equinocandinas, a mutação no gene *FKS1* e *FKS2* promove a mudança no alvo, impedindo a ligação desse fármaco (LEE *et al.*, 2021).

O efeito paradoxal está relacionado com modificações no metabolismo de contrabalanço de drogas e ocorre quando células fúngicas são capazes de crescer em concentrações muito superiores ao CIM da droga. Algumas cepas de *C. auris* apresentam menor sensibilidade a caspofungina em elevadas concentrações da CIM, estudos mostram que essas cepas possuem mutações no gene *FKS1*, conferindo resistência as equinocandinas (KORDALEWSKA *et al.*, 2018; VANSTRAELEN *et al.*, 2013).

Tabela 1 - Fatores relacionados à resistência aos antifúngicos

Relacionado ao fungo	Relacionado ao hospedeiro	Relacionado a droga
<ul style="list-style-type: none"> • Redução do acúmulo de droga dentro da célula fungica • Diminuição da afinidade da droga com seu alvo • Modificação do metabolismo de contrabalanço no efeito da droga • Produção de biofilme 	<ul style="list-style-type: none"> • Imunossupressão • Sítio de infecção • Severidade da infecção • Início do tratamento 	<ul style="list-style-type: none"> • Natureza fungistática • Dosagem • Farmacocinética • Interação com outras drogas

Adaptado de (A.GANAVALLI, 2018)

A formação de biofilme garante ao fungo maior proteção contra os agentes antifúngicos, visto que no biofilme há uma expressão aumentada de bombas de efluxo, sequestro de drogas na matriz extracelular e modificação da composição da membrana plasmática (LEE *et al.*, 2021).

Tabela 2 - Mecanismos de resistência associado aos principais antifúngicos

	Classe		
	Azólicos	Poliênicos	Equinocandina
Mecanismo de resistência	Mutação gene <i>ERG 11</i> , super expressão de bombas de efluxo	Mutação no gene <i>ERG 2, 3, 6 e 11</i> . Diminuição de ergosterol	Mutação no gene <i>FKS1</i> e <i>FKS2</i> . Diminuição ligação

Adaptado de (ARENDRUP; PATTERSON, 2017)

2.7.2 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

A evolução da resistência aos antibióticos em MRSA está relacionado ao uso inadequado e generalizado de antibióticos, uso de antibióticos como estimuladores de crescimento em animais e facilidade com que MRSA pode cruzar barreiras geográficas por viagens internacionais (WATKINS; HOLUBAR; DAVID, 2019).

A resistência de *S. aureus* à meticilina está relacionada à aquisição de genes conhecidos por *mecA* ou *mecC*, que se localizam no elemento genético móvel chamado cassete estafilocócica *mec* do cromossomo (*SCCmec*), codificando uma proteína de ligação à penicilina alterada (PBP2a ou PBP2'), com baixa afinidade a maioria dos beta-lactâmicos inclusive, penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos. Existem treze tipo de *SCCmec* (*SCCmec I-XIII*), dependendo da estrutura e genética (ROSSATO *et al.*, 2020).

Na tabela 3 estão expostos os mecanismos de resistência associados aos principais antibióticos utilizados no tratamento de infecções por *S. aureus*.

Tabela 3 - Alguns mecanismos moleculares relacionados à resistência em *S. aureus*

	Classe		
	Aminoglicosídeo	Macrolídeo	Tetraciclina
Mecanismo de resistência	Inativação enzimática pela modificação da enzima aminoglicosídeo (AMEs)	Alterações no sitio alvo do ribossoma (<i>ermA</i> , <i>ermB</i> e <i>ermC</i>) Bomba de efluxo	Proteção ribossomal (tetM) Bomba de efluxo

Adaptado de WATKINS; HOLUBAR; DAVID, 2019

2.8 Novas estratégias terapêuticas

Nos últimos anos houve um aumento na incidência infecções associadas à produção de biofilme e à isolados multiresistentes, representando um aumento na morbidade e mortalidade, visto que o tratamento dessas infecções é mais complexo. De acordo com o CDC, 1,7 milhão de infecções hospitalares ocorrem anualmente, com total de 99.000 mortes e elevado custo para a saúde (FALK, 2019).

Nesse contexto, faz-se necessária a busca de novas opções visando o sucesso terapêutico, surgindo assim o interesse pelo estudo dos surfactantes, que correspondem a moléculas com características capazes de modificar as interações interfaciais, ou seja, possuem em sua estrutura um grupo com alta afinidade e outro com baixa afinidade pelo solvente. Essa característica faz com que essas moléculas possuam diversas aplicações na indústria farmacêutica, alimentícia, cosmética e têxtil. As principais classes de surfactantes são: catiônicos, aniônicos, anfotéricos e não iônicos.

- ◆ Não iônico: não formam íons em solução aquosa.
- ◆ Aniônicos: ionizam-se em solução aquosa, formando íons carregados negativamente.
- ◆ Catiônicos: ionizam-se em solução aquosa, formando íons carregados positivamente.
- ◆ Anfotéricos: ionizam-se em solução aquosa, formando íons carregados negativamente ou positivamente, dependendo do pH do grupo polar.

No entanto, vale salientar o impacto ambiental causado pelo amplo uso de surfactantes. Relata-se que pela dificuldade de biodegradação, há a formação de espumas em riachos e estações de tratamento de águas residuais, causando assim um desafio ambiental (COWAN-ELLSBERRY *et al.*, 2014).

Dessa forma, o estudo de surfactantes derivados de aminoácidos visa obter um menor impacto ambiental, pois envolve o uso de matérias primas renováveis. Esses compostos são formados por um aminoácido como parte polar e uma parte apolar, possuem atividade antimicrobiana, são simples e de baixo custo (PINAZO *et al.*, 2016).

2.9 Surfactante derivado de aminoácidos

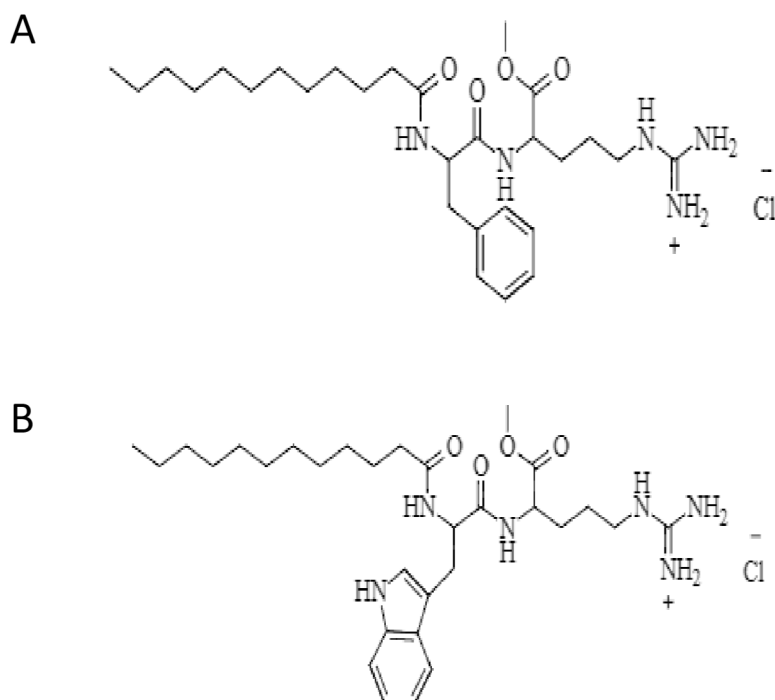
Surfactantes catiônicos derivados de aminoácidos são estruturalmente análogos a lipopeptídeos, um agente antibacteriano convencional. São moléculas anfifílicas com um ou dois aminoácidos ligados a uma porção hidrofóbica. Desse modo, possuem modo de ação semelhante a esse fármaco, interagindo com membranas celulares bacterianas, provocando o rompimento da integridade da membrana ou de seu potencial eletroquímico (PINAZO *et al.*, 2016).

Nos últimos anos tem-se destacado a busca por agentes antimicrobianos que atuem nas membranas celulares, essenciais para a viabilidade celular. Desse modo, muitas pesquisas tem sido empregadas no desenvolvimento de surfactantes que desregulam a membrana, apresentando uma notável atividade frente a bactérias e fungos (FALK, 2019; JOONDAN; JHAUMEER-LAULLOO; CAUMUL, 2014)

Nesse contexto, o grupo coordenado pela professora Loudez Perez sintetizou diferentes surfactantes catiônicos derivados de aminoácidos com potencial biomédico (DA SILVA *et al.*, 2020; PINAZO *et al.*, 2016). Esses compostos têm atraído atenção especial por serem biodegradáveis e biocompatíveis, podendo ser produzidos em larga escala seguindo os princípios da química verde (MORÁN *et al.*, 2001). Além disso, o grande número de diferentes aminoácidos permite a preparação de multifuncionais surfactantes catiônicos que podem ser adaptados para uma variedade de aplicações biomédicas.

Diante do potencial antifúngico e antibacteriano relatado na literatura, neste trabalho, utilizamos dois novos surfactantes catiônicos com cabeças polares compostas por dois aminoácidos: arginina-fenilalanina (LPAM) e arginina-triptofano (LTAM) (Figura 4) sintetizados e cedidos Profa. Dra. Loudez Perez, do *Consejo Superior de Investigaciones Científicas* (CSIC), cuja síntese foi descrita por Moreno e colaboradores (2021). A atividade antifúngica destes novos surfactantes e sua associação com Anfotericina B (AMB) foi avaliada contra cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol na forma planctônica e de biofilme, e sua atividade antibacteriana foi avaliada frente a cepas de MRSA, tanto na forma planctônica quanto em biofilme. Para estudar o modo de ação, diferentes experimentos baseados em citometria de fluxo foram realizados. Por fim foi avaliado seu potencial para o desenvolvimento de novos fármacos utilizando técnicas ADMET.

Figura 4 - Estrutura química dos surfactantes derivados de aminoácidos. LPAM (A) e LTAM (B).



3 HIPÓTESES

3.1. Os tensoativos catiônicos LPAM e LTAM apresentam atividade antifúngica frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol isolados e associados a anfotericina B.

3.2. Os tensoativos catiônicos LPAM e LTAM apresentam atividade frente ao biofilme formado de cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol isolados e associados a anfotericina B.

3.3. Os tensoativos catiônicos LPAM e LTAM causam apoptose das células de *Candida* spp..

3.4. Os tensoativos catiônicos LPAM e LTAM não apresentam atividade antifúngica frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol

3.5. Os tensoativos catiônicos LPAM e LTAM apresentam atividade frente a cepas de *S.aureus* resistentes a metilina, na forma planctônica e em biofilme.

3.6. Os tensoativos catiônicos LPAM e LTAM causam apoptose nas células de *S. aureus* resistentes a metilina.

3.7. Os tensoativos catiônicos LPAM e LTAM interagem com proteínas bacterianas.

3.8. Os tensoativos catiônicos LPAM e LTAM não apresentam atividade frente a cepas de *S.aureus* resistentes a metilina.

3.9. Os tensoativos catiônicos LPAM e LTAM possuem um potencial para o desenvolvimento de novos fármacos.

4 OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade de dois tensoativos catiônicos inéditos sintetizados a partir da arginina frente a cepas clínicas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol e *S. aureus* resistente a metilicina na forma planctônica e biofilme.

4.2. Objetivos Específicos

4.2.1. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do LPAM e LTAM frente às cepas de *Candida* spp. na forma planctônica.

4.2.2. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (SCIM) do LPAM e LTAM em combinação com a anfotericina B frente cepas de *Candida* spp..

4.2.3. Avaliar a atividade do LPAM e LTAM isoladamente e em combinação com anfotericina B frente a biofilme formado de *Candida* spp.

4.2.4. Avaliar o efeito citotóxico do LPAM e LTAM frente a células L929 de mamíferos

4.2.5. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do LPAM e LTAM frente às cepas de *S.aureus* resistente a metilicina na forma planctônica.

4.2.6. Avaliar a atividade do LTAM e LPAM frente a biofilme formado de *S. aureus* resistente a metilicina.

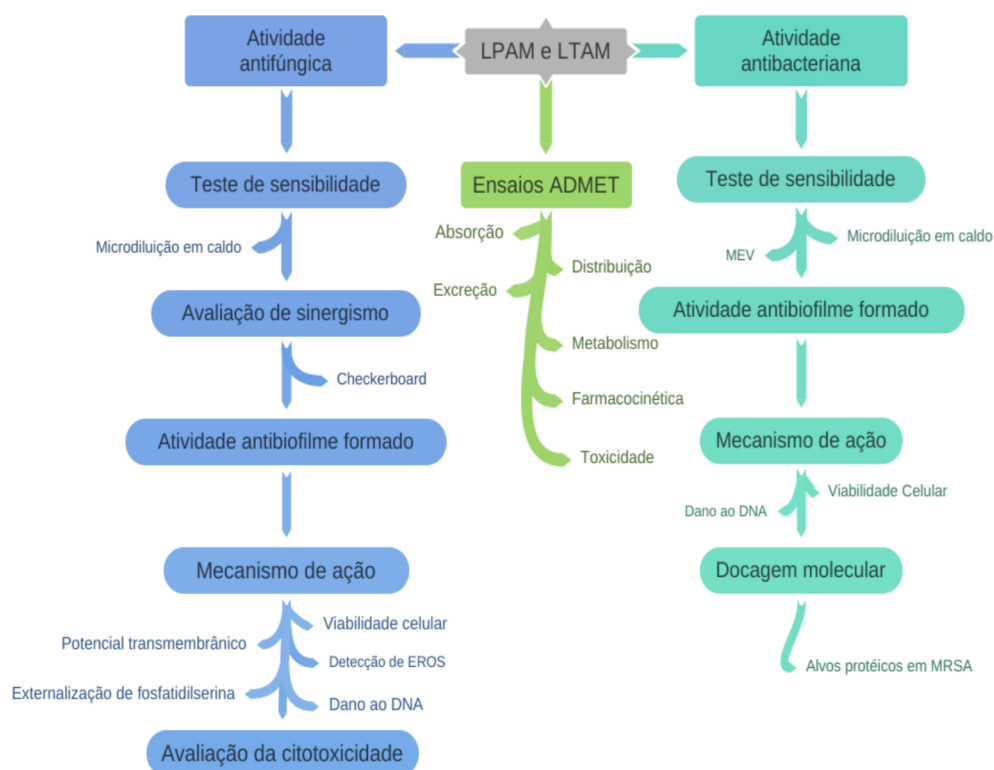
4.2.7. Investigar o possível mecanismo de ação antifúngico e antibacteriano do LPAM e LTAM através de citometria de fluxo.

4.2.8. Verificar a interação do LPAM e LTAM com proteínas bacterianas através de técnicas de docagem molecular.

4.2.9. Avaliar potencial do LPAM e LTAM para desenvolvimento de novos fármacos, utilizando parâmetros ADMET como: absorção, distribuição, metabolismo, excreção, toxicidade e farmacocinética.

5 METODOLOGIA

Figura 5 - Fluxograma da metodologia utilizada



5.1 Microorganismos

Neste estudo, para avaliar a atividade antifúngica dos produtos em análise foram utilizadas 7 cepas de *Candida* spp resistentes ao fluconazol, entre elas, 2 *Candida albicans*, 3 *Candida tropicalis* e 2 *Candida parapsilosis*. Duas cepas de *Candida* ATCC (*C. parapsilosis* ATCC® 22019™ e *C. krusei* ATCC® 6258™) foram utilizadas como controles. As cepas em estudo estavam armazenadas na micoteca do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN) da Universidade Federal do Ceará (UFC) em Sabouraud caldo (HiMedia, Mumbai, Índia) acrescido de glicerol (Dinâmica, São Paulo, Brasil) e armazenadas a – 20 °C. Inicialmente, foi realizada a reativação das cepas de *Candida* spp. Para tal foram suspensas em caldo Sabouraud (HiMedia, Mumbai, Índia) e incubadas por 24 horas a 35 °C. No dia seguinte, para verificar a pureza das colônias, as cepas foram repicadas em meio

cromogênico HiCrome *Candida* Differential Agar (HiMedia, Mumbai, Índia) e incubadas por 24 horas a 35 °C. Por fim, as cepas cuja pureza foram confirmada foram repicadas em Sabouraud dextrose ágar (HiMedia, Mumbai, Índia).

Para avaliação da atividade antibacteriana foram utilizadas 16 cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e 6 cepas de *S.aureus* sensíveis a meticilina (SASM) Como controle, foram utilizadas 2 cepas de *S.aureus* ATCC, uma resistente (65398) e uma sensível a meticina (6538). Todas as cepas estavam armazenadas na bacterioteca do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN) da Universidade Federal do Ceará (UFC) em solução contendo caldo Mueller Hinton (HiMedia, Mumbai, Índia), com alto teor de glicose (Proquimios, Rio de Janeiro, Brasil) e glicerol (Dinâmica, São Paulo, Brasil) armazenadas a baixas temperaturas (- 20 °C). Para reativação, as cepas foram suspensas em 1mL de caldo Mueller Hinton (HiMedia, Mumbai, Índia) e incubadas por 24 horas a 35 °C. Por fim, as cepas foram repicadas em Agar Mueller Hinton e incubadas por 48 horas a 35 °C.

5.2 Produtos

Neste trabalho, dois novos surfactantes catiônicos à base de aminoácidos, fenilalanina-arginina (LPAM) e triptofano-arginina (LTAM) foram sintetizados pela equipe da Profa. Dra. Lourdes Perez, do *Consejo Superior de Investigaciones Científicas* (CSIC) e disponibilizados ao Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN) da Universidade Federal do Ceará (UFC) para avaliação de suas propriedades físico-químicas, antifúngicas e antibiofilme. Os surfactantes à base de aminoácidos foram preparados usando um procedimento químico simples a partir de matérias-primas renováveis, cuja síntese foi descrita por Moreno e colaboradores (2021).

Fluconazol, anfotericina B, oxacilina e vancomicina foram obtidas comercialmente da Sigma Aldrich, USA.

5.3 Teste de sensibilidade antifúngica

5.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos produtos isolados

O teste de sensibilidade à microdiluição em caldo foi realizado de acordo com o documento M27-A3 utilizando caldo RPMI (pH 7,0) tamponado com 0,165 M MOPS (CLSI, 2008). Os testes foram executados em placas de poliestireno com fundo em chato, estéreis com 96 poços. O preenchimento da placa foi da seguinte forma: coluna 1 utilizada como controle de esterilidade, preenchida apenas com meio RPMI e coluna 12 utilizada como controle de

crescimento, preenchida com RPMI e inóculo. Coluna 2 a 11 utilizada para realização da diluição seriada a fim de obter o intervalo desejado de concentração da droga em teste. LPAM e LTAM foram solubilizados em DMSO e testados na faixa de 0,5 - 260 µg/mL, enquanto a anfotericina B e o fluconazol na faixa de 0,03-16 µg/mL e 0,125 a 64 µg/mL, respectivamente. Para realização do teste as cepas foram semeadas em Sabouraud dextrose ágar (HiMedia, Mumbai, Índia) incubadas por 24 horas a 35 °C. A partir dessas culturas foram preparados inóculos de acordo com a escala 0,5 McFarland (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil). E então, foram realizadas diluições seriadas em meio RPMI de modo a obter um inóculo final contendo $0,5-2,5 \times 10^3$ UFC/mL. O volume de 100 µL desse inóculo foi adicionado do poço 2 ao 12 e as placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. Em seguida, os resultados foram lidos visualmente, conforme recomendado pelo CLSI (2012). A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a concentração que inibiu 50 % do crescimento do fungo quando comparada ao controle de crescimento livre de fármaco. *C. parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258 foram utilizadas como controle do teste. Os pontos de corte adotados para o fluconazol e anfotericina B foram de acordo com o documento M27-S4, sendo considerada a ocorrência de resistência o $CIM \geq 8 \mu\text{g/mL}$ (CLSI, 2012). Os testes foram realizados em triplicata em dias diferentes.

5.3.2 Avaliação do sinergismo pela técnica de microdiluição em caldo - checkerboard

Após obter a CIM dos compostos puros para cada cepa individualmente, as interações surfactante/AMB foram avaliadas pela técnica do checkerboard (ODDS, 2003). Nesta técnica, concentrações sub-MIC de LPAM e LTAM (0,016 - 8,12 µg/mL) foram combinadas, individualmente, com AMB (0,0005 - 0,25 µg/mL; 0,001 - 0,5 µg/mL), de modo a obter o maior número possível de combinações entre as drogas.

Esta análise foi realizada a partir da determinação do Índice da Concentração Inibitória Fracionária (FICI) o qual foi obtido pela soma do FIC de cada fármaco, encontrado pela relação entre o CIM de cada fármaco utilizado em combinação e o CIM do mesmo fármaco utilizado isoladamente. Os resultados obtidos foram classificados de acordo com os seguintes parâmetros: $FICI \leq 0,5$: sinergismo; $FICI > 4,0$: antagonismo; $0,5 < FICI < 4,0$: indiferente (ODDS, 2003).

5.3.3 Análise de dados

Os testes de sensibilidade in vitro foram realizados em triplicata em dias diferentes. As médias geométricas foram usadas estatisticamente para comparar os resultados do CIM.

5.4 Avaliação da atividade frente a biofilme fúngico

5.4.1 Avaliação da atividade dos produtos isolados e associados a anfotericina B em biofilme formado de *Candida* spp.

O efeito de LPAM, LTAM, LPAM + AMB, LTAM + AMB no biofilme formado de espécies de *Candida* foi avaliado utilizando 3 cepas de *Candida* spp. (1 *Candida albicans*, 1 *Candida parapsilosis* e *C. tropicalis*), todas pertencentes a micoteca do LABIMAN, que foram inicialmente semeadas em ágar Sabouraud dextrose a 35 °C por 24 h, em seguida, foram suspensas em 5mL de meio YNB e reincubadas sob as mesmas condições. As células foram centrifugadas (3000 g, 5 min) e lavadas com PBS por três vezes, ajustadas de acordo como padrão 0,5 da escala de McFarland em meio RPMI e então 200 µL do inoculo preparado foi adicionado em placas de 96 poços de fundo chato e incubados a 35 °C por 24 h. Após esse tempo, o sobrenadante foi retirado e em seguida, os poços foram lavados três vezes com PBS, para remoção das células não aderentes podendo observar visualmente a formação do biofilme no fundo dos poços.

O tratamento dos biofilmes formados foi realizado da seguinte forma: LPAM e LTAM (CIM/ 4; CIM / 2; CIM; 2x CIM; 4x CIM; 10x CIM) para avaliar isoladamente cada produto e para avaliar o sinergismo: LPAM e LTAM (CIM/ 4; CIM / 2; CIM; 2x CIM; 4x CIM; 10x CIM) + AMB (CIM/4; CIM /2; CIM; 2x CIM; 4x CIM; 10x CIM), cada produto combinado a anfotericina B , em meio RPMI. As placas foram incubadas a 35 °C durante 24 h. A medição da atividade metabólica das células do biofilme foi avaliada usando o ensaio colorimétrico MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]. Todas as leituras foram realizadas em um leitor de microplacas Biochrom Asys UVM 340 (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido) a 540 nm. Após incubação de 18 a 20 horas no escuro, o corante foi removido, os poços lavados 3 vezes com PBS e adicionado 200 µL DMSO. Após 15 minutos, retirou-se 100 µL 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). Para avaliar a ocorrência de sinergismo entre os produtos e a anfotericina B foi realizado a metodologia do checkerboard para derivação do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI), como descrito por Ramage e Wickes (2001). O SCIM50% foi definido com a menor concentração de combinação das drogas necessária para

reduzir 50% do biofilme formado quando comparado ao controle (RAMAGE; WICKES, 2001). Os ensaios foram realizados em triplicata em dias diferentes.

5.5 Ensaios de citometria de fluxo

5.5.1 Preparo de suspensões de células de *Candida* spp.

Neste ensaio foram utilizadas uma cepa de cada espécie (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*). As cepas foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose a 35 °C por 24 horas. Em seguida, as células foram suspensas em 5 mL de meio YPD, incubadas sob as mesmas condições, e então, centrifugadas (3000 g, 5 min) e lavadas três vezes com solução salina 0,85%. Por fim, as células (~10⁶ células/mL) foram ressuspensas em meio RPMI (Vitrocell Embriolife, São Paulo, Brasil) (DA SILVA *et al.*, 2013; NETO *et al.*, 2014).

5.5.2 Tratamento de células de *Candida* spp.

Fez-se necessário o tratamento inicial com os produtos e drogas avaliados para a determinação da viabilidade celular, avaliação do potencial transmembrana mitocondrial, detecção de espécies reativas de oxigênio e externalização de fosfatidilserina. Para tal, as células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, todas resistentes ao fluconazol, foram expostas ao LPAM e LTAM, isoladamente: MIC (8.12 µg/mL), 2xMIC (16.24 µg/ml), 4xMIC (32.48 µg/ml), ao FLC (64 µg/mL) e à AMB (4 µg/mL), que foram usados como controle negativo e de morte, respectivamente. As células tratadas foram incubadas a 35 °C durante 24 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes.

5.5.3 Determinação da viabilidade celular em células de *Candida* spp.

Após o tratamento supracitado, item 5.5.2, as células em análise foram marcadas com o marcador iodeto de propídeo (PI) e analisadas por citometria de fluxo. Foram avaliados 10.000 eventos a cada experimento e os restos celulares foram omitidos da análise (DA SILVA *et al.*, 2013).

5.5.4 Determinação do potencial transmembranico ($\Delta\psi_m$) em células de *Candida* spp

Após tratamento descrito no item 5.5.2, as células foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS) e incubadas com rodamina 123 (1 µg/mL) (Sigma, USA) a 37 °C por 15 min, no escuro. Posteriormente, as células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas a 37 °C por

30 min. A fluorescência foi determinada por citometria de fluxo. Foram avaliados 10.000 eventos a cada experimento e os restos celulares foram omitidos da análise (DA SILVA *et al.*, 2013; NETO *et al.*, 2014).

