



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE – UFCG  
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE – CES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS NATURAIS E BIOTECNOLOGIA

ALANA KAROLINE PENHA DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE KD1 CONTRA *Candida* spp.**

CUITÉ-PB

2021

ALANA KAROLINE PENHA DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE KD1 CONTRA *Candida* spp.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia, Centro de Educação e Saúde, da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Naturais e Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia Industrial

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Wylly Araújo de Oliveira

Coorientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dra. Igara Oliveira Lima

CUITÉ-PB

2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE  
Responsabilidade Rosana Amâncio Pereira – CRB 15 – 791

N244a Nascimento, Alana Karoline Penha do.

Avaliação da atividade antifúngica de KD1 contra *Candida* spp. / Alana Karoline Penha do Nascimento. – Cuité: CES, 2021.

49 fl.

Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais e Biotecnologia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2021.

Orientador: Dr. Wylly Araújo de Oliveira.

Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Igara Oliveira Lima.

1. Antifúngicos. 2. *Testes in vitro*. 3. *Ensaio de associação*. 4. *Micromorfologia*. 5. *Cinética de morte*. 6. *Candida* spp. I. Título.

ALANA KAROLINE PENHA DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE KD1 CONTRA *Candida* spp.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia, Centro de Educação e Saúde, da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Naturais e Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia Industrial

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Wylly Araújo de Oliveira  
Coorientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Igara Oliveira Lima

**Aprovado em: 03 / 02 / 2021**

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof. Dr. Wylly Araújo de Oliveira  
Universidade Federal de Campina Grande  
Orientador

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Igara Oliveira Lima  
Universidade Federal de Campina Grande  
Coorientadora

---

Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas  
Universidade Federal de Campina Grande  
Examinador interno

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Júlia Beatriz Pereira de Souza  
Universidade Federal de Campina Grande  
Examinadora externa

CUITÉ-PB  
2021

À Deus, meu socorro presente na hora da angústia,  
por me fazer seguir em frente, pelo dom da vida e  
por me fortalecer.

À minha mãe, por todos ensinamentos, pelo apoio,  
mansidão, temperança, pelo amor.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu Deus Todo Poderoso, pelo dom da vida, por suas promessas se cumprirem em minha vida, por me fortalecer, capacitar, me dar sabedoria, discernimento, sem Ele eu nada seria e nada faria, toda honra e glória seja dada a ti meu Deus.

À minha maravilhosa mãe Maria Rizalba Penha do Nascimento, por ser um exemplo de ser humano, mulher, mãe, amiga, conselheira, sempre será fundamental em minhas conquistas, sempre minha base e referência. Obrigada por seu companheirismo, apoio, conselhos, orações e por sua fé.

Aos meus familiares, André Xavier, José Erenilson, José Arivonaldo, Maria Rozânia, Ingrid Lohanny, Wesley Vitor, Maria Luciene, Fátima Soares, pelas palavras de força, carinho, perseverança e pelo apoio de sempre.

Aos que auxiliaram nessa caminhada, Carlos Medeiros, Letícia Sousa, José Vinícius, Rodrigo Ribeiro, Paulo César, em especial Thales Santos, pela colaboração e pelas palavras de conforto durante esses anos.

Aos técnicos de laboratório que me auxiliaram e me receberam com carinho.

Ao professor Dr. Wylly Araújo, que me acompanhou e auxiliou na realização deste trabalho, como bem, a professora Dra. Igara Oliveira, grata pela confiança e paciência de ambos. Aos professores que fizeram parte da banca examinadora, pela contribuição e disponibilidade.

Agradeço a CAPES, por incentivar o desenvolvimento deste trabalho.

Gratidão a Universidade Federal de Campina Grande, como bem ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia por me proporcionar tantas experiências, ensinamentos e pela infraestrutura ofertada.

## RESUMO

NASCIMENTO, A. K. P. **Avaliação da atividade antifúngica de KD1 contra *Candida* spp.**

Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2020.

Infecções fúngicas tem sido um problema de saúde mundial, sendo observado o aumento constante do número de doenças causadas por fungos patogênicos. Dentre os principais causadores das infecções fúngicas destaca-se as espécies do gênero *Candida*. O tratamento farmacológico disponível ainda é restrito. Os triazóis, junto aos imidazóis estão inseridos na classe dos compostos azólicos, agentes antifúngicos mais utilizados devido ao seu amplo espectro de atividade, eficácia, e perfil de segurança mais favorável. Contudo, a ampla aplicação dos mesmos e o surgimento de cepas multi-resistentes culminaram na resistência grave aos antifúngicos existentes, o que reduziu significativamente sua eficácia clínica. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica de uma substância sintética (KD1) contra *Candida* spp. Desta forma, foram executados testes para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de KD1, contra as espécies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, obtendo-se CIMs que variaram de 32 a 64 µg/mL. Na avaliação micromorfológica de KD1 contra *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, foi demonstrado alterações morfológicas no crescimento normal do fungo, reduzindo a proliferação de fatores de virulência e resistência, como o desenvolvimento de hifas, pseudo-hifas, blastoconídeos e clamidoconídeos. Com o método *Checkerboard*, observou-se indiferença, nas concentrações utilizadas, de KD1 quando associado à anfotericina B, contra as espécies de *Candida* spp. avaliadas. Em seguida procedeu o ensaio de cinética de morte, em que foi possível observar forte característica fungicida de KD1, contra *C. albicans*. A substância apresentou atividade antifúngica contra *Candida albicans* e não-*albicans*. Estudos dessa natureza, são de extrema relevância, aumentando assim, as possibilidades de farmacoterapia antifúngica.

**Palavras-chave:** Antifúngicos; Testes *in vitro*; Ensaio de associação; Micromorfologia; Cinética de morte; *Candida* spp.

## ABSTRACT

NASCIMENTO, A. K. P. **Evaluation of the antifungal activity of KD1 against *Candida* spp.** Master's Dissertation - Postgraduate Program in Natural Sciences and Biotechnology, Federal University of Campina Grande, Cuité, 2020.

Fungal infections have been a worldwide health problem, with a steady increase in the number of diseases caused by pathogenic fungi. Among the main causes of fungal infections stands out the species of the genus *Candida*. The pharmacological treatment available is still restricted. Triazoles, along with imidazoles, are included in the class of azole compounds, the most widely used antifungal agents due to their broad spectrum of activity, effectiveness, and more favorable safety profile. However, their widespread application and the emergence of multi-resistant strains culminated in severe resistance to existing antifungals, which significantly reduced their clinical efficacy. This work aimed to evaluate the antifungal activity of a synthetic substance (KD1) against *Candida* spp. Thus, tests were performed to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of KD1, against the species *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*, obtaining MICs that ranged from 32 to 64 µg / mL. In the micromorphological evaluation of KD1 against *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis*, morphological changes in the normal growth of the fungus were demonstrated, reducing the proliferation of virulence and resistance factors, such as the development of hyphae, pseudo-hyphae, blastoconids and chlamydoconids. With the Checkerboard method, it was observed indifference, in the concentrations used, of KD1 when associated with amphotericin B, against *Candida* spp. evaluated. Then the death kinetics test was carried out, in which it was possible to observe a strong fungicidal characteristic of KD1, against *C. albicans*. The substance showed antifungal activity against *Candida albicans* and non-*albicans*. Studies of this nature are extremely relevant, thus increasing the possibilities of antifungal pharmacotherapy.

**Keywords:** Antifungals; *In vitro* tests; Association test; Micromorphology; Death kinetics; *Candida* spp.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Micromorfologia de <i>candida albicans</i> ATCC 76485 controle e frente a antifúngicos .....	31
Figura 2: Micromorfologia de <i>candida krusei</i> ATCC 6258 controle e frente a antifúngicos .....	32
Figura 3: Micromorfologia de <i>candida tropicalis</i> ATCC 13803 controle e frente a antifúngicos .....	33
Figura 4: Micromorfologia de <i>candida parapsilosis</i> ATCC 22019 controle e frente a antifúngicos .....	34
Figura 5: Cinética de morte de <i>candida albicans</i> quando exposta à KD1 em função do tempo. ....	37
Figura 6: Cinética de morte de <i>candida albicans</i> quando exposta à anfotericina b em função do tempo. ....	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração inibitória mínima em µg/ml de KD1 e da anfotericina b contra <i>Candida</i> spp. ....	25
Tabela 2: Micromorfologia de <i>Candida albicans</i> ATCC 76485 quando exposta à várias concentrações de KD1.....	27
Tabela 3: Micromorfologia de <i>Candida krusei</i> ATCC 6258 quando exposta à várias concentrações de KD1.....	27
Tabela 4: Micromorfologia de <i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803 quando exposta à várias concentrações de KD1.....	28
Tabela 5: Micromorfologia de <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019 quando exposta à várias concentrações de KD1.....	28
Tabela 6: Determinação da concentração inibitória fracionária e o índice da concentração inibitória fracionária contra <i>candida</i> spp .....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ASD	–	Ágar Sabouraud Dextrose
ATCC	–	<i>American Type Culture Collection</i>
CIM	–	Concentração Inibitória Mínima
CIF	–	Concentração Inibitória Fracionária
ICIF	–	Índice da Concentração Inibitória Fracionada
DMSO	–	Dimetilsulfóxido
UFCG	–	Universidade Federal de Campina Grande
CES	–	Centro de Educação e Saúde
UFPB	–	Universidade Federal da Paraíba
$\mu\text{L}$	–	Microlitros
$\mu\text{g}$	–	Microgramas
$\mu\text{g/mL}$	–	Microgramas por mililitros
$^{\circ}\text{C}$	–	<i>Graus Celsius</i>
UFC	–	Unidades formadoras de colônia

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	13
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	13
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	13
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
<b>3.1 <i>Candida</i> spp</b> .....	14
3.1.1 Características gerais .....	14
3.1.2 Epidemiologia das infecções por <i>Candida</i> spp.....	14
3.1.3 Fatores de virulência.....	15
<b>3.2 Antifúngicos sintéticos</b> .....	16
<b>3.3 Resistência de <i>Candida</i> spp. aos antifúngicos disponíveis atualmente</b> .....	18
<b>3.4 Importância de se estudar a associação entre fármacos</b> .....	19
<b>3.5 Quinonas</b> .....	19
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	21
<b>4.1 Local do estudo</b> .....	21
<b>4.2 Substância teste</b> .....	21
<b>4.3 Microrganismos</b> .....	21
<b>4.4 Meio de cultura</b> .....	21
<b>4.5 Inóculo</b> .....	22
<b>4.6 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima da substância teste</b> .....	22
<b>4.7 Estudo do efeito da substância teste sobre a micromorfologia do microrganismo</b> .....	22
<b>4.8 Associação de antimicrobianos</b> .....	23
<b>4.9 Cinética de morte do microrganismo quando exposto à substância teste</b> .....	24
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	25
<b>5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</b> .....	25
<b>5.2 Efeitos de KD1 e anfotericina B sobre a micromorfologia das leveduras</b> .....	27
<b>5.3 Estudo de associação de KD1 e anfotericina B</b> .....	35
<b>5.4 Efeitos de KD1 sobre a cinética do crescimento das leveduras</b> .....	36
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	39
<b>REFERÊNCIAS</b>	

## 1 INTRODUÇÃO

*Candida* spp. são leveduras que podem residir na microbiota normal do ser humano, como organismos comensais, sem causar danos ao hospedeiro. No entanto, fatores como sistema imunológico fragilizado, podem predispor ao aparecimento de infecções, tendo em vista que se trata de espécies oportunistas (SARDI et al., 2010; PEIXOTO et al., 2016). O gênero *Candida* possui a capacidade de aderir às células do hospedeiro com o auxílio de proteínas expressas na parede celular (ZORDAN, CORMACK, 2012), além disso, os fatores de virulência, promovem a proliferação e adaptação no ser humano e, posterior a isso, o estabelecimento de infecções (SHIELDS et al., 2018).

A espécie considerada mais prevalente desse gênero é a *C. albicans*, porém a *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii* também se destacam em estudos, sendo, portanto, de relevante interesse clínico (MONTERO et al., 2012; SANTANA et al., 2013; ČERNÁKOVÁ et al., 2019). Uma vez que nos últimos anos infecções causadas por essas espécies vêm crescendo de forma significativa, acometendo principalmente, indivíduos que estão imunocomprometidos (PILMIS et al., 2016; OZER, DURMAZ, YULA, 2016; MOTOA et al., 2016; REGINATTO et al., 2020).

Infecções sistêmicas causadas por *Candida* spp. estão associadas com alta taxa de morbimortalidade, maior tempo de internação e altos custos com assistência médica (REGINATTO et al., 2020). A *Candida albicans* está frequentemente relacionada a infecções do trato urinário (OZER, DURMAZ, YULA, 2016), a candidíase oral, também se destaca, sendo uma infecção com alta prevalência e incidência em diversas populações no mundo (SKUPIEN et al., 2013). As infecções por *C. albicans* variam de superficiais da mucosa e dérmica a infecções disseminadas pela corrente sanguínea com taxas de mortalidade superiores a 40% (LOHSE et al., 2018). Embora a espécie *C. albicans* seja a mais isolada, em diferentes sítios anatômicos, a representação epidemiológica da candidemia tem alterado bastante, com a crescente prevalência de *Candida*-não-*albicans*. Além disso, essas espécies são capazes de causar infecções intestinais e de pele (COLOMBO, GUIMARÃES, 2003; GUINEA, 2014; KULLBERG; ARENDRUP, 2016).

