



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

MELYNIA CHAVES LEITE DE ANDRADE

**LEVEDURAS CLÍNICAS DO COMPLEXO *Candida parapsilosis*: virulência e controle
por ação do d-limoneno como bloqueador da morfogênese, aderência e crescimento**

**RECIFE
2020**

MELYNA CHAVES LEITE DE ANDRADE

LEVEDURAS CLÍNICAS DO COMPLEXO *Candida parapsilosis*: virulência e controle por ação do d-limoneno como bloqueador da morfogênese, aderência e crescimento

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical.

Área de Concentração: Medicina Tropical

Orientadora: Prof^a Dra. Rejane Pereira Neves

Co-orientador: Dr. Luiz Nascimento de Araújo Neto

Recife
2020

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

A5531 Andrade Melyna Chaves Leite de.
Leveduras clínicas do complexo *Candida parapsilosis*: virulência e controle por ação do d-limoneno como bloqueador da morfogênese, aderência e crescimento / Melyna Chaves Leite de Andrade. – 2020.
94 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Rejane Pereira Neves.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical. Recife, 2020.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Candidíase invasiva. 2. Câncer. 3. *Candida parapsilosis*. 4. Terpeno. 5. Atividade anti-virulência. I. Neves, Rejane Pereira (Orientadora). I. Título.

610 CDD (20.ed.) UFPE (CCS2020-137)

MELYNA CHAVES LEITE DE ANDRADE

LEVEDURAS CLÍNICAS DO COMPLEXO *Candida parapsilosis*: virulência e controle por ação do d-limoneno como bloqueador da morfogênese, aderência e crescimento

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical.

Aprovada em: 17/02/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a Rejane Pereira Neves (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a Sylvia Lemos Hinrichsen (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a Carolina Maria da Silva (Examinador Externo)
Universidade de Pernambuco

Dr Cícero Pinheiro Inácio (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

À minha família, por todo o amor e dedicação incondicional sempre me motivando a lutar pelos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por permitir mais essa conquista em minha vida.

À Universidade Federal de Pernambuco, à Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa concedida, ao Centro de Pesquisas Ageu Magalhães e aos Laboratórios de Micologia Médica Sylvio Campos e Imunodiagnóstico pela infraestrutura disponibilizada para realização dos experimentos.

Agradeço aos meus pais, Ivete de Moraes Chaves e Melício da Costa Leite Neto, responsáveis pela pessoa que me tornei, e que sempre fizeram de tudo para que eu conquistasse meus objetivos, me incentivando e acreditando em minha capacidade, até quando eu mesma duvidei. Aos meus irmãos Melyssa e Luiz Felipe por todo o apoio e incentivo e ao meu esposo João Bosco de Andrade Lima Filho por entender e respeitar a minha ausência e por sempre me incentivar a continuar na vida acadêmica. A vocês dedico todo meu amor e carinho.

Agradeço a minha orientadora Profa. Rejane Neves, pela oportunidade, e por todo apoio e confiança em mim depositada e por sempre contribuir para o aperfeiçoamento do meu perfil profissional.

À professora Oliane Magalhães por todo o ensino na micologia médica, amizade e aconselhamento. Aos professores Danielle Macêdo, Reginaldo Gonçalves e Armando Marsden por sempre estarem dispostos a ajudar e por todos os ensinamentos transmitidos na prática laboratorial.

Por fim, mas não menos importante, agradeço aos amigos do Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos e Imunodiagnóstico por toda ajuda nos experimentos, momentos de descontração, de desabafos, por estarem sempre ao meu lado. Vocês fazem parte da minha família e sei que posso sempre contar com vocês. Foi um prazer imenso fazer parte da família Micologia Médica.

RESUMO

Nas últimas décadas a candidíase invasiva vem ocupando lugar de destaque no âmbito das infecções relacionadas à assistência a saúde, principalmente em pacientes gravemente doentes, como os portadores de neoplasias malignas. Esta micose representa mundialmente a terceira causa de infecções hospitalares, e dentre as leveduras, se destaca aquelas do complexo *Candida parapsilosis*, representando grande relevância clínica. Ademais, a frequência de isolamento deste complexo, vem sendo maior que de *C. albicans*, além dessas espécies possuírem alto potencial de virulência e patogenicidade. Aliado a isto, o surgimento de cepas resistentes e os efeitos tóxicos dos antifúngicos utilizados limitam a escolha terapêutica e contribuem para mau prognóstico. Dessa forma, o uso de um composto natural como o D-Limoneno surge como uma alternativa. Este composto possui atividade antimicrobiana descrita; no entanto, o mecanismo de ação e atividade antivirulência frente às espécies do complexo *C. parapsilosis*, até então, não estão elucidadas. Assim, este estudo teve como objetivo diagnosticar candidíase invasiva em pacientes oncológicos, caracterizar quanto ao potencial de virulência, bem como avaliar a ação antivirulência e antifúngica do D-Limoneno frente aos isolados do complexo. O diagnóstico da candidíase invasiva foi realizado por meio de exame direto e cultura e as cepas de leveduras isoladas foram purificadas e identificadas por técnica proteômica. Além disso, foram obtidas leveduras do complexo *C. parapsilosis* pertencentes a Coleção de Culturas Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco. Os isolados foram submetidos a testes de susceptibilidade antifúngica com drogas convencionais e com o D-Limoneno. Ainda foi avaliada a atividade antivirulência do limoneno frente a estas leveduras. No diagnóstico da candidíase invasiva em pacientes oncológicos foi verificado um número variado de espécies de *Candida* agentes de candidemia apresentando altas taxas de resistência aos antifúngicos. Ainda, foi constatado que o D-Limoneno exibiu atividade antifúngica frente às leveduras do complexo *C. parapsilosis*, além de uma excelente atividade antivirulência na inibição da morfogênese e aderência das leveduras ao epitélio humano. Este estudo foi o primeiro a avaliar a atividade antivirulência do D-Limoneno frente a leveduras do complexo *C. parapsilosis* o qual se mostrou promissor para o tratamento da candidíase invasiva por leveduras desse complexo e assim, contribuir para um melhor prognóstico e sobrevida dos pacientes.

Palavras-chave: Candidíase invasiva. Câncer. *Candida parapsilosis*. Terpeno. Atividade anti-virulência.

ABSTRACT

In the last decades, invasive candidiasis has been occupying a prominent place in the context of healthcare-related infections, especially in critically ill patients, such as those with malignant neoplasms. This invasive mycosis represents the third leading cause of hospital infections worldwide, and among yeasts, those of the *C. parapsilosis* complex have stood out, representing great clinical relevance. Furthermore, the frequency of this complex, in turn, has been greater than the isolation of *C. albicans* and these species have shown to have a high potential for virulence and pathogenicity. Allied to this, the emergence of resistant strains and the toxic effects of the antifungals used limit the therapeutic choice and contribute to a poor prognosis. Thus, the use of a natural compound such as D-Limonene appears as an alternative. This compound has antimicrobial activity described, however, the mechanism of action and antivirulence activity against species of the *C. parapsilosis* complex, until then, are not elucidated. Thus, this study aimed to diagnose invasive candidiasis by yeasts of this complex in cancer patients, to characterize yeasts for virulence potential, as well as to evaluate the anti-virulence and antifungal action of D-Limonene against the isolates of the complex. The diagnosis of invasive candidacy was carried out by means of direct examination and culture and as strains of isolated yeasts were purified and identified by protein technique. In addition, yeasts from the *C. parapsilosis* complex belonging to the URM Micoteca Culture Collection at the Federal University of Pernambuco were collected. All tests were used for antifungal susceptibility testing with active drugs and with D-Limonene. An antivirulent activity of this natural product was also evaluated against these yeasts. In the diagnosis of invasive candidiasis in cancer patients, a varied number of *Candida* species of candidemia agents have been found showing high rates of resistance to antifungals. In addition, it was found that D-Limonene exhibited antifungal activity against the yeasts of the *C. parapsilosis* complex, in addition to an excellent antivirulence activity in inhibiting morphogenesis and adherence of yeasts to the human epithelium. This study was the first to assess the anti-virulence activity of D-Limonene against yeasts of the *C. parapsilosis* complex, in which it has shown promise for the treatment of invasive candidiasis by yeasts of this complex and thus contribute to a better prognosis and survival of patients.