5.5.5 Detecção de Espécies Reativas de Oxigenio (EROS) em células de *Candida* spp.

Após tratamento descrito no item 5.5.2, as células foram incubadas com H2DCFDA (20 μ M) (Diacetato 2',7'- diclorodihidrofluoresceína) (Sigma, USA) por 30 min, no escuro, a 35 °C. Em seguida, as células foram colhidas, lavadas, ressuspensas em PBS, e analisadas por citometria de fluxo. Foram avaliados 10.000 eventos a cada experimento e os restos celulares foram omitidos da análise (DA SILVA *et al.*, 2013; NETO *et al.*, 2014).

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

Após tratamento descrito no item 5.2, as células foram centrifugadas e digeridas com Zymolyase 20T (2 mg/mL) (Seikagaku Corporation, Japão) em tampão fosfato de salina (PBS) (1 M pH 6,0) durante 2 h a 30 °C. Os esferoplastos das células 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, a suspensão foi analisada por citometria de fluxo. Foram avaliados 10.000 eventos a cada experimento e os restos celulares foram omitidos da análise (DA SILVA *et al.*, 2013; NETO *et al.*, 2014).

5.5.7 Análise de dados

A análise foi realizada 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).

5.6 Avaliação citotoxicidade

5.6.1 Ensaio do cometa

O ensaio em cometa alcalino foi realizado como descrito por (MILOSHEV; MIHAYLOV; ANACHKOVA, 2001). Para tal, as células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, todas resistentes ao fluconazol, foram centrifugadas durante 5 min, lavadas com água destilada, e ressuspensas em tampão S (1M de sorbitol, 25 mM de KH₂PO₄, pH 6,5). Em seguida, alíquotas de aproximadamente 5×10^4 células foram adicionadas à agarose de baixo

ponto de fusão (37 °C) contendo Zymolyase 20T (2 mg/mL) e distribuídas sobre as lâminas, que foram cobertas com lamínulas e incubadas durante 20 min a 30 °C. Tendo como objetivo de reduzir a atividade enzimática intracelular os ensaios foram feitos em uma câmara fria (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 EDTA, pH 12,3) durante 1 h para lisar os esferoplastos. As lâminas foram lavadas três vezes durante 20 min em cada uma solução (30 mM de NaOH, 10 mM de EDTA e 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. Então, os géis foram neutralizados por submersão das lâminas em 10 mM Tris HCl pH 7,5 durante 10 min seguido por incubações consecutivas por 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 procedimentos acima foram realizados no escuro para evitar danos adicionais no DNA. A análise foi feita a partir de imagens de 100 células selecionadas aleatoriamente (50 células de cada uma das duas lâminas idênticas) para cada grupo experimental. A leitura foi feita através de 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 zero (completamente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4) (COLLINS, 2004).

5.6.1.1 Análise de dados

A análise foi realizada 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).

5.6.2 Inibição da proliferação de células L929 usando o teste MTT

O ensaio de citotoxicidade foi realizado conforme descrito por (CAVALCANTI *et al.*, 2009). As células L929, adquiridas através do Banco de Células do Rio de Janeiro da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil), foram cultivadas em condições padrão em meio essencial mínimo com sais de Earle. Todos os meios de cultura foram suplementados com 10 % de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 μ g/mL de penicilina e

100 µg/mL de estreptomicina, e as células foram cultivadas a 37 °C com 5 % de CO₂. As células foram cultivadas durante 2 dias antes do tratamento com as substâncias teste.

O crescimento celular foi quantificado com base na capacidade das células vivas de reduzir o corante amarelo MTT (Sigma-Aldrich) ao produto formazan roxo. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços (0,3 x 10⁶ células/poço) e os produtos (0,039 a 25 µg/mL) dissolvidos em DMSO a 0,1 % foram adicionados a cada poço, seguido por incubação por 24 horas sob condições de cultivo padrão. Em seguida, as placas foram centrifugadas e o meio foi substituído por meio fresco (150 µL) contendo 0,5 mg/mL de MTT. Três horas depois, o produto MTT formazan foi dissolvido em 150 µL de DMSO e a absorvância foi medida usando um leitor de placas múltiplas (Spectra Count; Packard, Canadá). Os efeitos produtos foram quantificados como a porcentagem de absorvância de controle do corante reduzido a 595 nm. O experimento foi realizado em duplicata e repetido três vezes.

5.7 Avaliação da atividade antibacteriana frente a cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA)

5.7.1 Teste de sensibilidade antibacteriana

5.7.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos produtos isolados

O teste de sensibilidade à microdiluição em caldo foi realizado de acordo com o documento M07-A10 (CLSI, 2015). Os testes foram executados em placas de poliestireno defundo “chato”, estéreis com 96 poços.

O preenchimento da placa foi da seguinte forma: coluna 1 utilizada como controle de esterilidade, preenchida com o meio caldo Mueller Hinton (HiMedia, Mumbai, Índia) de cátion ajustado (CAMHB) e coluna 12 utilizada como controle de crescimento, preenchida com CAMHB e inóculo. Coluna 2 a 11 utilizada para realização da diluição seriada a fim de obter o intervalo desejado de concentração da droga em teste. LPAM e LTAM foram solubilizados em DMSO e testados na faixa de 0.50 - 260 µg/mL, enquanto a oxacilina (Sigma-Aldrich Co. USA) foi usada na faixa de concentração 0.25 - 256 ou 1- 1024 µg/mL e vancomicina 0.03-32 µg/mL. Para realização do teste as cepas foram semeadas em ágar Mueller Hinton e incubadas por 24 horas. A partir dessas culturas foram preparados inóculos de acordo com a escala 0,5 McFarland (Probac do Brasil, São Paulo, Brasil). Em seguida, 100 µL dessas suspensões foram colocados em 900 µL de CAMHB e 5 µL foram adicionados em cada poço da placa, com exceção dos poços da coluna 1. As placas foram incubadas por 20 horas a 35 °C e, após esse

período, foi feita a leitura visual. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a concentração que inibiu 99% do crescimento da bactéria quando comparada ao controle de crescimento livre de fármaco. MRSA ATCC 65398 e *S. aureus* ATCC 6538 foram utilizadas como controle do teste. Os pontos de corte adotados para a oxacilina e vancomicina foram de acordo com o documento M27-S4. Sendo considerada a ocorrência de resistência o $CIM \geq 32 \mu\text{g/mL}$ para vacomicina e $CIM \geq 4 \mu\text{g/mL}$ para oxacilina (CLSI, 2017). Os experimentos foram realizados em triplicata, além de serem utilizadas as cepas padrões como controle.

5.7.1.2 Microscopia eletrônica de varredura em células planctônicas

A avaliação da morfologia de MRSA na forma planctônica, tratada com os produtos LPAM e LTAM, isoladamente, foi realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Esse ensaio foi realizado seguindo o protocolo de (BRAMBILLA *et al.*, 2017) com modificações. Inicialmente, as Thermanox® lâminas (Thermo Fisher Scientific, Nova Iorque, Estados Unidos da América) foram tratadas com 100 μL de silano 2.5 %, para a fixação das células na lâmina, as que foram secas a temperatura ambiente por 2h e então foi feito um inóculo em caldo TSB que continha cerca de $1,0 \times 10^8$ células/mL, previamente tratadas por 24h com LPAM e LTAM isoladamente na concentração de CIM e CIM/4. Dessa forma, 150 μL da suspensão foram adicionadas às lamínulas de vidro já colocadas em uma placa de 12 poços de poliestireno. Foi realizada então a etapa de fixação com glutaraldeído a 2,5 % em tampão cacodilato de sódio 0,15 M, as placas foram incubadas *overnight* a 4 °C. Em seguida, as amostras foram lavadas duas vezes com tampão cacodilato 0,15 M e foi realizada a etapa de desidratação alcoólica, utilizando concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 80, 90, 95, e 100 %), 2 vezes por 10 minutos cada concentração. Após secagem a temperatura ambiente, adicionou-se hexametildisilazano (Polysciences Europe, Alemanha) por 30 minutos e depois o produto foi retirado e as lamínulas foram secas em dessecador por 24h. As lamínulas foram recobertas com 10 nm de ouro (Emitech Q150T) e observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura Quanta 450 FEG – FEI, em alto vácuo a 15 kV. As imagens obtidas foram processadas com o software Photoshop (Adobe Systems, EUA).

5.8 Avaliação da atividade frente a biofilme bacteriano

5.8.1 Avaliação da atividade em biofilme formado de MRSA

A avaliação da atividade dos produtos em análise frente a biofilme formado de MRSA foi realizada e para tal foi necessária a formação do biofilme de isolados de MRSA em placas de microtitulação de acordo com a metodologia de Brambilla e colaboradores (2017) com algumas modificações. Dessa forma, utilizou-se 4 cepas de MRSA oriundas de amostras clínicas e boas formadoras de biofilme pertencentes a bacterioteca do LABIMAN. As cepas foram semeadas em Mueller Hinton Agar a 37 °C, 24 h. Em seguida, as cepas foram suspensas em caldo TSB, 1 % glicose e incubadas por 24h, em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos e lavadas com PBS, procedimento repetido 3 vezes. Foram feitos inóculos em caldo TSB a 0,5 da escala de McFarland (1×10^8 células) e 200 μ L foram adicionados a cada poço e a placa foi incubada a 35 °C por 48 h.

Os biofilmes formados foram tratados com os produtos LPAM e LTAM, isoladamente, nas concentrações de CIM/4, CIM/2, CIM, 4xCIM, 16xCIM. Foi utilizado controle de 100 % de crescimento (suspensão de células em TSB 1 % sem os produtos). Para tal avaliação foi adicionado 200 μ L do produto nas determinadas concentrações e incubado a 37 °C por 24 h. Após esse intervalo de tempo, os biofilmes foram lavados 3 vezes com PBS para então verificação da viabilidade celular, utilizando o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) -2,5-difenil tetrazolium (MTT). Após retirar sobrenadante, adicionou-se 100 μ L de MTT a cada poço a placa foi incubada por 18 a 20 h a 37 °C, no escuro. Em seguida, o corante foi removido das placas, os poços foram lavados com PBS e adicionou-se 150 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) como objetivo de dissolver o {E, Z- 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -1,3-diphenylformazan} (sal de formazan). Após 15 minutos, homogeneizou e 100 μ L foi transferido para uma nova placa de 96 poços. A leitura foi realizada em um leitor microplaca Biochrom Asys UVM 340 (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido) a 540 nm e o crescimento foi comparado ao poço que corresponde a 100% de crescimento, livre de produto.

5.8.2 Análise de dados

A análise foi realizada 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).

5.9 Citometria de fluxo

5.9.1 Preparo e tratamento de suspensões de células de MRSA

Uma cepa representativa foi selecionada para análise utilizando citometria de fluxo. Esta cepa foi semeada em ágar Mueller Hinton a 35 °C por 24 horas e então suspensa em 5ml de meio caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI) e reincubada sob as mesmas condições anteriores. Posteriormente, as células foram coletadas por centrifugação (3000 g, 5 min) e lavadas três vezes com solução salina 0,85 %. E então cerca de 10⁶ células/mL foram ressuspensas em meio BHI (DA SILVA *et al.*, 2013; NETO *et al.*, 2014).

Dessa forma, com a finalidade de avaliar a viabilidade celular e dano ao DNA, células de MRSA foram expostas a Vancomicina (4 µg/mL), Oxacilina (128 µg/mL), LPAM (MIC/4= 4,06 µg/mL; MIC= 16,25 µg/mL e 4xMIC= 32,5 µg/mL) LTAM (MIC/4= 2,03 µg/mL; MIC= 8,12 µg/mL e 4xMIC= 32,5 µg/mL). O meio de cultura BHI foi utilizado como controle negativo do teste e a vancomicina e oxacilina foram usadas como controle de morte. As células tratadas foram incubadas a 35 °C durante 24 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes.

5.9.2 Avaliação da integridade de membrana

A integridade de membrana foi realizada seguindo os protocolos de (NETO *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2007). Para isso, foi utilizado o teste de exclusão com iodeto de propídeo (IP) na concentração de 2 mg/L. Após a incubação com as amostras durante 20 horas, a fluorescência celular foi determinada no citômetro *Fluorescence-activated Cell Sorting* (FACS) e analisada usando o software CytoSoft 4.1. Um total de 10.000 eventos foram avaliados por análise (n=2) e os detritos celulares foram omitidos.

5.9.3 Avaliação do dano ao DNA

O dano ao DNA foi avaliado utilizando a técnica *Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay* (TUNEL) descrita por Dwyer e colaboradores (2012) e por Neto e colaboradores (2015). Para análise, as células foram tratadas e fixadas com paraformaldeído a 7 %. As células fixadas foram penetradas com 1 % de Triton X-100 em gelo durante 10 minutos e depois incubadas com a mistura reacional TUNEL durante 1 hora a 37 °C. Recomendações do fabricante do kit (Roche, Suíça) foram seguidas para realização do experimento. Após isso, 200 células foram contadas por amostra para determinar as

porcentagens de células positivas por meio de um microscópio de fluorescência (Olympus, Tokyo, Japan).

5.10 Docagem molecular

5.10.1 Procedimentos computacionais

5.10.1.1 Códigos usados

Para realizar as simulações, foram utilizados os códigos livres para uso acadêmico em um sistema operacional de 64 bits: Autodocktools™ (HUEY; MORRIS; FORLI, 2012), AutoDockVina™ (TROTT; OLSON, 2010), Avogadro™ (<http://avogadro.cc/>) (HANWELL *et al.*, 2012), Discovery studio visualizer™ viewer (BIOVIA, 2016), MarvinSketch™ 19.13.0, 2019, (<http://www.chemaxon.com>) (CSIZMADIA, 2019), Pymol (DELANO, 2020) e UCSF Chimera™ (PETTERSEN *et al.*, 2004).

5.10.1.2 Design e otimização dos ligantes

O design dos ligantes LPAM e LTAM foi realizado usando o código MarvinSketch (CSIZMADIA, 2019), as conformações de menor energia foram salvas e otimizadas utilizando ciclos de 50 interações do algoritmo *steepest descente* e campo de força MMFF94 (*Merck Molecular Force Field*) (HALGREN, 2000) a partir do código Avogadro (HANWELL *et al.*, 2012).

5.10.1.3 Procedimentos gerais de docagem molecular

Para avaliar a atividade anti-MRSA foram realizadas simulações de docking molecular utilizando a metodologia proposta por Andrade Neto e colaboradores (2021). As estruturas dos alvos foram obtidas no repositório Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>), identificadas como “*Wild-type Staphylococcus aureus DHFR in complex with NADPH and trimethoprim*” (PDB 2W9G), depositada com resolução de 1.95 Å, determinada por *X-Ray Diffraction*, expressa em sistema *Escherichia coli BL21(DE3)*, classificada como *oxidoreductase*, organismo *Staphylococcus aureus* (HEASLET *et al.*, 2009); “*The twinned 3.35Å structure of S. aureus Gyrase complex with Ciprofloxacin and DNA*” (PDB 2XCT), depositada com resolução de 3.35 Å, determinada por *X-Ray Diffraction*, expressa em sistema *Escherichia coli BL21(DE3)*, classificada como *isomerase/DNA/antibiotic*, organismo *Staphylococcus aureus subsp. aureus N315, synthetic construct* (BAX *et al.*, 2010); “*Crystal Structure of S.A. gyrase in complex with Compound 7*” (PDB 5BS3), depositada com resolução de 2.65 Å, determinada

por *X-Ray Diffraction*, expressa em sistema *Escherichia coli*, classificada como *isomerase/DNA/RNA*, organismo *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus subsp. aureus ED98* (SINGH *et al.*, 2015); “5'-D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3'-Benzimidazole Complex” (PDB 453D), depositada com resolução de 1.80 Å, determinada por *X-Ray Diffraction*, classificada como *DNA* (NEIDLE *et al.*, 1999) e “Crystal structure of ceftaroline acyl-PBP2a from MRSA with non-covalently bound ceftaroline and muramic acid at allosteric site obtained by soaking” (PDB 3ZFZ), depositada com resolução de 2.25 Å, determinada por *X-Ray Diffraction*, expressa em sistema *Escherichia coli BL21(DE3)*, classificada como *hydrolase*, organismo *Staphylococcus aureus subsp. aureus Mu50* (OTERO *et al.*, 2013). Na preparação das estruturas proteicas foram removidos os resíduos co-cristalizados, foram adicionados os átomos de hidrogênio polares e as cargas Gasteiger (YAN *et al.*, 2014). O resíduo NDP (NADPH *dihydro-nicotinamide-adenine-dinucleotide phosphate*) foi mantido na enzima *Wild-type Staphylococcus aureus DHFR* por ser um cofator importante para a catálise (HEASLET *et al.*, 2009).

Para a realização das simulações de docking molecular, foi utilizado o código AutodockVina (TROTT; OLSON, 2010), configurado para executar o *Lamarckian Genetic Algorithm* (LGA). O espaço de simulação foi determinado a partir do grid box seguindo a metodologia de Andrade Neto e colaboradores (2021) centralizado englobando todas as estruturas dos alvos proteicos, utilizando os eixos x, y e z: -4.854, -27.055, 4.446 respectivamente com parâmetros de size 90Å (x), 90Å (y) e 86Å (z) com a *Wild-type S. aureus DHFR*; eixos x, y e z: 17.747, 37.969, 24.799 respectivamente com parâmetros de size 126Å (x), 126Å (y) e 126Å (z) com a *S. aureus gyrase complex with DNA*; eixos x, y e z: -2.314, -28.737, -27.418 respectivamente com parâmetros de size 126Å (x), 126Å (y) e 126Å (z) com a *S. aureus gyrase*; eixos x, y e z: 14.674, 21.536, 9.84 respectivamente com parâmetros de size 52Å (x), 52Å (y) e 86Å (z) com a *DNA (5'-D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3')* e eixos x, y e z: 1.716, 38.268, 44.556 respectivamente com parâmetros de size 116Å (x), 84Å (y) e 126Å (z) com a *Acyl-PBP2a from MRSA*. O critério de *Exhaustiveness* foi ajustado para 64 objetivando melhorar o refinamento parcial do cálculos computacionais (MARINHO *et al.*, 2020). Foram realizadas 50 simulações independentes com obtenção de 20 poses por simulação. Como critério de seleção da *Best Pose*, foi utilizado o RMSD (*Root Mean Square Deviation*) em que valores inferiores a 2 Å são considerados ideais (YUSUF D., DAVIS A. M., KLEYWEGT G. J., 2008)

A partir da energia de afinidade (ΔG) (equação 1), que tem como parâmetros de idealidade valores iguais ou inferiores a -6.0 kcal/mol (SHITYAKOV; FÖRSTER, 2014) foi avaliada a estabilidade dos complexos proteína-ligante formados. Utilizando os valores de energia de afinidade (kcal/mol) foram determinados os valores das constante de inibição (K_i) (equação 2) de cada complexo proteína-ligante (KADELA-TOMANEK *et al.*, 2021).

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (1)$$

$$K_i = e^{(\Delta G/RT)} \quad (2)$$

Onde ΔG é a energia livre de ligação em $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, R ($8.32 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\text{K}^{-1}$) é a constante do gás, T (298K) é a temperatura absoluta e K_i é a constante de inibição.

Para avaliar a força das H-bond, foram utilizados valores das distancias entre os átomos doadores e receptores, onde as interações que ficaram entre 2.5 Å e 3.1 Å são classificadas como *Strong*, entre 3.1 Å e 3.55 Å são consideradas *Average* e distancias superiores a 3.55 Å são classificadas como *Weak* (IMBERTY *et al.*, 1991).

5.11 ADMET

5.11.1 Triagem Virtual de Bioatividade com Classes de Alvos

O código SMILES da LPAM e LTAM foram reportada do desenho bidimensional do programa MarvinSketch, ChemAxon (<https://chemaxon.com/products/marvin>) e carregado no programa Molinspiration (<https://www.molinspiration.com/>) para predição de bioatividade, onde as pontuações foram geradas do teste de similaridade com seu conjunto de dados para ligação com receptores acopladas a proteína-G (GPCR) e de receptores nucleares, modulador de canais iônicos e inibidor de quinases, proteases e enzimas.

5.11.2 Caracterização da Lipossolubilidade

A caracterização da microespécie dominante, coeficiente de distribuição (logD) e solubilidade (logS), em função da variação do pH, foram mediadas pelas representações gráficas dos cálculos do programa MarvinSketch, ChemAxon (<https://chemaxon.com/products/marvin>) e associadas aos parâmetros farmacocinéticos de permeabilidade celular.

5.11.3 Validação da Semelhança com Medicamentos (Druglikeness)

Para validação da LPAM e LTAM como *candidatos* a medicamento, as propriedades físico-químicas de massa molecular (MM), lipofilicidade (logP), aceitadores e doadores de hidrogênio e polaridade, foram aplicadas aos critérios da “regra de cinco” de Lipinski (LIPINSKI, 2004), bem como dos critérios de segurança da empresa farmacêutica Pfizer, Inc. (HUGHES *et al.*, 2008; WAGER *et al.*, 2016). A “regra de cinco” constitui na filtragem de quatro parâmetros físico-químicos, nas quais incluem: massa molecular (MM) ≤ 500 g/mol, logP ≤ 5 , aceitadores de H ≤ 10 e doadores de H ≤ 5 , onde existe a probabilidade de um composto atingir a fase II de testes clínicos e atender às condições de biodisponibilidade oral. As condições estabelecidas pela “regra de cinco” evidenciam que um composto pode violar até 1 dos critérios estabelecidos pela regra.

5.11.4 Previsão da Farmacocinética Pelos Modelos de ADMET

Com o objetivo de validar as propriedades físico-químicas teóricas calculadas, o composto foi submetido a testes de similaridade com compostos do conjunto de dados dos parâmetros *in vitro* e *in vivo* de permeabilidade intestinal e cerebral, volume de distribuição, metabolismo pelas isoenzimas do citocromo P450 (CYP450), mutagenicidade de Ames (XU *et al.*, 2012) e inibição de canais hERG da triagem consensual dos servidores preADMET (<https://preadmet.bmdrc.kr/>) e pkCSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/>). Além disso, foram avaliados modelos de QSAR para possíveis sítios de interação da LPAM e LTAM com as isoformas de CYP450 avaliadas pelo servidor SOMP, Way2Drug (<http://www.way2drug.com/somp/>), assim como foram identificados os farmacofóros potencialmente reativos e bloqueadores dos canais hERG no servidor Pred-hERG, LabMol (<http://predherg.labmol.com.br/>)

6 RESULTADOS

6.1 Atividade antifúngica dos produtos LPAM e LTAM frente a cepas planctônicas de *Candida* spp. resistências ao Fluconazol

A atividade antifúngica foi avaliada usando sete cepas de *Candida* resistentes a fluconazol e duas cepas de ATCC. A Tabela 1 mostra os valores de CIM obtidos para LPAM e LTAM, e também para dois antifúngicos comerciais, AMB e FLC. O CIM foi definido como a concentração mais baixa que produziu uma redução de 50% no crescimento das células fúngicas para fluconazol e a menor concentração de droga que impediu qualquer grau de crescimento discernível para os produtos LPAM e LTAM e para a AMB. Os valores CIM de FLC contra as sete cepas não ATCC ($\geq 32 \mu\text{g} / \text{L}$) indicam sua resistência a este medicamento. LPAM e LTAM apresentaram boa atividade antifúngica contra todas as cepas, com CIM = 8,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para ambos os compostos.

6.1.1 Avaliação da atividade dos produtos LPAM e LTAM combinados a anfotericina B frente a cepas de *Candida* spp. resistências ao Fluconazol

A Tabela 4 também inclui os valores de CIM de AMB contra todas as cepas estudadas. Como esperado, este composto exibiu forte atividade, com valores de CIM inferiores a 1 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Para avaliar possíveis efeitos sinérgicos, foi determinada a atividade antifúngica das misturas AMB / LPAM e AMB / LTAM (Tabela 1). A interação entre AMB e os surfactantes foi avaliada pelo cálculo do índice de concentração inibitória fracionada (FICI):

$$\text{FICI} = [\text{CAB}] / [\text{AB}] + [\text{CP}] / [\text{P}]$$

onde [CAB] e [CP] representam os CIMs da AMB e os surfactantes atuando em combinação, enquanto [AB] e [P] são os CIMs dos mesmos compostos, respectivamente, atuando sozinhos. Sinergismo (SIN) foi definido como $\text{FICI} \leq 0,5$, indiferente (IND) como $0,5 < \text{FICI} < 4$ e antagonismo (ANT) como $\text{FICI} > 4,0$. Nossos resultados indicam que quando as diferentes cepas de *Candida* foram expostas às combinações AMB / LPAM ou AMB / LTAM, elas exerceram um efeito sinérgico na sensibilidade à levedura ($\text{FICI} \leq 0,5$). Os valores de CIM obtidos para as misturas contra todas as cepas foram significativamente ($p < 0,05$) menores (cerca de 3 vezes) do que os dos compostos puros. Comportamento semelhante foi observado para todas as cepas de *Candida* e para ambas as misturas de drogas.

Tabela 4 - Valores de CIM obtidos para os tensoativos catiônicos puros, AMB e as misturas de tensoativo / AMB contra *Candida* spp.

