

CECÍLIA MARIA DE SÁ BARRETO CRUZ FALCÃO

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE NANOPARTÍCULAS DE
PRATA E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM FLUCONAZOL
FRENTE A CEPAS DE *CANDIDA ALBICANS* RESISTENTES**

RECIFE-PE

2018

CECÍLIA MARIA DE SÁ BARRETO CRUZ FALCÃO

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE NANOPARTÍCULAS DE
PRATA E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM FLUCONAZOL
FRENTE A CEPAS DE *CANDIDA ALBICANS* RESISTENTES**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia área de concentração em Clínica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Stevens Leonidas Gomes

Coorientadora: Profa. Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo
Ximenes

RECIFE-PE

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4-1895

- F178a Falcão, Cecília Maria de Sá Barreto Cruz.
Atividade antifúngica de nanopartículas de prata e de sua associação com fluconazol frente a cepas de *Candida albicans* resistentes / Cecília Maria de Sá Barreto Cruz Falcão. – Recife: o autor, 2018.
76 f.: il.; 30 cm.
- Orientador: Anderson Stevens Leonidas Gomes.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em odontologia.
Inclui referências, apêndices e anexos.
1. Prata. 2. Fluconazol. 3. *Candida albicans*. I. Gomes, Anderson Stevens Leônidas (Orientador). II. Título.

617.6 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018 - 028)

CECÍLIA MARIA DE SÁ BARRETO CRUZ FALCÃO

**“ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E DE SUA
ASSOCIAÇÃO COM FLUCONAZOL FRENTE A CEPAS DE *CANDIDA*
ALBICANS RESISTENTES”**

Aprovado em 22 de janeiro de 2018

Orientador: Prof. Dr. ANDERSON STEVENS LEONIDAS GOMES

Banca Examinadora:

3°

**Prof. Dr. Anderson Stevens Leonidas Gomes
(Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco**

2°

**Profa. Dra. Andrea dos Anjos Pontual
(Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco**

3°

**Profa. Dra. Luciana Ferraz Gominho
(Examinador Externo)
Universidade Federal de Campina Grande**

Universidade Federal de Pernambuco

Reitor

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice-Reitor

Profa. Dra. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

Pró-Reitor para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação

Prof. Dr. Ernani Carvalho

Diretor do Centro de Ciências da Saúde

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Prof. Dr. Alessandra de Albuquerque Tavares de Carvalho

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Membros do Corpo Permanente

Prof. Dr. Alessandra de Albuquerque Tavares de Carvalho

Prof. Dr. Anderson Stevens Leonidas Gomes

Prof. Dr. Andrea Cruz Câmara

Prof. Dr. Andrea dos Anjos Pontual

Prof. Dr. Arnaldo de França Caldas Júnior

Prof. Dr. Bruna de Carvalho Farias Vajgel

Prof. Dr. Carlos Menezes Aguiar

Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez

Prof. Dr. Flavia Maria de Moraes Ramos Perez

Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy

Prof. Dr. Jair Carneiro Leão

Prof. Dr. Jurema Freire Lisboa De Castro

Prof. Dr. Luiz Alcino Monteiro Gueiros

Prof. Dr. Maria Luiza dos Anjos Pontual

Prof. Dr. Renata Cimões Jovino Silveira

Secretária

Ozicelere Sena

Dedico este trabalho à minha mãe, D. Penha, e a meu pai, Sr. Antonio (*in memoriam*). Meus maiores mestres!

A meu marido, Glauber. Parceiro de vida!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e à Nossa Senhora, por toda essa caminhada.

Agradeço à Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-graduação em Odontologia. Fazer parte dessa instituição sempre foi um sonho. E hoje, é mais um sonho realizado.

Agradeço à minha família pelo apoio incondicional. Devo tudo isso a ela. Em especial nas pessoas de meus pais, Glauber e Armando. Nada disso seria possível sem vocês!

Agradeço a sr. Edilson e D. Teresinha, que são presentes que a vida me proporciona!

Agradeço ao professor Anderson pelos ensinamentos, confiança e incentivo. Muito mais do que orientação, desde o início, tive apoio e oportunidade de crescer. Obrigada por todo aprendizado que vai muito além do universo da pesquisa! Obrigada por essa conquista!

Agradeço à professora Eulália, por todos os ensinamentos, exigência, paciência e fé. Muito mais do que microbiologia, em seu laboratório reforcei minha disciplina, pensamento científico e capacidade crítica. Obrigada pela confiança e oportunidade! Obrigada por essa caminhada!

Aos amigos, de perto e de longe, sempre presentes.

À querida turma de mestrado, a melhor turma! Onde testemunhei momentos de trabalho árduo, descontração, ética, crescimento e união. O laço que existe, firmado nesses dois anos cheios de histórias, é indelével.

Aos professores da pós-graduação por todo enriquecimento que nos proporcionaram dentro e fora da sala de aula.

Em especial, aos professores Gustavo Godoy, Maria Luiza Pontual, Luiz Alcino, Danyel Cruz e Luciana Gominho, que em momentos distintos contribuíram para o planejamento e crescimento dessa pesquisa e dissertação.

Aos professores, estagiários, monitores e alunos da Clínica Integral 1 (noturno) com quem tive o privilégio de desenvolver meu estágio em docência. Em especial, à professora Daene que me recebeu de braços abertos.

À Oziclere e Tamires pelo apoio e suporte. À D. Tania, pelo eterno sorriso.

Aos colegas e amigos do Departamento de Física, por todas as parcerias e aprendizados. Em especial, agradeço à Patrícia e Luciana que alicerçaram o início dessa jornada. Agradeço carinhosamente à Luana, que me apresentou ao DF, e à Anna Michelle que foi peça chave no desfecho desta pesquisa. Agradeço à Tereza, Dani, Audrey, Gisele, Claudinha, Emery. Tantas vezes vocês estiveram do meu lado, apoiando, sugerindo e iluminando meu caminho!

Às parceiras do LFBM. Com vocês, meninas, dividi muitas horas. Incluindo noites, sábados, domingos e feriados. Eu não teria essa dissertação sem vocês. Luane, Lili, lane, Raissa e Marina, agradeço de coração!

Aos mais do que colegas de trabalho, aos amigos do DQV da UFRPE. Sem o apoio deles, não teria sido possível essa caminhada, em especial à diretora Rivonylda, ao coordenador Luiz Malheiros, por toda força e compreensão. Às amigas Zhoraia, Ivania e Bruna, pelo carinho e incentivo. A Gustavo Dimech e Taciana de Paula que me deram força e iluminaram essa jornada. E ainda à querida equipe da Odontologia: Ana Paula, Ayonara, Dra Angela, Mariana e Tatiana.

À Raquel Balaban. Mesmo longe, sempre tão perto! Devo muito a você!

Agradeço ainda às crianças de minha vida, que mesmo nos dias mais exaustivos me arrancavam sorrisos, minhas afilhadas: Ana Louise, Clara e Isabelle. E à sobrinha do coração Maria Clara. Amo vocês!

Amo todos vocês!

**“Somos programados para gostar de resolver mistérios. Especialmente
quando a solução está longe.”
Lawrence Krauss**

RESUMO

Candida albicans é uma levedura comensal presente em seres humanos e animais, podendo ser patogênica em imunocomprometidos ou indivíduos em que as barreiras que impedem a disseminação foram rompidas. A candidíase é uma doença frequente da cavidade oral e a candidemia é a doença fúngica mais comum entre pacientes hospitalizados no mundo. O fluconazol comumente é a droga de escolha no tratamento de candidíase superficial e sistêmica. Uma vez que *C. albicans* desenvolve resistência ao fluconazol pode haver dificuldade no sucesso terapêutico. O objetivo dessa pesquisa foi investigar a atividade antifúngica de nanopartículas de prata e de sua associação com fluconazol. *C. albicans* (n = 9) e uma cepa de referência (ATCC 10231) foram utilizadas. Foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) das cepas frente às nanopartículas de prata e aos fármacos: nistatina, anfotericina B e fluconazol. Para determinação da interação entre o fluconazol e as nanopartículas de prata foi utilizado o método *checkerboard*. Foi realizado o teste do tubo germinativo a fim de identificar a atividade das nanopartículas de prata em um dos principais fatores de patogenicidade do micro-organismo. As nanopartículas de prata apresentaram atividade fungistática e fungicida em baixas concentrações (variando de 4 a 8 µg/mL e de 8 a 16 µg/mL, respectivamente). Quando as nanopartículas de prata foram utilizadas em associação com o fluconazol, foi possível reverter a resistência das cepas de *C. albicans*. A redução da CIM do fluconazol variou de 87,5 até 99,8%. Todas as associações apresentaram-se sinérgicas. E mesmo em concentrações subinibitórias, equivalentes a 50% da CIM (2 µg/mL), as nanopartículas de prata foram capazes de inibir a formação do tubo germinativo. As nanopartículas de prata apresentaram potencial antifúngico isoladamente e em associação com o fluconazol, podendo ser uma alternativa para o desenvolvimento de novos medicamentos com base neste tipo de nanocompósito para o tratamento de infecções por *Candida*.

Palavras-chave: Prata. Fluconazol. *Candida albicans*.

ABSTRACT

Candida albicans is a harmless commensal in most healthy people and a pathogen of the immunocompromised patients or in which barriers that prevent dissemination have been breached. Candidiasis is a common pathology in oral cavity and candidemia is the most common fungal disease among hospitalized patients worldwide. Fluconazole is commonly a first-line treatment of superficial and systemic candidiasis. Since *C. albicans* develops resistance to fluconazole there may be difficulty to therapeutic success. The aim of this study was to investigate the antifungal activity of silver nanoparticles and their association with fluconazole. *C. albicans* (n = 9) and a reference strain (ATCC 10231) were used. The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC) of the strains against silver nanoparticles and the drugs: nystatin, amphotericin and fluconazole were determined. The checkerboard method was used to determine the interaction between fluconazole and silver nanoparticles. The germ tube test was performed in order to identify the silver nanoparticles activity in one of the main microorganism pathogenicity factor. The silver nanoparticles presented fungistatic and fungicidal activity at low concentrations (fluctuating between 4 to 8 µg / mL and 8 to 16 µg / mL, respectively). When silver nanoparticles were used in combination with fluconazole, it was possible to reverse the *C. albicans* strains resistance. The reduction of fluconazole MIC ranged from 87.5 to 99.8%. All associations were synergistic. And even at sub-inhibitory concentrations, equivalent to 50% of CIM (2 µg / mL), silver nanoparticles were able to inhibit the formation of the germ tube. The silver nanoparticles presented antifungal potential alone and in association with fluconazole, and may be an alternative for new drugs development based on this type of nanocomposite for the treatment of *Candida* infections.

Keywords: Silver. Fluconazole. *Candida albicans*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Protocolo técnico para determinação da Concentração Inibitória Mínima das drogas frente a cepas de *Candida albicans*..... 44

Figura 2. Protocolo técnico para técnica do tabuleiro de xadrez. Eixo X: distribuição do fluconazol; concentração de 512 µg/mL a 0,25 µg/mL. Eixo Y: Distribuição das nanopartículas de prata; concentração de 0,01525 µg/mL a 2 µg/mL.....45

No artigo

Fig. 1. Silver nanoparticles in different amplification. Transmission electron microscopy..... 63

Fig. 2. Absorption spectrum from silver nanoparticles..... 63

Fig. 3. Isobologram showing synergistic effect of silver nanoparticles with fluconazole on *Candida albicans* ATCC 10231 (spaced line) and LFBM 04 (solid line). Y axis: silver nanoparticles FIC; X axis: fluconazole FIC..... 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios de leitura para os valores de Concentração Inibitória Mínima para os antifúngicos fluconazol, nistatina e anfotericina B frente a cepas de <i>Candida albicans</i>	44
--	----

No artigo

Table 1. Minimal inhibitory concentration and minimal fungicidal concentration of silver nanoparticles and antifungals against <i>Candida albicans</i> strains.....	64
---	----

Table 2. Evaluation of the interaction between silver nanoparticles and fluconazole against <i>Candida albicans</i> strains.....	65
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CIF	Concentração inibitória fracionada
CIM	Concentração inibitória mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	Deoxyribonucleic acid
FCZ	Fluconazol
FIFRA	Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act
HIV	Human Immunodeficiency Virus
ICIF	Índice de concentração inibitória fracionada
LFBM	Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos
MOPS	Morpholinopropanesulfonic acid; Ácido morfolinopropanosulfanico
NpAg	Nanopartículas de prata
PMAA	Poly(methacrylic acid); Ácido polimetacrílico
Rpm	Rotações por minuto
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute Medium
S D-D	Susceptível dose-dependente
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

$\pm$	- Mais ou menos
$\geq$	- Maior ou igual
$\leq$	- Menor ou igual
®	- Marca registrada
° C	- Graus Celsius
AgNO ₃	- Nitrato de prata
M	- Mol
mM	- Milimol
nm	- Nanômetro
µg	- Micrograma
µL	- Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. <i>CANDIDA ALBICANS</i>	20
2.1. Epidemiologia	22
2.2. Candidemia e Candidíase invasiva.....	23
2.3 Candidíase oral	24
2.4 Patogenicidade – Formação do tubo germinativo	27
2.5 Terapia antifúngica	29
3. NANOPARTÍCULAS DE PRATA	33
3.1 Prata	34
3.2 Nanopartículas de prata como agente antimicrobiano	36
3.3 Toxicidade e citotoxicidade	37
4. OBJETIVOS	41
5. METODOLOGIA	42
5.1 Preparação e caracterização das nanopartículas de prata	42
5.2 Cepas e meios de cultura	42
5.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)	42
5.4 Determinação da interação entre fluconazol e nanopartículas de prata	45
5.5 Avaliação da inibição do tubo germinativo	46
5.6 Análise estatística	46
6. RESULTADOS	46
7. CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48

APÊNDICE A – Artigo	59
ANEXO A – Pedido de patente	74

1 INTRODUÇÃO

Candida albicans faz parte da microbiota das pessoas saudáveis. Contudo, pode causar infecções sintomáticas quando as defesas do hospedeiro estão comprometidas (Tsui *et al.*, 2016; Hampe *et al.*, 2017). Esta levedura é responsável por um amplo espectro de infecções clínicas, que vão desde comprometimento superficial em mucosa até infecções sistêmicas potencialmente fatais (Morio *et al.*, 2010; Douglas e Konopka, 2016). Embora as infecções sejam, em geral, superficiais e facilmente tratadas em indivíduos imunocompetentes, existe grave morbidade associada a essas infecções em pacientes com respostas imunes comprometidas (Tang *et al.*, 2016).

Micro-organismos do gênero *Candida* são predominantemente oportunistas (Hofer, 2016), altamente adaptáveis e capazes de causar infecção em diversos sítios anatômicos com respostas do hospedeiro igualmente diversas (Jabra-Rizk *et al.*, 2016; Kashem e Kaplan, 2016). Estudos indicam que essa espécie fúngica tem desenvolvido estratégias eficientes para invadir o hospedeiro, bem como evadir os sistemas de defesa, especialmente através de mutações genéticas (Qin *et al.*, 2016; Hampe *et al.*, 2017).

Com avanços da medicina moderna, tratamentos quimioterápicos, exposição a antibióticos de amplo espectro e doenças que causam imunossupressão, a frequência das infecções por fungos oportunistas tem aumentado (Kabir e Ahmad, 2013; Hargrove *et al.*, 2017). No entanto, o progresso da pesquisa neste campo não foi rápido o suficiente para efetivamente prevenir ou tratar doenças fúngicas (Kim, 2016). Estima-se que as infecções fúngicas causam cerca de 1,5 milhão de mortes por ano (Kim, 2016; Wirmsberger *et al.*, 2016).

A terapia antifúngica das infecções por *Candida* enfrenta problemas como: número limitado de drogas antifúngicas, toxicidade dos medicamentos disponíveis no mercado, resistência do micro-organismo, recidivas das infecções e alto custo dos medicamentos (Mandras *et al.*, 2016). Devido ao perfil de segurança e alta efetividade, os fármacos da família dos azólicos têm sido utilizados, durante anos, como terapia de primeira linha para tratar infecções por *Candida*, e também para a profilaxia antifúngica em pacientes com alto risco de infecção ou mesmo como tratamento empírico e preventivo, onde há sinais de infecção fúngica ou evidência do micro-

organismo sem infecção real. No entanto, tem surgido um preocupante perfil de resistência a esses fármacos (Morio *et al.*, 2010; Tedeschi *et al.*, 2016; Calandra *et al.*, 2016)

Fluconazol é, relativamente, uma droga de baixo custo (Ulu Kilic *et al.*, 2017). Em muitos países é o antifúngico mais prescrito para a candidíase orofaríngea e candidíase vulvovaginal (Peron *et al.*, 2016). Apesar de não existir consenso sobre seu emprego como tratamento de primeira escolha, em quadros clínicos de candidemia, costuma ser a medicação inicialmente prescrita em mais de 60% dos casos (De Rosa *et al.*, 2015; Rodriguez *et al.*, 2017).

Uma vez que *Candida albicans* desenvolve resistência ao fluconazol, surge também uma dificuldade para o sucesso terapêutico (Alvarez-Rueda *et al.*, 2016). Portanto, são necessárias novas estratégias para lidar com essas infecções (Sun *et al.*, 2016).

As doenças infecciosas ainda representam grande desafio em todo o mundo (Hamed *et al.*, 2017) e o desenvolvimento de agentes antifúngicos não é uma tarefa fácil. A utilização de combinações de fármacos tem se mostrado uma solução válida e prática (Gu *et al.*, 2016). Uma estratégia que tem sido eficaz é a combinação de fármacos com nanopartículas metálicas com o objetivo de controlar infecções e bloquear mecanismos de resistência. Essas combinações poderiam aumentar a eficácia e reduzir a toxicidade da droga, e ainda minimizar a resistência fúngica (Ahmad *et al.*, 2016).

Com a nanotecnologia, a disponibilidade de nanopartículas de prata tem viabilizado rápido crescimento de seu emprego nas ciências da saúde (Ahmad *et al.*, 2016). O uso combinado de nanomateriais com antifúngicos convencionais pode ser uma estratégia viável para combater as infecções causadas por fungos resistentes (Sun *et al.*, 2016). As nanopartículas de prata (NpAg) têm demonstrado atividade antibacteriana (Dar *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2017) e antifúngica (Sun *et al.*, 2016) inclusive sobre biofilme formado pelo gênero *Candida* (Monteiro *et al.*, 2013).

Sabendo da relevância das infecções por *Candida albicans* e da emergência crescente de cepas resistentes à antifúngicos convencionais, o objetivo dessa dissertação foi investigar a atividade de nanopartículas de prata frente a cepas de *Candida albicans* e avaliar sua interação com o fluconazol.