Os fungos apresentam variados fatores de virulência, em *Candida* spp. esses fatores incluem a formação de biofilmes, capacidade de adesão à superfície bióticas e abióticas, secreção de enzimas hidrolíticas, capacidade de evadir ao ataque das células do sistema

imunológico, transição de levedura a hifa e variabilidade genotípica, contribuem para patogenicidade (CHAVES; SILVA-ROCHA, 2012; MAYER et al., 2013; JOTHIPRAKASAM et al., 2016; GIONGO et al., 2016; PEIXOTO et al., 2016).

Os antifúngicos existentes no mercado são limitados, sendo necessária a constante busca por novos compostos bioativos que atuem em diferentes alvos terapêuticos. As classes principais desses antifúngicos disponíveis são derivados azólicos, equinocandinas, poliênicos e análogos de nucleosídeos (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013; GUZZETTI et al., 2017). Mas com a crescente resistência dos fungos às terapias, as espécies de *Candida*, vem desenvolvendo resistência a antifúngicos como anfotericina B, anidulafungina, fluconazol e itraconazol (ABRANTES; MCARTHUR; AFRICA, 2014).

Nesse sentido, faz-se necessário a pesquisa por novas substâncias naturais com ação antimicrobiana, uma delas são as naftoquinonas, encontradas em fungos, bactérias, animais e principalmente em vegetais, esse interesse surgiu por suas propriedades farmacológicas, detentora de um comportamento eletroquímico, ou seja, uma propensão de sofrer reação química de oxirredução, induzindo o estresse oxidativo (FERREIRA et al., 2010; MELLO; LANZMASTER, 2015). Dessa forma dentre as atividades farmacológicas destaca-se: anticancerígena, moluscicida, leishmanicida, antimalárica, tripanocida e antifúngica (AGUIAR et al., 2020).

Diante destes fatores, destacamos nesse estudo a atividade antifúngica dessa classe química, tendo em vista que a busca por alternativas terapêuticas eficazes e seguras, é de fundamental importância, tendo em vista que a descoberta de novos fármacos aumenta as possibilidades de melhora na saúde do indivíduo e dessa maneira, implica diretamente na qualidade de vida da população.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a atividade antifúngica de KD1 contra *Candida* spp.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de KD1 e da anfotericina B contra *Candida* spp.;
- Analisar os efeitos de KD1 na micromorfologia dos microrganismos *Candida* spp.;
- Analisar a associação de KD1 com o antifúngico anfotericina B contra *Candida* spp.
- Investigar a cinética de morte do microrganismo quando exposto a KD1;

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 *Candida* spp

##### 3.1.1 Características gerais

O gênero *Candida*, pertence ao reino Fungi, filo *Ascomytota*, classe *Hemiascomycetes*, ordem *Saccharomyces*, família *Saccharomycetacea*, estes microrganismos compreendem cerca de 200 espécies, apresentam-se como leveduras, podendo ser polimórficos. Normalmente, encontra-se vivendo em condições saprófitas (GARCIA, SIQUEIRA, 1988; YAPAR, 2014; SULE et al, 2019).

Esse gênero é composto por leveduras que se apresentam ovoides ou globosas, alongadas ou cilíndricas, geralmente não apiculadas, ogivais ou em forma de frasco, sua reprodução acontece por brotamento multipolar. O pseudomicélio que se forma é encontrado na maior parte das espécies, diferenciado em pseudo-hifa e blastósporos. Clamidósporos e micélio verdadeiro, também podem ser formados (DIGNANI et al., 2003; DOI et al., 2016; GUPTA, GUPTA, 2017). Macroscopicamente tem por características, consistência cremosa, brilhante ou opaca, com coloração branca a creme, contudo podem apresentar coloração nas cores marfim a vermelho (GORTHI, 2019).

Espécies do gênero *Candida* residem como comensais, fazem parte da microbiota normal da cavidade oral, da vagina, da uretra, do trato gastrointestinal e dos pulmões de indivíduos sadios (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013; LIPKE, 2018). No entanto, essas leveduras podem tornar-se patogênicas, quando ocorre ruptura desse equilíbrio com o hospedeiro ou o sistema imune deste encontra-se comprometido (MIOTTO et al., 2004; MONGE et al., 2006; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; TEDILA et al., 2019).

##### 3.1.2 Epidemiologia das infecções por *Candida* spp

Considerada uma espécie patogênica, a *C. albicans* é frequentemente isolada nos seres humanos com relação a infecções fúngicas, associada em até 50% dos casos desse tipo de infecção (MONTERO et al., 2012; PEMÁN et al., 2012).

Segundo estudos realizados, cerca de 4 milhões de pessoas no Brasil têm infecções fúngicas a cada ano. Desse total, 2,8 milhões são infecções causadas por *Candida*, que acometem principalmente pessoas com defesas orgânicas enfraquecidas em razão do uso de medicamentos contra rejeição de órgãos transplantados, câncer, AIDS, do uso intensivo de



antibióticos ou de procedimentos invasivos como sondas e cateteres em unidades de terapia intensiva (UTI) (FIORANTI, 2016; ČERNÁKOVÁ et al., 2019).

Estimativas globais mostram que anualmente surjam em média, 700 mil casos de *Candida* spp invasiva, no entanto, esse valor pode ser ainda maior devido às falhas de diagnóstico em muitos casos. Por muito tempo infecções fúngicas foram negligenciadas pelos órgãos públicos e privados de saúde, pois atingiam um grupo de risco restrito já acometido por outras doenças, mas com o passar do tempo a epidemiologia dessas infecções invasivas tem mudado, a população de pacientes com outras comorbidades tem expandido, atingindo pacientes transplantados, aidéticos, com câncer, com sistema imunológico suprimido, idosos, bebês prematuros e aqueles submetidos a cirurgias invasivas (BONGOMIN et al., 2017).

Embora causem mais de 1,5 milhões de mortes ao redor do mundo, uma taxa maior que a das mortes provocadas por malária e tuberculose, as infecções fúngicas continuam sendo negligenciadas, diante esse cenário a criação de novos fármacos, melhorias nas técnicas de diagnóstico e tratamento são fundamentais (GIACOMAZZI et al., 2016).

### 3.1.3 Fatores de virulência

A *C. albicans* é a mais prevalente, causando infecções superficiais e para que isso ocorra, o fungo precisa aderir, invadir e danificar os tecidos hospedeiros. A adesão é mediada pela superfície adesinas que estão na parede celular da célula, interação covalentemente ou não covalentemente com receptores na superfície das células hospedeiras (ZORDAN; CORMACK, 2012; LIPKE, 2018). A evolução da morfologia e virulência em espécies de *Candida* ocorre, respectivamente, leveduras, pseudo-hifas e hifas (THOMPSON et al., 2011).

Os fatores de virulência atuam por vários mecanismos na *Candida* spp. e dessa forma contribuem para sua adaptação e proliferação no corpo humano e, conseqüentemente possíveis instalações de infecções. Dentre esses fatores a capacidade de transição morfológica pela qual a célula leveduriforme forma filamentos, chamada de polimorfismo, desempenha papel importante nos processos de infecção por *Candida* (SUDBERY, 2011).

Esse polimorfismo com formação de hifas auxilia na invasão tissular, a produção de enzimas extracelulares como proteinases e fosfolipases e a termotolerância significativa, atividade hemolítica, variabilidade genotípica, formação de biofilme (RÖRIG, COLACITE, ABEGG, 2009; JOTHIPRAKASAM et al., 2016; GIONGO et al., 2016; ZARDO, PEIXOTO et al., 2016).

A habilidade de formação do biofilme na *Candida* spp. também é um fator de virulência, atuando como reservatórios de infecções persistentes e são resistentes a substâncias antifúngicas comparado a células planctônicas (NOBILE; MITCHELL, 2006; SAMARANAYAKE et al., 2005). Durante essa formação do biofilme, as células se comunicam por *quorum sensing*, modulando o desenvolvimento e o crescimento do mesmo (HOGAN, 2006).

É estimado que aproximadamente 80% das infecções causadas por *Candida* spp. estão diretamente associadas a presença de biofilmes (TSANG et al., 2012). Pesquisas do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, evidenciam que os biofilmes microbianos são responsáveis por cerca 65% das infecções nosocomiais e mais de 80% das infecções crônicas (JAMAL et al., 2018). Apesar da importância, os biofilmes são pouco compreendidos e as estratégias eficazes para combater as infecções por biofilme permanecem limitadas. Assim, biofilmes são definidos como populações complexas de microrganismos que crescem em microcolônias de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) envolvidas em matrizes que podem ser associadas à superfície ou populações que se auto-agregam (RODRIGUES et al., 2017; VAN WOLFEREN et al., 2018; WANG. 2019).

Outro mecanismo de comunicação química celular através de moléculas sinalizadoras chama-se “*quorum sensing*” que estimulam o desenvolvimento de hifas e a expressão do polimorfismo (SANTANA et al., 2013; BARRIUSO et al., 2018; DEL ROSARIO et al., 2019). Na *C. albicans* as principais moléculas do “*quorum sensing*” são o tirosol, farnesol, e o dodecanol (BERMAN; SUDBERY, 2002).

### **3.2 Antifúngicos sintéticos**

Existem variados agentes antifúngicos disponíveis, de administração sistêmica e tópica, estes sendo distribuídos em algumas classes farmacológicas, de acordo com seu alvo de ação (MURRAY et al., 2014).

As classes principais de antifúngicos utilizados para o tratamento de infecções por *Candida* spp. são os poliênicos (anfotericina B e nistatina), que atuam na membrana celular fúngica; azóis (fluconazol, miconazol, itraconazol, posaconazol, voriconazol, cetoconazol) atuam na enzima relacionada a biossíntese do ergosterol conhecido como um componente da membrana celular fúngica; e equinocandinas (caspofungina, anidulafungina e micafungina) que agem na enzima  $\beta$ -1,3-D-glucano sintase da parede celular do fungo (MARSH, MARTIN, 2005; RODRIGUES et al., 2014; MAUBON et al., 2014; VIEIRA, SANTOS, 2017).

Pertencente ao grupo dos poliênicos, a anfotericina B é indicada para formas graves de doença invasiva. São moléculas que atuam na membrana celular fúngica, onde possui grande afeição pelo ergosterol, justificando assim sua especificidade. Como bem, interferem no processo de permeabilidade e com as funções de transporte pela sua capacidade de formar grandes poros na membrana causando distúrbios graves no equilíbrio iônico, com perda de K<sup>+</sup> extracelular, além de utilizar múltiplas vias de sinalização intracelular para indução da morte da levedura (RANG et al., 2011; CHUDZIK et al., 2015).

O grupo azólicos são agentes fungistáticos sintéticos com amplo espectro de atividade, baseados nos núcleos triazol ou imidazol. Atuam inibindo a enzima fúngica lanosina-14a-desmetilase, que é responsável pela conversão de lanosterol em ergosterol, afetando diretamente a fluidez da membrana e nas enzimas ligadas a esta. No caso de infecção invasiva, um dos mais utilizados é o fluconazol, este sendo um antifúngico triazólico que alcança grandes concentrações no líquido cefalorraquidiano, podendo ser a primeira opção nos casos de meningite fúngica, bem como alcança também boas concentrações no humor vítreo, saliva, pele, unhas e tecido vaginal (RANG et al., 2011; CHUDZIK et al., 2015).

Pertencente ao grupo das equinocandinas a caspofungina é administrada intravenosamente. Atua contra o crescimento de fungos através da inibição da enzima  $\beta$ -1,3-D-glucano-sintase. Essa estrutura é necessária para manter estável as paredes celulares fúngicas, sendo que, na sua ausência, as células fúngicas perdem a integridade e ocorre a sua lise. O amplo espectro de atividade fungicida contra as espécies de *Candida*, baixos efeitos colaterais e perfil de interação favorável faz da caspofungina terapia de primeira linha para as diversas manifestações clínicas da candidíase (EL-AZIZI; FARAG; KHARDORI, 2015; THOMPSON et al., 2008).

Apesar da sua eficácia e ser considerada “padrão ouro” para o tratamento de candidíase, a anfotericina B apresenta alto grau de toxicidade, na maioria dos pacientes que iniciam a farmacoterapia com este medicamento, além disso, pode provocar alguns efeitos adversos provenientes da infusão, podendo ser, tremores, febre, cefaleia e calafrios. (RANG, 2012; JANOUT et al., 2015).

As equinocandinas desde seu surgimento apresentaram ser uma alternativa antifúngica importante. Provenientes de alguns fungos, são consideradas lipopeptídeos sinteticamente modificados, atuando em nível de parede celular fúngica, inibindo a produção do polímero 1,3-beta-D-glucana, este de função estrutural. Além da notável atividade fungicida, é uma classe

bem tolerada na terapêutica, com menos efeitos adversos em relação a outros fármacos utilizados (AGUILAR-ZAPATA; PETRAITIENE; PETRAITIS, 2015).