Cepas	Produtos						LPAM/AMB			LTAM/AMB		
	CIM (µg/mL)						CIM (µg/mL)			CIM (µg/mL)		
	FLC	LPAM	LTAM	AMB	LPAM/AMB	FICI	LPAM/AMB	FICI	LPAM/AMB	FICI	LTAM/AMB	FICI
<i>C. albicans</i> 1	64	8,12	8,12	0,5	2,03/0,125	0,5	SIN	2,03/0,125	SIN	2,03/0,125	0,5	SIN
<i>C. albicans</i> 2*/**	32	8,12	8,12	0,25	2,03/0,062	0,5	SIN	2,03/0,062	SIN	2,03/0,062	0,5	SIN
<i>C. tropicalis</i> 1	32	8,12	8,12	0,5	1,01/0,062	0,25	SIN	1,01/0,062	SIN	1,01/0,062	0,25	SIN
<i>C. tropicalis</i> 2*/**	32	8,12	8,12	0,5	2,03/0,125	0,5	SIN	2,03/0,125	SIN	2,03/0,125	0,5	SIN
<i>C. tropicalis</i> 3	32	8,12	8,12	0,5	2,03/0,125	0,25	SIN	2,03/0,125	SIN	2,03/0,125	0,25	SIN
<i>C. parapsilosis</i> 1*	32	8,12	8,12	0,5	2,03/0,125	0,5	SIN	2,03/0,125	SIN	2,03/0,125	0,5	SIN
<i>C. parapsilosis</i> 2 **	128	8,12	8,12	0,5	2,03/0,125	0,5	SIN	2,03/0,125	SIN	2,03/0,125	0,5	SIN
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	1	8,12	8,12	0,25	1,01/0,031	0,25	SIN	1,01/0,031	SIN	1,01/0,031	0,25	SIN
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	16	8,12	8,12	0,5	2,03/0,125	0,5	SIN	2,03/0,125	SIN	1,01/0,125	0,5	SIN

* Cepas utilizadas no ensaio de biofilme formado

** Cepas utilizadas no ensaio de citometria

C. krusei ATCC 6258 (resistente ao fluconazol) e *C. parapsilosis* ATCC 22019 (sensível ao fluconazol) cepas controle

LPAM: Surfactante catiônico à base de fenilalanina-arginina; LTAM: Surfactante catiônico à base triptofano-arginina; FLC: fluconazol; AMB: anfotericina B

6.2 Atividade dos produtos LPAM e LTAM frente a biofilme de *Candida* spp.

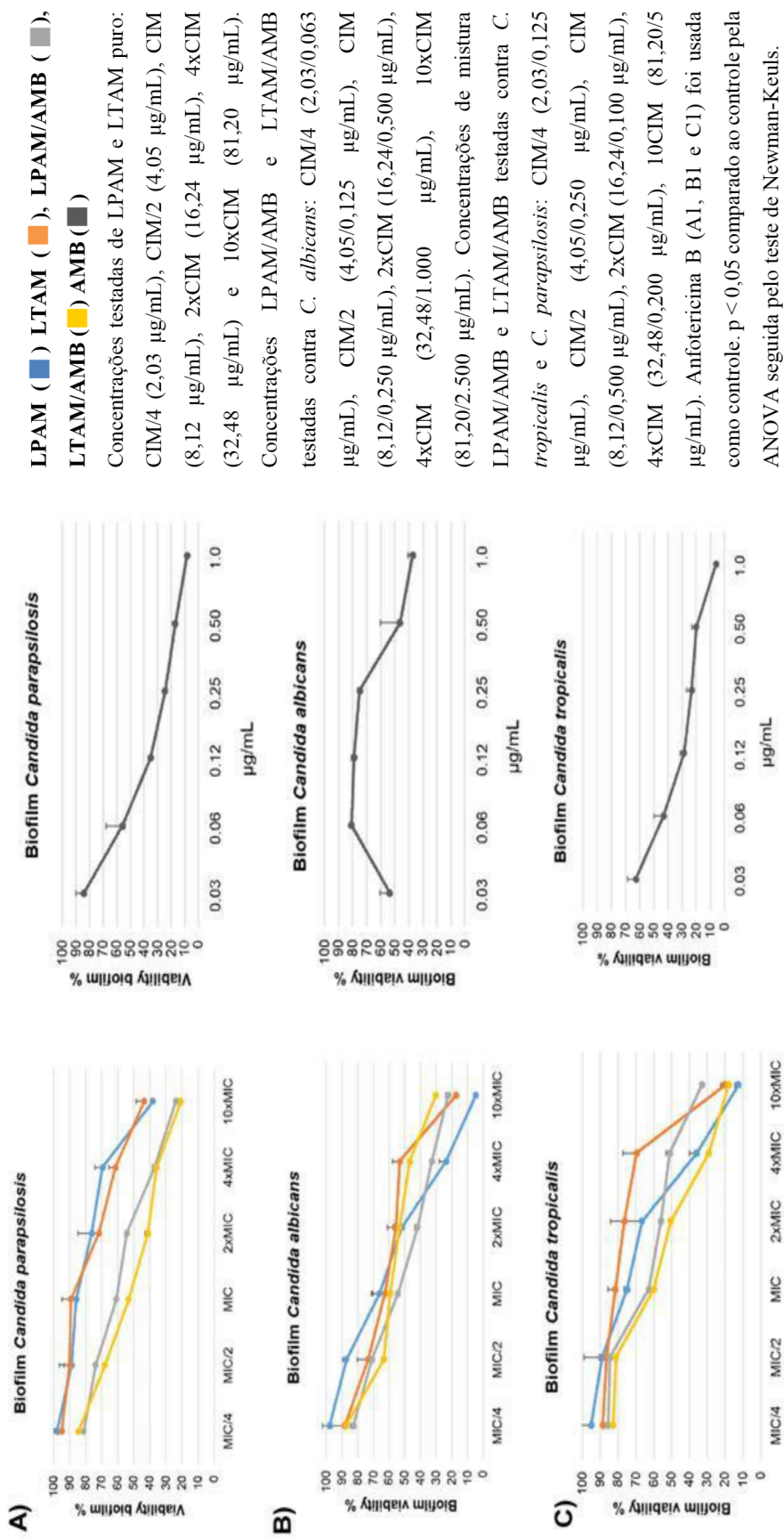
LPAM e LTAM foram testados quanto à capacidade de dispersar biofilmes maduros de *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. parapsilosis* resistentes a FLC. Os resultados (Figura 6) indicam que ambos os surfactantes desestruturaram biofilmes produzidos por *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. tropicalis*. A 10xCIM (81,20 µg / mL), LPAM e LTAM destruíram mais de 80 % do biofilme de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Atividade mais fraca contra os biofilmes de *C. parapsilosis* foi observada para ambos os surfactantes, a maior concentração testada removendo cerca de 40 % do biofilme.

6.2.1 Avaliação da atividade dos produtos LPAM e LTAM combinados a Anfotericina B frente a biofilme de *Candida* spp.

Ao determinar a atividade antibiofilme das misturas LTAM / AMB e LPAM / AMB (Figura 6), testamos as concentrações acima e abaixo dos valores CIM obtidos para esses compostos puros obtidos para essas misturas. No valor de CIM, todas as espécies de *Candida* testadas, exceto *C. albicans* tratadas com LPAM, exibiram redução significativa na viabilidade do biofilme após exposição a LPAM ou LTAM combinado com AMB quando comparados aos compostos puros LPAM e LTAM. Por exemplo, no CIM (8,12 µg/mL surfactante catiônico/0,500 µg/mL AMB) as misturas dispersaram cerca de 50% dos biofilmes de *C. parapsilosis*, enquanto individualmente os surfactantes catiônicos dispersaram apenas 20 %. Esse comportamento se deve à presença de AMB. Por outro lado, o efeito do AMB puro (coluna A1, B1, C1) é superior ao observado nas combinações. Por exemplo, para *C. parapsilosis* no valor CIM (8,12 µg/mL/0,500 µg/mL) exibiu baixo efeito, enquanto o AMB em 0,500 µg/mL dispersou cerca de 80 % do biofilme. No entanto, a combinação de LPAM ou LTAM com AMB não mostrou atividade contra *Candida* spp. biofilme quando comparado com AMB sozinho.

AMB também dispersou os biofilmes maduros de *Candida* estudados, destruindo mais de 80% em concentrações muito baixas (0,25-1 µg/mL). No entanto, o gráfico B1 (atividade de AMB contra *C. albicans*) exibe um comportamento dose-efeito incomum; seria de se esperar que a viabilidade da biomassa a 0,03 µg/mL fosse superior à obtida a 0,06 µg/mL. *Candida albicans* 2 é uma cepa clínica e mostrou resistência à AMB em concentrações mais baixas.

Figura 6 - Atividade antibiofilme de LPAM, LTAM isoladas e combinadas com anfotericina B contra: *C. parapsilosis* resistente a FLC (A), *C. albicans* (B) e *C. tropicalis* (C) cepas após 24h

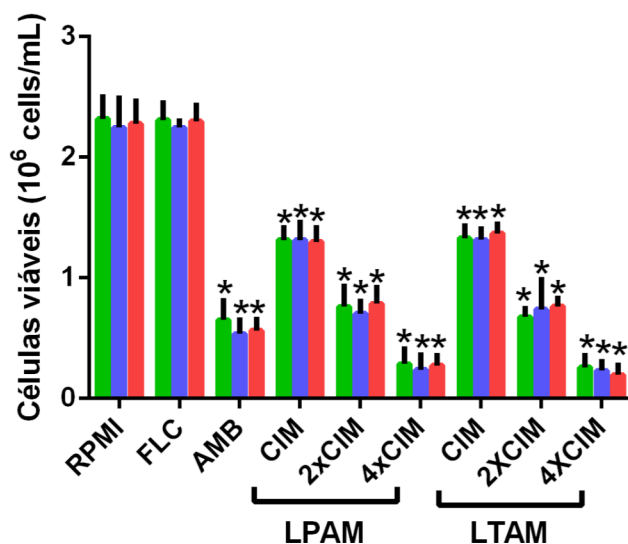


6.3 Avaliação do tipo de morte celular em *Candida* spp. após exposição aos produtos LPAM e LTAM

6.3.1 Redução da viabilidade celular de *Candida* spp. após exposição aos produtos LPAM e LTAM

A Figura 7 mostra o número de células viáveis das três espécies de *Candida* após serem tratadas com LPAM, LTAM, FLC e AMB. Conforme esperado, não houve redução da viabilidade celular após o tratamento com FLC, sendo o resultado semelhante ao obtido para o controle em branco. Em contraste, quando essas cepas de *Candida* spp. foram tratadas com os tensoativos catiônicos, foi observada uma redução significativa no número de células viáveis. A atividade dependeu da concentração do surfactante: uma redução de cerca de 50% foi obtida no CIM, enquanto no 2xCIM foi semelhante ao AMB (o controle positivo).

Figura 7 - Redução no número de células viáveis de *Candida* spp. após tratamento com LPAM e LTAM.

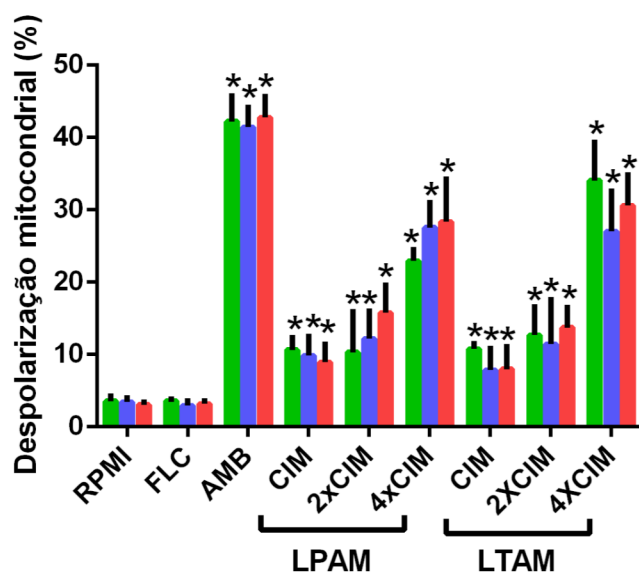


As células de *C. parapsilosis* (■), *C. tropicalis* (■), e *C. albicans* (■) foram tratadas com LPAM e LTAM (CIM= 8,12 µg/ml, 2xCIM=16,24 µg/ml e 4xCIM=32,48 µg/ml), FLC (CIM=64 µg/mL), AMB (CIM= 4 µg/mL; controle de morte) e RPMI (controle negativo). Após 24 horas, foram corados com brometo de etídio e analisados por citometria de fluxo. Os dados são apresentados como a média ± erro padrão da média (E.P.M) em três experimentos independentes realizados em duplicata. *P<0,05 comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.3.2 Despolarização mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em células de *Candida* sp. causadas após exposição aos produtos LPAM e LTAM

As cepas tratadas com FLC, assim como o controle negativo (células em meio RPMI), não exibiram alterações no potencial transmembrana mitocondrial (Figura 8). Em *Candida* spp., nas células tratadas com LPAM e LTAM, a porcentagem do potencial transmembrana mitocondrial dependeu da concentração do surfactante. No CIM, o $\Delta\psi_m$ foi semelhante ao das células de controle não tratadas, mas a concentração mais alta testada (4xCIM) induziu um colapso grave no $\Delta\psi_m$ nas três cepas representativas de *Candida*.

Figura 8 - Avaliação do potencial transmembrana mitocondrial de células de *Candida* spp. após tratamento com LPAM e LTAM.

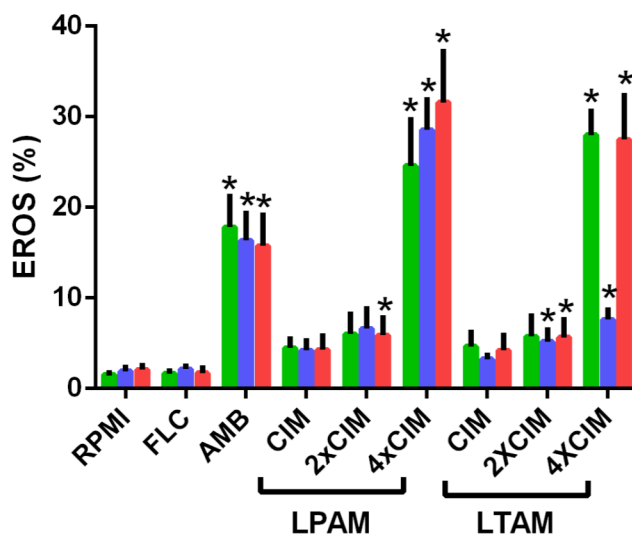


As células de *C. parapsilosis* (■), *C. tropicalis* (■), e *C. albicans* (■) foram tratadas com LPAM e LTAM (CIM= 8,12 µg/ml, 2xCIM=16,24 µg/ml e 4xCIM=32,48 µg/ml), FLC (CIM=64 µg/mL), AMB (CIM= 4 µg/mL; controle de morte) e RPMI (controle negativo). Após 24 horas, foram corados com brometo de etídio e analisados por citometria de fluxo. Os dados são apresentados como a média ± erro padrão da média (E.P.M) em três experimentos independentes realizados em duplicata. *P<0,05 comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.3.3 Produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROS) em células de *Candida* sp. causadas após exposição aos produtos LPAM e LTAM

Como mostrado na Figura 9, a produção intracelular de EROS em células *Candida* spp. tratadas (FLC) e não tratadas (RPMI) não aumentou significativamente ($p < 0,05$). O tratamento de cepas com baixas concentrações de LPAM e LTAM resultou em uma produção de EROS muito baixa, mas aumentou consideravelmente após a exposição a 4xCIM. Na verdade, nesta concentração, a produção de EROS foi maior do que no controle positivo tratado com AMB. Não foram observadas diferenças entre LTAM e LPAM, e o comportamento das três cepas de *Candida* spp. foi semelhante.

Figura 9 - Geração de espécies reativas de oxigênio em células de *Candida* spp. após tratamento com LPAM e LTAM.

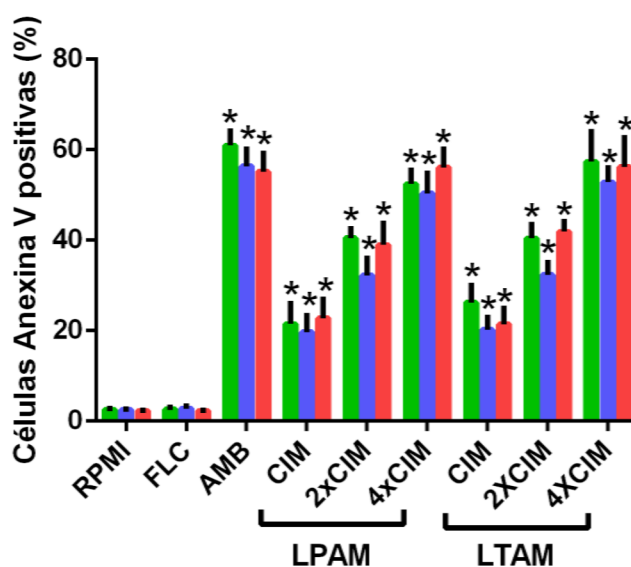


As células de *C. parapsilosis* (■), *C. tropicalis* (■), e *C. albicans* (■) foram tratadas com LPAM e LTAM (CIM= 8,12 µg/ml, 2xCIM=16,24 µg/ml e 4xCIM=32,48 µg/ml), FLC (CIM=64 µg/mL), AMB (CIM= 4 µg/mL; controle de morte) e RPMI (controle negativo). Após 24 horas, foram corados com brometo de etídio e analisados por citometria de fluxo. Os dados são apresentados como a média ± erro padrão da média (E.P.M) em três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.3.4 Externalização de fosfatidilserina (PS) em células de *Candida* sp. causadas após exposição aos produtos LPAM e LTAM

A porcentagem de células com PS externalizado após a exposição (24 h) a AMB (controle positivo), FLC (controle negativo) e os surfactantes à base de aminoácidos catiônicos é mostrada na Figura 10. Embora insignificante em células tratadas e não tratadas com FLC, a porcentagem de células com PS externalizado (soma dos estágios inicial e final) foi significativa em culturas de levedura tratadas com LPAM e LTAM em três concentrações diferentes (CIM, 2xCIM e 4xCIM) após 24 horas de incubação.

Figura 10 - Externalização de fosfatidilserina em células de *Candida* spp. após tratamento com LPAM e LTAM.

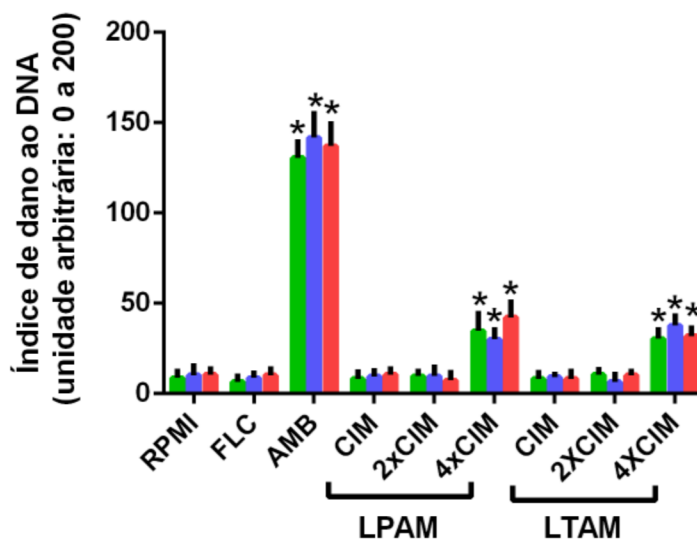


As células de *C. parapsilosis* (■), *C. tropicalis* (■), *C. albicans* (■) foram tratadas com LPAM e LTAM (CIM= 8,12 µg/ml, 2xCIM=16,24 µg/ml e 4xCIM=32,48 µg/ml), FLC (CIM=64 µg/mL), AMB (CIM= 4 µg/mL; controle de morte) e RPMI (controle negativo). Após 24 horas, foram corados com brometo de etídio e analisados por citometria de fluxo. Os dados são apresentados como a média ± erro padrão da média (E.P.M) em três experimentos independentes realizados em duplicata *p<0,05 comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.3.5 Avaliação de danos ao DNA em células de *Candida* spp. causadas após exposição aos produtos LPAM e LTAM

As células tratadas com FLC não mostraram qualquer dano ao DNA, enquanto numerosas quebras de DNA foram observadas nas células de controle positivo tratadas com AMB (Figura 11). Após 24 horas de exposição a LPAM e LTAM, nenhum dano significativo ao DNA da célula foi detectado para CIM e 2xCIM. Em 4xCIM foi observada alguma porcentagem de quebras nas fitas de DNA; cerca de 30 % das quebras obtidas para o AMB (valores na faixa de 30-40 foram obtidos para os tensoativos catiônicos enquanto valores em torno de 130 foram obtidos para o AMB).

Figura 11- Dano ao DNA em células de *Candida* spp. após tratamento com LPAM e LTAM.



As células de *C. parapsilosis* (■), *C. tropicalis* (■), e *C. albicans* (■) foram tratadas com LPAM e LTAM (CIM= 8,12 µg/ml, 2xCIM=16,24 µg/ml e 4xCIM=32,48 µg/ml), FLC (CIM=64 µg/mL), AMB (CIM= 4 µg/mL; controle de morte) e RPMI (controle negativo) . Após 24 horas, foram corados com brometo de etídio e analisados por citometria de fluxo. Os dados são apresentados como a média ± erro padrão da média (E.P.M) em três experimentos independentes realizados em duplicata.*p<0,05 comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.4 Avaliação da citotoxicidade dos produtos LPAM e LTAM frente a células L929

A citotoxicidade contra células L929 de mamíferos foi determinada e na concentração de 3xCIM (25 µg/mL) 80-100 % das células sobreviveram.

6.5 Atividade antibacteriana dos produtos LPAM e LTAM frente a cepas planctônicas de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA)

A atividade antibacteriana foi avaliada usando 14 cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e 6 cepas de *S.aureus* sensíveis a meticilina. Como controle, foram utilizadas 2 cepas de *S.aureus* ATCC, uma resistente (65398) e uma sensível a meticina (6538). A Tabela 5 mostra os valores de CIM obtidos para LPAM e LTAM. O CIM foi definido como a concentração mais baixa que produziu uma redução de 100 % no crescimento das células bacterianas. Os valores CIM de meticilina contra cepas não ATCC (≥ 32 µg/mL) indicam sua resistência a este medicamento. LPAM e LTAM apresentaram boa atividade antibacteriana contra todas as cepas, com CIM variando de 4,06 a 16,25 µg/mL para ambos os compostos.

Tabela 5 - Valores de CIM obtidos para os tensoativos catiônicos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e *S.aureus* sensíveis a meticilina.

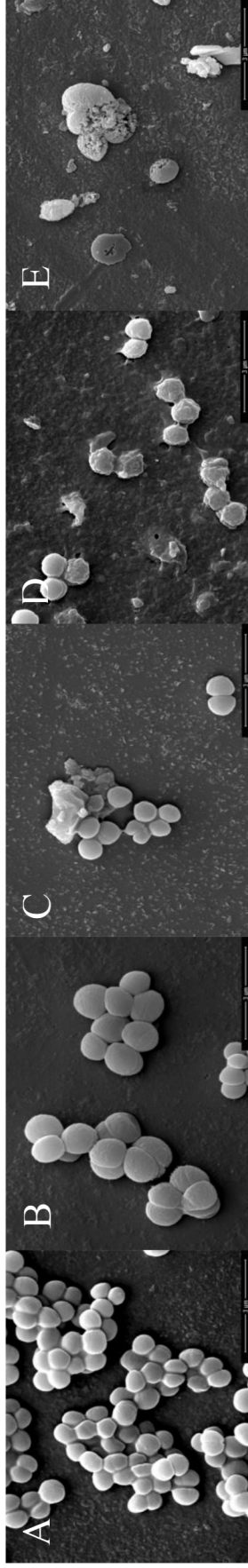
Cepa	Compostos			
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)			
	Oxacilina	Vancomicina	LPAM	LTAM
<i>S.aureus</i> 1	0,25	0,5	4,06	4,06
<i>S.aureus</i> 2	0,5	4	4,06	4,06
<i>S.aureus</i> 3	0,5	2	4,06	4,06
<i>S.aureus</i> 4	0,5	0,5	4,06	4,06
<i>S.aureus</i> 5	1,0	0,5	4,06	4,06
<i>S.aureus</i> 6	0,25	0,5	4,06	4,06
MRSA 1	8	2	4,06	16,25
MRSA 2*	256	2	8,12	8,12
MRSA 3	1024	2	8,12	16,25
MRSA 4* **	128	1	16,25	8,12
MRSA 5	64	1	8,12	4,06
MRSA 6	16	2	8,12	16,25
MRSA 7	128	1	8,12	8,12
MRSA 8	64	1	8,12	8,12
MRSA 9	512	2	8,12	4,06
MRSA 10	16	0,5	8,12	4,06
MRSA 11	64	2	8,12	8,12
MRSA 12	64	1	8,12	4,06
MRSA 13*	16	1	8,12	16,25
MRSA 14	64	>16	8,12	16,25
<i>S.aureus</i> ATCC 6538	4	0,5	8,12	4,06
MRSA ATCC 65398	4	2	8,12	4,06

* Cepas usadas no ensaio de biofilme formado
 ** Cepas usadas no ensaio de citometria e microscopia
S.aureus ATCC 6538 e MRSA ATCC 65398 cepas controle

6.5.1 Avaliação de cepas planctônicas de *S. aureus* resistentes a metilicina (MRSA) tratados com os produtos LPAM e LTAM por MEV

Imagens de MEV foram realizadas para mostrar as diferenças estruturais obtidas quando células de MRSA tratadas na concentração CIM e CIM/4 de LPAM e LTAM (Figura 12). No controle (Figura 12A e 12F) pode-se observar um grande número de células, sem alterações em sua morfologia. Nas células tratadas em concentrações de CIM/4 (4,06 e 2,06 $\mu\text{g/mL}$) (figura 12G e 12H) pode-se observar muitas células sem alterações morfológicas. Quando observada a concentração de CIM (16,24 e 8,12 $\mu\text{g/mL}$) (figura 12I e 12J) verifica-se a presença de poucas células e danos em sua morfologia celular.