2 *CANDIDA ALBICANS*

Mesmo dentro do reino fúngico morfológicamente diversificado, *C. albicans* se destaca por sua notável plasticidade (Noble *et al.*, 2017). Trata-se de um colonizador comensal inofensivo da maioria dos seres humanos e animais e um patógeno dos indivíduos imunocomprometidos ou pacientes em que as barreiras naturais que impedem a infecção e disseminação foram rompidas (Da Silva Dantas *et al.*, 2016; Janus *et al.*, 2016). É um fungo dimórfico capaz de colonizar diversos sítios anatômicos, como a pele humana saudável e mucosas (Jabra-Rizk *et al.*, 2016; Kashem e Kaplan, 2016).

Dependendo das condições do hospedeiro e do ambiente, pode ocorrer uma diversidade de doenças, que vão desde infecções em mucosas até infecções sistêmicas invasivas como resultante dos danos mediados pelo micro-organismos e das respostas do hospedeiro (Jabra-Rizk *et al.*, 2016). Quando a interação equilibrada entre *C. albicans* e células hospedeiras é rompida, pode haver crescimento excessivo dessas leveduras nas superfícies da pele e da mucosa e/ou invasão do tecido do hospedeiro, se disseminando para a corrente sanguínea, colonizando órgãos (Kim, 2016) e apresentando capacidade de proliferar e invadir praticamente qualquer sítio do hospedeiro (Tsui *et al.*, 2016). Além do acometimento de pacientes imunocomprometidos, infecções por fungos podem ocorrer em pacientes com trauma físico cuja integridade de barreiras naturais é interrompida. O trauma físico pode ser um fator de risco, mesmo em indivíduos imunocompetentes (Erwig e Gow, 2016).

Uma das principais características associadas à patogênese é a mudança da forma celular de levedura para hifa, que pode danificar células epiteliais e induzir o processo inflamatório. Os aspectos exatos que subsidiam à infecção ainda são desconhecidos (Cleary *et al.*, 2016; Hofer, 2016). Contudo, as diferentes morfologias de *C. albicans* possuem interações distintas com células hospedeiras durante o processo infeccioso: notavelmente, a forma de hifa possui a capacidade de invadir os tecidos e causar doenças (Cleary *et al.*, 2016).

Durante as últimas décadas, ocorreu progresso significativo na compreensão da interação entre *C. albicans* e o sistema imunológico do hospedeiro (Qin *et al.*, 2016). Diante da célula fúngica agressora, o sistema imunológico do hospedeiro se prepara para a defesa contra o micro-organismo pelo reconhecimento

de receptores, ativação dos sinais de transdução e cooperação de células do sistema imunológico. A partir daí, *C. albicans* pode ser rapidamente eliminada por células imunes ou se disseminar por via hematogênicas, promovendo infecções sistêmicas (Rast et al., 2016).

As cepas de *C. albicans* frequentemente são capazes de gerar variantes com alterações genéticas a fim de se adaptarem às mudanças ambientais durante os processos de colonização e infecção, (Hampe et al., 2017) ou seja, ainda que existam variados mecanismos de defesa do indivíduo, esses patógenos fúngicos apresentam habilidades de invadir e se disseminar pelo hospedeiro, desenvolvendo o quadro patológico (Morschhäuser, 2016; Qin et al., 2016).

As características dos estados comensais e patogênicos da *C. albicans* envolvem regulação e adaptação ao microambiente do hospedeiro. Sua biologia celular tem evoluído para permitir o estabelecimento de diferentes tipos de relacionamentos com o hospedeiro humano (Da Silva Dantas et al., 2016). Os exatos mecanismos que protegem contra infecções fúngicas ainda não são explícitos (Wirnsberger et al., 2016).

As células epiteliais são a primeira linha de defesa contra *Candida albicans* (Hebecker et al., 2014; Tang et al., 2016), pois desempenham papel fundamental no sistema imunológico, monitorando a comunidade microbiana nas superfícies mucosas e iniciando respostas defensivas quando esta comunidade é disfuncional (Rast et al., 2016). Além de exercer a função de barreira e fornecer um ponto de ancoragem para a colonização destas leveduras, as células epiteliais também iniciam respostas imunes inatas e adaptativas (Hebecker et al., 2014).

As superfícies da mucosa mantêm a homeostase entre o ambiente interno e externo do hospedeiro, formando uma rede de comunicação intercelular, ao mesmo tempo que fornece rotas de entrada importantes para agentes patogênicos microbianos (Tang et al., 2016). Assim, a superfície da mucosa representa tanto o local primário da interação do hospedeiro com *C. albicans* quanto a origem de infecções clínicas graves (Rast et al., 2016). Ainda não está claro se a presença de *C. albicans* em indivíduos saudáveis é uma desvantagem ou um benefício no contexto do treinamento do sistema imunológico (Prieto et al., 2016).

A relação entre *Candida albicans* e as células do hospedeiro é caracterizada por interação complexa entre a expressão de fatores de patogenicidade (dentre eles a morfogênese celular, expressão de adesinas, endocitose induzida, penetração ativa, degradação proteolítica) que resultam em aderência, invasão e danos celulares. O sistema imunológico do hospedeiro, responde secretando citocinas pró-inflamatórias, particularmente a Interleucina 8, ativando dessa forma as ações antimicrobianas e eliminando o patógeno fúngico. Tem-se percebido que *Candida albicans* tem evoluído para driblar essas respostas imunes (Höfs *et al.*, 2016). Para sobreviver dentro do hospedeiro, os fungos utilizam vários mecanismos para evitar a captura pelo sistema imunológico e interferir nos vários estágios de interação com os fagócitos. Essas estratégias podem prejudicar significativamente a potência da resposta imune inata (Erwig e Gow, 2016).

Evidências apontam que a maioria das infecções por *C. albicans* está associada à formação de biofilmes em superfícies hospedeiras ou abióticas. O biofilme pode, inclusive, ser residente em dispositivos médicos: situação que apresenta alta relação morbidade/mortalidade. Esses biofilmes são inerentemente tolerantes à terapia antimicrobiana e, portanto, a susceptibilidade dos biofilmes de *Candida* aos atuais agentes terapêuticos permanece baixa. Supõe-se que a formação de biofilmes pode ser um processo de adaptação para a sobrevivência dentro do ambiente hostil do hospedeiro (Tsui *et al.*, 2016). Dessa forma, sabe-se que biofilmes podem atuar como duplo empecilho: resistência aos antifúngicos e barreira ao sistema imunológico (Panwar *et al.*, 2016).

2.1 Epidemiologia

A epidemiologia das infecções por *Candida* tem se alterado ao longo das últimas décadas, influenciada por condições hospitalares, situação predisponente do paciente e tipo de agentes antifúngicos administrados (Bassetti *et al.*, 2016). Estima-se que as infecções fúngicas têm sido em grande parte sub-dagnosticadas (Tang *et al.*, 2016).

Em estudos epidemiológicos recentes, a candidemia tem sido descrita como uma causa comum da infecção sanguínea em todo o mundo e sua incidência mostrou variação geográfica, variando de 0,1 a 2,86 casos por 1000 internações

hospitalares (Poikonen *et al.*, 2010; Bassetti *et al.*, 2011; Bassetti *et al.*, 2013; Tedeschi *et al.*, 2016). No Brasil, a incidência de candidemia em hospitais públicos é de aproximadamente 2,5 casos por 1000 internações hospitalares (Colombo *et al.*, 2013). *C. albicans* tem permanecido como um dos agentes patogênicos mais importantes associados à infecções sanguíneas (Bujdáková, 2016).

O número de pacientes com candidíase invasiva tem aumentado gradualmente. A taxa de mortalidade foi maior nos últimos anos, bem como a utilização de drogas antifúngicas (Ulu Kilic *et al.*, 2017). A mortalidade pode atingir índices de 40%, mesmo quando os pacientes recebem terapia antifúngica (Li *et al.*, 2017). A candidíase invasiva é uma importante causa de mortalidade e morbidade em recém-nascidos muito prematuros ou de muito baixo peso (Austin *et al.*, 2015).

2.2 Candidemia e Candidíase invasiva

A candidemia é a doença fúngica mais comum entre pacientes hospitalizados no mundo (Li *et al.*, 2017) trazendo graves consequências (Pfaller e Diekema, 2010). Esta patologia compreende a presença de levedura na corrente sanguínea e outras infecções invasivas profundas causadas por espécies de *Candida* com significativa morbidade e mortalidade (Bassetti *et al.*, 2016).

Mais de um terço dos episódios de candidemia (ou candidíase invasiva) ocorrem em unidades de medicina interna, mas poucos estudos têm se concentrado em dados específicos sobre sua epidemiologia, características clínicas e fatores de risco para a mortalidade. Sua incidência pode ser subestimada, principalmente nos centros que realizaram um menor número de hemoculturas (Tedeschi *et al.*, 2016).

A candidemia tem mostrado mortalidade significativamente maior do que as infecções bacterianas da corrente sanguínea em pacientes com câncer. E a *C. albicans* foi citada como o principal agente patogênico (Li *et al.*, 2017). Este quadro clínico representa um desafio terapêutico onde a vigilância contínua da susceptibilidade antifúngica ajudará a selecionar a terapia apropriada (Peron *et al.*, 2016).

Dispositivos como próteses, válvulas cardíacas e cateteres são fatores de risco associados a candidíase nosocomial. Estes dispositivos médicos podem ser

colonizados por leveduras do gênero *Candida*, formando um biofilme em sua superfície (Bujdaková, 2016; Gulati e Nobile, 2016). Uma vez que um biofilme de *C. albicans* é formado em um dispositivo médico implantado, atua como um reservatório para células patogênicas, é altamente resistente às drogas e ao sistema imunológico do hospedeiro, e tem potencial para disseminar infecções sanguíneas que podem levar a infecções sistêmicas invasivas de tecidos e órgãos (Gulati e Nobile, 2016).

Nos últimos anos, houve mudanças substanciais no gerenciamento da candidemia e na disponibilidade de agentes antifúngicos, com maior complexidade na prescrição de medicamentos adequados e interesse crescente no desenvolvimento de programas de monitoramento (Bassetti et al., 2016). Novas ideias têm modificado substancialmente as estratégias diagnósticas e terapêuticas. As mudanças na epidemiologia e o surgimento da resistência contra medicações da família dos azólicos merece atenção (Kullberg e Arendrup, 2015). Essas infecções ainda carregam índices de morbidade e mortalidade inaceitavelmente elevados, o que claramente aponta para grandes limitações no atual armamento antifúngico (Calandra et al., 2016; Vila et al., 2017). A progressão de uma infecção sistêmica para a conclusão final (a morte do patógeno ou do hospedeiro) reflete a articulação de diversos programas de atuação e mudança simultâneas que são induzidas pela interação hospedeiro-patógeno (Erwig e Gow, 2016).

2.3 Candidíase oral

A cavidade oral é um ecossistema complexo composto por vários tipos de epitélio da mucosa e constantemente banhado em saliva secretada por glândulas salivares maiores e menores. É uma região que abriga uma extensa microbiota que inclui micro-organismos benéficos, juntamente com comensais potencialmente nocivos e patógenos transitórios. *Candida albicans* é normalmente um fungo comensal que coloniza a saliva e a mucosa oral, mas que pode se tornar um patógeno causador de candidíase orofaríngea (Salvatori et al., 2016).

Em geral, acredita-se que uma ecologia oral saudável é altamente diversificada na composição das espécies. Essa diversidade é perdida quando a patologia surge ou vice-versa, surge a patologia quando essa diversidade é perdida (Janus et al., 2016).

Watkins *et al.* (2017), em estudo exploratório prospectivo, encontraram que a admissão dos pacientes em Unidades de Terapia Intensiva esteve associada a alterações na microbiota, incluindo um aumento geral em *Candida albicans* (Watkins *et al.*, 2017). Em estudo epidemiológico, observou-se a candidíase pseudomembranosa e colonização oral por *Candida* estava acima da média em recém-nascidos prematuros de baixo peso (Tinoco-Araujo *et al.*, 2013).

A maioria das espécies de *Candida* crescem como formas de levedura unicelulares, enquanto *C. albicans* também é capaz de formar morfologias de hifas ou pseudo-hifas. Perturbações no estado imune do hospedeiro permitem a progressão da *C. albicans* do comensalismo para a patogenicidade; no entanto, a compreensão sobre outros fatores predisponentes que subsidiam essa transição ainda está incompleta. Supõe-se que os principais fatores são: perturbação do componente bacteriano da microbiota oral (como por exemplo durante o uso de antibióticos de amplo espectro), alterações na quantidade ou qualidade salivar ou violação das barreiras epiteliais do hospedeiro (como resultado de queimaduras, cateteres ou tubos de ventilação, ou uso de prótese dentária) (Hebecker *et al.*, 2014; Salvatori *et al.*, 2016). No entanto, *C. albicans* também é capaz de produzir doenças em um hospedeiro saudável: quando invade a polpa dentária ou coloniza superfícies dentárias na doença periodontal (Salvatori *et al.*, 2016).

Em geral, enquanto o equilíbrio entre o fungo, os mecanismos de defesa do hospedeiro e os outros membros da microbiota oral são mantidos, a colonização oral com *C. albicans* pode ser considerada benigna. Entretanto, a interrupção deste equilíbrio pode levar ao crescimento excessivo de fungos e candidíase oral. Dados clínicos e resultados obtidos nos diferentes modelos de infecção demonstram claramente que a patogênese da candidíase oral depende de ambas as atividades: do fungo que leva à invasão do tecido e da resposta do hospedeiro (Hebecker *et al.*, 2014).

Também pode haver desencadeamento da patologia quando fatores locais ou sistêmicos predispõem o indivíduo. A prevalência de *Candida albicans* foi maior em pacientes com Diabetes Mellitus em amostras coletadas de bolsas periodontais e canais radiculares. As cepas de *Candida albicans* mostraram maior patogenicidade em pacientes diabéticos em comparação com pacientes normoglicêmicos (Gomes *et al.*, 2017). Pacientes idosos com diabetes apresentaram risco estimado 4,4 vezes

maior de desenvolver candidíase oral quando comparado com idosos sem essa condição (Bianchi et al., 2016).

A cavidade oral é o único sítio onde as infecções por *Candida albicans* ocorrem tanto em indivíduos imunocompetentes como em imunossuprimidos (Salvatori et al., 2016), sendo a hipossalivação, forte condição predisponente (Billings et al., 2017). Pacientes com xerostomia apresentam maior número de micro-organismos do gênero *Candida* na cavidade oral (Shinozaki et al., 2012).

A candidíase oral ocorre em pacientes imunocomprometidos. Como este grupo de pacientes provavelmente continuará a aumentar devido aos avanços na medicina moderna, a candidíase oral continuará a ser um problema comum em pacientes em situação de vulnerabilidade. Embora a terapia padrão seja eficaz na maioria dos pacientes, as infecções recorrentes em pacientes imunocomprometidos de longo prazo fornecem um desafio terapêutico à medida que cepas resistentes se desenvolvem sob tratamento de longo período. Perspectivas recentes sobre a patogênese e os mecanismos de defesa do hospedeiro fornecem a base para novas abordagens para a candidíase oral (Hebecker et al., 2014).

Infecções fúngicas orais oportunistas têm se expandido, especialmente em portadores de próteses dentárias. A estomatite protética é uma reação inflamatória comum, de etiologia multifatorial, que geralmente está associada a espécies de *Candida*, particularmente *Candida albicans*, devido à sua alta patogenicidade, capacidade de aderir e formar biofilmes em tecidos de cavidade oral e superfícies protéticas. Esta reação inflamatória é comum na clínica odontológica e se manifesta em uma variedade de apresentações clínicas (Gleiznys et al., 2015). É possível observar inflamação da mucosa oral em contato direto com próteses dentárias. E curiosamente, afeta um número significativo de portadores de prótese dentária com bom estado de saúde geral (Yano et al., 2016). Pode dar origem a sintomas bucais dolorosos, bem como ser um reservatório para infecção em outros locais do corpo (Aguayo et al., 2017).

O manejo da candidíase oral pode, eventualmente, ser complexo. E nesses casos, deve-se sempre incluir investigação minuciosa das condições predisponentes subjacentes para evitar sua recorrência ou disseminação sistêmica (Gleiznys et al., 2015).

Um fator agravante e desafiador desta patologia é que *Candida albicans* facilmente coloniza e forma biofilmes nos materiais odontológicos que compõem a estrutura da prótese (Yano *et al.*, 2016). A formação de hifas desempenha um papel importante na sua fixação sobre superfícies acrílicas (Aguayo *et al.*, 2017). É possível que um biofilme de *C. albicans* formado na superfície protética inocule continuamente a mucosa do hospedeiro levando a formação de biofilme associado ao tecido. A natureza pró-inflamatória do biofilme na superfície protética pode levar à inflamação crônica que resulta no fracasso quanto ao extermínio da infecção, devido à presença do dispositivo oral contaminado (Yano *et al.*, 2016). Assim, a manutenção da mucosa saudável está diretamente relacionada ao grau de higiene das próteses em contato com os tecidos bucais (Bianchi *et al.*, 2016).

2.4 Patogenicidade – Formação do tubo germinativo

A compreensão de quando e como os mecanismos e fatores de patogenicidade contribuem para a infecção tem aumentado significativamente nos últimos anos. Durante a infecção superficial e sistêmica, *C. albicans* depende de uma série de fatores de patogenicidade de atributos inerentes da capacidade celular (Mayer *et al.*, 2013). Os casos de resistência a medicamentos entre esses agentes patogênicos tornaram-se mais frequentes, exigindo o desenvolvimento de novos fármacos, juntamente com uma melhor compreensão dos processos de resistência (Hargrove *et al.*, 2017).

Dentre os atributos, incluindo a transição morfológica entre formas de leveduras e hifas, a expressão de adesinas e invasões na superfície celular, o tigmotropismo, a formação de biofilmes, a mudança fenotípica e a secreção de enzimas hidrolíticas são considerados importantes fatores de patogenicidade. À medida que a compreensão detalhada dos mecanismos de patogenicidade das células e comunidades fúngicas melhora, o potencial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e de diagnóstico se expande (Mayer *et al.*, 2013).

Como já destacado anteriormente, um relevante atributo de patogenicidade de *Candida albicans* é a sua capacidade de formar biofilmes: comunidades densamente agrupadas de células aderidas a uma determinada superfície (Gulati e Nobile, 2016). Esses biofilmes apresentam arquitetura complexa (Soll e Daniels,

2016), e, em geral, são intrinsecamente resistentes à terapia antifúngica convencional, ao sistema imunológico do hospedeiro e a outros fatores ambientais; tornando as infecções associadas a biofilmes um desafio clínico significativo (Gulati e Nobile, 2016; Jia, W. *et al.*, 2016).

Em geral, o biofilme consiste em camadas basais de células leveduriformes e uma região superior de hifas encapsuladas em matriz extracelular (Soll e Daniels, 2016). A resistência fúngica ao biofilme é multifacetada, envolvendo barreiras físicas básicas e processos regulatórios complexos (Ramage *et al.*, 2012; Gulati e Nobile, 2016).

