

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
MESTRADO EM QUÍMICA

Daphne Fonseca de Coppoli Lanferini

Associação de nanopartículas de prata a medicamentos antifúngicos para inibir o crescimento *in vitro* de *Candida spp.*

Juiz de Fora

2022

Daphne Fonseca de Coppoli Lanferini

Associação de nanopartículas de prata a medicamentos antifúngicos para inibir o crescimento *in vitro* de *Candida spp.*

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Química, área de concentração: físico-química, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Sant'Ana

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Francis Moreira Borges

Juiz de Fora
2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Lanferini, Daphne Fonseca de Coppoli.

Associação de nanopartículas de prata a medicamentos antifúngicos para inibir o crescimento *in vitro* de *Candida spp.* / Daphne Fonseca de Coppoli Lanferini. -- 2022.

75 p.

Orientador: Antonio Carlos Sant'Ana

Coorientadora: Francis Moreira Borges

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2022.

1. Nanopartículas. 2. *Candida spp.* 3. SERS. 4. Sinergia. 5. Quitosana. I. Sant'Ana, Antonio Carlos, orient. II. Borges, Francis Moreira, coorient. III. Título.

Daphne Fonseca de Coppoli Lanferini

Associação de nanopartículas de prata a medicamentos antifúngicos para inibir o crescimento in vitro de *Candida spp*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Físico-Química

Aprovada em 25 de abril de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Carlos Sant'Ana - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Francis Moreira Borges - Coorientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Erix Alexander Milán Garcès

Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Michele Munk Pereira

Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 19/04/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Michele Munk Pereira, Professor(a)**, em 25/04/2022, às 11:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Carlos Sant Ana, Professor(a)**, em 25/04/2022, às 11:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Francis Moreira Borges, Professor(a)**, em 25/04/2022, às 11:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Erix Alexander Milán Garcés, Usuário Externo**, em 25/04/2022, às 11:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Uffj (www2.ufff.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0748666** e o código CRC **EF2CBFCD**.

Dedico este trabalho à memória de
Laís Fonseca Bessa e Ilza Fonseca de Coppoli.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe e ao meu padrasto, por me proporcionarem chegar até aqui.

Ao meu esposo, meu grande incentivador.

À todas as famílias que eu faço parte, direta ou indiretamente.

Ao meu orientador, Antonio Carlos Sant'Ana, por acreditar em mim desde o começo.

Aos professores Francis Moreira Borges, Gustavo Fernandes de Souza Andrade, Andréia Francisco Afonso e Ivoni Freitas-Reis, pelos ensinamentos que ultrapassaram, em muito, qualquer ementa.

Aos irmãos e primos do LabNano, em especial Flávia Campos Marques, Hudson Batista da Silva, Paulo Henrique de Melo Toledo, Pedro Victor Almeida Pessanha e Rafael de Oliveira, pela ajuda inestimável.

Ao Bonde do Ludwig, pela amizade, torcida, figurinhas e fanfics.

Aos amigos da Química e da Física, pela companhia e todo café do mundo.

Aos colegas do ICB, em especial à Jéssica Chagas.

Aos amigos da Farmácia do Linhares.

Aos amigos de sempre: Carvalhos, Covinha, Dona, Doug, Edgard, PitPow e Kássio.

Aos meus pets, lembrança constante do amor incondicional.

À todas as mulheres cientistas que vieram antes de mim.

Aos artistas audiovisuais, plásticos, músicos e escritores, porque a vida não basta.

À UFOP, por me fazer farmacêutica, e à UFJF, por me fazer química.

בְּרוּךְ אַתָּה, יְיָ אֱלֹהֵינוּ, מֶלֶךְ הָעוֹלָם, שֶׁהִתְיַבֵּן וְקִיְמָנוּ וְהִגִּיעָנוּ לְזֶמֶן הַזֶּה

“We have calcium in our bones, iron in our veins, carbon in our souls, and nitrogen in our brains. 93% stardust, with souls made of flames, we are all just stars that have people names.”
(GILL, 2016, p. 79)

RESUMO

Neste trabalho foram comparadas a ação antifúngica de nanopartículas de prata (AgNP) sintetizadas com e sem quitosana de baixo peso molecular (QBPM) como modificador de superfície, e sua associação aos medicamentos antifúngicos, Anfotericina B (AMB), Fluconazol (FZL) e Caspofungina (CFG), com o objetivo de avaliar as propriedades fungicidas e fungistáticas destas associações através de ensaios *in vitro* contra *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. As interações químicas dos adsorbatos na superfície das AgNP foram estudadas através das técnicas de espectroscopia no Ultravioleta-visível e Infravermelho Próximo (UV-VIS-NIR) e de Espalhamento Raman Intensificada por Superfície (SERS), enquanto o tamanho e potencial zeta foram analisados pelo método de Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS). As concentrações dos agentes antifúngicos foram testadas separadamente e em combinação para a obtenção dos valores de Concentração Inibitória Mínima (MIC), Concentração Inibitória Fracionária (FIC), Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI) e Concentração Fungicida Mínima (MFC). A associação AgNP + QBPM demonstrou ação fungicida superior às AgNP sem modificador de superfície. Nos resultados para MIC, FIC e FICI *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentaram valores de sinergia para AMB associada às AgNP + QBPM, enquanto *C. tropicalis* apresentou adição e *C. albicans* sinergia para FZL associado a AgNP + QBPM, levando à observação de um efeito fungicida, confirmado pelos resultados para MFC. Esses resultados demonstram a eficiência do uso de AgNP + QBPM como agentes sinérgicos da ação antifúngica, quando associados às drogas e como agente de entrega controlada de fármacos.

Palavras-chave: Nanopartículas. *Candida spp.* Antifúngico. Quitosana. Sinergia. SERS.

ABSTRACT

In this work, the antifungal action of silver nanoparticles (AgNP) synthesized with and without low molecular weight Chitosan (QBPM), as a surface modifier, and its association with the antifungal drugs, Amphotericin B (AMB), Fluconazole (FZL) and Caspofungin (CFG) was compared with the objective of evaluating the fungicidal and fungistatic properties of these associations through *in vitro* assays against *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. The chemical interactions of adsorbates on the surface of AgNP were studied using Ultraviolet-visible Near Infrared (UV-VIS-NIR) spectroscopy and Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Spectroscopy, while the size and zeta potential was studied using Dynamic Light Scattering (DLS) method. The concentrations of antifungal agents were tested separately and in combination to obtain Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Fractional Inhibitory Concentration (FIC), Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) and Minimum Fungicide Concentration (MFC) values. The association AgNP + QBPM demonstrated superior fungicidal action than AgNP without surface modifier. In the results for MIC, FIC and FICI, *C. albicans* and *C. tropicalis* showed synergy values for AMB associated with AgNP + QBPM, while *C. tropicalis* presented addition and *C. albicans* synergy for FZL associated with AgNP + QBPM, leading to the observation of a fungicidal effect, confirmed by the results for MFC. These results demonstrate the efficiency of using AgNP + QBPM as synergistic agents of antifungal action when associated with drugs and as an agent for controlled drug delivery.

Keywords: Nanoparticles. *Candida spp.* Antifungal. Chitosan. Synergy. SERS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1	- Classificações das candidíases e alguns exemplos.....	17
Quadro 2	- Fatores predisponentes das candidíases.....	18
Figura 1	- Alvos celulares dos agentes antifúngicos discutidos neste trabalho....	20
Figura 2	- Molécula de AMB.....	22
Figura 3	- Molécula de CFG.....	24
Figura 4	- Molécula de FZL.....	25
Figura 5	- Processo de obtenção da quitosana a partir da desacetilação da quitina.....	28
Figura 6	- Diagrama de Jablonski simplificado representando esquematicamente os espalhamentos: a) Rayleigh (elástico) e b) Stokes (inelástico).....	29
Figura 7	- Esquema de oscilação plasmônica para uma esfera, mostrando o deslocamento da nuvem dos elétrons de condução em relação aos núcleos.....	31
Figura 8	- Perfil de variações nas concentrações plasmáticas de drogas administradas por diferentes métodos, em função do tempo.....	32
Figura 9	- Representação da placa de microdiluição em meio líquido e esquema de distribuição de componentes para os testes MIC.....	38
Figura 10	- Representação da placa de microdiluição em meio líquido e esquema de distribuição de componentes para os testes FIC.....	40
Figura 11	- Espectro de extinção dos coloides de AgNP preparados sob diferentes métodos, e com QBPM. Caminho óptico 5mm.....	49
Figura 12	- Espectros de extinção das soluções de AgNP + QBPM (56 $\mu\text{g. mL}^{-1}$), AMB (250 $\mu\text{g. mL}^{-1}$), CFG (28 $\mu\text{g. mL}^{-1}$), FZL (128 $\mu\text{g. mL}^{-1}$), CV (0,4 g.L^{-1}) e RPMI 1640 (10,4 g.L^{-1}). Caminho óptico 5 mm.....	50
Figura 13	- Espectro de extinção coloide AgNP + QBPM, adicionado de CV, RPMI e AMB em diferentes concentrações.....	50
Figura 14	- Espectro de extinção coloide AgNP + QBPM, adicionado de CV, RPMI e CFG em diferentes concentrações.....	51
Figura 15	- Espectro de extinção coloide AgNP + QBPM, adicionado de CV, RPMI e FZL em diferentes concentrações.....	51

Figura 16	Histograma da distribuição de tamanhos por intensidade para o colóide AgNP.....	52
Figura 17	Histograma da distribuição de tamanhos por intensidade para o colóide AgNP + QBPM.....	52
Figura 18	Distribuição de potencial ζ para o colóide AgNP, em triplicata.....	53
Figura 19	Distribuição de potencial ζ para o colóide AgNP, em triplicata.....	53
Figura 20	Espectros SERS da R6G obtidos em suspensão AgNP ($\lambda_0=785$ nm, 10 mW, 5 coadições de 10 segundos) depositada sobre porta-amostra de plástico revestido com papel alumínio tratado, sobre papel alumínio sem tratamento, e espectro Raman do papel alumínio tratado puro e limpo.....	55
Figura 21	Espectros SERS do CV associado a AgNP ($\lambda_0=785$ nm) e SERRS do CV associado à AgNP, com e sem QBPM ($\lambda_0=632,8$ nm) depositada sobre porta-amostra revestido com FAT.....	56
Figura 22	Estrutura conformacional calculada no vácuo para a molécula de AMB (software: Drawmol).....	57
Figura 23	A) Espectro SERS da AMB associada à solução de AgNP ($\lambda_0 =632,8$ nm, 10 mW, 500 segundos) e B) Espectro Raman da AMB em solução aquosa ($\lambda_0=1064$ nm, 1000 mW, 512 scans)	58
Figura 24	Estrutura conformacional calculada no vácuo para a molécula de CFG (software: Drawmol).....	59
Figura 25	A) Espectro SERS de CFG associada à solução de AgNP ($\lambda_0 =632,8$ nm, 20 mW, 750 segundos) e B) Espectro Raman de CFG em solução aquosa ($\lambda_0=1064$ nm, 1000 mW, 512 scans)	60
Figura 26	Estrutura conformacional calculada no vácuo para a molécula de FZL (software: Drawmol).....	62
Figura 27	A) Espectro SERS de FZL associada à solução de AgNP ($\lambda_0 =633$ nm, 10 mW, 90 segundos) e B) Espectro Raman de FZL sólido ($\lambda_0=1064$, 1000 mW, 512 scans)	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-	Diferentes métodos utilizados para obtenção de AgNP	36
Tabela 2	-	Concentrações dos antifúngicos utilizadas nos testes biológicos	37
Tabela 3	-	Resultados dos ensaios de susceptibilidade MIC, FIC e FICI.....	45
Tabela 4	-	Resultados dos testes MFC.....	48
Tabela 5	-	Valores obtidos através da técnica de DLS para os coloides AgNP e AgNP + QBPM.....	53
Tabela 6	-	Atribuições de bandas de AMB.....	58
Tabela 7	-	Atribuições de bandas de CFG.....	61
Tabela 8	-	Atribuições de bandas de FZL.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American type culture collection</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DDS	<i>Drug delivery system</i>
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
FAT	Filme de alumínio tratado
FIC	<i>Fractional inhibitory concentration</i>
FICI	<i>Fractional inhibitory concentration index</i>
FT-Raman	Espectrômetro Raman com transformada de Fourier
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LSPR	<i>Localized Surface Plasmon Resonance</i>
MFC	<i>Minimal fungicidal concentration</i>
MIC	<i>Minimal inhibitory concentration</i>
PdI	<i>Polydispersity index</i>
QBPM	Quitosana de baixo peso molecular
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SERS	<i>Surface-enhanced Raman spectroscopy</i>
SERRS	<i>Surface-enhanced resonance Raman spectroscopy</i>
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UV-VIS-NIR	Espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível e infravermelho próximo

LISTA DE SÍMBOLOS

δ	Deformação angular no plano
γ	Deformação angular fora do plano
ν	Estiramento
μ	Micro (10^{-6})
ω	<i>Wagging</i>
ζ	zeta
AgNO ₃	Nitrato de prata
AgNP	Nanopartícula de prata
AMB	Anfotericina B
as	Estiramento antissimétrico
CFG	Caspofungina
CYP	Citocromo P450
CYP51	14- α esterol-desmetilase
CV	Cristal Violeta
FZL	Fluconazol
HCl	Ácido clorídrico
HNO ₃	Ácido nítrico
NaBH ₄	Borohidreto de sódio
NP	Nanopartícula
nm	nanômetro (1×10^{-9} m)
s	Estiramento simétrico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	CANDIDÍASE.....	16
1.1.1	<i>Candida albicans</i>	19
1.1.2	<i>Candida tropicalis</i>	20
1.2	AGENTES ANTIFÚNGICOS.....	20
1.2.1	Anfotericina B.....	21
1.2.2	Caspofungina.....	23
1.2.3	Fluconazol.....	25
1.2.4	Prata.....	26
1.2.5	Quitosana.....	27
1.3	ESPECTROSCOPIA RAMAN E SERS.....	28
1.4	PROPRIEDADES ÓPTICAS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	30
1.5	APLICAÇÕES BIOLÓGICAS.....	32
2	OBJETIVOS.....	34
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	34
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
3	PARTE EXPERIMENTAL.....	35
3.1	REAGENTES.....	35
3.2	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	35
3.3	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	36
3.3.1	Ensaio para Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)....	38
3.3.2	Ensaio para Determinação da Concentração Inibitória Fracionária (FIC).	39
3.3.3	Ensaio para Determinação da Concentração Fungicida Mínima (MFC)....	40
3.4	FILME DE ALUMÍNIO TRATADO.....	41
3.5	TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS.....	42
3.5.1	Espectroscopia UV-VIS-NIR.....	42
3.5.2	Espalhamento Dinâmico de Luz.....	43
3.5.3	Espectroscopias Raman.....	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	45
4.1	ENSAIOS DE SUSCEPTIBILIDADE.....	45
4.2	ESPECTROSCOPIA UV-VIS-NIR.....	49

4.3	MEDIDAS DE TAMANHO E POTENCIAL ζ POR DLS.....	52
4.4	RAMAN E SERS.....	54
4.4.1	Espectros SERS da R6G.....	54
4.4.2	Espectros SERS do CV.....	55
4.4.3	Espectros SERS da AMB.....	56
4.4.4	Espectros SERS da CFG.....	59
4.4.5	Espectros SERS do FZL.....	61
5	CONCLUSÕES.....	64
	REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

Dentre os vários fungos pertinentes à saúde humana, o gênero *Candida*, fungo saprófita pertencente à classe *Ascomycetes* e à família *Saccharomycetaceae*, se destaca devido à facilidade com que coloniza e infecta hospedeiros humanos (COLOMBO et al., 2013).

As espécies de *Candida* são encontradas no trato gastrintestinal em 20 a 80% dos adultos saudáveis, e é estimado que entre 70-75% das mulheres em idade reprodutiva terão, pelo menos, um episódio de candidíase vaginal durante a vida, e 50% terão um episódio recorrente (ZENG et al., 2018).

Ainda que não causem grandes transtornos ao bem-estar em hospedeiros imunocompetentes, para os indivíduos que se apresentam imunocomprometidos – como aqueles que sofreram procedimentos clínicos invasivos, os doentes de câncer, os que passam por longas estadias em unidades de terapia intensiva, os transplantados e os portadores de HIV/AIDS - uma infecção por *Candida* é um grande risco, e a morbidade e mortalidade nesses pacientes é alta, devido, inclusive, ao diagnóstico tardio e tratamento demorado (VOLTAN, 2016, P. 3715).

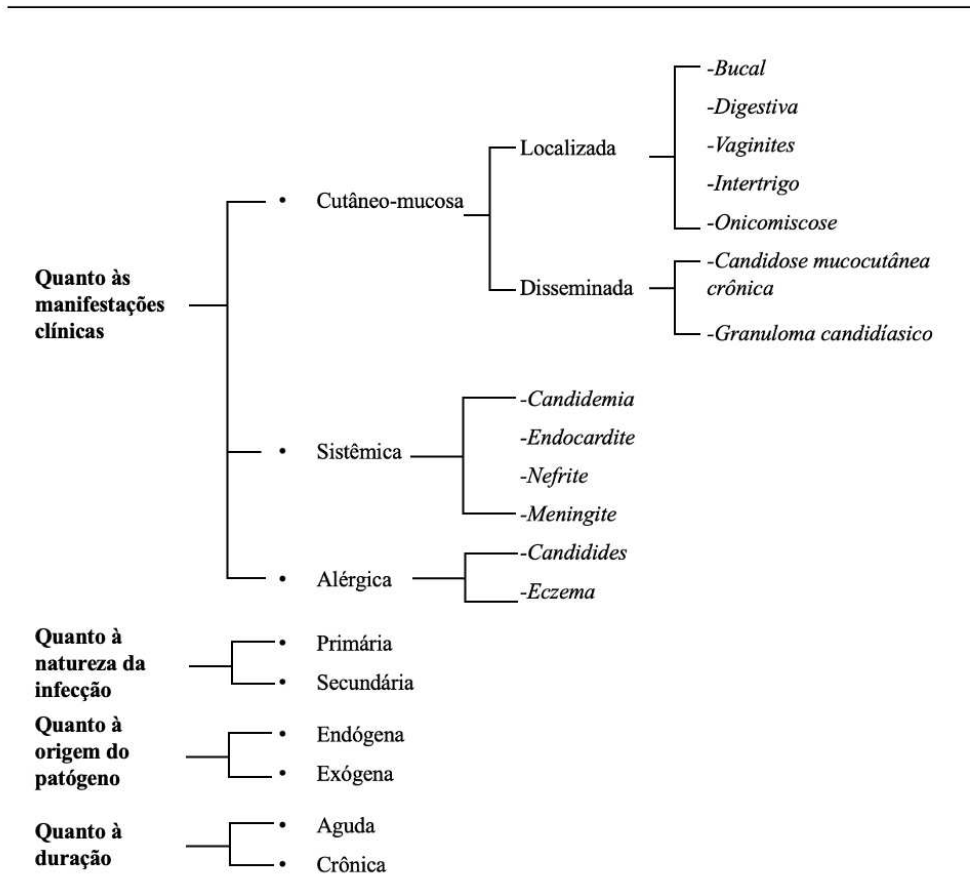
A *Candida* é um fungo oportunista, assim, é necessário que o organismo sofra alguma alteração, como uma ruptura no balanço normal da microbiota ou o comprometimento do sistema imune do hospedeiro, que permita a ação patogênica. O uso indiscriminado de antimicrobianos é um fator importante para o desenvolvimento da candidíase, pois além do desequilíbrio ecológico da microbiota do indivíduo, a falta de outros microrganismos para competição com o fungo é considerada como um mecanismo que facilitam a agressão por *Candida* (CARVALHAES, 2014).

Devido à crescente resistência das espécies do gênero *Candida*, devem ser buscadas outras opções para o tratamento antifúngico eficaz, além de contornar os efeitos adversos comuns a estes tratamentos.

1.1 CANDIDÍASE

As infecções pelo gênero *Candida* são chamadas de candidíases, e podem ser superficiais, atingindo mucosas e pele, ou invasivas, em órgãos e tecidos profundos como intestinos, pulmões e sangue, chamadas de candidemias (ROCHA et al., 2021).

Quadro 1 - Classificações das candidíases e alguns exemplos



Fonte: Adaptado de ARENAS GUZMÁN, 2014; ROCHA et al., 2021.

As candidemias são conhecidas como uma das maiores causas de morbidade (taxa de portadores de determinada doença em relação à população total estudada, em determinado local e em determinado momento) e mortalidade (risco ou probabilidade que qualquer pessoa na população apresenta de poder vir a morrer ou de morrer em decorrência de uma determinada doença) nos ambientes de saúde (PAPPAS et al., 2015; SAÚDE, 1997), e são amplamente associadas a longos períodos de internação hospitalar (CAPPELLETTY; EISELSTEIN-MCKITRICK, 2007).

Ainda que candidíases locais, como na pele, unhas e regiões genitais sejam bastante comuns, a probabilidade de infecções invasivas em pacientes imunocompetentes é baixa. Pacientes imunossuprimidos apresentam maior risco de desenvolverem infecções invasivas. Por exemplo, foi estimado que 25% dos pacientes com sintomas severos de Covid-19 também contraíram infecções fúngicas invasivas, particularmente aqueles tratados com antibióticos de amplo espectro e corticosteroides, e os que foram submetidos a nutrição parenteral, intubação endotraqueal e uso de cateteres intravenosos (ARASTEHFAR et al., 2020).