Key-words: Invasive candidiasis. Cancer. *Candida parapsilosis*. Terpene. Anti-virulence activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo 1

- Figura 1 - Ecocardiograma transtorácico paraesternal, mostrando vegetação de prótese valvar aórtica grave, com grande massa móvel 2,11 x 1,61 cm (a), associada ao espessamento do folheto valvar (b) e projeção de vegetação na aorta (A). Além disso, pode ser observado refluxo discreto (B). Ainda, pode-se observar a amostra protética da válvula (C) e células ovais de levedura e hialina clarificada com hidróxido de potássio a 20% (KOH) observado ao microscópio óptico (aum 400x) (D)..... 45

Artigo 2

- Figura 1 - Microscopia direta de amostra de sangue de paciente com candidemia. As setas indicam as células de leveduras ovais e hialinas presentes na amostra (aum 400X)..... 50

Artigo 3

- Figura 1 - Avaliação da inibição da morfogênese de leveduras do complexo *Candida parapsilosis* pelo D-Limoneno. (A) Emissão de tubo germinativo após 1 hora de incubação e (B) índice de morfogênese (IM) após 3h de incubação. Os dados representam a média e desvio padrão em triplicata (n₃). Para a análise, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi realizado para todas as médias obtidas ao nível de significância de 5%. Os símbolos “**”, “***”, “*****” indicam diferenças significativas entre a porcentagem de emissão de tubo germinativo e índice de morfogênese ($p \leq 0,001$), ($p \leq 0,0003$) e ($p \leq 0,0001$), respectivamente..... 63

- Figura 2 - Inibição da capacidade de aderência às células epiteliais de leveduras do complexo *Candida parapsilosis* pelo D-Limoneno. (A1-A2) URM 7445 *Candida parapsilosis* stricto sensu apresentando forte aderência antes do tratamento e fraca aderência após tratamento com o D-Limoneno e (B1-B2) URM 7434 *Candida orthopsilosis* apresentando fraca aderência antes do tratamento e aderência ausente após tratamento com o D-Limoneno. As setas indicam as células de leveduras aderidas as células epiteliais

humanas..... 65

Figura 3 - Citometria de fluxo para análises de apoptose com Anexina V e Iodeto de Propídio em células de *Candida parapsilosis* URM7445 A) *C. orthopsilosis* URM 7434 (B) e *C. metapsilosis* URM7423 (C) 24h pós-tratamento com D-limoneno. (A1, A2 e A3): células expostas a 1024µg/mL de D-limoneno, 512µg/mL e 256µg/mL respectivamente, (B1, B2 e B3): células expostas a 512µg/mL de D-limoneno, 256µg/mL e 128µg/mL respectivamente e (C1, C2 e C3): células expostas a 2048µg/mL de D-limoneno, 1024µg/mL e 512µg/mL respectivamente..... 67

Figura 4 - Detecção de espécies reativas de oxigênio (A-C) e peroxidação lipídica (D) para as espécies do complexo *Candida parapsilosis*. Para a análise, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi realizado para todas as médias obtidas ao nível de significância de 5% 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas de seis pacientes portadores de neoplasias com candidemia.....	49
Tabela 2 - Concentrações Inibitórias Mínimas dos isolados de <i>Candida</i> sp. frente aos antifúngicos da classe dos azólicos e equinocandinas.....	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	INFECÇÕES FÚNGICAS INVASIVAS.....	15
2.1.1	Diagnóstico.....	18
2.1.2	Identificação de leveduras.....	19
2.1.3	Relação câncer e infecção fúngica.....	20
2.2	COMPLEXO <i>Candida parapsilosis</i>	22
2.3	FATORES DE VIRULÊNCIA.....	25
2.3.1	Aderência.....	26
2.3.2	Morfogênese.....	28
2.4	TERAPIA ANTINFÚNGICA.....	29
2.4.1	Polienos.....	30
2.4.2	Azólicos.....	31
2.4.3	Equinocandinas.....	33
2.4.4	Limoneno.....	34
3	OBJETIVOS.....	37
3.1	OBJETIVO GERAL.....	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4	OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA.....	38
4.1	COMITE DE ÉTICA.....	38
4.2	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL MICOLÓGICO.....	38
4.2.1	Obtenção das amostras clínicas.....	38
4.2.2	Realização do diagnóstico micológico.....	38
4.2.3	Obtenção e autenticação taxonômica dos isolados de leveduras.....	38
4.2.4	Viabilidade das culturas de leveduras.....	39
4.2.5	Autenticação taxonômica.....	39
4.3	CARACTERIZAÇÃO QUANTO A VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS DO COMPLEXO <i>C. parapsilosis</i>	40
4.3.1	Ensaio da morfogênese.....	40
4.3.2	Ensaio da capacidade de aderência das leveduras às células epiteliais.....	41
4.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	42

4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
5	RESULTADOS.....	43
5.1	ARTIGO 1 - GRANDE VEGETAÇÃO FÚNGICA EM PRÓTESE AÓRTICA DEVIDA À <i>Candida parapsilosis</i> : UMA APRESENTAÇÃO INCOMMON.....	43
5.2	ARTIGO 2 - CANDIDEMIA EM PACIENTES NEOPLÁSICOS: UMA SÉRIE DE CASOS.....	46
5.3	ARTIGO 3 - MECANISMO DE AÇÃO E POTENCIAL ANTIVIRULÊNCIA DO D-LIMONENO FRENTE A LEVEDURAS CLÍNICAS DO COMPLEXO <i>Candida parapsilosis</i>	55
6	CONCLUSÃO.....	75
	REFERÊNCIAS.....	76
	APENDICE A – LARGE AORTIC PROTESIS VEGETATION DUE TO <i>Candida parapsilosis</i>: NA UNCOMMON PRESENTATION.....	90
	ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO À REVISTA DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES.....	91
	ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO À REVISTA FOOD CHEMISTRY.....	92
	ANEXO C – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	93

1 INTRODUÇÃO

O cenário mundial, nas últimas duas décadas, mostra a incidência cada vez mais crescente da candidíase invasiva. Esta infecção vem ocupando lugar de destaque no âmbito das infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS), principalmente em pacientes gravemente doentes, como aqueles convivendo com HIV/AIDS, transplantados, cardiopatas, portadores de neoplasias malignas e ainda aqueles expostos a dispositivos médicos-invasivos (AUZINGER *et al.*, 2015).

As leveduras pertencentes ao gênero *Candida* apresentam-se como comensais no hospedeiro humano, no entanto alterações no sistema imunológico ou fatores de risco podem provocar um desequilíbrio na microbiota, ou até mesmo translocação destes microrganismos e desencadear infecções sistêmicas graves em pacientes críticos, especialmente naqueles internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (ALNUAIMI *et al.*, 2015; NETEA *et al.*, 2015).

A candidíase invasiva afeta mais de 250.000 pessoas a cada ano no mundo e é responsável por mais de 50.000 mortes, sendo a terceira causa de infecções hospitalares. O agente etiológico isolado com maior incidência é *C. albicans*, no entanto, outras espécies têm emergido, a exemplo de *C. pelliculosa*, *C. haemulonii*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. famata*, *C. auris* e as espécies do complexo *C. parapsilosis* (SILVA *et al.*, 2012; BEYDA *et al.*, 2013; CLANCY, *et al.* 2017).

O complexo *C. parapsilosis* representa grande relevância clínica, uma vez que sua frequência como causa da candidíase invasiva tem sido maior do que da espécie *C. albicans*. Ademais, as leveduras pertencentes a esse complexo têm demonstrado alto potencial de virulência e patogenicidade, sendo referidas em constante associação à cateteres, sondas, entre outros dispositivos. Dentre os fatores de virulência indispensáveis para o estabelecimento da doença, a aderência às células epiteliais e emissão de estruturas filamentosas merece destaque, visto que representam o estágio inicial para infecção e invasão destas leveduras nas células do hospedeiro humano (PAPPAS *et al.*, 2018). Além disso, apresentam intensa refratariedade aos tratamentos atualmente instituídos e a hepatotoxicidade associada aos azólicos, nefrotoxicidade associada aos polienos e o surgimento de cepas resistentes as equinocandinas limitam a escolha terapêutica e contribuem para prognósticos negativos (KRIENGKAUYKIAT, ITO, DADWAL, 2011, LIM *et al.*, 2012, NETEA *et al.*, 2015).

Dessa forma, torna-se de extrema importância a busca por substâncias bioativas que possam promover o controle de fatores de virulência e a inibição do crescimento da levedura,

expressando ação antifúngica. Assim, os produtos naturais de origem vegetal surgem como alternativa terapêutica por serem ricos em óleos essenciais e seu conteúdo aromático das plantas como um tratamento promissor contra microrganismos patogênicos (WEBER *et al.*, 2014; MARASINI *et al.*, 2015). Dentre esses compostos, destacam-se os terpenóides e entre eles o limoneno. De relevante importância, o limoneno é um dos principais constituintes do óleo cítrico e o terpeno mais usado na indústria de alimentos e bebidas devido à sua agradável fragrância e não toxicidade (THAKRE *et al.*, 2018). Este é classificado como um monoterpene e está presente em várias plantas cítricas, como limão e laranja (SUN *et al.*, 2007; SHU-SHENG *et al.*, 2013).

O limoneno é relatado por apresentar diversas atividades terapêuticas como ação antibacteriana, antiparasitária, inseticida, antitumoral e principalmente, antifúngica frente a leveduras do gênero *Candida* (AGGARWAL *et al.*, 2006, THAKRE *et al.*, 2018). No entanto, seu potencial antifúngico frente às leveduras do complexo *C. parapsilosis*, seu mecanismo de ação bem como sua ação no controle de fatores de virulência produzidos por estas espécies ainda é escasso.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INFECÇÕES FÚNGICAS INVASIVAS

A partir da segunda metade do século XX, os fungos emergiram como uma das principais causas de doenças humanas, especialmente em indivíduos imunocomprometidos e pacientes hospitalizados com doenças de base graves, resultando por muitas vezes em índices elevados de morbidade e mortalidade (FISHER *et al.*, 2012). Além disso, os grandes avanços na área médica, principalmente nos cuidados intensivos contribuíram não apenas para a maior sobrevivência dos pacientes, mas também para o aumento da incidência destas infecções oportunistas (PARAMYTHIOTOU *et al.*, 2014).

