

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**COMBINAÇÃO DE ANTIFÚNGICOS COM cloreto de poli(dialildimetilamônio):
UMA NOVA ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DE CANDIDÍASE**

LAVÍNIA DA VEIGA PEREIRA

Porto Alegre, 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**COMBINAÇÃO DE ANTIFÚNGICOS COM cloreto de poli(dialildimetilamônio):
UMA NOVA ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DE CANDIDÍASE**

Dissertação apresentada por Lavínia da
Veiga Pereira como requisito para a
obtenção do GRAU DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas.

Orientador(a): Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Co-Orientador(a): Prof. Dr. Michel Mansur Machado

Porto Alegre, 2024

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 05 de abril de 2024 pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Juliana Caierão

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Patrícia Valente da Silva

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Rosane Michele Duarte Soares

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

da Veiga Pereira, Lavinia
COMBINAÇÃO DE ANTIFÚNGICOS COM cloreto de
poli(dialildimetilamônio): UMA NOVA ALTERNATIVA PARA O
TRATAMENTO DE CANDIDÍASE / Lavinia da Veiga Pereira.
-- 2024.
88 f.
Orientador: Alexandre Meneghello Fuentefria.

Coorientador: Michel Mansur Machado.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, , Porto Alegre, BR-RS, 2024.

1. Atividade Antifúngica. 2. Candida spp.. 3.
biopolímeros. 4. combinação. 5. PDDA. I. Meneghello
Fuentefria, Alexandre, orient. II. Mansur Machado,
Michel, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada, Anexo II, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) na cidade de Porto Alegre. O autor recebeu bolsa de estudos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) durante todo o curso.

*Dedico esse trabalho à minha amada mãe Ivania, fonte de amor,
incentivo, apoio e inspiração inesgotáveis.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus. A minha fé é o que me mantém firme nos meus propósitos. Eu sei que o Senhor se faz presente todos os dias na minha vida.

Agradeço à minha amada mãe Ivania. Não existem palavras que expressem o real amor e admiração que sinto por ti. Teu apoio e amor são essenciais para mim e eu serei sempre grata por todo o esforço que você fez e faz para me ver feliz e bem.

À minha irmã Letícia, pela amizade e companherismo além do nosso elo sanguíneo. A tua presença alegria a minha vida e torna ela mais leve. As tuas palavras foram inúmeras vezes o meu conforto e combustível para persistir nos meus objetivos.

Ao meu pai Luís Odeto, que do jeitinho dele sempre torceu por mim e vibra pelas minhas conquistas. Eu enxergo o teu amor toda vez que você insiste para eu voltar para perto de vocês.

Família, obrigada por compreenderem a minha ausência e acreditarem no meu potencial. Obrigada por apoiarem o meu voo, mas principalmente por sempre me receberem de braços abertos todas as vezes que precisei pousar. Vocês são o meu refúgio e a minha fortaleza.

Ao saudoso e estimado professor Dr. Luís Flávio Souza de Oliveira (*in memoriam*). Me emociono toda vez que falo em você, pois o senhor foi muito importante na minha trajetória. Obrigada pelo olhar atencioso, diálogo acolhedor e incentivo aos estudos.

À Micaela Federizzi por me acolher em Porto Alegre, viver essa fase e dividir a casa comigo. Obrigada pelas conversas profundas, apoio e momentos compartilhados.

À minha psicóloga Tiasmin Ohnmacht, por me auxiliar nessa jornada. Você contribuiu muito para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos meus colegas do Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada (LPMA), pelos conhecimentos compartilhados, parcerias de bancada e momentos de descontração que tornaram a jornada mais leve.

À minha amiga e colega de pós-graduação, Manoela Mace. Obrigada pelos ensinamentos compartilhados na nossa primeira experiência como docentes e por ser tão gentil.

Ao meu amigo e colega de pós-graduação, Tiago Rizzi. Desde os primeiros momentos tivemos conexão e parceria, tanto no trabalho quanto na vida. Viver essa jornada contigo foi muito especial.

Aos amigos que fiz durante esse tempo, não irei citar todos os nomes, mas vocês sabem do carinho e apreço que tenho por vocês. Os guardo em um lugarzinho especial no meu coração.

Ao professor Dr. Michel Mansur Machado, por aceitar me acompanhar em mais uma fase da pesquisa acadêmica. Nossas conversas continuam me tranquilizando e clareando os meus pensamentos. Sabes o carinho e admiração que tenho por ti.