### **3.3 Resistência de *Candida* spp. aos antifúngicos disponíveis atualmente**

É crescente o número de casos envolvendo resistência fúngica frente aos antifúngicos utilizados, este fato tem gerado considerável preocupação médica (CAMPOS et al., 2020). Essa resistência dos fungos aos fármacos pode ser classificada em resistência microbiológica, que se trata do fenômeno no qual o agente etiológico apresenta capacidade de desenvolver-se mesmo na presença de concentrações terapêuticas dos antifúngicos. Podendo ser de forma intrínseca quando nenhum membro da espécie se apresenta sensível; primária quando se encontra cepa resistente em uma espécie normalmente sensível a antifúngico; secundária ou adquirida quando uma cepa previamente sensível desenvolve resistência após exposição ao fármaco devido a alterações genotípicas ou fenotípicas. Outra classificação é a chamada resistência clínica que é definida como a persistência ou progressão de uma infecção, apesar da administração do fármaco apropriado. O mecanismo de resistência em ambos os casos, está envolvido com respostas celulares, moleculares e bioquímicas (EL-AZIZI; FARAG; KHARDORI, 2015; VIEIRA; SANTOS, 2017).

A resistência aos antifúngicos entre as espécies de *Candida* spp. tem sido um problema crescente e foi detectada em diversos estudos, inclusive possíveis mecanismos moleculares responsáveis por ela (PFALLER et al., 2006; DA MATTA et al., 2007).

Ao longo dos últimos anos a *Candida* spp. passou por uma mudança na epidemiologia, com um aumento de espécies não *albicans* em pacientes admitidos em UTI's (GABARDI et al., 2016), isso pode estar relacionado ao uso abusivo e indiscriminado de antifúngicos e antibióticos, que causam uma redução na sensibilidade das cepas aos fármacos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2007).

Moreira e colaboradores (2017) encontraram em seus estudos que as cepas de *Candida* spp. isoladas apresentaram um índice alto de resistência aos antifúngicos azólicos (Miconazol e Fluconazol) estes sendo alguns dos antifúngicos mais utilizados no controle dessas leveduras.

A ascensão da resistência de *Candida* spp., destaca a necessidade de novas moléculas, com novos alvos e novas fontes para o tratamento da candidíase (RODRIGUES et al., 2018). Esse fato constitui um problema de saúde, tendo em vista que constantemente têm surgido relatos de identificação de cepas fúngicas resistentes a vários fármacos tradicionalmente empregados na terapêutica, em especial as espécies não *albicans* cujo número de casos de

resistência ao fluconazol, e outros derivados azólicos, amplamente utilizados em nível hospitalar com finalidade profilática ou de manutenção, vem aumentando significativamente (PERLIN, 2015; LOCKHART et al., 2017).

### **3.4 Importância de se estudar a associação entre fármacos**

Diversas abordagens têm sido utilizadas para otimizar o efeito de terapia antimicrobiana de microrganismos resistentes, uma delas sendo a combinação de fármacos (KHAN et al., 2012). O conceito de sinergia antimicrobiana é fundamentado no princípio de que, em combinação com outras drogas, a composição pode melhorar a eficácia, diminuir os efeitos colaterais adversos, reduzir a toxicidade, diminuir a dose, aumentar a biodisponibilidade, e reduzir o desenvolvimento da resistência antimicrobiana (LI et al., 1993; INUI et al., 2007).

A associação entre diferentes antifúngicos viabilizam uma terapia de êxito em relação às monoterapias. Infecções fúngicas estão cada vez mais prevalentes, sendo caracterizadas pelo surgimento de novas cepas multi-resistentes, com isso surge a necessidade de desenvolver outras alternativas terapêuticas e/ou adjuvantes para as infecções sistêmicas. Sendo assim, alguns trabalhos de pesquisa têm direcionado seu foco para a avaliação antifúngica de produtos de origem natural utilizados em associação a fármacos convencionais contra cepas resistentes de *Candida* e isoladamente, permitindo um horizonte de novos estudos e promissoras possibilidades na descoberta de novos tratamentos (HAN et al., 2016).

Antifúngicos com diferentes mecanismos de ação pode representar uma alternativa terapêutica válida e eficaz. Teoricamente, a interação entre dois fármacos pode potencializar a atividade antifúngica de ambos, diminuindo a concentração dos mesmos, a duração do tratamento e conseqüentemente a emergência de resistências (MUKHERJEE et al, 2005). Sendo uma vantagem da associação o amplo espectro de ação dos antimicrobianos e prevenção de microrganismos resistentes (SPADER, 2017).

### **3.5 Quinonas**

As quinonas são compostos aromáticos distribuídos e presentes na natureza, podendo ser encontrados em diversas famílias de plantas, incluindo isolados de fungos, algas e bactérias. São classificadas em benzoquinonas, antraquinonas e naftoquinonas de acordo com suas estruturas químicas (KUMAGAI et al., 2011). As naftoquinonas são compostos presentes como metabólitos secundários de microrganismos e plantas; eles conferem atividade em vários

processos oxidativos biológicos e representam uma defesa química usada por muitas plantas (SAEED et al., 2013).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Local do estudo

O trabalho foi realizado nos laboratórios de Bioquímica (J08) e Microbiologia (J11), do bloco J, da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Centro de Educação e Saúde (CES), *campus* Cuité-PB.

### 4.2 Substância teste

Para realização dos estudos *in vitro*, foi utilizada a substância KD1 sintetizada pelo grupo de pesquisa liderado pelo professor Juliano Carlo Rufino de Freitas, do laboratório de Síntese Orgânica (LASO), localizado no Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, *campus* Cuité/PB, além deste utilizou-se no experimento anfotericina B, adquirida comercialmente.

### 4.3 Microrganismos

Cepas fúngicas do gênero *Candida*, cedidas pelo Laboratório de Micologia do Centro de Ciências da Saúde (UFPB) e cepas padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC), são elas:

- *Candida albicans*:
  - ✓ *C. albicans* ATCC 76485.
- *Candida não-albicans*:
  - ✓ *C. glabrata* ATCC 90030;
  - ✓ *C. krusei* ATCC 6258;
  - ✓ *C. tropicalis* ATCC 13803;
  - ✓ *C. parapsilosis* ATCC 22019.

### 4.4 Meio de cultura

Os meios de cultura utilizados durante os experimentos foram o ágar sabouraud dextrose (ASD), caldo sabouraud dextrose (CSD), meio corn meal ágar, neste adicionou-se tween® 80, todos foram preparados conforme as orientações do fabricante, sendo solubilizados com água destilada, em seguida, esterilizados em autoclave com temperatura a 121°C durante 15 minutos.

#### **4.5 Inóculo**

Para a preparação do inóculo foram utilizadas cepas fúngicas mantidas em ágar sabouraud de 24 – 48h. Inicialmente, as suspensões foram preparadas em tubos de ensaio contendo solução salina (NaCl 0,9 %) estéril, em seguida as mesmas foram agitadas com o auxílio do aparelho vórtex, até completa homogeneização. Por fim, a concentração do inóculo fúngico foi ajustada de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala McFarland, que corresponde a aproximadamente  $1 - 5 \times 10^6$  UFC/mL (CLSI, 2008; SOARES, 2018).

#### **4.6 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima da substância teste**

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizado o método de microdiluição em caldo sabouraud dextrose (CASTRO, LIMA, 2010; CORTEZ et al., 2015). O experimento foi realizado em microplacas estéreis contendo 96 cavidades, na qual foi testado a concentração do composto a partir de 512 a 1 µg/mL diluídos seriadamente de 1:2, o experimento foi conduzido com aproximadamente  $1 - 5 \times 10^5$  UFC/mL em cada cavidade, onde foram adicionados o meio caldo sabouraud dextrose, a substância teste e o microrganismo. Foram utilizados para solubilizar os compostos, água e dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,5%. Foi realizado os controles com meio de cultura, o microrganismo e DMSO nas mesmas concentrações utilizadas no experimento, para demonstrar que o DMSO nas concentrações utilizadas não interfere o crescimento do fungo. O experimento se procedeu em duplicata (DIAS et al., 2017).

As microplacas foram incubadas em uma estufa a  $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  por 24-48h com monitoramento. Sendo considerada como CIM a menor concentração da substância capaz de inibir o crescimento da levedura (DIAS et al., 2017; BANSAL et al., 2019).

#### **4.7 Estudo do efeito da substância teste sobre a micromorfologia do microrganismo**

Para determinar se a nova substância é capaz de causar qualquer alteração na morfologia dos fungos através da inibição do desenvolvimento de hifas, pseudo-hifas e outras estruturas, foram preparadas câmaras de microcultivo utilizando lâmina em câmara úmida executada em placa de *Petri* teve no seu interior um pedaço de papel filtro, duas lâminas unidas por fita (servindo como suporte) e sobre essas, outra lâmina.

O meio utilizado foi o corn meal agar (Agar fubá), na sua preparação foi adicionado com 1% Tween® 80, Kelly e Funigeillo (1959) reportaram que a adição de Tween aumenta a



formação de clamidósporo por *C. albicans*, posteriormente foi incorporado a substância KD1, nas concentrações CIM/2, CIM e CIMx2. Um controle para o crescimento de leveduras foi realizado, bem como um controle com anfotericina B (este nas mesmas concentrações) para fins comparativos. O processo de preparação procedeu com a adição de 2mL de água destilada estéril sobre o papel filtro, 400µL do meio, previamente preparado, sobre a lâmina superior e com uma alça bacteriológica foi removido, das culturas de *C. albicans* e não-*albicans* (sendo cepas recentes), uma alíquota para realização de duas estrias paralelas sobre o meio, que foram então cobertas com uma lamínula estéril. As concentrações testadas de KD1 e anfotericina B foram em CIM/2, CIM e CIMx2. As câmaras foram colocadas em uma estufa por 48-72 horas a temperatura  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , houve reincubação das placas até 6 dias com temperatura de incubação sendo 30-35°C. A observação foi feita diariamente, os resultados registrados a partir de um microscópio óptico usando uma objetiva de 40x (LI et al., 2019).

#### **4.8 Associação de antimicrobianos**

A investigação *in vitro* da interação entre a anfotericina B e o novo composto KD1, contra *C. albicans* e não-*albicans*, foi avaliada através do método de *Checkerboard*. Este método consistiu na realização de uma diluição seriada, nas concentrações, CIMx4, CIMx2, CIM, CIM/2, CIM/4 e CIM/8, em tubos de ensaio, no qual de um tubo contendo 6mL, de solução das drogas, foi retirado uma alíquota de 3mL e transferida para um outro tubo que já continha 3mL de água destilada estéril.

A etapa seguinte foi à distribuição de 50µL da solução de anfotericina B, e 50µL da solução KD1, em microplacas que já possuem 100µL de caldo sabouraud dextrose, de forma que todas as concentrações da anfotericina B foi combinada com todas as concentrações de KD1 (foi destinada uma microplaca para cada cepa, de anfotericina B x KD1). Por fim a cada uma das cavidades foram adicionados 20µL de inóculo, 6 cavidades foram destinadas para o controle positivo (Inóculo + Caldo) e negativo (apenas Caldo), e em seguida essas placas foram incubadas por 24 - 48h a 35 °C.

A natureza dessas interações foi avaliada pelo cálculo do índice de concentração inibitória da fração (FICI). O FICI foi calculado pela fórmula:  $\text{FICI} = (\text{FLCc}/\text{FLCa}) + (\text{FENc}/\text{FENa})$ , em que FLCc é a CIM da anfotericina B em combinação, FENc é a CIM do KD1 em combinação, FLCa é a CIM da anfotericina B sozinha e FENa é a CIM de KD1 sozinho. A interação foi considerada sinérgica quando o FICI foi  $\leq 0,5$ , aditivo quando FICI foi = 1, não houve diferença

quando o FICI foi  $> 1$  e  $\leq 4$  e antagônico quando o FICI foi  $> 4,0$  (DOERN, 2014; CUI et al., 2015; PINTO et al., 2017).

#### **4.9 Cinética de morte do microrganismo quando exposto à substância teste**

A cinética de morte de *C. albicans*, na presença do composto KD1 foi realizada de acordo com Klepser et al. (1997), com algumas modificações. Os microrganismos foram cultivados em agar sabouraud dextrose em tubos, 24 horas antes do experimento. Colônias derivadas da cultura foram suspensas em 0,9% de NaCl e a turbidez ajustadas na faixa de 0,5 McFarland ( $1-5 \times 10^6$  UFC / mL). Desta suspensão retirou-se uma alíquota para adicionar nas cavidades que continham caldo sabouraud dextrose com ou sem a substância teste nas variadas concentrações (CIM/2, CIM e CIMx2), isso resultou em uma diluição de 1:10 da suspensão fúngica e forneceu um inóculo inicial de cerca de  $1-5 \times 10^5$  UFC / mL.

As concentrações de KD1 e da anfotericina B foram testadas em concentrações CIM/2, CIM e CIMx2. Essas culturas foram incubadas a  $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ , em vários períodos de tempo (0, 4, 8, e 24 horas), uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  foi removida de cada solução e diluído 1:100, a partir disso, 10  $\mu\text{L}$  de cada diluição foi removido e semeado em placas de Petri 15x90mm contendo ASD. As placas de Petri foram incubadas a  $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  por 24-48 horas e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) contados e multiplicado pelo fator da diluição utilizada, para obter o número de UFC/ml.