Figura 12 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de células de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)

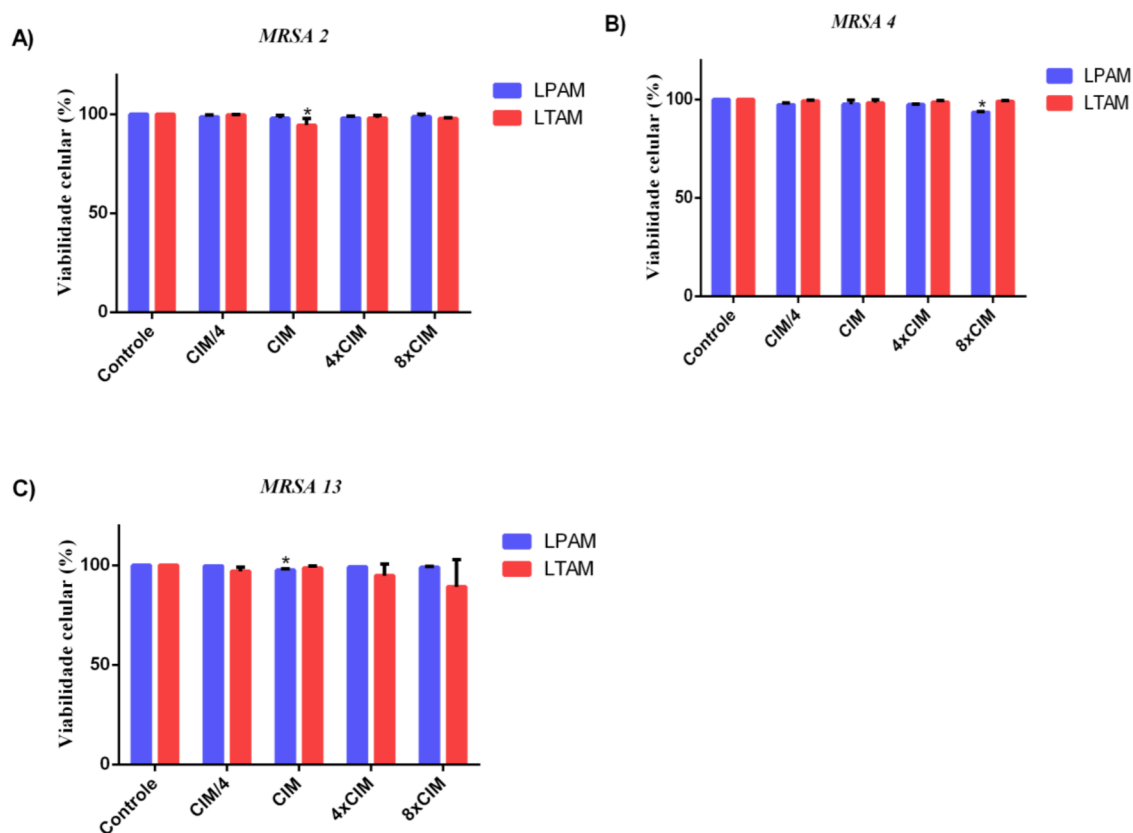


A: controle, B: células tratadas com 4,06 µg/mL de LPAM, C: células tratadas com 2,03 µg/mL de LTAM, D: células tratadas com 16,25 µg/mL de LPAM, E: células tratadas com 8,12 µg/mL de LTAM em ampliação de 40000X (Bar 3 µm).

6.6 Biofilme

Após a confirmação da atividade antifúngica de LPAM e LTAM contra MRSA na forma planctônica, foi analisada sua atividade contra biofilme formado (24 h) em três cepas de MRSA selecionadas: MRSA 2, MRSA 4 e MRSA 13. Concentrações inibitórias e subinibitórias (MIC/4, MIC, 4xMIC, 8xMIC) foram utilizados e observou-se que não houve redução da viabilidade celular do biofilme nas cepas de MRSA (Figura 13).

Figura 13 - Efeito de LPAM e LTAM contra biofilme formado de MRSA de acordo com o ensaio de MTT.



Cepas de MRSA 2 (A), MRSA 4 (B) e MRSA 13 (C) após 24 h. LPAM testou concentrações contra MRSA 2 e 13: MIC / 4 (2,03 µg/mL), MIC (8,12 µg / mL), 4xMIC (32,48 µg/mL), 8xMIC (64,96 µg/mL). LPAM testou concentrações contra MRSA 4: MIC / 4 (4,06 µg/mL), MIC (16,25 µg/mL), 4xMIC (65,00 µg/mL), 8xMIC (130,00 µg/mL). LTAM testou concentrações contra MRSA 2 e 4: MIC/4 (2,03 µg/mL), MIC (8,12 µg/mL), 4xMIC (32,48 µg/mL), 8xMIC (64,96 µg/mL). LTAM testou concentrações contra MRSA 13: MIC/4 (4,06 µg/mL), MIC (16,24 µg/mL), 4xMIC (64,96 µg/mL), 8xMIC (129,92µg/mL). *p<0,05 comparado ao controle pela ANOVA seguida pelo Newman-Keuls test.

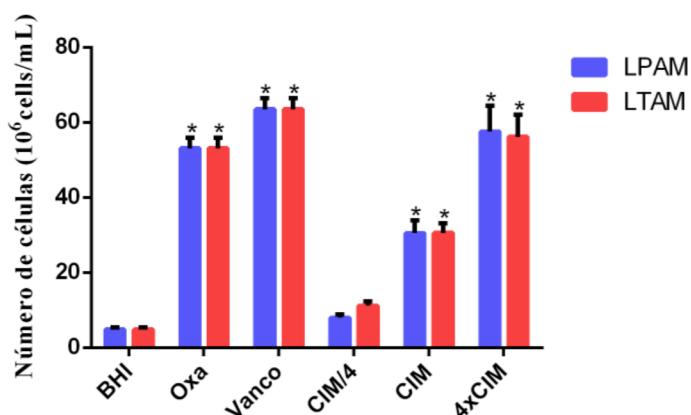
6.7 Avaliação preliminar do mecanismo envolvido na ação antibacteriana dos produtos LPAM e LTAM contra uma cepa de MRSA

6.7.1 Integridade de membrana

A fim de investigar se havia diferenças nos eventos celulares analisados após a exposição a LPAM e LTAM, uma cepa representativa foi selecionada (Tabela 5). As análises foram realizadas após 24 horas de exposição aos produtos.

De acordo com a Figura 14, LPAM e LTAM nas concentrações de MIC/4 (7,94 %, 11,13 %), MIC (30,53 %, 30,58 %) e 4xCIM (57,55 %, 56,14 %), respectivamente, promoveram aumento significativo ($p < 0,05$) no número de células inviáveis na cepa MRSA, após 24 h de exposição, em relação ao controle (BHI). A vancomicina (63,50 %) e a oxacilina (53,12 %) foram utilizadas como controle positivo e, após 24 horas de exposição, houve um aumento no número de células inviáveis quando comparadas ao controle negativo (4,82 %) na cepa testada.

Figura 14 - Efeito de LPAM e LTAM no número de células não viáveis na cepa representativa de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) avaliada por citometria de fluxo.



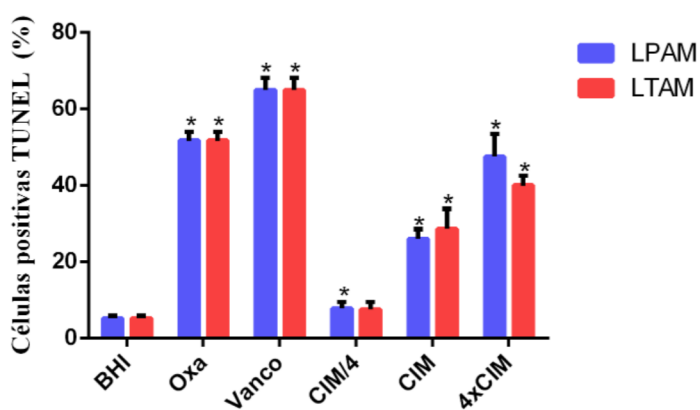
BHI (Brain Heart Infusion Broth) foi usado como controle negativo. Oxa: oxacilina; Vanco: Vancomicina; LPAM - MIC/4 = 4,06 µg/mL, MIC = 16,24 µg/mL, 4xMIC = 64,96 µg/mL; LTAM - MIC/4 = 2,03 µg/mL, MIC = 8,12 µg/mL, 4xMIC = 32,48 µg/mL. (* $p < 0,05$ comparado ao controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

6.7.2 Análise de fragmentação de DNA

O teste TUNEL foi usado para verificar quebras no DNA de MRSA, quando tratado com LPAM e LTAM. A Figura 15 mostra que em relação ao 4xMIC, houve um aumento no

dano ao DNA (47,51 % para LPAM e 39,95 % para LTAM) na cepa testada ($P < 0,05$), enquanto o grupo controle (não tratado) apresentou 5,2 % de células MRSA, coradas com um marcador de citofluorometria. Oxacilina (51,70 %), vancomicina (51,71 %).

Figura 15 - Teste de TUNEL na cepa representativa de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA,) mostrando fragmentação de DNA após incubação com LPAM e LTAM.



BHI (caldo de infusão de cérebro e coração) foi usado como controle negativo. Oxa: oxacilina; Vanco: Vancomicina; LPAM - MIC/4 = 4,06 $\mu\text{g/mL}$, MIC = 16,24 $\mu\text{g/mL}$, 4xMIC = 64,96 $\mu\text{g/mL}$; LTAM - MIC/4 = 2,03 $\mu\text{g/mL}$, MIC = 8,12 $\mu\text{g/mL}$, 4xMIC = 32,48 $\mu\text{g/mL}$. (* $p < 0,05$ em comparação ao controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls).

6.8 Docagem molecular

Inicialmente foi utilizado o critério RMSD (*Root Mean Square Deviation*) para validação estatística das simulações e seleção da *best pose*. Todas as simulações realizadas apresentaram valores inferiores a 2 Å (Tabela 6). A partir da escolha da *best poses* foi avaliada a energia de afinidade dos complexos formados, com destaque para a *best pose* dos complexos formados com os receptores *S. aureus gyrase complex with DNA* e *S. aureus gyrase* que apresentaram os melhores valores de energia de afinidade, ambos de -7.3 kcal/mol com LPAM, e *S. aureus gyrase complex with DNA* (-8.5 kcal/mol) e *S. aureus gyrase* (-7.9 kcal/mol) com LTAM.

S. aureus gyrase complex with DNA, *S. aureus gyrase*, *Wild-type S. aureus DHFR*, *Acyl-PBP2a from MRSA* e *DNA (5'-D (*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3')* complexados a LPAM e LTAM apresentaram constante de inibição na ordem de 4.46×10^{-6} , 4.46×10^{-6} , 2.41×10^{-5} , 2.86×10^{-5} e 5.61×10^{-5} respectivamente quando complexados a LPAM e 5.89×10^{-7} , 1.62×10^{-6} , 8.77×10^{-6} , 3.38×10^{-5} e 6.64×10^{-5} quando complexados a LTAM. A partir do valor de K_i foi possível calcular o pK_i para complexos formados com *S. aureus gyrase complex with DNA*, *S. aureus gyrase*, *Wild-type S. aureus DHFR*, *Acyl-PBP2a from MRSA* and *DNA (5'-D (*CP*GP) *CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3')*, obtendo valores de 5.35, 5.35, 4.62, 4.54 e 4.25 respectivamente para complexos formados com LPAM e valores de 6.23, 5.79, 5.05, 4.47 e 4.18, respectivamente para complexos formados com LTAM (Tabela 1).

Tabela 6 - Valores de energia de afinidade e RMSD dos complexos formados após simulações de docking, organizados a partir da energia de afinidade.

Ligand - Receptor	Energy (kcal/mol)	K_i	pK_i	RMSD (Å)
LPAM - <i>S. aureus gyrase complex with DNA</i> ^a	-7.3	4.46×10^{-6}	5.35	1.617
LPAM - <i>S. aureus gyrase</i> ^b	-7.3	4.46×10^{-6}	5.35	1.821
LPAM - <i>Wild-type S. aureus DHFR</i> ^c	-6.3	2.41×10^{-5}	4.62	1.501
LPAM - <i>Acyl-PBP2a from MRSA</i> ^d	-6.2	2.86×10^{-5}	4.54	1.644
LPAM - <i>DNA (5'-D (*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3')</i>	-5.8	5.61×10^{-5}	4.25	1.752

<i>TP*TP*CP*GP*CP*G</i> -3') ^c				
LTAM - <i>S. aureus</i> gyrase complex with DNA ^a	-8.5	5.89 x 10 ⁻⁷	6.23	1.713
LTAM - <i>S. aureus</i> gyrase ^b	-7.9	1.62 x 10 ⁻⁶	5.79	1.188
LTAM - Wild-type <i>S. aureus</i> DHFR ^c	-6.9	8.77 x 10 ⁻⁶	5.05	1.564
LTAM - Acyl-PBP2a from MRSA ^d	-6.1	3.38 x 10 ⁻⁵	4.47	1.869
LTAM - DNA (5'-D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') ^e	-5.7	6.64 x 10 ⁻⁵	4.18	1.627

a. The crystal structure of *S. aureus* gyrase complex with DNA - PDB ID: 2XCT.

b. The crystal structure of *S. aureus* gyrase - PDB ID: 5BS3.

c. The crystal structure of Wild-type *S. aureus* DHFR - PDB ID: 2W9G.

d. The crystal structure of Acyl-PBP2a from MRSA residue -PDB ID: 3ZFZ.

e. The crystal structure of DNA (5'-D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') - PDB ID: 453D.

A tabela 7 mostra as interações envolvidas na formação dos complexos proteína-ligante e na figura 16 pode-se observar as interação dos complexos formados entre o ligante de LPAM, em que foi possível identificar que o complexo LPAM-*S. aureus* gyrase complex with DNA é formado predominantemente por Ligação de hidrogênio envolvendo os resíduos Asn1182B (2.19 Å), Gln1267B (2.74 Å), Gly1332B (2.19 Å), Gly1332B (2.44 Å), Ade18H (2.34 Å), Cyt19H (5.35 Å) e Gua2E (2.82 Å), apresentou também duas interações hidrofóbicas com os resíduos Val1268B (5.15 Å) e Pro1326B (5.48 Å). O complexo LPAM - *S. aureus* gyrase DNA também é formado predominantemente por Ligação de hidrogênioenvolvendo os resíduos Gly1174D (3.51 Å), Thr1181D (2.02 Å), Asn1182D (2.28 e 2.77 Å), Cyt4F (3.60 Å), Cyt19E (3.55 e 3.78 Å), Gual17E (2.45 Å) e Gual18E (2.05, 2.52 e 4.67 Å), apresentou uma interação hidrofóbica com Pro1326D (4.90 Å) e uma Unfavorable Donor-Donor com Gual17E (4.67 Å). O complexo LPAM - Wild-type *S. aureus* DHFR apresentou seis interações hidrofóbicas com Leu5A (4.03 Å), Leu20A (4.43 Å), Val31A (4.49 Å), Ile50A (3.96 Å), Phe92A (4.54 Å), NPD1160A (4.67Å), três Ligação de hidrogênio com Leu20A (2.03 Å), Trp22A (3.71 Å) e Ile50A (3.52 Å). O complexo LPAM - Acyl-PBP2a from MRSA apresentou

quatro interações hidrofóbicas com Val217B (5.22 Å), Tyr369B (4.55 Å), Pro370B (3.93 e 4.29 Å), seis Ligações de hidrogênio com Glu189B (2.54 Å), Lys219B (2.26 e 2.86 Å), Asp221B (3.45 Å), Asp367B (2.46 Å), Glu379B (1.95 Å) e duas Attractive Charge com Glu189B (5.33 Å) e Glu379B (4.09 Å). O complexo LPAM - DNA (5'-D (*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') é formado predominantemente por Ligações de hidrogênio envolvendo os resíduos Thy7A (2.23 Å), Ade5A (1.93 Å), Ade6A (2.24, 3.44 e 3.77 Å), Gua4A (3.00 e 3.05 Å), Cyt21B (3.28 Å), e Gua22B (2.09, 2.54 e 2.99 Å), apresentou também duas interações hidrofóbicas com os resíduos Ade5A (4.99 Å), Cyt21B (5.17 Å), uma Attractive Charge com Thy7A (4.96 Å) e uma Unfavorable Donor-Donor com Gua22B (2.54 Å).

Tabela 7 - Interações do ligante LPAM com os receptores *S. aureus* gyrase complex with DNA ^a, *S. aureus* gyrase ^b, Wild-type *S. aureus* DHFR ^c, Acyl-PBP2a from MRSA ^d e DNA (5'-D (*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') ^e.

Receptor	Resíduo	Interação	Distancia (Å)
<i>S. aureus</i> gyrase complex with DNA ^a	Val1268B	Hidrofóbica	5.15
	Pro1326B	Hidrofóbica	5.48
	Asn1182B	Ligação de hidrogênio	2.19
	Gln1267B	Ligação de hidrogênio	2.74
	Gly1332B	Ligação de hidrogênio	2.19
	Gly1332B	Ligação de hidrogênio	2.44
	Ade18H	Ligação de hidrogênio	2.34
	Cyt19H	Ligação de hidrogênio	5.35
<i>S. aureus</i> gyrase ^b	Gua2E	Ligação de hidrogênio	2.82
	Pro1326D	Hidrofóbica	4.90
	Gly1174D	Ligação de hidrogênio	3.51
	Thr1181D	Ligação de hidrogênio	2.02
	Asn1182D	Ligação de hidrogênio	2.28
	Asn1182D	Ligação de hidrogênio	2.77
	Cyt4F	Ligação de hidrogênio	3.60
	Cyt19E	Ligação de hidrogênio	3.55
	Cyt19E	Ligação de hidrogênio	3.78
	Gua17E	Ligação de hidrogênio	2.45
	Gua18E	Ligação de hidrogênio	2.05
	Gua18E	Ligação de hidrogênio	2.52
	Gua18E	Ligação de hidrogênio	4.67
	Gua17E	Unfavorable Donor-Donor	4.67

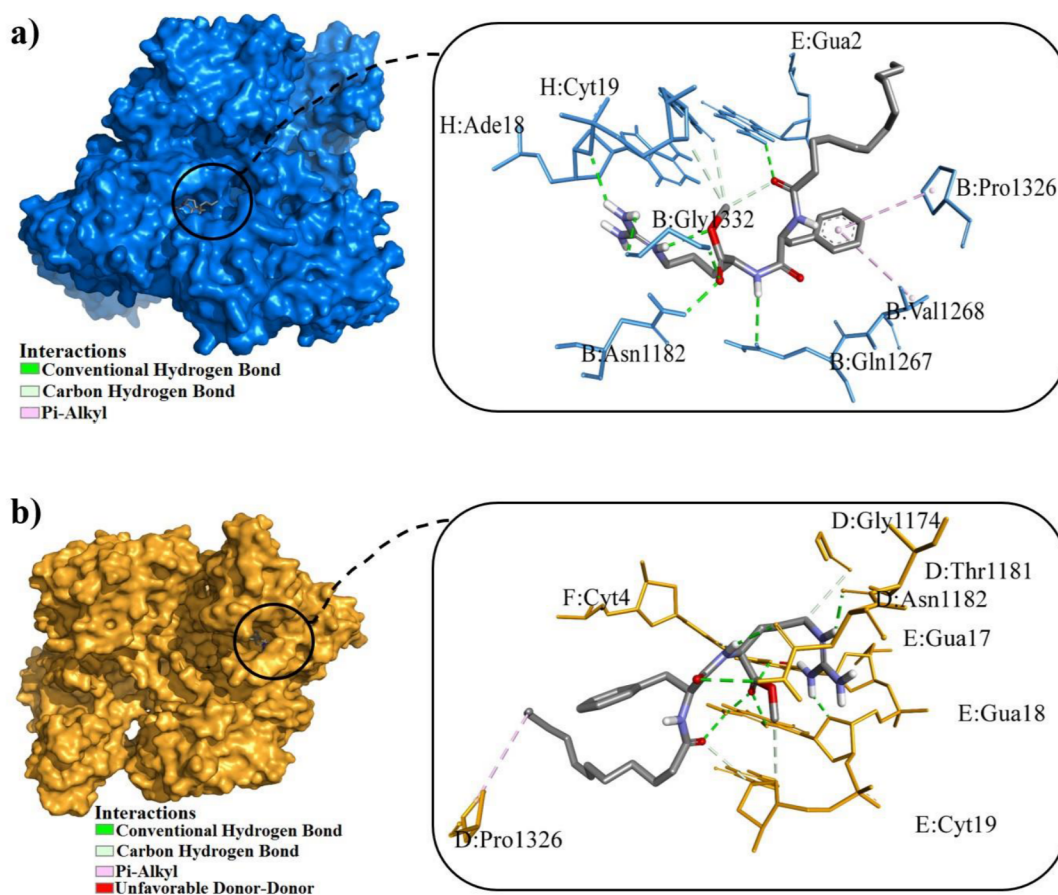
<i>Wild-type S. aureus DHFR</i> ^c	Leu5A	Hidrofóbica	4.03	
	Leu20A	Hidrofóbica	4.43	
	Val31A	Hidrofóbica	4.49	
	Ile50A	Hidrofóbica	3.96	
	Phe92A	Hidrofóbica	4.54	
	NPD1160A	Hidrofóbica	4.67	
	Leu20A	Ligação de hidrogênio	2.03	
	Trp22A	Ligação de hidrogênio	3.71	
	Ile50A	Ligação de hidrogênio	3.52	
	<i>Acyl-PBP2a from MRSA</i> ^d	Val217B	Hidrofóbica	5.22
Tyr369B		Hidrofóbica	4.55	
Pro370B		Hidrofóbica	3.93	
Pro370B		Hidrofóbica	4.29	
Glu189B		Ligação de hidrogênio	2.54	
Lys219B		Ligação de hidrogênio	2.26	
Lys219B		Ligação de hidrogênio	2.86	
Asp221B		Ligação de hidrogênio	3.45	
Asp367B		Ligação de hidrogênio	2.46	
Glu379B		Ligação de hidrogênio	1.95	
Glu189B		Attractive Charge	5.33	
Glu379B		Attractive Charge	4.09	
DNA (5'-D (*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP* GP*CP*G)-3') ^e		Ade5A	Hidrofóbica	4.99
		Cyt21B	Hidrofóbica	5.17
		Thy7A	Ligação de hidrogênio	2.23
	Ade5A	Ligação de hidrogênio	1.93	
	Ade6A	Ligação de hidrogênio	2.24	
	Ade6A	Ligação de hidrogênio	3.44	
	Ade6A	Ligação de hidrogênio	3.77	
	Gua4A	Ligação de hidrogênio	3.00	
	Gua4A	Ligação de hidrogênio	3.05	
	Cyt21B	Ligação de hidrogênio	3.28	
	Gua22B	Ligação de hidrogênio	2.09	
	Gua22B	Ligação de hidrogênio	2.54	
	Gua22B	Ligação de hidrogênio	2.99	
	Thy7A	Attractive Charge	4.96	
	Gua22B	Unfavorable Donor-Donor	2.54	

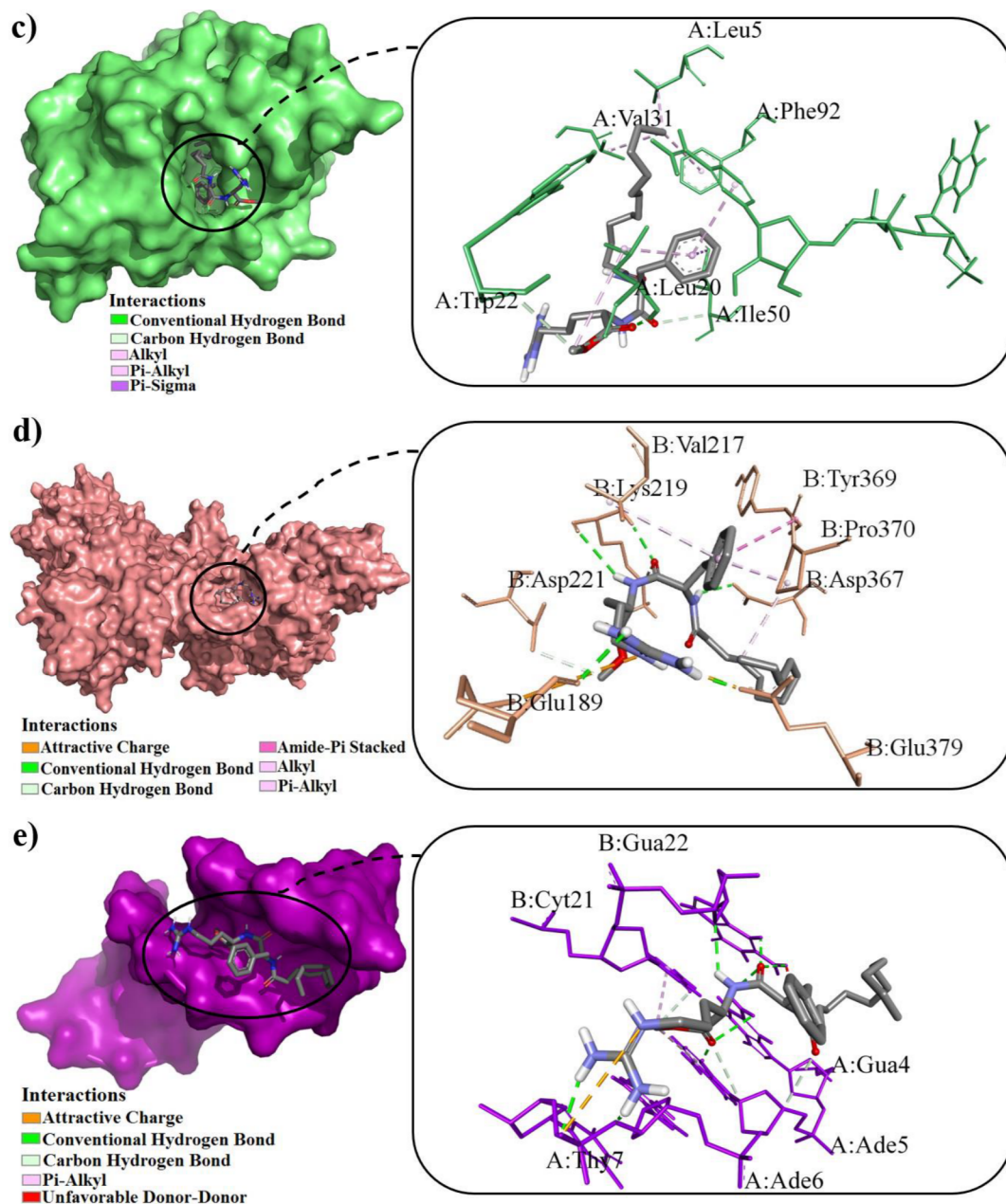
a. Estrutura cristal de *S. aureus* gyrase complex com DNA - PDB ID: 2XCT.

b Estrutura cristal de *S. aureus* gyrase - PDB ID: 5BS3.

- c. Estrutura cristal de *S. aureus* DHFR - PDB ID: 2W9G.
 d. Estrutura cristal da Acyl-PBP2a do resíduo de MRSA -PDB ID: 3ZFZ.
 e. Estrutura cristal do DNA (5'-D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') - PDB ID: 453D.