Ao professor Dr. Alexandre Meneghello Fuentesfria, por me receber no seu grupo de pesquisa e me orientar durante esses dois anos.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), pela oportunidade e ensino de qualidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À banca examinadora dessa dissertação de mestrado, por aceitarem gentilmente o meu convite.

A todos aqueles que cruzaram o meu caminho, torceram pelo meu sucesso e de certa forma contribuíram para a pessoa que sou hoje, eu agradeço.

“Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês, diz o Senhor, planos de fazê-los prosperar e não de lhes causar dano, planos de dar-lhes esperança e um futuro”. Jeremias 29:11

RESUMO

A ciência dos polímeros e a sua versatilidade de aplicação está revolucionando o manejo de doenças fúngicas. Estratégias baseadas em biopolímeros permeiam as áreas de prevenção, diagnóstico e tratamento das infecções fúngicas, devido as suas características biocompatíveis, biodegradáveis e quimiossensibilizantes. As infecções causadas por fungos representam um problema de saúde pública mundial e o gênero *Candida* é predominante nas infecções invasivas, atingindo principalmente indivíduos com sistema imune debilitado. A resistência aos antifúngicos e as limitações das terapias disponíveis agravam essa situação. A terapia combinada, reposicionamento e reuso de fármacos são estratégias eficazes e menos dispendiosas, que possibilitam a prospecção de agentes mais potentes e contornam a toxicidade dos antifúngicos tradicionais. O objetivo principal desse estudo foi avaliar a combinação de um biopolímero com antifúngicos convencionais, como uma nova alternativa para combater infecções fúngicas e contaminações de superfícies inertes causadas por espécies leveduriformes de interesse clínico. O cloreto de poli(dialildimetilamônio) (PDDA) foi combinado aos fármacos anfotericina B (AMB), clioquinol (CLIO), nitroxolina (NTX) e caspofungina (CSP) e sua atividade foi avaliada frente as cepas de *Candida* spp. A maioria das estirpes foram sensíveis aos fármacos isolados, as concentrações inibitórias mínimas (MIC's) variaram de 0,5 – 4,0; 0,25 – 1,0; 0,25 – 4,0 e $7,81 \times 10^{-3}$ – 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para AMB, CLIO, NTX e CSP, respectivamente. As combinações ricas em polímero (1:99) de AMB-PDDA, CSP-PDDA e CLIO-PDDA foram capazes de reduzir o MIC individual dos fármacos, especialmente CSP-PDDA proporcionou MICs inferiores a nanogramas por mililitro. O biofilme formado de *Candida* spp. demonstrou pouca suscetibilidade aos efeitos de CSP-PDDA, entretanto, a combinação não demonstrou riscos de toxicidade *in silico*, mostrando-se até o momento como uma abordagem segura ao organismo humano. A combinação entre PDDA e os antifúngicos proporcionaram sistemas eficazes contra diferentes cepas de *Candida*, sugerindo um forte candidato a novas aplicações em diversificadas áreas biomédicas, tais como dispositivos médicos, sistemas de liberação de fármacos e materiais antimicrobianos.

Palavras-chave: Atividade antifúngica; *Candida* spp.; biopolímeros; combinação; PDDA; quimiossensibilização.

ABSTRACT

COMBINATION OF ANTIFUNGALS WITH poly(diallyldimethylammonium) chloride: A NEW ALTERNATIVE FOR THE TREATMENT OF CANDIDIASIS

The Science of polymers and their versatility of application is revolutionizing the management of fungal diseases. Strategies based on polymers permeate the areas of prevention, diagnosis and treatment of fungal infections, due to their biocompatible, biodegradable and chemosensitizing. Infections caused by fungi are a worldwide public health problem and the *Candida* genus is predominant in invasive infections, mainly affecting individuals with weakened immune systems. Antifungal resistance and the limitations of available therapies aggravate the situation. Combination therapy, repositioning and drug reuse are effective and less expensive strategies, often enabling the search for more potent agents and circumventing the toxicity of traditional antifungals. The main objective of this study was to evaluate the combination of conventional antifungals with a biopolymer as a new alternative to combat fungal infections caused by yeast species of clinical interest. The poly(diallyldimethylammonium) chloride (PDDA) was combined with drugs amphotericin B (AMB), clioquinol (CLIO), nitroxoline (NTX) and caspofungin (CSP) and their activity was evaluated against *Candida* spp. strains. Most of the strains were sensitive to the isolated drugs, with minimum inhibitory concentrations (MICs) ranging from 0.5 - 4.0, 0.25 - 1.0, 0.25 - 4.0 and 7.81×10^{-3} - 0.5 $\mu\text{g/mL}$ for AMB, CLIO, NTX, and CSP, respectively. The polymer-rich combinations (1:99) of AMB-PDDA, CSP-PDDA and CLIO-PDDA reduced the individual MIC of the drugs, primarily CSP-PDDA provided MICs of less than nanograms per milliliter. The formed biofilm of *Candida* spp. showed little susceptibility to the effects of CSP-PDDA, however the combination did not demonstrate toxicity risks in silico, proving so far to be a safe approach for the human organism. The combination of PDDA and antifungals provided effective systems against different *Candida* strains, suggesting a strong candidate for new applications in diverse biomedical areas, such as medical devices, drug delivery systems and antimicrobial materials.