Chen e colaboradores (2018) em um estudo realizado durante o período de cinco anos verificaram que 236 (11,3%) dos 2083 pacientes com malignidade hematológica foram diagnosticados com infecção fúngica invasiva pulmonar, incluindo 41 (17,4%) casos comprovados, 75 (31,8%) casos prováveis e 120 (50,8%) casos possíveis. Entre os 116 pacientes de casos comprovados e prováveis de infecção fúngica invasiva pulmonar, predominou a aspergilose (77,6%), seguida pela criptococose (9,9%) e mucormicose (4,4%).

Em um estudo realizado entre 2001 e 2010, analisando o banco de dados nacional de alta hospitalar da França, Programme de Médicalisation du Système d'Information, foi observado o registro de 35.876 casos de infecções fúngicas invasivas. Estas infecções incluíam a candidemia (43,4%), pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* (26,1%), aspergilose invasiva (23,9%), criptococose (5,2%) e mucormicose (1,5%). Neste estudo, os autores constataram que a taxa de mortalidade foi de 27,6%, sendo a candidemia e aspergilose responsáveis por 87,6% dessas mortes (BITAR *et al.*, 2014).

As taxas de incidência de candidemia foram relatadas como sendo entre 2 e 14 casos por 100.000 pessoas em estudos de base populacional (ARENDRUP, 2010; CLEVELAND *et al.*, 2015). Com mais de 400.000 casos anuais em todo o mundo, com incidência de 0,24 a 34,3 pacientes / 1.000 internações em UTI e mortalidade que se aproxima de 40%, *Candida* spp. constituem a terceira causa mais comum de infecções relacionadas à assistência a saúde em todo o mundo (BASSETI *et al.*, 2017). Cleveland e colaboradores (2015) realizaram um estudo de 2008 a 2013 onde diagnosticaram 3.848 casos de candidemia em duas regiões metropolitanas dos EUA.

A ordem de classificação de *Candida* spp. nas infecções da corrente sanguínea varia de país para país e é influenciada pelo grupo de pacientes estudados. Em estudos norte-

americanos, espécies de *Candida* representam o terceiro principal patógeno causadores de infecções da corrente sanguínea associadas à assistência à saúde, que também incluem *Staphylococcus aureus*, estafilococos coagulase-negativos e *Enterococcus* spp., Já em países europeus *Candida* spp. representa o 6º a 10º principal agente de infecções invasivas (KULLBERG, 2015; McCARTY, 2016).

Nos Estados Unidos, foi relatado que espécies de *Candida* causam até 22% das infecções da corrente sanguínea associadas aos cuidados de saúde com base em dados da Rede Nacional de Saúde e Segurança. Aproximadamente 50% dos episódios de candidemia ocorrem em UTI, refletindo a complexidade da doença geralmente associada a essa infecção (MAGILL, 2014).

As leveduras do gênero *Candida* se apresentam como comensais em humanos colonizando a pele e as superfícies mucosas, como as do trato gastrointestinal e trato urogenital. Além da limitação dos nutrientes, essas leveduras estabelecem uma relação de competição com as bactérias da microbiota, desta forma, exercem uma pressão seletiva, o que resulta na eliminação dos microrganismos menos adaptados, tendo então um equilíbrio entre as populações microbianas nos tecidos colonizados (PAM *et al.*, 2012). Nas alterações do sistema imunológico, ocorre um desequilíbrio entre os microrganismos comensais, conduzindo à debilidade podendo causar infecções superficiais em pessoas saudáveis e sistêmicas graves em pacientes críticos (NETEA *et al.*, 2015).

A candidíase invasiva é uma infecção altamente letal associada a taxas de mortalidade entre 40 e 60% (LEROY *et al.* 2016). Mohammadi e Foroughifar em 2016, no Irã, identificaram espécies de *Candida* isoladas em amostras clínicas obtidas de diferentes regiões do corpo em pacientes neutropênicos com câncer e constataram que 22 dos 309 pacientes apresentaram candidíase sistêmica, sendo *C. albicans* a espécie mais prevalente.

É interessante destacar que apesar de serem conhecidas mais de 200 espécies de *Candida*, cerca de 20 são reconhecidas como patógenos humanos. Existe uma variabilidade geográfica, na prevalência das espécies de *Candida*. As cinco espécies mais comuns são *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (PAPPAS, 2016). A espécie *C. albicans* continua a ser a espécie mais prevalente, causando doença em populações adultas e pediátricas, mas nas últimas décadas tem sido relatado um aumento no diagnóstico de candidemia causadas por outras espécies de *Candida* em ambos os grupos (CASTENHEIRA *et al.* 2016).

Em 2013, no Paquistão, Farooqi e colaboradores relataram a incidência de *C. tropicalis*, seguida por *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. albicans* como agentes em casos de

candidíase sistêmica em adultos. Estes autores afirmam também, que a idade dos pacientes é o principal fator para o acometimento da doença.

Silva e colaboradores em 2015 ressaltaram o envolvimento de várias espécies de *Candida*, como *C. albicans* e *C. parapsilosis* responsáveis pelos casos de candidíase invasiva em recém-nascidos. Além disso, espécies raras têm sido descritas, como *C. haemulonii*, considerada um patógeno emergente.

Sutcu *et al.* (2016) em um estudo realizado na Turquia, identificaram 134 infecções sistêmicas causadas por *Candida* spp. em pacientes de UTI pediátrica. Neste estudo, *Candida albicans* foi a espécie mais isolada, seguida de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis* e *C. krusei*.

Essa diversidade de espécies de *Candida* como agente de infecções invasivas também foi relatada por Trouvé e colaboradores em 2017, ao analisarem dados epidemiológicos com base em 335 casos de candidíase sistêmica em 30 hospitais na Bélgica. Neste estudo, *C. albicans* foi isolada em 50,4% dos casos, seguido por *C. glabrata* (27,3%) e *C. parapsilosis lato sensu* (9,8%).

Castenheira e colaboradores em 2016 relatam também que a prevalência de *Candida* não *C. albicans* na maioria das regiões é geralmente determinada por fatores como padrões de uso de antifúngico na região, fatores de risco de pacientes e surtos clonais. Na China, Yang *et al.* (2004) relataram 121 episódios de candidemia, onde a proporção de espécies *Candida* não-*C. albicans* (62.8%) foi maior quando comparada com os casos de candidemia causada por *C. albicans* (37.2%). Nos Estados Unidos e no noroeste da Europa, a segunda espécie mais comum é geralmente *C. glabrata* no cenário de não-surtos. Esta espécie também é geralmente mais comum entre indivíduos com idade superior a 60 anos e entre receptores de transplante de órgãos sólidos (CLEVEND *et al.*, 2015; McCARTY *et al.*, 2016).

Na América Latina, Sul da Europa, Índia e Paquistão, *C. parapsilosis* e/ou *C. tropicalis* são mais frequentemente encontradas que *C. glabrata*. O agente menos comum das cinco principais espécies de *Candida* é *C. krusei*, sendo mais comumente encontrada em pacientes com neoplasias hematológicas subjacentes que receberam profilaxia antifúngica com fluconazol (CASTENHEIRA *et al.*, 2016). Entretanto, uma tendência global muito preocupante é o surgimento de *C. auris*, agente de candidíase invasiva, considerada uma espécie multi-droga resistente (CHOWDHARY *et al.*, 2017; CLANCY *et al.*, 2017; LOCKHART *et al.*, 2017).

2.1.1 Diagnóstico

O diagnóstico rápido e preciso da candidíase invasiva é crucial para que a terapia antifúngica adequada seja iniciada rapidamente (CLANCY *et al.*, 2018). No entanto, o diagnóstico precoce nem sempre é fácil. Os sinais e sintomas clínicos para a candidíase invasiva, frequentemente, são inespecíficos e esta doença deve ser suspeitada em pacientes com fatores de risco conhecidos que tenham uma febre persistente e que não respondam ao tratamento antibacteriano. Febre e leucocitose são os principais indícios de uma infecção sistêmica, contudo 20% dos pacientes não desenvolvem hipertermia e apenas 50% apresentam leucocitose (PAPPAS *et al.*, 2018). Dessa forma, o diagnóstico da candidíase invasiva é fundamental para um bom prognóstico do paciente, visto que um atraso de um a dois dias no início da terapia antifúngica correta está associado ao aumento da mortalidade (GAREY *et al.*, 2006, GIOLO e SVIDZINSKI, 2010).