Figura 15 - Complexos de interação entre o ligante LPAM com os receptores *S. aureus* gyrase complex with DNA (a), *S. aureus* gyrase (b), Wild-type *S. aureus* DHFR (c), Acyl-PBP2a from MRSA residue (d) e DNA (5'-D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') (e)





(a), *S. aureus* gyrase (b), Wild-type *S. aureus* DHFR (c), Acyl-PBP2a from MRSA residue (d) and DNA (5'-D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') (e).

É possível identificar na tabela 8 as interações envolvidas na formação dos complexos proteína-ligante, e na figura 17 pode-se observar a interação dos complexos formados entre o ligante de LTAM com os receptores, onde o complexo LTAM-*S. aureus* gyrase complex with DNA é formado por cinco interações hidrofóbicas com os resíduos Ala1180B (4.28 Å), Val1268B (5.07 e 5.23Å), Pro1326B (4.80 Å), Ade18H (4.98 Å); cinco Ligação de hidrogênio

envolvendo os resíduos Gln1267B (2.37 Å), Ser1330B (2.16 Å), Ade20H (2.60 Å), Gua2E (1.98 e 2.14 Å); uma interação *Unfavorable Positive-Positive* com Lys1276B (3.50 Å) e uma *Unfavorable Donor-Donor* com Gua2E (2.29 Å). O complexo LTAM - *S. aureus gyrase* é formado predominantemente por Ligação de hidrogênio envolvendo os resíduos Gly1174D (2.94 Å), Thr1181D (2.73 Å), Gly1332D (3.41 Å), Cyt3F (2.29 Å) e Gua18E (2.73 e 3.54 Å), apresentou quatro interações hidrofóbicas envolvendo os resíduos Val1268D (4.92 Å), Pro1326D (5.49 Å), Gua2F (5.23 Å), Cyt3F (5.22 Å) e uma interação *Unfavorable Donor-Donor* com Asn1182D (2.09 Å). O complexo LTAM - *Wild-type S. aureus DHFR* é formado predominantemente por interações hidrofóbicas envolvendo os resíduos Leu5A (4.22 Å), Leu20A (4.31 Å), Leu28A (4.69 e 4.70 Å), Val31A (4.49 e 5.48 Å), Ile50A (5.18 Å), Leu54A (3.81 e 5.45 Å) e Phe92A (5.16 Å); o complexo também apresentou uma interação *Unfavorable Positive-Positive* com His23A (5.51 Å). O complexo LTAM - *Acyl-PBP2a from MRSA* apresentou cinco interações hidrofóbicas com Val217A (4.86 Å), Lys218A (4.21 Å), Lys219A (4.31 Å), Leu224A (5.40 Å), Tyr369A (5.03 Å) e uma H-Bond com Glu189A (2.84 Å). O complexo LTAM - *DNA (5'-D (*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3')* é formado predominantemente por Ligação de hidrogênio envolvendo os resíduos Gua4A (2.20 e 2.37 Å), Ade5A (2.25 Å), Cyt21B (2.49 Å) e Gua22B (1.81, 2.37, 2.38, 2.56 e 2.67 Å), apresentou também uma interação hidrofóbica com o resíduo Cyt21B (5.47 Å) e uma interação de carga atrativa com Gua22B (5.06 Å).

Tabela 8 - Interações do ligante LTAM com os receptores *S. aureus gyrase complex with DNA*^a, *S. aureus gyrase*^b, *Wild-type S. aureus DHFR*^c, *Acyl-PBP2a from MRSA*^d e *DNA (5'-D (*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3')*^e

Receptor	Resíduo	Interação	Distancia (Å)
<i>S. aureus gyrase complex with DNA</i> ^a	Ala1180B	Hidrofóbica	4.28
	Val1268B	Hidrofóbica	5.07
	Val1268B	Hidrofóbica	5.23
	Pro1326B	Hidrofóbica	4.80
	Ade18H	Hidrofóbica	4.98
	Gln1267B	Ligação de hidrogenio	2.37
	Ser1330B	Ligação de hidrogenio	2.16
	Ade20H	Ligação de hidrogenio	2.60
	Gua2E	Ligação de hidrogenio	1.98
	Gua2E	Ligação de hidrogenio	2.14

	Lys1276B	Unfavorable Positive- Positive	3.50
	Gua2E	Unfavorable Donor-Donor	2.29
<i>S. aureus gyrase</i> ^b	Val1268D	Hidrofóbica	4.92
	Pro1326D	Hidrofóbica	5.49
	Gua2F	Hidrofóbica	5.23
	Cyt3F	Hidrofóbica	5.22
	Gly1174D	Ligação de hidrogenio	2.94
	Thr1181D	Ligação de hidrogenio	2.73
	Gly1332D	Ligação de hidrogenio	3.41
	Cyt3F	Ligação de hidrogenio	2.29
	Gua18E	Ligação de hidrogenio	2.73
	Gua18E	Ligação de hidrogenio	3.54
	Asn1182D	Unfavorable Donor-Donor	2.09
<i>Wild-type S. aureus DHFR</i> ^c	Leu5A	Hidrofóbica	4.22
	Leu20A	Hidrofóbica	4.31
	Leu28A	Hidrofóbica	4.69
	Leu28A	Hidrofóbica	4.70
	Val31A	Hidrofóbica	4.49
	Val31A	Hidrofóbica	5.48
	Ile50A	Hidrofóbica	5.18
	Leu54A	Hidrofóbica	3.81
	Leu54A	Hidrofóbica	5.45
	Phe92A	Hidrofóbica	5.16
	His23A	Unfavorable Positive- Positive	5.51
<i>Acyl-PBP2a from MRSA</i> ^d	Val217A	Hidrofóbica	4.86
	Lys218A	Hidrofóbica	4.21
	Lys219A	Hidrofóbica	4.31
	Leu224A	Hidrofóbica	5.40
	Tyr369A	Hidrofóbica	5.03
	Glu189A	Ligação de hidrogenio	2.84
DNA (5'-D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') ^e	Cyt21B	Hidrofóbica	5.47
	Gua4A	Ligação de hidrogenio	2.20
	Gua4A	Ligação de hidrogenio	2.37
	Ade5A	Ligação de hidrogenio	2.25
	Cyt21B	Ligação de hidrogenio	2.49
	Gua22B	Ligação de hidrogenio	1.81
	Gua22B	Ligação de hidrogenio	2.37
	Gua22B	Ligação de hidrogenio	2.38

Gua22B	Ligação de hidrogenio	2.56
Gua22B	Ligação de hidrogenio	2.67
Gua22B	Attractive Charge	5.06

a. Estrutura cristal de *S. aureus* gyrase complex com DNA - PDB ID: 2XCT.

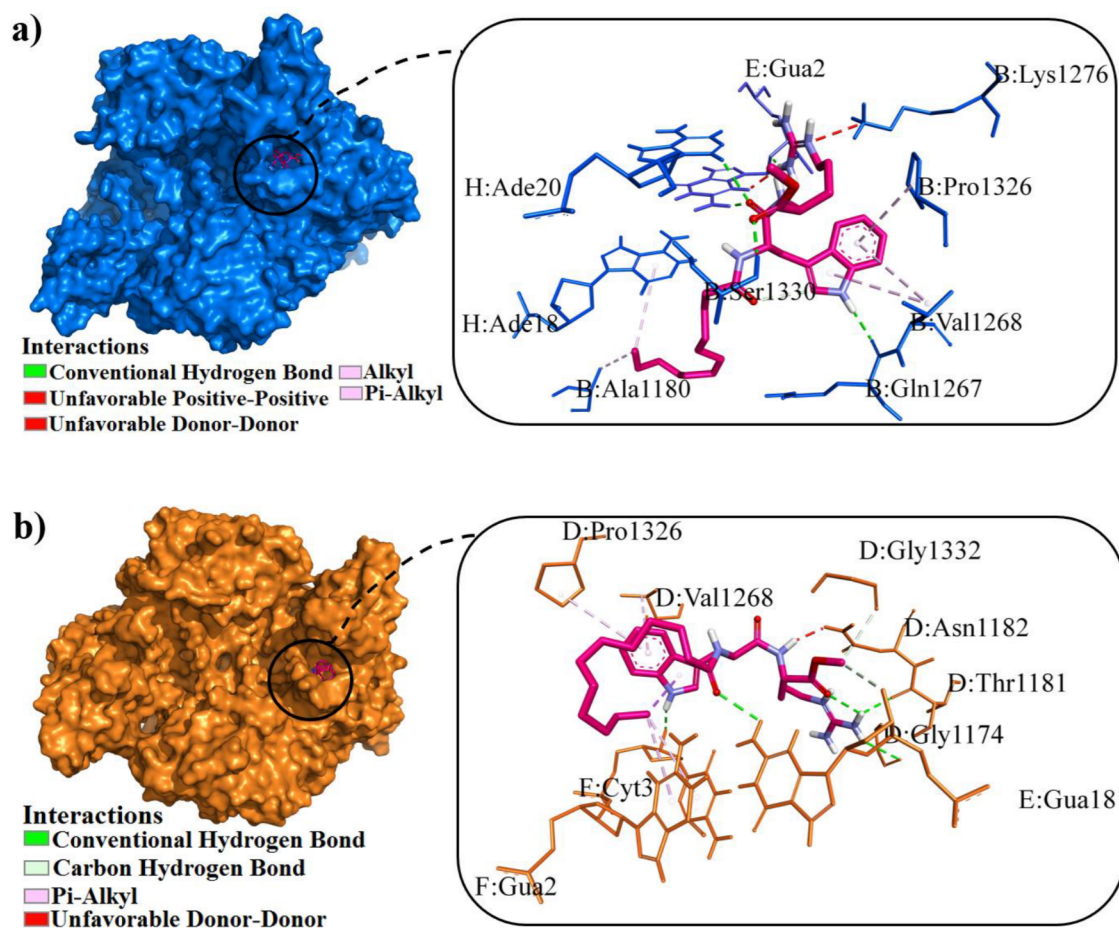
b Estrutura cristal de *S. aureus* gyrase - PDB ID: 5BS3.

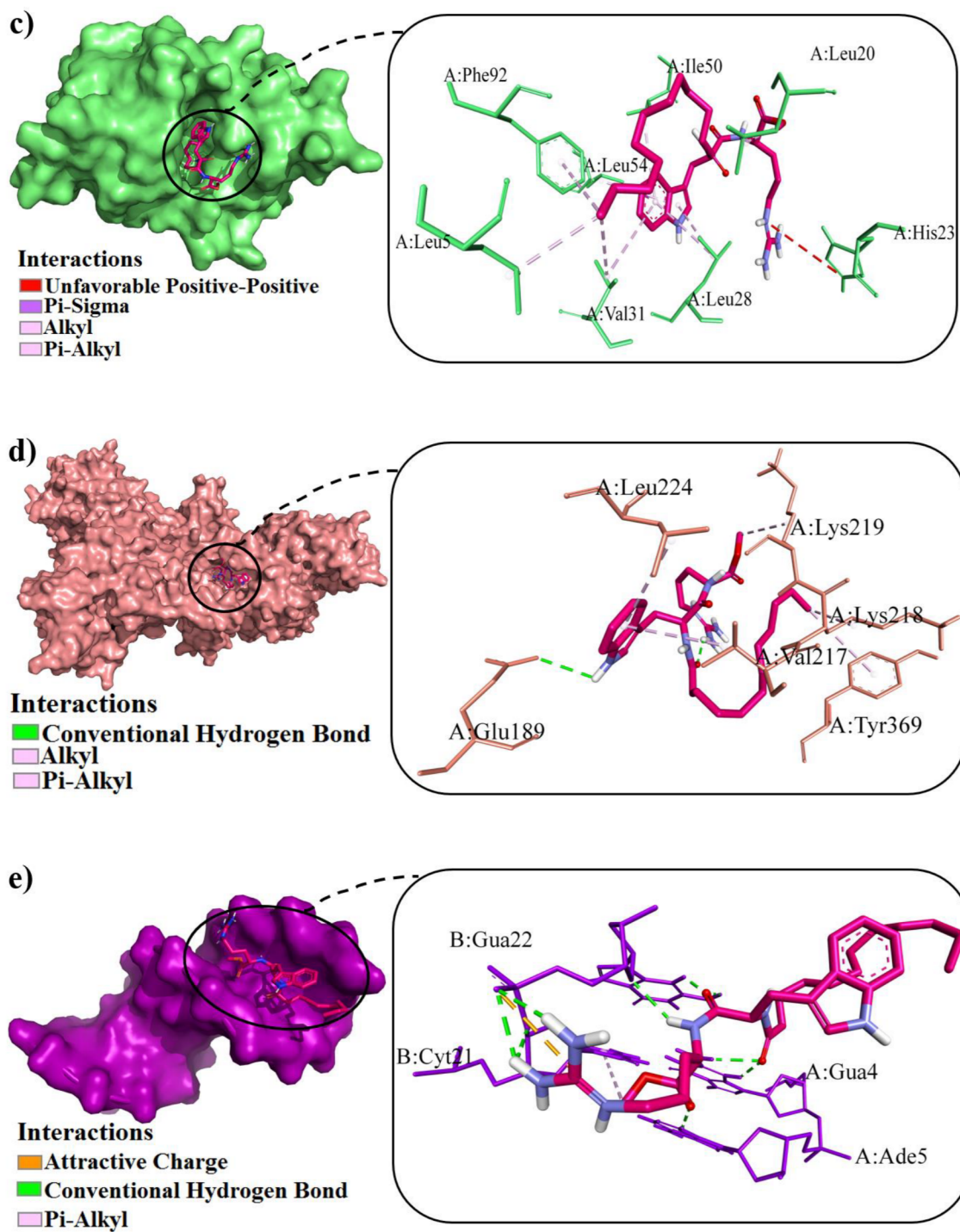
c. Estrutura cristal de *S. aureus* DHFR - PDB ID: 2W9G.

d. Estrutura cristal da Acyl-PBP2a do resíduo de MRSA -PDB ID: 3ZFZ.

e. Estrutura cristal do DNA (5'-D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') - PDB ID: 453D.

Figura 16 - Complexos de interação entre o ligante LTAM com os receptores *S. aureus* gyrase complex with DNA (a), *S. aureus* gyrase (b), Wild-type *S. aureus* DHFR (c), Acyl-PBP2a from MRSA residue (d) e DNA (5'-D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') (e)





(a), *S. aureus* gyrase (b), Wild-type *S. aureus* DHFR (c), Acyl-PBP2a from MRSA residue (d) and DNA (5'-D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3') (e).

6.9 ADMET

É possível observar na tabela 9 que LPAM e LTAM apresentam alto grau de interação com receptores de membrana, com pontuação de 0,20 para LPAM e 0,28 para LTAM com o ligante de receptor acoplado à proteína G. A previsão também mostrou que o ligante peptídico é um bom inibidor de proteases, onde a pontuação na ordem de 0,46 para LPAM e 0,44 para LTAM.

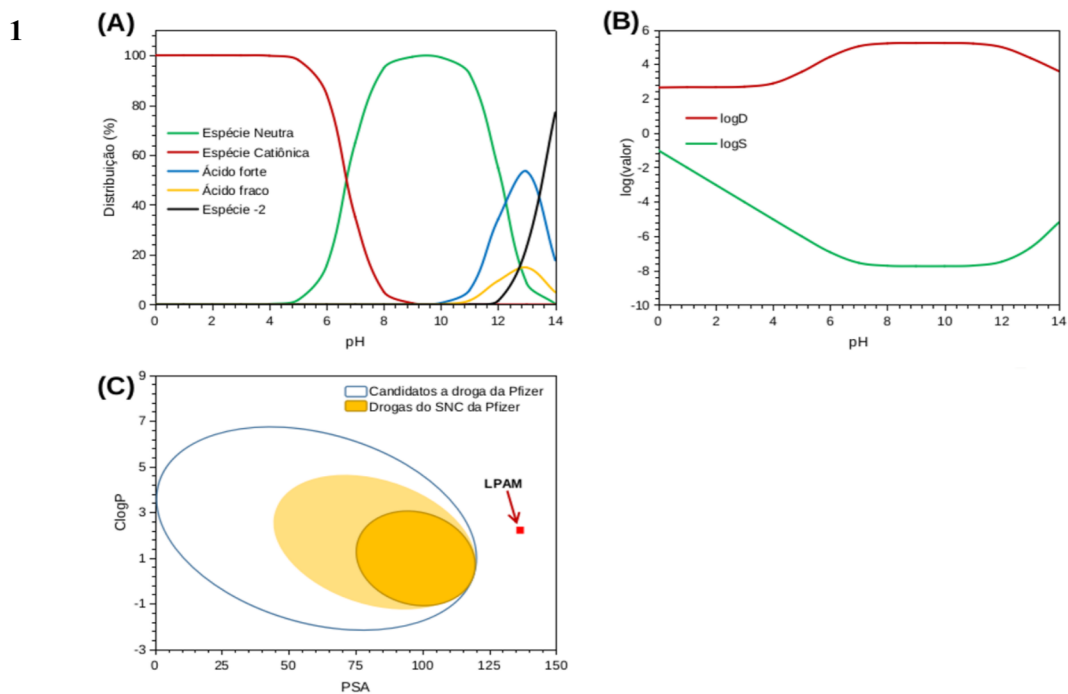
Tabela 9 - Pontuações de bioatividade com diversas classes de alvos biológicos

Bioatividade	Pontuação Molinspiration	
	LPAM	LTAM
Ligante de receptor acoplado a proteína-G	0,20	0,28
Modulador de canais iônicos	-0,05	-0,19
Inibidor de quinase	-0,16	-0,10
Ligante de receptor nuclear	-0,10	-0,20
Inibidor de protease	0,46	0,44
Inibidor enzimático	0,10	0,05

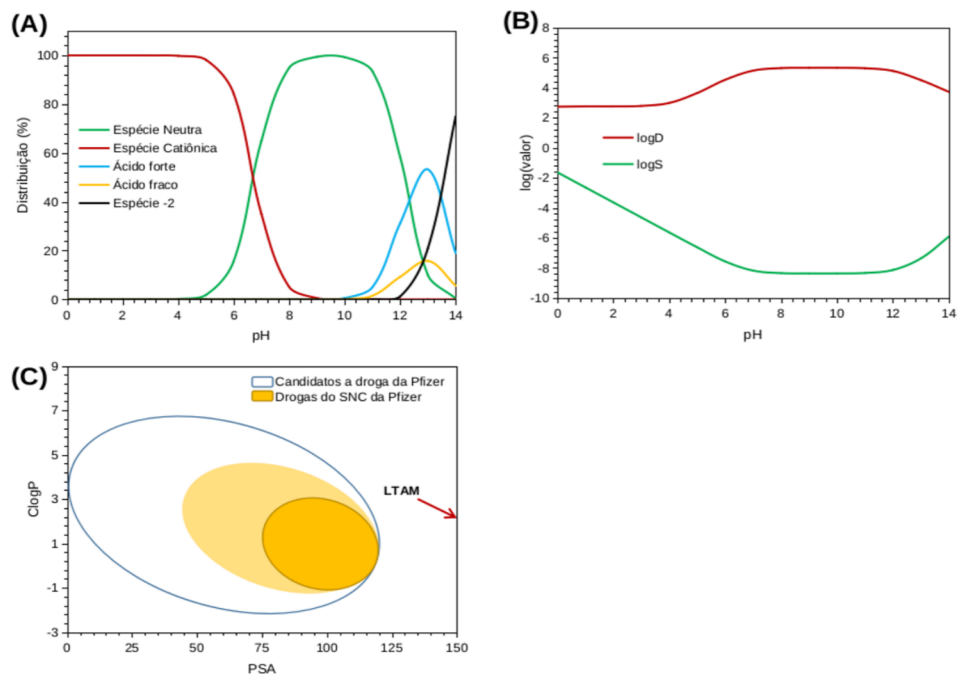
6.9.1 Lipofilicidade e solubilidade

No gráfico da Figura 17 (A) é possível observar a distribuição das possíveis espécies presentes em diferentes níveis de pH. Como tensoativo catiônico tipo N + H, o pKa calculado igual a 6,73 para a base mais forte sugere a desprotonação das moléculas que compõem o volume molecular de LPAM e LTAM, uma vez que o equilíbrio químico se desloca para a predominância das espécies desprotonadas em pH fisiológico (aproximadamente pH 7,4). Ao mesmo tempo, o valor de pKa igual a 12,20 sugere que a espécie ácida mais forte é formada apenas em níveis de pH elevados. Como resultado, a substância sofre um aumento em sua lipofilicidade, onde o valor calculado de logD na ordem de 5,14 para LPAM e 5,25 para LTAM.

Figura 17- LPAM 1 e LTAM 2: (A) Distribuição das microespécies e (B) coeficientes de distribuição e solubilidade em função da variação do pH; (C) Aproximação ao espaço físico-químico de segurança do conjunto de dados da Pfizer



2



6.9.2 Características de *druglikeness*

Os resultados envolvendo as propriedades físico-químicas calculadas e aplicadas aos critérios de “similaridade ao fármaco” estão apresentados na Tabela 10, em consenso com o espaço físico-químico dos *candidatos* a fármacos da empresa Pfizer, no gráfico da Figura 17(C).

Em relação às propriedades físico-químicas, foi possível perceber que o LTAM apresentou dupla violação do tipo MM > 500 g / mol e mais de 5 átomos doadores de ligação H (H-Bond). Em relação ao LPAM, observou-se que este composto é superior ao ideal previsto pela regra, onde a massa molecular calculada é de 553,168 g / mol (tabela 10).

Por serem propriedades que mudam inversamente entre si e com a modificação de outras propriedades físico-químicas, como MM e a soma de doadores e aceitadores de H-Bond, o perfil traçado de lipofilicidade foi de ClogP=2,211 e polaridade PSA=152,31 Å² de LTAM.

Tabela 10 - Propriedades físicas-químicas aplicadas aos critérios de “druglikeness” da empresa Pfizer, Inc

Propriedade Físico-química	Resultado		Fonte
	LPAM	LTAM	
pKa (ácido mais forte)	12,10	12,16	ChemAxon
pKa (básico mais forte)	6,73	6,73	ChemAxon
logD em pH 7.4	5,14	5,25	ChemAxon
logS em pH 7.4	-7,67	-8,28	ChemAxon
Massa molecular	553,168 g/mol	592,205 g/mol	pkCSM
ClogP	2,212	2,211	pkCSM
Aceitadores de hidrogênio	4	4	pkCSM
Doadores de hidrogênio	5	6	pkCSM
Área de Superfície Polar (PSA)	136,52 Å ²	152,31 Å ²	ChemAxon
Regra de Cinco	Sim	Não	(LIPINSKI, 2004)
Regra da Pfizer	Sim	Sim	(WAGER <i>et al.</i> , 2016)

6.9.3 Avaliação dos Parâmetros Farmacocinéticos

O valor previsto de permeabilidade em células Caco⁻² pelo conjunto de dados in vitro do servidor pré-ADMET na ordem de $2,054 \times 10^{-6}$ cm/s e $2,053 \times 10^{-6}$ cm/s foi mediado por suas microespécies dominantes de LPAM e LTAM, respectivamente em pH 7.4, capaz penetrar moderadamente nas células do trato gastrointestinal (SEVIN *et al.*, 2013) bem como seguir o modelo de permeabilidade aparente em escala logarítmica do servidor pkCSM na ordem de 0,496 e 0,345 para LPAM e LTAM respectivamente.

Uma análise semelhante é aplicada ao analisar o valor de permeabilidade aparente em MDCK na ordem de $2,774 \times 10^{-7}$ cm/s e $1,289 \times 10^{-8}$ cm/s para LPAM e LTAM respectivamente (Tabela 11), relativamente inferior ao ideal relatado na literatura, 3×10^{-6} cm/s (WANG *et al.*, 2005). Em relação a absorção intestinal, para LPAM e LTAM variou entre 43-78% como mostra a predição consensual expressa na Tabela 11.

Tabela 11 - Parâmetros farmacocinéticos do conjunto de dados in vitro dos servidores preADMET e pkCSM

Parâmetros de Absorção	Valor previsto			
	LPAM		LTAM	
	preADMET	pkCSM	preADMET	pkCSM
Permeabilidade Caco-2	$2,054 \times 10^{-6}$ cm/s	0,496 (logPapp 10^{-6} cm/s)	$2,053 \times 10^{-6}$ cm/s	0,345 (logPapp 10^{-6} cm/s)
Permeabilidade MDCK	$2,774 \times 10^{-7}$ cm/s	-	$1,289 \times 10^{-8}$ cm/s	-
Substrato da glicoproteína-P	-	Sim	-	Sim
Inibidor da glicoproteína-P I	Sim	Sim	Sim	Sim
Inibidor da glicoproteína-P II	Sim	Não	Sim	Não
Absorção intestinal	78,934 %	43,294 %	78,354 %	44,494 %

O valor previsto de logVd na ordem de -0,043 para LPAM e 0,551 para LTAM, está diretamente relacionado com a baixa fração molar disponível para distribuição entre os tecidos (0,235 para LPAM e 0,206 para LTAM), resultado do alto grau de interação com as proteínas

plasmáticas (93,570 % para LPAM e 96,578 % para LTAM). Desta forma, o coeficiente de concentração cérebro-sangue (logBB) na ordem de -1,34 para LPAM e -1,261 para LTAM sugere que a dose administrada dos tensoativos tende a ser pouco distribuída no cérebro, enquanto o coeficiente de relação permeabilidade-área de superfície (logPS) na ordem de -4,231 para LPAM e -4,226 para LTAM indica que a substância é incapaz de penetrar o SNC (Tabela 12)(PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015).