Pacientes com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), receptores de transplantes, pacientes oncológicos e aqueles tratados com agentes imunossupressores, especialmente pacientes pediátricos, constituem a população mais susceptível às candidíases, sendo ranqueada entre as quatro principais causas de morte entre esses pacientes (MONDELLI et al., 2012; MOTTA et al., 2017). As causas de óbito por complicações decorrentes da candidemia incluem endocardite (infecção do revestimento interno e válvulas do coração), meningite (inflamação das membranas do cérebro e medula espinhal), osteomielite (infecção dos ossos), peritonite (infecção da membrana que reveste a cavidade e os órgãos abdominais), neutropenia (redução da contagem dos glóbulos brancos no sangue), pneumonia (infecção pulmonar), infecções do pâncreas e hepatoesplênicas (fígado e baço) (BARBEDO; SGARBI, 2010).

Alguns fatores predisponentes da candidíase são apresentados no quadro 2.

Quadro 2 - Fatores predisponentes da candidíase

Estados fisiológicos	Enfermidades debilitantes
Extremos etários	Neoplasias
Gravidez	Infecções
Fatores locais	Inanição
Umidade	Infecção por HIV
Exposição ocupacional	AIDS
Oclusão cutânea	Medicamentos e tratamentos
Próteses	Contraceptivos
Feridas e queimaduras	Antibióticos de amplo espectro
Endocrinopatias e enfermidades metabólicas	Glicocorticoides
Diabetes	Imunossupressores
Obesidade	Radioterapia
Hiperuricemia	Intervenções cirúrgicas
Síndrome de Cushing	Transplantes
Hipotireoidismo	Alimentação parenteral
Deficiência de ferro	Cateterismo
Poliendocrinopatia	Traqueostomia
	Uso de entorpecentes
	Heroína IV

Fonte: Adaptado de ARENAS GUZMÁN, 2014.

Os fungos possuem vários mecanismos que permitem o sucesso da colonização e sobrevivência nos hospedeiros quando causando infecções. Este aparato, conhecido como fatores de virulência, confere vantagens ao microrganismo que envolvem mudança morfológica, formação de biofilmes e expressão de adesinas.

A plasticidade morfológica do gênero é um determinante de sua virulência. A *Candida* pode existir como levedura unicelular em forma oval com brotamento, bem como em diferentes formas filamentosas denominadas hifas e pseudo-hifas, dependendo de diversas condições. A hifa tem papel fundamental no processo infeccioso, pois é uma forma resistente à fagocitose (SOUZA, 2017).

Outra forma importante são biofilmes de *Candida spp.* Constituídos de uma estrutura tridimensional complexa e organizada de leveduras e pseudo-hifas, dependendo da espécie, onde as células fúngicas estão aderidas a uma superfície sólida, viva ou inerte, e envolvidas por uma matriz polissacarídica extracelular, composta por carboidratos, proteínas e glicose, entre outros nutrientes. A aderência do biofilme pode ser influenciada por fatores como temperatura, pH e estado nutricional do hospedeiro (BARBEDO; SGARBI, 2010).

A formação de biofilme confere uma série de vantagens aos micro-organismos como, proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro, virulência acentuada além de tolerância aos agentes antimicrobianos, já que a matriz extracelular pode agir como uma barreira, impedindo a penetração dessas substâncias. Uma vez estabelecido, o biofilme pode tolerar agentes antimicrobianos em concentrações de 10 a 1000 vezes maiores que as necessárias para eliminar os micro-organismos desorganizados (CARDOSO, 2017; COLOMBO et al., 2013).

Por muitos anos a espécie *Candida albicans* foi a principal responsável por casos de candidíases e candidemias. Atualmente, entretanto, outras espécies vêm tomando lugar de destaque e sendo objeto de pesquisas. São elas: *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*, que juntamente com a espécie *albicans* constituem mais de 90% das candidemias e infecções invasivas do gênero (PAPPAS et al., 2015).

No presente trabalho, as espécies *Candida albicans* e *Candida tropicalis* foram escolhidas como objetos de estudo.

1.1.1 *Candida albicans*

C. albicans é a espécie mais comum do gênero *Candida* a causar infecções em humanos, tanto superficiais quanto invasivas, em diversas partes do mundo, e certamente a espécie com maior conhecimento patogênico (BARBEDO; SGARBI, 2010). Esta espécie é naturalmente sensível a todas as drogas antifúngicas de uso sistêmico, mas casos de resistência adquirida a azóis, equinocandinas e polienos são conhecidos em pacientes expostos prolongadamente a estes medicamentos (SANTOS; VIEIRA, 2017).

1.1.2 *Candida tropicalis*

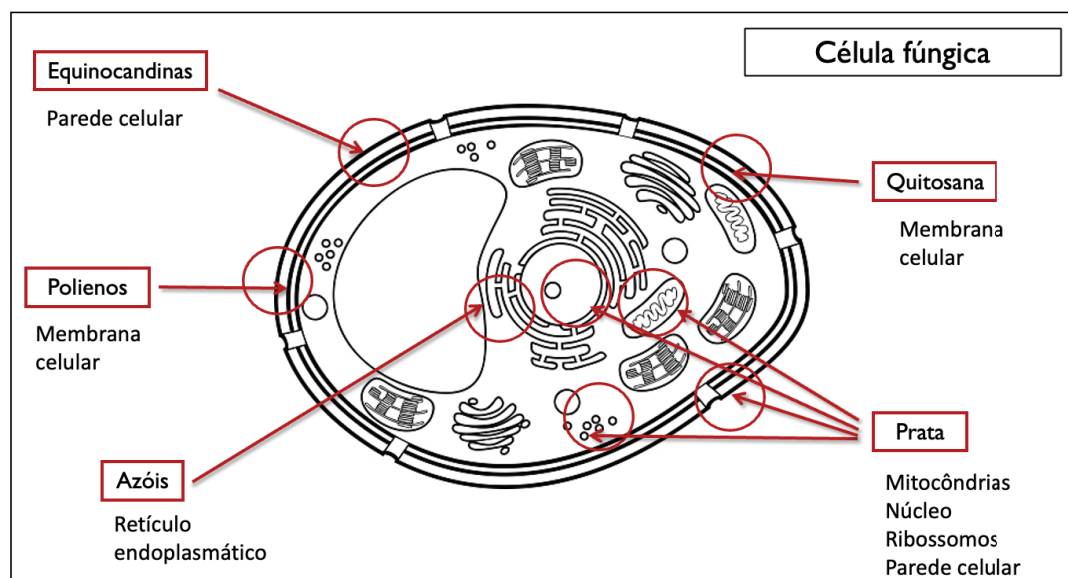
C. tropicalis vem sendo amplamente considerada a segunda espécie mais virulenta de *Candida*, precedida apenas por *C. albicans* como causa mais frequente de candidemia e candidíase invasiva, sendo muitas vezes relacionada à uma maior mortalidade que *C. albicans*, sobretudo em países da América Latina e Ásia (TAN et al., 2015). Além de compartilhar vários fatores de virulência com *C. albicans*, como adesão ao epitélio bucal e secreção de enzimas líticas, *C. tropicalis* supera *C. albicans* na produção de biofilme na maioria dos estudos.

As infecções por *C. tropicalis* são comumente tratadas com agentes azólicos, principalmente pelo alto custo das equinocandinas. Entretanto, um número crescente de estudos vem demonstrando um aumento significativo de casos de *C. tropicalis* resistentes a azólicos, polienos e equinocandinas (ARASTEHFAR et al., 2020a; FAVARELLO et al., 2021).

1.2 AGENTES ANTIFÚNGICOS

A célula fúngica é constituída por uma membrana plasmática, organelas dispersas no citoplasma, além de uma camada protetora externa denominada parede celular. Cada um dos agentes discutidos neste trabalho age sobre um alvo celular diferente, descrito na figura 1.

Figura 1 - Alvos celulares dos agentes antifúngicos discutidos neste trabalho



Fonte: Desenvolvido pela autora (2022).

As células fúngicas são eucarióticas, assim como as humanas; logo os dois tipos de células são alvos para os compostos antifúngicos, o que resulta em efeitos colaterais consideráveis para os pacientes e menos alvos celulares seletivos disponíveis para a ação das drogas antifúngicas. Além disso, um aumento constante na resistência aos antifúngicos tradicionais resultou na necessidade de desenvolvimento de novas terapias e a busca pela identificação de novas substâncias com potencial efeito antifúngico em baixas concentrações ou em combinação com os antifúngicos tradicionais (SANTOS et al., 2018; WILLE et al., 2013).

Como citado anteriormente, infecções fúngicas sistêmicas são associadas com altas taxas de mortalidade, mesmo com tratamento adequado. Além disso, um aumento na resistência adquirida aos antifúngicos dificulta ainda mais o manejo terapêutico. Uma estratégia para vencer a resistência a antifúngicos é usar esses agentes combinados. No momento, existem poucos antifúngicos no mercado, pertencentes a um limitado número de classes com diferentes mecanismos de ação, os quais podem não ser efetivos no tratamento devido ao aumento da resistência antimicrobiana. Apesar da necessidade urgente de novos antifúngicos e novas classes terapêuticas, uma estratégia terapêutica promissora pode ser utilizar antifúngicos combinados. De fato, uma das maiores vantagens em combinar antifúngicos é superar a resistência (BIDAUD et al., 2021).

A combinação de agentes antifúngicos pode, em alguns casos, melhorar a eficácia, aumentar o espectro de ação, e reduzir a duração do tratamento. Para o projeto racional de combinações de drogas antifúngicas como tratamento potencial de micoses invasivas, é necessário o estudo através de uma metodologia *in vitro* confiável que seja preditiva do resultado *in vivo* (BELLIO et al., 2021).

Os fármacos antifúngicos podem ser divididos em: fármacos sistêmicos (orais ou parenterais) para infecções sistêmicas, fármacos orais para infecções mucocutâneas e fármacos tópicos para infecções mucocutâneas (KATZUNG, 2017).

1.2.1 Anfotericina B (AMB)

A AMB é um macrolídeo poliênico, formado por um anel macrolídeo, com uma cadeia com 7 ligações duplas conjugadas (cadeia poliênica) e uma cadeia com 7 hidroxilas livres (cadeia poli-hidroxilada) que lhe conferem comportamento anfipático. A molécula de AMB é mostrada na figura 2.

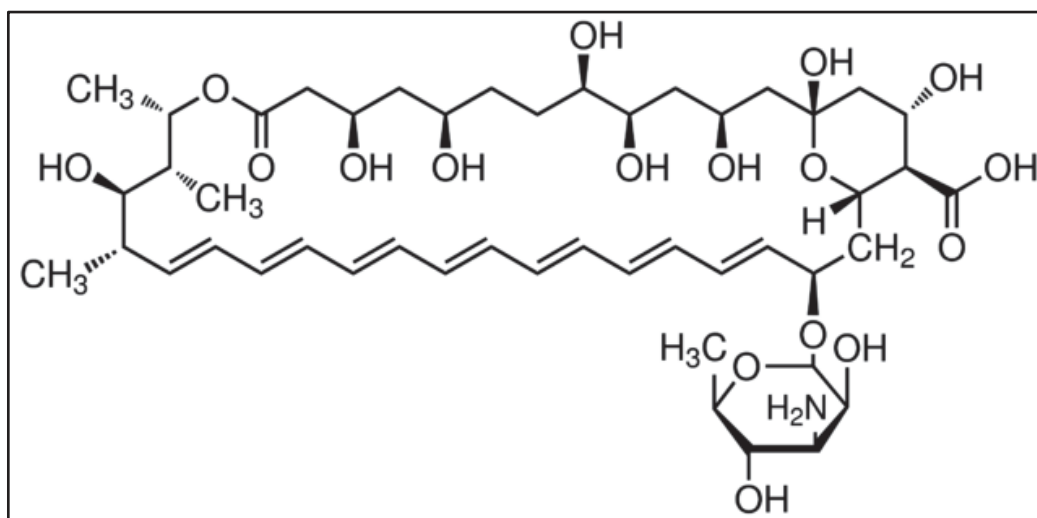
As regiões hidrofóbica poliênica e hidrofílica poli-hidroxilada de AMB estão dispostas ao longo do eixo longitudinal da molécula, enquanto uma cabeça polar contendo uma unidade de açúcar, comumente chamada de unidade de micosamina, é fixada em uma das extremidades. Tanto a amina da micosamina quanto o ácido carboxílico encontram-se ionizados em pH fisiológico, com pKa de 10 e 5.5, respectivamente (BRANCO FILIPPIN; CANES SOUZA, 2006).

O comportamento anfotérico que dá nome ao fármaco provém da presença de um grupo carboxila no anel principal e o grupo amino primário da unidade de micosamina, que conferem hidrossolubilidade em valores extremos de pH (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

A AMB é fungistática (reduz a taxa de crescimento de fungos) ou fungicida (mata fungos) dependendo de sua concentração nos fluidos corporais e da suscetibilidade do fungo ao medicamento, e possui atividade clínica útil contra *Candida spp.*

Extensas pesquisas foram realizadas para determinação do mecanismo de ação da AMB, droga utilizada no tratamento das infecções fúngicas desde a década de 1950. A atividade da AMB envolve sua ligação irreversível ao ergosterol (principal esteroide componente da membrana plasmática das células fúngicas), onde 4 a 12 moléculas de AMB se organizam formando um poro transmembrana, que altera a permeabilidade da membrana e permite o extravasamento de componentes celulares, com subsequente morte celular (DONG et al., 2021; PASQUALOTTO, 2010; VOLMER; SZPILMAN; CARREIRA, 2010).

Figura 2 – Molécula de AMB



Fonte: sigmaldrich.com

A seletividade da AMB para o ergosterol quando comparado ao colesterol da membrana plasmática dos mamíferos é explicada em parte pela maior afinidade do ergosterol em formar ligações do tipo van der Waals com a cadeia heptaênica rígida da molécula de AMB. Entretanto, a AMB retém alguma afinidade pelo colesterol – uma propriedade que desempenha um papel importante na toxicidade e efeitos adversos da AMB (BRAJTBURG; BOLARD, 1996; ZIELIŃSKA et al., 2016).

A resistência à AMB é pouco relatada na literatura, pois as mutações que levam a esse tipo de resistência trazem consequências à sobrevivência da levedura, diminuindo drasticamente sua tolerância a estresses externos e gerando defeitos na filamentação e invasão tecidual (SANTOS; VIEIRA, 2017). Entretanto, estudos (MARTEL et al., 2010; SHARMA et al., 2014) com *Candida albicans* sugerem que mutações na via de biossíntese do ergosterol podem levar à formação de esteróis alternativos na membrana plasmática das células fúngicas, que não têm afinidade pela AMB. Além disso, um tratamento anterior com medicamentos antifúngicos azólicos pode levar a diminuição da produção de ergosterol, gerando uma resistência secundária a AMB devido à menor oferta de sítio de ligação.

A AMB, entretanto, apresenta efeitos adversos que podem impedir seu uso mesmo na presença de infecção fúngica sistêmica grave. A nefrotoxicidade é o principal efeito colateral do uso crônico de mais de 35 mg/dia de AMB, um limite facilmente atingido em pacientes adultos, já que, em infecções disseminadas e/ou graves por *Candida*, as doses usuais de AMB variam de 0,4 a 0,6 mg/kg/dia por 4 semanas ou mais (MORALES-ALVAREZ, 2020).

1.2.2 Caspofungina (CFG)

A procura de produtos naturais de fermentação fúngica na década de 1970 levou à descoberta das equinocandinas, que constituem a classe mais nova de agentes antifúngicos aprovados para uso. Trata-se de grandes peptídeos cíclicos ligados a um ácido graxo de cadeia longa (KATZUNG, 2017), como mostra a figura 3.

A CFG e demais equinocandinas atuam na parede celular do fungo ao inibir a síntese de β -1,3-D-glucano. Mais especificamente, elas se ligam à β -1,3-D-glucano-sintetase, bloqueando a síntese de β -1,3-D-glucano, o qual, juntamente com a quitina, fornece integridade e forma a parede celular. Essa inibição resulta em ruptura da parede celular e morte do fungo, resultando, portanto, na atividade antifúngica da CFG contra *Candida spp* (VAN DAELE et al., 2019).

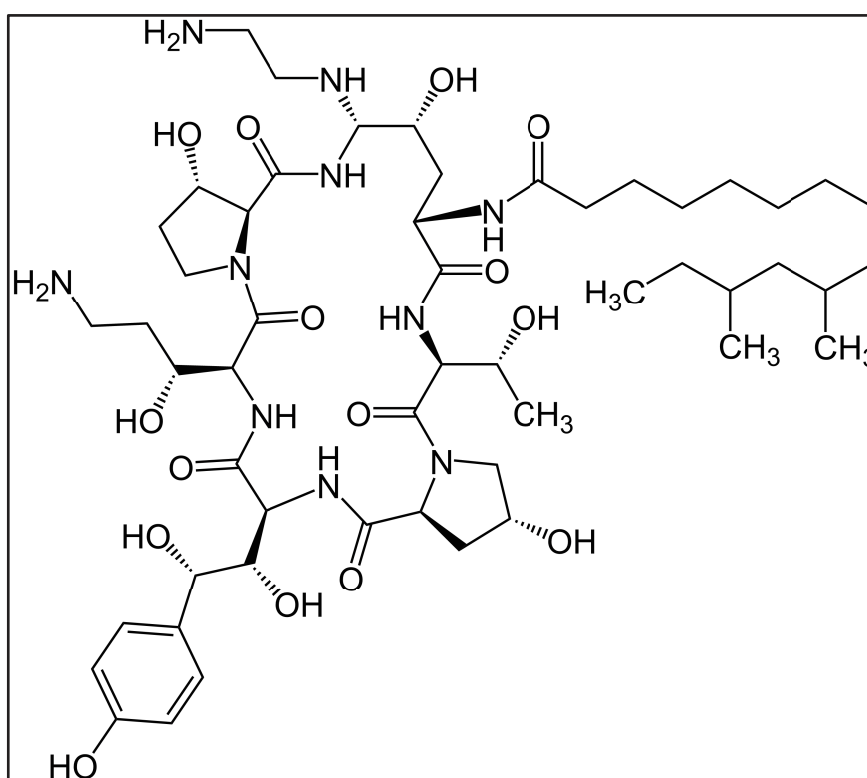
A CFG forma quatro ligações de hidrogênio com resíduos de aminoácidos no sítio ativo Pro642, Arg643, Leu644, e Asn64 (FARHADI; FARHADI; HASHEMIAN, 2020).

A β -1,3-D-glucano-sintetase não é encontrada em células de mamíferos, por isso a CFG apresenta baixa toxicidade para humanos (HOANG, 2001).

A CFG é considerada fungicida para espécies de *Candida*, exceto para *C. guilliermondii*, menos sensível e algumas amostras desta espécie sofrem ação apenas fungistática pela CFG (MARTINEZ, 2006).

Apesar de raros, há relatos de diminuição da susceptibilidade de *C. albicans* e *C. tropicalis* à CFG, relacionada principalmente à mutação no gene *FKS1* que codifica a enzima β -1,3-D-glucano-sintase (KHAN et al., 2018). Estas mutações aumentam o risco de falha terapêutica, e elevações nas concentrações inibitórias mínimas dos antifúngicos (SANTOS; VIEIRA, 2017).

Figura 3 – Molécula de CFG



Fonte: sigmaldrich.com

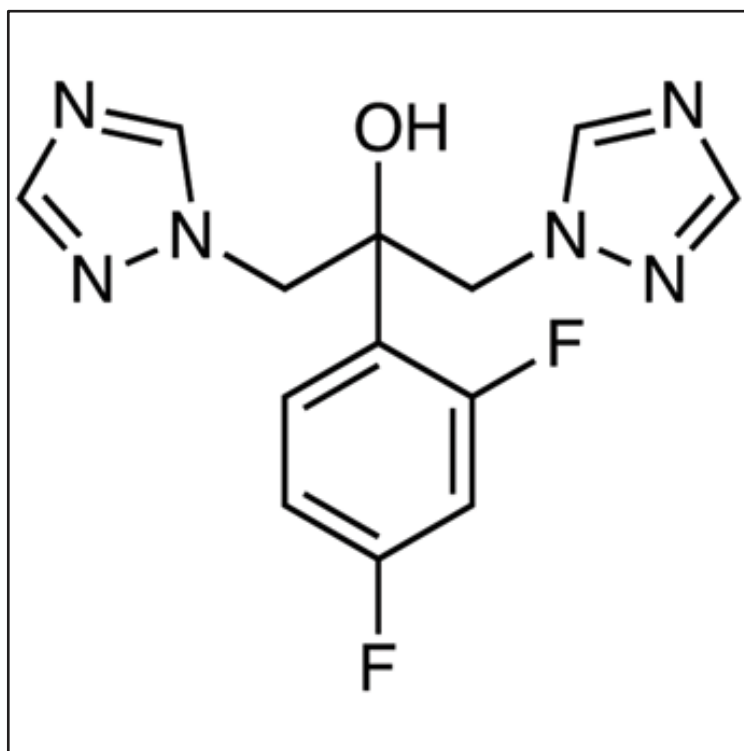
O uso prolongado de CFG em pacientes com candidíase refratária (casos em que o paciente não responde satisfatoriamente a diferentes esquemas de tratamento, em doses adequadas e por tempo suficiente) ou recorrente, também pode resultar no desenvolvimento de resistência (CAPPELLETY; EISELSTEIN-MCKITRICK, 2007).