O experimento foi realizado em triplicata. O limite mínimo de detecção desse método é de 100 UFC/mL. Foi considerada atividade fungicida quando houve diminuição maior ou igual a  $3 \log_{10}$  UFC/mL do inóculo inicial, resultando em redução de 99,9% ou mais UFC/mL em 24 horas comparado com o inóculo inicial. Atividade menor que a descrita foi considerada fungistática, com base nos estudos já existentes (KLEPSER et al., 1997; LIU et al., 2019).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os resultados obtidos a partir da determinação da CIM, utilizando a técnica de microdiluição, que avalia a ação antifúngica de KD1 frente às espécies de *Candida*, estão descritos na tabela 1.

**Tabela 1:** Concentração inibitória mínima em µg/mL de KD1 e da anfotericina B contra *Candida* spp.

Microrganismos	KD1	Anfotericina B
	CIM µg/mL	CIM µg/mL
<i>C. albicans</i> (ATCC-76485)	64	0,06
<i>C. glabrata</i> (ATCC-90030)	32	0,06
<i>C. krusei</i> (ATCC 6258)	32	1
<i>C. tropicalis</i> (ATCC 13803)	64	1
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	32	0,5

**Fonte:** Própria autoria, 2020.

A substância teste KD1 teve a capacidade de inibir o crescimento em todas as cepas testadas, com destaque para ação frente as cepas *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, uma vez que exibiu uma CIM de 32 µg/mL. Apenas para as depas *C. albicans* e *C. tropicalis*, o composto exibiu uma CIM 64 µg/ml.

O antifúngico padrão, anfotericina B, este sendo o controle, apresentou resultados satisfatórios com CIM entre 0,06 µg/mL e 1 µg/mL. O controle das cepas foi satisfatório, houve o crescimento durante a realização dos ensaios fúngicos, assegurando a viabilidade desta. Os controles foram satisfatórios, com crescimento no positivo, assegurando a viabilidade das cepas e não havendo crescimento nos controles negativos, garantindo a esterilidade do meio de cultura utilizado.

O método de microdiluição foi escolhido devido sua simplicidade, e possui reprodutibilidade, sendo este mais sensível que outros métodos utilizados, além disso, requer uma pequena quantidade de meios de cultura e amostra (SCORZONI et al., 2007, OSTROSKY et al., 2008). A diluição em caldo utiliza-se da relação entre a proporção de crescimento do microrganismo no meio líquido e a concentração da substância ensaiada. A avaliação é comparada frente a um padrão de referência. Compreende-se por proporção a densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano (PINTO et al., 2003). O método fornece resultados semi-quantitativos, uma desvantagem é a dificuldade na detecção visual de contaminação no caso de teste com materiais clínicos (OSTROSKY et al., 2008).

O uso prolongado aos medicamentos e a falta de resposta terapêutica contribui para o desenvolvimento dos mecanismos de resistência contra esses fármacos utilizadas para diversos fungos, limitando assim, as principais alternativas terapêuticas (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

Na clínica para ser considerado ideal, o antifúngico deve possuir amplo espectro de atividade, ação fungicida, possuir formulação parenteral e oral, mínima interação com outros medicamentos, possuir doses eficazes sem causar muitas reações adversas, ter custo-efetivo e baixa resistência microbiana, portanto, é um desafio desenvolver um agente antifúngico que possua potenciais de ação que não sejam partilhados pela espécie humana e pelo fungo (PFALLER et al., 1998; NAVARINI, 2007).

O aumento de cepas microbianas resistentes, maior prevalência/incidência de infecções oportunistas principalmente por pacientes imunocomprometidos, o aumento da mortalidade vinculada a esses patógenos, incluindo cepas de *Candida* spp., mostra a necessidade da busca de novos fármacos com amplo espectro de atividade biológica. A constante busca de novos antimicrobianos, seja de origem vegetal, animal, sintética ou semissintética que permitam o tratamento de infecções causadas por organismos patogênicos é de grande interesse e relevância mundial (EL-GAMEL et al., 2013; MALLADI et al., 2014).

O tratamento de infecções fúngicas é um problema que transcende a questão da quantidade de alternativas terapêuticas. Além da lentidão do diagnóstico e a falta de precisão, vários dos medicamentos utilizados apresentam índice terapêutico baixo e efeitos adversos proveniente da farmacocinética, fazendo com que a administração desses fármacos seja feita com bastante cautela (PAUW, 2011; WHALEN; FINKEL; PANAVELIL, 2016).

Um composto da mesma classe química da substância desse trabalho, antraquinona reína reportou uma potente atividade antifúngica, dentre esses fungos, incluía a *Candida albicans* (YANG et al., 2015).

A espécie *Cassia nigricans*, uma planta lenhosa entre 1,2 m e 1,5 m de altura com pequenas flores amarelas, a partir do fracionamento do extrato em acetato de etila levou ao isolamento da antraquinona emodina que para algumas espécies de fungos, incluindo a *C. albicans* apresentou um valor de CIM também significativo semelhante ao presente trabalho (AYO; AMUPITAN; ZHAO, 2007).

Assim trabalhos prévios já demonstra o potencial dessa classe de substância. Entre esses também temos outro estudo que avaliou a atividade antifúngica de derivados da estrutura naftoquinona e obtiveram valores de CIM inferior a 64 µg/mL frente a culturas de *Candida*

*albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* (SASAKI et al., 2002).

## 5.2 Efeitos de KD1 e anfotericina B sobre a micromorfologia das leveduras

A formação de pseudo-hifas e hifas, por representarem uma barreira à fagocitose e permitirem que a levedura fique aderida ao tecido epitelial, está relacionada com fatores de virulência expressos por *Candida* spp. Assim sendo, alterações morfológicas podem ser associadas com a patogenicidade do microrganismo (OLIVEIRA et al., 2016).

A seguir estão expressos em tabelas 2, 3, 4, 5 os resultados obtidos a partir da micromorfologia dos microrganismos frente a diferentes concentrações da substância teste, como bem do antifúngico utilizado como padrão nesse estudo.

**Tabela 2:** Micromorfologia de *C. albicans* ATCC 76485 quando exposta à várias concentrações de KD1

Microcâmara	Estruturas Morfológicas			
	Blastoconídios	Clamidoconídios	Hifas	Leveduras
Controle	+	+	+	+
KD1 CIM/2	+/-	-	+/-	+
KD1 CIM	+/-	-	+/-	+
KD1 CIMx2	+/-	-	+/-	+
ANF. B CIM/2	+/-	-	+/-	+
ANF. B CIM	+/-	-	+/-	+
ANF. B CIMx2	-	-	-	+

**Legenda:**(-) Inibição Total, (+/-) Inibição Parcial, (+) Presença da estrutura.  
**Fonte:** Própria Autoria, 2020.

**Tabela 3:** Micromorfologia de *C. krusei* ATCC 6258 quando exposta à várias concentrações de KD1

Microcâmara	Estruturas Morfológicas		
	Blastoconídios	Pseudo-hifas	Leveduras
Controle	+	+	+
KD1 CIM/2	+/-	+/-	+
KD1 CIM	+/-	+/-	+
KD1 CIMx2	-	-	+
ANF. B CIM/2	+/-	+/-	+
ANF. B CIM	+/-	-	+
ANF. B CIMx2	-	-	+

**Legenda:**(-) Inibição Total, (+/-) Inibição Parcial, (+) Presença da estrutura.  
**Fonte:** Própria Autoria, 2020.

**Tabela 4:** Micromorfologia de *C. tropicalis* ATCC 13803 quando exposta à várias concentrações de KD1

Microcâmara	Estruturas Morfológicas		
	Blastoconídios	Pseudo-hifas	Leveduras
Controle	+	+	+
KD1 CIM/2	+/-	+/-	+
KD1 CIM	-	-	+
KD1 CIMx2	-	-	+
ANF. B CIM/2	+/-	+/-	+
ANF. B CIM	+/-	-	+
ANF. B CIMx2	-	-	+

**Legenda:**(-) Inibição Total, (+/-) Inibição Parcial, (+) Presença da estrutura.  
**Fonte:** Própria Autoria, 2020.

**Tabela 5:** Micromorfologia de *C. parapsilosis* ATCC 22019 quando exposta à várias concentrações de KD1

Microcâmara	Estruturas Morfológicas		
	Blastoconídios	Pseudo-hifas	Leveduras
Controle	+	+	+
KD1 CIM/2	+/-	+/-	+
KD1 CIM	-	+/-	+
KD1 CIMx2	-	+/-	+
ANF. B CIM/2	+/-	+/-	+
ANF. B CIM	+/-	+/-	+
ANF. B CIMx2	-	+/-	+

**Legenda:**(-) Inibição Total, (+/-) Inibição Parcial, (+) Presença de estrutura.  
**Fonte:** Própria Autoria, 2020.

Os resultados do estudo mostram que a substância teste KD1 na concentração (CIM e CIMx2) é capaz de reduzir significativamente o desenvolvimento de pseudo-hifas, hifas, blastoconídios e clamidoconídios (em *C. albicans*) quando comparado com o controle (este cultivado sem qualquer componente teste). Esses resultados corroboram com o estudo de Oliveira e colaboradores (2016), porém estes utilizaram um óleo essencial, que alterou morfológicamente a formação do fungo.

A análise microscópica, realizada nos estudos micromorfológicos com as cepas de *Candida* spp., permitiu observar o controle das cepas de *Candida* spp. em que apresentou desenvolvimento normal de suas estruturas (Figura 1A), tendo características como clamidoconídios, blastoconídios, pseudo-hifas e leveduras. Entretanto, nas demais microcâmaras, contendo a anfotericina B e a substância KD1 (em concentrações diferentes), observou-se a inibição total ou parcial do desenvolvimento de algumas dessas estruturas.

A substância KD1, em sua CIMx2 (Figura 1G), CIM (Figura 1F) e CIM/2 (Figura 1E), inibiu totalmente o desenvolvimento de clamidoconídios e parcialmente o de pseudo-hifas e

blastoconídios. Por outro lado, a anfotericina B foi, em sua CIMx2 (Figura 1D), capaz de inibir totalmente o desenvolvimento de clamidoconídios, blastoconídios e pseudo-hífas, estando presente apenas as leveduras. Contudo, em sua CIM (Figura 1C) e CIM/2 (Figura 1B) houve a inibição total no desenvolvimento de clamidoconídios e parcial no de blastoconídios.

Já a análise microscópica, nos estudos micromorfológicos com as cepas de *C. parapsilosis*, revelou que a anfotericina B e a substância KD1 causaram inibição no desenvolvimento de pseudo-hífas, quando comparado ao controle. Em suas maiores concentrações a inibição foi maior, chegando a quase uma inibição total na microcâmara da anfotericina B em sua concentração CIMx2 (Figura 4D).

Leite e colaboradores (2015), em seu estudo “Investigação da atividade antifúngica e mecanismo(s) do Geraniol contra cepas de *Candida albicans*”, ao realizar a análise micromorfológica observou em seu exame do controle a presença das mesmas estruturas encontradas no presente estudo. Porém, tanto o Geraniol como a anfotericina B causou variações no desenvolvimento de blastoconídios e inibiu a formação de pseudo-hífas, nas microcâmaras em que foram incorporados em diferentes concentrações.