As infecções fúngicas pelo biofilme tornaram-se cada vez mais reconhecidas como um problema clínico significativo. Tem-se percebido a importância da formação de biofilmes na colonização de *C. albicans* e a quantidade de estudos publicados tem aumentado de forma exponencial (Soll e Daniels, 2016). Uma das principais razões por trás disso é o impacto que ocorre após o tratamento, uma vez que a terapia antifúngica geralmente falha e intervenções mais invasivas podem ser necessárias. Refletindo inclusive nos aspectos financeiros dos serviços de saúde (Ramage *et al.*, 2012).

A capacidade de *C. albicans* sofrer uma transição morfológica reversível de levedura para forma filamentosa é apontada como fator mais relevante na patogênese do micro-organismo. Significativos esforços de pesquisa tem se concentrado em mecanismos capazes de inibir ou controlar essa transição (Kadosh, 2016; Vila *et al.*, 2017). O biofilme tem sido apontado como a principal causa da patogênese das infecções por cateter (Jia, W. *et al.*, 2016). Uma vez que o biofilme é formado nas superfícies de dispositivos médicos, pode-se até observar a biodeterioração desses materiais, relacionados à sua estrutura e função, após um certo período de tempo (Polívková *et al.*, 2017).

Em experimentos laboratoriais, os biofilmes de *C. albicans* apresentam capacidade de se desenvolver em vários substratos diferentes e em tipos diversos de meio. Isto indica uma robustez inerente do desenvolvimento do biofilme a uma ampla gama de condições ambientais (Gulati e Nobile, 2016).

A formação inicial de tubos germinativos é suficiente para invasão em células epiteliais saudáveis (Hebecker *et al.*, 2014), expressando assim seu papel crucial na patogenicidade (Máté *et al.*, 2017).

A erradicação de uma infecção associada ao biofilme é muito difícil devido à sua resistência e tolerância expressa aos tratamentos terapêuticos disponíveis (Bujdaková, 2016). Muitas vezes, esses tratamentos nem sequer são possíveis, já que muitos pacientes encontram-se criticamente vulneráveis e são incapazes de tolerá-los, deixando esses pacientes com poucas opções disponíveis e ressaltando a necessidade urgente de encontrar melhores terapias para combater a formação de estruturas de biofilmes (Gulati e Nobile, 2016).

As medicações das famílias dos azólicos e as formulações clássicas dos poliênicos, por exemplo, não são eficazes contra os biofilmes de *C. albicans*, o que limita ainda mais os fármacos que podem ser utilizados para tratar essas infecções. A resistência é multifatorial e complexa mecanicamente, mas deve-se principalmente a três mecanismos principais: a superativação das bombas de efluxo, a presença da matriz extracelular e a existência de células metabolicamente inativas, referidas como células "persistentes". Atualmente, não existem medicamentos específicos para o tratamento de biofilme, tornando este um ponto particularmente problemático. Não só os biofilmes fornecem proteção física contra as defesas imunes do hospedeiro e medicamentos antifúngicos, mas células nos biofilmes são intrinsecamente resistentes aos medicamentos devido à sua elevação constitutiva de bombas de efluxo de drogas e seus estados metabólicos alterados. Assim, o desenvolvimento de fármacos antifúngicos com novos mecanismos é claramente necessário (Gulati e Nobile, 2016).

2.5 Terapia antifúngica

Quando comparado com a quantidade de agentes antibacterianos, a disponibilidade de agentes antifúngicos é significativamente menor (Tsui *et al.*, 2016). O tratamento antifúngico pode ser classificado como profilático (em pacientes com alto risco de infecção por fungos), empírico (desencadeado por sinais clínicos de infecção fúngica, como por exemplo, febre persistente na presença de fatores de risco), preventivo (no caso de evidência microbiológica de fungo sem infecção real) e

definitiva (após confirmação microbiológica positiva da existência e sensibilidade do micro-organismo) (Calandra *et al.*, 2016).

As terapias são muitas vezes iniciadas tardiamente, pois essas infecções podem ser difíceis de diagnosticar (Calandra *et al.*, 2016). A terapia antifúngica pode resultar em complicações durante sua administração devido a mudanças nos padrões de epidemiologia e susceptibilidade às drogas (Moazeni *et al.*, 2016). A maior parte das cepas de *Candida* isoladas de indivíduos infectados estão se tornando resistentes aos medicamentos antifúngicos comumente usados (Kabir e Ahmad, 2013).

Os pacientes infectados com *Candida* são comumente tratados com uma variedade de drogas antifúngicas, como fluconazol, anfotericina B e nistatina. Durante uso prolongado destas drogas, muitos patógenos fúngicos tornam-se resistentes e a terapia antifúngica perde eficiência. A este respeito, acredita-se que a combinação de dois ou mais medicamentos antifúngicos pode ser uma alternativa no combate à crescente resistência a medicamentos (Kabir e Ahmad, 2013).

Em 2016, A Infectious Disease Society of America atualizou as diretrizes para o manejo clínico das infecções por *Candida*. Para candidíase orofaríngea leve é preconizado o uso do clotrimazol, ou como alternativa, a nistatina (Pappas *et al.*, 2016). No Brasil, o clotrimazol não está disponível em formulações adequadas para uso oral, só restando a nistatina para uso tópico. Para infecções moderadas ou severas, a melhor opção terapêutica de uso sistêmico é o fluconazol. Outros fármacos são considerados em pacientes não responsivos ou intolerantes ao fluconazol, como outros azólicos ou Anfotericina B (Colombo *et al.*, 2013; Pappas *et al.*, 2016). Caspofungin, anidulafungin e micafungin devem ser reservados ao tratamento de candidíase esofágica refratária ao fluconazol (Colombo *et al.*, 2013). Para candidíase relacionada a prótese dentária, é recomendada a desinfecção do dispositivo protético, juntamente com a terapia antifúngica (Pappas *et al.*, 2016).

A anfotericina B é considerada um antifúngico eficaz no tratamento de infecções por *C. albicans*, mas sua aplicação clínica é limitada por efeitos adversos e baixa biodisponibilidade. Seu uso generalizado tem sido limitado devido a altos custos e necessidade de altas doses. Assim, pesquisas extensas têm sido feitas para desenvolver outros sistemas de dispensação mais eficientes (como micelas, nanoesferas e conjugados) e com menor toxicidade (Zhou *et al.*, 2017). Existem

evidências que a anfotericina B intravenosa é o único agente antifúngico que tem mostrado um efeito sobre a mortalidade em quadros de candidíase invasiva (Johansen e Gøtzsche, 2014).

A nistatina, eventualmente, é empregada profilaticamente em pacientes com imunodeficiência grave ou mesmo no tratamento de infecção fúngica em tais pacientes, embora seu efeito pareça ser questionável. A Organização Mundial de Saúde recomenda a terapia tópica com suspensão ou pastilhas de nistatina como alternativa ao fluconazol para tratar a candidíase orofaríngea em crianças e adultos portadores do vírus HIV (World Health, 2014). Apesar de ser uma droga amplamente utilizada no combate da candidíase orofaríngea, ainda não há consenso quanto à formulação, dosagem ou duração do tratamento. Escassas evidências são encontradas a respeito da eficácia da nistatina para candidíase oral na prática clínica (Lyu *et al.*, 2016). Uma revisão sistemática sugeriu que o tratamento tópico com nistatina poderia reduzir as taxas de infecção grave em recém-nascidos de muito baixo peso, mas não houve evidência de redução no risco de morte (Austin *et al.*, 2015).

Fluconazol é uma alternativa antifúngica relativamente de baixo custo (Ulu Kilic *et al.*, 2017). O surgimento da resistência das cepas de *C. albicans* aos azólicos tem se tornado um problema para pacientes com candidíase, pois o fluconazol em muitos países é o fármaco mais comumente prescrito para a candidíase orofaríngea e candidíase vulvovaginal (Peron *et al.*, 2016). Em estudo retrospectivo observacional em pacientes com queimaduras e acometimento por candidíase invasiva, Renau *et al.* (2016) encontraram o fluconazol como droga antifúngica mais utilizada (Renau Escrig *et al.*, 2016).

Trata-se de uma droga com boa tolerância, alta biodisponibilidade e boa penetração nos tecidos. No entanto, períodos prolongados de tratamento com fluconazol podem induzir mutações que expressem a resistência à medicação causando insucessos no tratamento (Peron *et al.*, 2016).

O patógeno fúngico oportunista *C. albicans* frequentemente produz variantes geneticamente alteradas para se adaptar às mudanças ambientais. O aumento da resistência ao fluconazol de tais cepas propicia o crescimento fúngico mesmo em presença da droga (Hampe *et al.*, 2017). Entre as muitas mutações

pontuais já descritas na literatura, cerca de doze foram confirmadas como envolvidas na resistência aos medicamentos azólicos (Alvarez-Rueda *et al.*, 2016). A resistência a esta droga apresenta-se como desafio no manejo da *Candida albicans* (Shao *et al.*, 2017).

Um aspecto intrigante e preocupante é que a terapia antifúngica seja capaz de promover a evolução das cepas que, como consequência de uma mutação de resistência aos medicamentos, possam adquirir maior resistência inclusive a mecanismos de defesa inatos do hospedeiro (Hampe *et al.*, 2017).

Um excelente exemplo de microevolução é o desenvolvimento de resistência ao fluconazol, que inibe a biossíntese de ergosterol, durante a terapia antifúngica (Morschhäuser, 2016). Os esteróis são os componentes basais das membranas do patógeno *Candida albicans*, e essas membranas determinam a susceptibilidade das células a uma variedade de tensões: como pressões iônicas, osmóticas e oxidativas e tratamento com drogas antifúngicas. Os azólicos têm seu mecanismo de ação direcionado para a biossíntese do ergosterol (Lv *et al.*, 2016).

A resistência ao fluconazol pode ser causada por mutações no alvo do fármaco, por mudanças na via de biossíntese do ergosterol e por mutações de ganho de função em fatores de transcrição que resultam na regulação positiva constitutiva de genes de biossíntese de ergosterol e bombas de efluxo de drogas (Morschhäuser, 2016). Existe alta diversidade e frequência de substituições de aminoácidos na estrutura do ergosterol, principal alvo de drogas antifúngicas da família dos azólicos (Morio *et al.*, 2010). O fluconazol também induz rearranjos genômicos que resultam em amplificação de genes e perda de padrão de heterozigose para mutações de resistência, o que aumenta ainda mais a resistência às drogas. Essas alterações do genoma podem afetar as regiões cromossômicas e ter consequências fenotípicas adicionais. Isso, por sua vez, levanta a possibilidade de que a recombinação sexual entre diferentes variantes de uma população inicialmente susceptível a fármacos possa contribuir para a geração de cepas altamente resistentes ao fluconazol com múltiplos mecanismos de resistência. As mutações de ganho de função em fatores de transcrição, que resultam na expressão de genes desregulados, também causam redução na aptidão física (Morschhäuser, 2016). Este polimorfismo genético deve ser levado em consideração no projeto de racionalidade de novos compostos antifúngicos (Morio *et al.*, 2010).

Apesar disso, muitos isolados clínicos que contêm tais mutações não apresentam defeitos de condicionamento físico, o que indica que eles superaram os ônus da resistência aos medicamentos com uma evolução posterior por mecanismos ainda desconhecidos. O fluconazol inibe a enzima esterol 14 α -desmetilase na via de biossíntese do ergosterol, resultando no esgotamento do ergosterol e na produção de um esterol metilado tóxico, levando ao comprometimento das funções da membrana (Morschhäuser, 2016).

As células podem adquirir resistência ao fluconazol de várias maneiras: diminuição dos efeitos tóxicos do fármaco, alteração da enzima alvo para reduzir a ligação do fármaco, aumento da quantidade da enzima alvo ou prevenção da acumulação intracelular do medicamento. Um mecanismo frequente é o transporte ativo da droga fora da célula. Todos esses mecanismos foram encontrados em isolados clínicos de *C. albicans* resistentes ao fluconazol. Coletivamente, esses achados indicam que a aquisição de resistência ao fluconazol por mutações pontuais e rearranjos genômicos afeta a aptidão de *C. albicans* na ausência da droga (Morschhäuser, 2016).

3 NANOPARTÍCULAS DE PRATA

O desenvolvimento de tecnologias e técnicas para a síntese de nanopartículas/nanocompósitos tem revolucionado o campo da biomedicina (Rudramurthy *et al.*, 2016). A nanotecnologia está diretamente ligada a física, química, biologia, ciências de materiais e ciências da saúde. E encontra aplicação em vários aspectos da vida cotidiana (Dos Santos *et al.*, 2014). A rápida progressão da nanotecnologia tem proporcionado novas intervenções terapêuticas (Hamed *et al.*, 2017). Nanopartículas proporcionam esperanças para o desenvolvimento de agentes antimicrobianos eficazes no futuro (Rudramurthy *et al.*, 2016).

Quando um material passa para o regime nanométrico, suas propriedades físicas e químicas são influenciadas pela relação superfície/volume, o que tem permitido a descoberta de novas propriedades e, conseqüentemente, de novas aplicações (Henglein, 1989). As nanopartículas inorgânicas e os seus compostos tem

sido aplicados como bons agentes antibacterianos (Fateme et al., 2017). O nanoproduto mais proeminente é a nanopartícula de prata, que em geral apresenta tamanho de 1-100 nm em pelo menos uma dimensão. As nanopartículas de prata revelam propriedades químicas, físicas e biológicas notavelmente incomuns e têm sido utilizadas para distintas aplicações (Aziz e Akbarzadeh, 2017).

O uso de metais e de nanopartículas metálicas, particularmente a prata, tem se mostrado assim uma ferramenta alternativa no combate a micro-organismos (Durán et al., 2010; Khan et al., 2016). A ciência dos materiais está produzindo vários nanomateriais e nanopartículas, incluindo aqueles com base em ouro, prata, selênio, titânio, etc. (Donovan et al., 2016; Maiyo e Singh, 2017; Vimbela et al., 2017), que já são amplamente utilizados em Ortopedia (Jia, Z. et al., 2016) ou Odontologia (Fateme et al., 2017).

As nanopartículas de prata estão entre os nanomateriais mais utilizados (Tiwari et al., 2017). Os íons de prata sempre demonstraram serem úteis e eficazes em aplicações contra micro-organismos, mas devido às propriedades únicas da nanotecnologia as nanopartículas surgiram como uma alternativa razoável para o desenvolvimento de novos agentes biológicos (Morones et al., 2005). E a prata tem se tornado o padrão-ouro no tratamento antimicrobiano no que se refere à escala nanométrica (Polívková et al., 2017).

A cooperação interdisciplinar que liga a química dos nanomateriais com a pesquisa biológica pode trazer novas possibilidades para a prevenção e erradicação, do biofilme de *Candida* (Bujdaková, 2016). Pesquisas a respeito da utilização de nanopartículas como antibacteriano, agente antibiofilme, antifúngico e antiviral têm aumentado nos últimos anos, juntamente com uma ascendente incorporação deste material em diversos compostos (Rai et al., 2009; Dos Santos et al., 2014; Perez-Diaz et al., 2015).

3.1 Prata

Historicamente, a prata tem sido importante agente terapêutico, especialmente em doenças infecciosas, incluindo infecções cirúrgicas (Alexander, 2009). Produtos contendo prata têm sido usados há milhares de anos pelos seus

efeitos benéficos, muitas vezes para a higiene e nos últimos anos mais como antimicrobianos sobre feridas de queimaduras, traumas e úlceras de pacientes diabéticos (Silver *et al.*, 2006). É considerada não-tóxica para os seres humanos quando usada em pequenas concentrações. Em geral, os micro-organismos são menos susceptíveis ao desenvolvimento de resistência a esse material, se comparado a antimicrobianos convencionais (Rai *et al.*, 2009).

A prata tem sido empregada em várias condições médicas, principalmente empiricamente antes mesmo da constatação de que os micro-organismos eram agentes de infecção (Alexander, 2009). Seu uso diminuiu quando os antibióticos foram introduzidos, mas permaneceu como um dos agentes mais populares para infecções de feridas, especialmente em pacientes queimados (Edwards-Jones, 2009). Classicamente as indicações bem estabelecidas para o uso efetivo de prata são: purificação de água, curativos, prevenção e tratamento da infecção, higiene dental, doenças oculares e outras complicações infecciosas (Alexander, 2009).

Curativos contendo prata apareceram para beneficiar a cicatrização das feridas. A eficácia em destruir a carga bacteriana presente no tecido parece ser o melhor preditor de aceleração da cicatrização (Hiro *et al.*, 2012). Uma série de curativos com prata de liberação lenta em sua composição estão disponíveis no mercado. Estes, são geralmente aceitos como úteis para o controle de infecções bacterianas (e também contra fungos e vírus), mas questões importantes permanecem, incluindo a eficácia relativa de diferentes produtos de prata e a existência de micro-organismos que são resistentes a este metal (Silver *et al.*, 2006).

A prata já foi bastante utilizada na endodontia. Jasper, em 1941, introduziu a técnica de obturação de canais radiculares com cones de prata, sendo amplamente difundida até o início dos anos de 1970 (Maggio, 2004). A utilização dos cones de prata era bem aceita por sua boa estabilidade como material obturador e por serem suficientemente radiopacos e dúcteis para preencherem canais radiculares em todo seu comprimento (De Mele *et al.*, 1986). Atualmente este material não tem mais empregabilidade clínica pois frequentemente eram observadas dificuldades como a dissolução dos meios de cimentação por fluidos teciduais e também a limitação da capacidade de adaptação do cone de prata nas paredes do canal radicular. Além disso, a corrosão tem sido relatada e refletindo em obturação mal sucedida dos condutos radiculares (Brady e Del Rio, 1975).

3.2 Nanopartículas de prata como agente antimicrobiano

As nanopartículas de prata na forma de prata coloidal têm sido utilizadas por mais de 100 anos e há seu registro como um material biocida nos Estados Unidos desde 1954 (Nowack *et al.*, 2011). Este primeiro produto, chamado Algaedyn foi registrado no Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act (FIFRA) (Vaclav, 1960), e ainda hoje é usado como algicida em piscinas residenciais (Nowack *et al.*, 2011).

As nanopartículas de prata têm um grande potencial de uso para controle biológico, incluindo relevante atividade antimicrobiana (Sap-lam, 2010; Bao *et al.*, 2015). A atividade biocida de nanopartículas metálicas em geral e das nanopartículas de prata depende de várias características morfológicas e físico-químicas (Dos Santos *et al.*, 2014). A interação das nanopartículas de prata com tecidos biológicos (corpo humano, micro-organismos, etc.) é favorecida pelo tamanho, visto que encontram-se na mesma escala de suas estruturas primárias (células, genes) (Link *et al.*, 1999). Muitas das interações das nanopartículas de prata com o corpo humano ainda são pouco conhecidas; consequentemente, as características mais desejáveis ainda não estão bem estabelecidas (Dos Santos *et al.*, 2014).

Considerando os efeitos antibacterianos positivos das nanopartículas de prata, o uso delas tem sido recomendado na odontologia restauradora. Existem evidências que as nanopartículas de prata podem ter efeitos positivos sobre a resistência de união dos sistemas adesivos (Fateme *et al.*, 2017; Torres-Méndez *et al.*, 2017).