1.2.3 Fluconazol (FZL)

A atividade antifúngica dos azóis, incluído o FZL, consiste na inibição de uma enzima microssômica do citocromo P450 (CYP), a 14 α -esterol desmetilase (CYP51) (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). A CYP51 é responsável por promover a conversão do lanosterol em ergosterol. Com a inibição da enzima, o precursor lanosterol é acumulado, sofrendo posteriormente a ação enzimática, gerando um esteroide tóxico para a célula, pois sua incorporação na membrana celular culmina com a desorganização da mesma, levando a alterações em sua fluidez, permeabilidade e integridade (SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

O FZL apresenta modo de ação fungistático, predominantemente inibindo o crescimento ao invés de levar à morte fúngica (HOPE et al., 2019).

Figura 4 – Molécula de FZL



Fonte: sigmaaldrich.com

O FZL atua na CYP451 principalmente através de uma ligação de coordenação de um dos átomos de nitrogênio dos anéis triazólicos com o átomo de ferro do grupo heme. Os outros átomos de nitrogênio contribuem através de uma ligação de hidrogênio com resíduos de aminoácidos (Phe126, Arg138 ou Gly307). O grupo difluorofenil pode formar uma

interação hidrofóbica com os resíduos Thr122 e Phe152 e, em outra conformação possível, o grupo hidroxil faz uma ligação de hidrogênio com His310 (IMAN; DAVOOD, 2014).

A resistência aos antifúngicos azóis ocorre através de múltiplos mecanismos, inclusive resistência cruzada (resistência simultânea aos antifúngicos pertencentes à mesma classe devido ao mesmo evento de mutação gênica) (FORASTIERO et al., 2013).

O mecanismo primário de resistência em *C. albicans*, entretanto, consiste no acúmulo de mutações no ERG11, o gene que codifica a 14- α -esterol desmetilase. Essas mutações protegem o grupo heme da ligação ao azol, porém permitem o acesso do substrato natural da enzima, o lanosterol (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). Estão sendo relatados números crescentes de linhagens resistentes, que até alguns anos atrás eram raras, sugerindo que o maior uso desses agentes para profilaxia e terapia pode estar selecionando linhagens resistentes aos fármacos (KATZUNG, 2017).

1.2.4 Prata

Desde a antiguidade, são atribuídas à prata e seus compostos diversas propriedades antimicrobianas, incluindo propriedades bactericidas, fungicidas e antissépticas (DE SOUZA et al., 2013). Nos anos 1940, a prata foi substituída com a introdução clínica dos antimicrobianos. Com o abuso destes ao longo dos anos e o subsequente desenvolvimento de resistência, a prata voltou a ser considerada, especialmente com o desenvolvimento da nanotecnologia.

Devido à maior facilidade de controle da toxicidade e menor custo de produção, se comparado ao metal bruto, as nanopartículas de prata (AgNP) vêm recebendo especial atenção por seu potencial inibitório frente a uma ampla variedade de microrganismos (LI et al., 2018), podendo efetivamente eliminar uma variedade de patógenos, mesmo em baixas concentrações, incluindo bactérias, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* (FILGUEIRAS, 2013); fungos, como *Aspergillus niger* e diversas espécies de *Candida* (MALLMANN et al., 2015); e vírus, como o da Hepatite B (LU et al., 2008) e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (LARA et al., 2010).

Além disso, alguns estudos mostram que AgNP apresentam atividade nematicida e anti-helmíntica (TOMAR; PREET, 2017), e mais recentemente, um estudo demonstrou que AgNP possuem alta eficiência *in vitro* contra SARS-CoV-2 (JEREMIAH et al., 2020).

Outras atividades biológicas das AgNP também vêm sendo exploradas, incluindo reparação de ferimentos e fraturas ósseas (LI et al., 2021b; MARSICH et al., 2013), aumento

de imunogenicidade de vacinas (XU et al., 2013) e efeitos antidiabéticos (SENGOTTAIYAN et al., 2016).

Enquanto a eficiência e eficácia da prata como agente antimicrobiano estejam bem estabelecidas, os múltiplos mecanismos de ação simultâneos permanecem sendo discutidos. É proposto que as AgNP se liguem à superfície da membrana celular e perturbem drasticamente funções como permeabilidade e respiração. Posteriormente penetram na célula e causam dano, possivelmente, ao interagir com os compostos de enxofre e fósforo presentes no DNA, também liberando íons prata dentro da célula, gerando estresse oxidativo, contribuindo para o efeito fungicida (DURÁN et al., 2019; MORONES et al., 2005).

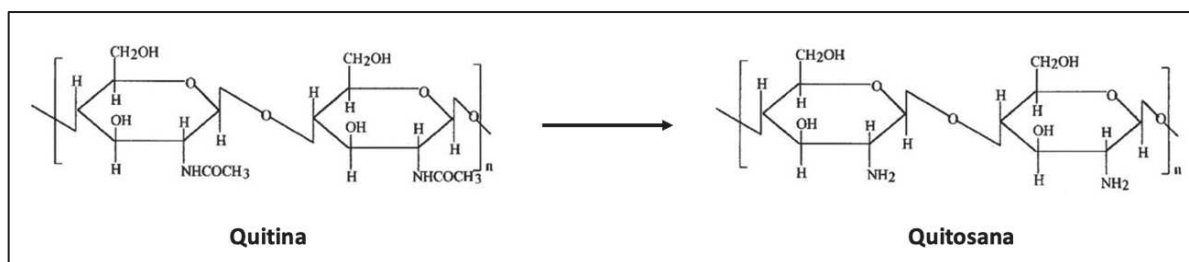
Adicionalmente, partículas metálicas com dimensões nanométricas (1-100 nm) apresentam propriedades físico-químicas diferentes de seus íons metálicos e metal bruto, o que leva a propriedades características importantes, como será discutido adiante.

1.2.5 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo catiônico produzido através da desacetilação da quitina (figura 5), um polissacarídeo polimérico encontrado no exoesqueleto de crustáceos e insetos, e na parede celular de alguns fungos. Mais comumente conhecida como suplemento alimentar com efeito hipocolesterêmico, a quitosana é um material biopolimérico amplamente utilizado por ser atóxica, exibir alta biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixo custo e excelente atividade biológica, inclusive atividades fungicidas e fungistáticas (LI et al., 2021^a). As aplicações de quitosana são geralmente dependentes do grau de desacetilação e peso molecular do polissacarídeo. Estudos sobre o assunto indicam que a quitosana de baixo peso molecular (QBPM) tem uma melhor atividade biológica e efeitos antimicrobianos e antifúngicos mais pronunciados quando comparadas aos polímeros de alto peso molecular (CZECHOWSKA-BISKUP et al., 2018; MATICA et al., 2019).

De acordo com a literatura, é proposto que sua natureza catiônica colabore para a atuação sobre a superfície da célula dos fungos, uma vez que suas cargas positivas podem interagir com os resíduos carregados negativamente das macromoléculas como lipopolissacarídeos e proteínas presentes na superfície das células fúngicas, causando alteração na permeabilidade da membrana celular e subsequente comprometimento de importantes vias metabólicas e atividade de enzimas promotoras de crescimento (COQUEIRO; DI PIERO, 2011). Como a quitosana apresenta carga positiva em valores de $\text{pH} \leq 6,0$, seu mecanismo antimicrobiano é pH-dependente.

Figura 5 – Processo de obtenção da quitosana a partir da desacetilação da quitina



Fonte: Desenvolvido pela autora (2022).

Além disso, a quitosana pode facilmente ser incorporada como estabilizante às suspensões coloidais de AgNP, gerando uma intensificação do efeito antimicrobiano por sinergia (FILGUEIRAS, 2013); além de ser útil como estratégia para prevenir o desenvolvimento de mecanismos de resistência, porque a probabilidade de desenvolvimento de várias mutações genéticas na mesma célula é baixa (SOUSA et al., 2020).

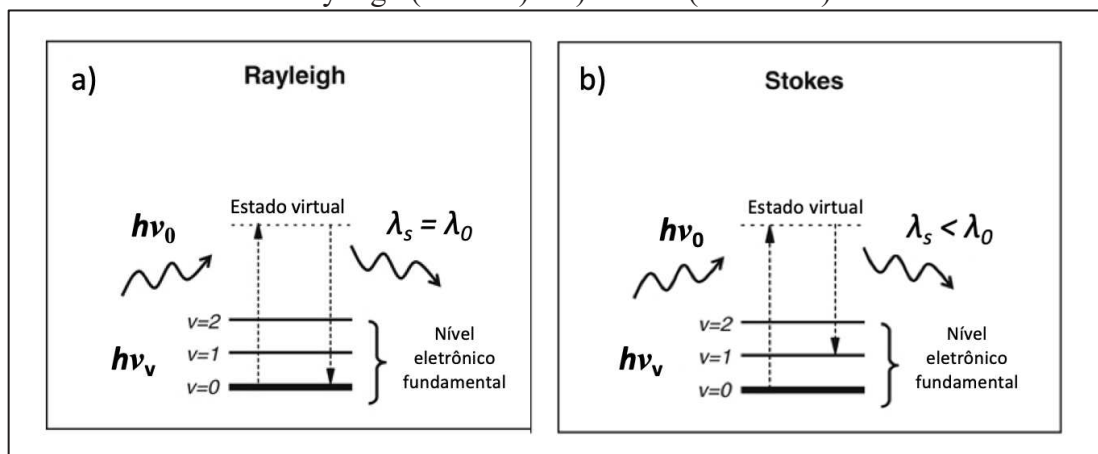
1.3 ESPECTROSCOPIAS RAMAN E SERS

O processo de espalhamento da luz pela matéria pode ser classificado em duas categorias:

a) Espalhamento elástico, ou Rayleigh (figura 6^a), onde os fótons incidentes e espalhados têm a mesma energia (ainda que tipicamente tenham uma direção e/ou polarização diferentes). Esse processo permite que a molécula ocupe o mesmo nível de energia após o espalhamento (não ocorre transferência de energia entre a molécula e o fóton), e, portanto, não é capaz de fornecer informações sobre a estrutura interna molecular;

b) Espalhamento inelástico (figura 6b), onde o fóton espalhado (λ_s) tem energia diferente do fóton incidente (λ_0). A diferença de energia ($h\nu_v$) corresponde a transição entre dois estados. No espalhamento inelástico Stokes da radiação monocromática, um pequeno número de fótons é espalhado com energia menor que a dos fótons incidentes. Uma das mais importantes formas de espalhamento inelástico em moléculas é o efeito Raman, ou espalhamento Raman, que envolve transições entre níveis vibracionais e/ou rotacionais.

Figura 6 – Diagrama de Jablonski simplificado representando esquematicamente os : a) Rayleigh (elástico) e b) Stokes (inelástico)



Fonte: Adaptado de (LE RU; ETCHEGOIN, 2009).

A espectroscopia Raman é baseada no efeito Raman, ambos nomeados em homenagem a Sir Chandrasekhara Venkata Raman (1888-1970), físico indiano conhecido por seu trabalho sobre o espalhamento da luz, que lhe conferiu, em 1930 o Prêmio Nobel em Física, tornando-se o primeiro asiático a receber tal premiação, em qualquer ramo da ciência.

Esse processo pode ser interpretado em termos de transferência de energia entre os fótons envolvidos no espalhamento inelástico e a molécula. Em outras palavras, um modo normal de vibração molecular é excitado quando a molécula absorve um quantum de energia. Cada modo normal vibracional envolve determinados movimentos onde variam as distâncias e ângulos de ligação entre os átomos e quando excitado leva à variação da polarizabilidade molecular. A intensidade do fenômeno varia com a frequência da radiação elevada à quarta potência. Assim, as propriedades estruturais de cada molécula podem ser identificadas ao detectar a mudança da energia do fóton, isto é, a frequência do modo vibracional que sofreu a transição, porque cada molécula tem o seu próprio espectro Raman particular (BAKER, 2012; HOU, 2014).

A espectroscopia Raman intensificada por superfície (SERS- do inglês *Surface-Enhanced Raman Scattering*) foi descoberta em um estudo que utilizou eletrodo de prata quimicamente ativado por ciclos de oxidação e redução do metal, que gerou uma superfície rugosa capaz de amplificar o sinal Raman da piridina em diversas ordens de grandeza quando em contato com este analito (FLEISCHMANN; HENDRA; MCQUILLAN, 1974). Posteriormente, descobriu-se que o uso de AgNP leva a uma diferença dramática de intensificações extremas no sinal Raman, da ordem de 10^3 a 10^6 , podendo chegar a 10^{14} , quando da detecção de uma única molécula (NIE; EMORY, 1997). Essas intensificações,

entretanto, não são decorrentes do aumento da área superficial do metal, e sim caracterizadas como consequência de um novo efeito, denominado SERS, que pode ser descrito pelo produto de dois mecanismos: o efeito químico, que não será abordado neste trabalho, e o efeito eletromagnético.

A teoria do efeito eletromagnético em SERS prevê que quando a radiação eletromagnética incide em metais (principalmente os de cunhagem, como ouro, prata e cobre), induz uma oscilação coletiva dos elétrons de condução da superfície, quando estes fótons estão em ressonância com essa transição eletrônica. Quando os estados de energia dos plásmons de superfície estão confinados em uma nanoestrutura muito menor que o comprimento de onda da luz incidente, como em uma AgNP, campos elétricos gigantes localizados ao redor da nanoestrutura são gerados pela transição ressonante do plásmon de superfície localizado (LSPR- do inglês *Localized Surface Plasmon Resonance*). O espaço intersticial entre duas nanopartículas, quando corretamente alinhado com o dipolo elétrico da radiação excitante, gera uma região de intensificação do campo elétrico ainda maior, chamada de *hot spot* (KOSUDA et al., 2019).

Além de ser atribuído ao efeito eletromagnético a maior contribuição para o efeito SERS, a transição LSPR também pode fornecer informações importantes sobre propriedades do sistema de nanopartículas através da espectroscopia UV-VIS-NIR, como arranjos, ambiente químico, dimensões e distância entre as nanopartículas metálicas. Nestes espectros de extinção, o desvio para a região do vermelho pode ser associado a substratos SERS-ativos com elevado desempenho, pela formação de *hot spots* (SANT'ANA; CORIO; TEMPERINI, 2006).

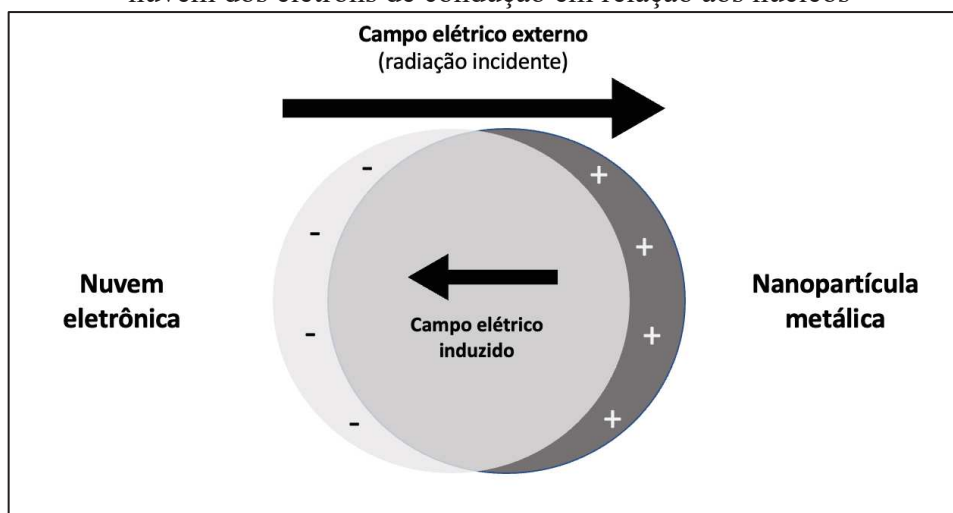
Cada vez mais amplamente utilizada na área de pesquisa biológica (ZONG et al., 2018), a espectroscopia SERS é uma técnica de análise de superfícies que mantém as informações ricas e únicas da espectroscopia Raman e que ganha relevância, neste estudo, ao permitir determinar a identidade e orientação dos sítios de interação dos antifúngicos com AgNP.

1.4 PROPRIEDADES ÓPTICAS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS PLASMÔNICAS

Quando uma nanopartícula metálica plasmônica quase esférica é irradiada pela luz, o campo elétrico oscilante leva os elétrons de condução a oscilarem coerentemente. A

frequência desta oscilação é determinada por quatro fatores: a densidade eletrônica, a massa eletrônica efetiva, a forma e o tamanho da distribuição da carga (KELLY et al., 2003).

Figura 7 – Esquema de oscilação plasmônica para uma esfera, mostrando o deslocamento da nuvem dos elétrons de condução em relação aos núcleos



Fonte: Desenvolvido pela autora (2022).

Plásmons de superfície são oscilações eletrônicas coletivas que ocorrem na superfície dos metais. Eles são significativamente menores em frequência e energia que os plásmons do *bulk*, e podem interagir, sob circunstâncias específicas, com a luz visível, em um fenômeno chamado Ressonância de Plásmon de Superfície (SPR – do inglês *Surface Plasmon Resonance*).

Os plásmons de superfície localizada (LSP – do inglês *Localized Surface Plasmon*) são oscilações eletrônicas coletivas em pequenos volumes, como nas superfícies de nanopartículas metálicas. Para a ocorrência do fenômeno da transição ressonante de plásmons de superfície localizada (LSPR – do inglês *Localized Surface Plasmon Resonance*), a partícula deve ser muito menor que o comprimento de onda da luz incidente, e então o campo elétrico da luz incidente é capaz de induzir um dipolo elétrico na partícula do metal.

A energia necessária para produzir LSPR depende de uma série de fatores como: tamanho, formato e composição das nanopartículas, bem como a composição do meio circundante. A interação da luz com as nanopartículas de metal esféricas pode ser descrita pela Teoria de Mie, que prediz, a partir do eletromagnetismo clássico qual fração da luz será absorvida ou espalhada ao colidir com nanopartículas coloidais de metal.

A soma da absorção e do espalhamento é a extinção da luz pelas nanopartículas. Isso é o fenômeno que de fato é medido em uma suspensão coloidal de metal em um espectrômetro

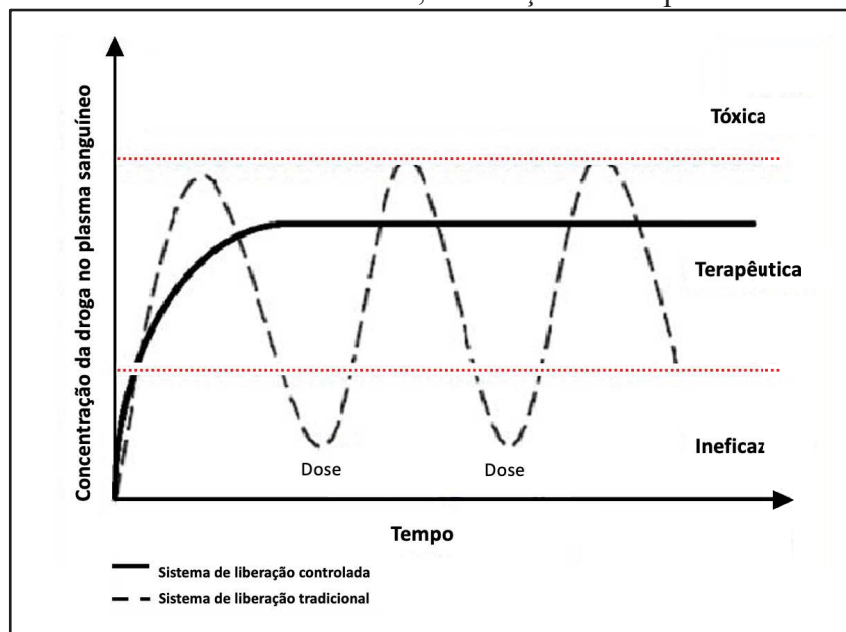
UV-VIS-NIR. De forma generalizada, à medida que o tamanho da nanopartícula aumenta, a frequência do plasma ressonante diminui, ou seja, a banda de transição LSPR é deslocada para comprimentos de onda maiores. Nanopartículas pequenas exibem extinções basicamente apenas devidas à absorção, enquanto nanopartículas maiores tendem a exibir espalhamentos muito mais significativos (CAMPBELL; XIA; BELBRUNO, 2007).

1.5 APLICAÇÕES BIOLÓGICAS

Nas formas de administração convencionais (como comprimidos ou injeções) após uma dose, a concentração da droga na corrente sanguínea aumenta, atinge um pico máximo e então declina, como pode ser visto na figura 8.

Cada droga possui uma faixa de concentração plasmática para a ação terapêutica, acima da qual há toxicidade e abaixo da qual a dose é ineficaz. Para muitas substâncias, a dose efetiva está próxima à dose tóxica, levando a um estreitamento da janela terapêutica que aumenta o risco de efeitos colaterais e indesejados (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). O objetivo de formas de liberação controlada é manter a concentração do fármaco entre estes dois níveis por um tempo prolongado, utilizando-se menos doses, levando a uma menor toxicidade.

Figura 8 – Perfil de variações nas concentrações plasmáticas de drogas administradas por diferentes métodos, em função do tempo



Fonte: Desenvolvido pela autora (2022).

Um Sistema de Entrega de Medicamentos (DDS – *Drug Delivery System*) é definido como uma formulação ou um dispositivo que permite a introdução de uma substância terapêutica no corpo e melhora sua eficácia e segurança, controlando a taxa, o tempo e o local de liberação dos medicamentos no corpo (BEGINES et al., 2020).