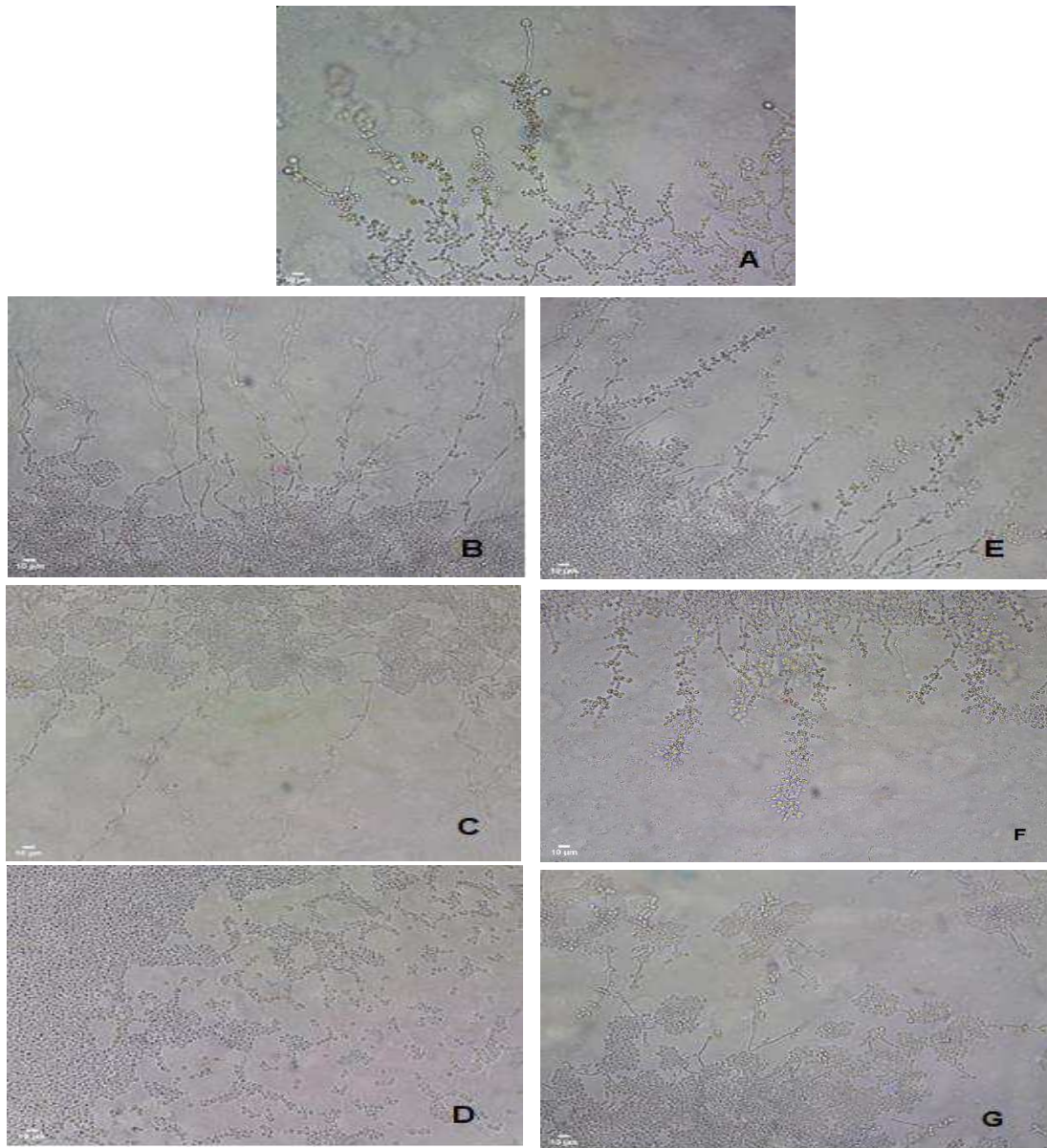
Em outro estudo os pesquisadores utilizaram uma substância da mesma classe química usada no presente trabalho, destacaram que um representante das oximas de arilcianometilenoquinona inibiu efetivamente o crescimento e a formação de hifas em *Candida albicans* e influenciou a atividade das proteínas cinases *in vitro*, revelaram que na concentração de 2µg /mL inibia totalmente a formação de hifas. Estando presentes apenas numerosas células bem separados do tipo levedura. Em contraste, a cultura de controle, que não foi tratada com a droga, exibiu a presença de numerosas hifas emaranhadas em enormes agregados celulares densos, juntamente com uma fração de células do tipo levedura (MASLYK et al., 2018).

Alguns estudos argumentam a importância de tal inibição, afirmando que, de fato, as formas de hifas são invasivas, pois invadem o substrato de ágar quando cultivadas em laboratório. Embora o crescimento filamentosos dos fungos não seja obrigatoriamente associado à invasão tecidual, é provável que promova a penetração tecidual e ajude na colonização de órgãos no caso de *C. albicans*. Sem dúvida, a ponta da hifa é uma “broca” eficaz que permite que o fungo se entere em um tecido. Como um local de secreção apical de um número de enzimas, a ponta da hifa facilita a infiltração em substratos e tecidos sólidos. Além disso as hifas fúngicas também exibem orientação de contato ou timotropismo, o que lhes permite navegar de acordo com a topografia da superfície e ter acesso aos locais de superfície fracos suscetíveis à invasão (MASLYK et al., 2018).

Liu e colaboradores (2019), em seu estudo de atividade antifúngica, cita que durante o estágio inicial da infecção, os fungos de levedura tornam-se hifas para penetrar nas células epiteliais e endoteliais humanas e causar danos a elas. Frisando assim a importância da busca por novas formas de evitar o desenvolvimento hifal.

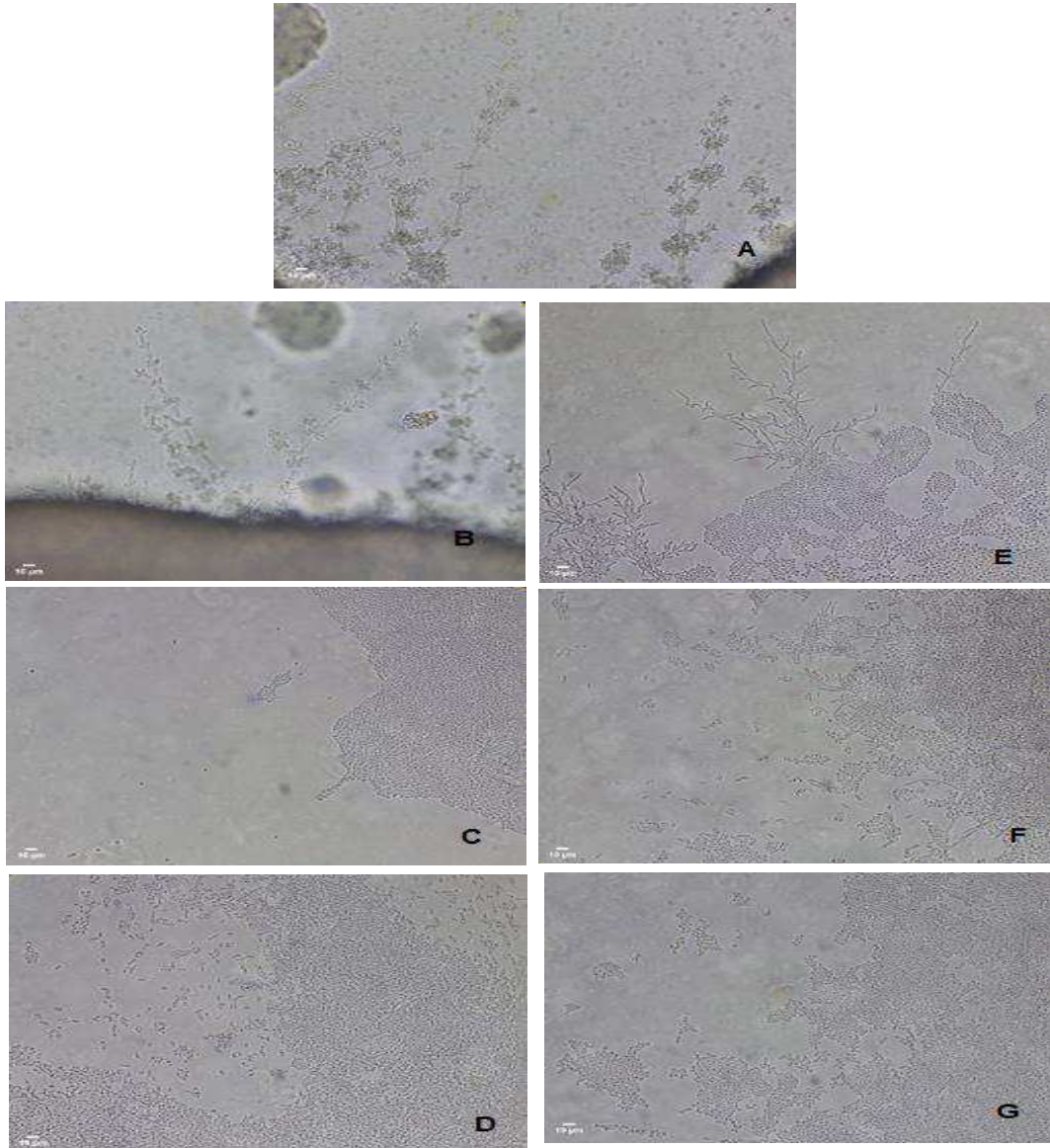


**Figura 1:** Micromorfologia de *C. albicans* ATCC 76485 controle e frente a antifúngicos



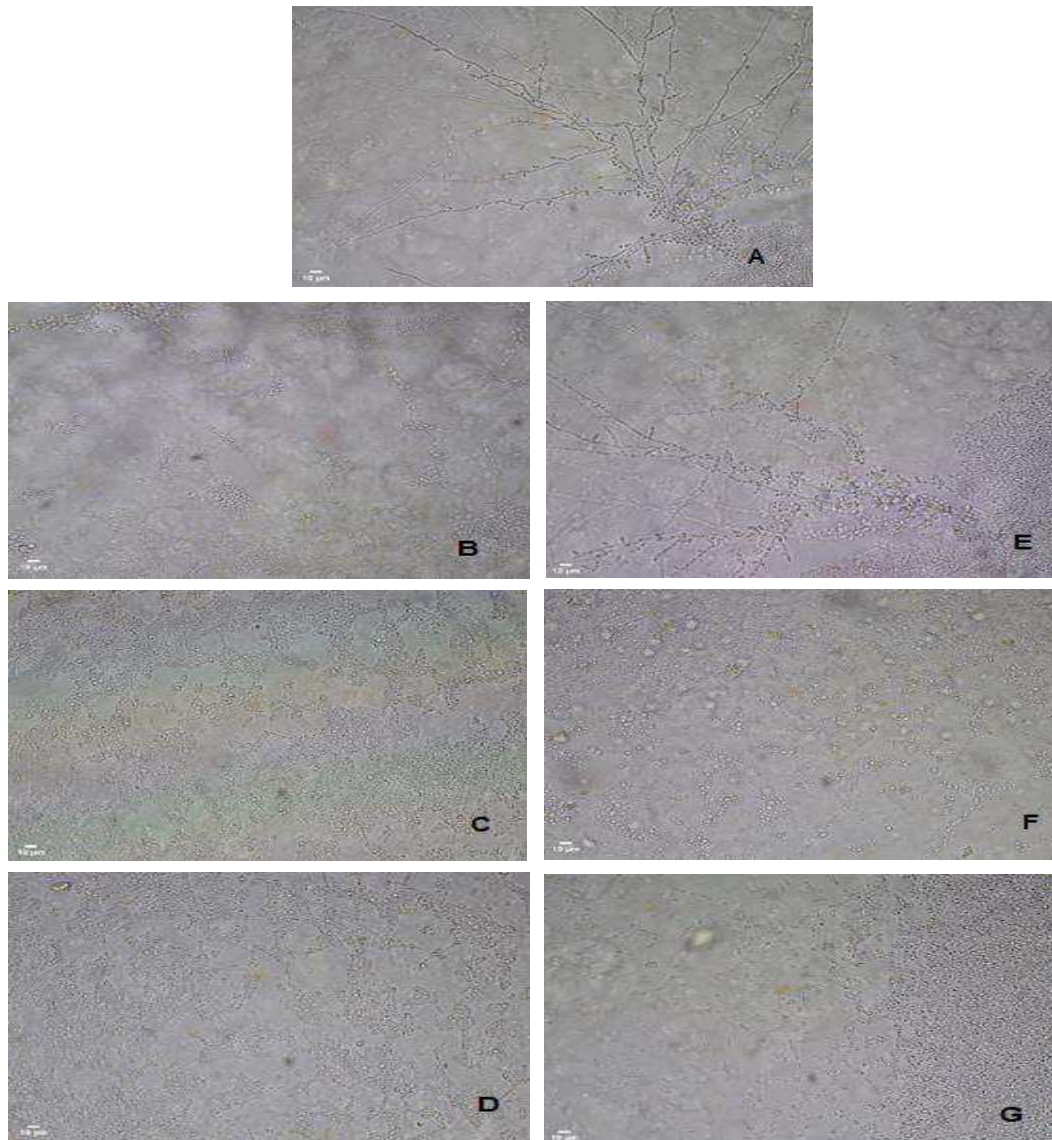
**Legenda:** A- Micromorfologia controle (microrganismo sem substância teste); B- Micromorfologia do microrganismo quando exposto à anfotericina B em CIM/2; C- Micromorfologia do microrganismo quando exposto à anfotericina B na sua CIM; D- Micromorfologia do microrganismo quando exposto à anfotericina B na sua CIMx2; E- Micromorfologia do microrganismo quando exposto à KD1 em sua CIM/2; F- Micromorfologia do microrganismo quando exposto à KD1 em sua CIM; G- Micromorfologia do microrganismo quando exposto à KD1 em sua CIMx2.  
**Fonte:** Própria autoria, 2020.

