



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS



CARLOS ALBERTO ARCELLY SANTOS BEZERRA

**PREPARAÇÃO, OTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOCRISTAIS DO DERIVADO 2-AMINO-TIOFENO, 6CN10, E
AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA SOBRE *Candida* spp.
E *Cryptococcus* spp.**

JOÃO PESSOA-PB

2025

CARLOS ALBERTO ARCELLY SANTOS BEZERRA

**PREPARAÇÃO, OTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOCRISTAIS DO DERIVADO 2-AMINO-TIOFENO, 6CN10, E
AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA SOBRE *Candida* spp
E *Cryptococcus* spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**.
Área de concentração: **FARMACOLOGIA**

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro
Coorientador: Prof. Dr. Elquio Eleamen Oliveira

JOÃO PESSOA-PB

2025

ATA DE DEFESA

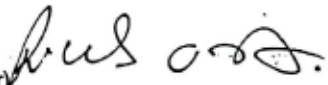


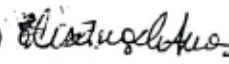
Universidade Federal da Paraíba
Centro de Ciências da Saúde
Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos



Ata da 513ª (quingentésima décima terceira) Dissertação de Mestrado do(a) aluno(a) do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Carlos Alberto Arcelly Santos Bezerra**, candidato(a) ao Título de "Mestre" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia.

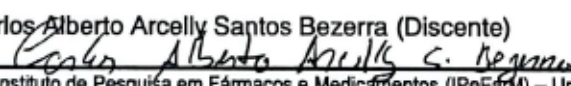
Às nove horas (09h00) do dia vinte e sete de fevereiro do ano de dois mil e vinte e cinco (27/02/2025), no Auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos, da Universidade Federal da Paraíba, reuniram-se em caráter de Solenidade Pública os membros da Comissão designada para examinar o(a) discente **Carlos Alberto Arcelly Santos Bezerra**, candidato(a) ao Título de "MESTRE" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos na área de concentração Farmacologia. Foram componentes da Comissão Examinadora os pesquisadores Elisângela Afonso de Moura Kretzschmar, Ph.D em Biotecnologia; Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes, Ph.D em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos e Ricardo Dias Castro, Ph.D em Farmacologia. Sendo todos integrantes do corpo docente da Universidade Federal da Paraíba. Dando início aos trabalhos, o(a) Presidente da Comissão, professor(a) Ricardo Dias de Castro, após declarar os objetivos da reunião, apresentou o(a) candidato(a) **Carlos Alberto Arcelly Santos Bezerra**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado: **"PREPARAÇÃO, OTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCRISTAIS DO DERIVADO 2-AMINOTIOFENO, 6CN10, E AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA SOBRE CANDIDA SPP. E CRYPTOCOCCUS SPP."**. Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de quarenta minutos, o(a) candidato(a) foi arguido(a) pelos examinadores na forma regimental. Em seguida, passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito APROVADO(A). Em face da aprovação, declarou o(a) Presidente achar-se o(a) examinado(a) **Carlos Alberto Arcelly Santos Bezerra** legalmente habilitado(a) a receber o Título de "MESTRE" em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de concentração Farmacologia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que o(a) mesmo(a) faz jus. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da Comissão e pelo(a) discente.

Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro (Orientador) 

Prof.ª Dr.ª Elisângela Afonso de Moura Kretzschmar (Examinadora) 

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes (Examinador) 

Carlos Alberto Arcelly Santos Bezerra (Discente)


Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPEFARM) – Universidade Federal da Paraíba
Recanto da Milona, Via Ipê Amarelo – Cidade Universitária – João Pessoa – PB – Brasil. CEP: 58051-900
Fone: 55 83 3216-7502 E-mail: pos-graduacao@itf.ufpb.br Site: www.ufpb.br/pos/pgpnsb

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

B574p Bezerra, Carlos Alberto Arcelly Santos.

Preparação, otimização e caracterização de nanocristais do derivado 2-Amino-Tiofeno, 6CN10, e avaliação de sua atividade antifúngica sobre *Candida* spp. E *Cryptococcus* spp. / Carlos Alberto Arcelly Santos Bezerra. - João Pessoa, 2025.

65 f. : il.

Orientação: Ricardo Dias de Castro.

Coorientação: Elquio Eleamen Oliveira.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. *Candida*. 2. *Cryptococcus*. 3. Nanocristal - Derivado 2-amino-tiofeno. 4. Composto 6CN10. I. Castro, Ricardo Dias de. II. Oliveira, Elquio Eleamen. III. Título.

UFPB/BC

CDU 582.288(043)

CARLOS ALBERTO ARCELLY SANTOS BEZERRA

**PREPARAÇÃO, OTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCRISTAIS DO
DERIVADO 2-AMINO-TIOFENO, 6CN10, E AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA SOBRE *Candida* spp. E *Cryptococcus* spp.**

Dissertação de mestrado APROVADA em: 27/02/2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro

(Universidade Federal da Paraíba)

Orientador

Prof. Dr^a. Elisângela Afonso de Moura Kretzschmar

(Universidade Federal da Paraíba)

Examinadora externa

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes

(Universidade Federal da Paraíba)

Examinador Interno

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi fruto de um esforço coletivo seja entre pessoas do meio acadêmico ou entre pessoas que me auxiliaram durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Deixo aqui a todas essas pessoas meu mais sincero, Obrigado.

Aos meus familiares, Maria Vera Lucia Ferreira dos Santos, Givanildo Lima Salviano, Ayany Arcelly Santos Nunes e Wolfgang Péricles Arcelly Santos Bezerra, obrigado pelo amor, carinho, paciência e por me auxiliarem das mais diversas formas durante esse momento. Por estarem comigo nos momentos bons e difíceis, por todos os sacrifícios que fizeram e que me auxiliaram a chegar aonde estou. Amo todos vocês.

A Minha noiva Maria Bárbara Borges de Santana, pela paciência, pelo carinho e amor, pelo auxílio na academia e na vida, por ter me dado forças e me acolhido quando precisei. Espero conseguir fazer por você o mesmo que você faz por mim todos os dias e que o fruto de nossos esforços recompense tudo que passamos e possamos envelhecer juntos. Lembre, estou contigo pro que for. Te amo.

Ao meu orientador, professor e amigo Ricardo Dias de Castro, agradeço pela paciência, por ter me acolhido de braços abertos em seu laboratório, por ter aceitado fazer esse gigantesco trabalho em equipe. Agradeço pelos momentos de divertimento e descontração, pelos passeios e conversas sobre história, política e a vida. Obrigado imensamente por tudo.

Aos professores, coorientadores e amigos Elquio Eleamen Oliveira e Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior, agradeço imensamente por terem me acolhido e confiado em mim durante todos os momentos. Fico imensamente feliz em poder trabalhar em conjunto com alguém que me inspira e que tenho uma profunda admiração. Ambos os senhores são gigantes como pessoas e como pesquisadores, fico feliz de poder pensar na frase “Se cheguei até aqui foi porque me apoiei no ombro dos gigantes” e pensar em ambos. Obrigado, e que venham mais momentos em conjunto.

A todos os que me auxiliaram durante esse trabalho, me iluminando em diversas etapas e me ajudando a resolver diversos problemas. À professora Rejane Pereira Neves, A Dra. Maria Daniela Silva Buonafina, Ao professor e amigo Sócrates Golzio dos Santos, Ao professor Felipe Queiroga Sarmiento Guerra, Ao professor Francisco Humberto Xavier Junior e caso tenha esquecido alguém, mil desculpas, agradeço imensamente da mesma forma.

Agradeço por todos os momentos de companheirismo, descontração e ombro amigo de todos meus amigos de laboratório ou de laboratórios, Alexia, Izabele, Rodrigo Santos, Rodrigo Alto, Vitória, Luciana, Janine, Priscilla, Natália, Malu, Adriana, Ricardo, Palloma e Paula.

Aos meus Amigos, tem tanta gente aqui nesse grupo que fica até difícil de escrever todos, mas a todos meus amigos do ensino médio que me acompanham até hoje, Giovani, Breno, Luciana, Gabriel, Mugi, Rafaela, Pablo, Jessica e Eduardo. Aos meus amigos da universidade que me acompanharam durante toda a graduação, Daniel, Lucas, Julio, Laura, Raquel, Marlia, Brena, Leonardo, Fernando e tem gente demais pra continuar escrevendo, mas obrigado a todos. Aos outros inúmeros amigos que a vida forneceu em vários outros momentos, Rondy, Gugu, Lucas, Vitória, Franco, Maria, Thaís e mais muita gente, Obrigado a todos!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), do Núcleo de Processamento de Alto Desempenho (NPAD/UFRN), da Central Multiusuário de Análise e Caracterização Químico-Biológica da UEPB (CM-ACQuimBio)

Novamente agradeço a todos aqui escritos os outros que não caberiam aqui, meu mais profundo obrigado!

RESUMO

Bezerra, C.A.A.S. **PREPARAÇÃO, OTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCRISTAIS DO DERIVADO 2-AMINO-TIOFENO, 6CN10, E AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA SOBRE *Candida* spp. E *Cryptococcus* spp.** 2025. Dissertação de mestrado (Pós-graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos) PgPNSB/CCS/UFPB. 2025.

Infecções fúngicas, como candidíase e criptococose, representam um desafio crescente à saúde pública, especialmente entre indivíduos imunocomprometidos. A baixa diversidade de antifúngicos disponíveis e o surgimento de resistência medicamentosa aumentam a necessidade de novas terapias. O composto 6CN10, um derivado 2-amino-tiofeno com atividade antifúngica promissora, apresenta baixa solubilidade em água, limitando sua aplicação clínica. No presente trabalho, o desenvolvimento, otimização e caracterização de nanocristais de 6CN10 através das técnicas de Difração de raios-X, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) espectroscopia de raman e ressonância magnética nuclear (RMN), teve como objetivo avaliar o incremento da solubilidade em meio aquoso do nanosistema desenvolvido, avaliar sua atividade antifúngica através da análise avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM) via protocolo CLSI m27-a3 contra 9 linhagens de *C. neoformans* e 3 de *Candida* spp. e avaliar possíveis proteínas-alvos do 6CN10 através de *docking* molecular. Os nanocristais foram obtidos pela técnica de nanoprecipitação por anti-solvente e apresentaram tamanho médio das partículas de $252,1 \pm 14,2$ nm com índice de polidispersão (PDI) de $0,04 \pm 0,03$. O planejamento experimental do tipo otimizado demonstrou com $p > 0,05$ que as variáveis estudo volume de solvente, concentração de estabilizante e a interação entre fatores volume de solvente e tipo de estabilizante, volume de solvente e concentração de estabilizante e tipo de estabilizante e concentração de estabilizante influenciam na variável resposta tamanho de partícula. Os nanocristais de 6CN10 apresentaram incremento na solubilidade em água na ordem de 7 vezes quando comparado ao fármaco puro. Os nanocristais liofilizados apresentaram-se estáveis após 90 dias com tamanho de partícula de $256,42 \pm 3,25$ nm e PDI de $0,17 \pm 0,2$. Os estudos de DRX indicam a amorfização dos nanocristais liofilizados. Os estudos de espectroscopia de raman, RMN e FTIR demonstraram que não houve alteração das ligações das moléculas durante a formulação dos nanocristais. Na avaliação da CIM as linhagens de *C. neoformans* 6895, *C. neoformans* 6901, *C. neoformans* 6907, *C. neoformans* 6909 se mostraram suscetíveis ao tratamento apresentaram valores iguais de CIM com faixa de 250 - 125 µg/mL para 6CN10 livre e Nanocristais de 6CN10. A linhagem de *C. auris* 01132023 foi suscetível aos nanocristais, apresentando CIM de 125 µg/mL. Os nanocristais de 6CN10 não apresentaram atividade fungicida enquanto o fármaco livre apresentou atividade fungicida. Diante desses resultados, concluímos que o 6CN10 e nanocristais de 6CN10 demonstram-se promissores na terapia antifúngica e com potencial frente a linhagens de *C. auris* e *C. neoformans*.

Palavras-chave: *Candida*; *Cryptococcus*; Nanocristal; derivado 2-aminotiofeno; 6CN10.

ABSTRACT

Bezerra, C.A.A.S. **PREPARAÇÃO, OTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOCRISTAIS DO DERIVADO 2-AMINO-TIOFENO, 6CN10, E AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA SOBRE *Candida* spp. E *Cryptococcus* spp.** 2025. Dissertação de mestrado (Pós-graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos) PgPNSB/CCS/UFPB. 2025.

Fungal infections, such as candidiasis and cryptococcosis, represent a growing challenge to public health, especially among immunocompromised individuals. The limited diversity of available antifungals and the emergence of drug resistance increase the need for new therapies. The compound 6CN10, a 2-amino-thiophene derivative with promising antifungal activity, exhibits low water solubility, limiting its clinical application. In the present study, the development, optimization, and characterization of 6CN10 nanocrystals using X-ray Diffraction, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Raman spectroscopy, and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) aimed to evaluate the increase in solubility in aqueous medium of the developed nanoparticle, assess its antifungal activity through the analysis of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) via the CLSI m27-a3 protocol against 9 strains of *C. neoformans* and 3 of *Candida* spp., and evaluate potential target proteins of 6CN10 through molecular docking. The nanocrystals were obtained using the anti-solvent nanoprecipitation technique and exhibited an average particle size of 252.1 ± 14.2 nm with a polydispersity index (PDI) of 0.04 ± 0.03 . The optimized experimental design demonstrated with $p > 0.05$ that the studied variables—solvent volume, stabilizer concentration, and the interaction between factors such as solvent volume and stabilizer type, solvent volume and stabilizer concentration, and stabilizer type and stabilizer concentration—influence the response variable particle size. The 6CN10 nanocrystals showed a 7-fold increase in water solubility compared to the pure drug. The lyophilized nanocrystals remained stable after 90 days, with a particle size of 256.42 ± 3.25 nm and a PDI of 0.17 ± 0.2 . XRD studies indicated the amorphization of lyophilized nanocrystals. Raman spectroscopy, NMR, and FTIR studies demonstrated that there were no changes in the molecular bonds during the formulation of the nanocrystals. In the MIC evaluation, the strains *C. neoformans* 6895, *C. neoformans* 6901, *C. neoformans* 6907, and *C. neoformans* 6909 were susceptible to treatment, showing equal MIC values ranging from 250 to 125 $\mu\text{g/mL}$ for both free 6CN10 and 6CN10 nanocrystals. The *C. auris* 01132023 strain was susceptible to the nanocrystals, exhibiting an MIC of 125 $\mu\text{g/mL}$. The 6CN10 nanocrystals did not show fungicidal activity, while the free drug exhibited fungicidal activity. Based on these results, we conclude that 6CN10 and 6CN10 nanocrystals demonstrate promise in antifungal therapy and have potential against *C. auris* and *C. neoformans* strains.

Keywords: *Candida*; *Cryptococcus*; Nanocrystals; 2-amine-thiophene derivate; 6CN10.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6CN10 - 2 amino-tiofeno 2-[(4-nitrobenzilideno) amino] -4,5,6,7-tetrahidro-4H-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila

AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida

BHE – Barreira hematoencefálica

CDC – Centros de Controle e Prevenção de Doenças

DHM – Diâmetro hidrodinâmico médio

DRX – Difração de Raios-X

FTIR – Infravermelho com transformada de Fourier

GXM – Glucuronoxilomanano

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

Lhc1 – lactonohydrolase

MDR – multirresistente a drogas

nm – nanômetros

OMS – Organização mundial da saúde

Plb1- fosfolipase B1

PVA – Polivinil álcool

RMN – Ressonância magnética nuclear

RPM – Rotações por minuto

SCB- Sistema de classificação biofarmacêutico

UTI - Unidade de tratamento intensivo

Uv-vis – Ultravioleta visível

Θ - Theta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tecidos e órgãos infectados na candidíase mucocutânea e sistêmica.

Figura 2- Via da MAPK, Ras-cAMP-PKA e Cálcio-calcineurina em *C. albicans* e suas implicações celulares.

Figura 3- Principais tecidos, órgãos e sistemas nas manifestações clínicas de criptococose

Figura 4- Via da síntese de ergosterol e inibidores da via

Figura 5- Estrutura química do 6CN10

Figura 6- Figura de superfície de resposta 3D do modelo

Figura 7- Gráfico de superfície de resposta 3D do PVA

Figura 8:-Análise de DHM e PDI de nanocristais a) pré liofilizados b) liofilizados sem trealose (D90) c) liofilizados com 5% trealose (D90)

Figura 9- Difractogramas do a) PVA b) Nanocristais de 6CN10

Figura 10- Espectros de FTIR de a) PVA, b) Nanocristais de 6CN10, C) 6CN10 livre

Figura 11- Espectros de Raman de a) Nanocristais de 6CN10, b) 6CN10 livre, C) PVA

Figura 12- Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H do composto 6CN10

Figura 13- Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H do estabilizante PVA

Figura 14 - Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H dos nanocristais de 6CN10

Figura 15 - Gráfico de barras - Afinidade de ligação (kcal/mol) dos ligantes com as proteínas-alvo. Fonte: autor.

LISTA TABELAS

Tabela 1- Variáveis e os níveis do desenho experimental do tipo otimizado dos nanocristais de 6CN10

Tabela 2- DHM e PDI obtidos para as preparações de nanocristais de 6CN10 da matriz de ensaio de experimentos por superfície de resposta.

Tabela 3- Análise de variância para testar a significância dos termos obtidos para a variação de DHM de partícula das preparações de nanocristais de 6CN10

Tabela 4- Diâmetro hidrodinâmico médio e PDI do estudo de estabilidade dos nanocristais liofilizados

Tabela 5- Resultados da concentração inibitória mínima $\mu\text{g/mL}$ dos nanocristais de 6CN10 e 6CN10 livre frente a *Candida* spp. e *C. neoformans*

Tabela 6- Resultados da concentração fungicida mínima dos nanocristais de 6CN10 e 6CN10 livre frente a *Candida* spp. e *C. neoformans*

Sumário

1.INTRODUÇÃO	19
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
2.1 Candidíase	20
2.2 Criptococose	24
2.3 Epidemiologia das infecções fúngicas.....	27
2.4 Escassez de agentes antifúngicos	28
2.5 Derivados 2-amino-tiofenos.....	31
2.6 Nanocristais.....	32
3. OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo geral	35
3.2 Objetivos específicos	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Local de realização da pesquisa e cepas.....	36
4.2 Obtenção do derivado 2-amino-tiofeno 6CN10	36
4.3 Triagem de solventes	36
4.4 Estudo desenvolvimento e otimização dos nanocristais de 6CN10	37
4.5 Estudo de estabilidade dos nanocristais de 6CN10	38
4.6 Caracterização físico-química dos nanocristais de 6CN10	38
4.6.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersão.....	38
4.6.2 Difração de Raios-X (DRX)	39
4.6.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	39
4.6.4 Espectroscopia de Raman	39
4.6.5 Ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H	39
4.6.6 Determinação da solubilidade em água dos nanocristais de 6CN10	40
4.7 Estudo de atividade fungicida.....	40
4.7.1 Meios de cultura, fármacos e solubilizantes.....	40
4.7.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	40
4.7.3 Concentração Fungicida mínima (CFM).....	41

4.8 Avaliação da ligação entre alvos moleculares fúngicos e o 6CN10 através de docking.	41
4.8.1 Geração e Ajuste das Estruturas Químicas dos Ligantes.....	41
4.8.2 Obtenção e Preparação das Proteínas para Análises de Docking	42
4.8.3 Identificação e Predição de Sítios de Ligação.....	43
4.8.4 Realização do Docking com AutoDock Vina.....	43
4.9 Análises estatísticas	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1 Obtenção e otimização dos nanocristais de 6CN10.....	44
5.2 Caracterização físico-química dos nanocristais de 6CN10	51
5.2.1 Difração de Raios-X (DRX)	51
5.2.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	52
5.2.3 Espectroscopia de Raman	54
5.2.4 Ressonância magnética nuclear (RMN).....	56
5.3 Determinação da solubilidade em água dos nanocristais de 6CN10	59
5.4 Estudo de atividade fungicida.....	59
5.4.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)	59
5.5 Avaliação da ligação entre alvos moleculares fúngicos e o 6CN10 através de docking.	62
6. CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

A incidência de infecções fúngicas vem aumentando nas últimas décadas, tendo como os principais agentes infecciosos *Aspergillus* spp., *Histoplasma* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. e *Pneumocystis jiroveci* (Salazar-Hamm; Torres-Cruz, 2024).