Uma das causas mais comuns de falência do implante é a peri-implantite, que é causada pela formação de biofilmes nas superfícies dos implantes dentários. A modificação da nanotopografia superficial com revestimento de nanopartículas de prata tem sido sugerida para afetar a adesão microbiana (Besinis *et al.*, 2017; Pokrowiecki *et al.*, 2017). A aplicação de um revestimento com nanopartículas de prata na liga de titânio é capaz de promover uma superfície com propriedades de antibiofilme sem comprometer a biocompatibilidade para uma osteo-integração bem-sucedida e cicatrização óssea acelerada (Besinis *et al.*, 2017).

Na ortodontia, tem se testado a utilização de nanopartículas de prata para um revestimento estável e uniforme de bandas a fim de se obter bandas dentárias antimicrobianas em potencial para uso clínico futuro (Prabha *et al.*, 2016; Sodagar *et al.*, 2016). Também tem sido investigado seu emprego como agente antimicrobiano em próteses dentárias (Köroğlu *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016).

3.3 Toxicidade e citotoxicidade

Diante do exposto, percebe-se que as nanopartículas de prata têm sido incorporadas em dispositivos odontológicos graças as suas propriedades antimicrobianas. A exposição potencial e a toxicidade ainda são desconhecidas devido as diferentes propriedades físico-químicas das partículas e à insuficiência de dados toxicológicos (Savery *et al.*, 2017). O risco potencial das nanopartículas de prata com aplicação na área de saúde tem levantado preocupações (Wen *et al.*, 2017). Uma vez que mais de 30% dos produtos de consumo que incluem nanomateriais contêm nanopartículas de prata, a segurança deste material é de grande interesse público (Wang *et al.*, 2014).

O uso exponencial das nanotecnologias associado às dificuldades de avaliar seu impacto na saúde e no meio ambiente tem estimulado novas metodologias para caracterizar esses nano-objetos em um contexto biológico (Chevallet *et al.*, 2017). Vários agentes mutagênicos podem estar presentes em substâncias liberadas no ambiente, provocando impactos ambientais. Existe uma preocupação especial em relação ao uso generalizado de nanopartículas de prata em vários produtos devido às suas propriedades bactericidas amplamente conhecidas, incluindo no campo médico e na indústria de alimentos (Becaro *et al.*, 2017).

A informação da toxicidade das nanopartículas de prata com base em estudos *in vivo* é limitada e muitas vezes polêmica. Portanto, é crucial investigar o padrão de distribuição de nanopartículas de prata *versus* íons de prata e entender seus efeitos tóxicos. A persistência de nanopartículas metálicas em sistemas biológicos aumenta o risco de carcinogenicidade e, portanto, é importante investigar a sua distribuição, toxicidade e genotoxicidade nos tecidos (Campagnolo *et al.*, 2017). A toxicidade pode interferir nos componentes intracelulares e comprometer a divisão celular (Becaro *et al.*, 2017).

A química da superfície e as dimensões físicas das nanopartículas de prata desempenham um papel importante nas características da toxicidade (Jiravova *et al.*, 2016). A dissolução é característica vital que determina o destino das nanopartículas metálicas no ambiente, bem como nos organismos. Assim, o tamanho das nanopartículas e sua área e a configuração superficiais são relevantes pois influenciam biocinética e toxicidade (Das *et al.*, 2017). Íons de prata tem se mostrado mais tóxicos do que nanopartículas (Galandáková *et al.*, 2016).

Foi observado que as nanopartículas provocaram inflamação e resposta imune ao interagir com tecidos, o que é mecanismo chave da nanotoxicidade (Campagnolo *et al.*, 2017). A exposição prolongada pode promover danos microscópicos: ruptura mitocondrial, inflamação e ativação de vários fatores proliferativos e de sobrevivência celular. Isso poderia levar à desregulação apoptótica e à promoção da morte celular por necrose (Tiwari *et al.*, 2017).

Ainda não é possível determinar um limite seguro para a ingestão oral de nanopartículas de prata ou prata coloidal. Existe uma necessidade urgente de mais pesquisas sobre este tema e, em particular, se as pessoas que utilizam a prata coloidal como um tratamento primário de água potável, trabalhando com nanopartículas de prata na fabricação de filtros em países de baixa renda ou usando esses filtros impregnados, apresentam evidências de danos no DNA (Fewtrell *et al.*, 2017). Não há investigação experimental sistemática e abrangente que forneça dados baseados em evidências sobre a influência de compostos inorgânicos e orgânicos sobre a citotoxicidade das nanopartículas de prata (Kaiser *et al.*, 2017).

Recentemente, também tem surgido o interesse pelo impacto potencial das nanopartículas durante o período de gestação. Verificou-se, em experimento de modelo animal, que a inalação de nanopartículas de prata resulta em aumento do número de fetos reabsorvidos e níveis reduzidos de estrogênio no plasma, em exposição durante um período de 4 horas/dia. Resultados comprovam que as nanopartículas são capazes de alcançar e cruzar a placenta do rato e sugerem que seja tomada precaução em relação à exposição aguda a nanopartículas durante a gravidez (Campagnolo *et al.*, 2017).

É racional especular que uma dose mais baixa das nanopartículas de prata com período de exposição prolongado poderia essencialmente ser acumulado em

órgãos específicos e produzir toxicidade crônica, podendo aumentar o risco de carcinogenicidade (Campagnolo *et al.*, 2017). Relatórios indicam que a prata liberada a partir de produtos aplicados dermatologicamente (por exemplo, curativos para feridas ou cosméticos) pode penetrar na pele, especialmente se danificada. Também foi observada atividade citotóxica e genotóxica (Domeradzka-Gajda *et al.*, 2017). Efeitos citotóxicos e genotóxicos dependem não apenas das características das nanopartículas, mas também do tipo de células expostas (Jiravova *et al.*, 2016).

A avaliação dos efeitos da prata liberada no ambiente, com diferentes concentrações, tamanhos e associada ou não a outros tipos de materiais, incluindo polímeros é essencial. Devido à possibilidade de induzir danos no material genético, dependendo da concentração e a combinação com materiais distintos, as nanopartículas de prata podem ser prejudiciais ao meio ambiente, o que exige controle da eliminação de materiais e embalagens contendo estas nanopartículas (Becaro *et al.*, 2017).

Salvioni *et al.* (2017), desenvolveram nanopartículas de prata de 20 nm de diâmetro que apresentaram poderosa atividade antibacteriana e baixa toxicidade em comparação com a prata coloidal atualmente disponível. A toxicidade muito baixa para células eucarióticas, as torna alternativa promissora aos aditivos convencionais utilizados nas formulações de alimentos, cosméticos e fármacos. Aproveitando a forte estabilidade em soluções aquosas e oleosas, podem ser incluídas em formulações líquidas, semissólidas e sólidas, adequadas para serem administradas por via tópica, incluindo a pele e mucosa intactas ou feridas, via oral ou aplicadas em rígidas ou flexíveis superfícies que estão em contato com o corpo humano ou animal (Salvioni *et al.*, 2017).

Em teste de citotoxicidade e genotoxicidade, com nanopartículas de prata de aproximadamente 20 nm de diâmetro, os resultados mostraram que, para a aplicação pretendida como agente tópico para cicatrização de feridas, o mais adequado seria utilizar até a concentração de 25 µg/mL (Galandáková *et al.*, 2016).

Nanopartículas menores podem entrar em células mais facilmente do que as maiores, o que pode ser a causa de maiores efeitos tóxicos (Liu *et al.*, 2010). Contudo, partículas de 10 nm foram menos tóxicas do que íons de prata (Galandáková *et al.*, 2016). Já Liu *et al.* (2010) relataram que as nanopartículas de prata de 5 nm

eram mais tóxicas do que íons de prata, mas as de 20 nm e 50 nm eram menos tóxicas do que prata livre (Liu *et al.*, 2010).

Um estudo abrangente sobre a biodisponibilidade das nanopartículas de prata administradas por via oral foi realizado em ratos. A absorção da prata foi monitorada nos tecidos do fígado e dos rins, bem como na urina e nas fezes. Uma fração significativa (~ 50%) de prata foi encontrada nas fezes, enquanto na urina foi insignificante (Jiménez-Lamana *et al.*, 2014). Apesar de haver acumulação significativa nos rins, a maioria das nanopartículas de prata sistemicamente biodisponíveis é encontrada principalmente no fígado (Jiménez-Lamana *et al.*, 2014; Munger *et al.*, 2015).

Após 14 dias de administração oral de um nanoproduto de prata coloidal é possível detectar prata em soro humano. Esta prata, no entanto, não provoca alterações clinicamente significativas demonstráveis em achados metabólicos, hematológicos, urinários, físicos ou inibição ou atividade de indução de enzimas do citocromo P450 (Munger *et al.*, 2015).

Estudos de citotoxicidade das nanopartículas usando culturas de células humanas devem ser realizados em condições de cultivo bem controladas e compreendidas, a fim de melhorar a compatibilidade de diferentes estudos (Kaiser *et al.*, 2017). Tal como acontece com todos os fármacos, as potenciais interações medicamentosas são aspecto relevante no que concerne a ingestão de nanopartículas de prata (Munger *et al.*, 2015).

4 OBJETIVOS

Objetivo geral

Determinar a atividade de nanopartículas de prata frente a cepas de *Candida albicans*.

Objetivos específicos

Determinar a atividade fungistática e fungicida das nanopartículas de prata frente a cepas de *Candida albicans*.

Determinar a atividade das nanopartículas de prata em associação com o fluconazol frente a cepas de *Candida albicans*.

Identificar a atividade de nanopartículas de prata na formação do tubo germinativo das cepas de *Candida albicans*.

5 METODOLOGIA

5.1 Preparação e caracterização das nanopartículas de prata

Uma solução aquosa de 50 mL de AgNO_3 (5 mM) foi misturada com 50 mL de uma solução aquosa de PMAA – ácido polimetacrílico (0.5 mM), e posta sob agitação magnética por 5 minutos. A solução final foi colocada sob iluminação UV por 6 horas, onde foi possível observar a mudança de coloração do amarelo claro ao castanho. A solução foi armazenada em vidros âmbar para posterior caracterização (espectroscopia de absorção de luz UV e microscopia eletrônica de transmissão) (Sap-lam, 2010). As nanopartículas de prata foram produzidas no Laboratório de Fotônica e Biofotônica e no Laboratório de Óptica Não Linear do Departamento de Física da Universidade Federal de Pernambuco.

5.2 Cepas e meios de cultura

Foram utilizadas cepas de *C. albicans* (n=9) e uma cepa de referência ATCC 10231. As cepas são mantidas na coleção do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos (LFBM), do Departamento de Antibióticos, do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco e foram obtidas de isolados de amostras clínicas de vários sítios corpóreos (cavidade oral, urina e mucosa vaginal).

Com o objetivo de confirmar se as cepas eram da espécie *C. albicans* todas foram semeadas em Chromagar, Ágar Candida Cromogênico® (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil) e incubadas a $35 (\pm 2) ^\circ\text{C}$ por 48 horas em estufa bacteriológica. Todas as cepas também foram submetidas a uma identificação rápida utilizando o kit teste FUNGIFAST® (ELITech MICROBIO, Signes, França).

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

O perfil de susceptibilidade das cepas de *Candida albicans* foi avaliado frente a nanopartículas de prata e aos fármacos: nistatina (Roval, Recife,

Pernambuco, Brasil), anfotericina B (Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil) e fluconazol (Isofarma, Eusébio, Ceará, Brasil). Foi utilizada, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), metodologia padrão de técnica de microdiluição preconizada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI, 2008 (CLSI, 2008; CLSI, 2012).

O inóculo foi preparado a partir de coleta de uma colônia bem crescida (aproximadamente 2 mm de diâmetro) em placa de Agar Sabouraud Dextrose. A colônia foi semeada em caldo de RPMI 1640 - Roswell Park Memorial Institute Medium (Sigma-Aldrich) tamponado com 0,165 M de MOPS (morpholinopropanesulfonic acid). Após 24 h de incubação a 35 ($\pm$ 2) °C, esta cultura foi calibrada entre 0,5 a 2,5 x 10³ UFC/mL através de diluição de 1:100 e confirmado pela contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Esse experimento foi realizado em triplicata.

A avaliação da CIM foi executada em placas de 96 poços com diluição seriada das drogas. Em cada poço foram colocados 100 µL do fármaco diluído em RPMI1640 e 100 µL do inóculo calibrado em 2,5 x 10³ UFC/mL. Para cada coluna, de 01 a 10, foram distribuídas as diferentes cepas de *C. albicans*. A coluna 11, foi destinada ao controle de esterilidade do meio, sendo cada poço preenchido apenas com 100 µL do fármaco.

Em cada linha, foi colocada uma diluição do fármaco, variando nas linhas de A até H nas seguintes concentrações: nanopartículas de prata e anfotericina B de 128 µg/mL a 1 µg/mL, fluconazol 1024 µg/mL a 8 µg/mL, nistatina 256 µg/mL a 2 µg/mL. (Figura 1) Essas concentrações dos fármacos foram utilizadas a fim de abranger os *breakpoints* estabelecidos pelo CLSI.

As placas foram incubadas a 35 ($\pm$ 2) °C durante 48 h. Todos os testes foram realizados em triplicata. A menor concentração capaz de inibir o crescimento visível dos micro-organismos foi determinada como CIM.

Os valores de *breakpoints* estabelecidos pelo CLSI, foram utilizados para classificar as cepas de acordo com seu perfil de susceptibilidade frente às drogas, conforme pode ser observado na Tabela 1 (CLSI, 2008).

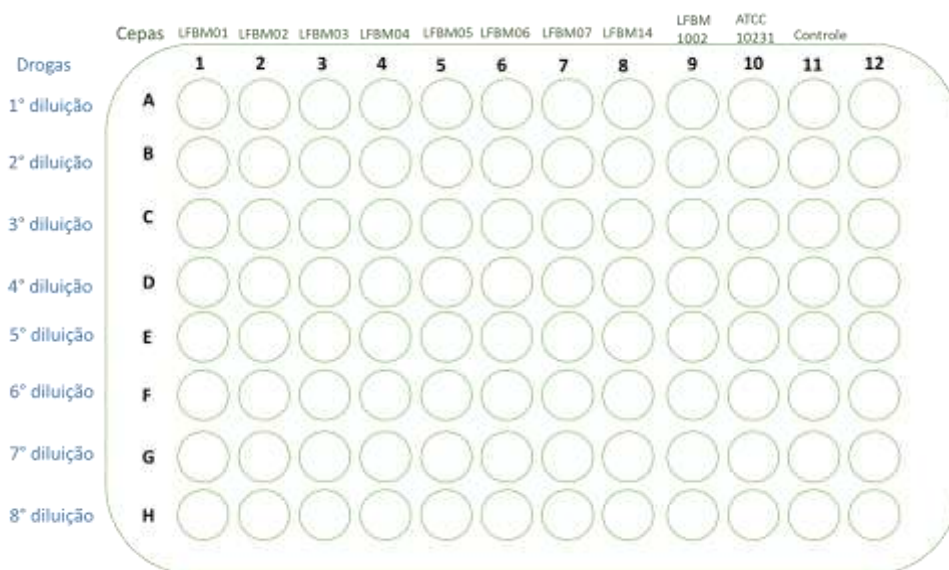


Figura 1. Protocolo técnico para determinação da Concentração Inibitória Mínima das drogas frente a cepas de *Candida albicans*.

Tabela 1. Critérios de leitura para os valores de Concentração Inibitória Mínima para os antifúngicos fluconazol, nistatina e anfotericina B frente a cepas de *Candida albicans*.

PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE			
Droga	Fluconazol	Nistatina	Anfotericina B
Sensível	$\leq 8 \mu\text{g/mL}$	$\leq 4 \mu\text{g/mL}$	$\leq 1 \mu\text{g/mL}$
Sensibilidade dose-dependente	$16 - 32 \mu\text{g/mL}$	$4 - 32 \mu\text{g/mL}$	-
Resistente	$\geq 64 \mu\text{g/mL}$	$\geq 32 \mu\text{g/mL}$	$> 1 \mu\text{g/mL}$

Para a determinação da concentração fungicida mínima (CFM), de todos os poços onde não houve crescimento fúngico visível foram retiradas alíquotas de 10 μL (em média 4 alíquotas) e foram depositadas na superfície do Agar Sabouraud 2%. As placas foram incubadas por 48 h a $35 (\pm 2) ^\circ\text{C}$. A CFM é definida como a menor concentração onde houve destruição de 99,9% das células viáveis.

5.4 Determinação da interação entre fluconazol e nanopartículas de prata

A partir dos resultados obtidos nos experimentos anteriores, a determinação da interação entre fluconazol e nanopartículas de prata foi realizada pelo método *checkerboard* (tabuleiro de xadrez) em placas de 96 poços (Odds, 2003).

Dissoluções seriadas em meio de cultura RPMI 1640 das duas drogas (nanopartículas de prata e fluconazol) foram realizadas previamente. Cada poço da microplaca de 96 poços recebeu combinações diferentes dos fármacos, com 50 μ L de cada droga e 100 μ L do inóculo. As drogas foram distribuídas da seguinte forma: nas linhas de A-H nanopartículas de prata nas concentrações de 0,01525 μ g/mL a 2 μ g/mL; e nas colunas de 1 a 12, fluconazol nas concentrações de 512 μ g/mL a 0,25 μ g/mL. (Figura. 2) As placas foram incubadas a 35 ($\pm$ 2) °C durante 48 horas. O resultado foi verificado pela inibição de crescimento.