As AgNP têm sido empregadas em DDS devido à sua capacidade de alterar e melhorar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos fármacos. Isso se deve à sua capacidade de aumentar a solubilidade e estabilidade dos fármacos, permitir uma liberação controlada, a possibilidade de serem produzidas com tamanhos e formatos ajustáveis à necessidade e apresentar biocompatibilidade com tecidos e células, o que se reflete em uma melhora geral na eficiência terapêutica. Além disso, seu tamanho subcelular é compatível com uma injeção intravascular e sua alta área superficial é passível de modificação para que o fármaco seja liberado em um alvo específico, reduzindo os efeitos adversos sistêmicos e aumentando a adesão terapêutica, por meio da diminuição da dose usual e a frequência de administração (SOUSA et al., 2020).

Para que as AgNP sejam usadas em DDS, seu potencial citotóxico deve ser estudado de forma a garantir que não haja efeitos adversos ou toxicidade para o organismo do paciente em concentrações terapêuticamente aplicáveis (ION et al., 2019).

No caso de administração de AgNP em altas concentrações e sem qualquer tipo de modificador de superfície, as propriedades tóxicas de AgNP para o organismo do paciente frequentemente observadas envolvem a interação eletrostática com proteínas contendo tiol, incluindo glutatona, e enzimas essenciais ao mecanismo de defesa antioxidante da célula, o que leva ao aumento das espécies reativas de oxigênio, gerando dano oxidativo e apoptose, um processo conhecido como “morte celular programada” (IVANOVA et al., 2019).

Os mecanismos para melhorar a biocompatibilidade e diminuir tal mecanismo citotóxico incluem a funcionalização das nanopartículas metálicas com grupos polietilenoglicol, lipídios, e polímeros, como a quitosana (QURESHI, 2013).

A nanotecnologia tem se mostrado uma estratégia interessante para aumentar a potência e eficiência dos antifúngicos convencionais, possibilitar a diminuição da toxicidade e do custo, evitar uma degradação antecipada, melhorar a distribuição do fármaco, aumentando o tempo de circulação e melhorando a farmacocinética, e também para melhorar o direcionamento de drogas, com resultados promissores *in vitro* e *in vivo* (ASGHARI et al., 2016).

2 OBJETIVOS

Neste capítulo serão discriminadas a hipótese central a ser investigada neste trabalho, seguida das motivações e resultados que se pretendem alcançar através da pesquisa, bem como as etapas a serem cumpridas, de forma mais detalhada.

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Promover a associação dos antifúngicos FZL, CFG e AMB às AgNP modificadas com QBPM, e investigar o efeito dessa associação em espécies de fungos do gênero *Candida spp.* por ensaios de susceptibilidade *in vitro* e espectroscopia SERS.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar AgNP, modificadas com QBPM, em soluções aquosas e caracterizá-las por espectroscopia UV-VIS-NIR, espalhamento de luz dinâmico (DLS - do inglês, *Dynamic Light Scattering*) e potencial zeta (ζ);
- Estudar a adsorção dos fármacos na superfície da prata por espectroscopia SERS;
- Modificar as AgNP com os antifúngicos, modificadores de superfície e o marcador SERS cristal violeta (CV), para interação *in vitro* com os fungos e verificação dos possíveis efeitos sinérgicos através de ensaios de susceptibilidade, utilizando as leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis*.

3 PARTE EXPERIMENTAL

Este capítulo descreve o roteiro para a realização das análises, bem como a descrição dos materiais, equipamentos, reagentes e técnicas de caracterização utilizadas para realizar o experimento com suas devidas especificações.

3.1 REAGENTES

AMB, CFG e FZL (Sigma-Aldrich), CV (Sigma-Aldrich), Borohidreto de sódio (Fluka), Nitrato de prata (Sigma-Aldrich), Citrato trissódico (Sigma-Aldrich), QBPM (Sigma-Aldrich), Ácido acético glacial (Synth), Rodamina 6G (R6G) (Synth), Hidróxido de potássio (Synth), álcool isopropílico (Synth), 2-propanol (Synth), Ágar Sabouraud dextrose (Neogen), RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), cloreto de sódio (Proquímios), Tween 80 (Sigma-Aldrich).

A água deionizada Milli-Q esterilizada em autoclave a 121°C por 15 minutos foi utilizada em todos os preparos e sínteses.

Toda a vidraria utilizada foi limpa em solução de água régia (3 HCl : 1 HNO₃) e enxaguada abundantemente com água deionizada.

3.2 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Foram sintetizadas AgNP sem e com quitosana como modificador de superfície. As AgNP sintetizadas sem quitosana foram obtidas através do método de Creighton (CREIGHTON; BLATCHFORD; ALBRECHT, 1979), com modificações nas proporções molares, nas concentrações das soluções dos reagentes, bem como nas condições de temperatura, como descrito na tabela 1, a fim de buscar-se características ótimas de tamanho e LSPR.

Tabela 1 - Diferentes métodos utilizados para obtenção das AgNP

Método	Proporção volumétrica	Concentração	Condições de temperatura
	NaBH ₄ : AgNO ₃	NaBH ₄ : AgNO ₃ (mol L ⁻¹)	
AgNP I	3 : 1	2,0.10 ⁻³ : 1,0.10 ⁻³	Banho de gelo
AgNP II	3 : 1	2,0.10 ⁻³ : 1,0.10 ⁻³	Ambiente
AgNP III	6 : 1	2,0.10 ⁻³ : 1,0.10 ⁻³	Banho de gelo
AgNP IV	3 : 1	4,0.10 ⁻³ : 1,0.10 ⁻³	Banho de gelo

Fonte: Desenvolvido pela autora (2022).

Nota: A temperatura das soluções em condições ambientes, no dia da síntese, era de 24 °C, e no banho de gelo era de 8 °C.

As AgNP sintetizadas com quitosana (AgNP + QBPM) foram obtidas através do método descrito por Filgueiras (FILGUEIRAS, 2013), como se segue: Em um erlenmeyer com o exterior revestido com papel alumínio, 50 mL de AgNO₃ 2,1.10⁻³ mol. L⁻¹ são acrescidos de 1,0 mL de Na₃Cit 1,6.10⁻¹ mol. L⁻¹ e em seguida, a prata é reduzida pelo gotejamento de 0,5 mL de NaBH₄ 2,1.10⁻² mol. L⁻¹. Após isso, foram adicionados 5 ml de QBPM 0,2 g. L⁻¹. Todo o procedimento supracitado foi realizado em temperatura ambiente (23°C).

Como o pKa da QBPM é de 6,3; logo, um ajuste no pH do coloide é necessário para evitar a coagulação do polímero. Esse ajuste foi feito com a adição de 0,5 mL de ácido acético glacial 0,1 mol. L⁻¹ (SAINI et al., 2011).

Para os ensaios biológicos, 100 µL de CV 1,0.10⁻⁴ mol. L⁻¹ foram adicionados a cada mL de coloide. O CV é um corante também muito utilizado na espectroscopia SERS como molécula prova, por apresentar sinal SERS intenso e já conhecido. O CV apresenta também excelente capacidade fungicida *in vitro* contra *Candida* (MALEY; ARBISER, 2013).

3.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Em microbiologia, a esterilização de componentes sensíveis ao calor é frequentemente realizada por filtração. De acordo com a literatura (RAMAGE; WICKES, 2001), a filtração das soluções de FZL e CFG, bem como do meio de cultura RPMI 1640, deve ser feita com filtros de seringa com poros de 0.22µm. Já as soluções de AMB devem ser filtradas com

filtros de seringa com poros de 0.45µm. No presente estudo, a AMB já foi adquirida solubilizada e filtrada pelo fabricante.

A ação antifúngica foi avaliada contra as linhagens padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC) de *Candida albicans* (ATCC 18804) e *Candida tropicalis* (ATCC 750) pertencentes à coleção do Instituto de Ciências Biológicas da UFJF.

A escolha das concentrações utilizadas foi baseada no documento padronizado do CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2017).

Tabela 2 - Concentrações dos antifúngicos utilizadas nos testes biológicos

Antifúngico	Concentrações testadas (µg.mL ⁻¹)									
AMB	16	8	4	2 ^r	1 ^s	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031
CFG	8	4	2	1 ^r	0,5	0,25 ^s	0,125	0,062	0,031	0,015
FZL	64	32	16	8 ^r	4	2 ^s	1	0,5	0,25	0,125

Fonte: Desenvolvido pela autora (2022).

Nota: ^s = sensível- se concentrações iguais ou menores do antifúngico forem necessárias para obter-se o MIC, o fungo é considerado sensível ou suscetível ao antifúngico em questão, ^r = resistente- a partir do *breakpoint* indicado pelo CLSI, se concentrações iguais ou maiores do antifúngico forem necessárias para obter-se o MIC, o fungo é considerado resistente ao antifúngico em questão (ORASCH et al., 2014).

Para o preparo do inóculo (suspensão de células), as leveduras foram subcultivadas em Ágar Sabouraud Dextrose por 24 horas à temperatura de 35°C. O inóculo foi preparado dissolvendo-se uma alíquota desta cultura em 5,0 mL de solução salina 0,85% esterilizada, contendo 0,1% (vol./vol.) de Tween 80 (um surfactante não iônico, usado para tornar as preparações mais resistentes ao fluxo e retardar a sedimentação das partículas nas suspensões); até atingir a turbidez correspondente ao nível 0,5 da escala McFarland (padrão de turvação mais frequentemente utilizado nos laboratórios de microbiologia, para determinar a intensidade da multiplicação em meios de cultivo líquidos).

A suspensão foi então diluída em meio líquido RPMI 1640 na proporção de 1:50, obtendo-se uma suspensão com $5,0 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^3$ células mL⁻¹, a ser utilizada nos ensaios biológicos. Os controles de esterilidade foram feitos utilizando-se o meio RPMI 1640 puro, e os controles de crescimento utilizando-se o inóculo com o meio RPMI 1640.

Os ensaios biológicos foram realizados em capela de fluxo laminar, e todos os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C, exceto aqueles descartáveis que foram adquiridos já esterilizados pelo fabricante. A incubação é feita a 35°C, por 48 horas.

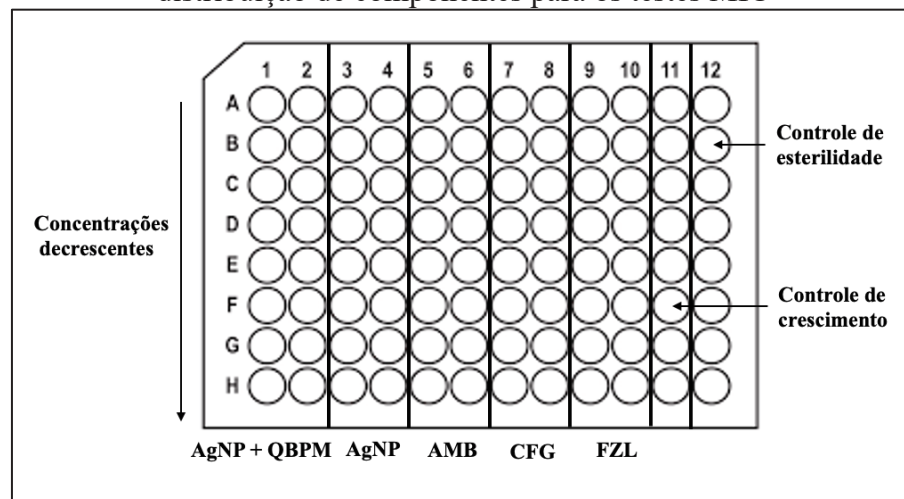
3.3.1 Ensaios para Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

A Concentração Inibitória Mínima (MIC – do inglês *Minimum Inhibitory Concentration*) é a menor concentração de um agente antimicrobiano que causa uma redução específica no crescimento visível de um microrganismo em um teste de suscetibilidade (CLSI, 2017). A magnitude da redução no crescimento visível é avaliada de acordo com a seguinte escala numérica: 0, opticamente límpido; 1, levemente turvo; 2, considerável ($\approx 50\%$) queda no crescimento visível; 3, leve redução no crescimento visível; e 4, sem redução no crescimento visível (Norma M38-A, 2002).

Para testes de susceptibilidade a antifúngicos, o ponto final, no caso, o MIC, usado para medir a atividade *in vitro* é dependente tanto do organismo em questão quanto do antifúngico usado. Para AMB contra leveduras, a MIC é lida como a menor concentração que resulta na inibição completa do crescimento (score 0) em testes de microdiluição em caldo. Para CFG e FZL contra leveduras, a MIC é lida na menor concentração que resulta em uma inibição de 50% (score 2) no crescimento, comparada com o controle de crescimento (CLSI, 2017; WIEDERHOLD, 2021).

No presente estudo, os testes MIC foram realizados em placas de microdiluição de 96 poços, com volume de trabalho de 200 μL . Nos poços de 1 a 10 foram distribuídas as diluições de coloide de AgNP, AgNP + QBPM, AMB, CFG e FZL, e nos poços 11 e 12 foram feitos os controles de crescimento (positivo) e esterilidade (negativo), respectivamente, como mostra a figura 9.

Figura 9 - Representação da placa de microdiluição em meio líquido e esquema de distribuição de componentes para os testes MIC



Fonte: Desenvolvido pela autora (2022).

Em cada poço foram adicionados 100 µL do agente antifúngico, e 100 µL de inóculo em RPMI 1640, exceto nos poços dedicados aos controles, onde foram usados 100 µL de RPMI 1640 e adicionados 100 µL de água para o controle negativo, e 100 µL de inóculo para o controle positivo.

3.3.2 Ensaio para Determinação da Concentração Inibitória Fracionária (FIC)

Quando duas ou mais drogas são combinadas e testadas simultaneamente, podem ocorrer diferentes efeitos: sinergia (quando um medicamento intensifica os efeitos de outro), adição (quando o efeito final de dois ou mais agentes é quantitativamente igual à soma dos efeitos produzidos individualmente), antagonismo (quando um medicamento diminui os efeitos de outro) ou indiferença (quando o mecanismo de ação de um medicamento não interfere no mecanismo de ação do outro)(GRAHAME-SMITH, 1992). Para avaliar o efeito das combinações, existem diversos métodos disponíveis.

O teste de sinergia antimicrobiana, ou ensaio *checkerboard* é um método experimental usado para avaliar a interação entre dois agentes antimicrobianos.

O índice de concentração inibitória fracionária (FICI – do inglês *Fractional Inhibitory Concentration index*) pode ser usado para determinar o efeito das combinações testadas. Para determinar o FICI, a concentração inibitória fracionada (FIC - do inglês *Fractional Inhibitory Concentration*) das duas drogas são somadas. Já a FIC é calculada pela divisão da MIC da droga sozinha e em combinação, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{FICI} = \text{FIC A} + \text{FIC B}$$

$$= \frac{\text{MIC do agente A em combinação}}{\text{MIC do agente A sozinho}} + \frac{\text{MIC do agente B em combinação}}{\text{MIC do agente B sozinho}}$$

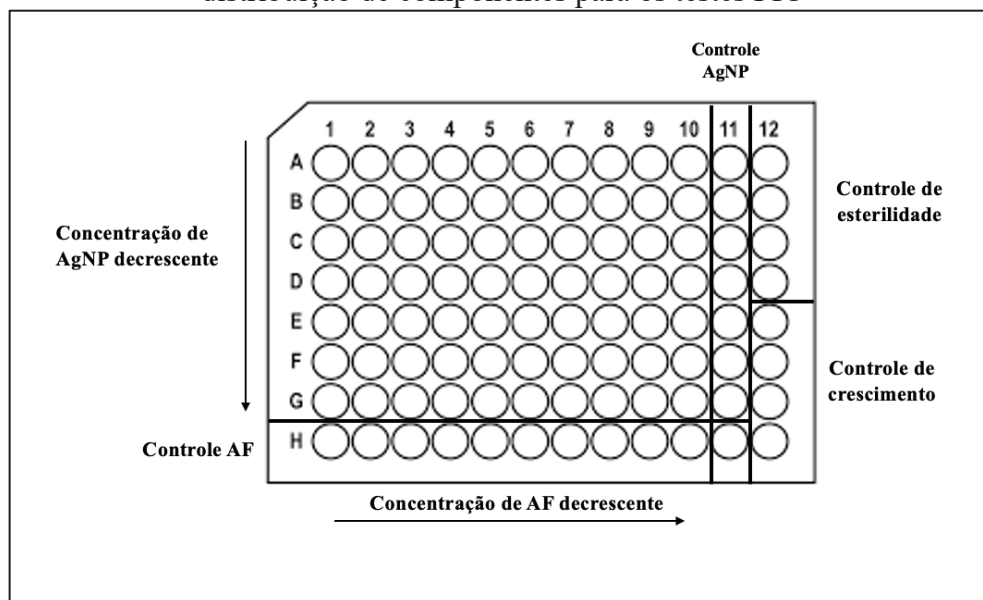
Onde o denominador são os valores de MIC dos antifúngicos A e B quando testados sozinhos, e o numerador são os valores de MIC dos antifúngicos A e B em combinação.

A recomendação para interpretar o FICI é: interação sinérgica quando $\text{FICI} \leq 0.5$, adição se $0.5 < \text{FICI} \leq 1.0$, indiferente se $4 \geq \text{FICI} > 1.0$ e antagonista se $\text{FICI} > 4$ (BIDAUD et al., 2021; MENESES, 2022).

No presente estudo, os testes FIC foram realizados em placas de microdiluição de 96 poços, com volume de trabalho de 200 µL. Nestes testes, cada AF foi testado contra cada linhagem em uma placa exclusiva. Nas colunas de 1 a 10 foram distribuídas as diluições de

coloide de AgNP e das soluções de AMB, CFG e FZL. A linha H foi reservada para o controle de AF, e a coluna 11 para o controle de AgNP. A linha 12 foi reservada para os controles positivo e negativo, como mostra a figura 10.

Figura 10 - Representação da placa de microdiluição em meio líquido e esquema de distribuição de componentes para os testes FIC



Fonte: Desenvolvido pela autora (2022).

Em cada poço foram adicionados 50 μ L de coloide, 50 μ L de AF, e 100 μ L de inóculo em RPMI 1640. Nos poços de controle de AF e controle de AgNP foram usados 100 μ L de cada. Nos poços dedicados aos controles positivo e negativo foram usados 100 μ L de RPMI 1640 e adicionados 100 μ L de água para o controle negativo, e 100 μ L de inóculo para o controle positivo.

3.3.3 Ensaio para Determinação da Concentração Fungicida Mínima (MFC)

De acordo com o CLSI, a concentração fungicida mínima (MFC – do inglês *Minimal Fungicidal Concentration*) é considerada a menor concentração da substância em que não há crescimento visível dos fungos em subcultura, ou ainda, a menor concentração capaz de produzir uma redução de crescimento de 99.9% comparado ao controle de crescimento. Além disso, o MFC também é capaz de fornecer informações sobre a atividade fungicida ou fungistática do agente: se MIC e MFC forem iguais, é considerado fungicida, mas se o MFC for maior que o MIC, logo o agente é fungistático (CLSI, 2008).

No presente estudo, os testes MFC foram realizados retirando-se uma alíquota de 100 μ L dos poços correspondentes aos testes supracitados.

Em seguida, cada alíquota foi subcultivada em ágar Sabouraud dextrose e incubada a 35 °C por 48h.

3.4 FILME DE ALUMÍNIO TRATADO

Os espectros SERS da CFG e AMB apresentam dificuldade em serem obtidos em função das estruturas moleculares desses antifúngicos possuírem grandes proporções de cadeias alifáticas, que possuem baixa polarizabilidade molecular.

A fim de contornar esse empecilho, buscou-se na literatura soluções suficientemente eficientes e de baixa complexidade, para a otimização dos espectros SERS, condizentes com a infraestrutura do laboratório e tempo hábil disponível para o estudo. Com esse objetivo, foi encontrado um estudo (JU et al., 2017) que utilizava um pequeno anel com diâmetro de 5 mm revestido com filme de alumínio como suporte para as amostras, maximizar a rugosidade na construção dos filmes utilizados na obtenção dos espectros.

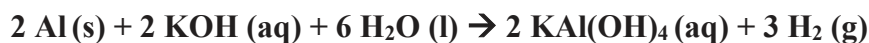
Estudos posteriores (BASU, 2017; HOU et al., 2018), mostraram que esses filmes de alumínio tratado foram adequados para obter-se essas nanoestruturas requeridas para a observação do efeito SERS. Comumente, outros métodos são utilizados para isso, como agregações induzidas e controladas das nanopartículas, deposição eletromagnética, deposição induzida por feixe de elétrons (EBID) litografia por nano impressão (NIL) e feixe de íons focalizado (FIB), entre tantas técnicas eficientes, porém muitas vezes de execução complexa e de alto custo (HOU et al., 2018).

O filme de alumínio de uso doméstico possui uma pureza de 98,5% a 99,9% (BASU, 2017), e baixo custo. Além disso, é um material de fácil acesso e que pode facilmente sofrer abrasão química. Com esse processo é gerada sobre o alumínio uma superfície áspera (em escalas micro e manométrica) aumentando também a superfície de contato do alumínio. Adicionalmente, os defeitos na rugosidade podem induzir a agregação controlada das AgNP formando *hot spots*, o que ajudaria a intensificar o sinal SERS (BASU, 2017). Após o tratamento, a parte fosca do filme de alumínio se torna mais áspera que a parte brilhante (HOU et al., 2018).