Candida spp. são micro-organismos comensais, os quais se tornam patogênicos, na maioria dos casos, em hospedeiros humanos imunocomprometidos. As infecções de importância médica causadas por fungos deste gênero podem ser divididas entre 2 subtipos: mucocutâneas e sistêmica. A candidemia, uma complicação da infecção por *Candida* spp., é a infecção da corrente sanguínea que ocorre especialmente por *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. auris*. Essas espécies são notórias por apresentarem mais comumente resistência aos fármacos atualmente disponíveis (Tortorano et al., 2021).

Cryptococcus spp., causadoras da criptococose, apresentam-se como patógenos oportunistas, especialmente em indivíduos imunocomprometidos, como aqueles infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). A criptococose manifesta-se com maior frequência como meningite, podendo também acometer pulmões, pele e outros órgãos. *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* são as principais responsáveis pela criptococose em humanos (Ortiz; Hull, 2024)

As principais limitações dos tratamentos disponíveis estão relacionadas ao pequeno arsenal terapêutico medicamentoso e surgimento de cepas resistentes aos fármacos disponíveis (Fisher et al., 2022). Atualmente, os principais agentes antifúngicos em uso pertencem a poucas classes, incluindo polienos, pirimidinas, azóis e equinocandinas. Mecanismos de resistência como bombas de efluxo de fármacos, alterações nos sítios de ligação, redução da permeabilidade celular e formação de biofilme estão se tornando cada vez mais comuns, com resistência aos azóis e equinocandinas frequentemente destacadas na literatura (Fisher et al., 2022). Esses fatos impulsionam a descoberta de novos fármacos.

O tiofeno, um composto heterocíclico aromático composto por 4 carbonos e um heteroátomo de enxofre, foi descoberto em 1883 por V. Meyer. Desde então, os compostos derivados do tiofeno apresentam um grupo diverso de moléculas de interesse farmacêutico. Especificamente, os derivados 2-amino-tiofenos demonstraram uma gama de atividades biológicas de interesse, em destaque, a atividade antifúngica (Queiroz, 2023). Dentre os derivados 2-amino-tiofenos, este estudo se dedicou ao composto 6CN10, uma molécula sintetizada por nosso grupo de estudos, tem sido avaliado por seu potencial antifúngico frente a linhagens de *Cryptococcus*.-Todavia, sua baixa solubilidade em meio aquoso e baixa permeabilidade representam um desafio para empregar o candidato a fármaco como possível terapia para criptococoses.

Nesse contexto, os nanocristais são nanosistemas compostos primordialmente de fármaco e estabilizante. Os nanocristais apresentam características únicas, por exemplo, tamanho inferior a 1000 nm e a propriedade de carrear substâncias terapêuticas. Este conjunto de características permite melhorar a solubilidade em água e permeabilidade de fármacos classificados como Sistema de Classificação Biofarmacêutico (SCB) III e IV (Xue et al., 2024).

Diante disso, a hipótese desse estudo visou desenvolver um nanocristal de 6CN10, caracterizá-lo, testar sua ação antifúngica frente a linhagens padrão e hospitalares de espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans* e avaliar as possíveis proteínas-alvo do 6CN10.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Candidíase

A candidíase é uma infecção fúngica ocasionada pela presença de leveduras do gênero *Candida*, organismos comensais aos humanos, logo, estas infecções possuem correlação com procedimentos cirúrgicos invasivos e alterações imunológicas [e.g. síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), terapia quimioterápica, terapia com imunossupressores pós-transplante de órgãos e uso de antibióticos de amplo espectro] do hospedeiro e alterações morfológicas e da virulência destes fungos (Denning, 2024).

As infecções por *Candida albicans* podem ser classificadas, conforme ilustrado na Figura 1, em mucocutâneas e sistêmicas. As infecções mucocutâneas acometem superfícies como a vaginal (candidíase vulvovaginal), oral (candidíase orofaríngea) e unhas (onicomicose). Já as infecções sistêmicas podem se disseminar por diversos órgãos e sistemas, incluindo o cardiovascular, hepático, renal e o sistema nervoso central. Essas infecções apresentam alta taxa de mortalidade, mesmo em pacientes submetidos a tratamento com antifúngicos modernos (Lopes; Lionakis, 2022).

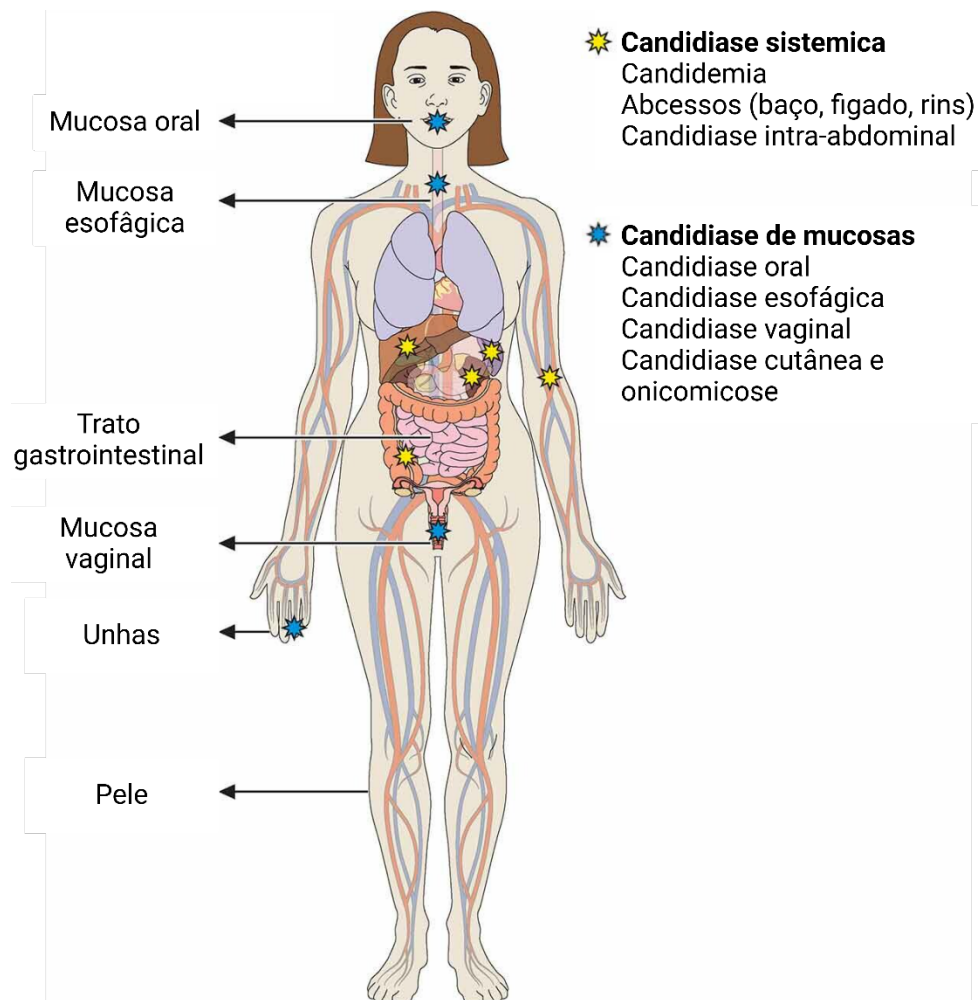


Figura 1: Tecidos e órgãos infectados na candidíase mucocutânea e sistêmica. Fonte: Adaptado de Lopes; Lionakis, 2022

As espécies de *Candida* se desenvolvem em forma de levedura (forma oval, unicelular e com reprodução por brotamento) ou filamentosa (forma alongadas unidas ponta-a-ponta). Dentre a forma filamentosa, há duas subdivisões: Hifa e pseudo-hifa. Em forma de pseudo-hifa, as células apresentam forma elíptica, possuem constrições nas

junções celulares e são altamente ramificadas. Na forma de hifa, as células apresentam parede celular paralelas, falta de constrições entre as paredes celulares e menor ramificação (Jacobsen; Hube, 2017).

A patogenicidade de *Candida* spp. é relacionada a sua capacidade de transição (dimorfismo), entre a forma de levedura e a forma invasiva de hifa. Essa transição é mediada por genes sensíveis a fatores ambientais (temperatura, pH, concentração de CO₂, disponibilidade de nutrientes), do hospedeiro (Sistema imune e hormônios) e de outras bactérias e fungos presentes no nicho. A forma de levedura possui maior envolvimento na disseminação no hospedeiro, enquanto a forma de hifa possui maior capacidade de invasão tecidual e patogenicidade (Jacobsen; Hube, 2017).

De forma geral, o processo de patogênese por *Candida* envolve a adesão às células epiteliais, colonização, penetração epitelial/Invasão por hifas, disseminação vascular, colonização endotelial/penetração. A disseminação da candidíase e progressão para candidemia se dá majoritariamente por duas rotas: Penetração do epitélio em mucosas e de forma artificial via procedimento cirúrgicos, implantação de dispositivos médicos ou depleção da microbiota natural via antibióticos (Ciurea *et al.*, 2020).

Os mecanismos moleculares envolvidos com a virulência estão relacionados à ativação de vias como a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAP) quinase, via da Ras1-cAMP-PKA, via da RIM101 e via da biossintéticas do ergosterol (Mba; Nweze, 2020).

A via da MAP quinase, descrita na Figura 2, possui vias de sinalização finais distintas através das modulações por Mkc1, que promove crescimento celular invasivo, biogênese da parede celular, formação de biofilme e integridade celular; Hog1, a qual modula respostas a estresse térmico, osmótico e oxidativo, formação da parede celular e morfogênese; E Cek1, que controla a reprodução, formação de hifas, adaptação a estresses térmicos e nutricionais (Gong *et al.*, 2017)

A via da Ras1-cAMP-PKA apresenta o fator de transcrição Efg1 como alvo. A Efg1 possui como genes alvos relacionados ao comensalismo no trato gastrointestinal,

formação de biofilme e transição entre fenótipo branco ou opaco. As funções da Efg1 variam de acordo com fatores ambientais. (Beekman et al., 2021; Mba; Nweze, 2020).

A via da cálcio-calcineurina através do aumento na expressão de fatores transcricionais como o Crz1, hph1 e hph2, promove a transcrição de genes relacionados a resistência a fármacos, estresses a membrana celular, pH alcalino. Além disso, a calcineurina possui como fator necessário para ativação da via a proteína Hsp90, a qual é modulada pelos fatores de transcrição hph1 e Crz1, e está correlacionada a resistência a azóis (Gong et al., 2017).

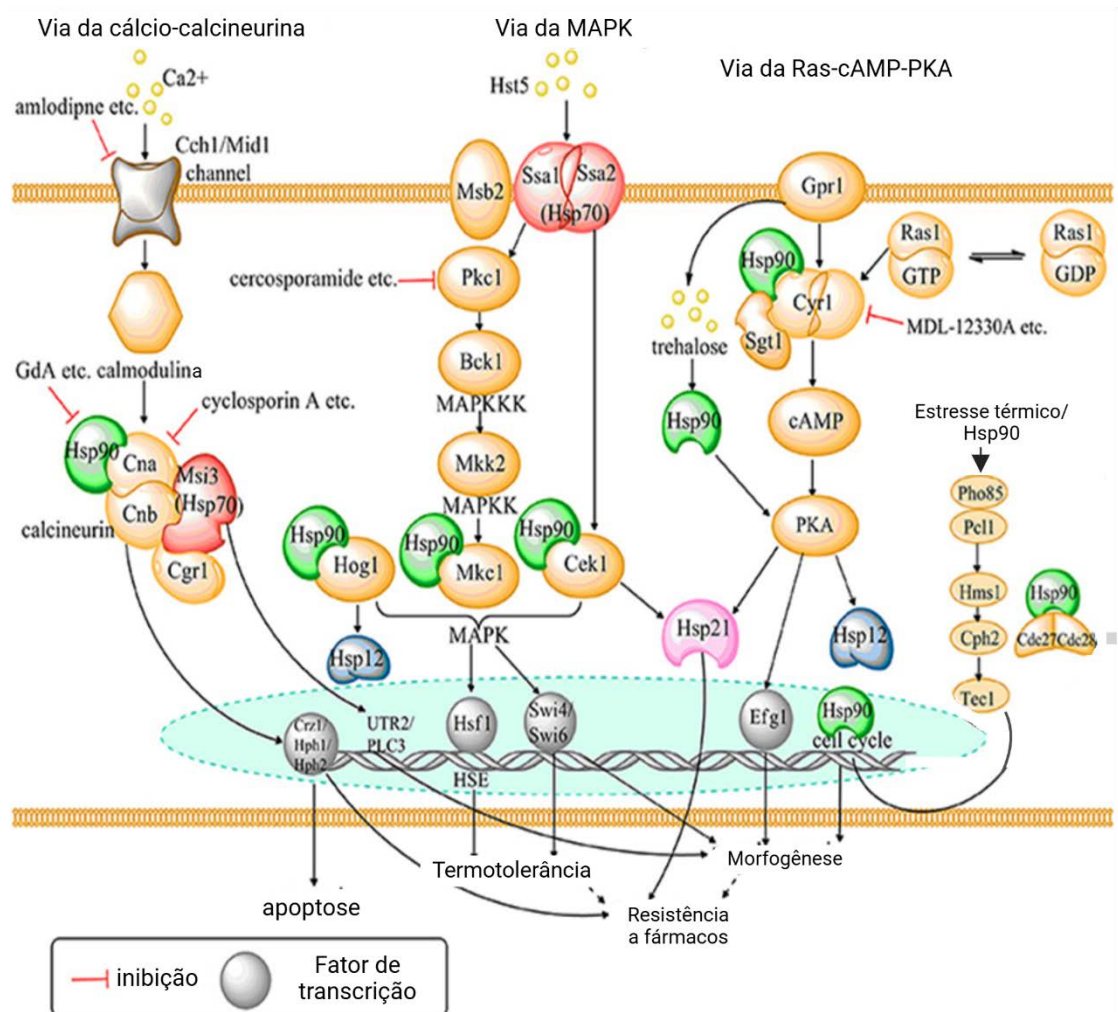


Figura 2: Via da MAPK, Ras-cAMP-PKA e Cálcio-calcineurina em *C. albicans* e suas implicações celulares.

Fonte: adaptado de Gong et al., 2017

Dentre *Candida* spp., *C. auris* apresenta uma emergência. Sua primeira identificação ocorreu no Japão em 2009 e logo se disseminou em escala global. Devido a sua multirresistência aos antifúngicos em uso médico, o patógeno é classificado como o primeiro fungo do gênero multirresistente a drogas (MDR). O Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estima que 90% das linhagens de possuem resistência a fluconazol, 30% a anfotericina B e 5 % a equinocandinas (Chaabane *et al.*, 2019).

Os fatores relacionados à resistência a antifúngicos de *C. auris* são majoritariamente associados a expressão de bombas de efluxo do tipo ABC (*ATP binding cassette*) e transportadores MFS (*Major facilitator superfamily*) quais estão correlacionados ao efluxo de fármacos da classe dos azóis. Estes genes identificados foram homólogos às bombas de efluxo também expressas em linhagens de *C. albicans* resistentes. A espécie também possui 3 regiões quentes, ou seja, regiões mais propensas a ocorrer mutações, comuns na região do gene *ERG11* qual codifica a enzima lanosterol 14-alfa-desmetilase que atua na conversão de lanosterol para ergosterol, molécula essencial para a integridade e estabilidade da membrana plasmática do fungo (Healey *et al.*, 2018)

A resistência a equinocandinas por *C. auris* é relacionada uma região mutável no gene *FKS1* e *FKS2* codificantes para 2 subunidades da enzima β (1,3) D-glucana sintase, enzima crucial na biossíntese de glucana, um componente da parede celular fúngica. *C. auris* possui no gene *FKS1* uma substituição de aminoácido nomeada S639F a qual demonstrou aumentar drasticamente sua resistência a equinocandinas (Watkins *et al.*, 2022).

2.2 Criptococose

A criptococose é uma infecção fúngica de significância global afetando, a depender do agente fúngico, hospedeiros imunocompetentes e imunocomprometidos (AIDS, em uso de imunossupressores, pacientes em unidades de tratamento intensivo). A maior parte dos casos de criptococose em pacientes imunocompetentes são causadas por *C. gattii*, enquanto pacientes imunocomprometidos apresentam maior índices de infecção por *C. neoformans*. *Cryptococcus* spp. tem como principal agente transmissor as fezes

de aves infectadas que liberam no ambiente leveduras ou basidiósporo que ao serem respirados levam à infecção pulmonar.

Em hospedeiros imunocompetentes, após o adentrar nos pulmões, o fungo pode ser combatido por macrófagos alveolares em conjunto com células *T-helper* tipo 1 levando a infecção assintomática latente ou fim da infecção. Em casos em que há infecção latente, esta ocorre devido a formação de uma cápsula composta majoritariamente por polissacarídeos como Glucuronoxilomanano (GXM) e galactoxilomanano. O GXM possui atividade imunomoduladora regulando negativamente citocinas inflamatórias. Outros componentes da cápsula como a enzima lactono-hidrolase (Lhc1) inibem a deposição de componentes do sistema complemento. Dessa forma, a cápsula evita a fagocitose do fungo na ausência de anticorpos ou proteínas auxiliares a opsonização (Do Carmo *et al*, 2022)

Em hospedeiros imunocomprometidos, os macrófagos alveolares realizam a fagocitose do fungo, promovendo sua disseminação. Dentro dos macrófagos, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* apresentam mecanismos de resistência ao complexo de fagocitose (fagolisossomos) como a expressão de melanina na parede celular, reduzindo a permeabilidade da parede celular e aumenta a resistência a agentes oxidantes e a expressão de ureases catalisando a hidrólise de ureia em CO₂ e amônia, reduzindo assim o pH ácido dos fagolisossomos (Gushiken; Saharia, 2021)

A produção e atividade extracelular da fosfolipase B1(Plb1) é um importante fator de virulência e de permanência para *C. neoformans* e *C. Gattii*. A produção de Plb1 está relacionada à virulência em camundongos e a diminuição da viabilidade celular de neutrófilos. Além disso, há correlações entre o crescimento da cápsula, inibição da fagocitose por macrófagos, modificação nos lipídios de membrana e morte celular de células alvo e a reprodução celular do fungo (Rathore *et al*, 2021)

A capacidade de evitar a morte celular nos fagossomos permite que o fungo escape dos fagolisossomos através de um processo chamado extrusão que envolve a fusão entre a membrana do fagolisossomos e a membrana do fungo. Após isso, os fungos da espécie *Cryptococcus* utilizam da maquinaria celular dos macrófagos para se

locomover através do sangue e atravessar barreiras como a barreira hematoencefálica (BHE) na chamada hipótese do cavalo de troia. *C. neoformans* e *C. gattii* também podem atravessar a BHE através da secreção de proteases como a Mpr1, as quais permitem o fungo forçar sua passagem através de junções ocludentes de células endoteliais. Outra maneira de superar a BHE é através de moléculas de ácido hialurônico presentes na superfície do fungo quais são capazes de se ligar a receptores CD44 no lúmen do endotélio. Essa ligação promove a ingestão do fungo pela célula endotelial (May *et al.*, 2016)

Dentre as manifestações clínicas da criptococose, a infecção pulmonar é a mais prevalente e está associada frequentemente por *C. Gattii*. Essa espécie também está associada a maior severidade da doença, quando está é ocasionada por *C. neoformans*. A meningite criptocócica é a condição mais frequente em pessoas com HIV apresentando alta mortalidade e com fatores associados a um prognóstico ruim como alta taxa de leveduras, reduzida depuração fúngica, estado mental alterado e inabilidade de produzir resposta inflamatória no líquido cefalorraquidiano (Rocha *et al.*, 2025). A Figura 3 representa os principais tecidos, órgãos e sistemas envolvidos nas manifestações clínicas de criptococoses.