**Figura 2:** Micromorfologia de *C. krusei* ATCC 6258 controle e frente a antifúngicos



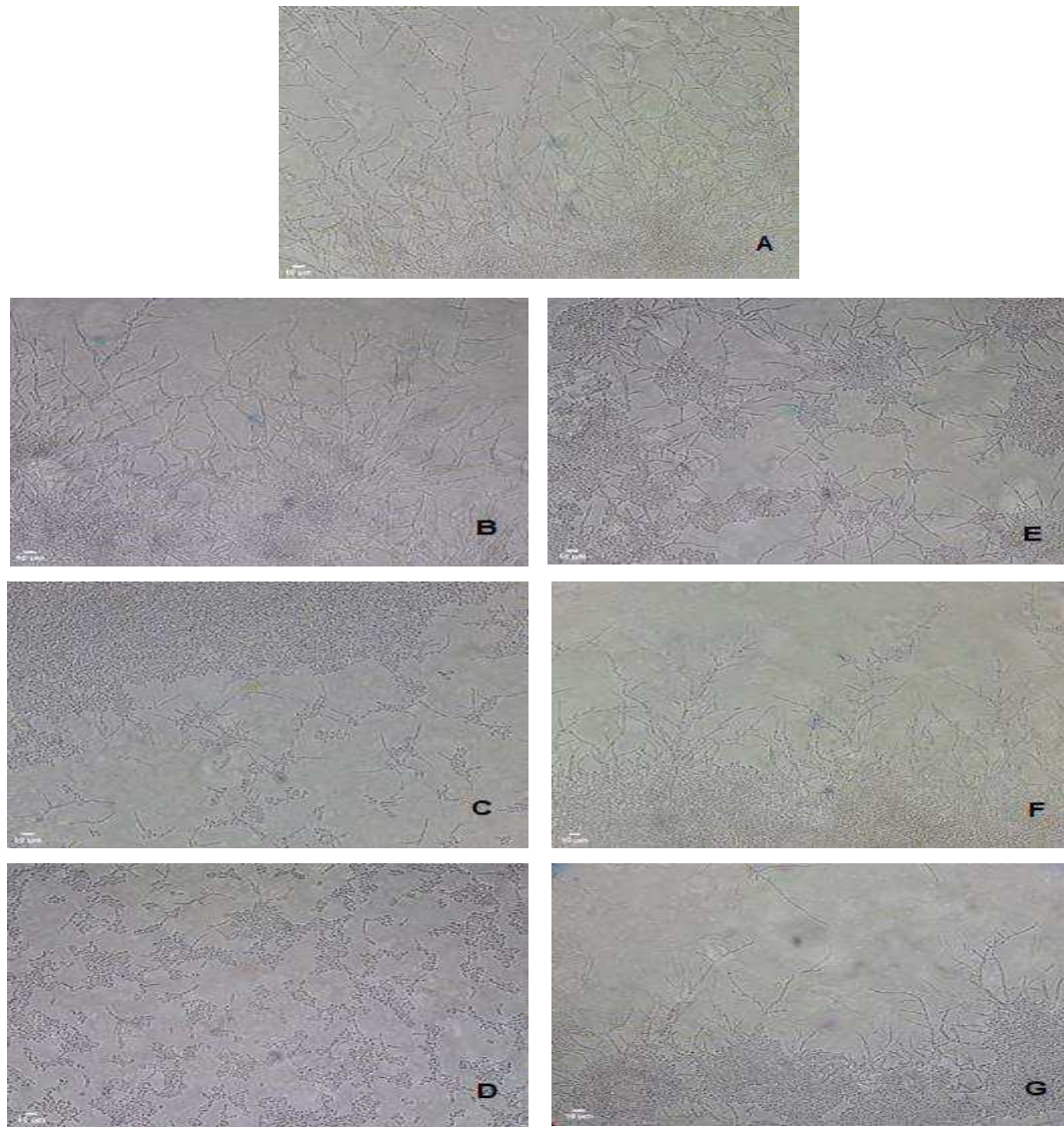
**Legenda:** A- Micromorfologia controle (microrganismo sem substância teste); B- Micromorfologia do microrganismo quando exposto à anfotericina B em CIM/2; C- Micromorfologia do microrganismo quando exposto à anfotericina B na sua CIM; D- Micromorfologia do microrganismo quando exposto à anfotericina B na sua CIMx2; E- Micromorfologia do microrganismo quando exposto à KD1 em sua CIM/2; F- Micromorfologia do microrganismo quando exposto à KD1 em sua CIM; G- Micromorfologia do microrganismo quando exposto à KD1 em sua CIMx2.  
**Fonte:** Própria autoria, 2020.

**Figura 3:** Micromorfologia de *C. tropicalis* ATCC 13803 controle e frente a antifúngicos



**Legenda:** A- Micromorfologia controle (microrganismo sem substância teste); B- Micromorfologia do microrganismo quando exposto à anfotericina B em CIM/2; C- Micromorfologia do microrganismo quando exposto à anfotericina B na sua CIM; D- Micromorfologia do microrganismo quando exposto à anfotericina B na sua CIMx2; E- Micromorfologia do microrganismo quando exposto à KD1 em sua CIM/2; F- Micromorfologia do microrganismo quando exposto à KD1 em sua CIM; G- Micromorfologia do microrganismo quando exposto à KD1 em sua CIMx2.  
**Fonte:** Própria autoria, 2020.

**Figura 4:** Micromorfologia de *C. parapsilosis* ATCC 22019 controle e frente a antifúngicos



**Legenda:** A- Micromorfologia controle (microrganismo sem substância teste); B- Micromorfologia do microrganismo quando exposto à anfotericina B em CIM/2; C- Micromorfologia do microrganismo quando exposto à anfotericina B na sua CIM; D- Micromorfologia do microrganismo quando exposto à anfotericina B na sua CIMx2; E- Micromorfologia do microrganismo quando exposto à KD1 em sua CIM/2; F- Micromorfologia do microrganismo quando exposto à KD1 em sua CIM; G- Micromorfologia do microrganismo quando exposto à KD1 em sua CIMx2.  
**Fonte:** Própria autoria, 2020.

### 5.3 Estudo de associação de KD1 e anfotericina B

A associação entre diferentes antifúngicos viabilizam uma terapia de êxito em relação às monoterapias. Infecções fúngicas estão cada vez mais prevalentes, sendo caracterizadas pelo surgimento de novas cepas multi-resistentes, reforçando a necessidade de desenvolver outras alternativas terapêuticas e/ou adjuvantes para as infecções sistêmicas. Sendo assim, alguns trabalhos de pesquisa, tem direcionado o estudo da ação de duas ou mais drogas combinadas para a avaliação antifúngica de produtos de origem natural utilizados em associação a fármacos convencionais contra cepas resistentes de *Candida* spp. e isoladamente, permitindo um horizonte de novos estudos e promissoras possibilidades na descoberta de novos tratamentos (HAN et al., 2016).

Na tentativa de melhorar o potencial antifúngico de uma determinada substância, a combinação com fármacos utilizados convencionalmente na terapêutica pode-se apresentar como uma opção relevante (PAI; GANAVALLI; KIKKERI, 2018).

À vista disso, na tabela a seguir, observa-se a associação entre a substância teste (KD1) e anfotericina B.

**Tabela 6:** Determinação da concentração inibitória fracionária e o índice da concentração inibitória fracionária contra *Candida* spp.

Cepas	CIF <sup>A</sup>	CIF <sup>B</sup>	ICIF	Tipo de interação
	μg/mL	μg/mL		
	KD1	Anfotericina B		
<i>C. albicans</i> (ATCC-76485)	2	0,125	2,125	Indiferente
<i>C. glabrata</i> (ATCC-90030)	2	0,125	2,125	Indiferente
<i>C. krusei</i> (ATCC 6258)	2	1	3	Indiferente
<i>C. tropicalis</i> (ATCC 13803)	2	0,125	2,125	Indiferente
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	2	0,125	2,125	Indiferente

**Legenda:** CIF – Concentração Inibitória Fracionária da substância teste; ICIF – Índice de Concentração Inibitória Fracionária. Foi considerado indiferente quando ICIF foi <1 e ≥4.

**Fonte:** Própria autoria, 2020.

Ao associar KD1 com anfotericina B, foi determinado o índice de concentração inibitória fracionada, assim observou-se que as cinco cepas investigadas do gênero *Candida*, apresentaram indiferença farmacológica. Esse resultado acontece quando não é evidenciada interação entre as substâncias combinadas, dessa forma, o mecanismo de ação de um composto não interage com o mecanismo de ação do outro (YAP et al.,2014; PINTO et al., 2017).

Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo associando anfotericina B com uma substância por nome Citronelal, frente à espécie de *Candida* spp. em que também se observou indiferença na associação (SILVA et al., 2018). Em outro estudo que tinha por

objetivo associar uma molécula sintética Carvacrol com anfotericina B e cetoconazol frente a cepas de *A. fumigatus*, também obtiveram indiferença, já frente a cepas de *A. flavus* esse resultado foi sinérgico, quando combinados (SOARES et al., 2018). Interessados em saber se seu composto também interferia no desenvolvimento do microrganismo Martins et al. (2019) fazendo a análise de um composto combinado com anfotericina B, frente a uma espécie de fungo, obtiveram sinergismo.

Em um estudo realizado por Nóbrega et al. (2019), estes analisaram um composto sintético combinado com anfotericina B, em que evidenciaram sinergismo frente a cepas de *C. guilhermondii*, aditividade quando contra *C. parapsilosis* e assemelhando-se a este trabalho obtiveram indiferença *C. tropicalis* e *C. Krusei*.

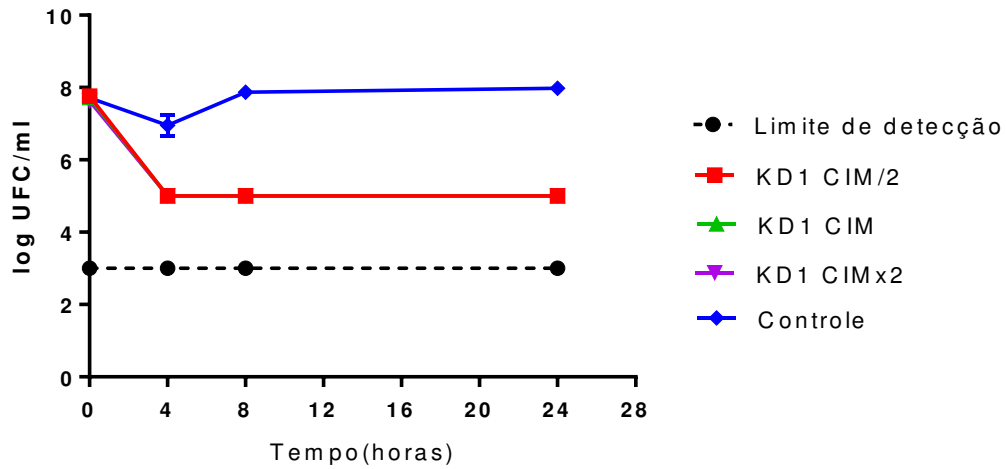
Diversas pesquisas *in vitro* sobre antifúngicos mostram que combinações podem ampliar a cobertura, conseqüentemente aumentar o efeito fungicida e diminuir o risco de desenvolvimento de resistência. Em alguns resultados os agentes combinados podem ter atividade sinérgica com toxicidade reduzida (CAMPITELLI et al., 2017).

#### **5.4 Efeitos de KD1 sobre a cinética do crescimento das leveduras**

Em seguida foi avaliado a viabilidade das cepas em variados intervalos de tempo, sendo exposta a substância teste KD1 e anfotericina B (padrão), com o objetivo de verificar se a substância tem atividade fungicida. Nas figuras seguintes tem a relação entre o número de UFC/mL expresso em  $\log_{10}$  versus os intervalos de tempo nas diferentes concentrações utilizadas sendo CIM/2, CIM e CIMx2, contra a cepa de *C. albicans*.

A figura 5 mostra que a substância teste KD1 em 4 horas contribuiu para redução de quase 99% da quantidade de colônias da cepa *C. albicans* nas concentrações CIM/2, CIM e CIMx2, evidenciando que esta substância possui atividade fungicida contra a *C. albicans*, dependendo da concentração utilizada, esse comportamento persiste ao longo das 24 horas. Situação semelhante foi observado na figura 6 em que representa a anfotericina B nas mesmas concentrações CIM/2, CIM e CIMx2 e em 4 horas de exposição já se observa a redução das populações das cepas de *C. albicans*, isso prevalecendo ao longo das 24 horas. A cepa teve crescimento satisfatório nos controles positivos, ou seja, sem a presença da substância teste ou qualquer antifúngico.

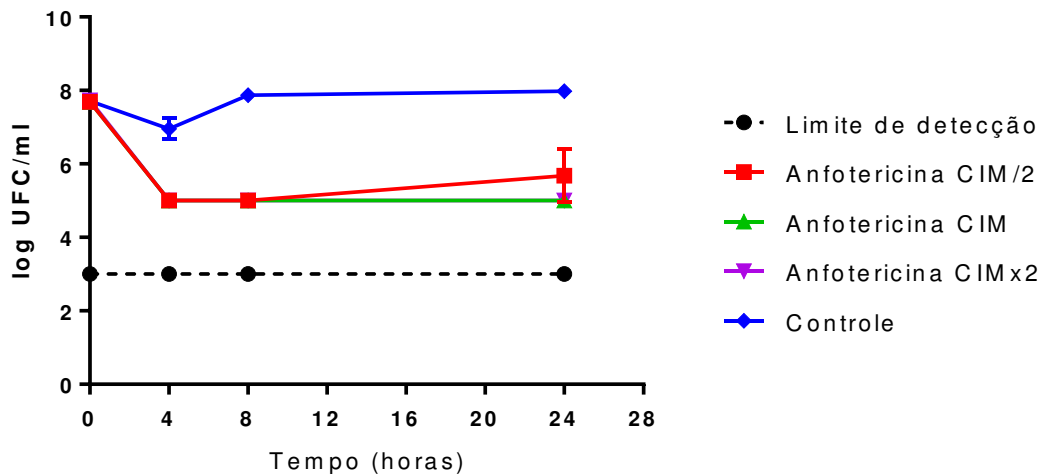
**Figura 5 (n=3):** Cinética de morte de *Candida albicans* quando exposta à KD1 em função do tempo.