Os filmes de alumínio foram submetidos à abrasão química da seguinte forma: pedaços de aproximadamente 5x5 cm de papel alumínio foram limpos com acetona, a fim de retirar resíduos orgânicos; depois limpos com álcool isopropílico, para retirar resíduos de

gordura (HOU, 2014). Depois foram limpos com água deionizada e secos na estufa. Em seguida, foram tratados, com agitação, em solução aquosa de KOH, por 60 segundos, lavados com água deionizada e secos em estufa novamente.

O tratamento descrito acima é regido pela seguinte reação:



O filme de alumínio tratado (FAT) foi então usado para revestir o porta-amostras de plástico, que foi usado como suporte para as amostras líquidas de coloide de AgNPs associadas aos antifúngicos.

Para os testes preliminares com FAT, foram utilizados Rodamina 6G (R6G) e Cristal Violeta (CV).

3.5 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

As técnicas espectroscópicas envolvidas aqui são a Espectroscopia UV-VIS-NIR), a técnica do Espalhamento Dinâmico de Luz e a Espectroscopia Raman. Tais técnicas foram escolhidas no intuito de caracterizar as amostras de AgNP, modificadas com QBPM, em soluções aquosas.

Nesse sentido a escolha pela técnica espectroscópica se torna crucial para que se possa entender que tipo de interação ocorre entre a radiação e a matéria, e que tipo de informação pode ser obtida.

Na sequência estão descritas, detalhadamente, as técnicas espectroscópicas que se fizeram pertinentes à realização deste trabalho.

3.5.1 Espectroscopia UV-VIS-NIR

As suspensões coloidais de AgNP e as soluções de antifúngicos, bem como as associações dessas, foram analisadas utilizando um espectrômetro Ocean-Optics USB2000 operando na região de 200 a 1100 nm, com fontes de tungstênio e deutério. Utilizaram-se cubetas de quartzo de caminho óptico 5 mm, e água deionizada para o branco.

3.5.2. Espalhamento Dinâmico de Luz

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS – do inglês *Dynamic Light Scattering*) mede as flutuações dependentes do tempo, que surgem de partículas em solução sob movimento browniano. O coeficiente de difusão (facilidade com que um soluto em particular se move em um determinado solvente) e as informações sobre o tamanho das partículas podem ser obtidos a partir da análise dessas flutuações (KASZUBA et al., 2008).

O DLS é uma técnica para caracterização de tamanho de partículas ou moléculas em dispersões coloidais sob movimento browniano. O movimento aleatório das partículas faz com que o espalhamento varie com o tempo. O coeficiente de difusão (facilidade com que um soluto em particular se move em um determinado solvente) e as informações sobre o tamanho das partículas podem ser obtidos a partir da análise dessas flutuações. Dispersões de NP são frequentemente polidispersas, isto é, as partículas existem como uma distribuição de tamanhos e formatos ao invés de um único tamanho e forma.

O mesmo equipamento usado para caracterização do tamanho em dispersões coloidais também permite medir o potencial zeta (ζ), prática comum para determinar a carga superficial de partículas coloidais. O potencial ζ é a magnitude da repulsão ou da atração eletrostática entre as cargas das partículas, um dos parâmetros fundamentais que afetam a estabilidade da amostra (KASZUBA et al., 2008).

As medidas foram obtidas utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano e cubeta de quartzo para as medidas de tamanho e cubeta de poliestireno para as medidas de potencial ζ .

AgNP em suspensão são estabilizadas contra agregação por repulsão eletrostática, impedimento estérico, ou uma combinação de ambos. A repulsão eletrostática advém da carga superficial da AgNP. O valor de ζ para AgNP é influenciado pela química de superfície, concentração, tamanho, pH do meio, temperatura, solvente e força iônica. As AgNP normalmente estão estáveis em solução quando os valores do potencial ζ são maiores, em módulo, que 25 mV.

O índice de polidispersibilidade (PDI – *Polydispersity index*) é a medida de heterogeneidade de uma amostra, baseada no tamanho. A polidispersibilidade pode ocorrer devido a distribuição de tamanho em uma amostra, ou devido a agregação ou aglomeração da amostra durante a análise (MUDALIGE et al., 2018). De acordo com o Organização Internacional de Normalização (ISO - *International Organization for Standardization*), para valores de PDI < 0.4 a amostra é considerada homogênea, enquanto para valores > 0.4 a

amostra é considerada menos homogênea. Amostras heterogêneas apresentam $PdI \geq 1.0$ (ISO 22412:2017, 2017).

3.5.3 Espectroscopia Raman

Os espectros Raman foram obtidos utilizando um espectrômetro Raman Bruker-Senterra dispersivo, equipado com um detector CCD refrigerado termoeletricamente, acoplado a um microscópio Olympus com lentes objetivas de magnificação de curto alcance de 50 e 100 vezes, com linha de excitação do laser com comprimentos de onda de 632,8 e 785 nm, potência variando de 10 mW a 20 mW, e tempo de integração de 90 a 500 segundos; e um espectrômetro FT-Raman Bruker-RFS-100, equipado com um detector de germânio refrigerado por nitrogênio líquido, acoplado a um microscópio Olympus com lente objetiva de magnificação de longo alcance de 40 vezes com linha de excitação do laser Nd-YAG com comprimento de onda de 1064 nm e potência de 1000 mW. Os dados espectrais e figuras de mapeamento foram obtidos através do software Origin 2018.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão apresentados os resultados coletados durante o procedimento experimental, bem como as discussões levantadas. Para tanto, foram elaborados tabelas, ilustrações e espectros a fim de facilitar a compreensão dos dados, bem como a rápida interação e interpretação dos resultados.

4.1 ENSAIOS DE SUSCEPTIBILIDADE

Os ensaios de susceptibilidade foram realizados para os agentes antifúngicos isolados, e também em combinação, como indicado na tabela 3.

Tabela 3 - Resultados para os ensaios de susceptibilidade MIC, FIC e FICI

	<i>C. albicans</i> MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	<i>C. tropicalis</i> MIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	<i>C. albicans</i> FIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	<i>C. tropicalis</i> FIC ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
AMB	0,25	0,125		
CFG	< 0,016	< 0,016		
FZL	4	1		
AgNP	56	28		
AgNP + QBPM	3,5	3,5		
QBPM	275	550		
CV	3,07	6,14		
AMB /	0,03/0,87	0,12/0,87	0,12/0,25	0,24/0,25
AgNP + QBPM			FICI = 0,37	FICI = 0,49
CFG /	<0,016/0,87	<0,016/0,87	$\leq 1,0/0,25$	$\leq 1,0/0,25$
AgNP + QBPM			FICI $\leq 1,25$	FICI $\leq 1,25$
FZL /	0,25/0,87	0,5/0,87	0,06/0,25	0,5/0,25
AgNP + QBPM			FICI = 0,31	FICI = 0,75

Fonte: Desenvolvido pela autora (2022).

Para a AMB, os valores de MIC obtidos foram $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. albicans* e $0,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. tropicalis*.

Para CFG, os valores de MIC para *C. albicans* e *C. tropicalis* não puderam ser obtido, por estar abaixo dos valores sugeridos pelo CLSI. Valores abaixo de $0,016 \mu\text{g.mL}^{-1}$ devem ser testados, a fim de obter-se o MIC.

Para FZL, os valores de MIC obtidos foram $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. albicans* e $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. tropicalis*. Lembrando que, para FZL, os valores de MIC são referentes à concentração que inibe em 50% o crescimento da levedura, comparado com o controle de crescimento, por ser uma droga antifúngica fungistática.

De acordo com o CLSI, ambas as linhagens são susceptíveis aos antifúngicos testados, já que o MIC para AMB foi menor que $1,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, para CFG o MIC foi menor que $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e para FZL o MIC foi menor que $2,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Já *C. albicans* apresenta sensibilidade intermediária, ou dose-dependente, para FZL, já que o MIC foi estabelecido em $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

O MIC para AgNP foi $56 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. albicans* e $28 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para e *C. tropicalis*.

O MIC para a QBPM foi estabelecida em $275 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. albicans* e $550 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. tropicalis*. No coloide utilizado neste estudo, a concentração de QBPM é de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O MIC para a QBPM foi prevalentemente estabelecido entre 120 e $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para as espécies *albicans* e *tropicalis* em outros estudos (ALBURQUENQUE et al., 2010; TAYEL et al., 2010).

Já AgNP + QBPM apresentou melhor atividade antifúngica, com MIC de $3,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para ambas as leveduras, o que permite inferir um resultado de sinergia entre os dois agentes, que pode ser explicado em termos de ação simultânea em múltiplos alvos na célula fúngica, devido à atividade antifúngica intrínseca da QBPM, e também pelo aumento da estabilidade, evitando a agregação das AgNP, levando à melhor performance (JIA; SUN, 2021; KVITEK et al., 2011).

Além disso, também foi feito um ensaio de susceptibilidade para determinar o MIC do CV que, além das funcionalidades como marcador SERS, também possui atividade antifúngica.

Para o CV, o MIC foi estabelecido em $3,07 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. albicans* e $6,14 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. tropicalis*.

Nos ensaios realizados nesse trabalho, uma concentração de $0,025 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de CV foi adicionada ao coloide de AgNP + QBPM. Dessa maneira, pode-se afirmar que a concentração de CV era subinibitória e não contribuiu para o efeito antifúngico observado. Entretanto, em estudos futuros, podem ser usadas concentrações maiores de CV a fim de buscar-se um efeito de sinergia entre os agentes.

Também puderam ser realizados os ensaios de susceptibilidade FIC, e obter o valor de FICI.

Para AMB + (AgNP + QBPM) contra *C. albicans*, o FIC foi estabelecido em 0,12/0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e o FICI calculado em 0,37, o que caracteriza a associação como sinérgica.

Para AMB + (AgNP + QBPM) contra *C. tropicalis*, o FIC foi estabelecido em 0,24/0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e o FICI calculado em 0,49, o que caracteriza a associação como sinérgica.

Como dito anteriormente, para CFG, os valores de MIC para *C. albicans* e *C. tropicalis* não puderam ser obtidos e, portanto os valores de FIC e FICI também não puderam ser obtidos. Entretanto, pode-se fazer uma estimativa destes valores.

Para FZL + (AgNP + QBPM) contra *C. albicans*, o FIC foi estabelecido em 0,06/0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e o FICI calculado em 0,31, o que caracteriza a associação como sinérgica.

Para FZL + (AgNP + QBPM) contra *C. tropicalis*, o FIC foi estabelecido em 0,5/0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e o FICI calculado em 0,75, o que caracteriza a associação como promotora de um efeito de adição.

Este efeito observado nas associações com FZL merece destaque especial, pois em associação, o FZL passa a ter efeito fungicida, ao invés do efeito fungistático convencional do FZL isolado.

Um trabalho recente (ABED-ALWAHED; AL-BAQI, 2020) demonstrou que AgNP são capazes de diminuir a expressão do gene ERG11, responsável pela resistência ao FZL e demais antifúngicos azólicos. Dessa forma, AgNP podem ser usadas em linhagens resistentes ao FZL.

A tabela 4 apresenta os resultados MFC para as duas linhagens e os agentes antifúngicos testados.

Tabela 4 - Resultados dos testes MFC

Agente antifúngico	MFC ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>
AgNP ^a	>56	>56
AgNP + QBPM ^a	28	14
AMB	4	2
CFG	1	1
FZL ^b	16	32
AMB / AgNP + QBPM	0,06/0,87	0,03/0,87
CFG / AgNP + QBPM	>0,016/0,87	>0,016/0,87
FZL / AgNP + QBPM	0,25/0,87	0,5/0,87

Fonte: Desenvolvido pela autora (2022).

Nota: a) concentrações relativas à massa de prata; b) concentração mínima ativa.

Para AgNP, não foi possível determinar o MFC, já que todas as concentrações testadas falharam em inibir o crescimento de ambas as linhagens fúngicas, e o MFC se manteve maior que $56 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para ambas as leveduras.

Para AgNP + QBPM o MFC foi estabelecido em $28 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *C. albicans* e $14 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *C. tropicalis*, confirmando melhor atividade antifúngica pelo efeito sinérgico da associação.

Para as associações de AMB/AgNP + QBPM, o MFC foi estabelecido em $0,06/0,87 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *C. albicans*, e $0,03/0,87 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *C. tropicalis*.

Para as associações de CFG/AgNP + QBPM, o MFC foi estabelecido em $>0,016/0,87 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Para as associações de FZL/AgNP + QBPM, o MFC foi estabelecido em $0,25/0,87 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *C. albicans*, e $0,5/0,87 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *C. tropicalis*, demonstrando que houve, de fato, efeito fungicida.

Convém esclarecer que, devido à falta de padronização do método de obtenção de AgNP e a grande dependência da ação antimicrobiana com a distribuição de tamanhos, ainda não existem *breakpoints* satisfatórios em seus valores de MFC para espécies de *Candida* (MENESES, 2022).

4.2 ESPECTROSCOPIA UV-VIS-NIR

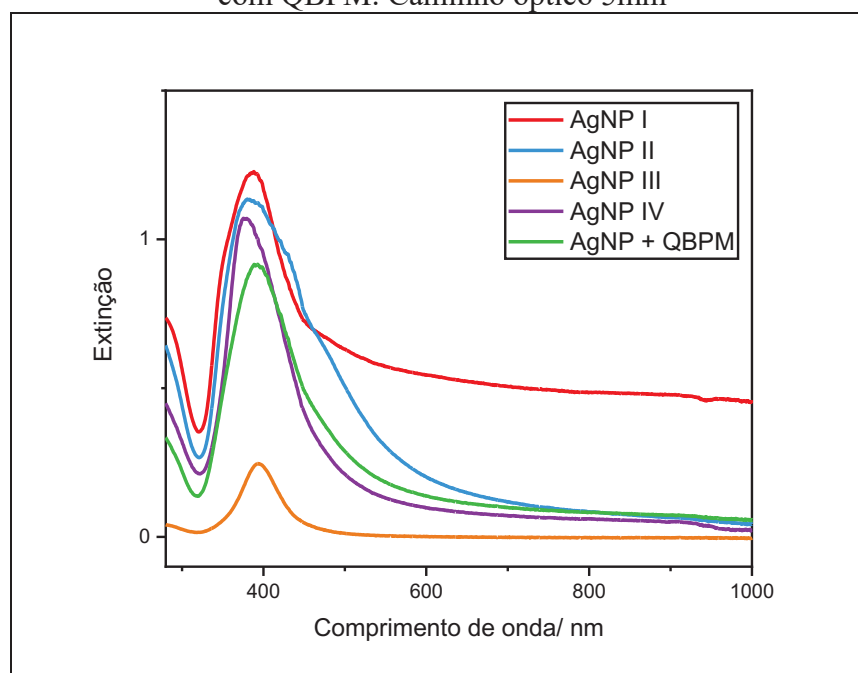
A figura 11 apresenta os espectros de extinção das suspensões aquosas das AgNP sintetizadas.

Os cinco métodos de síntese testados apresentaram máximo na banda LSPR semelhantes, com variações entre 375 e 393 nm.

Nas sínteses AgNP I, AgNP II e AgNP III, entretanto, é possível notar uma distribuição de tamanhos mais larga devida às agregações nas nanopartículas, caracterizada pelo alargamento da banda e não foram, portanto, utilizadas nos demais testes desse trabalho.

A AgNP IV apresentou distribuições de tamanhos mais estreitas, com máximo de absorção em 390 nm e pequena absorção na região do vermelho do espectro de extinção, padrão espectral esse característico de AgNP pequenas e adequadas para a realização dos testes biológicos (FILGUEIRAS, 2013).

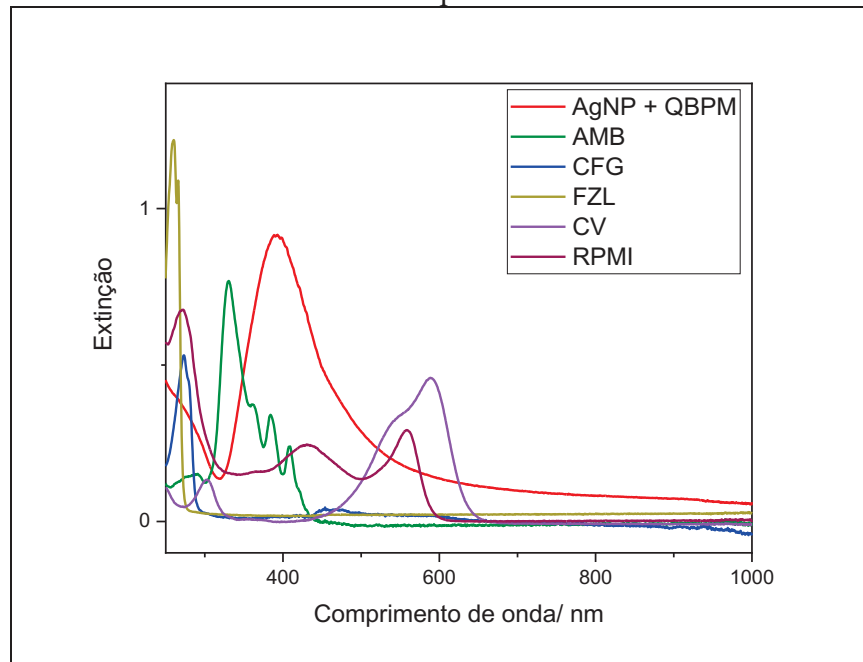
Figura 11- Espectro de extinção dos coloides de AgNP preparados sob diferentes métodos, e com QBPM. Caminho óptico 5mm



Fonte: Desenvolvido pela autora (2022).

A suspensão das AgNP + QBPM apresentou extinção na região do vermelho e do infravermelho próximo, que permitiu a ressonância com as radiações excitantes com comprimento de onda $\lambda_0 = 632,8$ nm utilizadas nos experimentos SERS. A figura 12 apresenta os espectros de extinção das soluções de AgNP + QBPM, AMB, CFG, FZL, CV e RPMI.

Figura 12 - Espectros de extinção das soluções de AgNP + QBPM ($56 \mu\text{g. mL}^{-1}$), AMB* ($250 \mu\text{g. mL}^{-1}$), CFG* ($28 \mu\text{g. mL}^{-1}$), FZL ($128 \mu\text{g. mL}^{-1}$), CV ($0,4 \text{ g.L}^{-1}$) e RPMI 1640 ($10,4 \text{ g.L}^{-1}$).
Caminho óptico 5 mm

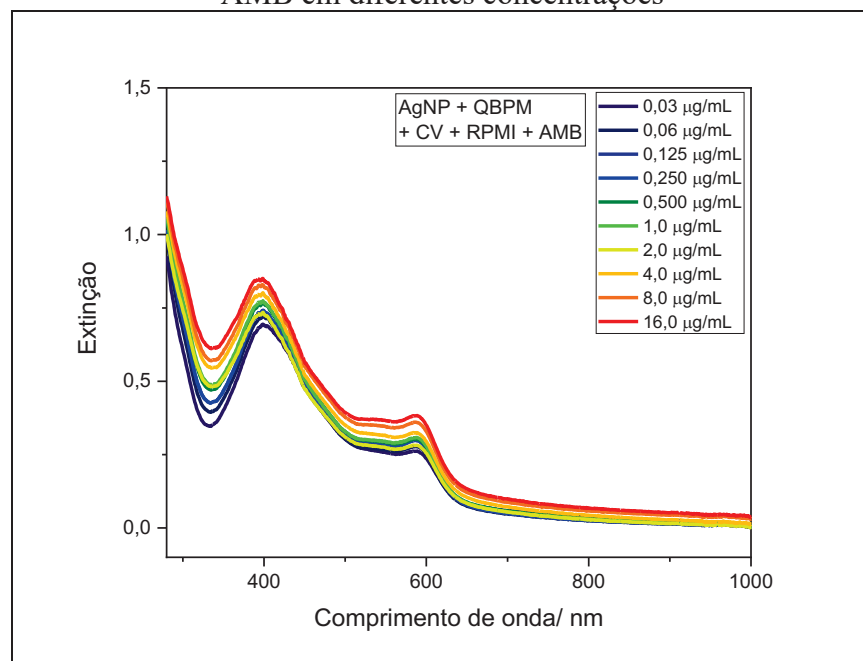


Fonte: Desenvolvido pela autora (2022).

Nota: *Resultados de extinção multiplicados por três, para melhor visualização.

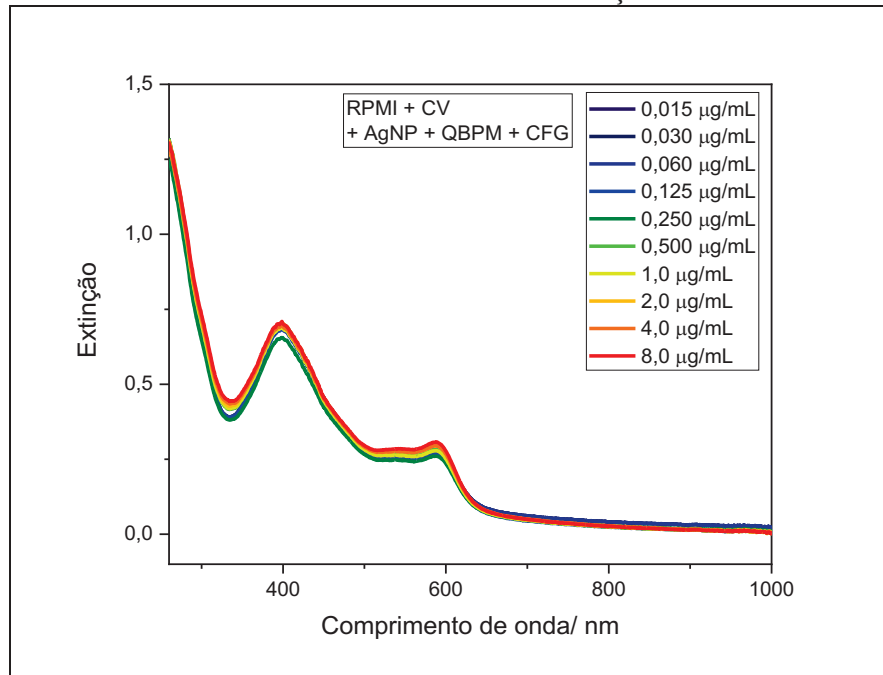
Nas figuras 13, 14 e 15 são apresentados os espectros de extinção das suspensões utilizadas nos testes biológicos com diferentes concentrações de antifúngicos.