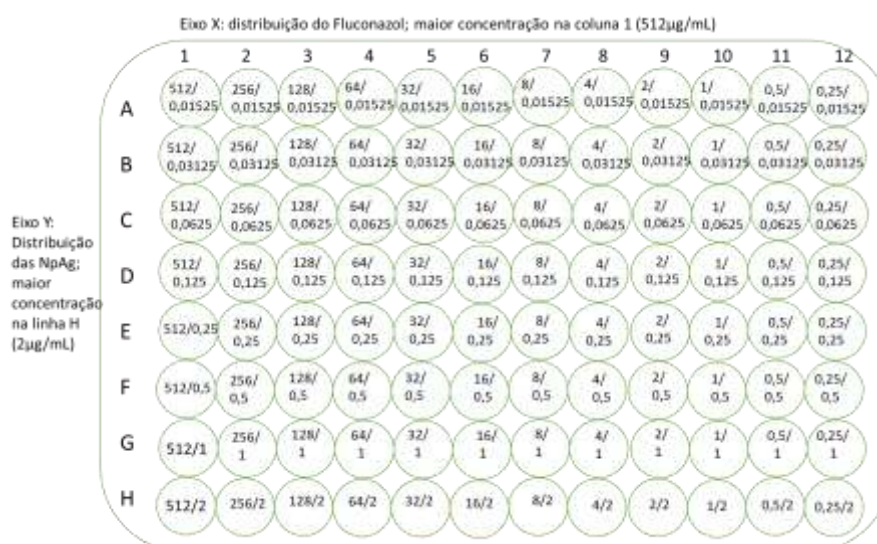


Figura. 2. Protocolo técnico para técnica do tabuleiro de xadrez. Eixo X: distribuição do fluconazol; concentração de 512 μ g/mL a 0,25 μ g/mL. Eixo Y: Distribuição das nanopartículas de prata; concentração de 0,01525 μ g/mL a 2 μ g/mL

Para análise da interação das nanopartículas de prata com o fluconazol foi calculado o índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) de acordo com a equação: índice CIF = CIF Fluconazol + CIF NpAg. Onde CIF Fluconazol corresponde a CIM do fluconazol em combinação / CIM do fluconazol sozinho. Bem como, CIF NpAg = CIM das NpAg em combinação / CIM das NpAg sozinha. O sinergismo foi definido como um índice CIF $\leq$ 0,5, o efeito aditivo como índice CIF entre 0,5 e 2,0 e

o antagonismo como índice CIF $\geq 2,0$.^(Odds, 2003) Todos os testes foram realizados em triplicata.

$$\text{Índice CIF} = \text{CIF fluconazol} + \text{CIF NpAg}$$

$$\text{CIF fluconazol} = \text{CIM fluconazol sozinho} / \text{CIM fluconazol em associação}$$

$$\text{CIF NpAg} = \text{CIM NpAg sozinha} / \text{CIM NpAg em associação}$$

5.5 Avaliação da inibição do tubo germinativo

Foi coletada alíquota de 1 mL do inóculo exposto a CIM, ½ CIM e ¼ CIM das nanopartículas de prata e CIM do fluconazol, bem como suas combinações mais sinérgicas obtidas nos testes de *checkerboard*. A cultura pura diluída em soro fetal bovino foi utilizada como controle. Em tubo esterilizado foi dispensado 1 mL de soro fetal bovino e 1 mL de cultura expostas às drogas. Todos foram incubados a 37 °C. Após 3 horas, uma gota da suspensão soro-levedura foi depositada sobre lâmina de microscopia e coberta com lamínula para leitura em microscopia óptica em aumento de 200 e 500 vezes para comprovar a presença da formação de tubos germinativos, um dos principais fatores de patogenicidade da *Candida albicans*.

5.6 Análise estatística

Os resultados para a CIM, CFM e teste de sinergismo foram expressos como média de três leituras experimentais.

6 RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta dissertação estão descritos na forma de artigo anexo e parte da dissertação. Os resultados foram animadores, pois observou-se atividade antifúngica das NpAg isoladamente e em associação com o fluconazol em baixas concentrações. Existe a perspectiva futura de desenvolvimento de fármaco à base de nanopartículas de prata. Foi realizado Pedido nacional de Invenção, Número do Processo: BR 10 2017 026474 2. Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT em anexo.

7 CONCLUSÃO

Candida albicans possui notável plasticidade e se destaca por sua capacidade em desenvolver mecanismos de resistência frente a drogas antifúngicas. Apesar de ser um colonizador comensal de vários sítios corpóreos, quando assume potencial patogênico pode configurar infecções invasivas e de desafio na prática clínica. A busca por novas drogas ou associações capazes de driblar esse micro-organismo são necessárias.

A prata possui atividade antimicrobiana reconhecida. Neste estudo, as nanopartículas de prata apresentaram boa estabilidade e potencial antifúngico tanto isoladamente, como em associação com o fluconazol. Quando utilizada em associação foi capaz de tornar susceptíveis ao fluconazol cepas resistentes a esse fármaco. Os resultados apontam a associação de nanopartículas de prata com fluconazol como uma alternativa interessante para o desenvolvimento de novos medicamentos com base neste tipo de nanocompósito para o tratamento de infecções por *Candida*. São necessários mais estudos para estabelecer o mecanismo exato de atividade das nanopartículas de prata frente a células fúngicas, bem como a empregabilidade dessas nanopartículas na área da saúde, especialmente em relação à sua biodisponibilidade e toxicidade.

REFERÊNCIAS

- AGUAYO, S. et al. Early Adhesion of *Candida albicans* onto Dental Acrylic Surfaces. **J Dent Res**, v. 96, n. 8, p. 917-923, jul. 2017. ISSN 1544-0591.
- AHMAD, A. et al. Amphotericin B-conjugated biogenic silver nanoparticles as an innovative strategy for fungal infections. **Microb Pathog**, v. 99, p. 271-281, out. 2016. ISSN 1096-1208.
- ALEXANDER, J. W. History of the medical use of silver. **Surg Infect (Larchmt)**, v. 10, n. 3, p. 289-92, jun. 2009. ISSN 1096-2964.
- ALVAREZ-RUEDA, N. et al. The amino acid substitution N136Y in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase is involved in fluconazole resistance. **Med Mycol**, v. 54, n. 7, p. 764-775, out. 2016. ISSN 1460-2709.
- AUSTIN, N. et al. Prophylactic oral/topical non-absorbed antifungal agents to prevent invasive fungal infection in very low birth weight infants. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 10, p. CD003478, out. 2015. ISSN 1469-493X.
- AZIZ, S. G.; AKBARZADEH, A. Advances in Silver Nanotechnology: An Update on Biomedical Applications and Future Perspectives. **Drug Res (Stuttg)**, v. 67, n. 4, p. 198-203, abr. 2017. ISSN 2194-9387.
- BAO, H. et al. New toxicity mechanism of silver nanoparticles: promoting apoptosis and inhibiting proliferation. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0122535, 2015. ISSN 1932-6203.
- BASSETTI, M. et al. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in Italy and Spain. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 12, p. 4167-72, dez. 2013. ISSN 1098-660X.
- BASSETTI, M.; PEGHIN, M.; TIMSIT, J. F. The current treatment landscape: candidiasis. **J Antimicrob Chemother**, v. 71, n. suppl 2, p. ii13-ii22, nov. 2016. ISSN 1460-2091.
- BASSETTI, M. et al. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and outcome of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in Italy. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24198, 2011. ISSN 1932-6203.
- BECARO, A. A. et al. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticle/carboxymethyl cellulose on *Allium cepa*. **Environ Monit Assess**, v. 189, n. 7, p. 352, jul. 2017. ISSN 1573-2959.
- BESINIS, A. et al. Antibacterial activity and biofilm inhibition by surface modified titanium alloy medical implants following application of silver, titanium dioxide and hydroxyapatite nanocoatings. **Nanotoxicology**, v. 11, n. 3, p. 327-338, abr. 2017. ISSN 1743-5404.

BIANCHI, C. M. et al. FACTORS RELATED TO ORAL CANDIDIASIS IN ELDERLY USERS AND NON-USERS OF REMOVABLE DENTAL PROSTHESES. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 58, p. 17, 2016. ISSN 1678-9946.

BILLINGS, M. et al. Elucidating the role of hyposalivation and autoimmunity in oral candidiasis. **Oral Dis**, v. 23, n. 3, p. 387-394, abr. 2017. ISSN 1601-0825..

BRADY, J. M.; DEL RIO, C. E. Corrosion of endodontic silver cones in humans: a scanning electron microscope and X-ray microprobe study. **J Endod**, v. 1, n. 6, p. 205-10, jun. 1975. ISSN 0099-2399 (Print)0099-2399.

BUJDÁKOVÁ, H. Management of Candida biofilms: state of knowledge and new options for prevention and eradication. **Future Microbiol**, v. 11, n. 2, p. 235-51, 2016. ISSN 1746-0921.

CALANDRA, T. et al. Diagnosis and management of invasive candidiasis in the ICU: an updated approach to an old enemy. **Crit Care**, v. 20, n. 1, p. 125, mai. 2016. ISSN 1466-609X.

CAMPAGNOLO, L. et al. Silver nanoparticles inhaled during pregnancy reach and affect the placenta and the foetus. **Nanotoxicology**, v. 11, n. 5, p. 687-698, jun. 2017. ISSN 1743-5404.

CHEVALLET, M. et al. Impact of labile metal nanoparticles on cellular homeostasis. Current developments in imaging, synthesis and applications. **Biochim Biophys Acta**, v. 1861, n. 6, p. 1566-1577, 06 2017. ISSN 0006-3002.

CLEARY, I. A. et al. Examination of the pathogenic potential of Candida albicans filamentous cells in an animal model of haematogenously disseminated candidiasis. **FEMS Yeast Res**, v. 16, n. 2, p. fow011, mar. 2016. ISSN 1567-1364.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. 3 ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

_____. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth informational supplement**. 3 ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

COLOMBO, A. L. et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **Braz J Infect Dis**, v. 17, n. 3, p. 283-312, 2013 mai-jun. 2013. ISSN 1678-4391.

DA SILVA DANTAS, A. et al. Cell biology of Candida albicans-host interactions. **Curr Opin Microbiol**, v. 34, p. 111-118, dez. 2016. ISSN 1879-0364.

DAR, M. A.; INGLE, A.; RAI, M. Enhanced antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cryptonectria* sp. evaluated singly and in combination with antibiotics. **Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 105-10, jan. 2013. ISSN 1549-9642.

DAS, B. et al. Surface modification minimizes the toxicity of silver nanoparticles: an in vitro and in vivo study. **J Biol Inorg Chem**, v. 22, n. 6, p. 893-918, ago. 2017. ISSN 1432-1327.

DE MELE, M. F.; SALVAREZZA, R. C.; VIDELA, H. A. Electrochemical study of endodontic silver cones used in root canal therapy. **Biomaterials**, v. 7, n. 4, p. 297-300, jul. 1986. ISSN 0142-9612 (Print)0142-9612.

DE ROSA, F. G. et al. The Effect on mortality of fluconazole or echinocandins treatment in candidemia in internal medicine wards [corrected]. **PLoS One**, v. 10, n. 5, p. e0125149, 2015. ISSN 1932-6203.

DOMERADZKA-GAJDA, K. et al. A study on the in vitro percutaneous absorption of silver nanoparticles in combination with aluminum chloride, methyl paraben or di-n-butyl phthalate. **Toxicol Lett**, v. 272, p. 38-48, abr. 2017. ISSN 1879-3169.

DONOVAN, A. R. et al. Single particle ICP-MS characterization of titanium dioxide, silver, and gold nanoparticles during drinking water treatment. **Chemosphere**, v. 144, p. 148-53, fev. 2016. ISSN 1879-1298.

DOS SANTOS, C. A. et al. Silver nanoparticles: therapeutical uses, toxicity, and safety issues. **J Pharm Sci**, v. 103, n. 7, p. 1931-44, jul. 2014. ISSN 0022-3549.

DOUGLAS, L. M.; KONOPKA, J. B. Plasma membrane organization promotes virulence of the human fungal pathogen *Candida albicans*. **J Microbiol**, v. 54, n. 3, p. 178-91, mar. 2016. ISSN 1976-3794.

DU, J.; SINGH, H.; YI, T. H. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Novosphingobium* sp. THG-C3 and their antimicrobial potential. **Artif Cells Nanomed Biotechnol**, v. 45, n. 2, p. 211-217, mar. 2017. ISSN 2169-141X.

DURÁN, N. et al. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, n. 6, p. 949-959, 00/2010 2010. ISSN 0103-5053.

EDWARDS-JONES, V. The benefits of silver in hygiene, personal care and healthcare. **Lett Appl Microbiol**, v. 49, n. 2, p. 147-52, ago. 2009. ISSN 0266-8254.

ERWIG, L. P.; GOW, N. A. Interactions of fungal pathogens with phagocytes. **Nat Rev Microbiol**, v. 14, n. 3, p. 163-76, mar. 2016. ISSN 1740-1534.

FATEMEH, K.; MOHAMMAD JAVAD, M.; SAMANEH, K. The effect of silver nanoparticles on composite shear bond strength to dentin with different adhesion protocols. **J Appl Oral Sci**, v. 25, n. 4, p. 367-373, jul-ago. 2017. ISSN 1678-7765.

FEWTRELL, L.; MAJURU, B.; HUNTER, P. R. A re-assessment of the safety of silver in household water treatment: rapid systematic review of mammalian in vivo genotoxicity studies. **Environ Health**, v. 16, n. 1, p. 66, jun. 2017. ISSN 1476-069X.

GALANDÁKOVÁ, A. et al. Effects of silver nanoparticles on human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. **Hum Exp Toxicol**, v. 35, n. 9, p. 946-57, set. 2016. ISSN 1477-0903.

GLEIZNYS, A.; ZDANAČIENĖ, E.; ŽILINSKAS, J. Candida albicans importance to denture wearers. A literature review. **Stomatologija**, v. 17, n. 2, p. 54-66, 2015. ISSN 1822-301X.

GOMES, C. C. et al. Investigations of the prevalence and virulence of Candida albicans in periodontal and endodontic lesions in diabetic and normoglycemic patients. **J Appl Oral Sci**, v. 25, n. 3, p. 274-281, mai-jun. 2017. ISSN 1678-7765.

GU, W. et al. The Synergistic Effect of Azoles and Fluoxetine against Resistant Candida albicans Strains Is Attributed to Attenuating Fungal Virulence. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 60, n. 10, p. 6179-88, out. 2016. ISSN 1098-6596.

GULATI, M.; NOBILE, C. J. Candida albicans biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes Infect**, v. 18, n. 5, p. 310-21, mai. 2016. ISSN 1769-714X.

HAMED, S. et al. Silver nanoparticles: Antimicrobial activity, cytotoxicity, and synergism with N-acetyl cysteine. **J Basic Microbiol**, v. 57, n. 8, p. 659-668, ago. 2017. ISSN 1521-4028.

HAMPE, I. A. I. et al. An acquired mechanism of antifungal drug resistance simultaneously enables Candida albicans to escape from intrinsic host defenses. **PLoS Pathog**, v. 13, n. 9, p. e1006655, set. 2017. ISSN 1553-7374.

HARGROVE, T. Y. et al. Structural analyses of Candida albicans sterol 14 α -demethylase complexed with azole drugs address the molecular basis of azole-mediated inhibition of fungal sterol biosynthesis. **J Biol Chem**, v. 292, n. 16, p. 6728-6743, abr 2017. ISSN 1083-351X.

HEBECKER, B. et al. Pathogenicity mechanisms and host response during oral Candida albicans infections. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 12, n. 7, p. 867-79, jul. 2014. ISSN 1744-8336.

HENGLEIN, A. Small-particle research: physicochemical properties of extremely small colloidal metal and semiconductor particles. **Chemical Reviews**, v. 89, n. 8, p. 1861-1873, 1989. ISSN 0009-2665.

HIRO, M. E. et al. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings on in vitro and in vivo processes of wound healing. **Eplasty**, v. 12, p. e48, 2012. ISSN 1937-5719.

HOFER, U. Fungal Pathogenesis: Candida's toxic relationship with its host. **Nat Rev Microbiol**, v. 14, n. 5, p. 268, abr. 2016. ISSN 1740-1534.

HÖFS, S.; MOGAVERO, S.; HUBE, B. Interaction of Candida albicans with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. **J Microbiol**, v. 54, n. 3, p. 149-69, mar. 2016. ISSN 1976-3794.

JABRA-RIZK, M. A. et al. Candida albicans Pathogenesis: Fitting within the Host-Microbe Damage Response Framework. **Infect Immun**, v. 84, n. 10, p. 2724-39, out. 2016. ISSN 1098-5522.

JANUS, M. M.; WILLEMS, H. M.; KROM, B. P. Candida albicans in Multispecies Oral Communities; A Keystone Commensal? **Adv Exp Med Biol**, v. 931, p. 13-20, 2016 2016. ISSN 0065-2598.

JIA, W. et al. The calcineurin inhibitor cyclosporine a synergistically enhances the susceptibility of Candida albicans biofilms to fluconazole by multiple mechanisms. **BMC Microbiol**, v. 16, n. 1, p. 113, jun. 2016. ISSN 1471-2180.

JIA, Z. et al. Bioinspired anchoring AgNPs onto micro-nanoporous TiO₂ orthopedic coatings: Trap-killing of bacteria, surface-regulated osteoblast functions and host responses. **Biomaterials**, v. 75, p. 203-222, jan. 2016. ISSN 1878-5905.

JIMÉNEZ-LAMANA, J. et al. An insight into silver nanoparticles bioavailability in rats. **Metallomics**, v. 6, n. 12, p. 2242-9, dez. 2014. ISSN 1756-591X.

JIRAVOVA, J. et al. The effect of silver nanoparticles and silver ions on mammalian and plant cells in vitro. **Food Chem Toxicol**, v. 96, p. 50-61, out. 2016. ISSN 1873-6351.

JOHANSEN, H. K.; GØTZSCHE, P. C. Amphotericin B versus fluconazole for controlling fungal infections in neutropenic cancer patients. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 9, p. CD000239, set. 2014. ISSN 1469-493X.

KABIR, M. A.; AHMAD, Z. Candida infections and their prevention. **ISRN Prev Med**, v. 2013, p. 763628, 2013. ISSN 2090-8784.

KADOSH, D. Control of Candida albicans morphology and pathogenicity by post-transcriptional mechanisms. **Cell Mol Life Sci**, v. 73, n. 22, p. 4265-4278, nov. 2016. ISSN 1420-9071.

KAISER, J. P. et al. Cytotoxic effects of nanosilver are highly dependent on the chloride concentration and the presence of organic compounds in the cell culture media. **J Nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, p. 5, jan. 2017. ISSN 1477-3155.

KASHEM, S. W.; KAPLAN, D. H. Skin Immunity to Candida albicans. **Trends Immunol**, v. 37, n. 7, p. 440-50, jul. 2016. ISSN 1471-4981.

KHAN, S. T.; MUSARRAT, J.; AL-KHEDHAIRY, A. A. Countering drug resistance, infectious diseases, and sepsis using metal and metal oxides nanoparticles: Current status. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 146, p. 70-83, mai. 2016. ISSN 0927-7765.

KIM, J. Y. Human fungal pathogens: Why should we learn? **J Microbiol**, v. 54, n. 3, p. 145-8, mar. 2016. ISSN 1976-3794.

KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, M. C. Invasive Candidiasis. **N Engl J Med**, v. 373, n. 15, p. 1445-56, out. 2015. ISSN 1533-4406.

KÖROĞLU, A. et al. Silver nanoparticle incorporation effect on mechanical and thermal properties of denture base acrylic resins. **J Appl Oral Sci**, v. 24, n. 6, p. 590-596, 2016 nov-dez. 2016. ISSN 1678-7765.

LI, D. et al. Evaluation of candidemia in epidemiology and risk factors among cancer patients in a cancer center of China: an 8-year case-control study. **BMC Infect Dis**, v. 17, n. 1, p. 536, ago. 2017.

LI, Z. et al. Effect of a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles on *Candida albicans* adhesion and biofilm formation. **Gerodontology**, v. 33, n. 2, p. 209-16, jun. 2016. ISSN 1741-2358.

LINK, S.; WANG, Z. L.; EL-SAYED, M. A. Alloy formation of gold-silver nanoparticles and the dependence of the plasmon absorption on their composition. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 103, n. 18, p. 3529-3533, 1999. ISSN 1520-6106.