Entretanto, o diagnóstico laboratorial da candidíase invasiva representa um desafio. A coleta de amostras clínicas ideal pode não ser possível, especialmente quando o foco infeccioso é desconhecido. Em grande número de casos, procedimentos invasivos de diagnóstico não podem ser realizados devido à debilidade clínica que muitos apresentam (PAPPAS *et al.*, 2018).

O diagnóstico laboratorial de micoses baseia-se na observação da estrutura fúngica em parasitismo através da análise microscópica direta da amostra biológica e na obtenção e identificação do agente etiológico em meios de cultura específicos (BACKES *et al.*, 2016). O exame microscópico direto pode ser realizado com material biológico de acordo com a clínica do paciente e esta análise pode ser realizada a fresco, com ou sem adição de corante, clarificante ou contrastante, a depender do material biológico (OLIVEIRA, 2014). Este método é considerado o mais rápido e menos oneroso na realização do diagnóstico laboratorial micológico, todavia um resultado negativo não exclui a infecção por *Candida* (SCHELENZ *et al.*, 2019).

Comumente, os fungos não são microrganismos exigentes em suas necessidades nutricionais e facilmente desenvolvem-se em variados meios de cultura sintéticos facilitando seu isolamento em diferentes condições de incubação (KAUFFMAN *et al.*, 2011). O padrão ouro para o diagnóstico de micoses sistêmicas causadas por fungos oportunistas é a detecção do fungo na cultura de sangue, líquido ou outro material biológico de sítio estéril associado aos sinais clínicos de infecção (COUTO *et al.*, 2011). Para candidemia, a hemocultura continua sendo o padrão-ouro para o diagnóstico, no entanto a sensibilidade deste exame é baixa, cerca

de 50% a 60% e é positiva em apenas 21% a 71% dos pacientes com candidíase invasiva comprovada por autópsia, dependendo da frequência de amostragem e do volume de sangue coletado segundo Clancy e colaboradores em 2013.

Durante um episódio de candidemia, o número de células de *Candida* circulantes é geralmente <1 Unidade Formadora de Colônias (UFC) por mL (PFEIFFER *et al.*, 2011). As espécies de *Candida* multiplicam-se mais lentamente que as bactérias, fato que pode explicar, em parte, a sensibilidade abaixo do ideal e o tempo prolongado para a positividade (mediana de 2 dias) para hemoculturas (ARENDRUP *et al.*, 2011; PFEIFFER *et al.*, 2011). Nesses pacientes, culturas de tecidos infectados podem ser realizadas, mas têm suas próprias limitações, incluindo a necessidade de procedimentos cirúrgicos invasivos e baixa sensibilidade (CLANCY *et al.*, 2018).

Testes de diagnósticos realizados sem a necessidade de isolamento em cultura foram desenvolvidos para detecção no sangue de componentes da parede celular fúngica, como manana e β -D-glucano, por imunoenaios, DNA por PCR e anticorpos por sorologia. No entanto, esses métodos também apresentam limitações como baixa sensibilidade e especificidade, além da necessidade de técnicas elaboradas para realização (CALANDRA *et al.* 2016).

2.1.2 Identificação de leveduras

O rápido reconhecimento e tratamento da candidíase invasiva são relevantes para reduzir o alto índice de mortalidade, bem como os custos com a internação. Portanto, a determinação da espécie é extremamente importante devido aos padrões de resistência intrínseca (VON LILIENFELD-TOAL *et al.*, 2019). A identificação de leveduras é baseada em análises morfológicas e fisiológicas, uma vez que a macromorfologia não apresenta muita diversidade e, portanto, não é um parâmetro suficiente para identificação (COSTA, 2015). As análises morfofisiológicas mais comuns para a identificação de *Candida* spp. são a análise morfológica das células vegetativas crescidas em meio líquido e sólido; formação de pseudomicélio, micélio verdadeiro, clamidósporo, tubo germinativo; assimilação de fontes de carbono e nitrogênio e a fermentação de açúcares (BARNNET *et al.*, 2000; HOOG *et al.*, 2000). Os métodos fenotípicos têm algumas limitações e podem não identificar ou identificar erroneamente algumas espécies do gênero *Candida*, como as espécies pertencentes ao complexo *C. parapsilosis* (MARCOS e PINCUS, 2013).

Diante disto, outros métodos de identificação taxonômica têm sido utilizados, como técnicas moleculares e proteômicas. Os métodos moleculares são capazes de identificar as leveduras em nível de espécie, contudo são técnicas que nem sempre estão disponíveis em laboratórios de diagnóstico microbiológico (MARCOS e PINCUS, 2013). Quanto à análise proteômica, o MALDI-TOF-MS tem sido introduzido no laboratório de microbiologia para identificação rápida de bactérias, micobactérias e fungos (BIZZINI *et al.*, 2010; KLEIN *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2013).

De Carolis e colaboradores (2014) avaliaram o desempenho do MALDI-TOF MS para identificar espécies do complexo *Candida parapsilosis*. O banco de dados Biotyper™ forneceu score satisfatório (≥ 2.0) na identificação de *C. parapsilosis* sensu stricto, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Fraser *et al.* (2016) também realizaram a identificação de 6328 isolados de leveduras patogênicas utilizando MALDI-TOF-MS. A análise permitiu a identificação correta de 99,8% dos isolados. No entanto, destacaram a importância de um banco de dados adjunto para apoiar os bancos de dados fornecidos comercialmente. A eficácia da espectrometria de massas também foi comprovada por Stefaniuk *et al.* (2016) ao identificarem corretamente pelo MALDI-TOF 98,4% dos isolados em nível da espécie usando escores de ≥ 2.000 .

2.1.3 Relação câncer e infecção fúngica

O câncer é definido como uma doença degenerativa de crescimento rápido e anormal de células defeituosas, que podem se espalhar pelo corpo (metástase) e aumentar a taxa de mortalidade (INCA, 2019). Segundo dados de 2018 do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), foi estimado, para o Brasil, no biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano. Essas estimativas refletem o perfil de um país que possui os cânceres de próstata, pulmão, mama feminina, cólon e reto entre os mais incidentes, mas que ainda apresenta altas taxas para os cânceres do colo do útero, estômago e esôfago.

Os cânceres de próstata (68 mil) e mama (60 mil) foram estimados como os mais frequentes. À exceção do câncer de pele não melanoma, estão como os tipos de câncer mais incidentes em homens o câncer de próstata (31,7%), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%), enquanto que nas mulheres, os cânceres de mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4,0%) figuram entre os principais (INCA, 2018).

Pacientes com câncer apresentam alta probabilidade de desenvolver infecções mucocutâneas e da corrente sanguínea por fungos, sobretudo por espécies de *Candida* (ALNUAIMI *et al.*, 2015). Além do aumento da incidência global de candidíase invasiva em pacientes oncológicos, a distribuição das espécies de *Candida* em unidades de oncologia mudou nas últimas duas décadas, com o aumento de espécies de *C. não C. albicans* mais resistentes aos tratamentos. Dentre as espécies mais incidentes, estão *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (SLAVIN *et al.*, 2010).

Dentre os principais fatores predisponentes destes pacientes para desenvolver a candidíase invasiva estão a nutrição parenteral, neutropenia, quimioterapia e terapia profilática com antifúngico (SUN *et al.*, 2019). Em um estudo retrospectivo do tipo caso-controle, realizado por Li e colaboradores (2017), entre 2006 a 2013, para avaliar os fatores de risco de pacientes com câncer desenvolverem candidemia, foi observado que a nutrição parenteral (> 5 dias), uso de cateter urinário (> 2 dias), quimioterapia, metástase de órgãos distantes e câncer gastrointestinal foram os fatores de risco para candidemia. Este estudo ainda demonstrou que o complexo *C. parapsilosis* foi identificada como a segunda espécie mais prevalente.

Bergamasco *et al.* (2013), no Brasil, estudando a incidência de *Candida* spp. em pacientes com câncer (malignidades hematológicas e tumores sólidos) e candidemia em associação verificaram que *C. albicans* foi a espécie mais frequente, seguida de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Assim como os estudos citados, Ghrenassia *et al.* (2019) também verificaram a alta incidência de *C. albicans* em pacientes com câncer. Neste estudo, do tipo coorte retrospectivo estes autores ao analisarem pacientes imunossuprimidos com candidemia verificaram que em pacientes com câncer, *C. parapsilosis* correspondia a 7% dos agentes.

O aumento de candidemia por *C. parapsilosis* em pacientes com neoplasias malignas, foi observado por Sun *et al.* (2019), neste estudo os autores analisaram 323 pacientes com câncer no período de 2012 a 2018 em um centro de câncer terciário chinês. Entre os isolados de *Candida*, a espécie mais frequentemente isolada foi *C. parapsilosis* com 37,15% (120/323), enquanto que *C. albicans* representou 34,37%. Estes dados refletem a grande ameaça das leveduras pertencentes ao complexo *C. parapsilosis* para os pacientes com neoplasias malignas.