Figura 13 - Espectro de extinção coloide AgNP + QBPM, adicionado de CV, RPMI 1640 e AMB em diferentes concentrações



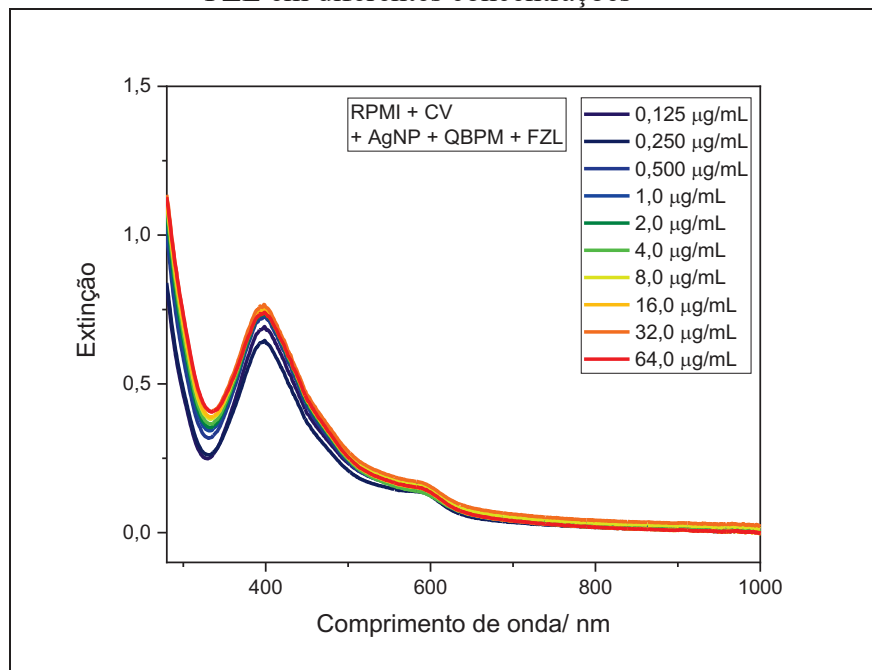
Fonte: Desenvolvido pela autora (2022).

Figura 14 - Espectro de extinção coloidal AgNP + QBPM, adicionado de CV, RPMI 1640 e CFG em diferentes concentrações



Fonte: Desenvolvido pela autora (2022).

Figura 15 - Espectro de extinção coloidal AgNP + QBPM, adicionado de CV, RPMI 1640 e FZL em diferentes concentrações



Fonte: Desenvolvido pela autora (2022).

Através dos espectros de extinção apresentados nas figuras 12 a 15 pode-se concluir que a adição dos fármacos às suspensões aquosas de AgNP, em todas as concentrações

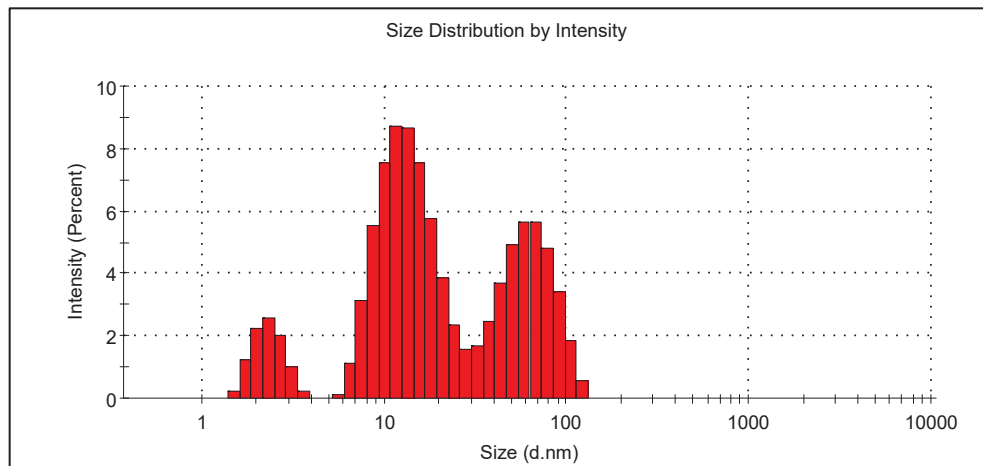
utilizadas nos experimentos biológicos e em meio RPMI 1640, contendo QBPM e CV, não levou à mudança significativa nos padrões espectrais, preservando as distribuições de tamanho.

Nestes espectros foram utilizadas as mesmas concentrações e a mesma suspensão de AgNP + QBPM que foram preparadas para as medições SERS.

4.3 MEDIDAS DE TAMANHO E POTENCIAL ζ POR DLS

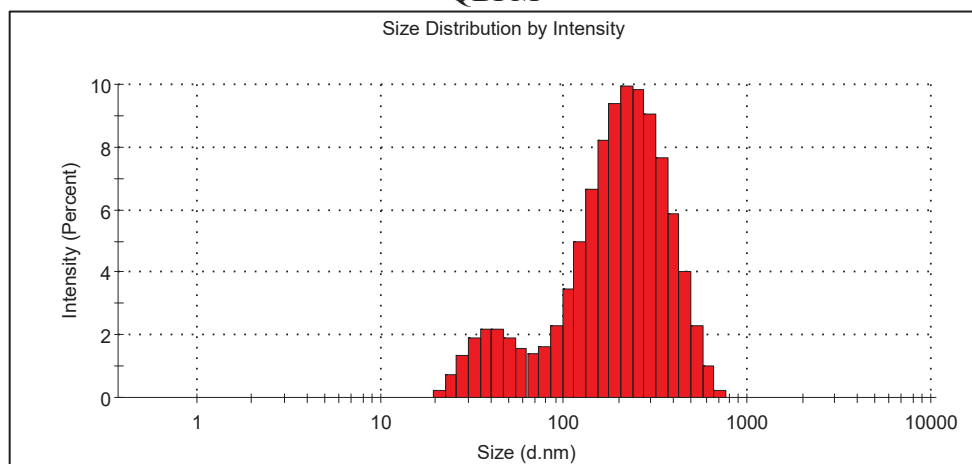
Os valores obtidos para as medidas de tamanho e potencial ζ são mostrados nas figuras 16 a 19, e na tabela 5.

Figura 16 - Histograma da distribuição de tamanhos por intensidade para o colóide AgNP



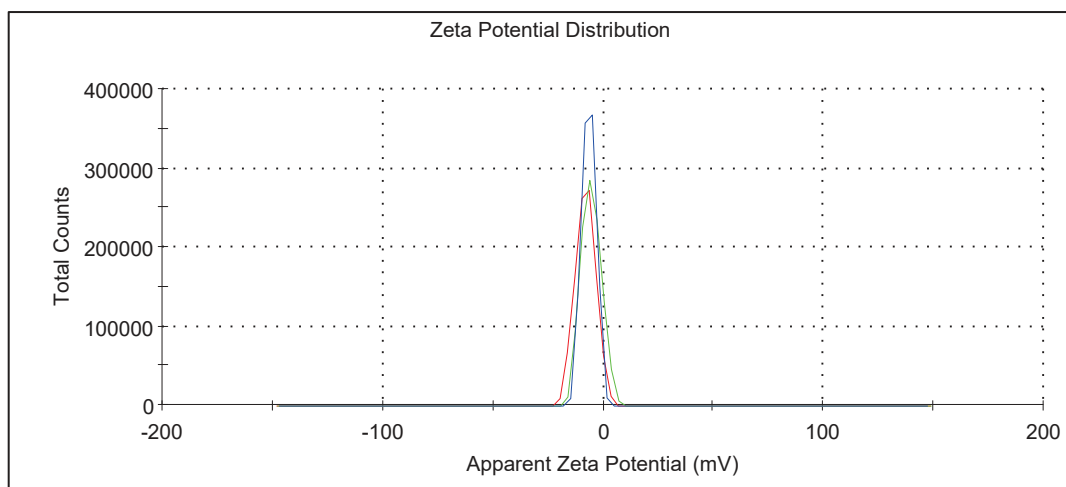
Fonte: Desenvolvido pela autora (2022).

Figura 17- Histograma da distribuição de tamanhos por intensidade para o colóide AgNP + QBPM



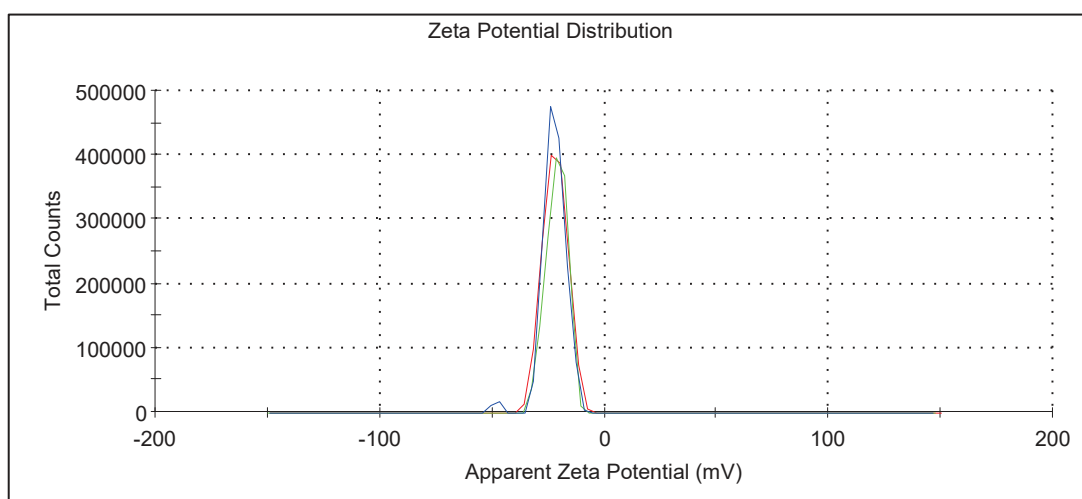
Fonte: Desenvolvido pela autora (2022).

Figura 18 - Distribuição de potencial ζ para o colóide AgNP, em triplicata



Fonte: Desenvolvido pela autora (2022).

Figura 19 - Distribuição de potencial ζ para o colóide AgNP + QBPM, em triplicata



Fonte: Desenvolvido pela autora (2022)

Tabela 5 - Valores obtidos através da técnica de DLS para os colóides

AgNP e AgNP + QBPM

Amostra	Tamanho (d.nm)	PdI	Potencial ζ (mW)
AgNP	35,35	0,123	-8,01
AgNP + QBPM	121,9	0,501	-22

Fonte: Desenvolvido pela autora (2022).

A AgNP apresentou potencial zeta de -8,01 mW, já associada a QBPM o potencial aumentou (em módulo) para -22mW, demonstrando o aumento da estabilidade da AgNP ao

ser associada com a QBPM. Ambos os coloides utilizados nas medidas apresentavam pH igual a 5,0.

A AgNP apresentou tamanho médio de 35,3 d.nm, com PDI de 0,123, tamanho que se adapta ao intervalo entre 25 e 40 nm, considerado ideal para uso em ensaios envolvendo a atividade antifúngica das AgNP (KVITEK et al., 2011).

A suspensão de AgNP + QBPM apresentou tamanho médio de 121,9 d.nm com PDI de 0,501, resultado que é esperado devido às dimensões desse polímero.

O histograma obtido para os resultados de distribuição de tamanho de AgNP tem três máximos, indicando três distribuições com tamanhos médios de 2,5 nm, 10,5 nm e 60 nm. Para AgNP + QBPM existem apenas duas distribuições, com máximos em 40 e 200 nm, demonstrando uma distribuição mais uniforme de tamanhos.

4.4 RAMAN E SERS

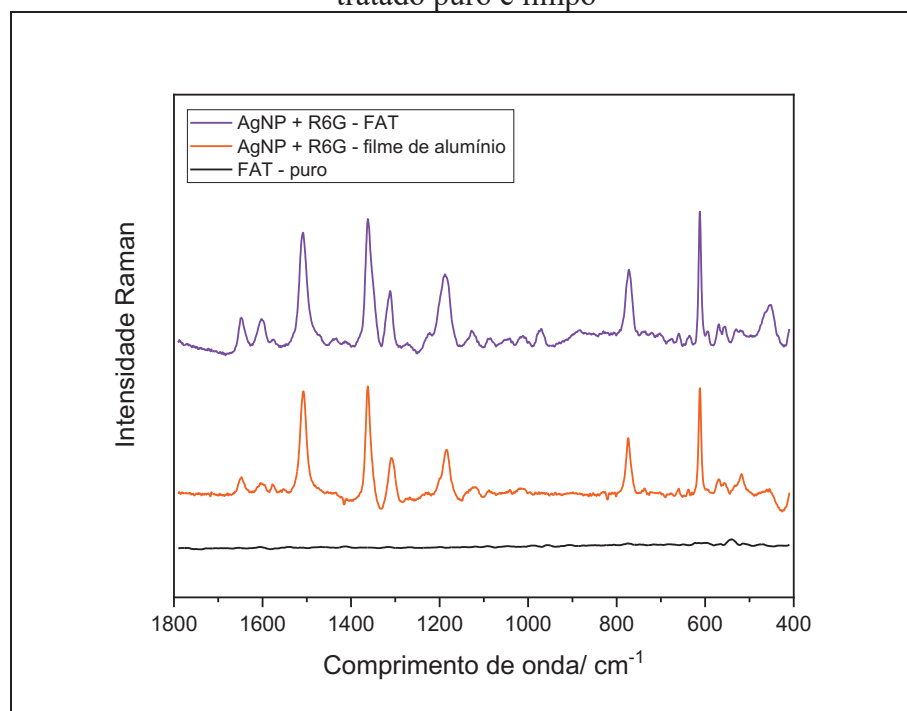
Para uma análise espectral em superfície metálica as espectroscopias Raman e SERS destacam-se como técnica crucial e, portanto, foram aqui utilizadas para obter as informações estruturais das análises necessárias à pesquisa.

4.4.1. Espectros SERS da R6G

A R6G é um corante amplamente utilizado em experimentos SERS, por ser quimicamente estável e de fácil detecção. Sua fórmula molecular é $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$.

A R6G foi utilizada como molécula de prova da eficiência da utilização do FAT na intensificação do sinal SERS. Na figura 9 pode-se observar melhora na definição e na intensidade dos picos da R6G com o uso de FAT, comparado com o uso de papel alumínio sem tratamento. Também pode ser visto que o FAT não produz sinal na região do espectro, garantindo que não haja interferência deste no sinal da amostra. Adicionalmente, o FAT evitou que o sinal do porta-amostras interferisse na análise dos espectros.

Figura 20 - Espectros SERS da R6G obtidos em suspensão AgNP ($\lambda_0=785$ nm, 10 mW, 5 condições de 10 segundos) depositada sobre porta-amostra de plástico revestido com papel alumínio tratado, sobre papel alumínio sem tratamento, e espectro Raman do papel alumínio tratado puro e limpo



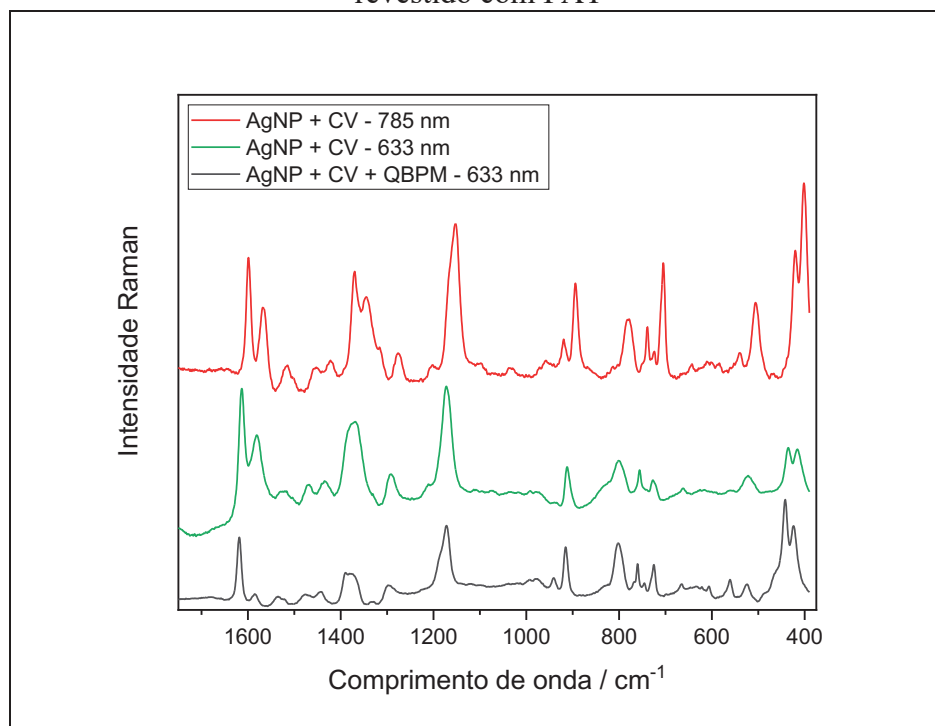
Fonte: Desenvolvido pela autora (2022).

4.4.2. Espectros SERS do CV

Quando uma espécie molecular interagindo com a AgNP possui transição eletrônica com energia em ressonância com a radiação excitante utilizada, além do efeito SERS, ocorre intensificação por Raman ressonante, denominado efeito SERRS (*Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering*) (SANT'ANA; CORIO; TEMPERINI, 2006), como no caso da AgNP + CV quando excitado em 632,8 nm.

A partir dos resultados obtidos na figura 10, pode-se observar que a associação da solução de CV com a suspensão de AgNP permitiu o registro do espectro SERS do CV também quando excitado em 785 nm e que a QBPM não agregou as AgNP de maneira que impedisse a observação do sinal SERRS do CV com excitação em 632,8 nm.

Figura 21 - Espectros SERS do CV associado a AgNP ($\lambda_0=785$ nm) e SERRS do CV associado à AgNP, com e sem QBPM ($\lambda_0=632,8$ nm) depositada sobre porta-amostras revestido com FAT

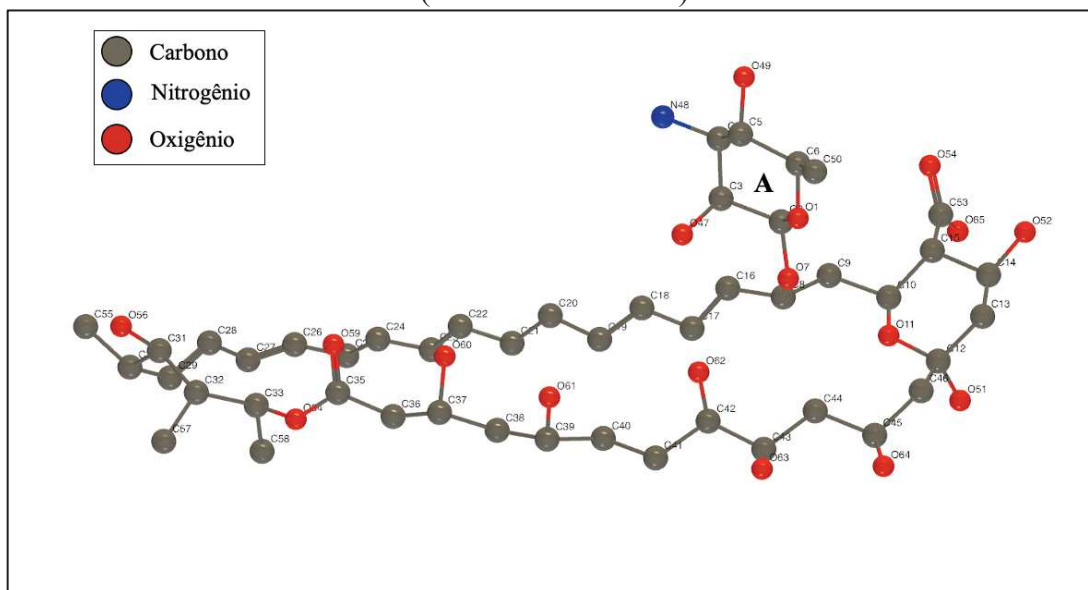


Fonte: Desenvolvido pela autora (2022).

4.4.3 Espectros SERS da AMB

A figura 22 apresenta a molécula de AMB com seus átomos numerados. As informações mais importantes sobre a interação da AMB com AgNP estão na região observada entre 1500 e 1800 cm^{-1} , que contempla as principais vibrações dos grupos $-\text{NH}_3^+$, $-\text{COO}^-$, $\text{C}=\text{C}$ e $\text{C}=\text{O}$.