LIU, W. et al. Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. **Nanotoxicology**, v. 4, n. 3, p. 319-30, set. 2010. ISSN 1743-5404.

LV, Q. Z.; YAN, L.; JIANG, Y. Y. The synthesis, regulation, and functions of sterols in *Candida albicans*: Well-known but still lots to learn. **Virulence**, v. 7, n. 6, p. 649-59, ago. 2016. ISSN 2150-5608.

LYU, X. et al. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. **Drug Des Devel Ther**, v. 10, p. 1161-71, 2016. ISSN 1177-8881.

MAGGIO, J. D. A Scanning Electron Microscope Examination of Silver Cones Removed From Endodontically Treated Teeth. **Journal of Endodontics**, v. 30, n. 7, p. 462, 2004. ISSN 0099-2399.

MAIYO, F.; SINGH, M. Selenium nanoparticles: potential in cancer gene and drug delivery. **Nanomedicine (Lond)**, v. 12, n. 9, p. 1075-1089, mai. 2017. ISSN 1748-6963.

MANDRAS, N. et al. Liquid and vapour-phase antifungal activities of essential oils against *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida*. **BMC Complement Altern Med**, v. 16, n. 1, p. 330, ago. 2016. ISSN 1472-6882.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-28, fev. 2013. ISSN 2150-5608.

MOAZENI, M. et al. Time to overcome fluconazole resistant *Candida* isolates: Solid lipid nanoparticles as a novel antifungal drug delivery system. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 142, p. 400-7, jun. 2016. ISSN 1873-4367.

MONTEIRO, D. R. et al. Silver colloidal nanoparticles: effect on matrix composition and structure of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. **J Appl Microbiol**, v. 114, n. 4, p. 1175-83, abr. 2013. ISSN 1364-5072.

MORIO, F. et al. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 66, n. 4, p. 373-84, abr. 2010. ISSN 1879-0070.

MORONES, J. R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 10, p. 2346, 2005. ISSN 0957-4484.

MORSCHHÄUSER, J. The development of fluconazole resistance in *Candida albicans* - an example of microevolution of a fungal pathogen. **J Microbiol**, v. 54, n. 3, p. 192-201, mar. 2016. ISSN 1976-3794.

MUNGER, M. A. et al. Assessing orally bioavailable commercial silver nanoparticle product on human cytochrome P450 enzyme activity. **Nanotoxicology**, v. 9, n. 4, p. 474-81, mai. 2015. ISSN 1743-5404.

MÁTÉ, G. et al. Linalool-induced oxidative stress processes in the human pathogen *Candida albicans*. **Acta Biol Hung**, v. 68, n. 2, p. 220-231, jun. 2017. ISSN 0236-5383.

NOBLE, S. M.; GIANETTI, B. A.; WITCHLEY, J. N. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. **Nat Rev Microbiol**, v. 15, n. 2, p. 96-108, 02 2017. ISSN 1740-1534.

NOWACK, B.; KRUG, H. F.; HEIGHT, M. 120 years of nanosilver history: implications for policy makers. **Environ Sci Technol**, v. 45, n. 4, p. 1177-83, fev. 2011. ISSN 0013-936x.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. **J Antimicrob Chemother**, v. 52, n. 1, p. 1, jul. 2003. ISSN 0305-7453.

PANWAR, R. et al. Efficacy of ferulic acid encapsulated chitosan nanoparticles against *Candida albicans* biofilm. **Microb Pathog**, v. 95, p. 21-31, jun. 2016. ISSN 1096-1208.

PAPPAS, P. G. et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v. 62, n. 4, p. e1-50, fev. 2016. ISSN 1537-6591.

PEREZ-DIAZ, M. A. et al. Silver nanoparticles with antimicrobial activities against *Streptococcus mutans* and their cytotoxic effect. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, v. 55, p. 360-6, out. 2015. ISSN 0928-4931.

PERON, I. H. et al. Resistance Surveillance in *Candida albicans*: A Five-Year Antifungal Susceptibility Evaluation in a Brazilian University Hospital. **PLoS One**, v. 11, n. 7, p. e0158126, 2016. ISSN 1932-6203.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive mycoses in North America. **Crit Rev Microbiol**, v. 36, n. 1, p. 1-53, 2010. ISSN 1549-7828.

POIKONEN, E. et al. Secular trend in candidemia and the use of fluconazole in Finland, 2004-2007. **BMC Infect Dis**, v. 10, p. 312, out. 2010. ISSN 1471-2334.

POKROWIECKI, R. et al. In vitro studies of nanosilver-doped titanium implants for oral and maxillofacial surgery. **Int J Nanomedicine**, v. 12, p. 4285-4297, 2017. ISSN 1178-2013.

POLÍVKOVÁ, M. et al. Antimicrobial Treatment of Polymeric Medical Devices by Silver Nanomaterials and Related Technology. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 2, fev. 2017. ISSN 1422-0067.

PRABHA, R. D. et al. Antibacterial nanosilver coated orthodontic bands with potential implications in dentistry. **Indian J Med Res**, v. 144, n. 4, p. 580-586, out. 2016. ISSN 0971-5916.

PRIETO, D. et al. Adaptation of *Candida albicans* to commensalism in the gut. **Future Microbiol**, v. 11, n. 4, p. 567-83, 2016. ISSN 1746-0921.

QIN, Y. et al. Innate immune cell response upon *Candida albicans* infection. **Virulence**, v. 7, n. 5, p. 512-26, jul. 2016. ISSN 2150-5608.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnol Adv**, v. 27, n. 1, p. 76-83, jan-fev. 2009. ISSN 0734-9750.

RAMAGE, G. et al. Fungal biofilm resistance. **Int J Microbiol**, v. 2012, p. 528521, 2012. ISSN 1687-9198.

RAST, T. J. et al. Human Epithelial Cells Discriminate between Commensal and Pathogenic Interactions with *Candida albicans*. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0153165, 2016. ISSN 1932-6203.

RENAU ESCRIG, A. I. et al. Candidemia in major burns patients. **Mycoses**, v. 59, n. 6, p. 391-8, jun. 2016. ISSN 1439-0507.

RODRIGUEZ, L. et al. A multi-centric Study of Candida bloodstream infection in Lima-Callao, Peru: Species distribution, antifungal resistance and clinical outcomes. **PLoS One**, v. 12, n. 4, p. e0175172, 2017. ISSN 1932-6203.

RUDRAMURTHY, G. R. et al. Nanoparticles: Alternatives Against Drug-Resistant Pathogenic Microbes. **Molecules**, v. 21, n. 7, 2016. ISSN 1420-3049.

SALVATORI, O. et al. Innate Immunity and Saliva in Candida albicans-mediated Oral Diseases. **J Dent Res**, v. 95, n. 4, p. 365-71, abr. 2016. ISSN 1544-0591.

SALVIONI, L. et al. Negatively charged silver nanoparticles with potent antibacterial activity and reduced toxicity for pharmaceutical preparations. **Int J Nanomedicine**, v. 12, p. 2517-2530, 2017. ISSN 1178-2013.

SAP-IAM, N., C. HOMKLINCHAN, R. LARPUDOMLERT, W. WARISNOICHAROEN, A. SEREEMASPUN AND S.T. DUBAS. UV Irradiation-induced Silver Nanoparticles as Mosquito Larvicides. **J. Applied Sci**, v. 10, n. 23, p. 3132-3136, 2010.

SAVERY, L. C. et al. Deriving a provisional tolerable intake for intravenous exposure to silver nanoparticles released from medical devices. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 85, p. 108-118, abr. 2017. ISSN 1096-0295.

SHAO, J. et al. Synergistic in vitro activity of sodium houttuynonate with fluconazole against clinical Candida albicans strains under planktonic growing conditions. **Pharm Biol**, v. 55, n. 1, p. 355-359, dez. 2017. ISSN 1744-5116.

SHINOZAKI, S. et al. Close association between oral Candida species and oral mucosal disorders in patients with xerostomia. **Oral Dis**, v. 18, n. 7, p. 667-72, out. 2012. ISSN 1601-0825.

SILVER, S.; PHUNG LE, T.; SILVER, G. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 33, n. 7, p. 627-34, jul. 2006. ISSN 1367-5435 (Print)1367-5435.

SODAGAR, A. et al. Evaluation of the antibacterial activity of a conventional orthodontic composite containing silver/hydroxyapatite nanoparticles. **Prog Orthod**, v. 17, n. 1, p. 40, dez. 2016. ISSN 2196-1042.

SOLL, D. R.; DANIELS, K. J. Plasticity of Candida albicans Biofilms. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 80, n. 3, p. 565-95, set. 2016. ISSN 1098-5557.

SUN, L. et al. Synergy Between Polyvinylpyrrolidone-Coated Silver Nanoparticles and Azole Antifungal Against Drug-Resistant Candida albicans. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 16, n. 3, p. 2325-35, mar. 2016. ISSN 1533-4880.

TANG, S. X. et al. Epithelial discrimination of commensal and pathogenic Candida albicans. **Oral Dis**, v. 22 Suppl 1, p. 114-9, abr. 2016. ISSN 1601-0825.

TEDESCHI, S. et al. Epidemiology and outcome of candidemia in internal medicine wards: A regional study in Italy. **Eur J Intern Med**, v. 34, p. 39-44, out. 2016. ISSN 1879-0828.

TINOCO-ARAUJO, J. E. et al. Invasive candidiasis and oral manifestations in premature newborns. **Einstein (Sao Paulo)**, v. 11, n. 1, p. 71-5, jan-mar. 2013. ISSN 2317-6385.

TIWARI, R. et al. Oral subchronic exposure to silver nanoparticles causes renal damage through apoptotic impairment and necrotic cell death. **Nanotoxicology**, v. 11, n. 5, p. 671-686, jun. 2017. ISSN 1743-5404.

TORRES-MÉNDEZ, F. et al. Effects of silver nanoparticles on the bonding of three adhesive systems to fluorotic enamel. **Dent Mater J**, v. 36, n. 3, p. 266-274, mai. 2017. ISSN 1881-1361.

TSUI, C.; KONG, E. F.; JABRA-RIZK, M. A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **Pathog Dis**, v. 74, n. 4, p. ftw018, jun. 2016. ISSN 2049-632X.

ULU KILIC, A. et al. Epidemiology and cost implications of candidemia, a 6-year analysis from a developing country. **Mycoses**, v. 60, n. 3, p. 198-203, mar. 2017. ISSN 1439-0507.

VACLAV, M. Z. **Process of producing oligodynamic metal biocides**: Google Patents 1960.

VILA, T. et al. Targeting *Candida albicans* filamentation for antifungal drug development. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 150-158, fev. 2017. ISSN 2150-5608.

VIMBELA, G. V. et al. Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. **Int J Nanomedicine**, v. 12, p. 3941-3965, 2017. ISSN 1178-2013.

WANG, X. et al. Use of coated silver nanoparticles to understand the relationship of particle dissolution and bioavailability to cell and lung toxicological potential. **Small**, v. 10, n. 2, p. 385-98, jan. 2014. ISSN 1613-6829.

WATKINS, R. R. et al. Admission to the Intensive Care Unit is Associated With Changes in the Oral Mycobiome. **J Intensive Care Med**, v. 32, n. 4, p. 278-282, mai. 2017. ISSN 1525-1489.

WEN, H. et al. Acute toxicity and genotoxicity of silver nanoparticle in rats. **PLoS One**, v. 12, n. 9, p. e0185554, 2017. ISSN 1932-6203.

WIRNSBERGER, G. et al. Inhibition of CBLB protects from lethal *Candida albicans* sepsis. **Nat Med**, v. 22, n. 8, p. 915-23, ago. 2016. ISSN 1546-170X.

WORLD HEALTH, O. Guidelines on the treatment of skin and oral HIV-associated conditions in children and adults. 2014. ISSN 9241548916.

YANO, J. et al. Transcription Factors Efg1 and Bcr1 Regulate Biofilm Formation and Virulence during *Candida albicans*-Associated Denture Stomatitis. **PLoS One**, v. 11, n. 7, p. e0159692, 2016. ISSN 1932-6203.

ZHOU, L. et al. Preparation, characterization, and evaluation of amphotericin B-loaded MPEG-PCL-g-PEI micelles for local treatment of oral *Candida albicans*. **Int J Nanomedicine**, v. 12, p. 4269-4283, 2017. ISSN 1178-2013.

APÊNDICE A – Artigo

REVERSAL OF FLUCONAZOLE RESISTANCE INDUCED BY A SYNERGISTIC EFFECT WITH SILVER NANOPARTICLES IN *CANDIDA ALBICANS* STRAINS

The aim of this study was to investigate the silver nanoparticles activity as an antifungal agent alone and in combination with fluconazole. Ten strains of *C. albicans* were used. The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC) of the strains against silver nanoparticles and the drugs: nystatin, amphotericin and fluconazole were determined following the standard microdilution technique methodology recommended by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The checkerboard method was used to determine the interaction between fluconazole and silver nanoparticles. The germ tube test was performed in order to investigate the action of the drugs on germ tube formation, one of the main microorganism pathogenicity factor of *Candida albicans*. Silver nanoparticles presented fungistatic and fungicidal activity at low concentrations (MIC = 4 - 8 µg/mL; MFC 8 - 16 µg/mL). When silver nanoparticles were used in combination with fluconazole, it was possible to reverse the *C. albicans* strains resistance reducing fluconazole MIC by up to 99.8%. Even at sub-inhibitory concentrations (2 µg/mL), silver nanoparticles were able to inhibit the formation of the germ tube. The silver nanoparticles presented antifungal potential alone and in association with fluconazole.

Keywords: Silver nanoparticles, fluconazole, *Candida albicans*.

INTRODUCTION

Candida albicans is part of normal microbiota of most healthy persons, but it can also cause symptomatic infections when host defenses are compromised.^{1, 2} This yeast is responsible for a wide spectrum of clinical infections in humans, ranging from mucosal infections such as vaginitis or oropharyngeal candidiasis to potentially life-threatening systemic infections such as candidemia.^{3, 4} While infections are largely superficial and easily treated in immunocompetent individuals, there is severe morbidity associated with these infections in individuals with compromised immune responses.⁵

Candida albicans is an opportunistic⁶ and a highly adaptable species able to cause infection at many anatomical sites with equally diverse host responses.^{7, 8} This microorganism has developed efficient strategies to invade the host and evade host defense systems.⁹ With some advances in modern medicine (such as cancer chemotherapy, broad exposure to antibiotics, and immunosuppression) the incidence of opportunistic fungal such as those caused by *Candida albicans* has increased.^{10, 11} However, research progress in this field has not been faster enough to effectively prevent

or treat life-threatening fungal diseases.¹² It is estimated to cause death of one and a half million people every year.^{12, 13}

The management of *Candida* infections faces many problems, such as a limited number of antifungal drugs, toxicity, resistance of *Candida* to commonly antifungal drugs, relapse of *Candida* infections, and the high cost of antifungal drugs.¹⁴ Infectious Disease Society of America updated in 2016 the guidelines for the clinical management of *Candida* infections. For mild oropharyngeal candidiasis the use of clotrimazole or, alternatively, nystatin is recommended. For moderate to severe infections, fluconazole is the best treatment option for systemic use. Other drugs are considered in patients not responsive or intolerant to fluconazole, such as other azoles or amphotericin B.¹⁵

Because of their safety profile and high therapeutic index, azole antifungal drugs have been used to treat *Candida* infections for many years, as first-line therapy, antifungal prophylaxis, or empirical or preemptive treatment. However, as a consequence of long-term exposure to azole drugs, resistance can arise.^{3, 16} Fluconazole is a relatively cheap antifungal alternative.¹⁷ It is the most common antifungal drug prescribed for oropharyngeal and vulvovaginitis due to *Candida*.¹⁵ Although there is no consensus regarding the use of fluconazole as first-line treatment of candidemia, it is usually the drug initially prescribed in more than 60% of the cases.^{18, 19}

Multidrug resistance is uncommon, but the increasing resistance of several *Candida* species to the azoles, echinocandins, and polyenes have been reported.²⁰ Antifungal resistance is an impediment to a successful treatment of *Candida albicans* infections.²¹ Infection caused by drug-resistant strains can lead to clinical complications and result in a higher serious disease risk. Therefore, new strategies for dealing with the infections caused by drug-resistant *C. albicans* should be further investigated.²²

With nanotechnology, the availability of silver nanoparticles has enabled the use of pure silver to accomplish a rapid growth in medical practice.²³ Silver nanoparticles has demonstrated antibacterial,²⁴ antifungal,²² larvicidal²⁵ and antiprotozoal activities.²⁶ Combinational use of engineered nanomaterials with the conventional antifungal should be a viable strategy to combat drug-resistant fungal infection.²²

The development of antifungal agents is not an easy task; therefore, use of drug combinations may be an effective and viable solution.²⁷ An effective strategy is to combine drugs with metal nanoparticles for the control of microbial infections and resistance.²³ There are several advantages and reasons to consider combination therapy: (i) the potential of increase effectiveness and extent of killing of existing drugs (synergy); (ii) broader spectrum of activity, targeting potentially resistant pathogens; (iii) to prevent the emergence of resistance; and (iv) the possibility of reducing the dosages of individual antifungal drugs decreasing its toxicity. This study focuses on the importance of combination therapy in increase potency and fungal killing.²⁸

In this study the silver nanoparticles activity was investigated as an antifungal agent isolated and in combination with fluconazole against drug-resistant *Candida albicans* strains.

MATERIALS AND METHODS

Preparation and Characterization of Silver Nanoparticles

To obtain the silver nanoparticles, 50 mL of AgNO₃ aqueous solution (5 mM) was mixed with 50 mL of polymethacrylic acid (PMAA) aqueous solution (0.5 mM), and put under magnetic stirring for 5 min. The final solution was placed under UV light for 6 hours, change in color from light yellow to brown. The solution was stored in amber glass for further characterization (UV absorption spectroscopy and transmission electron microscopy).²⁹

Candida albicans strains, media and growth conditions

The *Candida albicans* strains (n = 9) and one reference strain ATCC 10231 were used. The strains are maintained from the collection of the Laboratory of Physiology and Biochemistry of Microorganisms, Department of Antibiotics, Biological Sciences Center, Federal University of Pernambuco and they were obtained from several clinical samples.

C. albicans strains species were cultured in Chromagar (Agar Candida Chromogênico® Laborclin) and incubated at 35 (± 2) °C for 48 hours and then visually evaluated according to the color of the microorganism. All strains were also submitted to the FUNGIFAST® ELITech MICROBIO test to identify the microorganisms according to the manufacturer's instructions.

Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Fungicidal Concentration (MFC)

The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) test was performed by broth microdilution method, following the recommendations established by Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI M27-A3).³⁰

The *Candida albicans* strains susceptibility was evaluated against silver nanoparticles and the following drugs: nystatin (Roval, Recife, Pernambuco, Brazil), amphotericin B (Cristália, Itapira, São Paulo, Brazil) and fluconazole (Isofarma, Eusébio, Ceará, Brazil). These drugs were chosen because they are the main drugs to treat oral candidiasis, based on Guideline of Infectious Diseases Society of America.³¹

The inoculum was prepared and calibrated between 0.5 to 2.5×10³ cells/mL. The microdilution test was performed on 96-well plates with serial dilution of drugs. The test was carried out in RPMI 1640 - Roswell Park Memorial Institute Medium (Sigma-Aldrich) adjusted to pH 7.0 with 0.165 M morpholinepropanesulfonic acid (MOPS). Plates were incubated at 35 °C for 48h. All tests were performed in triplicate.