2.2 COMPLEXO *Candida parapsilosis*

A levedura *C. parapsilosis* foi pela primeira vez isolada em 1928 na cidade de Porto Rico, por Ashford, das fezes diarreicas de um paciente. Neste momento, a espécie foi nomeada *Monilia parapsilosis* para diferenciá-la do isolado mais comum, *Monilia psilosis*, conhecido atualmente como *C. albicans* (ASHFORD *et al.*, 1928). Apesar de ser considerada inicialmente uma levedura não patogênica, foi isolada como agente etiológico de um caso fatal de endocardite em um usuário de drogas intravenosas em 1940, sendo considerada na época, como uma introdução exógena de *C. parapsilosis* por meio dos instrumentos médicos invasivos e soluções de hiperalimentação (JOACHIM; POLAYES, 1940).

Quando comparada com outras espécies de *Candida*, esta levedura possui uma distribuição mais ubíqua na natureza. Não é considerado um patógeno humano obrigatório, tendo sido isolada de outras fontes, como animais domésticos, insetos, solo e ambientes marinhos. No entanto, este fungo é um comensal comum ao homem, sendo considerado um dos mais frequentes isolados do espaço sub-ungueal das mãos, especialmente em pesquisas com profissionais da área de saúde, o que sugere potenciais reservatórios e vias de transmissão (MENEZES *et al.*, 2018).

Vários autores relatam a alta incidência de *C. parapsilosis* como agente etiológico de infecções fúngicas graves. Estudos demonstram que esta levedura representa segunda espécie mais comumente isolada do sangue de pacientes em países da América Latina e na Ásia (BARRETT-BEE *et al.*, 1985; BAUTERS *et al.*, 2002), e também foi encontrada em pesquisas europeias (BAUTERS *et al.*, 2002; BARNES *et al.*, 2007).

Em 2005, após estudos baseados no Multilocus Sequence Typing (MLST) a levedura *C. parapsilosis* foi separada em três grupos distintos (I, II e III), no entanto foram observadas diferenças genéticas suficientes para designar cada grupo como novas espécies. Os isolados do grupo I permaneceram como *C. parapsilosis* stricto sensu e os grupos II e III foram renomeados para *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, respectivamente. Assim, o complexo *C. parapsilosis* passou a ser composto por três espécies distintas, *C. parapsilosis* stricto sensu, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (TAVANTI *et al.*, 2005).

Apesar da descoberta de novas técnicas, promover uma identificação confiável e rápida tem sido um grande desafio para os laboratórios de diagnóstico, especialmente para agentes etiológicos morfológicamente e fisiologicamente idênticos como as leveduras do complexo *C. parapsilosis*. No entanto, a taxonomia correta é necessária principalmente para avaliação de fatores epidemiológicos. Assim, novas metodologias para diferenciação têm sido

estudadas, incluindo a espectrometria de massa por tempo de voo (MALDI-TOF MS) que tem trazido resultados favoráveis para separação das espécies do complexo que condizem com os obtidos por genotipagem (DE CAROLIS *et al.*, 2014).

Dentre as espécies do complexo, *C. parapsilosis* stricto sensu é a espécie mais comumente isolada de infecções fúngicas, contudo 1 a 24% desses isolados podem ser, na verdade, *C. orthopsilosis*, erroneamente identificado como *C. parapsilosis*. Análises retrospectivas baseadas na análise de DNA indicam que *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* representam 1 a 10% das infecções / colonizações atribuídas a *C. parapsilosis* (BONFIETTI *et al.*, 2012; ROMEO *et al.*, 2012). No entanto, *C. metapsilosis* é um microrganismo ambiental, raramente isolado de espécimes clínicos e foi verificado que é menos virulento que *C. parapsilosis* stricto sensu em vários modelos de infecção (GACSER *et al.*, 2007; TAVANTI *et al.*, 2010).

Trevino-Rangel *et al.* (2014) em um modelo de infecção por larvas de *Galleria mellonella* encontraram uma taxa de mortalidade significativamente reduzida nas larvas infectadas com isolados de *C. metapsilosis* em comparação com larvas infectadas com *C. parapsilosis* stricto sensu ou *C. orthopsilosis*. Por outro lado, um modelo de candidíase disseminada não mostrou diferenças significativas entre as espécies de *C. parapsilosis* lato sensu.

Ainda, *C. parapsilosis* stricto sensu é a espécie responsável pela grande maioria dos casos de candidíase invasiva, quando comparada as outras espécies do complexo. Em microscopia *C. parapsilosis* lato sensu apresentam células ovais, redondas, ou cilíndricas e quando cultivadas em meio de Sabouraud Dextrose, as colônias apresentam-se de coloração branca, de aspecto cremoso, brilhantes e textura lisa ou enrugada. Ao contrário de *C. albicans* e *C. tropicalis*, que pode exibir múltiplas formas morfogênicas, *C. parapsilosis* não forma hifas verdadeira, entretanto podem formar pseudomicélio, os quais foram observados por Laffey e colaboradores em 2005. Evidências demonstram que formação de pseudohifas por *C. parapsilosis* está relacionada a um conjunto específico de aminoácidos, particularmente a citrulina, o que causa mudanças significativas para morfologia celular (KIM *et al.*, 2006).

Além de ameaçar pacientes adultos em UTIs, *C. parapsilosis* representa uma série de riscos aos recém-nascidos, especialmente aqueles nascidos prematuramente e com baixo peso ao nascer. Uma meta-análise de casos de candidíase neonatal realizada por Pammi *et al.* (2013) revelaram que *C. parapsilosis* é responsável por 33% de todas as doenças invasivas por *Candida* em recém-nascidos e é responsável por aproximadamente 80% das infecções invasivas causadas por *Candida* não *C. albicans*. No Canadá em um estudo de coorte

retrospectivo utilizando dados coletados pela Rede Neonatal Canadense do período de 2003 a 2013, *C. parapsilosis* foi a segunda espécie mais isoladas em casos de fungemia (TING *et al.*, 2018). Nos Estados Unidos, esta espécie ocupa a terceira colocação como agente de candidemia, como foi demonstrado em um estudo de base populacional realizado entre 2008 a 2011 em 41 hospitais do país (LOCKHART *et al.*, 2012).

Em países da América do Sul, *C. parapsilosis* tem sido isolada com alta frequência. Nucci em 2013 em estudo realizado na Colômbia de 2008 a 2010, em 21 hospitais de sete cidades, verificaram que *C. parapsilosis* ocupa o primeiro lugar como agente etiológico da candidemia, superando o isolamento de *C. albicans*. Dados similares foram encontrados em Lima, Peru e na Venezuela em que esta espécie também foi a levedura mais isolada (BUSTAMANTE *et al.*, 2014, TÓTH *et al.*, 2019).

No Brasil, Doi *et al.* (2016) em um estudo multicêntrico realizado em 16 hospitais distribuídos em cinco regiões do Brasil para avaliar a incidência da candidemia no período de 2007 a 2010, verificaram que *C. parapsilosis* (24,1%) representou a segunda espécie de *Candida* mais isolada da corrente sanguínea dos pacientes, sendo as neoplasias malignas a condição subjacente mais comum.

Ziccardi *et al.* (2015) também avaliaram a prevalência do complexo *C. parapsilosis* em casos de candidíase sistêmica no Sudeste do Brasil em dez anos de estudo. Por meio de técnicas moleculares foi possível distinguir 43 (81,1%) *C. parapsilosis* stricto sensu de 10 (18,9%) *C. orthopsilosis*. Contudo, nenhuma cepa de *C. metapsilosis* foi encontrada nesse estudo.

No Rio de Janeiro, Barbedo *et al.* (2015) ao avaliar pacientes de três hospitais terciários, identificaram que 9,5% dos pacientes apresentaram infecção sistêmica por espécies do complexo *C. parapsilosis*. Destes, 57,1% por *C. parapsilosis* stricto sensu, 28,3% por *C. orthopsilosis* e 4,8% por *C. metapsilosis*. Estes autores relataram que 80% dos casos de candidemia foram causadas por uma única cepa de *C. parapsilosis*, isolada de cateter. A observação de que as cepas podem permanecer no ambiente hospitalar por anos evidencia a possível existência de reservatórios e reforça a necessidade de medidas de controle.

Um estudo de Govender *et al.* (2016) também destaca o aumento da incidência de *C. parapsilosis* na África do Sul, onde esta espécie é responsável por 35% das infecções invasivas por *Candida* no setor público (segundo mais comum) e 50% nos hospitais do setor privado, superando assim *C. albicans*. Esta incidência aumentada também foi observada no Japão, em 10 hospitais universitários, e na China, em 65 hospitais gerais, sendo *C.*

parapsilosis a segunda espécie mais isolada em casos de candidemia (KAKEYA *et al.*, 2018; XIAO *et al.*, 2018).

Apesar de por muitas vezes *C. parapsilosis* ser considerado menos virulenta do que *C. albicans*, as leveduras do complexo *C. parapsilosis* são as espécies de *Candida* com o maior aumento em incidência desde 1990. Dentre os estudos que avaliam a virulência do complexo *C. parapsilosis*, observa-se que a *C. metapsilosis* tem sido a espécie que possui menor capacidade de invasão e a menor prevalência em infecções humanas, enquanto que *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis* stricto sensu são capazes de invadir, colonizar e infectar de forma mais grave o hospedeiro (TAVANTI *et al.*, 2010).