Figura 22 - Estrutura conformacional calculada no vácuo para a molécula de AMB (software: Drawmol)



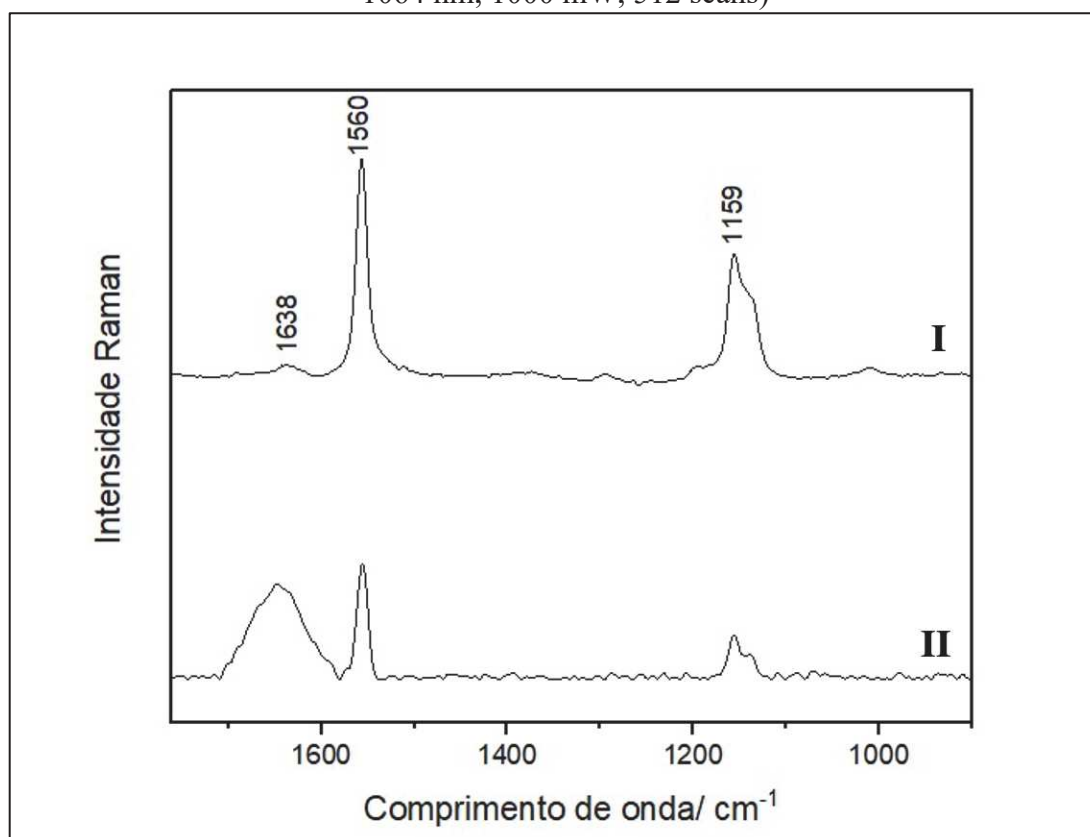
Fonte: Desenvolvido pela autora (2022).

Nota: Cadeia poliênica: C¹⁷ a C²⁷; A: resíduo de micosamina; porção carboxílica: C⁵³O⁵⁴O⁶⁵; cadeia de polióis: C³⁶C⁴⁵.

Pelo que pode ser observado no espectro SERS, e pela atribuição proposta na tabela 4, pode-se inferir que as moléculas da AMB se encontram adsorvidas na superfície metálica pela cabeça polar que abrange o resíduo A e a porção carboxílica. Isso significa que a superfície metálica é coberta por uma monocamada de moléculas de AMB. A pequena banda observada em 1007 cm⁻¹ demonstra que a possibilidade de ancoragem feita por hidroxilas localizadas ao longo da cadeia de polióis não pode ser excluída.

Um ponto importante observado é que a cadeia poliênica não interage significativamente com a AgNP, como pode ser visto pela pequena contribuição em 1638 cm⁻¹, pois essa porção da molécula participa da ligação com o ergosterol da membrana celular fúngica que leva à formação do canal transmembrana responsável pela ação antifúngica de AMB.

Figura 23 - I) Espectro SERS da AMB ($250 \mu\text{g. mL}^{-1}$) adsorvida na superfície das AgNP ($\lambda_0 = 632,8 \text{ nm}$, 10 mW , 500 segundos) e II) Espectro Raman da AMB em solução aquosa ($\lambda_0 = 1064 \text{ nm}$, 1000 mW , 512 scans)



Fonte: Desenvolvido pela autora (2022).

Tabela 6 - atribuições de bandas de AMB

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
1638	$\nu \text{ C=C}$ na cadeia poliênica + $\nu_{\text{as}} \text{ C}^{35}\text{O}^{59}$
1560	$\nu_{\text{as}} \text{ C}^{53}\text{O}^{65}\text{O}^{54-} + \delta \text{ N}^{48+}$
1159	$\nu_{\text{as}} \text{ C}^2\text{O}^1 + \nu_{\text{as}} \text{ C}^8\text{O}^7\text{C}^2$
1007	$\delta \text{ CCH}$, $\gamma \text{ CH}$ e $\nu \text{ COH}$ na cadeia de polióis

Fonte: Desenvolvido pela autora (2022).

Nota: δ = deformação angular no plano, γ = deformação angular fora do plano, ν = estiramento, as = vibração assimétrica (GAGOS; ARCZEWSKA, 2011; TUTAJ et al., 2016).

Estes canais de moléculas de AMB são formados em células cuja membrana plasmática contém colesterol apenas em concentrações em que há a auto associação de 8 a 12

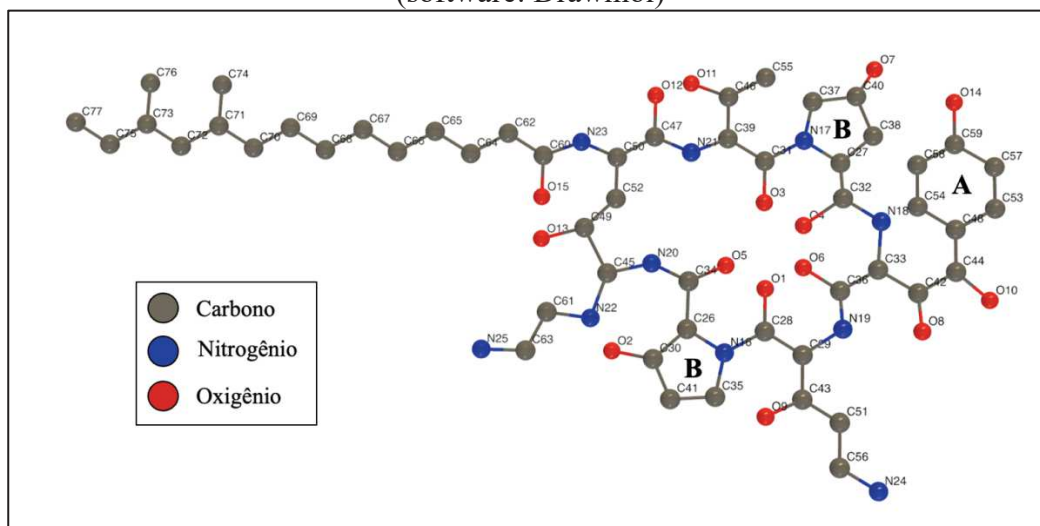
moléculas, enquanto em células contendo ergosterol, como as fúngicas, os canais são formados com a AMB ainda em formas oligoméricas (BRAJTBURG; BOLARD, 1996). Dessa forma, é postulado que a habilidade natural que a AMB possui para se arranjar espontaneamente governe sua toxicidade para humanos, logo, a imobilização de monômeros ou dímeros de AMB em um substrato metálico pode prevenir a formação de formas automontadas tóxicas de AMB e deslocar sua atividade na direção de se ligar ao ergosterol, enquanto sua toxicidade pode ser diminuída. (TUTAJ et al., 2016).

4.4.4 Espectros SERS da CFG

A molécula de CFG com seus átomos numerados é vista na figura 24.

A maior parte das bandas que possivelmente seriam observadas na CFG anidra tem sua visualização dificultada pelas bandas da água ao obtermos o espectro Raman de sua solução aquosa, como observado na Figura 25, principalmente na região acima de 1600 cm^{-1} , onde os estiramentos O-H dos álcoois, do fenol e da água se sobrepõem, dificultando a interpretação do espectro.

Figura 24 - Estrutura conformacional calculada no vácuo para a molécula de CFG (software: Drawmol)



Fonte: Desenvolvido pela autora (2022).

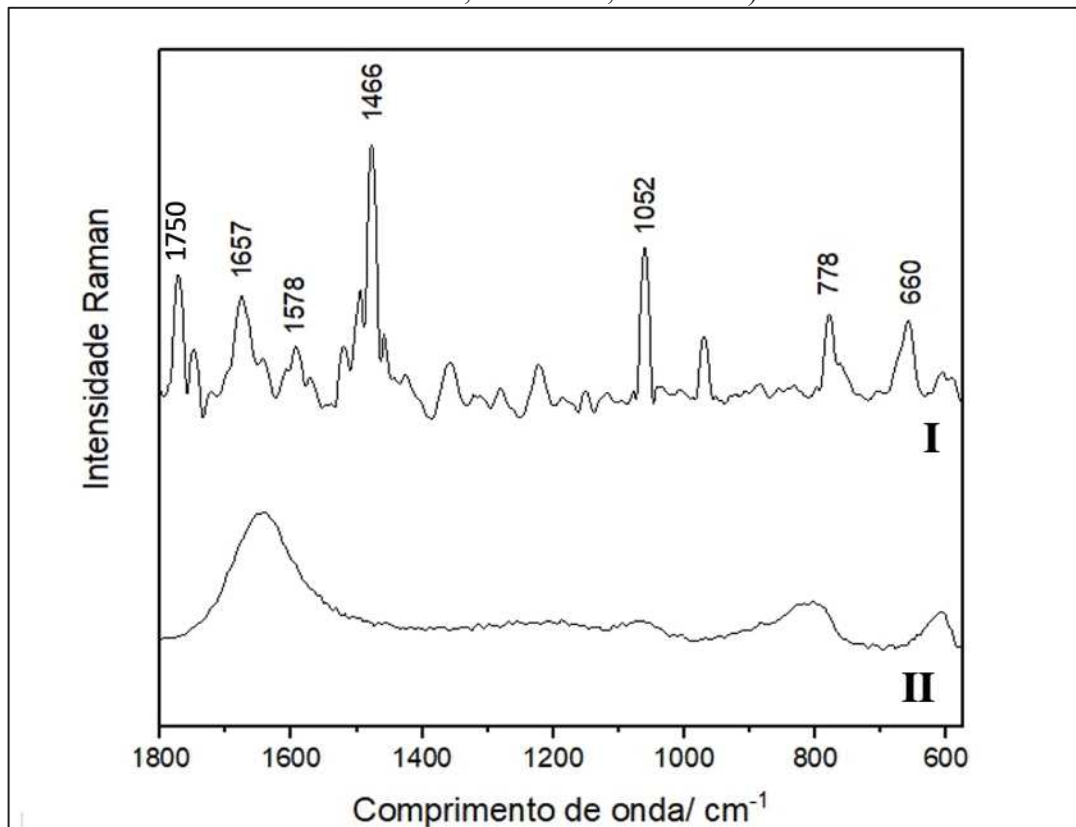
Nota: A: anel aromático fenólico; B: anel pirrolidínico.

Assim, outras regiões foram estudadas a fim de se contornar, dentro das limitações, o efeito da água no espectro da CFG, e estudar o efeito da conjugação desta com as AgNP através do espectro SERS.

Sabe-se que os oxigênios 9, 10, 15 e 12 interagem com a β -1,3-D-glucano-sintetase, no mecanismo responsável pela atividade antifúngica da CFG (FARHADI; FARHADI; HASHEMIAN, 2020). Os oxigênios 8 e 10 têm as atribuições ao estiramento C=O em 1727 cm^{-1} .

As bandas em 1750 e 1657 cm^{-1} , referente aos estiramentos C=O para os oxigênios numerados 1, 3, 4, 5, 6, 15 e 12, juntamente com a banda em 1578 cm^{-1} , referente aos estiramentos C-N-H para os nitrogênios numerados 16, 17, 18, 19, 20, 23 e 21, indicam que alguns desses grupos participam da interação da molécula de CFG com AgNP.

Figura 25 - I) Espectro SERS de CFG ($28 \mu\text{g. mL}^{-1}$), adsorvida na superfície das AgNP ($\lambda_0 = 632,8 \text{ nm}$, 20 mW, 750 segundos) e II) Espectro Raman de CFG em solução aquosa ($\lambda_0 = 1064 \text{ nm}$, 1000 mW, 512 scans)



Fonte: Desenvolvido pela autora (2022).

Tabela 7 - atribuições de bandas de CFG

Número de onda (cm ⁻¹)	Atribuição
1750	ν C=O
1657	ν C=O
1578	ν CNH
1466	(δ O ¹⁴ H + ν C ⁵⁹ O ¹⁴) no anel A + δ nos anéis B
1052	ν _s C ⁵⁹ O ¹⁴ H
778	γ OH + δ cadeia carbônica
660	γ NH ₂

Fonte: Desenvolvido pela autora (2022).

Nota: δ= deformação angular no plano, γ= deformação angular fora do plano, ν= estiramento, as= assimétrico, s= simétrico (LARKIN, 2011; SOCRATES, 1994).

Como são vários os átomos de oxigênio responsáveis por estas bandas, e pela baixa intensidade observada, é seguro considerar que a associação com AgNP não prejudica a ligação da CFG com os sítios alvo na parede celular fúngica.

As deformações nas cadeias carbônicas e nas hidroxilas, atribuídas à banda em 778 cm⁻¹, e nas aminas, em 660 cm⁻¹, também contribuem com a teoria de que várias partes da molécula de CFG contribuam para a interação com AgNP.

O espectro SERS indica, entretanto, que a maior contribuição é devida ao anel fenólico A, e aos anéis pirrolidínicos B, pelo que pode ser observado nas intensas bandas em 1466 e 1052 cm⁻¹.

4.4.5 Espectros SERS do FZL

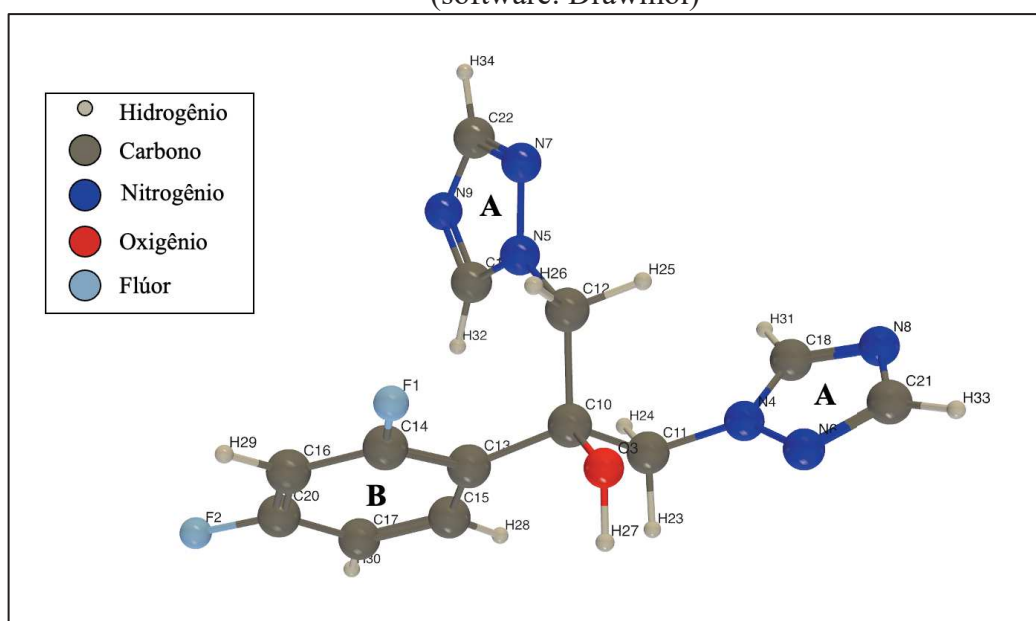
A figura 26 apresenta a molécula de FZL com seus átomos numerados.

Foi proposto na literatura (EL-BATAL; MOSALLAM; EL-SAYYAD, 2018) que a hidroxila O³H²⁷, o flúor F¹ do anel B e os nitrogênios N⁵, N⁷ e N⁶ dos anéis A são responsáveis pelo processo de associação da molécula de FZL às AgNP.

Essa teoria pode ser confirmada na figura 27, e através das atribuições para as bandas em 1014, 1078 e 1187 cm^{-1} . Uma contribuição dos grupos metil, observada em 1363 cm^{-1} também deve ser considerada.

Como comentado anteriormente, a parte fundamental do mecanismo de ação do FZL é devida à formação de uma ligação de coordenação covalente entre N^9 e um grupo heme na CYP51. Entretanto, a especificidade dessa ligação depende de outras interações entre a molécula de FZL e resíduos de aminoácidos no sítio ativo alvo.

Figura 26 - Estrutura conformacional calculada no vácuo para a molécula de FZL (software: Drawmol)



Fonte: Desenvolvido pela autora.

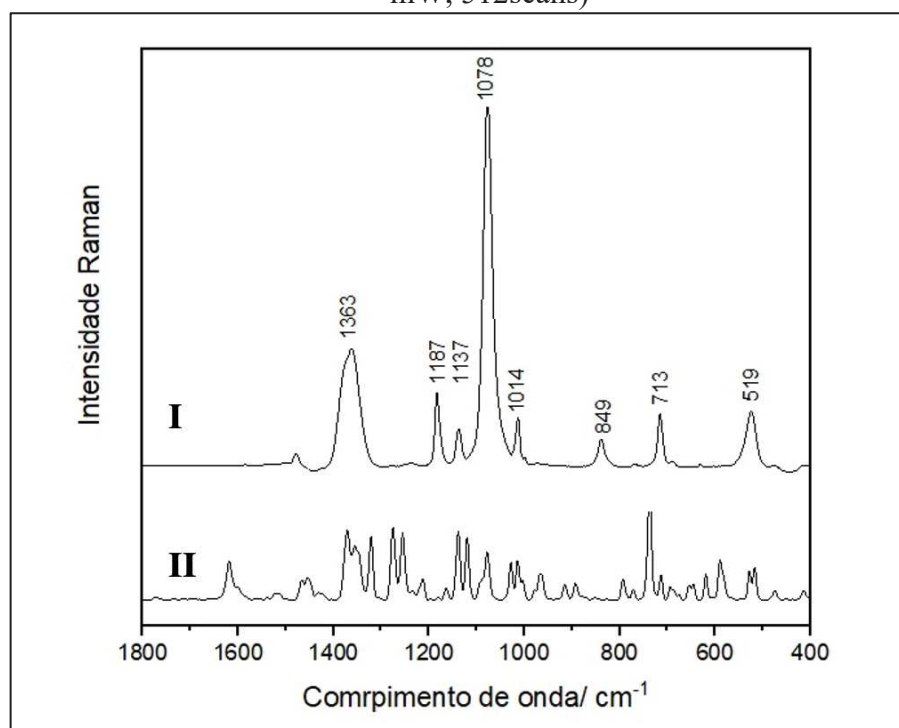
Nota: A: Anéis triazólicos; B: 2,4-difluorobenzil.

A partir dos espectros da figura 22, foi possível concluir que a principal banda relacionada aos modos de vibração de N^9 (1137 cm^{-1} , referente a vibrações $\text{H}^{23}\text{C}^1 \text{N}^9$) apresentam menos relevância em I, o que leva à conclusão de que o mecanismo antifúngico não foi prejudicado pela interação com AgNP.

Outra parte importante da molécula de FZL, envolvida na especificidade da ligação com CYP51 e com a diminuição da toxicidade para humanos é a interação entre F^2 e Phe152 (HONORATO-SIQUEIRA; MARTÍNEZ, 2020).

Também através da análise dos espectros da figura 22, pode-se observar que F^2 não interage significativamente com AgNP, já que suas principais bandas, em 588 cm^{-1} e 1253 cm^{-1} , atribuídas a deformação angular no plano e ao estiramento C^{20}F^2 , respectivamente, não são observadas em I.

Figura 27: I) Espectro SERS de FZL ($128 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), adsorvida na superfície das AgNP ($\lambda_0=633\text{nm}$, 10 mW, 90 segundos) e II) Espectro Raman de FZL sólido ($\lambda_0=1064$, 1000 mW, 512scans)



Fonte: Desenvolvido pela autora.

Tabela 8 - atribuições de bandas de FZL

Número de onda (cm^{-1})	Atribuição
1363	$\omega \text{H}^{26}\text{C}^{12}\text{H}^{25} \text{ e } \text{H}^{24}\text{C}^{11}\text{H}^{23}$
1187	$\nu \text{N}^5\text{-N}^7 + \delta \text{H}^{34}\text{C}^{22}\text{N}^7 \text{ e } \text{H}^{33}\text{C}^{21}\text{N}^8$
1137	$\delta \text{H}^{30}\text{C}^{17}\text{C}^{15} + \gamma \text{H}^{32}\text{C}^1\text{N}^9$
1078	$\nu \text{C}^{14}\text{F}^1 + \nu \text{C}^{10}\text{O}^3 + \delta \text{H}^{29}\text{C}^{16}\text{C}^{14}$
1014	$\delta \text{N}^6\text{C}^{21}\text{N}^8 + \delta \text{C}^{10}\text{O}^3\text{H}^{27}$
849	$\gamma \text{H}^{29}\text{C}^{16}\text{C}^{14}\text{C}^{13}$
713	$\delta \text{C}^{20}\text{C}^{17}\text{C}^{15}$
519	$\gamma \text{C}^{16}\text{C}^{20}\text{C}^{17}$

Fonte: Desenvolvido pela autora.