The lowest concentration able to inhibiting the visible growth of the microorganisms was determined as MIC. Accordingly to the values established by CLSI the strains were classified as susceptible, susceptible dose-dependent, or resistant according to values established by CLSI. The resistance breakpoints used were for fluconazole ≥ 64 =

resistant; for amphotericin B > 1 = resistant; and for nystatin between 8 and 32 = dose-dependent susceptibility.³⁰

To determine Minimal Fungicidal Concentration (MFC), all wells where there was no visible fungal growth were selected for the MFC tests. The absence of perceptible growth was considered the drug fungicidal concentration.

MIC was the lowest concentration of an antimicrobial agent that prevents visible growth in sensitivity tests by dilution in solid or liquid culture media. The minimal fungicidal concentration (MFC) is the lowest concentration of an antifungal compound that makes 99.99% of the original inoculum unviable. MFC was defined as the lowest concentration of compounds where fungal growth was not visualized.

Checkerboard assay

Combinations of silver nanoparticles and fluconazole were tested by using checkerboard method in 96-well microplates.³² In order to evaluate the effect of silver nanoparticles in combination with fluconazole the checkerboard test was performed. Each well received 100 μ L aliquots of *Candida albicans* suspensions (10^3 CFU/mL). Appropriate dilutions of silver nanoparticles and fluconazole were performed into RPMI 1640. From these dilutions, 50 μ L of each drug were added into each well, that is 100 μ L by drugs per well, to obtain a final concentration equal to the eight dilutions lower than MIC of silver nanoparticles and twelve dilutions lower than MIC of fluconazole.

Plates were incubated for 48 hours at 35 °C. The fractional inhibitory concentration index (FICI) was calculated as: (MIC of silver nanoparticles in combination with fluconazole / MIC of silver nanoparticles) + (MIC of fluconazole in combination with silver nanoparticles / MIC of fluconazole). The combination was considered to be synergistic when the FICI was ≤ 0.5 , additive when it was 0.5 to ≤ 1 , and antagonistic when ≥ 2 .³² Synergy is defined as improvement in activity by a magnitude greater than the expected sum of individual activities of individual agents; antagonism is when the antifungal activity of the combination of agents is less than that of the least active antifungal when given alone. An additive effect is seen when an improvement in efficacy is no greater than the sum activity of individual drugs.²⁸ Experiments were made in triplicate.

Germ Tube Testing

In order to investigate the potential effect of the drugs/silver nanoparticles on the germ tube formation, samples of *Candida albicans* culture was submitted to following treatment: 1) control (inoculum without drug), 2) MIC, $\frac{1}{2}$ MIC and $\frac{1}{4}$ MIC of silver nanoparticles alone, 3) MIC of fluconazole and wich combinations presented a synergistic effect. Each aliquot was added to 1 mL of fetal bovine serum and all samples were incubated at 37 °C. After 3 hours, a drop of the yeast-serum suspension was deposited on microscope slide and immediately analysed on 20- and 50-fold magnification microscopy to confirm the presence or absence of germ tube formation.

Statistical analysis

All quantitative values were presented as means - standard deviation of three experimental readings.

RESULTS

Preparation and Characterization of Silver Nanoparticles

Ultrastructural analysis showed the presence of spherical silver nanoparticles coated with polymethylacrylate (PMA), with maximum intensity in the absorption spectrum in the 420nm range and approximate diameter of 20nm were obtained, as shown in Fig. 1 and Fig. 2.

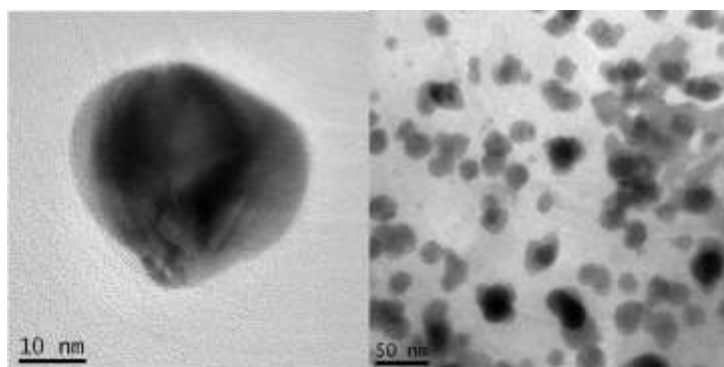


Fig 1. Transmission electron microscopy of silver nanoparticles at different amplifications.

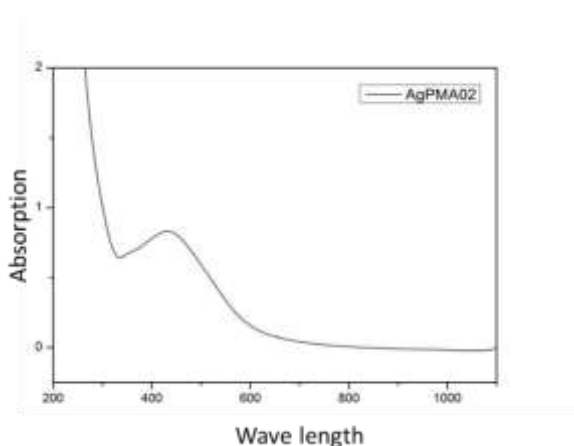


Fig. 2. Absorption spectrum from silver nanoparticles.

Candida albicans strains, media and growth conditions

According to Odds and Bernaerts (1994), at the Chromagar test, all samples presented growth with greenish colonies, characterizing *C. albicans* species.³³ (Fig. 2) All strains were confirmed as *C. albicans*, also with the FUNGIFAST® test.

Minimal inhibitory concentration (MIC) and Minimal Fungicidal Concentration (MFC)

MIC and MFC values are presented in Table 1. Silver nanoparticles inhibited the growth of *C. albicans* with MIC of 4 µg/mL and MFC of 8 µg/mL, except for the strain LFBM 07 that presented a greater resistance (MIC = 8 µg/mL e MFC = 16 µg/mL).

Except to LPBM 01, LPBM 05 and LPBM 14, all *Candida albicans* strains showed to be sensible to amphotericin B (MIC/MFC 1/2 µg/mL). The nystatin inhibited the growth of all *Candida albicans* strains tested with MIC value of 16 µg/mL. However fluconazole was not able to inhibit the growth of any strain, even in the highest concentration (MIC > 1024 µg/mL).

Table 1. Minimal inhibitory concentration and minimal fungicidal concentration of silver nanoparticles and antifungals against *Candida albicans* strains.

<i>C. albicans</i>	MIC/MFC (µg/ml)			
	AgNp	Amphotericin B	Nystatin	Fluconazole
LPBM 01	4 / 8	2 / 2	16 / 32	>1024
LPBM 02	4 / 8	1 / 2	16 / 32	>1024
LPBM 03	4 / 8	1 / 2	16 / 32	>1024
LPBM 04	4 / 8	1 / 2	16 / 32	>1024
LPBM 05	4 / 8	2 / 2	16 / 32	>1024
LPBM 06	4 / 8	1 / 2	16 / 32	>1024
LPBM 07	8 / 16	1 / 2	16 / 32	>1024
LPBM 14	4 / 8	2 / 4	16 / 32	>1024
LPBM 1002	4 / 8	1 / 2	16 / 32	>1024
ATCC 10231	4 / 8	1 / 2	16 / 32	>1024

Interaction

All tested strains presented resistance to Fluconazole. The combined values for the minimal inhibitory concentration and the fractional inhibitory concentration index of fluconazole / silver nanoparticle association against *Candida albicans* strains are shown in Table 2.

The tests confirmed the antifungal activity of silver nanoparticles association with fluconazole. Synergistic interaction was observed in 70% of the strains. In the others 30%, there were additive type interaction.

Sub-inhibitory concentrations of silver nanoparticles (equal or less than 0.5 x MIC) increased fluconazole antifungal activity. This synergistic effect was observed by percentage MIC reduced to values ranged from 50% to 75% for silver nanoparticles and ranged from 87.5% to 99.8% for fluconazole. The FIC index values ranged from 0.25 to 0.5 for silver nanoparticles and from 0.002 to 0.125 for fluconazole. The most expressive antifungal activity was observed for the associations against the strains LPBM 05, LPBM 07 and ATCC 10231 whose FIC index was 0.25, 0.28 and 0.27, respectively.

Table 2. Evaluation of the interaction between silver nanoparticles and fluconazole against *Candida albicans* strains.

<i>C. albicans</i>	MIC (µg/mL) AgNp/FCZ	Individual FIC AgNp/FCZ	FICI	Interaction	% MIC reduced
LPBM 01	2/128	0,5/0,125	0,625	Additive	50/87,5
LPBM 02	2/4	0,5/0,004	0,5	Synergistic	50/99,6
LPBM 03	2/16	0,5/0,02	0,52	Additive	50/98,4
LPBM 04	2/2	0,5/0,002	0,5	Synergistic	50/99,8
LPBM 05	1/4	0,25/0,004	0,25	Synergistic	75/99,6
LPBM 06	2/16	0,5/0,02	0,52	Additive	50/98,4
LPBM 07	2/32	0,25/0,03	0,28	Synergistic	75/96,8
LPBM 14	2/2	0,5/0,002	0,5	Synergistic	50/99,80
LPBM 1002	2/2	0,5/0,002	0,5	Synergistic	50/99,8
ATCC 10231	1/16	0,25/0,02	0,27	Synergistic	75/98,4

In Fig. 3, it is possible to observe the graphical representation of isobologram indicating the synergistic effect of silver nanoparticles in association with fluconazole in two *C. albicans* strains.

Germ tube test

All strains were able to produce germ tubes, except those exposed to MIC and $\frac{1}{2}$ MIC concentrations of silver nanoparticles, as well as those exposed to synergistic concentrations of silver nanoparticles with fluconazole (1 $\mu\text{g/mL}$ AgNp and 16 $\mu\text{g/mL}$ fluconazole).

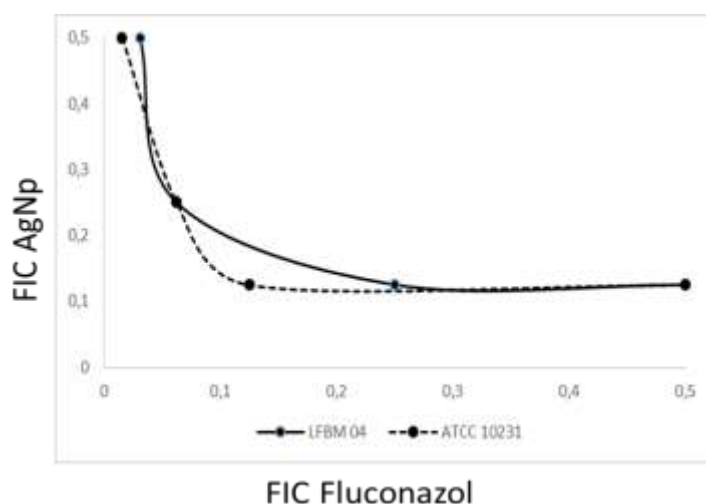


Fig. 3 Isobologram showing synergistic effect of silver nanoparticles with fluconazole on *Candida albicans* ATCC 10231 (spaced line) and LFBM 04 (solid line). Y axis: silver nanoparticles FIC; X axis: fluconazole FIC.

DISCUSSION

Despite the commensal relationship between *Candida* species and other microorganisms in the human mucosal microbiota, the opportunistic nature of this yeast allows them to provoke a variety of infections.⁵

Chromagar is a differential culture medium for isolation and presumptive identification of yeasts³⁴ and according to the manufacturer's instructions, it is suitable for differentiating the species of *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida tropicalis*. *C. albicans* strains were characterized by greenish coloration. The chromogenic medium used in routine clinical laboratories is ideal for presumptive identification of important *Candida* species because the results are fast, reliable and reproducible.³⁵ The FUNGIFAST® Kit allows the main pathogenic yeasts identification, as well as performs sensitivity tests for various antifungal agents used to treat superficial and systemic mycoses. According to the manufacturer's instructions, it allows the identification of yeasts based on detection of presence or absence of many enzymes, mainly by the production of color reaction. In addition, it is able to indicate the sensitivity and resistance profile for

the following drugs: amphotericin B, 5-flucytosine, itraconazole, fluconazole and variconazole.

The pathogenicity of this microorganism is hampered by the normal microbial population and the integrity of the tissues by the immune system.⁵ In view, the increasing number of people who fall under predisposing conditions, such as immunosuppression due to HIV infection, chemotherapy, organ transplantation, or hospitalized patients, the greatest risk for *Candida* infections is highlighted.^{2, 36, 37} The prevention, diagnosis and therapy of opportunistic and endemic mycoses remains extremely difficult,³⁷ thanks to the complex interaction between the expression of fungal pathogenicity factors (resulting in adherence, invasion and cellular damage), the host immune system³⁶ and also due to the emergence of resistance against azoles family drugs.³⁸

The *Candida albicans* infection begins with adherence to host cells or implanted medical devices, followed by formation of biofilms.³⁹ The relevance of these infections has stimulated researchers to develop new diagnostic and therapeutic approaches, as well as to expand knowledge for the areas of the epidemiology and pathogenesis of mycoses.³⁷ New strategies to combat fungal infections without toxicity to humans are a high medical priority.³⁹

Antifungal drugs, especially fluconazole, are generally effective against *Candida albicans* and it is often used in clinical practice. However, the emergence of resistant strains is a reality and challenge for the clinician.^{24, 27} Therefore, we tested the silver nanoparticles with fluconazole combination.

The interdisciplinary cooperation linking the nanomaterials chemistry with biological research may bring new possibilities to the prevention and eradication of *Candida* infections.⁴⁰ Evidence indicates that silver nanoparticles have fungicidal activity confirmed when in contact with microorganisms, due to their chemical and physical properties.²⁴ The combined use of nanomaterials, such as silver nanoparticles, with conventional antifungal may be a viable strategy to combat fungal infection by resistant microorganisms.⁴¹

In this study, the *in vitro* antifungal activity of silver nanoparticles was better than the activity of the antifungal drugs nystatin and fluconazole. Considering MIC and MFC results, silver nanoparticles presented a fungicidal potential in very low concentrations against all strains tested.

Few studies have investigated the silver nanoparticles activity as an antifungal drug and in combination against strains of *Candida albicans*.^{22, 41-45} In this study, MIC values for silver nanoparticles against *C. albicans* were at least four times lower than found by Hamed *et al.* (2017), Kelkawi *et al.* (2017), Mallmann *et al.* (2015), Sun *et al.* (2016), with MIC were 428 µg/mL⁴², 100 µg/mL,⁴³ 80 µg/mL,⁴⁴ and 16 µg/mL,²² respectively.

The minimal inhibitory concentration of silver nanoparticles depends greatly on nanoparticles size and shape.⁴⁶ The low MIC values found in this experiment are attributed to the specific characteristics of silver nanoparticles used: spherical shape, with a diameter of approximately 20 nm and a polymethacrylate coating. It is known that nanoparticle size, surface area and surface configuration are important factors influencing biokinetics and toxicity.⁴⁷ The silver nanoparticle biocidal effect is attributed to its nanometric size, which facilitates the interaction with microbial cells.⁴⁸

Georgantzopoulou *et al.* (2016) disclosed that silver nanoparticles of 20 nm diameter interfered in different proteins sets with a distinct cellular responses pattern when compared to 200 nm silver particles and AgNO₃, thus indicating that there is a different mechanism of action depending on the size of particles.⁴⁹ The first step in the interaction of the nanoparticle with the microorganism cell is to anchor itself on the surface of the cell wall, through electrostatic forces and molecular interactions. Researches have shown that both silver ions and silver nanoparticles are able of causing almost complete loss of intracellular potassium and hence dissipating the potential of the cytoplasmic membrane, destabilizing it.^{50, 51}

The antifungal activity of silver nanoparticles in combination with amphotericin B was investigated by Ahmad *et al.* (2016). Improved antifungal activity of the amphotericin B and AgNp conjugate system was identified because of synergism between the antifungal activity of amphotericin B and the silver antimicrobial properties. In this study, the MIC of silver nanoparticles associated with amphotericin was 5 µg/mL, against *C. albicans* strains,²³ it was still higher than our MIC data for silver nanoparticles without association.

Longhi *et al.* (2015), found similar values to those of this study when they evaluated the silver nanoparticles activity against three *Candida albicans* strains, one ATCC 26790 and two of clinical isolates, resistant to fluconazole: MIC of 4.35 µg/mL for nanoparticles alone. However, when there was an association with fluconazole, the maximum reduction of the AgNp MIC was 50% (2.17 µg/mL),⁵² whereas in our study reduction of up to 75% was found. They did not define the silver nanoparticles characteristics.

Singh *et al.* (2013) also tested the association of silver nanoparticles with 12nm of diameter and maximum absorption spectrum in the 460 nm range with fluconazole through the disk diffusion method. And they found results that strengthen the hypothesis of synergism between these two substances: the antifungal activity of fluconazole increased significantly in the presence of silver nanoparticles.⁵³

It is also known that stabilized silver nanoparticles with incorporation of polymers as used in our study, when applied in combination with antifungal drugs can exhibit good antifungal activity as a result of their greater stability.^{53, 54}

Studies about antimicrobial effect of silver nanoparticles have been concentrated on bacteria, with less information available on their activity in fungal cells.⁴⁸ It is believed that yeast eukaryotic cells can tolerate higher concentrations of silver nanoparticles than prokaryotic cells because of their better organization and cellular structure as well as better detoxification system through the efflux pumps.⁴² The exact mechanism of silver nanoparticles against microorganisms is complex⁴¹ and still not fully understood⁴². Some action mechanisms are suggested: adhesion to the cell wall,²² rupture of the cell membrane structure,^{46, 55, 56} impairment of the respiratory chain through reduction of dehydrogenase enzymatic activity,⁴² and cytotoxic activity of several reactive oxygen species such as superoxide (O₂⁻), hydrogen peroxide (H₂O₂) and hydroxyl (OH⁻) ions.²³ These free radicals are responsible for the induction of oxidative stress and damage to biomolecules such as proteins and DNA. Oxidative stress has been increasingly recognized as a key element in the biological response induced by nanoparticles.⁵⁷

Combined therapy may be useful for the treatment of fungal infections, especially those caused by resistant fungi.⁴¹ Ideally, the overall goal of combination antifungal therapy is to achieve increased clinical efficacy and to avoid toxicity to the patient.²⁸ The purpose of

this study was to try to reverse the resistance mechanism of the microorganism with silver nanoparticles support, making it susceptible to treatment with fluconazole. It was observed that silver nanoparticles combined with fluconazole in sub-inhibitory concentrations ($\leq 0.5 \times \text{MIC}$) were able to reverse the fluconazole resistance from all *Candida albicans* strains. This results corroborate with Hampe *et al.* (2017)²

The cells may be resistant to fluconazole in several ways: decrease the toxic effects of the drug, change the target enzyme to reduce drug-binding, increase the amount of the target enzyme or prevent intracellular drug accumulation. A frequent mechanism is the active transport of the drug out of the cell. All these mechanisms were found in clinical isolates of fluconazole-resistant *C. albicans*. Collectively, these findings indicate that the fluconazole resistance acquisition by point mutations and genomic rearrangements affects the *C. albicans* ability even in the absence of the drug.⁵⁸

The association of silver nanoparticles coated with PVP (polyvinylpyrrolidone) with fluconazole was able to decrease the expression levels of the CDR1, gene responsible for the decoding of a major drug efflux pump, and to inhibit ergosterol biosynthesis.²² That was the same mechanism hypothesized from interaction between diorcinol and fluconazole.⁵⁹ It was purposed that substance can act on the cell membrane and increase the penetration of drugs that can act on the DNA or protein synthesis.²⁸ These are possible mechanisms of activity resulting from the synergism investigated in this study.