2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

A maioria dos patógenos, incluindo as espécies de *Candida*, expressam diferentes fatores de virulência, e assim desenvolvem estratégias importantes no processo de patogênese no hospedeiro (SUCTU *et al.*, 2016). Durante algumas décadas as leveduras eram consideradas participantes passivas do processo de patogênese da infecção fúngica. Assim, a debilidade do hospedeiro era considerada único mecanismo responsável para o estabelecimento da infecção oportunista. Atualmente esse conceito vem sendo modificado, e assim o consenso é que esses microrganismos participam ativamente do processo fisiopatogênico da doença, utilizando-se de mecanismos de agressão denominados de fatores de virulência (LAURENCE *et al.*, 2018).

Há descrito que um número expressivo de fatores de virulência facilita a patogênese da candidíase invasiva, como a capacidade do fungo em se aderir as células hospedeiras, emissão de estruturas filamentosas, formação de biofilme, secreção de enzimas hidrolíticas, incluindo proteases, fosfolipases, lipases entre outras (PAPPAS *et al.*, 2018).

A identificação de fatores de virulência em fungos, particularmente ocorre em pesquisas com *C. albicans*, e, portanto, algumas espécies a exemplo do complexo *C. parapsilosis* apresentam dados insipientes quanto ao potencial de virulência e de patogenicidade (BRILHANTE *et al.*, 2018). Então, raros são os estudos disponíveis sobre as características de virulência para *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, dentre estes, um estudo pioneiro realizado por Gácsér *et al.* (2007) o qual avaliaram as propriedades invasivas do complexo *C. parapsilosis* em um epitélio oral humano reconstituído. Neste estudo, *C. metapsilosis* foi a espécie menos invasiva, enquanto *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis* stricto sensu foram capazes de colonizar e invadir o tecido epitelial em grau semelhante.

2.3.1 Aderência

A capacidade de aderir firmemente em diferentes superfícies, incluindo células do hospedeiro e superfícies abióticas (cateteres intravascular e vesical, válvulas cardíacas e próteses dentárias) é uma importante característica detectada em algumas espécies de *Candida* (DE GROOT *et al.*, 2013; MAYER *et al.*, 2013). Na candidíase, o mecanismo de adesão durante o processo de patogênese desencadeia uma endocitose e penetração ativa das leveduras nas células do hospedeiro, ocorrendo uma agressão tecidual e maior capacidade de disseminação (MAYER *et al.*, 2013, MODRZEWSKA E KURNATOWSKI, 2015).

A etapa de adesão é caracterizada como fundamental para a sobrevivência dos microrganismos em hospedeiros humanos, contribuindo como fonte de disseminação nos casos de infecções fúngicas sistêmicas (SARDI *et al.*, 2013; MODRZEWSKA E KURNATOWSKI, 2015). Assim, a análise *in vitro* da propriedade de aderência das espécies de *Candida* pode contribuir para a compreensão do comportamento destes organismos em um processo de infecção específico, bem como se acredita que a inibição dessa etapa contribua para a prevenção da infecção, como demonstrado em estudos anteriores com vários modelos experimentais (LIMA-NETO *et al.*, 2011; MENEZES *et al.*, 2013).

A aderência é o primeiro passo no processo infeccioso, dando origem à formação do biofilme pelas espécies de *Candida* em dispositivos médicos implantados no hospedeiro humano. Tanto a natureza físico-química do biomaterial como a proteína da parede celular do patógeno desempenha um papel determinante nesse processo (WILLIAMS *et al.*, 2013; NÚÑEZ-BELTRÁN *et al.*, 2017). O processo de adesão é controlado e induzido por várias cascatas de sinalização celular. A fixação inicial de células de *Candida* é mediada por fatores inespecíficos (hidrofobicidade e forças eletrostáticas) e promovido por fatores específicos como adesinas, proteínas presentes na superfície da parede celular fúngica que reconhecem ligantes presentes nas células do hospedeiro, como proteínas, fibrinogênio e fibronectina (VERSTREPEN E KLIS, 2006).

Um dos grupos de proteínas mais amplamente estudados envolvidos nesse processo pertence à família Als (sequência semelhante à aglutinina). Apesar de sua importância amplamente reconhecida como fatores de virulência em *C. albicans*, informações detalhadas sobre o papel biológico das proteínas Als em outras espécies de *Candida* são incipientes (GACSER, 2016).

Ainda, estudos mostram que a capacidade de aderência nas diversas espécies de *Candida* é diferente. Este fato explica por que alguns isolados colonizam mais frequentemente

superfícies mucosas do que outros sítios anatômicos (SILVA *et al.*, 2011). Adicionalmente podem ser observadas diferenças de adesão dentro de cepas da mesma espécie, pois a possibilidade de mudar o próprio fenótipo tem sido descrita em relação ao gênero *Candida* e pode modular alguns fatores de virulência, inclusive a aderência. Entretanto, para vários autores, os mecanismos que possibilitam esta mudança fenotípica ainda necessitam ser esclarecidos, é provável que estejam associados à riqueza de nutrientes e expressão de genes de adesinas ou de outras proteínas (JACOBSEN *et al.*, 2012).

Yang *et al.*, (2014) demonstraram em seu estudo que a interação entre células hospedeiras e *Candida* no processo de infecção sistêmico desempenham um grande papel na patogenicidade das espécies de *Candida*. A endocitose induzida e a penetração ativa são os dois mecanismos de invasão complementares nos casos de candidíase sistêmica.

Em 2013, Menezes e colaboradores avaliaram a capacidade de adesão de 118 isolados clínicos de espécies diferentes de *Candida*, incluindo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Em um total de 93 (79%) isolados foi identificada a propriedade de aderência, sendo as cepas de *C. tropicalis* as que apresentaram maiores níveis de adesão.

Lima-Neto e colaboradores em 2011 correlacionaram a capacidade de aderência em cepas de *C. albicans* e *C. parapsilosis* às células epiteliais bucais humanas, mostrando que a diferença individual entre as linhagens estava relacionada com um alto teor de resíduos de α -l-glicose na superfície celular, evidenciando que os carboidratos ou glicoconjugados da superfície celular desempenham papéis críticos em muitos processos celulares fundamentais, como interações célula-célula e microrganismo-célula hospedeira.

O primeiro estudo de grande escala comparando a adesão de *C. albicans* e *C. parapsilosis* (12 e 24 isolados, respectivamente) mostrou uma maior avidez, de 20,6% de *C. parapsilosis* para células epiteliais e uma maior adesão de 143,7% ao material acrílico (PANAGODA *et al.* 2001). Em contraste, outros estudos menores atribuíram uma tendência de 80% a 95% de adesão para *C. albicans* a células epiteliais versus *C. parapsilosis*, respectivamente. No entanto, estes estudos usaram apenas um único isolado de *C. parapsilosis*, tornando a relevância de suas descobertas questionável (KING *et al.*, 1980; BARRETT-BEE *et al.*, 1985). Ademais, o grande número de células aderentes de *C. parapsilosis* relatado anteriormente pode ser um resultado de co-aderência entre as células de levedura que causam agregados de superfícies epiteliais, um traço observado mais frequentemente para *C. parapsilosis* do que para *C. albicans*. Além disso, há uma variação intra-espécies significativas na aderência. Embora o resultado não tenha sido estatisticamente significativo, os isolados obtidos de lesões superficiais de *C. parapsilosis* tiveram 51,5%

maior avides pelas células epiteliais bucais do que isolados agentes de infecções sistêmicas (PANAGODA *et al.*, 2001). Além disso, as cepas de *C. parapsilosis* com patogenicidades semelhantes num experimento de infecção vaginal variou na capacidade em aderir ao material acrílico (CASSONE *et al.*, 1995).

A correlação entre o local de isolamento e a taxa de adesão também tem sido observada, pois os isolados mucocutâneos de *C. parapsilosis* expressam um perfil de maior adesão (SILVA-DIAS *et al.*, 2015).

2.3.2 Morfogênese

Os fungos desenvolveram outros mecanismos, além da capacidade de aderência, para causar doenças, que dependem principalmente de sua capacidade de desenvolver transições morfológicas. O fenômeno de morfogênese é descrito como a transição entre células unicelulares de leveduras (crescimento isotrópico) e formas filamentosas como hifas ou pseudohifas (crescimento apical) (GOW *et al.*, 2011).

A morfogênese fúngica está envolvida nos processos necessários para adaptação e invasão do hospedeiro. Acredita-se que a transição de levedura à hifa seja importante no estabelecimento da infecção, uma vez que mutantes incapazes de formar hifa são atenuados em virulência em camundongos. O desenvolvimento de hifas ou pseudo-hifas tem sido associado à virulência em algumas espécies de *Candida*, como *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (TREVIANO-CONTADOR *et al.*, 2016; LIN *et al.*, 2019).