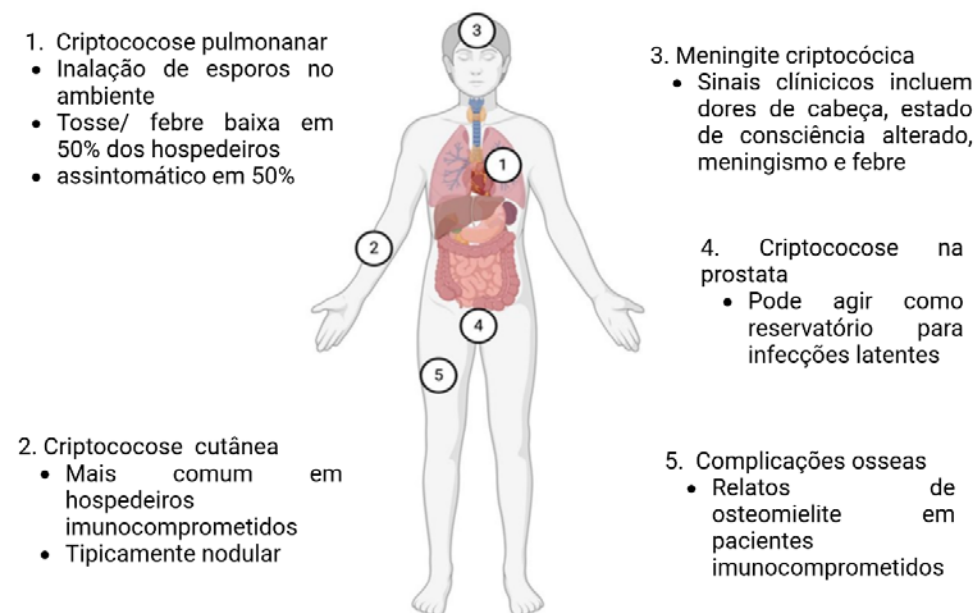


Figura 3: Principais tecidos, órgãos e sistemas nas manifestações clínicas de criptococose. Fonte: Adaptado de Rocha *et al.*, 2025

2.3 Epidemiologia das infecções fúngicas

Patógenos fúngicos e infecções fúngicas vem se mostrando um risco em crescimento à saúde global, sendo principalmente um fator de risco a pessoas imunocomprometidos, em tratamento para câncer, diabéticos, pacientes infectados com SARS-CoV-2, pacientes de procedimentos invasivos, soropositivos para HIV, doentes pulmonares crônicos, pacientes de unidade de tratamento intensivo (UTI), em tratamento com antibióticos de amplo espectro e pacientes em tratamento com medicações imunossupressoras (WHO, 2022).

Dentre os grupos prioritários de fungos causadores de infecções a Organização Mundial da Saúde (OMS) lista como de importância crítica: *Cryptococcus neoformans*, *Candida auris*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* e alta importância *Candida glabrata*, *Histoplasma* spp, *Fusarium* spp, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* (Fisher e Denning, 2023).

Estimativas mundiais mais recentes indicam uma incidência anual de 6,55 milhões de infecções fúngicas invasivas anuais, com um total de 3,8 milhões de mortes, das quais 2,5 milhões seriam diretamente atribuíveis. Do total de infecções fúngicas, estima-se que 193.973 casos de meningite criptocócica aconteçam todo ano, sendo aproximadamente 78% em pacientes com AIDS, 11% em pacientes imunodeficientes HIV negativos e 11% em pacientes sem doenças correlatas. Estima-se uma soma total de 1,5 milhões de casos de candidíase invasiva e candidemia, apresentando uma taxa de mortalidade de 63,6% (Denning, 2024)

Nas últimas décadas vem ocorrendo um aumento nos casos de infecções fúngicas por *Candida* spp. sendo isto correlato ao aumento nas infecções resistentes a antifúngicos. As espécies com maior aumento nas taxas de infecções e maior registros de resistência a medicações são *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. auris*. Entre a proporção crescente de infecções por *Candida* spp., aquelas causadas pelo emergente *C. auris* são particularmente preocupantes, dada sua capacidade duradoura de colonizar pacientes e o ambiente e sua alta taxa de resistência a antifúngicos (Oliva *et al*, 2023)

No Brasil, estudos epidemiológicos são conduzidos para estimar a prevalência das infecções fúngicas sistêmicas. Giacomazzi et al. (2016) analisaram dados do DATASUS e do IBGE, combinados com informações de outros estudos epidemiológicos, e estimaram que, em 2011, ocorreram 6.832 casos de meningite criptocócica e 28.991 casos de candidemia em pacientes hospitalizados.

Dados obtidos entre os anos de 2011 e 2016 em hospital de referência no Nordeste reportam um total de 68 casos (2.23 episódios para cada 1000 admissões) e uma taxa de mortalidade de 55.9% em 30 dias, sendo as espécies mais prevalentes *Candida albicans* (35.3%), *Candida tropicalis* (27.4%), *Candida parapsilosis* (21.6%) e *Candida glabrata* (11.8%). As maiores taxas de mortalidade foram associadas à infecção causada por *C. albicans* (61.1%) e *C. glabrata* (100%) (Medeiros et al., 2019).

Em estudo realizado entre 2010 e 2014 por Da Silva et al (2023) 401 neonatos com suspeita de septicemia foram tiveram amostras de sangue coletadas e analisadas para candidemia. Dos neonatos analisados 44 apresentaram a doença e tiveram como agentes *C.albicans* (31.8%), *Wickerhamomyces anomalus* (11.3%), *Meyerozyma guilliermondii* (4.5%), *C. glabrata* (4.5%), *Candida haemulonii* (4.5%), *C. tropicalis* (2.3%), and *Debaryomyces hansenii* (2.3%). Os dados indicaram uma prevalência da doença de 11% e uma correlação entre tempo de internação e desenvolvimento da doença.

Em uma revisão sistemática de caráter epidemiológico, Toledo (2022) investigou a ocorrência de coinfeções fúngicas associadas à COVID-19, abrangendo o período desde o início da pandemia até novembro de 2021, e identificou 215 casos de coinfeção entre *Candida* spp. e COVID-19, além de 225 casos envolvendo *Aspergillus* spp. Nucci et al (2021), observaram dados de candidemia em pacientes com COVID-19 e relataram um aumento significativo de casos dessa condição. Ocorreu também uma mudança no perfil dos pacientes quais, pré-pandemia de COVID-19, eram pacientes com câncer ou pós-cirúrgicos, enquanto os pacientes com COVID-19 não possuíam perfil similar.

2.4 Escassez de agentes antifúngicos

A carência de novos medicamentos antifúngicos em terapêutica se torna um problema cada vez maior visto que faz décadas desde o desenvolvimento de uma classe

nova de antifúngicos presentes na terapêutica de fungos. O uso irracional de medicações antibióticas e antifúngicas nas fazendas de criação de gado, agricultura, veterinária e até mesmo na saúde humana levaram a um aumento considerável nas espécies patógenas de fungos quais são resistentes e multirresistentes à terapêutica (Arastehfar *et al.*, 2020).

Nesse contexto, contrário aos antibióticos os quais possuem uma gama bastante distinta de classes, porém, ainda, situação terapêutica preocupante, os antifúngicos contam em uso as classes dos azóis (Figura 4), quais se ligam à enzima lanosterol 14-alfa desmetilase (Erg11) interrompendo a produção de ergosterol, desviando a via da síntese, devido ao aumento de substrato para a enzima Erg3 para a produção de 14- α -metil-3,6-diol, um esterol tóxico à fungos e levando a perturbação da estabilidade da membrana celular fúngica. As equinocandinas as quais atuam através da inibição da subunidade catalítica da enzima B-1,3-D-glucana sintase (Figura 4) a qual inibe a síntese deste fundamental componente da parede celular fúngica, e, por último, os polienos, os quais atuam na aglomeração e extração de ergosterol na membrana plasmática, levando a formação de poros e posterior morte celular fúngica (Chaabane *et al.*, 2019).

Em vista da problemática, a soma dos esforços no desenvolvimento de novas classes de drogas antifúngicas culmina, atualmente, em moléculas em fase de testes clínicos 2 ou 3, a exemplo do Fosmanogepix[®] (Inibidores do glicosilfosfatidilinositol), Olorofilm (orotimides), Ibrexafungerp[®] (triterpenoides), T2307 (arylamidina), VL2397 (antifúngico metálicos) e MGCD290 (inibidores de histona desacetilase (Bouz; Dolezal, 2021)

Fosmanogepix[®], um antifúngico de amplo espectro, atua como inibidor da enzima Gwt1 que possui ação de ancoragem e transporte de manoproteínas de membrana (Zhu *et al.*, 2020). Olorofilm, um antifúngico atuante sobre bolores resistentes, inibe a síntese da enzima Di-hidroorotato desidrogenase, a qual faz parte da via de síntese de pirimidinas (Seyedmousavi *et al.*, (2019).

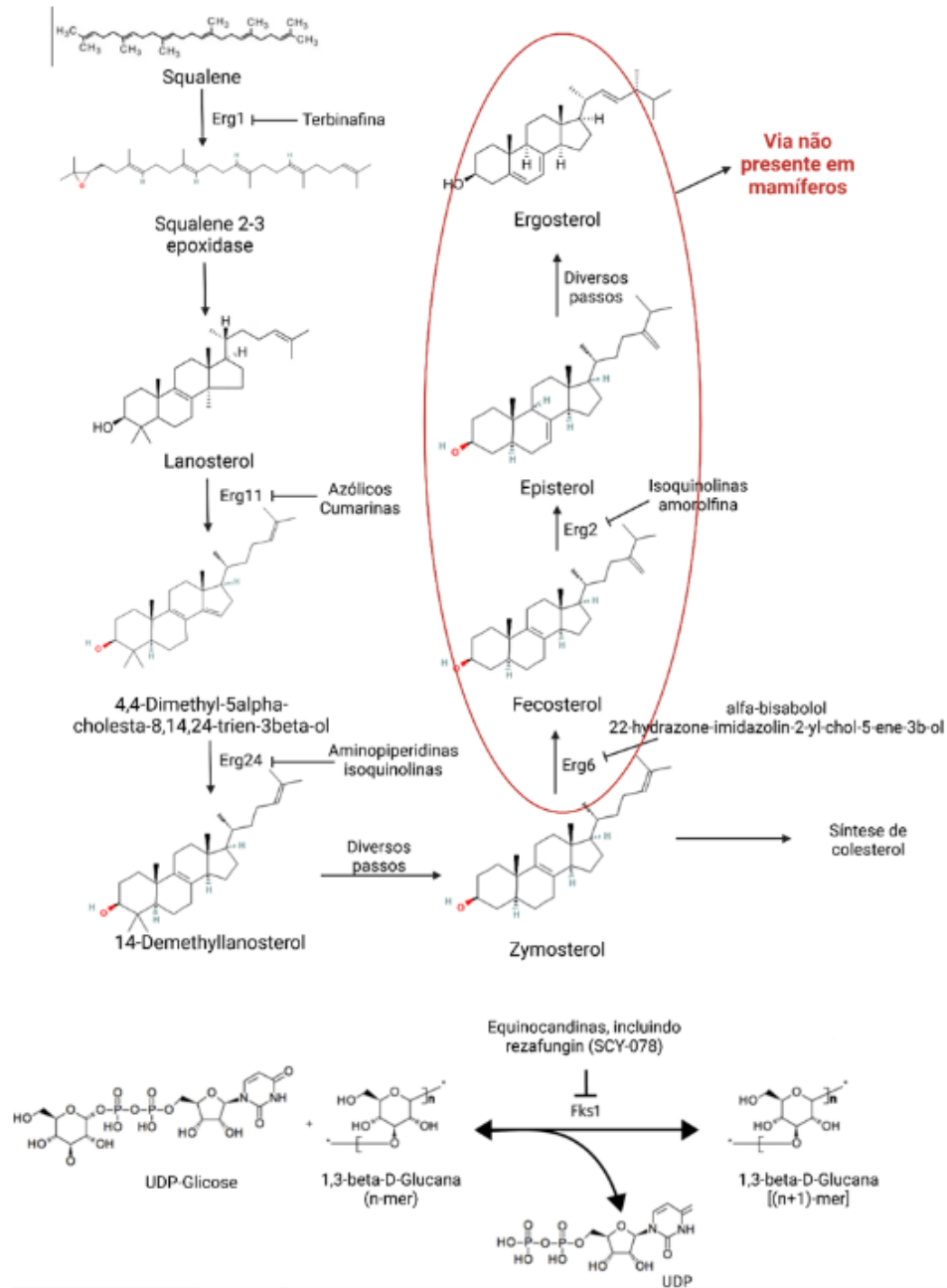


Figura 4: Via da síntese de ergosterol e inibidores da via. Fonte: adaptado de Nicola *et al.*, 2019

Ibrexafungerp[®], um antifúngico em testes para tratamento de candidemia e aspergilose, possui mecanismo de ação às equinocandinas ao bloquear a síntese de B-1,3-D-glucana através da inibição da enzima 1,3-beta-D-glucana sintase (Spec *et al.*, 2019). T-2307, um agente da classe das arilamidinas, atua como inibidor da cadeia respiratória mitocondrial fúngica, interferindo no transporte de elétrons e na produção de energia (Yamashita *et al.*, 2019).

VL-2397, um antifúngico metálico contendo gálio, mimetiza o ferro e é transportado para o interior das células fúngicas interferindo nos processos dependentes de ferro (Dietl *et al.*, 2019). MGCD290, um inibidor da histona desacetilase (HDAC) fúngica, atua sinergicamente com azóis, restaurando a sensibilidade de cepas resistentes ao fluconazol. Ao inibir a classe de enzima HDAC, interfere na regulação epigenética e na expressão de genes relacionados à resistência e virulência fúngica (Pfaller *et al.*, 2015).

2.5 Derivados 2-amino-tiofenos

O tiofeno é um composto aromático heterocíclico contendo 5 membros sendo quatro carbonos e um enxofre. O composto teve sua descoberta divulgada pela primeira vez por V. Meyer em 1883 (Cameron, 1949). Diversos derivados 2-amino-tiofenos vêm sendo sintetizados desde então. Gewald, em 1961, desenvolveu um processo simplificado, barateado e apresentando melhores rendimentos para a síntese desses derivados (GEWALD, 1961; HUANG; DÖMLING, 2011).

Devido ao crescente interesse na síntese de novos compostos terapêuticos, diferentes estratégias vêm sendo empregadas para modificação de moléculas com conhecida atividade biológica, dentre moléculas passíveis dessas modificações os tiofenos podem ser modificados através dos métodos por Karl Gewald, obtendo-se os derivados 2-amino-tiofenos, que apresentam compostos já em mercado, como Zyprexa[®], Etizolam[®], Tinoridina[®], que possuem atividades antipsicótica, ansiolítica e anti-inflamatória, respectivamente. (Duvachelle; Meffre; Benfodda., 2022).

Recentemente, o laboratório de síntese de vetorização de moléculas da Universidade Estadual da Paraíba em conjunto com o laboratório de síntese e planejamento de fármacos da Universidade Federal de Pernambuco realizaram a obtenção de uma série de derivados 2-amino-tiofênicos visando através de técnicas de quimioinformática a obtenção de moléculas com atividade antifúngica e bactericida.

O derivado 2 amino-tiofeno 2-[(4-nitrobenzilideno) amino] -4,5,6,7-tetrahidro-4H-benzo[b]tiofeno-3-carbonitrila, denominado 6CN10 (Figura 5) possui características de síntese interessantes, como baixo custo de produção, e relativa facilidade sintética

(Junior et al. 2011). Contudo, devido a sua reduzida solubilidade em água e baixa permeabilidade, o candidato a fármaco se torna de difícil incorporação a formas farmacêuticas convencionais.

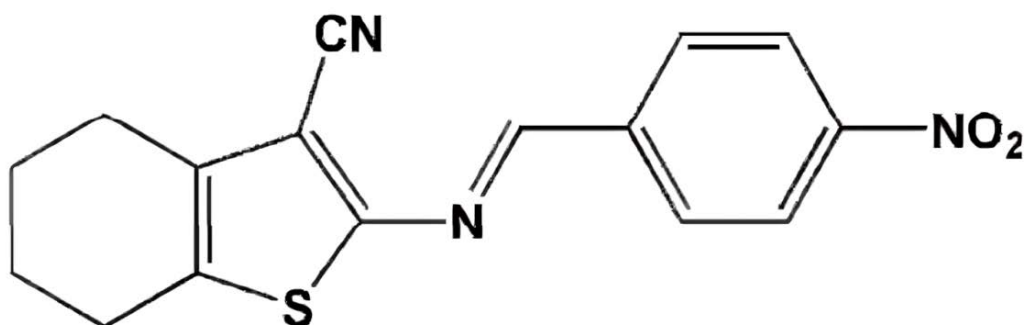


Figura 5: Estrutura química do 6CN10. Fonte: autor

A atividade antinociceptiva e anti-inflamatória e citotoxicidade aguda do 6CN10 foi avaliada (Mota *et al.*, 2018) em camundongos Swiss albino. Doses de 25, 50 e 100 mg/kg aplicadas por via intraperitoneal apresentaram atividade nociceptiva dose dependente sem apresentar efeito sedativo para os testes de placa quente, contorções abdominais induzidas por ácido acético e injeção de formalina.

Ademais, em modelo de inflamação através da indução por carragenina, o 6CN10 reduziu a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos nas doses de 50 e 100 mg/kg. Ainda no estudo, foi empregada a dosagem de 1000 mg/kg para avaliação da citotoxicidade a qual apresentou a morte de 2 de 24 animais teste e fêmeas com reduzido metabolismo, redução do consumo de alimentos e perda de peso.

Os achados relacionados às atividades biológicas e promissor perfil de toxicidade impulsionam o avanço nas pesquisas com derivados 2-amino-tiofenos. Dentre as novas propostas de investigação, destaca-se a preparação de nanossistemas, que podem contribuir para melhores características físico-químicas e potencialização do efeito biológico.

2.6 Nanocristais

Nanocristais de fármaco são nanopartículas, ou seja, possuem diâmetro médio inferior a 1000 nm, compostas essencialmente de um núcleo composto pelo fármaco e

uma camada externa composta de estabilizante. Os nanocristais são definidos como sistemas não matriciais, ou seja, não possuem uma matriz polimérica ou lipídica qual encapsula um agente terapêutico (Nsairat *et al.*, 2025)

Apesar do termo nanocristal implicar que o estado do material seria cristalino, o material pode se encontrar em estado amorfo ou semi-amorfo a depender das técnicas empregadas na sua formulação (Silva, 2020). Diferente de outros sistemas, devido a sua composição relativamente simples, os nanocristais minimizam a toxicidade devido à reduzida quantidade de componentes ou excipientes em comparação a outros nanosistemas. (Sartori, 2016).