**Legenda:** KD1- substância teste utilizada no ensaio

**Fonte:** Própria autoria, 2020.

**Figura 6 (n=3):** Cinética de morte de *Candida albicans* quando exposta à anfotericina B em função do tempo.



**Fonte:** Própria autoria, 2020.

Os antifúngicos são classificados conforme sua ação biológica, podendo ser fungistáticos, substâncias que inibem o crescimento fúngico ou fungicidas substâncias que matam as células. Cada antifúngico apresenta um mecanismo de ação e eles são classificados de acordo com a ação exercida nas células fúngicas. A terapia antifúngica requer cuidados, pois existem semelhanças fisiológicas e bioquímicas entre as células do hospedeiro humano e a célula fúngica. Por isso é importante a descoberta de novos compostos fungicidas (DA SILVA-ROCHA et al., 2014; KONSTANTYNER et al., 2013; GEDDES-MCALISTER, 2019).

Na literatura observamos vários estudos de diversos compostos com prováveis atividade antifúngica, Liu e colaboradores (2019), investigaram a atividade antifúngica de um composto hidroalcoólico contra diferentes fungos, dentre estes a *C. albicans* em que obtiveram atividade máxima a partir de 7 horas de incubação, esse sendo feito com a concentração 208 µg/mL. A substância teste utilizada nesse estudo KD1, apresentou atividade máxima a partir de 4 horas de incubação em todas as concentrações, levando a um forte indício de ser fungicida.

Silva et al. (2020), também se preocuparam em fazer essa análise com o composto que estudaram, analisaram a atividade antifúngica da molécula sintética β-citronellol, em que conseguiu inibir o crescimento de duas espécies do gênero *Candida*, sendo *C. albicans* e *C. tropicalis*, durante um ensaio de 24h, realizados em diferentes concentrações.

Em um estudo semelhante a este realizado por Leite et al. (2015), encontraram a influência de uma substância sintética geraniol, contra cepas de *C. albicans*, em intervalos de tempo durante um período de 24h, encontrando resultados semelhantes em que o monoterpene inibiu o crescimento da levedura mantendo-se constante a partir do intervalo de 8h, na concentração de 16µg/mL e já na concentração 32µg/mL demonstrou atividade fungicida, diminuindo ao final de 24h, 90% da população de leveduras de *C. albicans*.



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo por base os dados expostos, a substância teste KD1 inibiu o crescimento de todas as espécies de *Candida* spp. avaliadas, sendo elas a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* nas concentrações que variaram de 32 a 64 µg/mL. Concomitantemente, a substâncias teste KD1 provocou alterações significativas na micromorfologia destes microrganismos, reduzindo a quantidade de estruturas de resistência, tais quais a formação de blastoconídeos e claminconídeos, como bem eliminando parte dos fatores de virulência, em especial pseudo-hifas e hifas. Além disso, a associação entre a substância teste KD1 com a anfotericina B (fármaco padrão), se mostrou indiferente, nas concentrações empregadas nesse estudo. Finalmente, a ação fungicida da substância teste foi demonstrada no ensaio de cinética de morte microbiana, com a *C. albicans*, revelando assim um caráter concentração-dependente. A substância KD1 apresentou atividade anti-*Candida*, porém o presente estudo comporta resultados *in vitro* e se faz necessário estudos complementares.

## REFERÊNCIAS

- ABRANTES, P.M.S.; MCARTHUR, C.P.; AFRICA, C.W.J. Multi-drug resistant oral *Candida* species isolated from HIV-positive patients in South Africa and Cameroon. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, n. 2, p. 222-227, 2014.
- AGUIAR, C. E. R.; MEDEIROS, H. I. R.; SILVA, B. B. M. et al. O estado da arte de derivados da Lausona. **Brazilian Journal of development**, Curitiba, v. 6, n. 8, p. 57998-58006, 2020.
- AYO, R. G.; AMUPITAN, J. O.; ZHAO, Y. Cytotoxicity and antimicrobial studies of 1,6,8-trihydroxy-3-methyl-anthraquinone (emodin) isolated from the leaves of *Cassia nigricans* Vahl. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 11, p. 1276-1279, 2007.
- BANSAL, V.; GUPTA, H.; BHADURI, T.; et al. Agrawal Um Avaliação da eficácia antimicrobiana do extrato de nim e cravo-da-índia contra *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*: um estudo *in vitro*. **Revista médica nigeriana**, v. 60, n. 6, p. 285-289, 2019.
- BARRIUSO, J.; HOGAN, D.A.; KESHAVARZ, T.; et al. Role of quorum sensing and chemical communication in fungal biotechnology and pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, n. 5, p. 627–638, 2018.
- BERMAN, J.; SUDBERY, P.E. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. **Nature Reviews Genetics**, n. 3, p. 918-30, 2002.
- BELENKY P.; CAMACHO, D.; COLLINS, J. J. Fungicidal Drugs Induce a Common Oxidative Damage Cellular Death Pathway. **Cell Reports**, v. 3, n. 2, p. 350–358. 2013.
- BONGOMIN, F.; GAGO, S.; OLADELE, R.O. et al. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. **Journal of Fungi**. v.3, n.57, p. 1-29, 2017.
- CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida* spp. **Revista Odontologia UNESP**, v. 39, n. 3 p. 179-84, 2010.
- CAMPOS, T.; COSENTINO, C.; SIMIONI, P. U.; UGRINOVICH, L. Avaliação do comportamento de leveduras do gênero *Candida* a fármacos antifúngicos. **Revista Ciência & Inovação**, v.5, n.1, 2020.
- CAMPITELLI, M.; ZEINEDDINE, N.; SAMAHA, G.; et al. Combination antifungal therapy: A review of current data. **Journal of clinical medicine research**, v. 9, n. 6, p. 451–456, 2017.
- ČERNÁKOVÁ, L.; LIGHT, C.; SALEHI, B. et al. Novel Therapies for Biofilm-Based *Candida* spp. Infections. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1214, p. 93-123, 2019.
- CHAVES, G. M.; SILVA-ROCHA, W. P. Superoxide dismutases and glutaredoxins have a distinct role in the response of *Candida albicans* to oxidative stress generated by the chemical compounds menadione and diamide. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 8, p. 998–1005, 2012.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Candidúria: uma abordagem clínica e terapêutica Candiduria: a clinical and therapeutic approach. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 3, p. 332–337, 2007.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599 – 607, 2003.

CORTEZ, L. E. R.; YAMAGUCHI, M.U.; CORTEZ, D. A. G.; et al. Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae) e *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (Poaceae). **Mundo saúde (Impr.)**, v. 39, n. 4, p. 433-440, 2015.

CUI, J.; REN, B.; TONG, Y.; et al. Synergistic combinations of antifungals and anti-virulence agents to fight against *Candida albicans*. **Virulence**, v. 6, n. 4, p. 362–371, 2015.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**, approved standard M27-A3, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, v. 28, p. 14, 2008.

CHUDZIK, B.; KOSELSKI, M.; CZURYLO, A.; et al. A new look at the antibiotic amphotericin B effect on *C. albicans* plasma membrane permeability and cell viability functions. **European Biophysics Journal**, v. 44, n. 1-2, p. 77-90. 2015

DA SILVA-ROCHA, W. P.; LEMOS, V. L. B.; SVIDIZISNKI, T. I. E. et al. *Candida* species distribution, genotyping and virulence factors of *Candida albicans* isolated from the oral cavity of kidney transplant recipients of two geographic regions of Brazil. **BMC oral health PMID: 24628850 PMCID: PMC3995545**, v. 14, p. 20, 2014.

DA MATTA, D. A.; ALMEIDA, L.P.; MACHADO, A.M.; et al. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v. 57, n. 1, p. 399-404, 2007.

DIGNANI, M.C.; SOLOMKIN, J.S.; ANAISSE, E. *Candida*. In : Anaisse E, McGinnis MR, Pfaller MA, editors. Medical Mycology. **Philadelphia: Churchill Livingstone**; p. 195-239, 2003.

DIAS, I. J.; TRAJANO, E. R. I. S.; CASTRO, R. D.; et al. Antifungal activity of linalool in cases of *Candida* spp. isolated from individuals with oral candidiasis. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, 2017.

DEL ROSARIO, A. M.; VICECONTE, F. R.; VELA, GUROVIC, M. S. Effect of quórum sensing molecules and natamycin on biofilms of *Candida tropicalis* and other yeasts isolated from industrial juice filtration membranes. **Journal Applied Microbiology**, 2019.

DOI, A.M.; PIGNATARI, A.C.C.; EDMOND, M.B.; et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PLoS One**, v. 11, n. 1, 2016.

DOERN, C. D. When Does 2 Plus 2 Equal 5? A Review of Antimicrobial Synergy Testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 12, p. 4124–4128, 2014.

EL-GAMEL, NADIA E. A.; FARGHALY, THORAYA A. Design and synthesis of novel complexes containing N-phenyl-1H-pyrazole moiety: Ni complex as potential antifungal and antiproliferative compound. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 115, p. 469–475, nov. 2013.

EL-AZIZI, M.; FARAG, N.; KHARDORI, N. Antifungal activity of amphotericin B and voriconazole against the biofilms and biofilm-dispersed cells of *Candida albicans* employing a newly developed in vitro pharmacokinetic model. **Annals Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 4, n. 1, p. 14-21, 2015.

FIORANTI, C. O ataque silencioso dos fungos. **Revista Fapesp**, Edição 243 mai. 2016. **Disponível em:** <<https://revistapesquisa.fapesp.br/2016/05/19/o-ataque-silencioso-dos-fungos/>>. **Acesso em:** 18 de agosto de 2019.

GABARDI, S.; MARTIN, S.; SURA, M. et al. Micafungin treatment and eradication of candiduria among hospitalized patients. **International urology and nephrology**, v. 48, n. 11, p. 1881– 1885, 2016.

GARCIA, A.L.; DE SIQUEIRA, A.M. Isolamento, identificação e sorotipagem de *Candida albicans* a partir de secreção vaginal. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 30, n. 4, p. 270-3, 1988.

GE, H. M.; HUANG, B.; TAN, S. H.; et al. Bioactive oligostilbenoids from the stem bark of *Hopea exalata*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 12, p. 1800-1802, 2006.

GEDDES-MCALISTER, J.; SHAPIRO, R. S. New pathogens, new tricks: emerging, drug-resistant fungal pathogens and future prospects for antifungal therapeutics. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 1435, n. 1, p. 57-78, 2019.

GIACOMAZZI, J.; BAETHGEN, L.; CARNEIRO, L.C.; et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**. v.59, p.145-150, 2016.

GUPTA, R. K.; GUPTA, P. Opportunistic fungal infections. In *Pathology of Opportunistic Infections*. **Springer Cham: Elsevier**, p. 53-130, 2017.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GIONGO, J.L.; VAUCHER, R.A.; FAUSTO, V.P.; et al. Anti-*Candida* activity assessment of *Pelargonium graveolens* oil free and nanoemulsion in biofilm formation in hospital medical supplies. **Microbial Pathogenesis**, v. 100, p. 170-178, 2016.

GORTHI, L. V. Morphological Classification of Fungal Infections (Yeasts, Mold, Dimorphic). In *Fungal Infections of the Central Nervous System*. **Springer, Cham: Elsevier**, pp. 23-30, 2019.

GUINEA, J. Global trends in the distribuiton of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n. 5, p. 10, 2014.

- GUZZETTI, L. B.; VESCINA, C. M.; GIL, M. F.; et al. Candidemias em pediatria: distribuição de espécies y sensibilidade a los antifúngicos. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 49, n. 4, p. 320-322, 2017.
- HAN, B.; CHEN, J.; YU, Y.; et al. Antifungal activity of *Rubus chingii* extract combined with fluconazole against fluconazole-resistant *Candida albicans*. **Microbiology and Immunology**, v. 60, n. 2, p. 82-92, 2016.
- HOGAN, D.A. Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. **Eukaryot Cell**, v. 5, n. 4, p. 613-19, 2006.
- INUI, T.; WANG, Y.; DENG, S.; et al. Counter-current chromatography based analysis of synergy in an anti-tuberculosis ethnobotanical. **Journal of Chromatography A**, v. 1151, n. 1-2, p. 211-5, 2007.
- JAMAL, M.; AHMAD, W.; ANDLEEB, S. et al. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 81, n. 1, p. 7–11, 2018.
- JANOUT, V.; SCHELL, W.A.; THÉVENIN, D.; et al. Taming Amphotericin B. **Bioconjugate Chemistry**, v. 26, n. 10, p. 2021-2024, 2015.
- JOTHIPRAKASAM, V.; SAMBANTHAM, M.; CHINNATHAMBI, S.; et al. *Candida tropicalis* biofilm inhibition by ZnO nanoparticles and EDTA. **Archives of Oral Biology**, v. 73, p. 21-24, 2016.
- KHAN, R.; CHATTON, A.; THORENS, G.; et al. Validation of the French version of the alcohol, smoking and substance involvement screening test (ASSIST) in the elderly. **Substance Abuse Treatment, Prevention and Policy**, v. 7, n. 14. 2012.
- KLEPSEK, M. E.; WOLFE, E. J.; JONES, R. N.; et al. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B tested against *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 6, p. 1392-1395, 1997.
- KULLBERG, B.; ARENDRUP, M. C. Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, p. 1445–1456, 2016.
- KONSTANTYNER, T. C. R. O.; SILVA, A.M.; TANAKA, L. F.; et al. Factors associated with time free of oral candidiasis in children living with HIV/AIDS, São Paulo, Brazil. **Cadernos De Saúde Pública PMID: 24233035**, v. 29, n. 11, p. 2197–2207, 2013.
- KUMAGAI, Y.; SHINKAI, Y.; MIURA, T.; et al. A biologia química das naftoquinonas e suas implicações ambientais. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.52, p. 221-247, 2012.
- LEITE, M. C. A.; BEZERRA, A. P. B.; SOUSA, J. P.; et al. Investigating the antifungal activity and mechanism(s) of geraniol against *Candida albicans* strains. **Medical Mycology**, v. 53, n. 3, p. 275–284, 2015.
- LOCKHART, S.R.; ETIENNE, K.A.; VALLABHANENI, S. et al. Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 2, p. 134-140, 2017.