O desenvolvimento da hifa envolve importantes modificações celulares (como alterações do ciclo celular, crescimento polarizado e aumento da pressão na ponta do filamento) e expressão de genes específicos da hifa, sendo a transformação morfológica geralmente associada a alterações na estrutura da parede celular. Durante a transição de crescimento de levedura em filamento, proteínas e adesinas de superfície celular específicas são expressas e essas proteínas com capacidade de adesão favorecem que as hifas apresentem maior capacidade de aderir aos epitélios e endotélios do que os blastoconídios, o que é importante para entender como a filamentação contribui para a adesão e disseminação (SUDBERY *et al.*, 2011; KOZIK *et al.*, 2015; LIN *et al.*, 2019).

A formação de hifas foi caracterizada principalmente em *C. albicans* a múltiplos estímulos *in vitro*, como crescimento a 37 °C, soro de mamífero, N-acetil-glucosamina e pH neutro (SUDBERY *et al.*, 2011). No entanto, autores tem demonstrado que as pseudohifas de *C. parapsilosis* também contribuem para a virulência. Embora em termos de captação, as

células fagocíticas do hospedeiro não diferenciem as formas de levedura e pseudohifas, pseudohifas de *C. parapsilosis* são mais resistentes à morte por macrófagos e induzem níveis mais altos de dano celular *in vitro*, contribuindo para a patogenicidade da espécie (NEMETH *et al.*, 2013, TOTH *et al.*, 2014).

Ainda, Kim e colaboradores (2006) descreveram que isolados de *C. parapsilosis* sofrem mudanças drásticas na morfologia celular e de colônias em resposta a um subconjunto específico de aminoácidos. Neste estudo, os autores observaram que a morfogênese mediada por aminoácidos não requer transporte através da membrana plasmática. Isso indica que os aminoácidos podem ser reconhecidos por receptores de membrana que ativam as vias de transdução de sinal que controlam a diferenciação celular.

2.4 TERAPIA ANTIFÚNGICA

O aumento da incidência de patógenos resistentes a drogas e a toxicidade de compostos antifúngicos existentes atraem constantemente a atenção para o estudo de novos produtos antimicrobianos. Ainda, o pequeno número de medicamentos disponíveis para o tratamento das infecções fúngicas, a maioria dos quais são fungistáticos, incentivam a procura de tratamentos alternativos (SILVA *et al.*, 2015).

Apesar de haver disponíveis no mercado agentes antifúngicos, mais ativos e menos tóxicos além do uso de profilaxia antifúngica, a candidíase continua sendo associada a altas taxas de mortalidade (KRIENGKAUYKIAT, ITO, DADWAL, 2011). Neste contexto, a resistência antifúngica permanece crescente, conduzindo a falha terapêutica e consequentemente dificuldade no combate a infecções invasivas por espécies de *Candida*. A resistência clínica frequentemente está associada a Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) elevadas, sendo as principais causas de esquema terapêutico ineficaz a utilização de doses inadequadas, interações medicamentosas e neutropenia grave (LIM *et al.*, 2012).

As drogas antifúngicas utilizadas atualmente estão agrupadas em três classes distintas, conforme o seu alvo celular e mecanismo de ação para inibir ou cessar o crescimento fúngico (SARDI *et al.*, 2013; PATIL *et al.*, 2015). Dentre os grupos, estão: os polienos, representados principalmente pela anfotericina B e suas formulações lipídicas; os triazólicos, sendo seus agentes o fluconazol, voriconazol, itraconazol, posaconazol e o mais recente isavuconazol; e as equinocandinas, representadas pela caspofungina, anidulaungina e micafungina (PAPPAS *et al.*, 2018).

A seleção de um medicamento antifúngico para tratamento inicial deve ser baseada na exposição ou intolerância prévia do paciente a um agente antifúngico, gravidade da doença, comorbidades relevantes e envolvimento do cérebro, válvulas cardíacas e/ou órgãos viscerais. O conhecimento das principais espécies de *Candida* e dados sobre o perfil de suscetibilidade em uma unidade clínica específica também devem ser considerados (PAPPAS *et al.*, 2018).

Ainda, o arsenal limitado de antifúngicos está ameaçado pelo desenvolvimento de cepas de fungos multirresistentes e pelo surgimento de patógenos intrinsecamente resistentes (REVIE *et al.*, 2018).

2.4.1 Polienos

Os polienos pertencem a uma classe de antifúngicos naturais produzidos por espécies de *Streptomyces*, sendo representado principalmente pela anfotericina B. Este fármaco foi isolado pela primeira vez em 1955 a partir de culturas de *Streptomyces nodosus* obtidas no delta do rio Orinoco, na Venezuela (KLEINBERG *et al.*, 2006; CEREGHETTI; CARREIRA 2006).

A anfotericina B é uma molécula anfipática que possui uma região hidrofílica e uma região hidrofóbica, tornando-a insolúvel em meios aquosos. Normalmente, a anfotericina B é administrada por via intravenosa, com um agente solubilizante como o deoxicolato de sódio. Essa combinação é a formulação mais utilizada na prática clínica para o tratamento de infecções fúngicas, desde 1958, especialmente em países em desenvolvimento (KLEINBERG *et al.*, 2006; MESA-ARANGO *et al.*, 2012).

Por possuir amplo espectro de ação contra fungos dimórficos, filamentosos e leveduras, a anfotericina B é utilizada para a maioria das infecções sistêmicas, entre elas, candidíase invasiva, aspergilose e criptococose (BROOKS, 2012). O mecanismo de ação da anfotericina B pode ser dividido entre efeitos diretos sobre a membrana celular e efeitos intracelulares de indução de estresse oxidativo (FALCI *et al.*, 2015). O efeito na membrana baseia-se na sua interação com o ergosterol, um esteroide essencial da membrana celular dos organismos fúngicos, e de alguns protozoários (gênero *Leishmania* e amebas) (LEMKE *et al.*, 2005). A estrutura poliênica da molécula forma complexos com o ergosterol, causando a formação de poros na membrana que resultam em perda de sua integridade e rápido extravasamento de potássio e outros íons, ocasionando a morte celular (ANDERSON, 2014). No entanto, o sequestro do ergosterol pelas moléculas de anfotericina B também resulta em efeito tóxico para as células do patógeno, visto que o ergosterol é essencial para múltiplos

processos celulares, como endocitose, fusão de vacúolos e estabilização de proteínas da membrana (PAPPAS *et al.*, 2010).

Outro mecanismo de ação importante é a indução do estresse oxidativo. Evidências iniciais mostravam que o efeito sobre a membrana não parecia ser o único mecanismo pelo qual a molécula exercia suas propriedades farmacológicas. Estudos demonstraram que a anfotericina B induz o estresse oxidativo celular e o aumento na formação de radicais livres (LEMKE *et al.*, 2005).

Ademais, a anfotericina B apresenta vários efeitos adversos, o que faz com que o uso seja limitado. A nefrotoxicidade é o principal efeito colateral deste fármaco que apesar de reversível na maioria dos casos, ocasiona redução permanente da função renal (BROOKS, 2012). Com o objetivo de diminuir a toxicidade da formulação convencional da anfotericina B (desoxicolato), diversas formulações lipídicas deste composto (lipossomal, complexo lipídico, dispersão coloidal, intralipídica e conjugada) encontram-se atualmente disponíveis para o tratamento de candidemia, apresentando menor toxicidade quando comparadas à anfotericina B desoxicolato (PFALLER *et al.*, 2010). Embora as formulações lipídicas tenham reduzido a nefrotoxicidade, a anfotericina B não é mais comumente utilizada em adultos para candidíase invasiva, exceto casos de endocardite (ADLER-MOORE *et al.*, 2016).

Entre os isolados de *Candida*, a ocorrência de resistência secundária à anfotericina B ainda é considerada pouco frequente (VICENT *et al.*, 2013). Bailly e colaboradores (2016) detectaram apenas um isolado resistente a anfotericina B em um período de 10 anos durante um estudo retrospectivo realizado em uma UTI da França. No entanto, alguns casos de resistência à terapia com anfotericina B têm sido documentados (AHMAD *et al.*, 2019; MÉNDEZ-TOVAR *et al.*, 2019). Essa resistência aos polienos em *Candida* tem sido associada à inativação de proteínas essenciais na biossíntese de ergosterol, levando à depleção do mesmo e à formação de outros esteróis (JENSEN *et al.*, 2015).

2.4.2 Azólicos

Os antifúngicos azólicos sistêmicos foram introduzidos no mercado na década de 80 como drogas alternativas para o tratamento das micoses invasivas, principalmente em 45 indivíduos debilitados, cujo tratamento com anfotericina B não era possível devido a elevada toxicidade (AKINS, 2005). Esses antifúngicos apresentam ação fungistática atuando na inibição do crescimento celular. Os azólicos são caracterizados por um anel pentagonal na estrutura molecular, o qual contém três átomos de carbono e dois de nitrogênio

(imidazólicos), ou dois de carbono e três de nitrogênio (triazólicos). O mecanismo de ação está associado a inibição do citocromo P450 fúngico, através da desmetilação do 14-alfa-lanosterol, com consequente diminuição do ergosterol celular e comprometimento da integridade da membrana celular fúngica (MARGOTTO, 2012).