A função dos estabilizantes é impedir a aglomeração e agregação. Os estabilizantes/surfactantes utilizados podem ser polímeros anfifílicos ou surfactantes. Os agentes tensoativos iônicos, ao se adsorverem no núcleo formado pelo fármaco, proporcionam carga de superfície que promove a repulsão eletrostática, já os agentes tensoativos ou polímeros não iônicos conferem efeito estérico qual impede aproximação física entre as nanopartículas devido ao volume e comprimento de suas cadeias e massa molar (Jarvis; Krishnan; Mitragotri, 2019)

Esses nanocristais apresentam melhorias nas características farmacocinéticas, incluindo aumento da concentração plasmática máxima, redução da variabilidade das concentrações plasmáticas, aumento da velocidade de dissolução, incremento da solubilidade de saturação e aumento da adesividade a superfícies e membranas celulares (Zhang; Liu e Zeng., 2022).

Essa redução de tamanho aumenta a área de superfície do sólido, o que, de acordo com a equação de 1 Noyes-Whitney, aumenta a velocidade de dissolução em líquidos (Noyes; Whitney, 1897).

$$\frac{dX}{dt} = \frac{(D \times A)}{h} \times \left(C_s - \frac{x}{v} \right) \text{ (Equação 1)}$$

Na equação, dX/dt é a velocidade de dissolução, D é o coeficiente de difusão, A é a área da superfície da partícula, h é a distância difusional, C_s é a solubilidade de

saturação do fármaco, X é a concentração de fármaco no meio circundante e V o volume do meio de dissolução.

Com a reduzida proporção entre área de superfície e volume, ocorre aumento da adesividade a superfícies ou membranas celulares devido a maior área de contato. (Khan *et al*, 2021). A solubilidade de saturação é uma constante relacionada ao composto, temperatura e meio de dissolução e possui correlação com o raio das nanopartículas. De acordo com a equação 2 de Ostwald-Freundlich (Couillaud *et al*, 2019)

$$\log \left(\frac{C_s}{C_\infty} \right) = \frac{2\sigma V}{2.303RT\rho r} \quad (\text{Equação 2})$$

Em que C_s é a solubilidade de saturação, C_∞ é a solubilidade do sólido que consiste em partículas grandes, σ é a tensão interfacial da substância, V é o volume molar do material particulado, R é a constante do gás, T é a temperatura absoluta, ρ é a densidade do sólido e r é o raio.

Diversos medicamentos já no mercado estão apresentados em nanocristais, como Rapamune®, Tricor® e Megace®, os quais apresentam forma de administração oral, fator que aumenta a complacência de pacientes em terapêutica (Chen; Wu e Lu., 2020).

Existem dois tipos principais de técnicas para preparação de nanocristais: *top-down* e *bottom-up*. As técnicas *top-down* envolvem a quebra de partículas maiores para atingir a escala nanométrica (e.g. homogeneização por alta pressão, moagem úmida e moagem a seco), enquanto as técnicas *bottom-up* se baseiam na precipitação controlada a partir de uma solução supersaturada (Kalhapure *et al.*, 2022).

As metodologias *bottom-up*, como a precipitação por anti-solvente, apresentam vantagens em relação às técnicas *top-down*, como menor gasto energético, baixo custo, mais simples e menor consumo de tempo.

Na precipitação por anti-solvente, o fármaco é dissolvido em um solvente orgânico solúvel em água e posteriormente adicionado a um anti-solvente, geralmente a água (contendo surfactante), esse processo reduz a solubilidade do fármaco no meio induzindo

a supersaturação, esse fenômeno promove a nucleação (formação de núcleo primários). Devido ao estado energético elevado na superfície dos núcleos primários, ocorre o processo de crescimento dos nanocristais reduzindo a energia e reatividade da superfície dos nanocristais. A presença de surfactantes ou estabilizantes no meio limita o crescimento dos nanocristais ao estabilizar a energia em sua superfície, por fim, ocorre a precipitação de nanocristais (Jingru *et al*, 2021)

O diâmetro e o índice de polidispersão (PDI) dos nanocristais são influenciados por diversos parâmetros da formulação. O tipo e a concentração do estabilizador utilizado desempenham um papel crucial, visto que influenciam a energia superficial das partículas e, consequentemente, o crescimento e a agregação dos cristais. A escolha do solvente e anti-solvente e sua proporção também impacta o tamanho final dos nanocristais, pois afetam a supersaturação e a taxa de nucleação. Além disso, a taxa de adição do anti-solvente e a taxa de fluxo da solução do fármaco são parâmetros importantes que controlam o tamanho e a uniformidade dos nanocristais (Zhang; Liu; Zeng, 2022)

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Formular, otimizar e caracterizar nanocristais de derivado 2-amino-tiofeno, 6CN10, visando avaliar sua atividade antifúngica contra *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans* e elucidar sua ligação com alvos moleculares fúngicos.

3.2 Objetivos específicos

- Formular nanocristais de 6CN10 através da técnica de precipitação por anti-solvente;
- Otimizar nanocristais através de planejamento experimental;
- Caracterizar os aspectos físico-químicos dos nanocristais obtidos;
- Determinar o incremento da solubilidade em meio aquoso de nanocristais de 6CN10;
- Avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do 6CN10 livre e dos nanocristais de 6CN10;

- Avaliar a ligação entre alvos moleculares fúngicos e o 6CN10 por meio de estudos de *docking* molecular.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de realização da pesquisa e cepas

Os ensaios laboratoriais referentes ao estudo da atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Farmacologia Experimental e Cultivo Celular (LAFECC) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e No Laboratório de Micologia Médica do Centro de Biociências (CB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

As linhagens de *Candida* utilizada nos estudos incluem: *C. albicans* ATCC 90028, *C. auris* 01132023 e as linhagens de *Cryptococcus* incluem: *C. neoformans* LM-260 *C. neoformans* ATCC 66031, *C. neoformans* LM-1907, *C. neoformans* LM-287 e *C. neoformans* LM-108 as linhagens de *Candida* utilizadas incluem: *C. auris* B11903C, e as linhagens de *Cryptococcus* incluem: *C. neoformans* 6895, *C. neoformans* 6901, *C. neoformans* 6907 e *C. neoformans* 6907.

O desenvolvimento dos nanocristais foi realizado no Laboratório de Síntese e Vetorização de Molécula-UEPB (LSVM-UEPB) e a caracterização dos materiais foi feita na Central Multiusuária de análise e caracterização químico biológica (CM-ACQuimBio-UEPB)

4.2 Obtenção do derivado 2-amino-tiofeno 6CN10

O composto 6CN10 foi sintetizado no Laboratório de Síntese e Vetorização de Molécula-UEPB (LSVM-UEPB) de acordo com procedimentos previamente descritos (Mendonça-Junior et al., 2011).

4.3 Triagem de solventes

Para seleção de solventes foi adicionado gradualmente 6CN10 em 1 mL de acetona, Dimetilsulfóxido (DMSO) ou etanol. Para determinar o solvente com maior capacidade de solubilizar o 6CN10, verificou-se visualmente qual solvente foi capaz de solubilizar a maior quantidade de fármaco sem formação de precipitado.

4.4 Estudo desenvolvimento e otimização dos nanocristais de 6CN10

Os nanocristais de 6CN10 foram obtidos pela técnica de precipitação por anti-solvente (Reverchon; DELLA-PORTA, 1999). A formulação otimizada continha 2 mg de 6CN10 foram solubilizados em 1 mL de acetona e adicionados em fase aquosa sob agitação contendo Polivinil álcool (PVA) e 30 mL de água pura tipo II (). A formulação foi submetida a agitação sob 1100 RPM em Agitador magnético (753E, FISATOM) durante 3 horas. A suspensão contendo nanocristais foi então armazenada e guardada a $-4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

A otimização dos nanocristais foi realizada através de desenho experimental do tipo otimizado utilizando o *software Design Expert*, StatSoft, USA. Foram selecionados como variáveis de estudo: o volume do solvente, a concentração do estabilizante e o tipo de estabilizante, nas variáveis resposta utilizou-se diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e índice de polidispersão (PDI) (**Tabela 1**).

Tabela 1: Variáveis e os níveis do desenho experimental do tipo otimizado dos nanocristais de 6CN10

Formulação	FATOR A:	Fator B:	Fator C:
	Volume solvente (mL)	Estabilizante (%)	Tipo de Estabilizante
1	1	1	PVA
2	3	0,55	PVA
3	3	0,55	PVA
4	1	0,7	PF128
5	3	0,325	TW80
6	1	0,1	PVA
7	3,66667	1	PF128
8	5	0,7	T80
9	5	0,1	PVA
10	1	1	TW80

11	3	0,55	PVA
12	3	0,1	PF128
13	5	0,7	TW80
14	5	0,1	TW80
15	1	0,55	TW80
16	1	0,7	PF128
17	3	0,55	PF128
18	5	1	PVA
19	3,66667	1	PF128
20	5	0,1	PF128
21	1	0,1	TW80
22	5	0,55	PF128

PF128 = pluoronic f-128, T80 = Tween 80, PVA = Polivinil álcool

Fonte: autor

4.5 Estudo de estabilidade dos nanocristais de 6CN10

As suspensões obtidas pela técnica de precipitação por anti-solvente foram imediatamente acrescidas de trealose a 2,5% e 0% e congeladas em freezer sob temperatura de -20°C. As suspensões foram levadas a liofilizador (Alpha 1-2 LDplus, Christ) e liofilizadas por 24h em secagem primária e pressão de 1mbar. Os líofilos obtidos foram armazenados em geladeira a -4°C. Após 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias os líofilos foram ressuspensos com auxílio de agitador vórtex (AP59, Phoenix) e posteriormente foi avaliado o diâmetro médio e PDI através do equipamento de espalhamento de luz dinâmica (Zetasizer ultra red, Malvern).

4.6 Caracterização físico-química dos nanocristais de 6CN10

4.6.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio e índice de polidispersão

A determinação do diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersão (PDI) dos nanocristais foram obtidos a partir do equipamento Zetasizer (Zetasizer ultra, Malvern) através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS). As amostras

preparadas para leitura foram diluídas em água pura tipo II (1:9) e lidas em triplicata a 173°e a 25°C. As amostras foram analisadas pelo software Zs Xplorer 3.00

4.6.2 Difração de Raios-X (DRX)

O estado físico cristalino ou amorfo dos nanocristais de 6CN10, 6CN10 livre e PVA foi analisado via DRX e foram realizadas na Central Multiusuário do Departamento de Física da UFPE a partir do equipamento SmartLab (SmartLab, Rigaku) usando radiação CuKa ($1.54059 \text{ \AA}$, com tubos de voltagem de 40Kv e corrente de tudo de 30mA). As amostras foram analisadas com ângulo de varredura ao longo de 2θ variando de 5° a 70° , com velocidade de $2^\circ/\text{min}$.

4.6.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os Espectros de FTIR foram obtidos em espectrofotômetro IRspirit (IRspirit, Shimadzu) pela técnica de refletância total atenuada (ATR) na faixa espectral de 400 a 4000 cm^{-1} , utilizando o módulo QATR-S. As amostras liofilizadas de 6CN10 e sólidas de 6CN10 livre e PVA foram apertadas contra a superfície do prisma antes da medição. As amostras foram analisadas no software Labsolutions IR 2.31.

4.6.4 Espectroscopia de Raman

Os espectros de Raman foram obtidos em espectrofotômetro Airsight (Airsight, Shimadzu). Como parâmetros do microscópio foi utilizado laser à 785 nm , lentes objetivas de 50x e filtro ND a 12%. As amostras liofilizadas de 6CN10 e sólidas de 6CN10 livre e PVA foram postas sob lamínula e foi realizada análise direta do laser sob a matéria. Os espectros foram obtidos em 20 ou 25 leituras com tempo de exposição de 2 a 8 segundos. As análises foram realizadas sob faixa espectral de 200 a 3500 cm^{-1} . As amostras foram analisadas no software AMsolution IR 2.31

4.6.5 Ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H

As amostras de 6CN10, nanocristais de 6CN10 e PVA foram solubilizadas em 0.8 mL respectivamente nos seguintes solventes deuterados: Clorofórmio e DMSO. A amostra foi transferida para um tubo de RMN de 5 mm de diâmetro, previamente limpo e seco. O tubo foi inserido no porta amostras do espectrômetro. Os espectros foram adquiridos em espectrofotômetro de ressonância magnética nuclear RMN (Bruker Fourier

80) operando com frequência de 80MHz. Os dados foram tratados no software Topspin 4.4.1.

4.6.6 Determinação da solubilidade em água dos nanocristais de 6CN10

Alíquotas de 1ml de suspensão de nanocristais de 6CN10 e de suspensão contendo excesso de 6CN10 (2mg) foram dispersas em 1ml de água pura tipo II e armazenadas em microtubo 2mL. As suspensões foram submetidas à agitação orbital por 72 h e posteriormente ultracentrifugadas a 20.000 rpm durante 30 minutos em equipamento Hitachi CP100nx (Eppendorf). O sobrenadante foi posteriormente filtrado em filtro de membrana hidrofílica (0.45µm) e solubilizado em etanol. A quantidade solubilizada de 6CN10 nas amostras foi determinada através da técnica de espectrometria uv-vis utilizando o equipamento Genesys 10S UV-VIS (Thermo scientific) em comprimento de onda de 400nm, através de curva de calibração previamente elaborada.

4.7 Estudo de atividade fungicida

4.7.1 Meios de cultura, fármacos e solubilizantes

Para o crescimento fúngico foi utilizado como meio RPMI 1640 de acordo com o protocolo CLSI M27-A3. Visando a elucidação dos efeitos farmacológicos em meio aquoso, os fármacos e as diferentes formulações testadas foram solubilizadas em meio de cultura contendo DMSO 2,5%. Foram testados como tratamento o 6CN10 livre, os nanocristais de 6CN10 e, como controle, nistatina com concentração inicial de 48 µg/mL e anfotericina B com concentração inicial de 32 µg/mL.

4.7.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O método utilizado seguiu as condições descritas no documento CLSI-M27-A3. O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, pH 7,0±0,1, com ácido morfolino propano sulfônico (MOPS; 0,165 mol/L; Sigma-Aldrich). O meio de cultura foi esterilizado por filtração utilizando membranas de 0,22 µm (Kasvi®). Como tratamento foram utilizados 6CN10 livre e nanocristais de 6CN10 com concentração entre 250 e 3,90 µg/mL.

As leveduras foram mantidas em meio ágar Sabouraud dextrose (SDA) e incubadas por 48h à 35°C. As células dos isolados foram preparadas em solução salina (0,85%), e sua densidade foi ajustada a 90% de transmitância utilizando um espectrofotômetro com comprimento de onda 530 nm. O volume do inóculo foi ajustado para 5,0 mL de solução salina esterilizada e, posteriormente, diluído em RPMI 1640 para uma concentração de 2 a 5×10^3 células / mL (CLSI, 2008).

Para os testes, foram utilizadas placas de microtitulação de fundo chato com 96 poços (Kasvi[®]) nas quais foram dispostos 100µL de cada uma das diluições testadas nas colunas de 1 a 10. Em seguida, 100 µL de meio RPMI 1640 foram distribuídos nas colunas 11 e 12, as quais foram utilizadas como controle de crescimento e de esterilização, respectivamente. Posteriormente, 100 µL do inóculo padronizado foram adicionados aos poços das colunas 1 a 11, sendo as microplacas incubadas a 35°C por 48 horas para a determinação da CIM. As placas foram avaliadas visualmente e a atividade foi avaliada com base na inibição de 100% do poço quando comparado aos controles.

4.7.3 Concentração Fungicida mínima (CFM)

Para determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM), o conteúdo dos poços que mostraram 100% de inibição no crescimento foram cultivados para o meio DAS em placas de Petri. As placas foram incubadas a 35°C durante 48 horas para determinar a viabilidade fúngica. A CFM foi confirmada pela ausência de crescimento fúngico

4.8 Avaliação da ligação entre alvos moleculares fúngicos e o 6CN10 através de docking.

4.8.1 Geração e Ajuste das Estruturas Químicas dos Ligantes

As estruturas químicas dos fármacos ligantes, 6CN10, fluconazol e caspofungina, foram obtidas em formato SDF (Structured Data File). Para o 6CN10, utilizou-se o *Chemical Sketch Tool do Protein Data Bank* (PDB) com a interface *MarvinJS by Chemaxon* (rcsb.org/chemical-sketch). A nomenclatura IUPAC do derivado 2-amino tiofeno 6CN10 (2-[(4-nitrobenzylidene)-amino]-4,5,6,7-tetrahydro-4H-benzo[b]thiophene-3-carbonitrile) foi utilizada como entrada para gerar a estrutura e o arquivo SDF. Os hidrogênios implícitos foram adicionados via *PubChem Standardization Service*

(pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/standardize/standardize.cgi). Os arquivos SDF do fluconazol e caspofungina foram obtidos diretamente do PubChem (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).

4.8.2 Obtenção e Preparação das Proteínas para Análises de *Docking*

As estruturas das proteínas-alvo foram obtidas a partir dos bancos de dados Protein Data Bank (PDB) e o AlphaFold Database. As proteínas selecionadas associadas foram esterol 14-alfa demetilase (CYP51), 1,3- β -D-glucana sintase, Exo-beta-(1,3)-glucanase, Timidilato quinase e Delta(14)-esterol redutase ERG24. Utilizando o software ChimeraX (Pettersen et al., 2020) na versão 1.8 (cgl.ucsf.edu/chimerax), as estruturas PDB foram limpas, removendo moléculas de água, resíduos do experimento, ligantes e substratos catalíticos, exceto cofatores como grupos HEME-Fe²⁺. Especificamente, é importante elucidar que na estrutura 5TZ1 foram capturadas 2 conformações assimétricas da mesma proteína, separadas entre cadeias A e B, e estas foram isoladas em arquivos separados para cada cadeia para a docagem molecular.

Tabela 2. Proteínas alvo para docking molecular.

UniProtKB	PDB	Organismo [sistema de expressão gênica]	Nome	Método	Resolução (Å)
P10613	5TZ1	<i>Candida albicans</i> [<i>Escherichia coli</i> K-12]	Esterol 14- alfa demetilase (CYP51)	DRX	2.0
P38631	8JZN	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,3-beta-D- glucana synthase	CryoEM	2.47
P29717	1EQP	<i>Candida albicans</i>	Exo-beta- (1,3) - glucanase	DRX	1.9

Q59TV7	5UIV	<i>Candida albicans</i> SC5314 [<i>Escherichia coli</i>]	Timidilato quinase	DRX	2.45
A0A1D8PI C7	-	<i>Candida albicans</i>	Delta (14) - esterol redutase ERG24	AlphaFold2	-

Fonte: autor

4.8.3 Identificação e Predição de Sítios de Ligação

Utilizou-se a ferramenta P2RANK (Krivák; Hoksza, 2018) para predição de sítios de ligação em todas as proteínas. O P2RANK é uma ferramenta de machine learning que prevê a probabilidade de ligação em "bolsões" de ligação ("binding pockets") na superfície da proteína. A predição do P2RANK já é automaticamente integrada e disponibilizada pelo Protein Data Bank Europe (PDBe) para proteínas experimentalmente validadas do PDB, mas a ferramenta pode ser utilizada através da interface web PrankWeb (prankweb.cz) para novas predições.