LOHSE, M. B.; GULATI, M.; JOHNSON, A.D.; et al. Desenvolvimento e regulação de biofilmes de uma e de várias espécies de *Candida albicans*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, p. 19–31, 2018.

LIPKE, P.N. What we do not know about fungal cell adhesion molecules. **Journal Fungi**, v. 4, n. 59, 2018.

LIU, W.; SUN, B.; YANG, M.; et al. Antifungal Activity of Crude Extract from the Rhizome and Root of *Smilacina japonica* A. Gray. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, volume 2019.

LI, Y.; JIAO, P.; LI, Y.; et al. The synergistic antifungal effect and potential mechanism of D-penicillamine combined with fluconazole against *Candida albicans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 2853, 2019.

LI, R. C.; SCHENTAG, J.J.; NIX, DE. The fractional maximal effect method: a new way to characterize the effect of antibiotic combinations and other nonlinear pharmacodynamic interactions. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 37, n. 3, p. 523–31, 1993

MAUBON, D.; GARNAUD, C.; CALANDRA, T.; et al. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? **Intensive Care Med**, v. 40, n. 9, p. 1241–55, 2014.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119–128, 2013.

MARSH, P.; MARTIN, M. V. *Microbiologia oral*. 4<sup>o</sup> ed. Santos: São Paulo-SP, 2005.

MARTINS, G. R.; FONSECA, T. S.; MARTÍNEZ-FRUCTUOSO, L.; et al. Antifungal phenylpropanoid glycosides from *Lippia rubella*. **Journal of natural products**, v. 82, n. 3, p. 566-572, 2019.

MALLADI, S.; ISLOOR, A.M.; PEETHAMBAR, S.K et al. Synthesis and biological evaluation of newer analogues of 2,5-disubstituted 1,3,4-oxadiazole containing pyrazole moiety as antimicrobial agents. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, n. 6, p. 1185–1191, 2014.

MASLYK, M.; JANECZKO, M.; DEMCHUK, O. M.; et al. A representative of arylcyanomethylenequinone oximes effectively inhibits growth and formation of hyphae in *Candida albicans* and influences the activity of protein kinases in vitro. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, p. 244-252, 2018.

MELLO, M. V. P.; LANZMASTER, M. Ativação Redox como Estratégia para o Desenvolvimento de Novos Fármacos Aplicados ao Tratamento de Câncer. **Revista Virtual Química**. v. 7, n. 5, p. 1810-1829, 2015.

MIOTTO, N. M. L.; YURGEL, L. S.; CHERUBINI, K. et al. Métodos laboratoriais de identificação do fungo *Candida*. **Revista da Faculdade de Odontologia**. Passo Fundo, v. 9, n. 1, p. 27-33, 2004.

MONGE, R. A. et al. The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. **Microbiology**, London, v. 152, p. 905-912, 2006.

- MONTERO, J.G.; MARTÍN, A.D.; PIAPPÓN, M.R.P. DE; et al. Infección fúngica invasiva em los pacientes ingresados em las áreas de críticos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 30, n. 6, p. 338-343, 2012.
- MOREIRA, L. S.; DORIA, A. C. O. C.; SANTOS, T. B. et al. Estudo da resistência aos antifúngicos de leveduras isoladas de candidúrias de um hospital de médio porte. **Revista Univap**, São Paulo-Brasil, v. 23, n. 43, 2017.
- MOTOA, G.; MUÑOZ, J.S.; OÑATE, J.; et al. Epidemiology of *Candida* isolates from Intensive Care Units in Colombia from 2010 to 2013. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 34, n. 1, p. 17 – 22, 2016.
- MUKHERJEE, P. K.; SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; et al. Combination treatment of invasive fungal infections. **Clinical Microbiology Review**, v. 18, p. 163-194, 2005.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiológica Médica**, 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. p. 627-642, 2014.
- NAVARINI, A. **Avaliação de testes de identificação e sensibilidade que podem ser utilizados em laboratórios clínicos em Cepas de *Candida* spp.** 2007. São Paulo. 57 f. Tese (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, 2007.
- NOBILE, C.J.; MITCHELL, A.P. Genetics and genomics of *Candida albicans* biofilm formation. **Cellular microbiology**, v. 8, n. 9, p. 1382-1391, 2006.
- NÓBREGA, J. R.; et al. Atividade antifúngica do carvacrol e associação entre agentes antifúngicos contra espécie de *Candida* não- albicans. **Scientia Plena**, v. 15, n. 10, 2019.
- OLIVEIRA, L.B.S.; BATISTA, A.H.M.; FERNANDES, F.C.; et al. Atividade antifúngica e possível mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* (Linn.) sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.18, n.2, p.511-523, 2016.
- OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana de determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18,p. 301-307, 2008.
- PAUW, B.E. What are fungal infections?. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 3, n. 1, 2011.
- PAI, V.; GANAVALLI, A.; KIKKERI, N. N. Antifungal resistance in dermatology. **Indian Journal of Dermatology**, v.63, n.5, p.361-368, 2018.
- PEIXOTO, L.R.; ROSALEN, P.L.; FERREIRA, G.L.S.; et al. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. **Archives of Oral Biology**, v. 73, p. 179-185, 2016.
- PERLIN, D. S. Echinocandin Resistance in *Candida*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 6, p. 612-617, 2015.

PERLIN, D.S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p 382-392, 2017.

PEMÁN J, ZARAGOZA R. Hacia el diagnóstico temprano de la candidiasis invasora em el paciente crítico. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 29, n. 2, p. 71-75, 2012.

PINTO, E.; GONÇALVES, M.J.; CAVALEIRO, C. et al. Antifungal Activity of Thapsia villosa Essential Oil against *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Aspergillus* and Dermatophyte Species. **Molecules**, v. 22, 2017.

PFALLER, M. A.; MESSER, S.A.; HOUSTON, A.; et al. National epidemiology of mycoses survey: a multicenter study of strain variation and antifungal susceptibility among isolates of *Candida* species. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 31, n. 1, p. 289–96, 1998.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; SHEEHAN, D. J. Interpretive breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. **Clinical Microbiology Review**, v. 19, n. 2, p. 435-47, 2006.

PILMIS, B.; PUEL, A.; LORTHOLARY, O.; et al. New clinical phenotypes of fungal infections in special hosts. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 8, p. 681 – 687, 2016.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; et al. In: *Fármacos Antifúngicos*. Farmacologia. **Elsevier**, 7ª ed. 2011.

RANG, H. P. *Fármacos Antifúngicos*. **Farmacologia de Rang & Dale**, n.7, p. 758-763, 2012.

REGINATTO, P.; BERGAMO, V. Z.; BERLITZ, S. J.; et al. Rational selection of antifungal drugs to propose a new formulation strategy to control *Candida* biofilm formation on venous catheters. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2020.

RODRIGUES, M.E.; SILVA, S.; AZEREDO, J.; et al. Novel strategies to fight *Candida* species infection. **Critical Reviews in Microbiology**, p. 1–13, 2014.

RODRIGUES, C. F.; RODRIGUES, M. E.; HENRIQUES, M. C. R. Promising alternative therapeutics for oral candidiasis. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, 2018.

RODRIGUES, C.; RODRIGUES, M.; SILVA, S.; et al. *Candida glabrata* biofilms: how far have we come?. **Journal Fungi** v. 3, n. 1, p. 11, 2017.

RÖRIG, K.C.O.; COLACITE, J.; ABEGG, M.A. Produção de fatores de virulência in vitro por espécies patogênicas do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 225-7, 2009.

SAMARANAYAKE, Y.H.; YE, J.; YAU, J.Y.Y.; et al. In Vitro Method To Study Antifungal Perfusion in *Candida* Biofilms. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 2, p. 818–825, 2005.

SANTANA, D.P.; RIBEIRO, E.L.; MENEZES, A.C.S.; et al. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, n. 2, p. 229- 233, 2013.



- SARDI, J.C.O.; DUQUE, C.; MARIANO, F.S.; et al. *Candida* spp. in periodontal disease: a brief review. **Journal of Oral Science**, v. 52, n. 2, p.177- 185, 2010.
- SAEED, S. M. G.; SAYEED, S. A.; ASHRAF, S.; et al. Um novo método para o isolamento e purificação de leisona de *Lawsonia inermis* e sua atividade inibitória de ROS. **Pakistan Journal of Botany**, v. 45, n. 4, p. 1431-1436, 2013.
- SASAKI, K.; ABE, H.; YOSHIZAKI, F. In vitro antifungal activity of naphthoquinone derivatives. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 25, n.5, p. 669-670, 2002.
- SOARES, G. L.; SANTOS, C. S.; FREITAS, J. C. R.; et al. Síntese e avaliação do prop-2-in-1-il 4,6-di-O-acetil-2,3-didesoxi- $\alpha$ -D-eritro-hex-2-enopiranosídeo contra espécies não *albicans* de *Candida* e resultados da associação com a anfotericina B ou com o cetoconazol. **Revista PanAmazônica de Saúde**, v.9, n.2, p.43-50, 2018.
- SILVA, P. D. C.; SANTOS, B. L. C.; SOARES, G. L.; et al. A. Atividade anti-*Candida albicans* da associação do citrônella com a anfotericina b ou com o cetoconazol. **Periódico tchê química**, v. 16, n. 31, p. 250-257, 2018.
- SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288–305, 2012.
- SILVA, D.; DINIZ-NETO, H.; CORDEIRO, L.; et al. (R)-(+)- $\beta$ -Citronellol and (S)-(-)- $\beta$ -Citronellol in Combination with Amphotericin B against *Candida* Spp. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1785, 2020.
- SOARES, G. L.; SANTOS, B. L. C.; LUZ, B. R.A.; et al. A. Atividade antifúngica da associação do carvacrol com a anfotericina b ou com o cetoconazol. **Periódico tchê química**, v. 16, n. 31, p. 12-17, 2018.
- SULE, H.; KUMURYA, A. S.; SHEMA, F. B. Candidiasis Opportunistic Mycosis within Nigeria: A Review UMYU **Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 1, p. 77-82, 2019.
- SUDBERY, P.E. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 737–48, 2011.
- SHIELDS, R.; KLINE, E.; HEALEY, K.; et al. Spontaneous mutational frequency and FKS mutation rates vary by echinocandin agent against *Candida glabrata*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, 2018.
- SKUPIEN, J. A.; VALENTINI, F.; BOSCATO, N.; et al. Prevention and treatment of *Candida* colonization on denture liners: A systematic review. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, V. 110, n. 5, p. 356-362, 2013.
- SPADER, T. B. Avaliação da suscetibilidade de *Rhodotorula mucilaginosa* frente a associações de antifúngicos com fármacos diversos. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2017.
- SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; ALMEIDA, A. M. F.; et al. The use os Standard Methodology for Determination of Antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp. and *Cryptococcus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 391-397, 2007.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. Candida infections, causes, targets, and resistance mechanisms: Traditional and alternative antifungal agents. **BioMed Research International**, New York, v. 2013, 2013.

TSANG, C.S.P.; CHU, F.C.S.; LEUNG, W.K.; et al. Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 10, p. 1393–1398, 2007.

TSANG, P.W.K.; BANDARA, H.M.H.N.; FONG, W.P. Purpurin suppresses *Candida albicans* biofilm formation and hyphal development. **PloS One**, v. 7, n. 11, 2012.

THOMPSON, G.R.; WIEDERHOLD, N.P.; VALLOR, A.C.; et al. Development of caspofungin resistance following prolonged therapy for invasive candidiasis secondary to *Candida glabrata* infection. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 52, n. 10, p. 3783-5, 2008.

TEDILA, H.; ASSEFA, A.; HAJI, F. Candidiasis and opportunistic mycosis in human. **Novel Research in Microbiology Journal**, v. 3, n. 1, p. 190-203, 2019.

VAN WOLFEREN, M.; ORELL, A.; ALBERS, S-V. Archaealbiofilm formation. **Nature Reviews Microbiology**, v.16, n. 11, p. 699–713, 2018.

VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. I. S. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 3. P. 235-9, 2017.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v.10, n.95, p.105, 2014.

WHALEN, K.; FINKEL, R.; PANAVELIL, T.A. **Farmacologia ilustrada**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

WANG, R. Biofilms and meat safety: a mini-review. **Journal of Food Protection**, v. 82, n. 1, p.120–127. 2019.

ZORDAN, R.; CORMACK, B. Adhesins in opportunistic fungal pathogens. In *Candida and Candidiasis*, 2 ed. **Calderone RA, Clancy CJ**. ASM Press, p. 243-59, 2012.