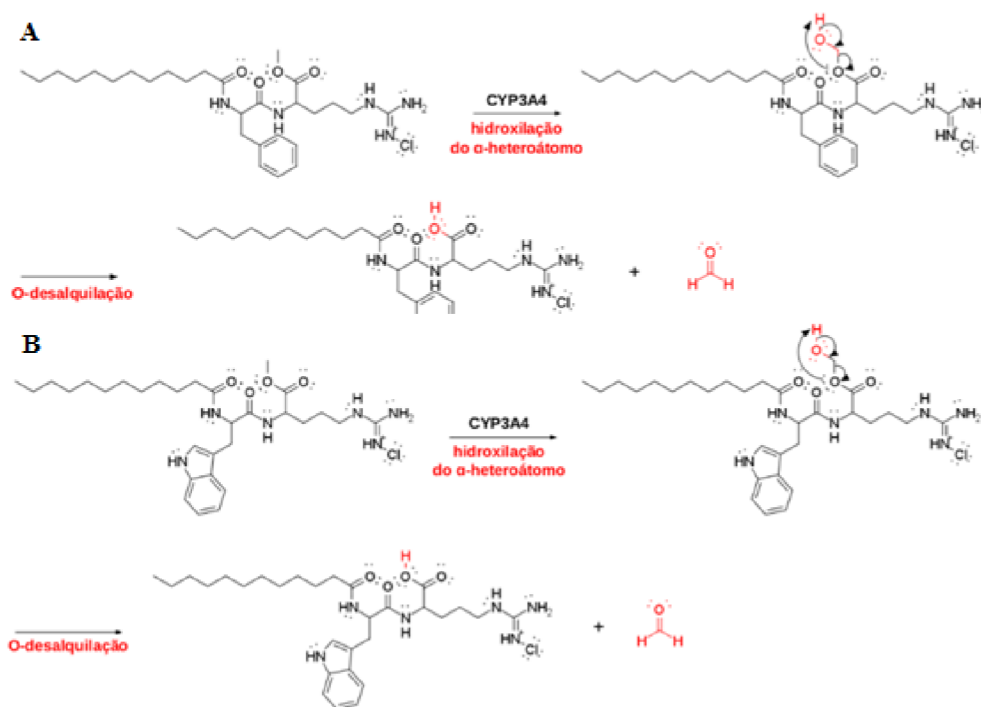
Tabela 12 - Parâmetros farmacocinéticos de volume de distribuição e acesso ao SNC do conjunto de dados *in vitro* e *in vivo* dos servidores preADMET e pkCSM

Parâmetro de Distribuição	Valor previsto	
	LPAM	LTAM
Volume de distribuição (Vd)	-0,043 (log L/kg)	0,551 (log L/kg)
Ligação às proteínas plasmáticas	93,570 %	96,578 %
Fração não ligada no plasma	0,235	0,206
Permeabilidade na BHE	-1,34 (logBB)	-1,261 (logBB)
Permeabilidade no SNC	-4,231 (logPS)	-4,226 (logPS)

6.9.4 Metabolismo, excreção e toxicidade

Os resultados mostram que LPAM e LTAM não inibiram as seguintes isoformas (2C9, 2C19, 2D6). Em relação à isoforma 3A4, o produto LPAM apresentou uma tendência relativa a ser um substrato CYP3A4 (probabilidade de 0,483), e o produto LTAM atua como um potencial inibidor desse substrato, conduzindo uma reação de O-desmetilação por substituição do grupo metil ligado a o éster de oxigênio, por um hidrogênio, resultando em uma hidroxilação conforme mostrado na figura 18, constituindo um produto mais solúvel em água e favorável à exceção.

Figura 18 - Reação de O-desalquilação da LPAM (A) e LTAM(B) conduzida por CYP3A4



Foi observado também que o produto químico gerado pelo metabolismo do LPAM e LTAM pode resultar em danos hepáticos, uma vez que a dose oral administrada excedeu a dose aguda prevista de 2,758 mol/kg (LPAM) e 2,627 mol/kg (LTAM) (Tabela 13).

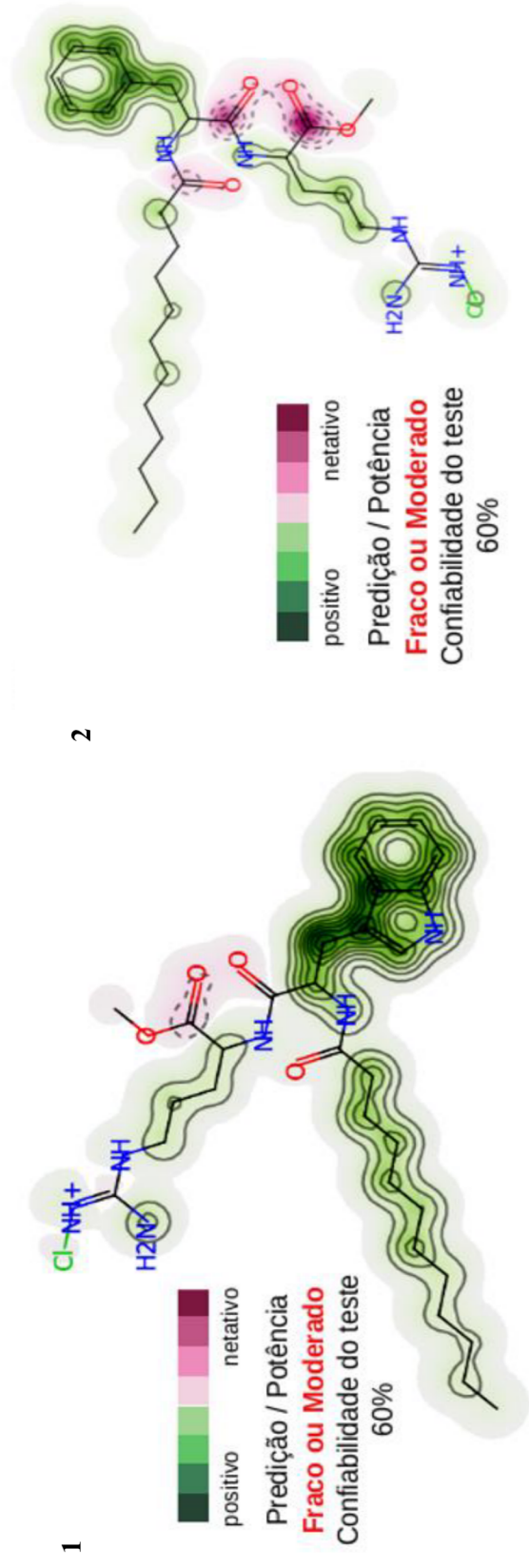
Na avaliação da resposta mutagênica, observou-se que correlacionando os dados *in vivo* os produtos LPAM e LTAM não mostraram resposta carcinogênica em ratos e camundongos e não oferecem risco mutagênico ao hospedeiro (Tabela 13).

Tabela 13 - Parâmetros de metabolismo, excreção e toxicidade (MET) da LPAM e LTAM

Parâmetro MET	Valor previsto			
	LPAM		LTAM	
	preADMET	pkCSM	preADMET	pkCSM
Substrato CYP2D6	Não	Não	Não	Não
Substrato CYP3A4	Fracamente	Sim	Fracamente	Sim
Inibidor CYP2C9	Não	Não	Não	Não
Inibidor CYP2C19	Não	Não	Não	Não
Inibidor CYP2D6	Não	Não	Não	Não
Inibitor CYP3A4	Não	Não	Sim	Sim
DL ₅₀ toxicidade aguda	-	2,758 mol/kg	-	2,627 mol/kg
Hepatotoxicidade	-	Sim	-	Sim
Mutagenicidade de Ames	No	Não	Não	Não
Carcinogenicidade	Não (para rato e camundongo)	-	Não (para rato e camundongo)	-
Inibitor hERG I	Talvez	Não	Alto risco	Não
Inibidor hERG II	talvez	Sim	Alto risco	Sim

O mapa da Figura 19 mostra a probabilidade das contribuições estruturais do LPAM e LTAM serem potencialmente bloqueadores de canais de transporte hERG, como modelo preditivo de detecção de farmacofóros potencialmente reativos. No mapa apresentado, é possível visualizar que os grupos carbonila das subunidades de arginina do LPAM e LTAM constituem contribuições negativas para o bloqueio hERG, com probabilidade 60% de apresentar resposta cardiotoxicidade fraca ou moderada, ao mesmo tempo em que os servidores preADMET e pkCSM mostraram um alerta de risco severo, sugerindo um controle rígido da dose oral administrada.

Figura 19 - Farmacóforos associados a atividade biológica de LPAM (1) e LTAM (2)



7 DISCUSSÃO

Nesse trabalho, a avaliação da atividade antifúngica foi realizada utilizando sete cepas de *Candida* resistentes a fluconazol e duas cepas de ATCC. Na Tabela 1 pode-se observar os valores de MIC obtidos para LPAM e LTAM e também para dois antifúngicos comerciais, AMB e FLC. O MIC foi definido como a concentração mais baixa que produziu uma redução de 50 % no crescimento das células fúngicas. Os valores MIC de FLC contra as sete cepas não ATCC ($\geq 32 \mu\text{g/L}$) indicam sua resistência a este medicamento. LPAM e LTAM apresentaram boa atividade antifúngica contra todas as cepas, com MIC = $8,12 \mu\text{g/mL}$ para ambos os compostos. O valor MIC para LPAM e LTAM está abaixo de seus respectivos CMC em água, o que sugere que os monômeros do produto estavam interagindo com as células fúngicas (CORNELLAS et al., 2011; LYON et al., 2011). Todas as espécies de *Candida* testadas exibiram a mesma suscetibilidade aos dois surfactantes. Recentemente, Paluch e colaboradores (2018) também descobriram que a atividade de surfactantes catiônicos com duas cargas catiônicas era semelhante contra diferentes cepas de *Candida*. Além disso, um trabalho realizado por Da Silva e colaboradores (2020) relatou recentemente que ramnolipídeos catiônicos baseados em arginina exibiram um nível semelhante de atividade antifúngica contra diferentes cepas de *Candida* resistentes a FLC.

Nossos resultados indicam que a substituição da fenilalanina por triptofano na cabeça polar não afetou a efetividade antifúngica. A alta atividade desses novos surfactantes pode estar associada à carga catiônica no grupo guanidina, bem como à combinação dos dois aminoácidos como a cabeça polar. A carga catiônica no grupo guanidina melhora a interação eletrostática com as membranas biológicas, facilitando assim a penetração do surfactante nas paredes celulares do fungo e a interação com as membranas citoplasmáticas (OTZEN, 2017). A literatura contém várias referências à atividade anti-*Candida* de surfactantes catiônicos. Por exemplo, oleilfosfololina exibiu valores de MIC de 1 a 4 mg/L contra isolados clínicos de *C. albicans* (HOLTAPPELS et al., 2018). Surfactantes à base de morfolina tiveram valores de MIC na faixa de 100 - 500 mg/mL contra *C. albicans* ATCC 10231 (BRYCKI; DEGA-SZAFRAN; MIRSKA, 2010).

Cabeças polares compostas por dois aminoácidos dão origem a compostos antibacterianos e antifúngicos altamente eficazes, especialmente quando combinados um aminoácido aromático e arginina. Parece que o elétron π dos grupos aromáticos resulta em nuvens carregadas negativamente que interagem com o grupo guanidina carregado

positivamente, tornando a entrada dos compostos na bicamada lipídica das membranas biológicas energeticamente mais favorável (BLUM; LESTER; DOUGHERTY, 2010; DOUGHERTY, 1996; MECOZZI S., A. P. WEST, JR., 1996).

Diante do exposto, a atividade antifúngica de LPAM e LTAM foi superior à descrita para surfactantes de amônio quaternário de cadeia simples (Gupta; Ahmad; Summerbell., 2002) ou derivados de Na-benzoil-arginina, que têm valores de MIC na faixa de 50- 60 $\mu\text{g/mL}$ (FAIT et al., 2019). Notavelmente, os valores de MIC para esses novos surfactantes contra fungos foram menores do que aqueles relatados para alguns peptídeos, que estão ganhando interesse como novos antibióticos em potencial (ROSCETTO et al., 2018).

A literatura também descreve alguns surfactantes catiônicos com atividade antifúngica comparável à observada para LPAM e LTAM. Os surfactantes N-acetilados gemini com cadeias alquil de 12 carbonos também tiveram valores de MIC de 8 $\mu\text{g/mL}$ contra várias cepas de *Candida* (MACHUCA et al., 2015). Enquanto os cloretos de amônio quaternário gemini com cadeias alquílicas de 10 carbonos e surfactantes catiônicos do tipo dicefálico exibiram atividade antifúngica contra *Candida* cepas com valores de MIC na faixa de 10 - 40 μM (OBŁAK et al., 2013; PALUCH et al., 2018).

A Tabela 1 também inclui os valores de MIC de AMB contra todas as cepas estudadas. Como esperado, este composto exibiu forte atividade, com valores de MIC inferiores a 1 $\mu\text{g/mL}$. Para avaliar possíveis efeitos sinérgicos, foi determinada a atividade antifúngica das misturas AMB / LPAM e AMB / LTAM (Tabela 1). A interação entre AMB e os surfactantes foi avaliada pelo cálculo do índice de concentração inibição fracionária. (FICI): $FICI = [CAB] / [AB] + [CP] / [P]$ onde [CAB] e [CP] representam os MICs de AMB e dos surfactantes atuando em combinação, enquanto [AB] e [P] são os MICs dos mesmos compostos, respectivamente, agindo isoladamente. Sinergismo (SIN) foi definido como $FICI \leq 0,5$, indiferença (IND) como $0,5 \leq FICI \leq 4$ e antagonismo (ANT) como $FICI > 4,0$.

Nossos resultados indicam que, quando as diferentes cepas de *Candida* foram expostas às combinações AMB / LPAM ou AMB / LTAM, elas exerceram um efeito sinérgico na sensibilidade à levedura ($FICI \leq 0,5$). Os valores de MIC obtidos para as misturas contra todas as cepas foram significativamente ($p < 0,05$) menores (cerca de 3 vezes) do que os dos compostos puros. Comportamento semelhante foi observado para todas as cepas de *Candida* e para ambas as misturas de drogas.

O antifúngico poliênico AMB causa permeabilização da membrana levando ao vazamento de íons e morte celular, embora seu uso seja limitado por nefrotoxicidade significativa (BARCHIESI et al., 1998; TE WELSCHER et al., 2012). Porém, ao aumentar os

efeitos da AMB, o sinergismo pode reduzir a dosagem necessária. Um estudo recente de Mařátková e colaboradores (2017) relatou o sinergismo da AMB com biossurfactantes como rhamnolipídios contra *C. parapsilosis*. O mecanismo de interação de LPAM e LTAM com AMB não foi determinado no presente trabalho. Oblack e colaboradores (2013) também descobriram que os sais de amônio quaternário gemini catiônicos aumentaram a sensibilidade de *C. albicans* à AMB.

Uma versão alcalina do ensaio do cometa foi usada para detectar quebras nas fitas de DNA de *Candida* spp resistente a FLC cepas tratadas com LPAM e LTAM. Como esperado, as células tratadas com FLC não mostraram qualquer dano ao DNA, enquanto numerosas quebras de DNA foram observadas nas células de controle positivo tratadas com AMB (Fig. 3). Após 24 h de exposição ao LPAM e LTAM, nenhum dano significativo ao DNA da célula foi detectado para o MIC e 2xMIC. No 4xMIC observou-se algum percentual de quebras. O aumento do dano ao DNA no 4xMIC foi relativamente baixo: 30 % / 23 % do dano ao DNA em *C. parapsilosis*, 26 % / 23 % em *C. albicans* e 21 % / 26 % em *C. tropicalis* para LPAM / LTAM respectivamente. Esses resultados indicam que a genotoxicidade não é o principal mecanismo de ação desses surfactantes catiônicos. Característica que torna esses compostos à base de aminoácidos candidatos atraentes como carreadores de genes para terapia gênica (RUDIUK et al., 2008).

A atividade antimicrobiana de surfactantes é relatada como geralmente relacionada a danos à membrana plasmática (OTZEN, 2017). Para confirmar que LPAM e LTAM também agem por rompimento da integridade da membrana, a densidade da cepa fúngica foi avaliada usando iodeto de propídio (IP), que penetra na célula e se liga ao DNA quando a membrana é permeável. A Fig. 4a mostra o número de células viáveis das três espécies de *Candida* após serem tratadas com LPAM, LTAM, FLC e AMB. Como esperado, não houve redução da viabilidade celular após o tratamento com FLC, sendo o resultado semelhante ao obtido para o controle em branco. Em contraste, quando essas cepas de *Candida* foram tratadas com os tensoativos catiônicos, foi observada uma redução significativa no número de células viáveis. A atividade dependeu da concentração do surfactante: uma redução de cerca de 50% foi obtida no MIC, enquanto no 2xMIC foi semelhante ao AMB (o controle positivo). Os dois tensoativos catiônicos apresentaram resultados semelhantes, confirmando que o tipo de aminoácido aromático não afetou essa atividade biológica, e as três cepas de *Candida* não diferiram na suscetibilidade. A diminuição da viabilidade celular observada com este teste indica que LPAM e LTAM rompem as membranas celulares, aumentando sua permeabilidade, por interações eletrostáticas e hidrofóbicas. A presença de aminoácidos hidrofóbicos como a fenilalanina e o

triptofano pode ser um fator importante na afinidade do surfactante com a membrana dos microrganismos (BROGDEN, 2005). A interação desses produtos com as membranas celulares também pode ser melhorada pela formação de ligações de hidrogênio entre os resíduos de guanidina e os grupos de cabeças fosfolipídicas das bicamadas (PALERMO; KURODA, 2010).

Diferentes mecanismos de ação têm sido relatados para a interação de surfactantes catiônicos com fungos, mas em geral as membranas celulares são os principais alvos. Foi descrito que este tipo de surfactantes interage com grupos fosfato carregados negativamente da parede celular (IBEAS et al., 2000). Devido à sua hidrofobicidade, os compostos subsequentemente se intercalam nas bicamadas lipídicas, abrindo canais que permeabilizam a membrana, provocando a perda de constituintes celulares essenciais. Ao diminuir a quantidade de esterol disponível nas células fúngicas, essas interações também podem interferir na capacidade do ergosterol de regenerar a membrana (BERGAMO et al., 2015). Estudos de ligação de derivados catiônicos de fenilalanina e DPPC mostram que as interações eletrostáticas e hidrofóbicas são responsáveis por sua atividade antimicrobiana (JOONDAN; JHAUMEER-LAULLOO; CAUMUL, 2014). Os surfactantes monocatenários e gemini à base de arginina também danificam diretamente a membrana plasmática (PINAZO et al., 2016) e os QACs alteram a permeabilidade da membrana com o consequente vazamento de constituintes celulares (HEGSTAD et al., 2010).

No entanto, nem todos os surfactantes catiônicos operam pelo mesmo mecanismo. Por exemplo, em baixas concentrações, dois surfactantes representativos (CTAB e SDS) não produziram danos à membrana (YU et al., 2015). Enquanto Jaber e colaboradores (2018) demonstraram que a permeabilização da membrana plasmática por surfactantes catiônicos é o primeiro evento que ocorre no interior das células fúngicas. Esses compostos também podem causar desnaturação de proteínas e DNA, bem como decomposição de organelas. Isso significa que as interações bioquímicas também podem ser fatores-chave na causa da morte celular. Para verificar se o modo de ação do LTAM e LPAM envolve esses tipos de alterações, foi estudado a despolarização mitocondrial e a geração de espécies reativas de oxigênio em células de levedura. Para investigar a despolarização mitocondrial ($\Delta\psi_m$) após a exposição a LTAM e LPAM, as células foram tratadas com o corante rodamina 123 fluorescente. Mitocôndrias despolarizadas têm menos afinidade pelo marcador, emitindo menos fluorescência, enquanto células viáveis emitem altos níveis de fluorescência devido à incorporação de rodamina (NETO et al., 2014). As cepas tratadas com FLC, assim como o controle negativo (células em meio RPMI), não exibiram alterações no potencial transmembrana mitocondrial (Fig. 4b). Em *Candida* spp. nas células tratadas com LPAM e LTAM, a porcentagem do potencial

transmembrana mitocondrial dependia da concentração do surfactante. No MIC, o $\Delta\psi_m$ foi semelhante ao das células de controle não tratadas, mas a concentração mais alta testada (4xMIC) induziu um colapso grave no $\Delta\psi_m$ nas três cepas representativas de *Candida*. Este resultado sugere que em altas concentrações os surfactantes afetaram a função respiratória mitocondrial, levando a danos celulares fatais. Geralmente, $\Delta\psi_m$ é causado pela formação de canais através das membranas mitocondriais internas, como o poro de transição de permeabilidade, que é ativado por fatores pró-apoptóticos (MARZO et al., 1998). A estrutura anfipática de LPAM e LTAM pode aumentar sua capacidade de formar esses tipos de canais. A literatura contém alguns exemplos de surfactantes com comportamento semelhante. Lucarini e colaboradores (2018) descobriram que a toxicidade dos surfactantes aniônicos à base de lactose contra as células epiteliais estava associada à despolarização do potencial da membrana mitocondrial e à permeabilização do plasma e das membranas nucleares. Shirai e colaboradores (2009) relataram que a ação fungicida dos surfactantes gemini catiônicos se deve principalmente à inibição da função respiratória após a destruição das membranas das organelas. Além disso, Kumar e colaboradores (2009) mostraram que alguns surfactantes catiônicos baseados em cobalto causam um colapso do potencial de membrana mitocondrial em células de câncer de mama HBL-100.

Como mostrado na Fig. 5a, a produção de ROS intracelular em células *Candida* tratadas (FLC) e não tratadas (RPMI) não aumentou significativamente ($p < 0,05$). O tratamento de cepas com baixas concentrações de LPAM e LTAM resultou em uma produção de ROS muito baixa, mas aumentou consideravelmente após a exposição a 4xMIC. Na verdade, nesta concentração, a produção de ROS foi maior do que no controle positivo tratado com AMB. Não foram observadas diferenças entre LTAM e LPAM, e o comportamento das três cepas de *Candida* foi semelhante. Esses dados estão de acordo com o $\Delta\psi_m$ obtido para as três linhagens (Fig. 4b). Os níveis aumentados de ROS intracelulares em 4xMIC podem ser atribuídos ao efeito do surfactante catiônico na função respiratória das células. Yu e colaboradores (2015) também propõem a despolarização mitocondrial como uma via de citotoxicidade induzida por surfactante em *C. albicans*, que alguns autores correlacionam com o acúmulo de ROS intracelulares (SCHERZ-SHOUVAL; ELAZAR, 2007; ZOROV et al., 2000). É bem conhecido que a morte celular necrótica e vários tipos de morte celular programada podem levar a respostas inflamatórias localmente ou no tecido circundante. No entanto, a morte celular por apoptose ocorre naturalmente para manter a homeostase do tecido normal sem induzir uma resposta inflamatória. A indução de apoptose é uma causa comum de despolarização mitocondrial e pode ser responsável pela formação de ROS observada. Um colapso de $\Delta\psi_m$

pode levar à abertura transitória dos poros nas membranas mitocondriais com a liberação subsequente de fatores pró-apoptóticos no citosol (HWANG et al., 2012). Também foi sugerido que a geração de ROS está relacionada ao rompimento da membrana celular que ocorre durante a apoptose e desencadeia a morte celular (GUILHERME et al., 2012; WAN et al., 2015). Os valores de $\Delta\psi_m$ e ROS de células tratadas com LPAM e LTAM sugerem que a apoptose pode estar envolvida na ação antifúngica do surfactante. Para testar essa hipótese, estudamos a externalização da fosfatidilserina (PS) nas células de levedura tratadas. No estágio inicial da apoptose, o PS é translocado da membrana interna para a externa (FADOK et al., 1992) e pode ser detectada com anexina V, proteína com alta afinidade pelo PS presente nas membranas das células apoptóticas (HWANG et al., 2012). A porcentagem de células com PS externalizado após a exposição (24 h) a AMB (controle positivo), FLC (controle negativo) e os surfactantes à base de aminoácidos catiônicos é mostrada na Fig. 5b. Embora insignificante em células tratadas e não tratadas com FLC, a porcentagem de células com PS externalizado (soma dos estágios inicial e final) foi significativa em culturas de levedura tratadas com LPAM e LTAM em três concentrações diferentes (MIC, 2xMIC e 4xMIC) após 24 h de incubação.

Diante dos resultados obtidos pelos experimentos de citometria, foi formulada a hipótese de que a ruptura da membrana celular e a permeabilização foram as principais vias para o dano celular de levedura induzido por LTAM e LPAM. No entanto, alterações bioquímicas como a despolarização do potencial de membrana mitocondrial e a geração de ROS também podem ter contribuído para a morte celular. Outro modo de ação possível é um influxo de surfactantes catiônicos com organelas celulares, como as mitocôndrias. Paluch e colaboradores (2018) sugeriram que surfactantes catiônicos dicefálicos podem penetrar na célula e interagir com as mitocôndrias, causando estresse oxidativo severo. O modo de ação dos derivados monocatenários catiônicos de arginina contra fungos também envolve ambos os mecanismos, permeabilização da membrana plasmática e indução de estresse oxidativo (FAIT et al., 2019). Da mesma forma, Shirai e colaboradores (2012) descobriram que a atividade de ruptura da membrana da organela e o estresse oxidativo causado por ROS. Compostos com esse modo de ação são de grande interesse, visto que parece dificultar o desenvolvimento da resistência antimicrobiana, pois, ao contrário dos antibióticos, o antimicrobiano não tem como alvo uma única molécula ou processo. Nossos resultados também confirmam que esses surfactantes catiônicos causaram morte celular por apoptose em três *Candida* spp resistentes a FLC. Comportamento semelhante foi relatado por Enomoto e colaboradores (2007) que sugeriram que o tratamento de células tumorais de mamíferos com surfactantes catiônicos promove a externalização do PS, indicando um estágio inicial de apoptose.

LPAM e LTAM foram testados quanto à capacidade de dispersar biofilmes maduros de *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. parapsilosis* resistentes a FLC. Os resultados (Fig. 6) indicam que ambos os surfactantes desalojaram biofilmes produzidos por *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. tropicalis* em baixas concentrações. A 10xMIC (81,2 µg / mL), LPMA e LTAM destruíram mais de 80% do biofilme de *C. albicans* e *C. tropicalis*. Atividade mais fraca contra os biofilmes de *C. parapsilosis* foi observada para ambos os surfactantes, a maior concentração testada removendo cerca de 60 % do biofilme. De acordo com a literatura, os agentes antifúngicos são geralmente menos eficazes contra biofilmes do que contra células planctônicas (NETT et al., 2008). Vários estudos relatam que os biofilmes de *Candida* são 30-2000 vezes mais resistentes do que as células planctônicas contra vários medicamentos antifúngicos, incluindo AMB (HAWSER; DOUGLAS, 1995). A boa atividade antibiofilme desses novos surfactantes pode ser atribuída tanto ao seu caráter anfipático quanto à sua carga catiônica. Essa estrutura química permitiu que eles penetrassem na rígida matriz extracelular polimérica dos biofilmes de *Candida* e, assim, exercessem ação antifúngica em baixas concentrações.