4.8.4 Realização do *Docking* com AutoDock Vina

O *docking* molecular foi realizado com Autodock Vina (Forli *et al.*, 2016) na versão 1.2.0, seguindo a metodologia de *docking* básico com receptores rígidos proposta pelos desenvolvedores (autodock-vina.readthedocs.io/en/latest/docking_basic.html). Os pacotes necessários foram instalados em um ambiente virtual Mamba (github.com/mamba-org/mamba), e todas as análises de *docking* molecular foram realizadas no supercomputador do Núcleo de Processamento de Alto Desempenho da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (NPAD/UFRN). O tamanho da "caixa" de *docking* foi definido com base nas coordenadas dos sítios de ligação preditos. Para ligantes menores, como o 6CN10 e o fluconazol, foram testadas 256 poses em uma caixa de 30x30x30 Å. Para ligantes maiores, como a caspofungina, foram testadas 512 poses em uma caixa de 60x60x60 Å.

4.9 Análises estatísticas

Para a análise estatística foram utilizados testes matemáticos definidos de acordo com a característica do experimento. Os resultados foram considerados significativos quando apresentarem valores de $p < 0,05$. As análises foram realizadas no *software* Jamovi 2.6.19.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção e otimização dos nanocristais de 6CN10

A primeira etapa do estudo consistiu na seleção do solvente orgânico de classe 3, ou seja, com baixo potencial tóxico capaz de solubilizar completamente o 6CN10. Dentre os solventes selecionados, a acetona foi capaz de solubilizar até 4 mg de 6CN10. Já DMSO e etanol apresentaram precipitado após adição de 2 mg do fármaco.

Visando avaliar a capacidade da técnica de produzir nanocristais e quais as variáveis de processo estavam influenciando as variáveis resposta de interesse DHM e PDI. Foram selecionados estabilizantes inertes, biocompatíveis e biodegradáveis que possuem uso permitido pela legislação e utilizados em concentração considerada atóxica (Cortés *et al.*, 2021).

Os resultados obtidos a partir dos parâmetros definidos para o planejamento de experimento por superfície de resposta estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: DHM e PDI obtidos para as preparações de nanocristais de 6CN10 da matriz de ensaio de experimentos por superfície de resposta.

Formulação	FATOR A: Volume solvente (mL)	FATOR B: Estabilizante (%)	FATOR C: Tipo de Estabilizante	RESPOSTA Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)	RESPOSTA PDI
1	1	1	PVA	409	0,16
2	3	0.55	PVA	380	0,19
3	3	0.55	PVA	337	0,13
4	1	0.7	PF128	709	0,52
5	3	0.325	TW80	640	0,53
6	1	0.1	PVA	234	0,017

7	3,6667	1	PF128	813	0,62
8	5	0.7	TW80	1835	1
9	5	0.1	PVA	1063	0,86
10	1	1	TW80	589	0,49
11	3	0.55	PVA	335	0,17
12	3	0.1	PF128	890	0,61
13	5	0.7	TW80	2487	1
14	5	0.1	TW80	1532	0,9
15	1	0.55	TW80	687	0,53
16	1	0.7	PF128	647	0,45
17	3	0.55	PF128	702	0,52
18	5	1	PVA	3332	1
19	3,6667	1	PF128	988	0,69
20	5	0.1	PF128	810	0,59
21	1	0.1	TW80	2614	1
22	5	0.55	PF128	791	0,61

PF128 = Pluoronic-f128, PVA = Polivinil álcool, TW80 = Tween 80

Fonte: autor

O menor e o maior valor de DHM foram, respectivamente, de 234 (F6) e 3332 (F18) nm. Em primeira análise, essa resposta demonstra que as variáveis estudo selecionadas impactam o DHM e o PDI. As formulações com DHM inferior a 800 nm apresentam valores dentro da faixa esperada para nanocristais (Gigliobianco *et al.*, 2018). Os resultados do estudo de otimização demonstram uma tendência ao aumento do DMH e do PDI dos nanocristais com o aumento do volume de acetona, isto é esperado devido a um menor volume de solvente proporcionar maior concentração de fármaco promovendo nucleação mais intensa e nanocristais menores (Shrimal; Jadeja; Patel, 2021). Também de acordo com os resultados, para as formulações contendo PVA ocorreu aumento significativo para as variáveis resposta em função de um aumento na

concentração do estabilizante, esse aumento pode ocorrer quando há excesso de estabilizante na formulação (Alkoholief *et al.*, 2022).

Os resultados obtidos a partir da matriz de experimento foram descritos na Tabela 3, que mostra a resposta da análise de variância (ANOVA) para o DHM. As variáveis independentes, assim como, suas interações são consideradas estatisticamente significativas quando os p-valores forem menores que 0,05 ($\alpha=0,05$) (PALLANT, 2011).

Assim, as variáveis estudo consideradas significativas no modelo quadrático foram: o volume de anti-solvente (A^2) e a concentração de surfactante (B^2). Já o modelo linear apresentou as variáveis: volume de anti-solvente, concentração de surfactante e tipo de surfactante. Na interação entre dois fatores a interação entre volume de anti-solvente e concentração de surfactante (AB), volume de anti-solvente e tipo de surfactante (AC) e concentração de surfactante e tipo de surfactante (BC). O modelo quadrático do DOE apresenta falta de ajuste não significativo (valor-p=0.1351) confirmando a adequação do modelo.

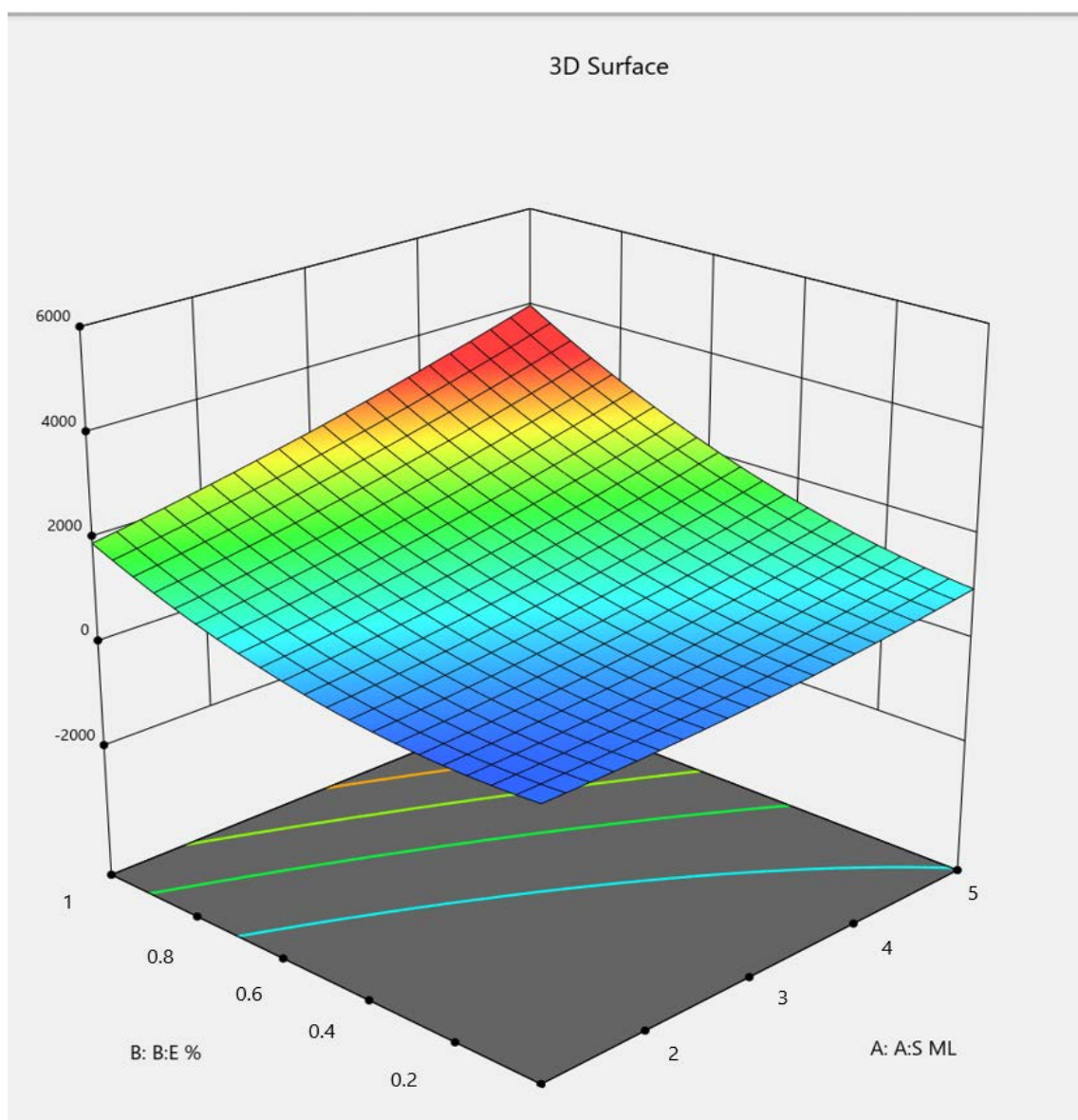
Tabela 3: Análise de variância para testar a significância dos termos obtidos para a variação de DHM de partícula das preparações de nanocristais de 6CN10

Fonte	SQ	GL	MQ	Valor-F	Valor-p
AB	3,49E+06	1	3,49E+06	38,87	0.0001
Model	1,33E+07	11	1,21E+06	13,51	0.0001
A- Volume solvente					
(mL)	2,47E+06	1	2,47E+06	27,51	0,0004
AC	1,81E+06	2	9,049+05	10,09	0,004
A^2	1,17E+06	1	1,17E+06	13,01	0,0048
BC	1,48E+06	2	7,39E+05	8,24	0,0077
C- TIPO DE					
ESTABILIZANTE	1,13E+06	2	5,64E+05	6,28	0,0171
B^2	7,22E+05	1	7,22E+05	8,05	0,0176
Falta de ajuste	6,660+05	5	1,33E+05	2,88	0,1351
B- Estabilizante %	2,10E+05	1	2,10E+05	2,33	0,1575

Resíduos	8,97E+05	10	89705,79
Erro puro	2,31E+05	5	46215,83
Total	1,42E+07	21	

GL: grau de liberdade; SQ (Aj.): Soma dos quadrados ajustados; MQ: Média quadrática, Valor-F: F estatístico; Valor-P: nível de significância.
Fonte: autor

Os resultados gráficos de superfície de resposta do modelo (figura 6) e do melhor estabilizante PVA (figura 7). Apesar do estudo de otimização ser capaz de avaliar qual a relevância de cada fator para a variável resposta DMH e apresentar um R^2 ajustado com valor (0,8676) que indica um bom ajuste ao modelo, a diferença entre o valor do R^2 ajustado do modelo e do R^2 predito (0,3292) indica que o modelo não é capaz de realizar predições adequadas sobre novos dados (Seegobin *et al.*, 2024).

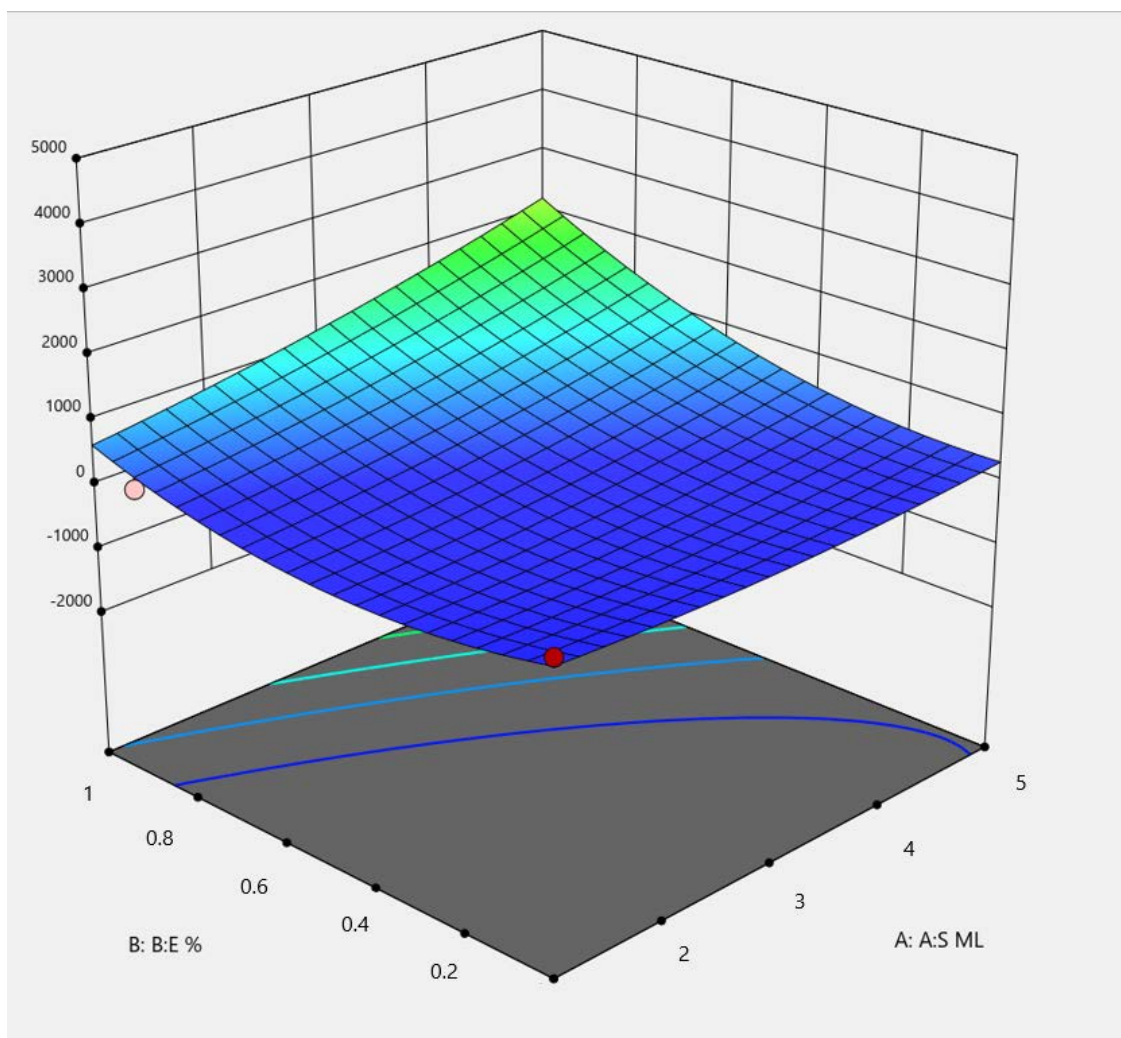


B: B:E% = Fator B: Concentração de estabilizante (%), A: A:S ML = Fator A: Volume de anti-solvente (mL).

Figura 6: Gráfico de superfície de resposta 3D do modelo para a variável resposta DHM. Fonte: autor

Os nanocristais F6 apresentaram melhores valores de DHM e PDI, porém, devido à instabilidade em suspensão foi realizada a liofilização visando melhorar a estabilidade do nanossistema. Os líofilos sem trealose apresentaram aparência de “bolo” liofilizado bem estruturado com caráter esponjoso e apresentaram fácil ressuspensão sob vórtex. Já os nanocristais contendo 5% trealose apresentaram-se como um pó quebradiço facilmente ressuspensão com auxílio de vórtex. Para ambas as formulações (líofilos com e sem

trealose) foi realizada a ressuspensão sob mesma concentração dos nanocristais e utilizada a mesma diluição que o estudo de otimização para leitura em Zetasizer. Os resultados do estudo de estabilidade estão na tabela 4.



B: B:E% = Fator B: Concentração de estabilizante (%), A: A:S ML = Fator A: Volume de anti-solvente (mL).

Figura 7: Gráfico de superfície de resposta 3D do PVA para a variável resposta DHM. Fonte: autor

Os nanocristais pré - liofilização, figura 6, Dia 1, apresentam DHM de $258,8 \pm 5,2$ nm, PDI de $0,04 \pm 0,03$ e potencial Zeta de $-7,93$ mV. Após 90 dias, os nanocristais liofilizados sem trealose apresentaram DHM de $256 \pm 10,2$ nm e PDI de $0,17 \pm 0,07$, já os nanocristais liofilizados contendo 5% de trealose apresentaram DHM de $250,5 \pm 6,8$ nm e PDI de $0,04 \pm 0,01$ no Dia 90. Os resultados não passaram no teste de normalidade dos dados, logo foram submetidos a teste estatístico de Mann-Whitney obtendo como valor-

p (0,310) e (0,003) para HDM e PDI respectivamente. Com isso demonstrou-se que para a análise de PDI há diferença significativa entre os nanocristais liofilizados com trealose e sem trealose. A Instabilidade física é uma problemática para nanopartículas em forma de suspensão. A alta proporção de área de superfície para volume cria alta energia livre na superfície da partícula, devido a isso, as moléculas da superfície interagem com partículas vizinhas em uma tentativa de diminuir a energia livre e aumentar a estabilidade termodinâmica. A liofilização utiliza da sublimação de gelo sobre baixa pressão para remover água da amostra, diminuindo assim a movimentação e interação entre partículas, o uso de crioprotetores, sendo os mais comuns os dissacarídeos como a trealose. Os crioprotetores formam uma matriz vítrea sob baixas temperaturas, esta matriz se deposita na superfície ou membrana das nanopartículas reduzindo sua interação (Gatto; Najahi-Missaoui, 2023).

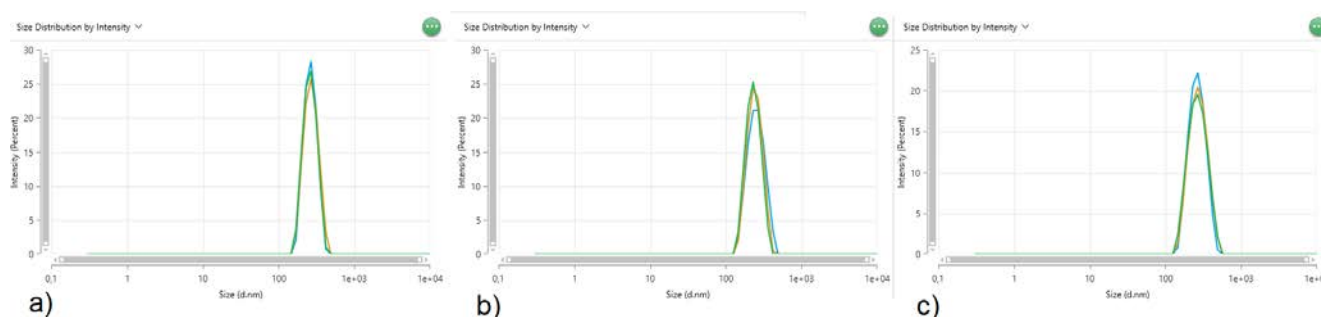


Figura 8: Gráfico de distribuição por intensidade de nanocristais a) pré liofilizados b) liofilizados sem trealose (D90) c) liofilizados com 5% trealose (D90). Fonte: autor

Devido a adequação ($PDI < 0,3$) dos nanocristais liofilizados sem trealose e DHM próximo dos líofilos acrescidos de trealose, foi escolhido para dar continuidade com os estudos de caracterização e atividade biológica a formulação liofilizada sem trealose.