The combination of antifungal drug with nanoparticles would reduce the amount and treatment cost and drug-related toxicity, thus providing a safer, more effective and economical alternative compared to the current antifungal treatment.²³

The morphological transition between yeasts and pseudohyphae forms^{6, 60}, adhesin expression and cell surface invasion, and biofilm formation are considered important pathogenicity factors.⁶¹ The transition from yeast to pseudohypha is a critical pathogenicity factor of *C. albicans*, studies have been made for decades to find the key factors and elucidate the mechanisms that drive these cellular morphological changes.¹² The ability of *C. albicans* to undergo morphological transition from yeast to filamentous form is reversible. Pathogenic characteristics such as the formation of germ tubes are possible targets of new drugs.⁶² The germ tube test is inexpensive, easy, and well-defined test⁶³ and it is relevant because it investigates the *Candida albicans* ability, in the presence of serum, to form pseudohypha, one of the main pathogenicity factors.

The formation of germ tubes is sufficient for invasion into healthy epithelial cells,⁶⁴ thus clarifying their crucial role in pathogenicity.⁶⁵ The pathogenic characteristics are possible targets of new drugs.⁶² In this work, the germ tube test revealed that even at sub-inhibitory concentrations, silver nanoparticles and its combination with fluconazole were able to inhibit germ tube formation.

In the cytotoxicity and genotoxicity test with silver nanoparticles of approximately 20 nm in diameter, results showed that, for the intended application as topical agent for wound healing, the most appropriate would be to use up to 25 $\mu\text{g/mL}$.⁶⁶ This recommendation corresponds to a value 6 times higher than the MIC of the nanoparticles in isolation in this study.

Lara *et al.* (2015) prepared even smaller nanoparticles of 1 nm and verified their cytotoxicity in human hepatocellular carcinoma. Silver nanoparticles were not cytotoxic to these human cells at the same concentrations that were effective against *C. albicans*

biofilm formation, thus indicating that their membrane-damaging activity may not reach the phospholipids and mammalian membranes at fungicidal concentrations. Silver nanoparticles inhibited planktonic fungal growth and were able to prevent pseudohypha growth and activity in an *in vitro* culture model. This indicates that, with a suitable formulation that helps maintain the activity of AgNp, they may be effective for the treatment or prevention of candidiasis.⁵⁵

Understanding the *Candida* species biology applying different modern and advanced technologies will definitely help us in preventing and healing diseases provoked by fungal pathogens.¹⁰

Salvioni *et al.* (2017) have developed silver nanoparticles of 20 nm in diameter, similar in size to this study, which showed strong antibacterial activity and low toxicity compared to the colloidal silver currently available. The very low toxicity to eukaryotic cells makes them a promising alternative to conventional additives used in food, cosmetic and pharmaceutical formulations. Taking advantage of the strong stability in aqueous and oily solutions, they may be included in liquid, semi-solid and solid formulations suitable for topical administration, including intact or injured skin and mucosa, orally or applied on rigid or flexible surfaces that are in contact with the human or animal body.⁶⁷

Further studies are needed to establish the exact mechanism of activity of silver nanoparticles against fungal cells, as well as the employability of these nanoparticles in the health area, especially in regarding about their bioavailability and toxicity.

CONCLUSIONS

Silver nanoparticles showed antifungal potential alone and in association with fluconazole, and may be an interesting alternative for the development of new drugs based on this type of nanocomposite for the treatment of *Candida albicans* infections. Even at sub-inhibitory concentrations, silver nanoparticles were able to inhibit the germ tube formation, thus reducing the pathogenic potential of the microorganism.

It can be concluded that pharmaceuticals formulations with silver nanoparticles can be an interesting purpose, in the future, as effective agents against fungal pathogens. However, *in vivo* testing for bioavailability, toxicity, and its pharmacokinetics are required.

REFERENCES

1. Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathog Dis*. 2016;74(4):ftw018.
2. Hampe IAI, Friedman J, Edgerton M, Morschhäuser J. An acquired mechanism of antifungal drug resistance simultaneously enables *Candida albicans* to escape from intrinsic host defenses. *PLoS Pathog*. 2017;13(9):e1006655.
3. Morio F, Loge C, Besse B, Hennequin C, Le Pape P. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010;66(4):373-84.
4. Douglas LM, Konopka JB. Plasma membrane organization promotes virulence of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *J Microbiol*. 2016;54(3):178-91.
5. Tang SX, Moyes DL, Richardson JP, Blagojevic M, Naglik JR. Epithelial discrimination of commensal and pathogenic *Candida albicans*. *Oral Dis*. 2016;22 Suppl 1:114-9.
6. Hofer U. Fungal Pathogenesis: *Candida's* toxic relationship with its host. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(5):268.
7. Jabra-Rizk MA, Kong EF, Tsui C, Nguyen MH, Clancy CJ, Fidel PL, et al. *Candida albicans* Pathogenesis: Fitting within the Host-Microbe Damage Response Framework. *Infect Immun*. 2016;84(10):2724-39.
8. Kashem SW, Kaplan DH. Skin Immunity to *Candida albicans*. *Trends Immunol*. 2016;37(7):440-50.
9. Qin Y, Zhang L, Xu Z, Zhang J, Jiang YY, Cao Y, et al. Innate immune cell response upon *Candida albicans* infection. *Virulence*. 2016;7(5):512-26.
10. Kabir MA, Ahmad Z. Candida infections and their prevention. *ISRN Prev Med*. 2013;2013:763628.
11. Hargrove TY, Friggeri L, Wawrzak Z, Qi A, Hoekstra WJ, Schotzinger RJ, et al. Structural analyses of *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase complexed with azole drugs address the molecular basis of azole-mediated inhibition of fungal sterol biosynthesis. *J Biol Chem*. 2017;292(16):6728-43.
12. Kim JY. Human fungal pathogens: Why should we learn? *J Microbiol*. 2016;54(3):145-8.
13. Wirnsberger G, Zwolanek F, Asaoka T, Kozieradzki I, Tortola L, Wimmer RA, et al. Inhibition of CBLB protects from lethal *Candida albicans* sepsis. *Nat Med*. 2016;22(8):915-23.
14. Mandras N, Nostro A, Roana J, Scalas D, Banche G, Ghisetti V, et al. Liquid and vapour-phase antifungal activities of essential oils against *Candida albicans* and non-albicans *Candida*. *BMC Complement Altern Med*. 2016;16(1):330.
15. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016;62(4):e1-50.
16. Tedeschi S, Tumietto F, Giannella M, Bartoletti M, Cristini F, Cioni G, et al. Epidemiology and outcome of candidemia in internal medicine wards: A regional study in Italy. *Eur J Intern Med*. 2016;34:39-44.
17. Ulu Kilic A, Alp E, Cevahir F, Ture Z, Yozgat N. Epidemiology and cost implications of candidemia, a 6-year analysis from a developing country. *Mycoses*. 2017;60(3):198-203.
18. Rodriguez L, Bustamante B, Huaroto L, Agurto C, Illescas R, Ramirez R, et al. A multi-centric Study of *Candida* bloodstream infection in Lima-Callao, Peru: Species distribution, antifungal resistance and clinical outcomes. *PLoS One*. 2017;12(4):e0175172.
19. De Rosa FG, Corcione S, Filippini C, Raviolo S, Fossati L, Montrucchio C, et al. The Effect on mortality of fluconazole or echinocandins treatment in candidemia in internal medicine wards [corrected]. *PLoS One*. 2015;10(5):e0125149.
20. Arendrup MC, Patterson TF. Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *J Infect Dis*. 2017;216(suppl_3):S445-S51.
21. Alvarez-Rueda N, Fleury A, Logé C, Pagniez F, Robert E, Morio F, et al. The amino acid substitution N136Y in *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase is involved in fluconazole resistance. *Med Mycol*. 2016;54(7):764-75.
22. Sun L, Liao K, Li Y, Zhao L, Liang S, Guo D, et al. Synergy Between Polyvinylpyrrolidone-Coated Silver Nanoparticles and Azole Antifungal Against Drug-Resistant *Candida albicans*. *J Nanosci Nanotechnol*. 2016;16(3):2325-35.
23. Ahmad A, Wei Y, Syed F, Tahir K, Taj R, Khan AU, et al. Amphotericin B-conjugated biogenic silver nanoparticles as an innovative strategy for fungal infections. *Microb Pathog*. 2016;99:271-81.
24. Dar MA, Ingle A, Rai M. Enhanced antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cryptonectria* sp. evaluated singly and in combination with antibiotics. *Nanomedicine*. 2013;9(1):105-10.
25. Sap-Iam N, C. Homklinchan, R. Larpudomlert, W. Warisnoicharoen, A. Sereemasapun and S.T. Dubas. UV Irradiation-induced Silver Nanoparticles as Mosquito Larvicides *J. Applied Sci* 2010.

26. Allahverdiyev AM, Abamor ES, Bagirova M, Ustundag CB, Kaya C, Kaya F, et al. Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:2705-14.
27. Gu W, Guo D, Zhang L, Xu D, Sun S. The Synergistic Effect of Azoles and Fluoxetine against Resistant *Candida albicans* Strains Is Attributed to Attenuating Fungal Virulence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(10):6179-88.
28. Baddley JW, Pappas PG. Antifungal combination therapy: clinical potential. *Drugs*. 2005;65(11):1461-80.
29. Carvalho M, Santana G, Andrade A, Cabral A, Rosa-Leão N, Melo-Santos MA, et al. Exploiting silver nanoparticles with PMAA against *Aedes aegypti* larvae development: potential larvicidal activity 2017.
30. Clinical and Laboratory Standards Institute. (CLSI). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*. 3 ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
31. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2016;62(4):e1-50.
32. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(1):1.
33. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol*. 1994;32(8):1923-9.
34. Jabra-Rizk MA, Brenner TM, Romagnoli M, Baqui AA, Merz WG, Falkler WA, et al. Evaluation of a reformulated CHROMagar Candida. *J Clin Microbiol*. 2001;39(5):2015-6.
35. Nadeem SG, Hakim ST, Kazmi SU. Use of CHROMagar Candida for the presumptive identification of *Candida* species directly from clinical specimens in resource-limited settings. *Libyan J Med*. 2010;5.
36. Höfs S, Mogavero S, Hube B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *J Microbiol*. 2016;54(3):149-69.
37. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol*. 2010;36(1):1-53.
38. Kullberg BJ, Arendrup MC. Invasive Candidiasis. *N Engl J Med*. 2015;373(15):1445-56.
39. Fazly A, Jain C, Dehner AC, Issi L, Lilly EA, Ali A, et al. Chemical screening identifies filastatin, a small molecule inhibitor of *Candida albicans* adhesion, morphogenesis, and pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(33):13594-9.
40. Bujdaková H. Management of *Candida* biofilms: state of knowledge and new options for prevention and eradication. *Future Microbiol*. 2016;11(2):235-51.
41. Sun S, Li Y, Guo Q, Shi C, Yu J, Ma L. Interactions between tacrolimus and azoles against *Candida albicans* determined by different methods. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(2):409-17.
42. Hamed S, Emara M, Shawky RM, El-Domany RA, Youssef T. Silver nanoparticles: Antimicrobial activity, cytotoxicity, and synergism with N-acetyl cysteine. *J Basic Microbiol*. 2017;57(8):659-68.
43. Kelkawi AHA, Abbasi Kajani A, Bordbar AK. Green synthesis of silver nanoparticles using *Mentha pulegium* and investigation of their antibacterial, antifungal and anticancer activity. *IET Nanobiotechnol*. 2017;11(4):370-6.
44. Mallmann EJ, Cunha FA, Castro BN, Maciel AM, Menezes EA, Fachine PB. Antifungal activity of silver nanoparticles obtained by green synthesis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015;57(2):165-7.
45. Du J, Singh H, Yi TH. Biosynthesis of silver nanoparticles by *Novosphingobium* sp. THG-C3 and their antimicrobial potential. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2017;45(2):211-7.
46. Vazquez-Munoz R, Avalos-Borja M, Castro-Longoria E. Ultrastructural analysis of *Candida albicans* when exposed to silver nanoparticles. *PLoS One*. 2014;9(10):e108876.
47. Das B, Tripathy S, Adhikary J, Chattopadhyay S, Mandal D, Dash SK, et al. Surface modification minimizes the toxicity of silver nanoparticles: an in vitro and in vivo study. *J Biol Inorg Chem*. 2017;22(6):893-918.
48. Artunduaga Bonilla JJ, Paredes Guerrero DJ, Sánchez Suárez CI, Ortiz López CC, Torres Sáez RG. In vitro antifungal activity of silver nanoparticles against fluconazole-resistant *Candida* species. *World J Microbiol Biotechnol*. 2015;31(11):1801-9.
49. Georgantzopoulou A, Serchi T, Cambier S, Leclercq CC, Renaut J, Shao J, et al. Effects of silver nanoparticles and ions on a co-culture model for the gastrointestinal epithelium. Part I. *Fibre Toxicol*. 2016;13:9.
50. Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, et al. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J Proteome Res*. 2006;5(4):916-24.
51. Dibrov P, Dzioba J, Gosink KK, Häse CC. Chemiosmotic mechanism of antimicrobial activity of Ag(+) in *Vibrio cholerae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(8):2668-70.

52. Longhi C, Santos JP, Morey AT, Marcato PD, Durán N, Pinge-Filho P, et al. Combination of fluconazole with silver nanoparticles produced by *Fusarium oxysporum* improves antifungal effect against planktonic cells and biofilm of drug-resistant *Candida albicans*. *Med Mycol*. 2016;54(4):428-32.
53. Singh M, Kumar M, Kalaivani R, Manikandan S, Kumaraguru AK. Metallic silver nanoparticle: a therapeutic agent in combination with antifungal drug against human fungal pathogen. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2013;36(4):407-15.
54. Kotakadi VS, Gaddam SA, Subba Rao Y, Prasad TN, Varada Reddy A, Sai Gopal DV. Biofabrication of silver nanoparticles using *Andrographis paniculata*. *Eur J Med Chem*. 2014;73:135-40.
55. Lara HH, Romero-Urbina DG, Pierce C, Lopez-Ribot JL, Arellano-Jimenez MJ, Jose-Yacamán M. Effect of silver nanoparticles on *Candida albicans* biofilms: an ultrastructural study. *J Nanobiotechnology*. 2015;13:91.
56. Devi LS, Joshi SR. Evaluation of the antimicrobial potency of silver nanoparticles biosynthesized by using an endophytic fungus, *Cryptosporiopsis ericae* PS4. *J Microbiol*. 2014;52(8):667-74.
57. Delaval M, Wohlleben W, Landsiedel R, Baeza-Squiban A, Boland S. Assessment of the oxidative potential of nanoparticles by the cytochrome c assay: assay improvement and development of a high-throughput method to predict the toxicity of nanoparticles. *Arch Toxicol*. 2017;91(1):163-77.
58. Morschhäuser J. The development of fluconazole resistance in *Candida albicans* - an example of microevolution of a fungal pathogen. *J Microbiol*. 2016;54(3):192-201.
59. Li Y, Chang W, Zhang M, Li X, Jiao Y, Lou H. Synergistic and drug-resistant reversing effects of diorcinol D combined with fluconazole against *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res*. 2015;15(2).
60. Cleary IA, Reinhard SM, Lazzell AL, Monteagudo C, Thomas DP, Lopez-Ribot JL, et al. Examination of the pathogenic potential of *Candida albicans* filamentous cells in an animal model of haematogenously disseminated candidiasis. *FEMS Yeast Res*. 2016;16(2):fow011.
61. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013;4(2):119-28.
62. Naicker SD, Patel M. *Dodonaea viscosa* var. *angustifolia* Inhibits Germ Tube and Biofilm Formation by *C. albicans*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:261978.
63. Atalay MA, Koc AN, Parkan OM, Aydemir G, Elmali F, Sav H. Can serums be replaced by Mueller-Hinton agar in germ tube test? *Niger J Clin Pract*. 2017;20(1):61-3.
64. Hebecker B, Naglik JR, Hube B, Jacobsen ID. Pathogenicity mechanisms and host response during oral *Candida albicans* infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014;12(7):867-79.
65. Máté G, Kovács D, Gazdag Z, Pesti M, Szántó Á. Linalool-induced oxidative stress processes in the human pathogen *Candida albicans*. *Acta Biol Hung*. 2017;68(2):220-31.
66. Galandáková A, Franková J, Ambrožová N, Habartová K, Pivodová V, Zálešák B, et al. Effects of silver nanoparticles on human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. *Hum Exp Toxicol*. 2016;35(9):946-57.
67. Salvioni L, Galbiati E, Collico V, Alessio G, Avvakumova S, Corsi F, et al. Negatively charged silver nanoparticles with potent antibacterial activity and reduced toxicity for pharmaceutical preparations. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:2517-30.

ANEXO A – Pedido de Patente

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2017 026474 2

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: CECÍLIA MARIA DE SÁ BARRETO CRUZ FALCÃO

Tipo de Pessoa: Pessoa Física

CPF/CNPJ: 07124191440

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Outras ocupações não especificadas anteriormente

Endereço: Rua Marechal Deodoro, 503, ap 1504, Encruzilhada

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52030172

País: Brasil

Telefone: 81 366087845

Fax:

Email: ceciliaodonto@gmail.com

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): COMPOSIÇÃO COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA CONTENDO NANOPARTÍCULAS DE PRATA E FLUCONAZOL

Resumo: A presente invenção trata-se de uma composição, com atividade antifúngica, contendo fluconazol e nanopartículas de prata. A combinação de nanopartículas de prata com fluconazol apresentou atividade antifúngica superior àquela obtida com o fluconazol e com as nanopartículas de prata avaliadas separadamente. E também foi capaz de inibir a formação do tubo germinativo, mesmo em concentrações sub-inibitórias.

Figura a publicar: 3