Os estudos sobre a eficácia de surfactantes catiônicos contra biofilmes fúngicos são muito limitados. Um estudo recente de Paluch e colaboradores (2018) mostrou que surfactantes catiônicos dicefálicos de cadeia longa são capazes de penetrar e afetar a estrutura do biofilme de *C. albicans*. Vale ressaltar que a estrutura química desse fármaco apresenta certa semelhança com a do LPAM e do LTAM, visto que possui uma fração hidrofóbica ligada a uma cabeça polar contendo um grupo amino passível de protonação. AMB também dispersou os três biofilmes maduros de *Candida* estudados, destruindo mais de 80 % em concentrações muito baixas (0,03- 1 µg/mL). No entanto, o gráfico B1 (atividade de AMB contra *C. albicans*) exibe um comportamento dose-efeito incomum; seria de se esperar que a viabilidade da biomassa a 0,03 µg/mL fosse superior à obtida a 0,06 µg/mL. *Candida albicans* 2 é uma cepa clínica e mostrou resistência ao AMB em concentrações mais baixas.

Ao determinar a atividade antibiofilme sinérgica das misturas LTAM/AMB e LPAM/AMB (Fig. 6), também testamos as concentrações acima e abaixo dos valores MIC. No valor de MIC, a redução do biofilme de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* obtida com as misturas é maior que a obtida com surfactantes puros. Por exemplo, no MIC (8,12 µg/mL surfactante catiônico/ 0,500 µg/mL AMB), as misturas dispersaram cerca de 50 % dos biofilmes de *C. parapsilosis*, enquanto individualmente os surfactantes catiônicos dispersaram apenas 20 %. Esse comportamento se deve à presença da AMB. Vale ressaltar que não foram observados efeitos sinérgicos para nenhuma cepa, visto que o efeito do AMB puro (coluna A1, B1, C1) é superior ao observado para as misturas. De fato, para *C. parapsilosis* ou *C. tropicalis*, ambas as

misturas no valor MIC (8,12 $\mu\text{g/mL}$ / 0,500 $\mu\text{g/mL}$) exibiram baixo efeito, enquanto o AMB a 0,500 $\mu\text{g/mL}$ dispersou cerca de 80% do biofilme. Esses resultados indicam, portanto, que os novos surfactantes à base de aminoácidos são capazes de dispersar biofilmes resistentes de *Candida*. Notavelmente, eles também podem potencializar a atividade antibiofilme de um medicamento convencional como o AMB. Esses resultados demonstram ainda que essas pequenas moléculas têm um potencial considerável como agentes antibiofilme.

A segurança desses surfactantes como agentes antifúngicos também foi estabelecida com base em sua interação com células L929 de mamíferos. Sua citotoxicidade contra esta linha celular foi determinada usando o ensaio MTT em 3xMIC (25 $\mu\text{g/mL}$) e 80-100 % das células sobreviveram. Portanto, em concentrações letais para fungos, esses compostos são seguros para células de mamíferos.

Tensoativos catiônicos tem se destacado por apresentarem atividade frente a bactérias MRSA, característica importante devido ao grave problema mundial de resistência bacteriana, surgindo assim como uma nova opção frente aos antimicrobianos clássicos. Wu e colaboradores (2020) avaliaram a atividade antibacteriana de nove novos surfactantes catiônicos gemini compostos por grupos amida e éster, relatando a atividades desses compostos frente a *S. aureus* ATCC 25923 com MIC variando de 32-512 $\mu\text{g/mL}$ e associando sua atividade a interação eletrostática entre os grupos positivos dos compostos e as cargas negativas da membrana celular, de forma que os tensoativos rompem e penetram na membrana, desestabilizando-a, ocasionando a liberação do citoplasma e consequente apoptose celular. Outro estudo realizado por Zhou e Wang (2020) associou a presença do anel aromático a atividade antibacteriana, de modo que a presença no grupo fenil hidrofóbico está relacionado a um aumento na capacidade do surfactante romper a membrana bacteriana, importante achado visto que, no presente estudo, os compostos LPAM e LTAM, cuja estrutura conta com grupo fenil, promoveram dano da membrana de células de MRSA. Em contrapartida os tensoativos catiônicos LPAM e LTAM não apresentaram atividade frente a biofilme de MRSA. Um estudo realizado por Pérez e colaboradores (2021) demonstrou a atividade de surfactantes catiônicos derivados de arginina, frente a biofilme de MRSA, relacionando sua atividade a estrutura química da arginina presente nesses compostos, permitindo que eles penetrem a matriz extracelular de biofilme formado por essas bactérias. Dessa forma, podemos inferir que a adição dos aminoácidos fenilalanina e triptofano pode ter impedido a penetração dos surfactantes derivados de arginina na matriz de biofilme de células de MRSA.

Para avaliar o mecanismo de ação dos tensoativos catiônicos LPAM e LTAM frente a cepas de MRSA, inicialmente verificou se esses compostos atuavam na membrana, para tal

utilizou-se o iodeto de propídio (IP), uma molécula fluorescente capaz de se ligar ao DNA, de modo que se houver perda da integridade da membrana esse marcador é capaz de entrar na célula e ser visualizado (CROWLEY et al., 2016). No presente estudo, verificou-se que houve um aumento significativo do dano de membrana após análise, concluindo-se que o efeito dos tensoativos é concentração-dependente frente a cepas de MRSA. Um estudo realizado por Voloshina e colaboradores (2020), verificou um aumento no dano do citoplasma bacteriano e consequente morte celular por apoptose células de *S. aureus* 209P, após exposição a concentrações crescentes do tensoativo de alquilimidazólio.

O teste de Tunel mostrou que os compostos LPAM e LTAM causam dano ao DNA de células de MRSA, um estudo realizado por Zhou e colaboradores (2012) verificou que tensoativos catiônicos de imidazólio são responsáveis por causar danos irreparáveis ao DNA. Voloshina e colaboradores (2020), observaram que tensoativos dicatiônicos alquilimidazólio são capazes de interagir com o DNA. Diante da capacidade de compactação e condensação do DNA por tensoativos catiônicos, estes compostos tem sido investigados devido às estruturas contendo cargas positivas neutralizantes das cargas do fosfato no DNA e sua caudas hidrofóbicas que interagem com a base do DNA e membrana celular (ZHOU; WANG, 2020)

O docking molecular é uma importante ferramenta utilizada no desenvolvimento de novas moléculas com potencial farmacológico. Essa estratégia tem como base o estudo das interações entre proteínas e ligantes, cuja afinidade e especificidade são dadas por interações do tipo: forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas, interações iônicas e ligações de hidrogênio. Dentre elas, as ligações de hidrogênio se destacam visto que desempenham papel fundamental no complexo proteína-ligante, pois possuem força molecular intensa e mantem a estrutura das proteínas (CHEN et al., 2016; GURYANOV; FIORUCCI; TENNIKOVA, 2016).

Nesse contexto, o estudo de docking molecular foi realizado com o objetivo de investigar o provável mecanismo de ação frente aos seguintes ligantes pré estabelecidos, tendo como alvo o DNA: *S. aureus* gyrase complex with DNA, *S. aureus* gyrase, Wild-type *S. aureus* DHFR, DNA (5'-D(*CP*GP*CP*GP*AP*AP*TP*TP*CP*GP*CP*G)-3) e tendo como alvo a parede celular: Acyl-PBP2a from MRSA. Desse modo, foi possível determinar que os complexos formados com os compostos LPAM e LTAM e os alvos *S. aureus* gyrase complex with DNA e *S. aureus* gyrase possuem energia mais favorável, com menor valor de K_i e maior valor de pK_i , apresentando maior afinidade pelo receptor, sendo necessária uma menor concentração do ligante para inibir a atividade enzimática, menor valor de K_i ($4,46 \times 10^{-6}$, $4,46 \times 10^{-6}$) e maior de pK_i (5,35; 5,35) respectivamente para LPAM e valores de K_i ($5,89 \times$

10⁻⁷, 1,62 x 10⁻⁶) maior de pKi (6,23; 5,79) respectivamente para LTAM, quando comparados aos demais ligantes. Os resultados da análise frente aos sítios alvos do DNA estão em consonância com o achado do teste do Tunel, em que os compostos LPAM e LTAM são capazes de se ligar fortemente ao DNA causando dano irreversível. Um estudo realizado por Lakshmi Praba e colaboradores (2014) mostrou que uma série de surfactantes catiônicos sintetizados a partir do complexo de cobre – base de Schiff são capazes de interagir com as bases do DNA através de suas longas cadeias alquílicas. Outro alvo avaliado foi a enzima dihidrofolato redutase (DHFR), que é importante para manter os níveis intracelulares de folato, fundamental para a síntese de DNA (WRÓBEL et al., 2020). Nesse estudo, os surfactantes não apresentaram significativas interações com esse alvo. Um estudo realizado por Andrade Neto e colaboradores (2021) avaliou as interações moleculares da curcumina com os mesmos alvos selecionados no presente estudo, observando importantes interações da droga em análise com o resíduo Phe92 no sítio da DHFR, porém no presente estudo os tensoativos LPAM e LTAM não interagiram fortemente com este resíduo, apresentando também baixa energia de ligação.

A enzima PBP2a é uma proteína transpeptidase responsável pela resistência das cepas de MRSA a antibióticos β-lactâmicos que é codificada pelo gene *mecA*, conferindo uma afinidade reduzida pela metilina. (FISHOVITZ et al., 2014). Um estudo realizado por Rani e colaboradores (2016) analisou a interação da ceftarolina, uma cefarospolina que possui alta afinidade pela PBP2, tendo assim atividade frente a cepas MRSA, com a enzima PBP2a, demonstrando que a droga interage por ligações de hidrogênio com os resíduos LYS316, TYR105, ASN104 com a cepa MRSA ATCC43300. No presente estudo não foram identificadas interações dos compostos LPAM e LTAM com tais resíduos. Outro estudo realizado por Kalalo e colaboradores (2020) demonstrou que a ceftarolina se liga a PBP2a resultando energia de ligação de -9,5 kcal/mol, enquanto no presente estudo a energia de ligação do LPAM e LTAM com a PBP2a foi de -6.2 e -6.1 kcal/mol, respectivamente, demonstrando ter uma menor afinidade.

Diante do potencial dos surfactantes catiônicos LPAM e LTAM frente a cepas de MRSA, o presente estudo foi conduzido de modo a avaliar *in silico* as propriedades ADMET entre elas: absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade, que são importantes no planejamento de novos fármacos. Uma triagem virtual inicial pode reduzir os custos laboratoriais de testes clínicos e acelerar o processo de descoberta de novos medicamentos. A técnica busca realizar um rastreamento de semelhança com compostos de uma série de conjuntos de dados, baseado em bioatividades conhecidas de estruturas moleculares já

caracterizadas, estimando uma probabilidade de atividade biológica (MENDEZ et al., 2019; SCIOR et al., 2012)

Em relação aos ensaios em ADMET, foi observado que de acordo com a pontuações de bioatividade, os produtos LPAM e LTAM podem atuar como inibidor da clivagem de proteínas de vários patógenos microbianos (Tabela 4).

O coeficiente de distribuição (logD) mede a solubilidade em gordura de uma substância à medida que o pH varia. Assim, compostos com valores de logD entre 1 e 3 tendem a ser moderadamente permeáveis devido ao equilíbrio entre solubilidade e permeabilidade (COMER, 2003). O valor calculado de logD foi 5,14 para LPAM e 5,25 para LTAM, indicando que as moléculas são pouco solúveis em água (logS -7,67 para LPAM e -8,28 para LTAM) o que dificulta sua difusão passiva nas membranas biológicas, conforme mostra o gráfico da Figura 17 (1B) e Figura 17 (2B).

Em relação aos critérios de “similaridade ao fármaco”, o produto LTAM apresentou dupla violação: $MM > 500$ g/mol e mais de 5 H doadores. Fatores esses que podem limitar sua biodisponibilidade oral, visto que são características associadas a possíveis riscos de efluxo passivo, o que resulta na diminuição de sua biodisponibilidade oral (LIPINSKI, 2016; WAGER et al., 2010). O produto LPAM possui a $MM > 500$ g/mol, indicando que o tamanho da molécula pode dificultar a permeabilidade passiva através das membranas biológicas, sendo, mesmo assim, um bom candidato para medicamento oral (Tabela 10).

Um estudo recente conduzido pela empresa Pfizer (WAGER et al., 2016) relata que um conjunto de dados analisado, que inclui drogas comerciais, drogas candidatas e drogas de penetração no sistema nervoso central (SNC), mostrou uma resposta tóxica mais baixa em compostos com $\log P < 3$ e $PSA > 75 \text{ \AA}^2$. Uma interpretação intuitiva sugere que a empresa Pfizer optou pela síntese de compostos com baixa lipofilicidade relativa e maior área de superfície polar, ou seja, com bom equilíbrio lipossolúvel para ser difundido através da bicamada lipídica das membranas celulares e com polaridade relativamente alta para uma boa penetração celular (HUGHES et al., 2008). Em seu conjunto de dados, um bom alinhamento das características farmacocinéticas, como alta permeabilidade, baixo risco de efluxo e baixa depuração metabólica foram associados a compostos ativos do SNC (62 %), medicamentos comerciais (12 %) e candidatos a medicamentos (5 %) que ocupou o quadrante gráfico de $\log P < 3$ e $PSA > 75 \text{ \AA}^2$.

Por serem propriedades que mudam inversamente entre si e com a modificação de outras propriedades físico-químicas, como MM e a soma de doadores e aceitadores de H, o perfil traçado de lipofilicidade ($ClogP = 2,211$) e polaridade ($PSA = 152,31 \text{ \AA}^2$) de LTAM, sugere

que a substância está a uma distância considerável do espectro ideal estimado pela Pfizer, indicando uma possível limitação em seus atributos farmacocinéticos, como limitação na permeabilidade MDCK aparente e risco de efluxo pela glicoproteína-P (gp-P), mas passa no critério porque está no quadrante associado a uma baixa incidência de toxicidade (Figura 17 C).

Vários modelos *in vitro* têm sido usados no desenvolvimento de drogas para melhorar a eficiência da previsão do transporte do lúmen intestinal para a circulação sistêmica de novas substâncias com propriedades biofarmacêuticas promissoras. Entre eles estão os modelos de células de adenocarcinoma colorretal (Caco-2), que têm múltiplas vias de transporte de drogas no epitélio intestinal, enquanto o modelo de monocamada de células renais caninas Madin-Darby (MDCK) pode fornecer informações sobre a permeabilidade aparente (Papp) no sangue. barreira cerebral (BHE), associada a compostos com a capacidade de penetrar no SNC (VOLPE, 2008).

Os valores de permeabilidade indicam que as propriedades físico-químicas do LPAM limitam seu acesso ao cérebro, com um padrão significativo de alinhamento às propriedades dos candidatos a drogas do SNC da Pfizer (WAGER et al., 2016). A permeabilidade moderada está intimamente ligada ao seu potencial para ruptura gradual das membranas envolvendo vários agentes microbianos (Morán et al., 2001).

A baixa biodisponibilidade oral está associada a uma grande quantidade de átomos de N e O ($N + O > 8$) e seu grande tamanho molecular (> 400 g/mol) que em conjunto são fatores limitantes de sua biodisponibilidade, uma vez que são características de uma substância que sofre efluxo de volta para o trato gastrointestinal pela P-glicoproteína (P-gp) (DIDZIAPETRIS et al., 2003), resultando em absorção intestinal moderada, que pode variar entre 43-78 %, conforme mostrado pela previsão de consenso expressa na Tabela 11.

O volume de distribuição (Vd) é um atributo farmacocinético que está associado a uma fração molecular livre após a dose oral administrada, podendo ser uniformemente distribuído no plasma sanguíneo e nos tecidos. Valores relativamente altos indicam que uma substância pode estar mais concentrada nos tecidos do que propriamente no plasma sanguíneo. Para LPAM e LTAM, respectivamente, o valor Vd na ordem de -0,043 e 0,551 (log L/kg), está diretamente associado ao alto grau de ligação às proteínas plasmáticas (93,570 % e 96,578 %), resultando em um pequeno índice livre fração molecular de apenas 0,235. Como reflexo, o coeficiente de distribuição previsto cérebro/sangue (logBB) de -1,34 e -1,261 para LPAM e LTAM, respectivamente, indica que a fração molecular dos compostos está mal distribuída no cérebro, uma vez que a razão de permeabilidade superficial polar (logPS) é da ordem de -4,231 e -4,226 para LPAM e LTAM, respectivamente, destaca sua incapacidade de penetrar no SNC (Tabela

12)(PIRES; BLUNDELL; ASCHER, 2015). Assim, a atividade biológica do LPAM e do LTAM é baseada na ação terapêutica local, como ocorre em outros surfactantes com carga amino positiva e cadeia lateral hidrofóbica, onde ocorre em certa medida a disponibilidade para interação com as cadeias de DNA (JADHAV et al., 2008).

A previsão das possíveis biotransformações de drogas e xenobióticos pelas isoenzimas do citocromo P450 (CYP450) por triagem virtual, seja por indução ou inibição, permite estimar os efeitos colaterais pela formação de metabólitos conjugados no processo de metabolismo de primeira passagem. As isoenzimas CYP450 são responsáveis por reações de redução de oxidação que transformam as substâncias ingeridas em químicas que são mais hidrofílicas e suscetíveis à eliminação (PIRES; KAMINSKAS entidades; ASCHER, 2018; SILVINO et al., 2016).

Os perfis de toxicidade orgânica relacionados à hepatotoxicidade são uma das vias de toxicidade que enfatizam as previsões *in silico*, pois é uma resposta direta dos produtos químicos gerados a partir da ingestão de uma determinada substância, que pode resultar em danos ao fígado (SILVINO et al., 2016). Nesse teste, é possível observar que o químico gerado pelo metabolismo do LPAM e do LTAM pode resultar em lesão hepática, uma vez que a dose oral administrada excede a dose aguda prevista de 2,758 e 2,627 mol/kg, respectivamente (Tabela 13).

Outra via de toxicidade orgânica associada à ingestão de drogas é a resposta mutagênica. Devido ao alto custo e tempo de teste, o modelo de triagem *in silico* baseado no conjunto de dados de mutagenicidade Ames foi aprimorado para detectar subestruturas prejudiciais ao hospedeiro, capazes de causar mutações genéticas (XU et al., 2012). A correlação com dados *in vivo* mostrou que LPAM e LTAM não mostraram uma resposta carcinogênica em ratos e camundongos e não representam um risco mutagênico para o hospedeiro (Tabela 13).

Em ensaio *in silico* ADMET foi observado que os grupos carbonila do LPAM e LTAM contribuem negativamente para o bloqueio do hERG, de modo que, curiosamente, estes grupos são um farmacóforo com forte interação intermolecular com receptores biológicos, uma vez que são regiões que realizam ataques nucleofílicos a grupos amino positivos (N + H) de aminoácidos (BLUM; LESTER; DOUGHERTY, 2010). Além disso, o grupo fenil da subestrutura da fenilalanina e os grupos aromáticos da subestrutura do triptofano foram plotados como uma contribuição positiva da atividade biológica de LPAM e LTAM, respectivamente, uma vez que são fragmentos moleculares capazes de intercalar com estruturas de DNA de agentes microbianos (JADHAV et al., 2008).

Diante dos promissores achados, pode-se inferir que os tensoativos catiônicos derivados de aminoácidos LPAM e LTAM podem ser usados como protótipos para o desenvolvimento de medicamentos para uso clínico em pacientes acometidos por infecções causadas tanto por *Candida spp.* quanto por MRSA. Outra aplicabilidade é seu uso como desinfetante hospitalar para evitar a contaminação desses ambientes. Atualmente, os tensoativos catiônicos à base de compostos quaternários de amônio são amplamente utilizados como desinfetantes, porém é importante enfatizar o impacto ambiental desses produtos, que são derivados do petróleo e descartados na superfície das águas, causando formação de espumas sobre os rios e lagos, ocasionando assim grave impacto ambiental (GONÇALVES et al., 2015). Diante disso, os compostos em estudo apresentam a vantagem de serem biodegradáveis, de modo que a espuma formada é degradada pelos microorganismos na natureza, reduzindo o impacto ambiental.

Em relação ao mecanismo de ação desses produtos, pode-se concluir pelos ensaios de citometria de fluxo que os processos iniciais de apoptose foram ativados pela perda da integridade da membrana em *Candida spp.* assim como em cepas de MRSA e dano ao DNA, principalmente, em cepas de MRSA, dado importante quando associado aos resultados de docagem molecular que demonstraram importante ligação desses compostos com DNA. Na docagem molecular e ADMET pode-se inferir que o farmacóforo, que representa o grupo responsável pelo mecanismo de ação da molécula, possivelmente está localizado na porção correspondente a arginina com os quais foram formadas ligações de hidrogênio. Dessa forma, diante do potencial antimicrobiano dos produtos analisados, mais estudos devem ser realizados com a finalidade de desenvolvimento de um produto com atividade frente a *Candida spp.* e cepas de MRSA.

8 CONCLUSÃO

- Os tensoativos catiônicos LPAM e LTAM apresentaram atividade antifúngica frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol isolados e combinados a anfotericina B.
- Os tensoativos catiônicos LPAM e LTAM apresentaram atividade antifúngica, bem como potencializa o efeito da anfotericina B frente a biofilme formado de *Candida* spp.
- Os tensoativos catiônicos LPAM e LTAM promovem dano de membrana, despolarização do potencial de membrana mitocondrial e a geração de ROS e consequente apoptose em células de *Candida* spp.
- Os tensoativos catiônicos LPAM e LTAM não apresentaram efeito citotóxico frente a células L929 de mamíferos.
- Os tensoativos catiônicos LPAM e LTAM apresentaram atividade antibacteriana frente a cepas de MRSA.
- Os tensoativos catiônicos LPAM e LTAM não apresentaram atividade antibacteriana frente a biofilme formado de MRSA
- Os tensoativos catiônicos LPAM e LTAM promovem dano de membrana, dano ao DNA e consequente apoptose em células de MRSA.
- Os tensoativos catiônicos LPAM e LTAM interagem fortemente com ligantes no DNA
- Os tensoativos catiônicos LPAM e LTAM podem ser utilizados no desenvolvimento de fármacos de ação terapêutica local, interagindo com o DNA de células bacterianas.

REFERÊNCIAS

- A.GANAVALLI, N. N. K. V. P. Antifungal Resistance in Dermatology. **Indian Journal of Dermatology**, v. 63, n. 5, p. 361–368, 2018.
- ALGAMMAL, A. M. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 3255–3265, 2020.
- ANDRADE, M. M. *et al.* The History of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Brazil. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2020, 2020.
- ANDRADE NETO, J. B. DE *et al.* Anti-MRSA activity of curcumin in planktonic cells and biofilms and determination of possible action mechanisms. **Microbial Pathogenesis**, v. 155, p. 104892, jun. 2021.
- ARENDRUP, M. C.; PATTERSON, T. F. Multidrug-resistant *candida*: Epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. Suppl 3, p. S445–S451, 2017.
- BALASUBRAMANIAN, D. *et al.* *Staphylococcus aureus* pathogenesis in diverse host environments. **Pathogens and Disease**, v. 75, n. 1, p. 1–13, 2017.
- BARCHIESI, F. *et al.* In-vitro interaction of terbinafine with amphotericin B, fluconazole and itraconazole against clinical isolates of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 41, n. 1, p. 59–65, 1998.
- BATISTA DE ANDRADE NETO, J. *et al.* Anti-MRSA activity of curcumin in planktonic cells and biofilms and determination of possible action mechanisms. **Microbial Pathogenesis**, v. 155, n. November 2020, 2021.
- BAX, B. D. *et al.* Type IIA topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents. **Nature**, v. 466, n. 7309, p. 935–940, ago. 2010.
- BERGAMO, V. Z. *et al.* Imidazolium salts as antifungal agents: Strong antibiofilm activity against multidrug-resistant *Candida tropicalis* isolates. **Letters in Applied Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 66–71, 2015.
- BIOVIA, D. S. **Discovery Studio Modeling Environment, Release 2017, San**

Diego Dassault Systèmes, 2016.

BLUM, A. P.; LESTER, H. A.; DOUGHERTY, D. A. Nicotinic pharmacophore: The pyridine N of nicotine and carbonyl of acetylcholine hydrogen bond across a subunit interface to a backbone NH. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 30, p. 13206–13211, 2010.

BRAMBILLA, L. Z. S. *et al.* Anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus* mrsa and mssa of neolignans and extract of piper regnellii. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 1, p. 112–117, 2017.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 238–250, 2005.

BROWN, G. D. *et al.* Hidden killers: Human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, 2012.

BRUNKE, S. *et al.* Virulence factors in fungal pathogens of man. **Current Opinion in Microbiology**, v. 32, n. Figure 1, p. 89–95, 2016.

BRYCKI, B.; DEGA-SZAFRAN, Z.; MIRSKA, I. Synthesis and antimicrobial activities of some quaternary morpholinium chlorides. **Polish Journal of Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 49–53, 2010.

CASCIOFERRO, S. *et al.* Therapeutic Strategies To Counteract Antibiotic Resistance in MRSA Biofilm-Associated Infections. **ChemMedChem**, v. 16, n. 1, p. 65–80, 2021.

CAVALCANTE, F. S. *et al.* Characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients on admission to a teaching hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **American Journal of Infection Control**, v. 45, n. 11, p. 1190–1193, 2017.

CAVALCANTI, B. C. *et al.* Kauren-19-oic acid induces DNA damage followed by apoptosis in human leukemia cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 29, n. 7, p. 560–568, 2009.

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. *Candida* Biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. **Frontiers in Medicine**, v. 5, n. FEB, p. 1–15, 2018.

CHEN, D. *et al.* Regulation of protein-ligand binding affinity by hydrogen bond pairing. **Science Advances**, v. 2, n. 3, 2016.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard NCCLS Document M27- A3**. Wayne, PA, USA, 2008.

CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: 4th informational supplement. Document M27-S4.** Wayne, PA, USA, 2012.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically. Document M07-A10.** Wayne, PA, USA. 2015.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100-S27.** Wayne, PA, USA. 2017.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249–261, 2004.

COMER, J. . *Methods and Principles in Medicinal Chemistry.* In: [s.l: s.n.].

CORNELLAS, A. *et al.* Self-aggregation and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium based ionic liquids in aqueous solution. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 355, n. 1, p. 164–171, 2011.

COWAN-ELLSBERRY, C. *et al.* Environmental safety of the use of major surfactant classes in North America. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 44, n. 17, p. 1893–1993, 2014.

CROWLEY, L. C. *et al.* Measuring cell death by propidium iodide uptake and flow cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 7, p. 647–651, 2016.

CSIZMADIA, P. **MarvinSketch and MarvinView: Molecule Applets for the World Wide Web**, 2019.

DA SILVA, A. *et al.* Antifungal and antiprotozoal green amino acid-based rhamnolipids: Mode of action, antibiofilm efficiency and selective activity against resistant *Candida* spp. strains and *Acanthamoeba castellanii*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 193, n. May, p. 111148, 2020.

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

DA SILVA, R. B. *et al.* Candidemia in a public hospital in Northeastern Brazil: Epidemiological features and risk factors in critically ill patients. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 36, n. 4, p. 181–185, 2019.

- DAMASCO, P. V. *et al.* Epidemiological and clinical profile of infective endocarditis at a Brazilian tertiary care center: An eight-year prospective study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. 1–9, 2019.
- DE ALMEIDA, J. N. *et al.* Emergence of *Candida auris* in Brazil in a COVID-19 intensive care unit. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 3, 2021.
- DELANO, W. L. **The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3** Schrödinger LLC, 2020.
- DIDZIAPETRIS, R. *et al.* Classification analysis of P-glycoprotein substrate specificity. **Journal of Drug Targeting**, v. 11, n. 7, p. 391–406, 2003.
- DIEKEMA, D. J. *et al.* Twenty-year trends in antimicrobial susceptibilities among *Staphylococcus aureus* from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. Suppl 1, p. S47–S53, 2019.
- DOUGHERTY, D. A. Cation- π interactions in chemistry and biology: A new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. **Science**, v. 271, n. 5246, p. 163–168, 1996.
- DU, H. *et al.* *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 10, p. 1–18, 2020.
- DWYER D. J., CAMACHO D. M., KOHANSKI M. A., CALLURA J. M., C. J. J. Antibiotic-induced bacterial cell death exhibits physiological and biochemical hallmarks of apoptosis. **Molecular cell**, v. 46, n. 5, p. 561–572, 2012.
- EDWARDS, A. M.; MASSEY, R. C. How does *Staphylococcus aureus* escape the bloodstream? **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 184–190, 2011.
- ENOMOTO, R. *et al.* Cationic surfactants induce apoptosis in normal and cancer cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1095, p. 1–6, 2007.
- FADOK, V. A. *et al.* Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **Journal of Immunology**, v. 148, n. 7, p. 2207–2216, 1992.
- FAIT, M. E. *et al.* Cationic surfactants as antifungal agents. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 1, p. 97–112, 2019.
- FALK, N. A. Surfactants as Antimicrobials: A Brief Overview of Microbial Interfacial Chemistry and Surfactant Antimicrobial Activity. **Journal of Surfactants and Detergents**, v.

22, n. 5, p. 1119–1127, 2019.

FISHOVITZ, J. *et al.* Penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **IUBMB Life**, v. 66, n. 8, p. 572–577, 2014.

GARDETE, S.; TOMASZ, A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 7, p. 2836–2840, 2014.

GONÇALVES, E. *et al.* Tensoativos Biodegradáveis. **Gestão em foco**, v. 7, p.252 - 262, 2015.

GUILHERME, S. *et al.* DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide - Elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 743, n. 1–2, p. 1–9, 2012.

GUO, Y. *et al.* Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. March, p. 1–11, 2020.

GURYANOV, I.; FIORUCCI, S.; TENNIKOVA, T. Receptor-ligand interactions: Advanced biomedical applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 68, p. 890–903, 2016.

HALGREN, T. A. Merck Molecular Force Field. 11. v. 17, n. 1996, p. 520–552, 2000.

HANWELL, M. D. *et al.* Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, 2012.

HASSOUN, A.; LINDEN, P. K.; FRIEDMAN, B. Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations-a review of recent developments in MRSA management and treatment. **Critical care (London, England)**, v. 21, n. 1, p. 211, 2017.

HAWSER, S. P.; DOUGLAS, L. J. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 9, p. 2128–2131, 1995.

HEASLET, H. *et al.* Structural comparison of chromosomal and exogenous dihydrofolate reductase from *Staphylococcus aureus* in complex with the potent inhibitor trimethoprim. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 76, n. 3, p. 706–717, ago. 2009.

HEGSTAD, K. *et al.* Does the wide use of quaternary ammonium compounds enhance the selection and spread of antimicrobial resistance and thus threaten our health? **Microbial Drug Resistance**, v. 16, n. 2, p. 91–104, 2010.

HOEHAMER, C. F. *et al.* Changes in the proteome of *Candida albicans* in response to azole,

polyene, and echinocandin antifungal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 5, p. 1655–1664, 2010.

HOLTAPPELS M., SWINNEN E., L. DE GROEF, WUYTS J., MOONS L., LAGROU K., E.; VAN DIJCK P., K. . Antifungal Activity of Oleylphosphocholine on In vitro and *In vivo* *Candida albicans* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 1, p. 1–14, 2018.

HUEY, R.; MORRIS, G. M.; FORLI, S. Using autodock 4 and autodock vina with autodocktools : a tutorial. 2012.

HUGHES, J. D. *et al.* Physicochemical drug properties associated with *in vivo* toxicological outcomes. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 17, p. 4872–4875, 2008.

HWANG, I. SOK *et al.* Amentoflavone Stimulates Mitochondrial Dysfunction and Induces Apoptotic Cell Death in *Candida albicans*. **Mycopathologia**, v. 173, n. 4, p. 207–218, 2012.

IBEAS, J. I. *et al.* Fungal cell wall phosphomannans facilitate the toxic activity of a plant PR-5 protein. **Plant Journal**, v. 23, n. 3, p. 375–383, 2000.

IMBERTY, A. *et al.* Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A. **Glycobiology**, v. 1, n. 6, p. 631–642, 1991.

JABER, Q. Z. *et al.* Cationic Amphiphiles Induce Macromolecule Denaturation and Organelle Decomposition in Pathogenic Yeast. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 57, n. 50, p. 16391–16395, 2018.

JADHAV, V. *et al.* Effect of the head-group geometry of amino acid-based cationic surfactants on interaction with plasmid DNA. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 7, p. 1852–1859, 2008.

JOONDAN, N.; JHAUMEER-LAULLOO, S.; CAUMUL, P. A study of the antibacterial activity of l-Phenylalanine and l-Tyrosine esters in relation to their CMCs and their interactions with 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC as model membrane. **Microbiological Research**, v. 169, n. 9–10, p. 675–685, 2014.

KADELA-TOMANEK, M. *et al.* Lipophilicity , Pharmacokinetic Properties , and Molecular Docking Study on SARS-CoV-2 Target for Betulin Triazole Derivatives with Attached 1 , 4-Quinone. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 6, p. 781, 2021.

KALALO, M. J. *et al.* TEA BIOACTIVE COMPOUNDS AS INHIBITOR OF MRSA PENICILLIN BINDING PROTEIN 2a (PBP2a): A MOLECULAR DOCKING STUDY. v. 1, n. 2, p. 75–94, 2020.

KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 2008. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

KORDALEWSKA, M. *et al.* Understanding echinocandin resistance in the emerging pathogen *Candida auris*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 6, 2018.

KUMAR, R. S. *et al.* Surfactant-cobalt(III) complexes: Synthesis, critical micelle concentration (CMC) determination, DNA binding, antimicrobial and cytotoxicity studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 1, p. 117–127, 2009.

LAKHUNDI, S.; ZHANG, K. *crossm.* v. 32, n. iv, 2018.

LAKSHMIPRABA, J. *et al.* Surfactant-copper(II) Schiff base complexes: Synthesis, structural investigation, DNA interaction, docking studies, and cytotoxic activity. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 33, n. 4, p. 877–891, 2014.

LEE, Y. *et al.* Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and beyond. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 6, p. 3390–3411, 2021.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 4, p. 337–341, 2004.

LIPINSKI, C. A. Rule of five in 2015 and beyond: Target and ligand structural limitations, ligand chemistry structure and drug discovery project decisions. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 101, p. 34–41, 2016.

LÓPEZ-FABAL, M. F. *et al.* Valoración de una técnica de PCR-múltiple en el diagnóstico rápido de la bacteriemia. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 31, n. 3, p. 263, 2018.

LUCARINI, S. *et al.* Synthesis, structure–activity relationships and *in vitro* toxicity profile of lactose-based fatty acid monoesters as possible drug permeability enhancers. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 3, p. 1–18, 2018.

LYON, J. P. *et al.* Inhibition of Virulence Factors of *Candida* spp. by Different Surfactants. **Mycopathologia**, v. 171, n. 2, p. 93–101, 2011.

MACHUCA, L. M. *et al.* <i>N</i>-Acetylated Gemini Surfactants: Synthesis, Surface-Active Properties, Antifungal Activity, and Ecotoxicity Bioassays. **Advances in**

Chemical Engineering and Science, v. 05, n. 02, p. 215–224, 2015.

MAERTENS, J. A. History of the development of azole derivatives. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. SUPPL. 1, p. 1–10, 2004.

MARINHO, E. M. *et al.* Virtual screening based on molecular docking of possible inhibitors of Covid-19 main protease. **Microbial Pathogenesis**, v. 148, p. 104365, nov. 2020.

MARZO, I. *et al.* Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. **Science**, v. 281, n. 5385, p. 2027–2031, 1998.

MAŤÁTKOVÁ, O. *et al.* Synergistic action of amphotericin B and rhamnolipid in combination on *Candida parapsilosis* and *Trichosporon cutaneum*. **Chemical Papers**, v. 71, n. 8, p. 1471–1480, 2017.

MBA, I. E.; NWEZE, E. I. Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 39, n. 10, p. 1797–1819, 2020.

MCCARTHY, M.; O'SHAUGHNESSY, E. M.; WALSH, T. J. Amphotericin B: Polyene Resistance Mechanisms. **Antimicrobial Drug Resistance**, n. 20, p. 387–395, 2017.

MECOZZI S., A. P. WEST, JR., D. D. A. Cation- π interactions in aromatics of biological and medicinal interest: Electrostatic potential surfaces as a useful qualitative guide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 20, p. 10566–10571, 1996.

MEI, Y. *et al.* FDA Approved Drug Library Screening Identifies Robenidine as a Repositionable Antifungal. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. June, p. 1–13, 2020.

MENDEZ, D. *et al.* ChEMBL: Towards direct deposition of bioassay data. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D930–D940, 2019.

MESINI, A. *et al.* Changing epidemiology of *candidaemia*: Increase in fluconazole-resistant *Candida parapsilosis*. **Mycoses**, v. 63, n. 4, p. 361–368, 2020.

MILOSHEV, G.; MIHAYLOV, I.; ANACHKOVA, B. Application of the single cell gel electrophoresis on yeast cells. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 513, n. 1–2, p. 69–74, 2001.

MORÁN, C. *et al.* Chemical structure/property relationship in single-chain arginine surfactants. **Langmuir**, v. 17, n. 16, p. 5071–5075, 2001.

MORENO, I.S.S. *et al.* Arginine-phenylalanine and arginine-tryptophan-based surfactants as new biocompatible antifungal agents and their synergistic effect with Amphotericin B against fluconazole-resistant *Candida* strains. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 207, p. 1 - 11, 2021.

NEIDLE, S. *et al.* Symmetric bis-benzimidazoles: new sequence-selective DNA-binding molecules. **Chemical Communications**, n. 10, p. 929–930, 1999.

NETO, J. B. A. *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, p. 1–10, 2014.

NETO, J. B. A. *et al.* Screening of Antimicrobial Metabolite Yeast Isolates Derived Biome Ceará against Pathogenic Bacteria , Including MRSA : Antibacterial Activity and mode of Action Evaluated by Flow Cy ... Original Research Article Screening of Antimicrobial Metabolite Yeas. n. July 2019, 2015.

NETT, J. E. *et al.* Reduced biocide susceptibility in *Candida albicans* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 3411–3413, 2008.

NETT, J. E.; ANDES, D. R. Contributions of the biofilm matrix to *candida* pathogenesis. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 33–38, 2020.

NUCCI, M. Persistent candidemia: Causes and investigations. **Current Fungal Infection Reports**, v. 5, n. 1, p. 3–11, 2011.

NUCCI, M. *et al.* Increased incidence of candidemia in a tertiary care hospital with the COVID-19 pandemic. **Mycoses**, v. 64, n. 2, p. 152–156, 2021.

OBŁAK, E. *et al.* Antifungal activity of gemini quaternary ammonium salts. **Microbiological Research**, v. 168, n. 10, p. 630–638, 2013.

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

OLIVEIRA, V. K. P. *et al.* Candidemia and death by *candida* orthopsilosis and *candida* metapsilosis in neonates and children. **Pediatrics and Neonatology**, v. 55, n. 1, p. 75–76, 2014.

OTERO, L. H. *et al.* How allosteric control of *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 2a enables methicillin resistance and physiological function. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America, 2013.

OTZEN, D. E. Biosurfactants and surfactants interacting with membranes and proteins: Same but different? **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1859, n. 4, p. 639–649, 2017.

PALERMO, E. F.; KURODA, K. Structural determinants of antimicrobial activity in polymers which mimic host defense peptides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 5, p. 1605–1615, 2010.

PALUCH, E. *et al.* Antifungal activity of newly synthesized chemodegradable dicephalic-type cationic surfactants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 164, p. 34–41, 2018.

PATERNINA-DE LA OSSA, R. *et al.* Is community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) an emerging pathogen among children in Brazil? **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 5, p. 371–376, 2018.

PAUL, S. *et al.* Dynamics of *in vitro* development of azole resistance in *Candida tropicalis*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 553–561, 2020.

PÉREZ, L. *et al.* Green cationic arginine surfactants: Influence of the polar head cationic character on the self-aggregation and biological properties. **Journal of Molecular Liquids**, v. 339, 2021.

PETTERSEN, E. F. *et al.* UCSF Chimera — A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. 2004.

PFALLER, M. A. *et al.* Twenty years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* species from 1997-2016. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. Suppl 1, p. S79–S94, 2019.

PFALLER, M. A.; CASTANHEIRA, M. Nosocomial candidiasis: Antifungal stewardship and the importance of rapid diagnosis. **Medical Mycology**, v. 54, n. 1, p. 1–22, 2016.

PIERCE C. G., UPPULURI P., TRISTAN A. R., WORMLEY JR F. L., MOWAT E., RAMAGE G., LOPEZ-RIBOT J. L. A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocols**, v. 3, n. 9, p. 1494–1500, 2008.

PINAZO, A. *et al.* Amino acid-based surfactants: New antimicrobial agents. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 228, p. 17–39, 2016.

PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 4066–4072, 2015.

PIRES, E. G. *et al.* Agreement between RAPD, API20C AUX, CHROMagar *Candida* and microculture on oral *Candida* identification. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, v. 14, n. 2, p. 149–153, 2015.

PIRES, D. E. V.; KAMINSKAS, L. M.; ASCHER, D. B. Prediction and Optimization of Pharmacokinetic and Toxicity Properties of the Ligand. In: **Computational Drug Discovery and Design, Methods in Molecular Biology**. [s.l.: s.n.]. v. 1762p. 271–284.

POISSY, J. *et al.* Risk factors for candidemia: A prospective matched case-control study. **Critical Care**, v. 24, n. 1, p. 1–11, 2020.

RAMAGE, G.; WICKES, B. L. Standardized Method for *In vitro* Antifungal Susceptibility Testing of. **Society**, v. 45, n. 9, p. 2475–2479, 2001.

RANA, M. A. *et al.* Post Tocilizumab Secondary Infections in Covid-19 patients”- Are we doing enough? **Pakistan Journal of Medical and Health Sciences**, v. 15, n. 8, p. 2023–2026, 2021.

RANI, N. *et al.* Allosteric site-mediated active site inhibition of PBP2a using Quercetin 3-O-rutinoside and its combination. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 34, n. 8, p. 1778–1796, 2016.

RICHARDSON, S. *et al.* Presenting Characteristics, Comorbidities, and Outcomes among 5700 Patients Hospitalized with COVID-19 in the New York City Area. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 323, n. 20, p. 2052–2059, 2020.

ROSCETTO, E. *et al.* Antifungal and anti-biofilm activity of the first cryptic antimicrobial peptide from an archaeal protein against *Candida* spp. clinical isolates. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

ROSSATO, A. M. *et al.* Vancomycin MIC and agr dysfunction in invasive MRSA infections in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1819–1823, 2020.

RUDIUK, S. *et al.* Modulation of photo-oxidative DNA damage by cationic surfactant complexation. **Langmuir**, v. 24, n. 16, p. 8452–8457, 2008.

SATOH, K. *et al.* *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the

- external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. **Microbiology and Immunology**, v. 53, n. 1, p. 41–44, 2009.
- SCHERZ-SHOUVAL, R.; ELAZAR, Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. **Trends in Cell Biology**, v. 17, n. 9, p. 422–427, 2007.
- SCIOR, T. *et al.* Recognizing pitfalls in virtual screening: A critical review. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 4, p. 867–881, 2012.
- SEVIN, E. *et al.* Accelerated Caco-2 cell permeability model for drug discovery. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 68, n. 3, p. 334–339, 2013.
- SHAHABUDIN, S.; AZMI, N. S. *Candida*, the opportunistic human pathogen. **Materials Science Forum**, v. 981 MSF, p. 309–315, 2020.
- SHI, L. *et al.* Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. **Cytometry Part A**, v. 71, n. 8, p. 592–598, 2007.
- SHIRAI A., SUMITOMO T., KURIMOTO M., MASEDA H., KOURAI H. The mode of the antifungal activity of gemini-pyridinium salt against yeast. **Biocontrol Science**, v. 14, n. 1, p. 13–20, 2009.
- SHIRAI, A. *et al.* Action of reactive oxygen species in the antifungal mechanism of gemini-pyridinium salts against yeast **Biocontrol Science**, 2012.
- SHITYAKOV, S.; FÖRSTER, C. *In silico* predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood-brain barrier choline transporter. **Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 23–36, 2014.
- SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Guanabara ed. Rio de Janeiro: [s.n.].
- SILVA, V. *et al.* Biofilm formation of multidrug-resistant mrsa strains isolated from different types of human infections. **Pathogens**, v. 10, n. 8, 2021.
- SILVINO, A. C. R. *et al.* Variation in Human Cytochrome P-450 drug-metabolism genes: A gateway to the understanding of plasmodium vivax relapses. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, p. 1–14, 2016.
- SINGH, S. B. *et al.* Tricyclic 1,5-naphthyridinone oxabicyclooctane-linked novel bacterial topoisomerase inhibitors as broad-spectrum antibacterial agents-SAR of left-hand-side moiety (Part-2). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 9, p. 1831–1835, maio 2015.

- SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: Traditional and alternative antifungal agents. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.
- TE WELSCHER, Y. M. *et al.* Polyene antibiotic that inhibits membrane transport proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 28, p. 11156–11159, 2012.
- TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, 2010.
- VANSTRAELEN, K. *et al.* The Eagle-like effect of echinocandins: What's in a name? **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 11, n. 11, p. 1179–1191, 2013.
- VOLOSHINA, A. D. *et al.* The structure – Activity correlation in the family of dicationic imidazolium surfactants: Antimicrobial properties and cytotoxic effect. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1864, n. 12, p. 129728, 2020.
- VOLPE, D. A. Variability in Caco-2 and MDCK Cell-Based Intestinal Permeability Assays. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 97, n. 2, p. 712–725, 2008.
- WAGER, T. T. *et al.* Defining desirable central nervous system drug space through the alignment of molecular properties, *in vitro* ADME, and safety attributes. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 1, n. 6, p. 420–434, 2010.
- WAGER, T. T. *et al.* Central Nervous System Multiparameter Optimization Desirability: Application in Drug Discovery. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 7, n. 6, p. 767–775, 2016.
- WAN, J. *et al.* Surface chemistry but not aspect ratio mediates the biological toxicity of gold nanorods *in vitro* and *in vivo*. **Scientific Reports**, v. 5, n. November 2014, p. 1–16, 2015.
- WANG, Q. *et al.* Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood-brain barrier. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 288, n. 2, p. 349–359, 2005.
- WATKINS, R. R.; HOLUBAR, M.; DAVID, M. Z. Antimicrobial Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* to Newer Antimicrobial Agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 12, 2019.
- WRÓBEL, A. *et al.* Trimethoprim and other nonclassical antifolates an excellent template for searching modifications of dihydrofolate reductase enzyme inhibitors. **Journal of**

Antibiotics, v. 73, n. 1, p. 5–27, 2020.

WU, J. *et al.* Cationic gemini surfactants containing both amide and ester groups: Synthesis, surface properties and antibacterial activity. **Journal of Molecular Liquids**, v. 299, n. xxxx, p. 112248, 2020.

XU, C. *et al.* *In silico* prediction of chemical ames mutagenicity. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 11, p. 2840–2847, 2012.

YABUNAKA, K. C. B. *et al.* Incidência E Fatores De Risco Para O Desenvolvimento De Candidemia Em Pacientes Internados Em Um Hospital Público Terciário No Oeste Do Estado De São Paulo. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 25, n. S 1, p. 101432, 2021.

YAN, J. *et al.* α -Glucosidase inhibition by luteolin: Kinetics, interaction and molecular docking. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, 2014.

YU, Q. *et al.* Novel mechanisms of surfactants against *Candida albicans* growth and morphogenesis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 227, n. December, p. 1–6, 2015.

YUSUF D., DAVIS A. M., KLEYWEGT G. J., S. S. An Alternative Method for the Evaluation of Docking Performance : RSR vs RMSD. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 48, n. 7, p. 1411–1422, 2008.

ZHOU, C.; WANG, Y. Structure–activity relationship of cationic surfactants as antimicrobial agents. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 45, p. 28–43, 2020.


ZHOU, T. *et al.* DNA compaction to multi-molecular DNA condensation induced by cationic imidazolium gemini surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 414, p. 33–40, 2012.

ZOMORODIAN, K. *et al.* Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. **Medical Mycology**, v. 49, n. 2, p. 208–211, 2011.

ZOROV, D. B. *et al.* Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: A new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 192, n. 7, p. 1001–1014, 2000.

Anexo II. Artigo publicado na revista *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, qualis A2, fator de impacto: 5.268.

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 207 (2021) 112017





ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfb





Arginine-phenylalanine and arginine-tryptophan-based surfactants as new biocompatible antifungal agents and their synergistic effect with Amphotericin B against fluconazole-resistant *Candida* strains

Leticia Serpa Sampaio Moreno^{a,b}, Hélio Vitoriano Nobre Junior^{a,b}, Anderson Ramos da Silva^f, Francisca Bruna S. Aires do Nascimento^{a,b}, Cecília Rocha da Silva^{a,b}, João Batista de Andrade Neto^{a,d,e}, Bruno Coelho Cavalcanti^{a,c}, Manoel Odorico de Moraes^{a,c}, Aurora Pinazo^f, Lourdes Pérez^{f,*}

^a Drug Research and Development Center, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil
^b School of Pharmacy, Laboratory of Bioprospection of Antimicrobial Molecules (LABIMAN), Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil
^c Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil
^d Christus University Center (UNICHRISTUS), Fortaleza, CE, Brazil
^e School of Pharmacy, Laboratory for Bioprospection of Antimicrobial Molecules (LABIMAN), Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil
^f Department of Surfactants and Nanobiotechnology, IQAC-CSIC, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Surface-active agents
Chemistry techniques
Synthetic
Drug resistance
Fungal
Candida
Biofilm

ABSTRACT

In the past two decades, the increase in microbial resistance to conventional antimicrobials has spurred scientists around the world to search tirelessly for new treatments. Synthetic amino acid-based surfactants constitute a promising alternative to conventional antimicrobial compounds. In this work, two new cationic amino acid-based surfactants were synthesized and their physicochemical, antifungal and antibiofilm properties evaluated. The surfactants were based on phenylalanine-arginine (LPAM) and tryptophan-arginine (LTAM) and prepared from renewable raw materials using a simple chemical procedure. The critical micelle concentrations of the new surfactants were determined by conductivity and fluorescence. Micellization of LPAM and LTAM took place at 1.05 and 0.54 mM, respectively. Both exhibited good antifungal activity against fluconazole-resistant *Candida* spp. strains, with a low minimum inhibitory concentration (8.2 µg/mL). Their mechanism of action involves alterations in cell membrane permeability and mitochondrial damage, leading to death by apoptosis. Furthermore, when LPAM and LTAM were applied with Amphotericin B, a significant synergistic effect was observed against all the studied *Candida* strains. These new cationic surfactants are also able to disperse biofilms of *Candida* spp. at low concentrations. The results indicate that LPAM and LTAM have potential application to combat the advance of fungal resistance as well as microbial biofilms.

Anexo III. Artigo submetido na revista Future Microbiology, qualis A2, fator de impacto: 3.165

23/03/2022 11:28

ScholarOne Manuscripts

 Future Microbiology

 Home

 Author

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to
Future Microbiology

Manuscript ID
FMB-2022-0074

Title
Activity of Arginine-phenylalanine and arginine-tryptophan-based surfactants against Staphylococcus aureus

Authors
Sampalo, Leticia
do Nascimento, Francisca Bruna Stefany
da Silva, Cecilia
Valente Sá, Livia
NETO, JOÃO BATISTA DE
Silva, Jaclene
Marinho, Emmanuel
dos Santos, Hélio
Pérez, Lourdes
da Silva, Anderson
Rodrigues, Daniel
Barbosa, Amanda
Moreira, Lara
Cavalcanti, Bruno
de Moraes, Manoel
Nobre Júnior, Hélio

Date Submitted
23-Mar-2022