Tabela 4: Diâmetro hidrodinâmico médio e PDI do estudo de estabilidade dos nanocristais liofilizados

Amostra	Dia	DHM (nm)	PDI
Nanocristais + trealose	pre-liofilização	252,1±14,2	0,04±0,03
Nanocristais + trealose	D7	269±4,4	0,04±0,03
Nanocristais + trealose	D15	263±17,9	0,07±0,05

Nanocristais + trealose	D30	258,4±2,6	0,04±0,02
Nanocristais + trealose	D60	246,7±5,1	0,06±0,04
Nanocristais + trealose	D90	250,5±6,8	0,04±0,02
Nanocristais s/ trealose	pre-liofilização	252,1±14,2	0,04±0,03
Nanocristais s/ trealose	D7	280,2±26,2	0,16±0,07
Nanocristais s/ trealose	D15	265,5±20,3	0,13±0,08
Nanocristais s/ trealose	D30	266,2±15,6	0,14±0,11
Nanocristais s/ trealose	D60	259,1±14,7	0,16±0,09
Nanocristais s/ trealose	D90	256±10,2	0,17±0,07

Fonte:autor

5.2 Caracterização físico-química dos nanocristais de 6CN10

5.2.1 Difração de Raios-X (DRX)

Os difratogramas são fundamentais para a caracterização de nanopartículas, pois permitem identificar a estrutura cristalina e os componentes presentes no material. Essas informações podem corresponder a informações importantes com respeito a solubilidade e dissolubilidade de uma substância.

Os Difratogramas dos componentes PVA e dos nanocristais de 6CN10 estão expressos na figura 9. O difratograma do PVA apresentou picos em 19.6° e 40.4° característicos do estado cristalino do polímero (Wang *et al*, 2007; Qian *et al.*, 2000; Zhang; Zhang, 2020). O difratograma dos nanocristais de 6CN10 apresentaram picos do PVA intensamente reduzidos e largos em comparação ao material puro. O 6CN10 possui um difratograma com picos em 9°, 12°, 14°, 16°e 26 alongados e finos, sendo característicos de uma substância cristalina como elucidado por Eleamen *et al* (2017).

O difratograma do 6CN10 livre enfrentou problemas em sua aquisição e não foi possível ser realizado a tempo desta dissertação.

É possível observar que o nanocristal não apresenta picos característicos como esperado de um material cristalino, sugerindo que pode ter ocorrido uma amorfização do 6CN10, durante o processo de formação dos nanocristais. Os materiais cristalinos

apresentam estrutura organizada e compactada geralmente requisitando mais energia para romper as interações da rede cristalina tendendo a reduzir sua solubilidade, porém, conferindo maior estabilidade termodinâmica ao composto. Materiais amorfos possuem maior desorganização em sua estrutura facilitando a penetração de solvente e aumento sua solubilidade, porém, devido a sua elevada reatividade, possuem menor estabilidade (AINUROFIQ *et al.*, 2021).

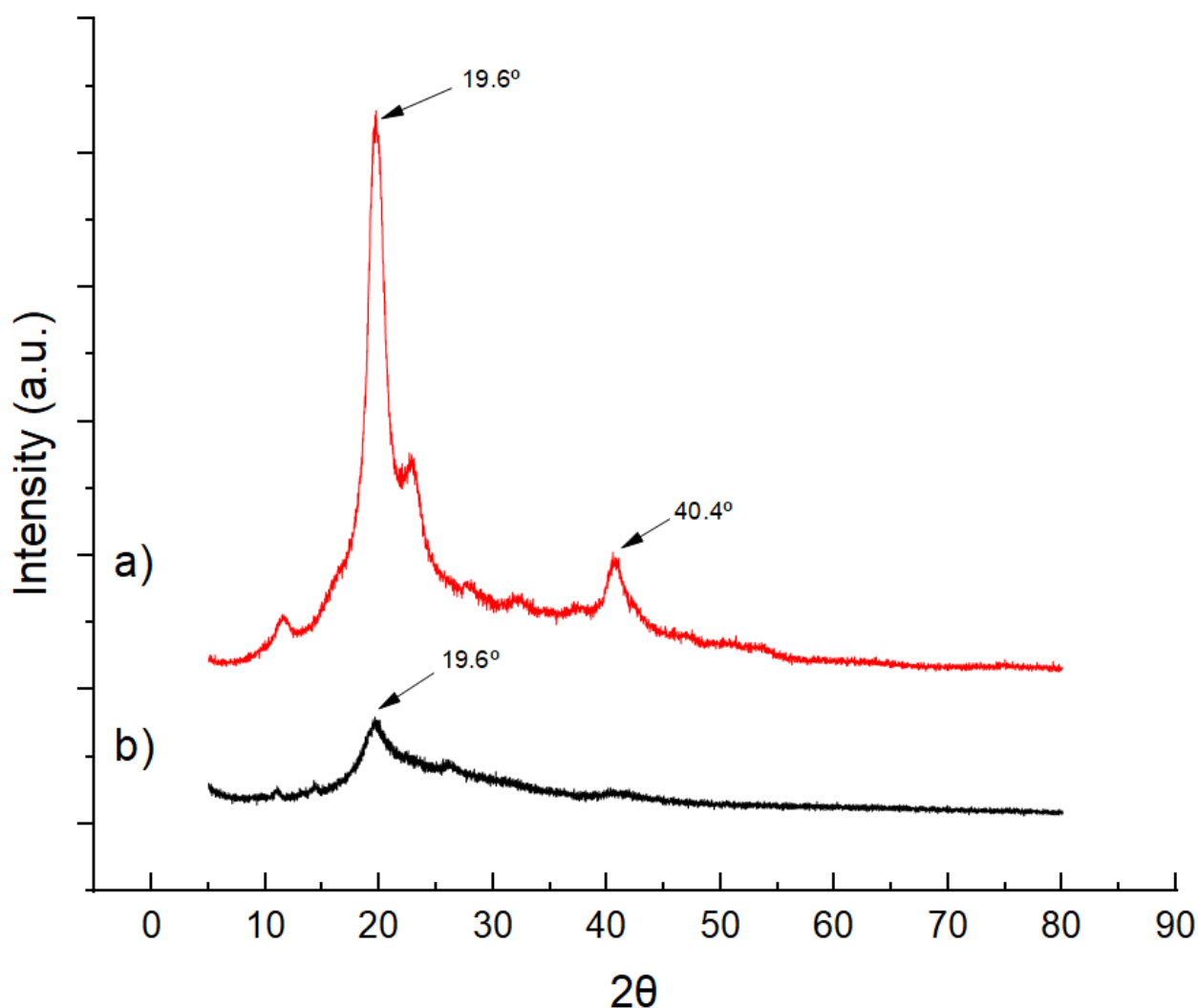


Figura 9: Difratogramas do a) PVA b) Nanocristais de 6CN10. Fonte: autor

5.2.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

O estudo de espectroscopia na região do infravermelho auxilia a identificar possíveis interações químicas entre os componentes em uma formulação ao

compararmos os padrões de picos entre os componentes isolados e a formulação, sendo assim, possível identificar a formação de novas ligações químicas. A figura 10 apresenta os espectros de FTIR do, PVA, 6CN10 e dos nanocristais.

O espectro FTIR do 6CN10 mostra a presença das principais bandas características de estiramento C-H (alifáticos e aromáticos) em 2850-3071 cm^{-1} , o estiramento $\text{C}\equiv\text{N}$ em 2222 cm^{-1} e as vibrações de estiramento simétrico e assimétrico do grupo nitro (NO_2) em 1533 e 1343 cm^{-1} . O espectro de FTIR do 6CN10 encontrado está de acordo com o descrito na literatura (Eleamen *et al.*, 2017).

Para o PVA, pode-se observar claramente as bandas características associadas aos grupos hidroxila (-OH) em 3278 e (-CO) de álcoois 1085 cm^{-1} , devido a vibração de estiramento. As bandas em 2922 e 2892 cm^{-1} correspondem ao estiramento assimétrico e simétrico dos grupos metileno, e outras bandas características em 1412, 1326 e 820 cm^{-1} correspondem ao balanço do CH_2 , à oscilação do CH e ao estiramento da ligação C-C, respectivamente. Os espectros de FTIR de PVA encontrados estão de acordo com os presentes na literatura (Kovtun; Casas; Cuberes, 2024; Flores-Arriaga *et al.*, 2021; Zhang; Zhang, 2020).

No espectro dos nanocristais é possível observar que há um mascaramento dos picos característicos do 6CN10 (2222, 1533 e 1343 cm^{-1}), esse efeito pode se dar devido a elevada proporção (15:1) entre o PVA e o 6CN10, devido a essa restrição na visualização dos picos, foi realizada espectroscopia de Raman. Semelhante resultado foi encontrado em estudo onde a proporção de citrato de tamoxifeno para o ácido polilático (PLA) foi de 1:10, proporção menor entre polímero e fármaco observada nesse trabalho (Altmeyer *et al.*, 2016). Em estudo anterior relação semelhante também foi encontrada com o mascaramento dos picos de AMTAC-01 sendo mascarados em nanopartículas de PLA devido a elevada proporção (1:25) entre PLA e AMTAC-01 (Melo, 2018)

Ademais, não foi detectado nenhum pico adicional no espectro dos nanocristais de 6CN10, indicando que não houve formação de novas ligações químicas.

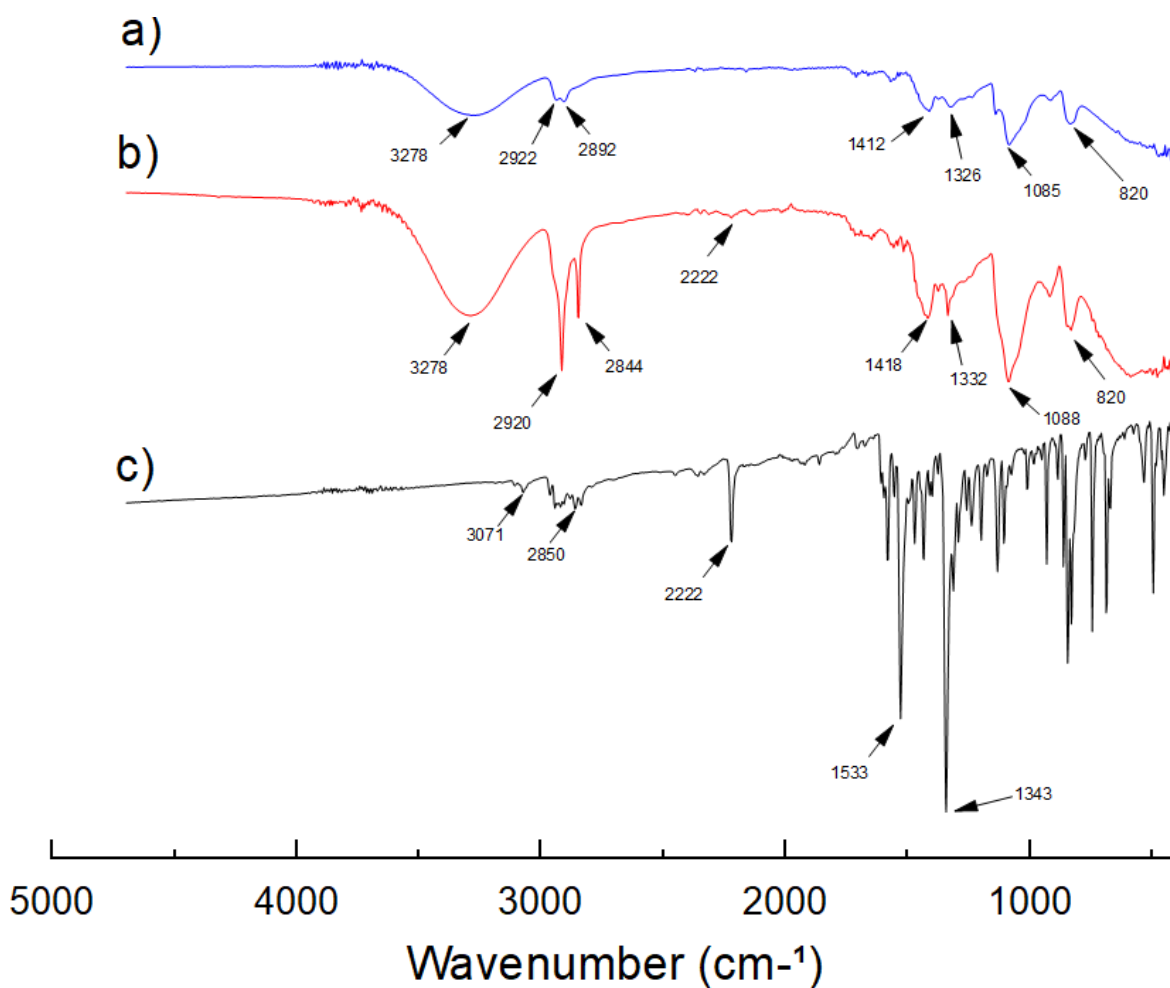


Figura 10: Espectros de FTIR de a) PVA, b) Nanocristais de 6CN10, c) 6CN10 livre. Fonte: autor

5.2.3 Espectroscopia de Raman

A técnica de Raman é uma espectroscopia molecular vibracional baseada no espalhamento inelástico da luz, que permite a análise de vibrações moleculares simétricas de grupos não polares e ligações homoatômicas, como S=S, S-S, N=N, C=C e O=O. Em contraste, a técnica de FTIR é mais adequada para estudar vibrações assimétricas, grupos polares e ligações heteroatômicas, como C=O, O-H e H-Cl.

Devido a isso, a espectroscopia de Raman apresenta como vantagem o silenciamento ou reduzida intensidade das ligações presentes na estrutura do PVA quais sobrepõem-se as vibrações presentes na estrutura do 6CN10 como relatado por Eleamen

et al (2017), onde as bandas características das moléculas de ciclodextrina foram atenuadas em comparação as pertencentes ao 6CN10.

Na figura 11, estão representados os espectros dos componentes PVA e 6CN10 e dos nanocristais de 6CN10.

Em acordo com o encontrado na literatura (Liao *et al*, 2015; Zhang; Zhang, 2020; Celebioglu *et al.*, 2014), o PVA apresenta seus picos característicos em 855, 923, 1096, 1150, 1372, 1442 e 2910 cm^{-1} . O pico em 2910 cm^{-1} corresponde às vibrações de estiramento de $-\text{CH}_2$. O pico em 1442 cm^{-1} corresponde às vibrações de estiramento do grupo $-\text{OH}$. O pico em 1372 cm^{-1} corresponde à vibração de dobramento C-H e O-H. O pico em 1150 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento C-O e C-C. O pico em 1096 cm^{-1} corresponde ao estiramento C-O e dobramento O-H. O pico em 917 cm^{-1} corresponde ao estiramento C-C. Já o pico em 855 cm^{-1} corresponde a vibração de estiramento C-C e CH_2 .

Os picos correspondentes ao 6CN10 apresentam-se de acordo com os encontrados em estudo anterior por Eleamen *et al* 2017. A análise dos nanocristais demonstra que a formulação dos nanocristais não alterou as ligações químicas presentes no 6CN10, ocorrendo apenas redução na intensidade dos sinais, fenômeno que também ocorreu na formulação de complexos de inclusão de 6CN10 Eleamen *et al* 2017.

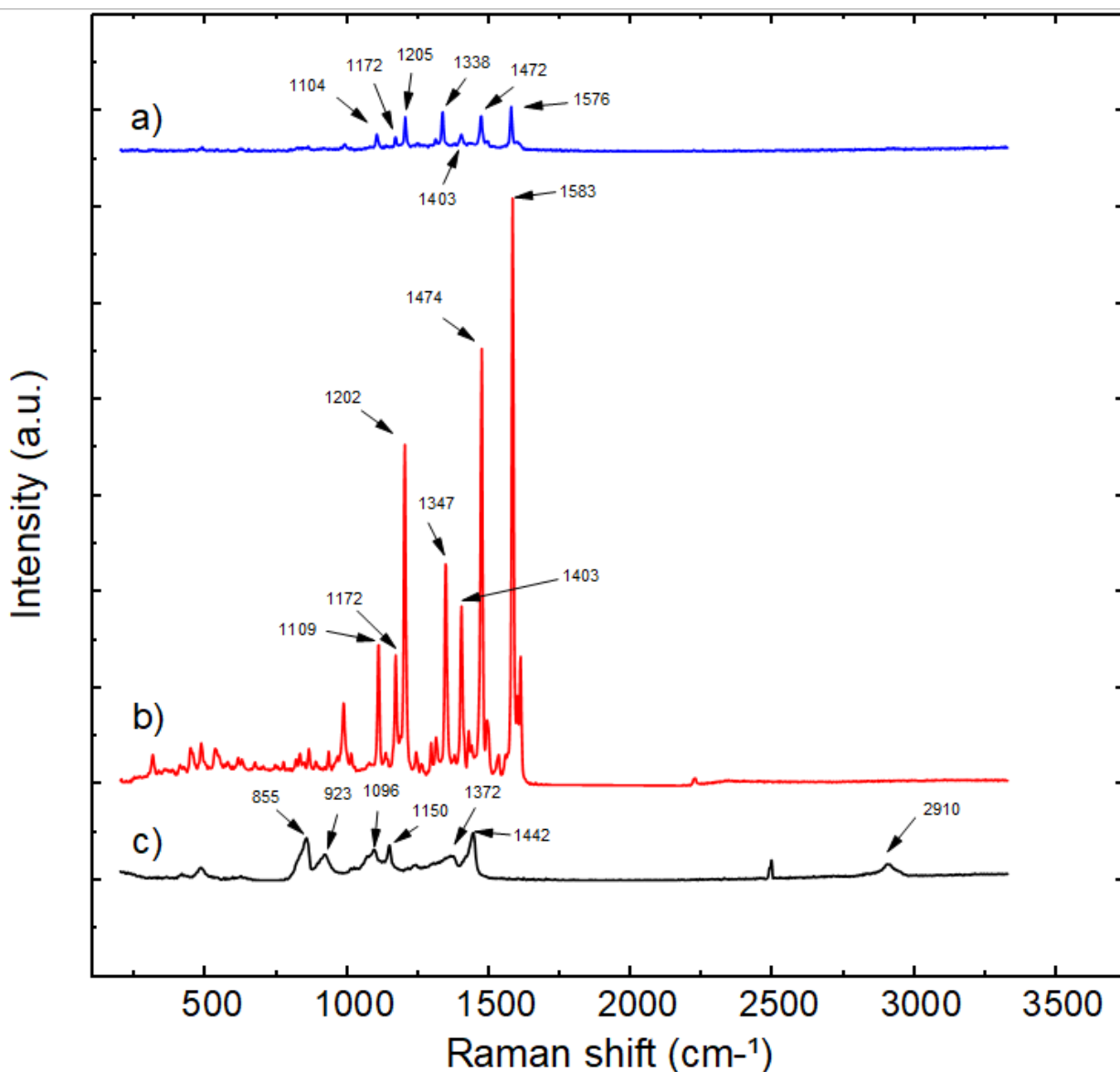


Figura 11: Espectros de Raman de a) Nanocristais de 6CN10, b) 6CN10 livre, c) PVA. Fonte: autor

5.2.4 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Como pode ser observado no espectro de ressonância magnética nuclear de ¹H do 6CN10 (Figura 12), a análise apresentou um singlete com deslocamento de 9,188 ppm sugestivo para grupamento (CH=N) da imina, os dupletos seguintes em 9,180 e 9,68 e 9,56 e 9,45 ppm correspondem aos prótons aromáticos do anel nitrobenzeno. Os multipletos restantes são referentes ao anel tetraidrobenzo[b]tiofeno.