Keyword: Antifungal activity; *Candida* spp.; biopolymers; combination; PDDA; chemosensitization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química dos fármacos envolvidos neste estudo. Figura do autor.....	35
Figura 2 - Estrutura química do cloreto de poli(dialildimetilamônio) – PDDA. Figura do autor.	37
Figura 3 - Formação do biofilme de fungos leveduriformes em superfície. Figura do autor.	41
Figura 4 – Representação da célula fúngica e alvos moleculares das principais classes de fármacos antifúngicos, imagem adaptada de Heard; Wu; Winter, 2021.	42

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AMB	Anfotericina B
AMB-PDDA	Anfotericina B e cloreto de poli(dialildimetilamônio)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CLIO	Clioquinol
CLIO-PDDA	Clioquinol e cloreto de poli(dialildimetilamônio)
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNA	<i>Candida não-albicans</i>
COVID-19	<i>Coronavirus disease 19</i>
CSP	Caspofungina
CSP-PDDA	Caspofungina e cloreto de poli(dialildimetilamônio)
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DODAB	Brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB)
ϵ -mPLS	ϵ -polilisinas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
LPMA	Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
NPs	Nanopartículas
NTX	Nitroxolina
NTX-PDDA	Nitroxolina e cloreto de poli(dialildimetilamônio)
PDDA	Cloreto de poli(dialildimetilamônio)
PDMAEMA	Poli(2-dialildimetilaminoetilmetacrilato)
PEG	Poli(etilenoglicol)
PEG-B-PLC	(poli-etilenoglicol)-bloco-poli(ϵ -caprolactona)
PEO	Óxido de polietileno
PGA	Poli-L-glutâmico
PLL	Poli-L-lisina (PLL)
SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
1. INTRODUÇÃO	22
1.1. OBJETIVOS.....	26
1.1.1. Objetivo Geral.....	26
1.1.2. Objetivos específicos.....	26
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	28
2.1. Polímeros com atividade antimicrobiana e a potencialização do efeito de fármacos antifúngicos.....	28
2.2. Desafios da terapia e resistência fúngica	31
2.3. Estratégias para contornar os desafios na terapia antifúngica	32
2.4. Cloreto de poli(dialildimetilamônio) – PDDA	35
2.5. Infecções fúngicas e <i>Candida</i> spp.	37
2.5.1. Biofilmes fúngicos.....	39
2.6. Mecanismos de ação dos fármacos antifúngicos	41
ARTIGO CIENTÍFICO	46
3. ARTIGO CIENTÍFICO – The association of a polyelectrolyte with antifungals promotes ng/mL range minimum inhibitory concentration values against <i>Candida</i> strains.	46
4. DISCUSSÃO	66
5. CONCLUSÃO	70
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	72
REFERÊNCIAS.....	74
ANEXOS	82

INTRODUÇÃO E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. INTRODUÇÃO

A otimização da ação de medicamentos através da utilização de agentes quimiossensibilizantes é uma área promissora da pesquisa para o tratamento das infecções fúngicas, considerando os crescentes desafios que permeiam esse campo (Bayliss; Schmidt, 2023; Du *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2023). A busca por estratégias terapêuticas inovadoras que potencializem a eficácia dos antifúngicos existentes é imperativa, especialmente devido a complexidade do desenvolvimento de novos medicamentos quando comparado as áreas da bacteriologia e virologia (Xin *et al.*, 2023). Neste cenário, os biopolímeros destacam-se como agentes promissores, oferecendo vantagens em termos de segurança, biocompatibilidade e capacidade de interação com os fármacos (Du *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2023; Xin *et al.*, 2023). Em particular, o cloreto de poli(dialildimetilamônio) (PDDA) desperta interesse devido as suas propriedades antimicrobinas e habilidade de aprimorar a ação de compostos aos quais é associado (Carrasco; Sampaio; Carmona-Ribeiro, 2015; de Carvalho *et al.*, 2023; Pérez-Betancourt *et al.*, 2022; Sanches *et al.*, 2015; Shi *et al.*, 2022).