Nota: δ = deformação angular no plano, γ = deformação angular fora do plano, ν = estiramento, ω = wagging. (CHANDRASEKARAN; THILAK-KUMAR, 2015; CYR et al., 1996).

5 CONCLUSÕES

Através da espectroscopia UV-VIS-NIR foi possível monitorar as mudanças da banda LSPR na presença dos antifúngicos em diferentes concentrações, RPMI 1640 e CV, componentes usados nos testes biológicos, onde se observou que a estabilidade do colóide de AgNP + QBPM foi mantida.

O espectro SERS da AMB permitiu inferir que a adsorção na superfície da AgNP ocorreu principalmente através da região polar, que abrange o resíduo de micosamina, e em menor proporção pela porção carboxila e pela cadeia polihidroxilada. Os resultados dos testes MIC, FIC e FICI demonstraram o efeito de sinergia da associação de AMB/ AgNP + QBPM para ambas as linhagens.

O espectro SERS da CFG permitiu inferir que a adsorção ocorreu principalmente na superfície da AgNP através do anel aromático fenólico e pelos anéis pirrolidínicos. Os resultados dos testes MIC, FIC e FICI para a associação de CFG/ AgNP + QBPM para ambas as linhagens não pôde ser obtido, mas estimativas baseadas na atividade observada permitiram uma estimativa do efeito.

O espectro SERS do FZL permitiu inferir que a adsorção ocorreu na superfície da AgNP através de um anel triazólico, pelo anel 2,4-difluorobenzil e pela porção propanólica. Os resultados dos testes MIC, FIC e FICI demonstraram o efeito de adição para *C. tropicalis* e sinergia para *C. albicans*. Como o FZL isolado é categorizado como um medicamento fungistático, o efeito observado merece destaque especial, pois em associação, o FZL passa a ter efeito fungicida, resultado inédito que foi confirmado pelos testes MFC.

A espectroscopia SERS mostrou-se uma ferramenta importante para o estudo da interação dos medicamentos antifúngicos com a superfície de AgNP, sendo útil na avaliação da disponibilidade dos sítios ativos para a interação de ambos com a célula fúngica.

Dentre as perspectivas futuras deve-se destacar que os ensaios para determinação de MIC, FIC, FICI e MFC para CFG e CFG/ AgNP + QBPM devem ser repetidos.

A ação antifúngica da associação de AgNP + QBPM aos medicamentos estudados até o momento é motivadora para a realização testes *in vivo*.

Para isso, devem ser testados diferentes métodos de síntese de AgNP + QBPM a fim de avaliar a concentração ótima do modificador de superfície tanto para a performance das AgNP para a espectroscopia SERS quanto para a atividade antifúngica.

A microscopia eletrônica de varredura pode fornecer informações complementares valiosas acerca da estrutura da associação de AgNP + QBPM bem como sua interação com as células fúngicas.

Testar diferentes métodos de síntese de coloides e outros modificadores de superfície, como ácido mercaptobenzóico e polivinilpirrolidona.

Fazer a atribuição de bandas através de modelagem computacional, a fim de obter-se melhores informações sobre a interação dos medicamentos com a superfície de AgNP e resultados mais preditivos da ação das associações com as células fúngicas.

REFERÊNCIAS

- ABED-ALWAHED, F. R.; AL-BAQI, N. J. A. Effect of the silver nanoparticles on ERG11 expression in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates. **Plant Archives**. Baghdad, 2020.
- ALBURQUENQUE, C. et al. Antifungal activity of low molecular weight chitosan against clinical isolates of *Candida spp.* **Medical Mycology**. Santiago de Chile. Informa Healthcare, dez. 2010.
- ARASTEHFAR, A. et al. Antifungal susceptibility, genotyping, resistance mechanism, and clinical profile of *Candida tropicalis* blood isolates. **Medical Mycology**. Valencia, Spain, 2020a.
- ARASTEHFAR, A. et al. Covid-19-associated candidiasis (Cac): An underestimated complication in the absence of immunological predispositions? **Journal of Fungi**. Base IMDPI AG, 1 dez. 2020b.
- ARENAS GUZMÁN, R. **Micología Médica Ilustrada**. 5. ed. Ciudad de México: McGraw-Hill, 2014.
- ASGHARI, F. et al. Antifungal nanomaterials: synthesis, properties, and applications. **Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy**, 2016.
- BAKER, J. D. **Near Single-Molecule Sers-Based Detection Using Ultrafiltered, Unfunctionalized Silver Nanoparticles**. Dayton: [s.n.].
- BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Rio de Janeiro, 2010.
- BASU, S. **Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) Substrates and Probes**. [s.l: s.n.].
- BEGINES, B. et al. Polymeric nanoparticles for drug delivery: Recent developments and future prospects. **Nanomaterials** MDPI AG, 1 jul. 2020.
- BELLIO, P. et al. New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay. **MethodsX**, v. 8, 1 jan. 2021.
- BIDAUD, A. L. et al. Techniques for the assessment of in vitro and in vivo antifungal combinations. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 1–16, 1 fev. 2021.
- BRAJTBURG, J.; BOLARD, J. Carrier effects on biological activity of amphotericin B. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 4, p. 512–531, 1996.
- BRANCO FILIPPIN, F.; CANES SOUZA, L. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. [s.l: s.n.].

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da TERAPÊUTICA de Goodman & Gilman**. 11^a ed. [s.l.] McGraw Hill, 2012.

CAMPBELL, D. J.; XIA, Y.; BELBRUNO, J. J. Plasmons: Why Should We Care? **Journal of Chemical Education - In the Classroom** Hanover, 2007. Disponível em: www.JCE.DivCHED.org

CAPPELLETY, D.; EISELSTEIN-MCKITRICK, K. The echinocandins. **Pharmacotherapy**, v. 27, n. 3, p. 369–388, 2007.

CARDOSO, B. **Produção de biofilme e perfil de suscetibilidade a antifúngicos de isolados de Candida spp. em episódios de candidemia no Hospital das Clínicas da FMRP-USP**. [s.l.] Universidade Federal de São Paulo, 2017.

CARVALHAES, J. **Tópicos em Micologia Médica**. Rio de Janeiro: [s.n.].

CHANDRASEKARAN, K.; THILAK-KUMAR, R. Structural, spectral, thermodynamical, NLO, HOMO, LUMO and NBO analysis of fluconazole. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 150, p. 974–991, 29 jun. 2015.

CLSI. **M27-A3 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: www.clsi.org.
CLSI. **Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts - M60CLSI suplement M60**, 2017.

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. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283–312, 2013.

COQUEIRO, D. S. O.; DI PIERO, R. M. Atividade de quitosanas com diferentes pesos moleculares sobre *Alternaria solani*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 3, p. 459–463, 2011.

CREIGHTON, J. A.; BLATCHFORD, C. G.; ALBRECHT, M. G. Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. **Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics**, v. 75, p. 790–798, 1979.

CYR, T. D. et al. Spectral characterization of fluconazole. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 14, n. 3, p. 247–255, 1996.

CZECHOWSKA-BISKUP, R. et al. Procedure for determination of the molecular weight of Chitosan by viscometry. **Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives**, v. 23, p. 45–54, 2018.

DE SOUZA, G. D. et al. Silver: Brief history, properties and applications. **Educacion Quimica**, v. 24, n. 1, p. 14–16, 2013.

DONG, P. T. et al. Polarization-sensitive stimulated Raman scattering imaging resolves amphotericin B orientation in *Candida* membrane. **Science Advances**, v. 7, n. 2, p. 1–11, 2021.

DURÁN, N. et al. NANOTOXICOLOGIA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA: TOXICIDADE EM ANIMAIS E HUMANOS. **Química Nova**, v. 42, n. 2, p. 206–213, 2019.

EL-BATAL, A. I.; MOSALLAM, F. M.; EL-SAYYAD, G. S. Synthesis of Metallic Silver Nanoparticles by Fluconazole Drug and Gamma Rays to Inhibit the Growth of Multidrug-Resistant Microbes. **Journal of Cluster Science**, v. 29, n. 6, p. 1003–1015, 2018.

FARHADI, Z.; FARHADI, T.; HASHEMIAN, S. M. Virtual screening for potential inhibitors of β -(1,3)-D-glucan synthase as drug candidates against fungal cell wall. **Journal of Drug Assessment**, v. 9, n. 1, p. 52–59, 1 jan. 2020.

FAVARELLO, L. M. et al. Trends towards lower azole susceptibility among 200 *Candida tropicalis* bloodstream isolates from Brazilian medical centres. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 25, p. 199–201, 1 jun. 2021.

FILGUEIRAS, A. L. Estudo in vitro do potencial antibacteriano de nanopartículas de prata, associadas à quitosana e antibióticos e das interações com a superfície metálica por espectroscopia Raman intensificada por superfície associadas à quitosana e antibióticos e das interações com a superfície metálica por espectroscopia Raman intensificada por superfície. p. 1–115, 2013.

FLEISCHMANN, M.; HENDRA, P. J.; MCQUILLAN, A. J. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. **Chemical Physics Letters**, v. 26, n. 2, p. 163–166, 1974.

FORASTIERO, A. et al. *Candida tropicalis* antifungal cross-resistance is related to different azole target (Erg11p) modifications. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 4769–4781, 2013.

GAGOŚ, M.; ARCZEWSKA, M. Influence of K⁺ and Na⁺ ions on the aggregation processes of antibiotic amphotericin B: Electronic absorption and FTIR spectroscopic studies. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, n. 12, p. 3185–3192, 2011.

GILL, Nikita. 93 percent stardust. In: **Your Soul is a River**. Thought Catalog Books, 2016.

GRAHAME-SMITH, D. G. A. J. K. **Oxford textbook of clinical pharmacology and drug therapy**. [s.l.] Oxford University Press, 1992.

HOANG, A. **Caspofungin acetate: An antifungal agent** *American Journal of Health-System Pharmacy*, 2001. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajhp/article-abstract/58/13/1206/5150149>

HONORATO-SIQUEIRA, T.; MARTÍNEZ, L. Molecular simulations of fluconazole-mediated inhibition of sterol biosynthesis. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 38, n. 6, p. 1659–1669, 12 abr. 2020.

HOPE, W. et al. Fluconazole monotherapy is a suboptimal option for initial treatment of cryptococcal meningitis because of emergence of resistance. **mBio**, v. 10, n. 6, 1 nov. 2019.
HOU, H. **Nano Cost Nano Patterned Template for Surface Enhanced Raman Scattering**. [s.l: s.n.].

HOU, H. C. et al. A Cost-Efficient Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) Molecular Detection Technique for Clinical Applications. **Journal of Electronic Materials**, v. 47, n. 9, p. 5378–5385, 2018.

IMAN, M.; DAVOOD, A. Homology modeling of lanosterol 14 α -demethylase of *Candida albicans* and insights into azole binding. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 6, p. 2890–2899, 2014.

ION, R. et al. Drug Delivery Systems Based on Titania Nanotubes and Active Agents for Enhanced Osseointegration of Bone Implants. **Current Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 854–902, 1 ago. 2019.

ISO 22412:2017. **Particle size analysis -- Dynamic light scattering (DLS)**., 2017.

IVANOVA, N. et al. Silver Nanoparticles as Multi-Functional Drug Delivery Systems. In: **Nanomedicines**. [s.l.] IntechOpen, 2019.

JEREMIAH, S. S. et al. Potent antiviral effect of silver nanoparticles on SARS-CoV-2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 533, n. 1, p. 195–200, 26 nov. 2020.

JIA, D.; SUN, W. Silver nanoparticles offer a synergistic effect with fluconazole against fluconazole-resistant *Candida albicans* by abrogating drug efflux pumps and increasing endogenous ROS. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 93, 1 set. 2021.

JU, J. et al. Sustained and Cost-Effective Silver Substrate for Surface Enhanced Raman Spectroscopy Based Biosensing. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

KASZUBA, M. et al. Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, n. 5, p. 823–829, 2008.

KATZUNG, B. G. **Bertram G. Katzung - Farmacologia Básica E Clínica, 12ª Edição (Artmed).pdf**. [s.l.] McGraw Hill, 2017.

KELLY, K. L. et al. The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 3, p. 668–677, 23 jan. 2003.

KHAN, Z. et al. Development of echinocandin resistance in *Candida tropicalis* following short-term exposure to caspofungin for empiric therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 4, 1 abr. 2018.

KOSUDA, K. M. et al. **Nanostructures and surface-enhanced raman spectroscopy**. [s.l.] Elsevier Ltd., 2019. v. 1–5.

KVITEK, L. et al. Antibacterial activity and toxicity of silver - Nanosilver versus ionic silver. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 304, n. 1, 2011.

LARA, H. H. et al. **Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.jnanobiotechnology.com/content/8/1/1>.

LARKIN, P. **Infrared and Raman Spectroscopy - Principles and spectra interpretation**. Amsterdam: Elsevier Inc., 2011.

LE RU, E. C.; ETCHEGOIN, P. G. (PABLO G. **Principles of surface-enhanced Raman spectroscopy: and related plasmonic effects**. [s.l.] Elsevier, 2009.

LI, H. et al. **Synergistic effect between silver nanoparticles and antifungal agents on Candida albicans revealed by dynamic surface-enhanced Raman spectroscopy** *Nanotoxicology*, 2018.

LI, J. et al. **Chitosan Natural Polymer Material for Improving Antibacterial Properties of Textiles** *ACS Applied Bio Materials* American Chemical Society, 17 maio 2021a.

LI, W. et al. Cupriferos Silver Peroxysulfite Superpyramids as a Universal and Long-Lasting Agent to Eradicate Multidrug-Resistant Bacteria and Promote Wound Healing. **ACS Applied Biomaterials**, v. 4, n. 5, p. 3729–3738, 17 maio 2021b.

LU, L. et al. **Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication**. [s.l: s.n.].

MALEY, A. M.; ARBISER, J. L. Gentian violet: A 19th century drug re-emerges in the 21st century. **Experimental Dermatology**, dez. 2013.

MALLMANN, E. J. J. et al. Atividade antifúngica de nanopartículas de prata obtidas por síntese verde. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 57, n. 2, p. 165–167, 2015.

MARSICH, E. et al. Nano-composite scaffolds for bone tissue engineering containing silver nanoparticles: Preparation, characterization and biological properties. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, n. 7, p. 1799–1807, jul. 2013.

MARTEL, C. M. et al. A clinical isolate of *Candida albicans* with mutations in ERG11 (encoding sterol 14 α -demethylase) and ERG5 (encoding C22 desaturase) is cross resistant to azoles and amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 9, p. 3578–3583, set. 2010.

MARTINEZ, R. **Atualização no uso de agentes antifúngicos**. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 2006.

MATICA, M. A. et al. **Chitosan as a wound dressing starting material: Antimicrobial properties and mode of action** *International Journal of Molecular Sciences* MDPI AG, 1 dez. 2019.

MENESES, M. L.; R. M.; M. P. L.; P. A. G. Antifungal activity of silver nanoparticles and clotrimazole against *Candida* spp. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, n. 58, 2022.

MONDELLI, A. L. et al. **Candidemia in a Brazilian tertiary hospital: Microbiological and clinical features over a six-year period.** *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 2012.

MORALES-ALVAREZ, M. C. Nephrotoxicity of Antimicrobials and Antibiotics. *Advances in Chronic Kidney Disease*, v. 27, n. 1, p. 31–37, 1 jan. 2020.

MORONES, J. R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, v. 16, n. 10, p. 2346–2353, 2005.

MOTTA, F. A. et al. Risk factors for candidemia mortality in hospitalized children. *Jornal de Pediatria (Versão em português)*, v. 93, n. 2, p. 165–171, 2017.

MUDALIGE, T. et al. Characterization of Nanomaterials: Tools and Challenges. In: *Nanomaterials for Food Applications*. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 313–353.

NIE, S.; EMORY, S. R. Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering. *Science*, v. 275, n. 5303, p. 1102–1106, 1997.

NORMA M38-A. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma Aprovada**, 2002.

ORASCH, C. et al. Candida species distribution and antifungal susceptibility testing according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and new vs. old Clinical and Laboratory Standards Institute clinical breakpoints: A 6-year prospective candidaemia survey from the fungal infection network of Switzerland. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 20, n. 7, p. 698–705, 2014.

PAPPAS, P. G. et al. Executive Summary: Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, v. 62, n. 4, p. 409–417, 2015.

PASQUALOTTO, A. C. (ED). **Aspergilosis: from diagnosis to prevention**. Berlin, Germany: Springer, 2010.

QURESHI, A. T. **Silver Nanoparticles as Drug Delivery Systems**. Baton Rouge: [s.n.].
RAMAGE, G.; WICKES, B. L. Standardized Method for In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of. *Society*, v. 45, n. 9, p. 2475–2479, 2001.

ROCHA, W. R. V. DA et al. Gênero Candida - Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 4, p. e43910414283, 2021.

SAINI, R. K. et al. PH dependent reversible aggregation of Chitosan and glycol-Chitosan stabilized silver nanoparticles. *Chemical Physics Letters*, v. 511, n. 4–6, p. 326–330, 5 ago. 2011.

SANT'ANA, A. C.; CORIO, P.; TEMPERINI, M. O EFEITO SERS NA ANÁLISE DE TRAÇOS: O PAPEL DAS SUPERFÍCIES NANOESTRUTURADAS. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 805–810, 2006.

SANTOS, G. C. DE O. et al. Candida infections and therapeutic strategies: Mechanisms of action for traditional and alternative agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUL, p. 1–23, 2018.

SANTOS, J. I.; VIEIRA, A. J. H. Mecanismos de resistência de Candida albicans aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 3, p. 235–239, 2017.

SAÚDE, M. DA. CONCEITOS E DEFINIÇÕES EM SAÚDE MINISTÉRIO. **Rev. Bras. Enf.**, p. 2–3, 1997.

SENGOTTAIYAN, A. et al. Synthesis and characterization of Solanum nigrum-mediated silver nanoparticles and its protective effect on alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Nanostructure in Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 41–48, mar. 2016.

SHARMA, S. et al. Sphingolipid biosynthetic pathway genes FEN1 and SUR4 modulate amphotericin B resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 2409–2414, 2014.

SOCRATES, G. **Infrared Characteristic Group Frequencies. Tables and Charts.** [s.l.] John Willey & Sons, 1994. v. 296.

SOUSA, F. et al. Current insights on antifungal therapy: Novel nanotechnology approaches for drug delivery systems and new drugs from natural sources. **Pharmaceuticals**, MDPI AG, 1 set. 2020.

SOUZA, M. A. F. **Patogenia e Diagnóstico de Candidíase Vaginal.** [s.l.] Instituto Nacional de Ensino Superior e Pesquisa, 2017.

SUETH-SANTIAGO, V. et al. CYP51: Is it a good idea? **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 2, p. 539–575, 2015.

TAN, B. H. et al. Incidence and species distribution of candidaemia in Asia: A laboratory-based surveillance study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 10, p. 946–953, 1 out. 2015.

TAYEL, A. A. et al. Anticandidal action of fungal chitosan against Candida albicans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, n. 4, p. 454–457, nov. 2010.

TOMAR, R. S.; PREET, S. Evaluation of anthelmintic activity of biologically synthesized silver nanoparticles against the gastrointestinal nematode, Haemonchus contortus. **Journal of Helminthology**, v. 91, n. 4, p. 454–461, 1 jul. 2017.

TUTAJ, K. et al. Amphotericin B-silver hybrid nanoparticles: Synthesis, properties, and antifungal activity. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 12, n. 4, p. 1095–1103, 2016.

VAN DAELE, R. et al. **Antifungal drugs: What brings the future?** Medical Mycology. **Anais...**Oxford University Press, 1 jun. 2019.

VOLMER, A. A.; SZPILMAN, A. M.; CARREIRA, E. M. Synthesis and biological evaluation of amphotericin B derivatives. **Natural Product Reports**, set. 2010.

VOLTAN, A.R. et al. Fungal diseases: could nanostructured drug delivery systems be a novel paradigm for therapy? **International journal of nanomedicine**, v. 11, p. 3715, 2016.

WIEDERHOLD, N. P. Antifungal Susceptibility Testing: A Primer for Clinicians. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 8, n. 11, 1 nov. 2021.

WILLE, M. P. et al. **Historical trends in the epidemiology of candidaemia: Analysis of an 11-year period in a tertiary care hospital in Brazil.** São Paulo, Brasil: [s.n.]. v. 108

XU, Y. et al. Evaluation of the adjuvant effect of silver nanoparticles both in vitro and in vivo. **Toxicology Letters**, v. 219, n. 1, p. 42–48, maio 2013.

ZENG, X. et al. Zeng X, Zhang Y, Zhang T, Xue Y, Xu H, An R. Risk Factors of Vulvovaginal Candidiasis among Women of Reproductive Age in Xi'an: A Cross-Sectional Study. **Mycoses**, v. 2018, n. 1, p. 1–9, 2018.

ZIELIŃSKA, J. et al. Thermodynamics and kinetics of amphotericin B self-association in aqueous solution characterized in molecular detail. **Scientific Reports**, v. 6, n. january, 2016.

ZONG, C. et al. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Bioanalysis: Reliability and Challenges. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 10, p. 4946–4980, 2018.