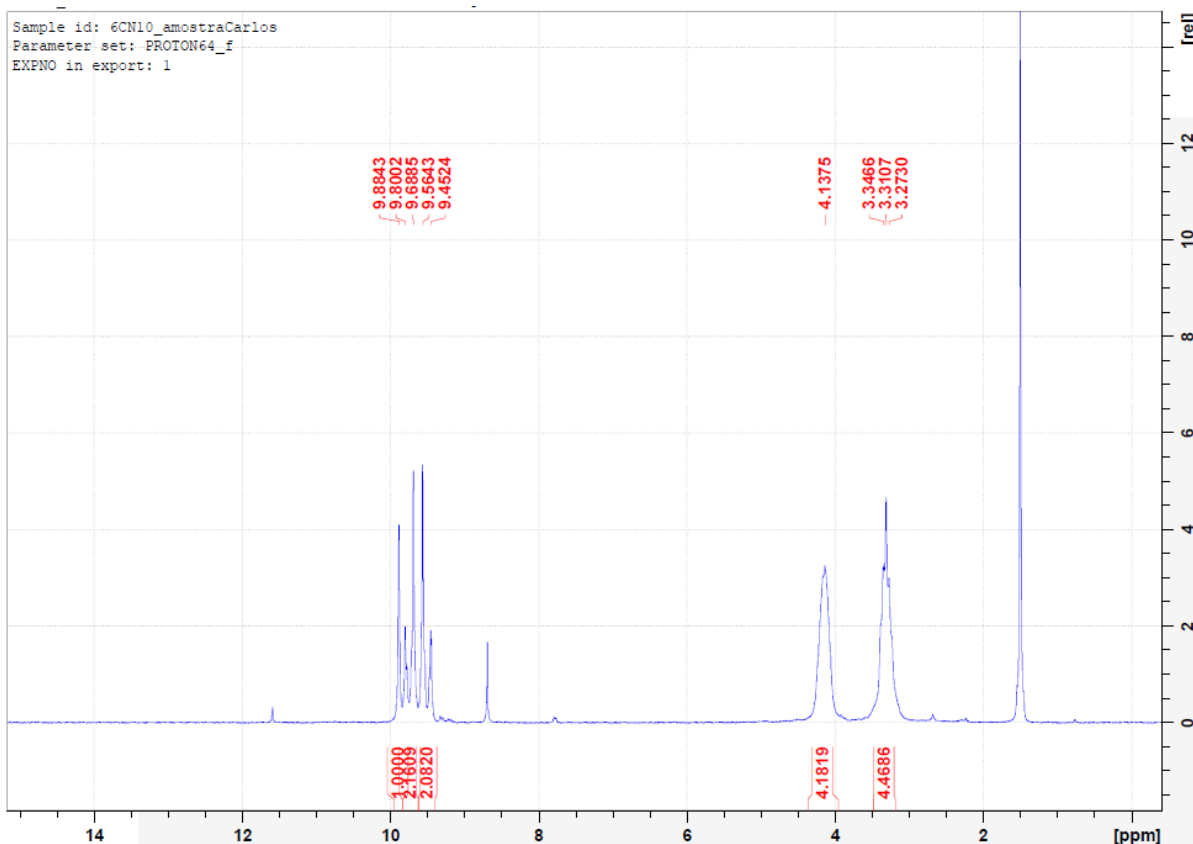


Figura 12: Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H do composto 6CN10. Fonte: autor

No espectro de RMN de ^1H do PVA (Figura 13), a análise apresentou picos consistentes com a literatura (Budhlall *et al*, 2003), indicando picos correspondentes ao H_β do etenol em 1.41 ppm. O pico em aproximadamente 2.5 ppm corresponde ao solvente DMSO utilizado. A detecção de um pico estreito em ~ 3.2 ppm corresponde a fração de água presente em PVA parcialmente hidrolisados quais apresentam caráter higroscópico. Devido à baixa frequência (80MHz) do RMN utilizado para a análise, ocorre a junção dos picos correspondentes aos prótons da hidroxila na região entre 3.83 e ~ 4.53 ppm.

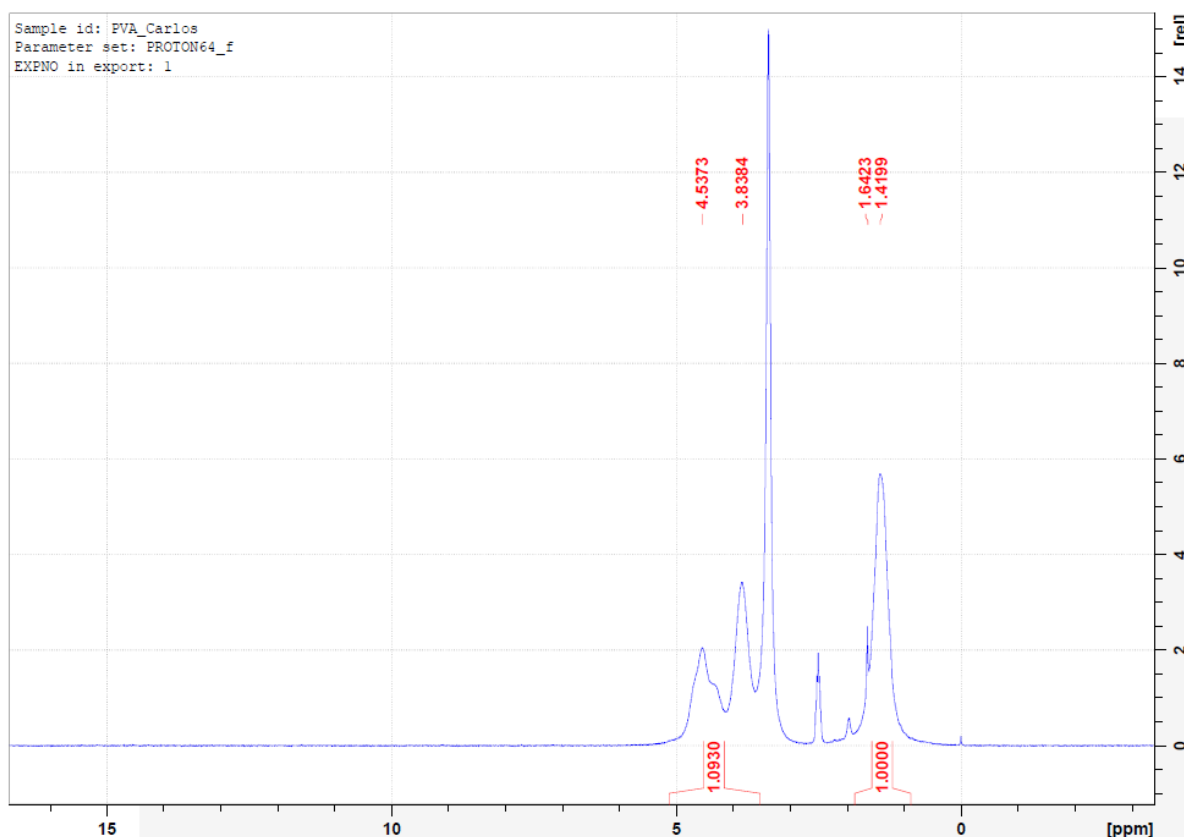


Figura 13: Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H do estabilizante PVA. Fonte: autor

A partir da análise do espectro dos nanocristais de 6CN10 (Figura 14) podemos analisar a presença dos picos e seus respectivos dupletos relacionados aos prótons aromáticos do anel nitrobenzeno em 8.46 e 8.34 e 8.25 e 8.14 ppm e é possível visualizar o singlete referente ao próton do grupamento imina em 8.8 ppm, porém, é notória a redução da intensidade dos picos em relação ao espectro do 6CN10.

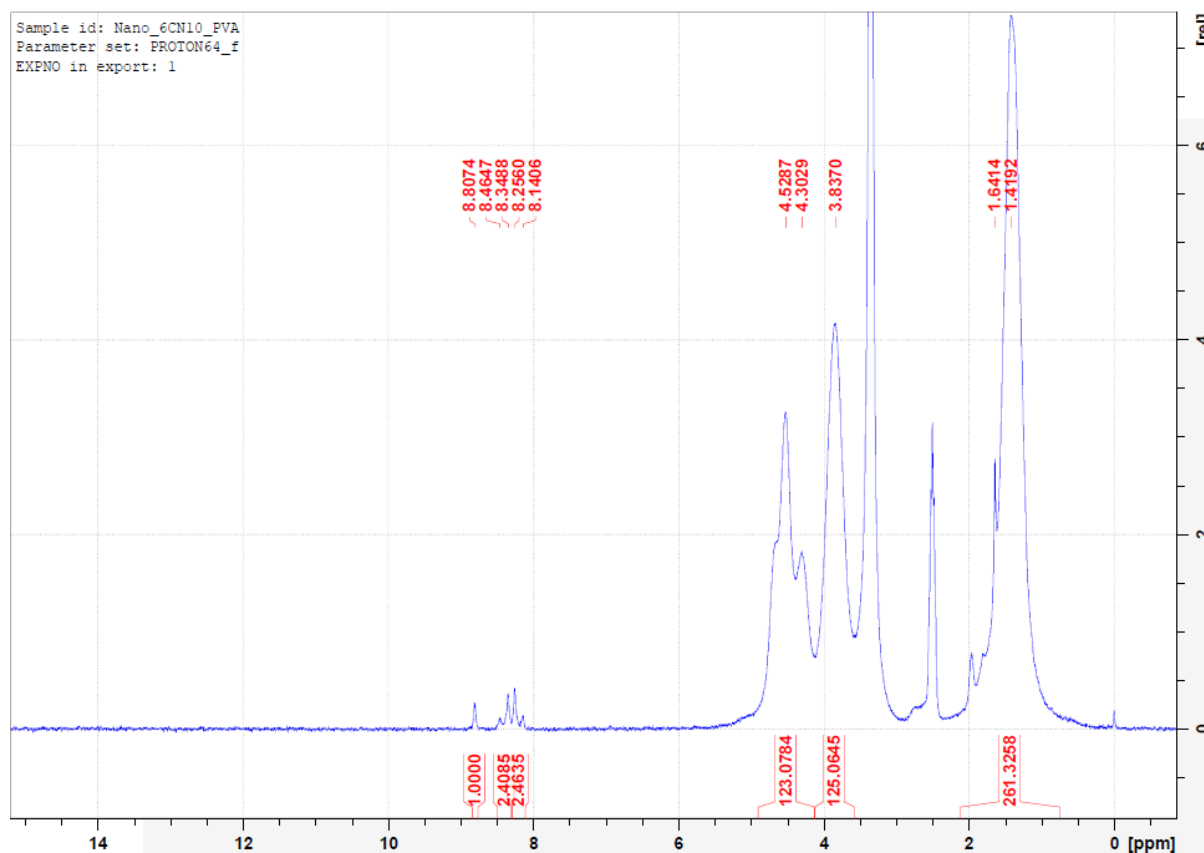


Figura 14: Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H dos nanocristais de 6CN10. Fonte: autor

5.3 Determinação da solubilidade em água dos nanocristais de 6CN10

No estudo realizado, o 6CN10 livre apresentou solubilidade em água de 1,9 $\mu\text{g/mL}$, indicando uma baixíssima solubilidade em água. Os nanocristais de 6CN10 desenvolvidos apresentaram um acréscimo na solubilidade na ordem de 7 vezes (13.54 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados encontrados colaboram com os encontrados na literatura onde a produção de nanocristais de drogas com baixa solubilidade levam a um incremento de solubilidade (Chiarappa et al, 2017; Malviya et al, 2021).

5.4 Estudo de atividade fungicida

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

Na técnica de microdiluição, os liófilos de 6CN10 apresentaram fácil redispersão em 5% DMSO seguidos de diluição até concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Após plaqueamento, os poços com nanocristais de 6CN10 apresentaram-se límpidos e sem

presença de precipitado que dificultassem a leitura da placa. Os poços contendo solução de 6CN10 livre apresentaram presença de precipitado visuais, mas que não dificultaram a leitura dos resultados da CIM.

Para a avaliação da CIM dos compostos avaliados, foi considerada a inibição de 100% em relação aos poços em relação aos poços controle. Para determinar a CFM dos compostos, o conteúdo dos poços que mostraram 100% de inibição no crescimento foram cultivados para o meio SDA em placas de Petri.

Para cada experimento de atividade antifúngica, os controles de inóculos demonstraram crescimento claramente detectável após período de incubação, indicando a viabilidade dos isolados. A Tabela 5 apresenta os valores de CIM encontrados para 6CN10 (fármaco livre), nanocristais de 6CN10 e fármacos padrões (Nistatina ou Anfotericina B).

Tabela 5: Resultados da concentração inibitória mínima µg/mL dos nanocristais de 6CN10 e 6CN10 livre frente a *Candida* spp. e *C. neoformans*

Microrganismos	Moléculas (µg/mL)			Controles	
	6CN10 livre	Nanocristal 6CN10	Polienos	Microrganismos	RPMI
<i>C. neoformans</i> 6895	250	250	0,5*	+	-
<i>C. neoformans</i> 6901	250	250	0,25*	+	-
<i>C. neoformans</i> 6907	125	125	0,125*	+	-
<i>C. neoformans</i> 6909	125	125	0,125*	+	-
<i>C. neoformans</i> LM-260	*	*	0,75**	+	-
<i>C. neoformans</i> ATCC 66031	*	*	0,75**	+	-
<i>C. neoformans</i> LM-1907	*	*	0,75**	+	-
<i>C. neoformans</i> LM-287	*	*	0,75**	+	-
<i>C. neoformans</i> LM-108	*	*	0,75**	+	-
<i>C. auris</i> 01132023	*	125	1,5**	+	-
<i>C. auris</i> B11903C	*	*	-	+	-
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	*	*	1,5**	+	-

(*): Anfotericina B; (**) Nistatina; (+) Crescimento do microrganismo; (-) Não houve crescimento do microrganismo; (*) CIM superior à maior concentração avaliada.

Os resultados da CIM demonstram que o 6CN10 livre não foi ativo nas concentrações testadas para *Candida* spp., assim como os nanocristais de 6CN10 com exceção contra a *C. auris* 01132023, exibindo uma CIM de 125 µg/mL.

A avaliação de ambos os tratamentos com base no 6CN10 frente a linhagens de *C. neoformans* indica uma possível resistência linhagem dependente, visto que as linhagens *C. neoformans* 6895, *C. neoformans* 6901 apresentaram valores de CIM de 125 µg/mL e *C. neoformans* 6907 e *C. neoformans* 6909 apresentaram valores de CIM de 250 µg/mL enquanto as linhagens *C. neoformans* LM-108, *C. neoformans* LM-260, *C. neoformans* LM1907 e *C. neoformans* ATCC 66031 não se apresentaram suscetíveis aos tratamentos, essa variação pode se dar devido as variações genéticas de cada linhagem quais podem conferir resistências a medicamentos, visto que as linhagens suscetíveis são derivadas de um hospital localizado no estado de Pernambuco e as não suscetíveis em hospital da Paraíba indica uma diferença no padrão de resistência à antifúngicos entre linhagens de *C. neoformans* entre estados.

Os resultados encontrados para *C. neoformans* se encontram em acordo com o observado por Eleamen *et al* (2017) e Neves *et al* (2020) em que as CIM para as linhagens testadas variaram entre 250 e 125 µg/mL. Já as linhagens *C. neoformans* LM-260, *C. neoformans* ATCC 66031 *C. neoformans* LM-1907 *C. neoformans* LM-287 e *C. neoformans* LM-108 não apresentaram suscetibilidade ao 6CN10 livre ou nanocristais de 6CN10 nas concentrações avaliadas.

Os resultados de CFM Tabela 6 apresentam as linhagens que apresentaram atividade no teste de CIM para ao menos um dos tratamentos. A avaliação da concentração fungicida foi feita com base na inibição de 100% do crescimento fúngico de alíquotas derivadas dos poços da placa de 96 poços utilizadas na avaliação da CIM plaqueados sob placas de Petri contendo meio de cultura SDA.

Nas linhagens avaliadas de *C. neoformans* os nanocristais formulados não apresentaram atividade fungicida nas concentrações avaliadas enquanto o fármaco livre apresentou atividade fungicida visto também que a relação entre CIM e CFM foi próxima de 1. Já para a linhagem *C. auris* 01132023 apenas os nanocristais apresentaram valor de CIM, porém, as placas apresentaram crescimento fúngico no teste de CFM.

Tabela 6: Resultados da concentração fungicida mínima dos nanocristais de 6CN10 e 6CN10 livre frente a *Candida* spp. e *C. neoformans*

Microrganismos	6CN10 livre	CFM/CIM	Nanocristal 6CN10
<i>C. neoformans</i> 6895	250	1	*
<i>C. neoformans</i> 6901	250	1	*
<i>C. neoformans</i> 6907	250	2	*
<i>C. neoformans</i> 6909	125	1	*
<i>C. auris</i> 01132023	-		*

Fonte: autor

(-) Não foi avaliado; (*) CFM superior à maior concentração avaliada.

5.5 Avaliação da ligação entre alvos moleculares fúngicos e o 6CN10 através de *docking*.

A tabela 7 e a Figura 15 apresentam as energias livres de ligação estimadas, quantificadas como afinidade em kcal/mol, para três ligantes distintos — 6CN10, Caspofungina e Fluconazol — interagindo com um painel de sete diferentes proteínas alvo. Os valores de afinidade, derivados do Autodock Vina, servem como uma medida da espontaneidade e força da interação ligante-proteína, com valores mais negativos indicando uma afinidade mais alta e, portanto, uma ligação termodinamicamente mais favorável e forte.

Tabela 7. Afinidade de ligação (kcal/mol) dos ligantes com as proteínas-alvo.

Proteína-alvo	Nome	Ligante	Afinidade de ligação (kcal/mol)
5TZ1 conformação 1	Esterol 14- α -demetilase	6CN10	-9,621
		Fluconazol	-8,552
5TZ1 conformação 2		6CN10	-9,449

		Fluconazol	-8,588
8JZN (porção extracelular)	1,3- β -D-glucana sintase	6CN10	-7,035
		Caspofungina	-5,886
8JZN (porção transmembranar)		6CN10	-8,827
		Caspofungina	-8,337
1EQP	Exo- β -1,3-glucanase	6CN10	-9,235
5UIV	Timidilato quinase	6CN10	-10,269
ERG24	Esterol 14- δ -redutase	6CN10	-9,039

Fonte: autor

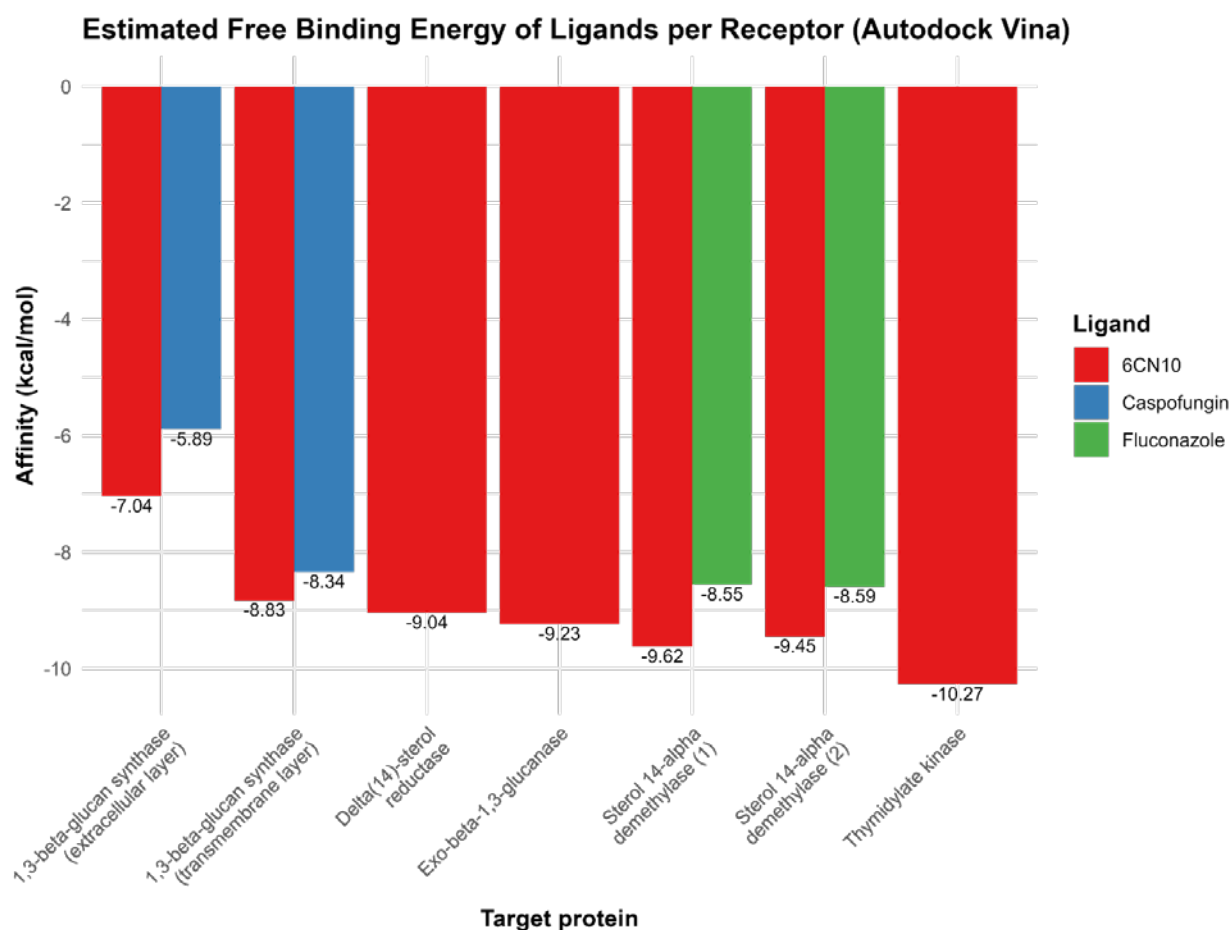


Figura 15. Gráfico de barras - Afinidade de ligação (kcal/mol) dos ligantes com as proteínas-alvo. Fonte: autor.