A resistência microbiana e elevados índices de morbi-mortalidade provocados por doenças fúngicas, configuram um cenário preocupante (Fisher *et al.*, 2022; Zhang; Bills; An, 2023). A terapia antifúngica ainda é um ponto crítico para a medicina e comunidade científica, pois mesmo com o constante avanço biotecnológico, existem poucas opções consolidadas e eficientes para o tratamento de infecções fúngicas. Somadas a essa circunstância, as restrições do uso clínico relacionadas a toxicidade e a baixa adesão aos tratamentos, em razão do tempo prolongado de exposição e ao custo elevado da terapia, dificultam o tratamento clínico adequado do paciente e também colaboram para a resistência aos antimicrobianos (Chang *et al.*, 2017; Fuentefria *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2023).

As candidíases ou candidoses, como são chamadas as micoses causadas por *Candida* spp., são consideradas oportunistas e apresentam diversas características clínicas, a depender do local de infecção (Lionakis; Drummond; Hohl, 2023; Singh; Tóth; Gácser, 2020). Esses microorganismos comensais, manifestam-

se principalmente em indivíduos imunocomprometidos, mas também podem desencadear lesões em imunocompetentes. A candidemia é a apresentação mais severa da doença, devido ao alto potencial de disseminação da levedura na corrente sanguínea (Lionakis; Drummond; Hohl, 2023).

O tratamento com antifúngicos tradicionais tem se tornado falho e limitado, evidenciando assim a importância de aprimorar as estratégias farmacêuticas existentes, através da descoberta de novas moléculas, inserção de novos antifúngicos ou potencializando o efeito dos mesmos através de combinações assertivas, visando o tratamento adequado das infecções fúngicas (Fuentefria *et al.*, 2018; Zhang; Bills; An, 2023; Zhu *et al.*, 2023). Nesse contexto, visamos o cloreto de poli(dialildimetilamônio) (PDDA) como uma proposta de combinação aos antifúngicos comerciais, devido as suas propriedades conformacionais e atividade antimicrobiana descrita (de Carvalho *et al.*, 2023; Grigoras, 2021; Sanches *et al.*, 2015).

O cloreto de poli(dialildimetilamônio) (PDDA) é um biopolímero, constituído por grupamentos de amônio quaternário permanentemente carregados em unidades cíclicas. É considerado seguro para a saúde humana, amplamente empregado na indústria e em processos biológicos, médicos e alimentícios (Bayliss; Schmidt, 2023; Biery; Knauss, 2022; Dos Santos *et al.*, 2021). Polímeros com essas mesmas conformações químicas têm sido descritos como antimicrobianos, mas as propriedades do PDDA ainda são pouco exploradas (Bayliss; Schmidt, 2023; Dos Santos *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2023) .

A combinação entre fármacos com eficácia conhecida, com produtos naturais ou a realocação dos mesmos, é uma estratégia atraente, pois o desenvolvimento e inserção de novas moléculas e medicamentos é deveras custoso (Heard; Wu; Winter, 2021; Zhu *et al.*, 2023). Nesse trabalho, combinamos os antifúngicos anfotericina B (AMB, polieno), caspofungina (CSP, equinocandina) e os derivados da 8-hidroxiquinolina, nomeadamente clioquinol (CLIO) e nitroxolina (NTX) com o PDDA, afim de sugerir uma abordagem inovadora que possa não só prospectar um novo fármaco, mas também renovar a utilização de uma série de fármacos de diferentes classes através da potencialização dos seus efeitos, especialmente para o tratamento de infecções de difícil tratamento associadas a *Candida* spp. A utilização

de biopolímeros renova as perspectivas para uma gestão eficaz das infecções fúngicas, contribuindo para a superação dos desafios terapêuticos e impactos na saúde pública.

As páginas 26 à 88 foram restringidas devido a intenção de publicação do conteúdo em artigo científico. Essa é a versão parcial da dissertação.