Para a proteína Esterol 14- α -demetilase (5TZ1), em ambas as conformações, o 6CN10 possui uma afinidade de ligação superior ao Fluconazol, sugerindo uma interação mais estável e favorável. Conforme o relatório do Uniprot (P10613), esta enzima desempenha um papel crítico no terceiro módulo da via de biossíntese do ergosterol, sendo o ergosterol o principal componente de esterol nas membranas fúngicas que participa de uma variedade de funções. Esse processo envolve a síntese do ergosterol por meio de reações consecutivas que ocorrem principalmente na membrana do retículo endoplasmático (Hargrove *et al.*, 2017).

Já na porção extracelular da 1,3- β -glucana sintase, o 6CN10 apresenta maior afinidade de ligação em comparativo com a Caspofungina. Esta enzima é uma proteína transmembrana, responsável pela síntese do 1,3- β -glucana, componente primário da parede celular fúngica, estando envolvida diretamente na manutenção e remodelação da parede celular (Zhao *et al.*, 2023).

A ERG24 faz parte do terceiro módulo da via de biossíntese do ergosterol que inclui as últimas etapas da via - a redução da ligação dupla C14=C15 do 4,4-dimetil-colesta-8,14,24-trienol para produzir 4,4-dimetil-colesta-8,24-dienol (Jia *et al.*, 2002).

Já a exo- β -1,3-glucanase é necessária para a integridade da parede celular. As beta-glucanases participam do metabolismo do beta-glucana, o principal componente estrutural da parede celular, também podem atuar como transglicosilases. Funcionam para entregar glucana da célula para a matriz extracelular e impactam no remodelamento de glucana da parede celular das. Além disso, estão envolvidas na adesão célula-substrato e célula-célula (Tsai *et al.*, 2011; Taff *et al.*, 2012).

Por fim, em comparativo dentre todas as proteínas-alvo testadas, a menor afinidade de ligação reportada é entre o 6CN10 e a timidilato quinase (5UIV), no valor de -10.27 kcal/mol.

É importante ressaltar que ligante 6CN10 consistentemente demonstra afinidades de ligação elevadas para todas as proteínas alvo listadas, demonstrando que apresenta um perfil de ligação favorável para todas as proteínas alvo investigadas. Visto que o presente estudo de *docking* molecular apresenta resultados preliminares. Para uma compreensão mais abrangente, estudos experimentais adicionais são necessários para investigar e comprovar a interação do 6CN10 com seus alvos. Portanto, destacam-se como abordagens a serem implementadas no futuro do projeto: *fishing docking*, *docking* flexível e hidratado e ensaios de dinâmica molecular.

6. CONCLUSÃO

A técnica de nanoprecipitação por anti-solvente produziu nanocristais de 6CN10 com tamanho adequado à faixa de tamanho de nanocristais. A técnica de otimização por superfície de resposta identificou quais fatores influenciam no DHM dos nanocristais de 6CN10 desenvolvidos. Os nanocristais desenvolvidos, após liofilização, foram estáveis por ao menos 90 dias.

A caracterização do estado físico-química das partículas (Raman, DRX e FTIR) revelaram que no processo de formação dos nanocristais o derivado 2-amino-tiofeno não formou novas ligações com o polímero PVA e que os nanocristais encontram-se em estado físico amorfo/semicristalino. A formulação otimizada apresentou incremento da solubilidade do 6CN10 na ordem de 7x em relação ao fármaco puro.

Os estudos de atividade fungicida indicam que os nanocristais de 6CN10 apresentam valor de CIM semelhante ao 6CN10 puro nos testes realizados contra linhagens de *C. neoformans* 6895, *C. neoformans* 6901, *C. neoformans* 6907, *C. neoformans* 6909. Nos testes realizados contra linhagens de *Candida albicans*, ambos os tratamentos se mostraram inativos nas concentrações avaliadas. Os nanocristais apresentaram uma melhor atividade frente a linhagem de *C. auris* em relação ao 6CN10 puro. Os nanocristais desenvolvidos não apresentaram atividade fungicida no estudo de CFM, enquanto o fármaco puro apresentou atividade fungicida.

Os resultados do *docking* molecular foram inconclusivos, necessitando de complementação por dinâmica molecular para melhor avaliar a estabilidade da ligação entre as enzimas alvos e o 6CN10.

Por fim, almeja-se dar continuidade com o estudo da atividade fungicida dos nanocristais contra linhagens de *C. auris* e avaliar a atividade antifúngica do nanosistema desenvolvido em solução contendo apenas água ultrapura tipo II, visando evitar o uso de DMSO na solubilização do sistema em testes de CIM.

REFERÊNCIAS

8 CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 769 Approved Standard – Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory 770 Standards Institute, 2008.

AINUROFIQ, Ahmad et al. A review on solubility enhancement methods for poorly water-soluble drugs. **Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 1, p. 137-147, 2021.

ALEKSANDER, S. et al. The Gene Ontology Knowledgebase in 2023. **Genetics**, v. 224, n. 1, 3 mar. 2023.

ALKHOLIEF, Musaed et al. Effect of solvents, stabilizers and the concentration of stabilizers on the physical properties of poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles: Encapsulation, in vitro release of indomethacin and cytotoxicity against HepG2-cell. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 4, p. 870, 2022.

ALTMAYER, Clescila et al. Tamoxifen-loaded poly (L-lactide) nanoparticles: development, characterization and in vitro evaluation of cytotoxicity. **Materials Science and Engineering: C**, v. 60, p. 135-142, 2016.

ARASTEHFAR, Amir et al. Drug-resistant fungi: an emerging challenge threatening our limited antifungal armamentarium. **Antibiotics**, v. 9, n. 12, p. 877, 2020.

ARENDRUP, Maiken Cavling; PATTERSON, Thomas F. Multidrug-Resistant Candida: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 216, n. suppl_3, p. S445–S451, 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article/216/suppl_3/S445/4107052>. Acesso em: 6 dez. 2019.

BEEKMAN, Chapman N. et al. Comparative genomics of white and opaque cell states supports an epigenetic mechanism of phenotypic switching in *Candida albicans*. **G3**, v. 11, n. 2, p. jkab001, 2021.

JARVIS, Maria; KRISHNAN, Vinu; MITRAGOTRI, Samir. Nanocrystals: A perspective on translational research and clinical studies. **Bioengineering & translational medicine**, v. 4, n. 1, p. 5-16, 2019.

BONGOMIN, Felix; GAGO, Sara; OLADELE, Rita; et al. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, p. 57, 2017.

BOUZ, Ghada; DOLEŽAL, Martin. Advances in antifungal drug development: an up-to-date mini review. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 12, p. 1312, 2021.

BUDHLALL, B. M. et al. Characterization of partially hydrolyzed poly (vinyl alcohol). Effect of poly (vinyl alcohol) molecular architecture on aqueous phase conformation. **Macromolecules**, v. 36, n. 25, p. 9477-9484, 2003.

CHAABANE, Farid et al. Review on antifungal resistance mechanisms in the emerging pathogen *Candida auris*. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 499266, 2019.
CHATTERJEE, Pronoy K.; GUPTA, Bhupender S. (Ed.). Absorbent technology. Elsevier, 2002.

CHIARAPPA, Gianluca et al. Exploring the shape influence on melting temperature, enthalpy, and solubility of organic drug nanocrystals by a thermodynamic model. **Crystal Growth & Design**, v. 17, n. 8, p. 4072-4083, 2017.

CIUREA, Cristina Nicoleta et al. *Candida* and candidiasis—opportunism versus pathogenicity: a review of the virulence traits. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 857, 2020.
CORTÉS, Hernán et al. Non-ionic surfactants for stabilization of polymeric nanoparticles for biomedical uses. **Materials**, v. 14, n. 12, p. 3197, 2021.

DA SILVA, Carolina Maria et al. Candidemia in Brazilian neonatal intensive care units: risk factors, epidemiology, and antifungal resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 817-825, 2023.

DENNING, David W. Global incidence and mortality of severe fungal disease. **The Lancet Infectious Diseases**, 2024.

DUVAUCHELLE, Valentin; MEFFRE, Patrick; BENFODDA, Zohra. Recent contribution of medicinally active 2-aminothiophenes: A privileged scaffold for drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 238, p. 114502, 2022.

ELEAMEN, Giovanna RA et al. Improvement of solubility and antifungal activity of a new aminothiophene derivative by complexation with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 116-125, 2017.

FISHER, Matthew C. et al. Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. **Nature reviews microbiology**, v. 20, n. 9, p. 557-571, 2022.

FLORES-ARRIAGA, Juan Carlos et al. Synthesis of a PVA drug delivery system for controlled release of a Tramadol–Dexketoprofen combination. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 32, n. 5, p. 56, 2021.

FORLI, S. et al. Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. **Nature Protocols**, v. 11, n. 5, p. 905–919, 14 abr. 2016.

GATTO, Matthew S.; NAJAH-MISSAOUI, Wided. Lyophilization of Nanoparticles, Does It Really Work? Overview of the Current Status and Challenges. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 18, p. 14041, 2023.

GIACOMAZZI, Juliana et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 3, p. 145-150, 2016.

GIGLIOBIANCO, Maria Rosa et al. Nanocrystals of poorly soluble drugs: drug bioavailability and physicochemical stability. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 3, p. 134, 2018.

HARGROVE, T. Y. et al. Structural analyses of *Candida albicans* sterol 14 α -demethylase complexed with azole drugs address the molecular basis of azole-mediated inhibition of fungal sterol biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 16, p. 6728–6743, abr. 2017.

HEALEY, Kelley R. et al. Limited ERG11 mutations identified in isolates of *Candida auris* directly contribute to reduced azole susceptibility. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 10, p. 10.1128/aac. 01427-18, 2018.

JACOBSEN, Ilse D.; HUBE, Bernhard. *Candida albicans* morphology: still in focus. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 15, n. 4, p. 327-330, 2017.

JIA, N. et al. *Candida albicans* sterol C-14 reductase, encoded by the ERG24 gene, as a potential antifungal target site. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 4, p. 947–57, abr. 2002.

JUNIOR, Francisco JB MENDONÇA et al. Synthesis and evaluation of the antifungal activity of 2-(substituted-amino)-4, 5-dialkyl-thiophene-3-carbonitrile derivatives. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 30, n. 8, p. 1492-1499, 2011.

KALHAPURE, Rahul S. et al. Nanocrystals for controlled delivery: state of the art and approved drug products. **Expert opinion on drug delivery**, v. 19, n. 10, p. 1303-1316, 2022.

KHAN, Muhammad Ayub et al. Eplerenone nanocrystals engineered by controlled crystallization for enhanced oral bioavailability. *Drug Delivery*, v. 28, n. 1, p. 2510-2524, 2021.

KOVTUN, Ganna; CASAS, David; CUBERES, Teresa. Influence of Glycerol on the Surface Morphology and Crystallinity of Polyvinyl Alcohol Films. **Polymers**, v. 16, n. 17, p. 2421, 2024.

KRIVÁK, R.; HOKSZA, D. P2Rank: machine learning based tool for rapid and accurate prediction of ligand binding sites from protein structure. **Journal of Cheminformatics**, v. 10, n. 1, 14 ago. 2018.

LOPES, José Pedro; LIONAKIS, Michail S. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Virulence**, v. 13, n. 1, p. 89-121, 2022.

MALVIYA, Vedanshu et al. Enhancement of solubility and dissolution rate of atazanavir sulfate by nanocrystallization. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 55, n. 3, p. S672-80, 2021.

MEDEIROS, Mariana Araújo Paulo de et al. Epidemiology and prognostic factors of nosocomial candidemia in Northeast Brazil: A six-year retrospective study. **PLoS One**, v. 14, n. 8, p. e0221033, 2019.

MELO, Camila de Oliveira. Nanopartículas de PLA contendo derivado espiro-acridínico com atividade anticancerígena. 2018.

MOHAMMAD, Imran Shair et al. Drug nanocrystals: Fabrication methods and promising therapeutic applications. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 562, p. 187-202, 2019.

MULLER, Rainer H.; KECK, Cornelia M. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs—a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *Journal of biotechnology*, v. 113, n. 1-3, p. 151-170, 2004.

Nsairat, H.; Lafi, Z.; Al-Najjar, B. O.; et al. How Advanced are Self-Assembled Nanomaterials for Targeted Drug Delivery? A Comprehensive Review of the Literature. **International Journal of Nanomedicine**, v. 20, p. 2133-2161, 2025.

OLIVA, Alessandra et al. Invasive *Candida* infection: epidemiology, clinical and therapeutic aspects of an evolving disease and the role of rezafungin. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 21, n. 9, p. 957-975, 2023.

ORTIZ, Sébastien C.; HULL, Christina M. Biogenesis, germination, and pathogenesis of *Cryptococcus* spores. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 88, n. 1, p. e00196-23, 2024.

PERFECT, John R. The antifungal pipeline: a reality check. **Nature reviews Drug discovery**, v. 16, n. 9, p. 603-616, 2017.

PERLIN, David S; RAUTEMAA-RICHARDSON, Riina; ALASTRUEY-IZQUIERDO, Ana. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. e383–e392, 2017.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. **Protein Science**, v. 30, n. 1, p. 70–82, 22 out. 2020.

PFALLER, M. A. et al. In vitro activity of a Hos2 deacetylase inhibitor, MGCD290, in combination with echinocandins against echinocandin-resistant *Candida* species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 81, n. 4, p. 259-263, 2015.

QUEIROZ, Cibele. Atividade antifúngica e alterações morfoestruturais de derivados de tiofeno frente a isolados de *Candida*. 2023. Dissertação (Mestrado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

REVERCHON, Ernesto; DELLA PORTA, Giovanna. Production of antibiotic micro-and nano-particles by supercritical antisolvent precipitation. **Powder Technology**, v. 106, n. 1-2, p. 23-29, 1999.

ROCHA, Maria Francisca et al. Reframing the clinical phenotype and management of cryptococcal meningitis. **Practical Neurology**, v. 25, n. 1, p. 25-39, 2025.

SALAZAR-HAMM, Paris; TORRES-CRUZ, Terry J. The Impact of Climate Change on Human Fungal Pathogen Distribution and Disease Incidence. **Current Clinical Microbiology Reports**, p. 1-13, 2024.

SARTORI, G. J. Desenvolvimento de nanocristais de efavirenz para incremento do perfil de dissolução. 2016. 99 f. Dissertação (Mestrado em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica) - Instituto de Tecnologia em Fármacos, Fundação Oswaldo Cruz

SEAGLE, Emma E.; WILLIAMS, Samantha L.; CHILLER, Tom M. Recent Trends in the Epidemiology of Fungal Infections. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 35, n. 2, p. 237–260, 2021.

SEYEDMOUSAVI, S. et al. Efficacy of olorofim (F901318) against *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans*, and *A. tanneri* in murine models of profound neutropenia and chronic granulomatous disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 6, p. 10.1128/aac.00129-19, 2019.

SHRIMAL, Preena; JADEJA, Girirajsinh; PATEL, Sanjaykumar. Microfluidics nanoprecipitation of telmisartan nanoparticles: Effect of process and formulation parameters. **Chemical Papers**, v. 75, p. 205-214, 2021.

SILVA, Andressa Daniele Artico. Desenvolvimento de micro e nanocristais de praziquantel racemato e do isômero L-praziquantel. 2020. 169 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Gestão, Pesquisa e Desenvolvimento na Indústria Farmacêutica) - Instituto de Tecnologia em Fármacos / Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.

SINHA, K.; RULE, G. S. The Structure of Thymidylate Kinase from *Candida albicans* Reveals a Unique Structural Element. **Biochemistry**, v. 56, n. 33, p. 4360–4370, 9 ago. 2017.

SPEC, Andrej et al. MSG-10: a phase 2 study of oral ibrexafungerp (SCY-078) following initial echinocandin therapy in non-neutropenic patients with invasive candidiasis.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 74, n. 10, p. 3056-3062, 2019.

TAFF, H. T. et al. A Candida Biofilm-Induced Pathway for Matrix Glucan Delivery: Implications for Drug Resistance. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 8, p. e1002848, 2 ago. 2012.

TORTORANO, Anna Maria et al. Candidemia: evolution of drug resistance and novel therapeutic approaches. **Infection and Drug Resistance**, p. 5543-5553, 2021.

TOLEDO, Amanda Grosselli. Infecções fúngicas em pacientes internados com COVID-19: uma revisão de literatura. 2022.

TSAI, P.-W. et al. Characterizing the role of cell-wall β -1,3-exoglucanase Xog1p in Candida albicans adhesion by the human antimicrobial peptide LL-37. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e21394, 2011.

WATKINS, Richard R. et al. Update on the Pathogenesis, Virulence, and Treatment of Candida auris. **Pathogens and Immunity**, v. 7, n. 2, p. 46, 2022.

WHO. "WHO Fungal Priority Pathogens List to Guide Research, Development and Public Health Action." [www.who.int, 25 Oct. 2022, www.who.int/publications/i/item/9789240060241.](http://www.who.int/publications/i/item/9789240060241)

XUE, Linying et al. Strategies and methods of nanocrystal technology for targeting drug delivery. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 26, n. 6, p. 114, 2024.

ZHANG, Jie; LIU, Minzhuo; ZENG, Zhihong. The antisolvent coprecipitation method for enhanced bioavailability of poorly water-soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 122043, 2022.

ZHAO, C.-R. et al. Structure of a fungal 1,3- β -glucan synthase. **Science Advances**, v. 9, n. 37, 15 set. 2023.

ZHU, YanChun et al. In vitro activity of manogepix against multidrug-resistant and panresistant Candida auris from the New York outbreak. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 11, p. 10.1128/aac.01124-20, 2020.