Quatro compostos azólicos estão disponíveis para o tratamento de doenças fúngicas invasivas: itraconazol, fluconazol, voriconazol, ravonazol e posaconazol. Para candidiases sistêmicas destaca-se o fluconazol e o voriconazol (PARAMYTHIOTOU *et al.*, 2014).

Os triazólicos são antifúngicos totalmente sintéticos, constituindo a maior classe de agentes antifúngicos e apresentam ampla atividade contra a maioria das espécies de *Candida*. Além disso, este grupo de antifúngicos é bem tolerado, tem interações medicamentosas previsíveis e podem ser administrados como agentes sistêmicos por via intravenosa ou oral (PAPPAS *et al.*, 2018).

O fluconazol foi um dos medicamentos de escolha para a candidemia até que as equinocandinas se tornassem disponíveis em 2003, e agora é um agente de segunda linha para terapia inicial na maioria dos casos. É importante ressaltar que a terapia com azólico é priorizada em situações clínicas específicas, como endoftalmite, meningite e candidíase do trato urinário, nas quais as equinocandinas não atingem concentrações suficientes, visto que as equinocandinas não passam suficientemente a barreira hematoencefálica e não são excretadas na urina (PAPPAS *et al.*, 2018). No entanto, em partes do mundo com recursos limitados e baixa prevalência de resistência ao azol, o fluconazol continua sendo o tratamento inicial padrão para pacientes com candidíase invasiva. Contudo, o fluconazol deve ser considerado como terapia de primeira linha com cautela, devido aos dados recentes relativos ao aumento da resistência ao fluconazol, particularmente entre regiões onde *C. auris* é prevalente (CHOWDHARY *et al.*, 2017).

As taxas globais de resistência ao fluconazol variam entre 2 e 5% (PFALLER *et al.*, 2015), e uma revisão que avaliou 6.023 isolados revelou uma taxa geral de resistência ao fluconazol de 3,4% (WHALEY *et al.*, 2016). A resistência do azol tem sido bem associada ao uso prévio ou atual de fluconazol (ZHANG *et al.*, 2015), e a resistência pode se desenvolver mesmo com a exposição a antibióticos sistêmicos e o consumo de alimentos expostos a pesticidas (BEN-AMI *et al.*, 2012; VAEZIA *et al.*, 2018).

A resistência aos azólicos está bem documentada em *C. parapsilosis*. Apesar da preocupação com uma predisposição genética à resistência às equinocandinas, os estudos com culturas de *Candida* mostram que a resistência ao azol ocorreu mais comumente do que a não suscetibilidade à equinocandina. Neste estudo, das 122 cepas de *C. parapsilosis*, 9,8% eram

resistentes ao fluconazol, enquanto 3,2% eram resistentes às equinocandinas (MELETIADIS *et al.*, 2017). Na América Latina, as taxas observadas de resistência ao fluconazol por *C. parapsilosis* têm variado de 0 – 26,9% (GONÇALVES *et al.*, 2016).

2.4.3 Equinocandinas

As equinocandinas são lipopeptídeos semissintéticos com estrutura química de hexapeptídeos cíclicos ligados a uma cadeia lateral de ácido graxo. Compõem uma nova classe de antifúngicos que atuam em nível de parede celular, por inibição específica do (1,3)- β -D-glucana sintase, um complexo enzimático que forma polímeros glucano, um dos principais componentes da parede celular dos fungos. Como os mamíferos não possuem parede celular, o risco de toxicidade é menor em relação aos polienos e azólicos e apresentam excelente atividade fungicida contra a maioria das espécies de *Candida*. As equinocandinas são eficazes, seguras e têm interações medicamentosas muito limitadas; no entanto, eles requerem administração intravenosa (VIEIRA *et al.*, 2017).

Esta classe de antifúngicos compreendem a caspofungina, micafungina e anidulafungina, as quais são atualmente recomendadas como terapia empírica de primeira linha para pacientes com candidíase disseminada suspeita ou comprovada (PAPPAS *et al.*, 2016). Cada agente dessa classe foi eficaz em aproximadamente 70 a 75% dos pacientes em ensaios clínicos comparativos randomizados (VAZQUEZ *et al.*, 2014). Uma análise de sete ensaios clínicos randomizados em larga escala que compararam o tratamento para candidíase invasiva em quase 2.000 pacientes em geral mostrou que uma equinocandina como agente de primeira linha para terapia inicial estava associada a uma mortalidade significativamente menor em 30 dias comparado com um azólico ou anfotericina B (ANDES *et al.*, 2012).

Dois estudos randomizados compararam diretamente uma equinocandina com um azólico para terapia inicial de candidemia. Um estudo randomizado de 2007 demonstrou que as taxas gerais de resposta foram numericamente mais baixas com fluconazol (60%) do que com anidulafungina (76%) (REBOLI *et al.*, 2007), e um estudo maior de 2016 gerou resultados altamente semelhantes para o isavuconazol (60%) em comparação com a caspofungina (71%) (KULLBERG *et al.*, 2016).

Devido ao perfil terapêutico e os níveis de segurança favoráveis, o uso de equinocandinas em pacientes críticos tem exibido um rápido aumento e existem diretrizes para administração destes medicamentos como tratamento primário para candidíase invasiva. No entanto, este recente aumento do uso de equinocandinas tem levantado temores sobre o

surgimento de resistência. Estudos mostram uma menor susceptibilidade a estes fármacos por algumas espécies de *Candida*, a exemplo de *C. parapsilosis* e *C. guilliermondii* (TÓTH *et al.*, 2019).

Alexander e colaboradores (2013) registraram taxas variáveis de resistência adquirida à equinocandina entre espécies de *Candida* em ambientes onde essas classes de antifúngicos são cada vez mais usadas. Apesar da resistência a equinocandinas ser incomum em *C. albicans* (<1%), *C. tropicalis* (<5%) e *C. krusei* (<7%), *C. glabrata* é responsável por maiores taxas de resistência (cerca de 13% em alguns centros) (MAUBON *et al.*, 2014).

Elevadas Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) para equinocandinas são frequentemente encontradas para leveduras do complexo *Candida parapsilosis* (CHIOTOS *et al.*, 2016; KONTOYIANNIS *et al.*, 2017). Em um estudo realizado por Brilhante *et al.* (2018), foi verificado que *C. orthopsilosis* foi resistente à caspofungina e susceptível dose dependente ao itraconazol e dois outros isolados de *C. orthopsilosis* foram susceptíveis dose dependentes ao fluconazol e itraconazol. Além disso, um isolado de *C. metapsilosis* também foi dose dependente aos azólicos. Da mesma forma, a suscetibilidade dependente da dose ao itraconazol e altos valores de CIM de caspofungina foram descritos contra *C. orthopsilosis* (BRILHANTE *et al.*, 2014), bem como a suscetibilidade dependente da dose ou resistência a azólicos contra cepas de *C. metapsilosis* (ATAIDES *et al.*, 2015). Em contrapartida, as infecções por estas espécies apresentam resposta *in vivo* quando tratadas com equinocandinas, mesmo não apresentando susceptibilidade *in vitro* (CORTÉS E RUSSI, 2011).

2.4.4 Limoneno

O limoneno, 4-isopropil-1-metil-ciclo-hexeno, faz parte da família dos terpenóides, os quais possuem estrutura típica e podem ser classificados de acordo com o número de carbonos da seguinte forma: hemiterpenos (C5); monoterpenos (C10); sesquiterpenos (C15); diterpenos (C20); sesterpenos (C25); triterpenos (C30); tetraterpenos (C40) e acima os polímeros (TIRAPELLI *et al.*, 2008). O limoneno é classificado como um monoterpeno monocíclico e faz parte da estrutura de mais de 300 plantas como laranja, limão, tangerina, toranja e várias outras plantas (SUN *et al.*, 2007; SHU-SHENG *et al.*, 2013).

Este composto é uma molécula quiral, estando disponível na natureza em ambas as formas enantioméricas R(+)-Limoneno e S(-)-Limoneno e são os mais abundantes monoterpenos na natureza. L- Limoneno é principalmente encontrado em uma variedade de

plantas e ervas como *Mentha* spp, enquanto D-Limoneno é o componente mais abundante dos óleos das cascas de limão e laranja e do óleo essencial de alcarávia, atuando na prevenção da desidratação e na inibição de crescimento microbiano nos vegetais (DEMYTTENAERE *et al.*, 2001).

Nos óleos essenciais dos cítricos em geral, o D-Limoneno é seu componente mais expressivo, atingindo concentrações de 90 a 96%. Esse composto é um líquido incolor, volátil e oleoso naturalmente encontrado nas cascas de, principalmente, frutas cítricas, e é responsável pelo forte odor característico destas frutas (ESPINA *et al.*, 2011).

Além de ser ativo contra diversos tipos de câncer, o limoneno tem se mostrado um excelente redutor de população de microrganismos, sobretudo, os fungos. Em vários estudos, o Limoneno apresenta diversas atividades farmacológicas, tais como: atividade antimicrobiana do óxido e aminas do limoneno, bem como óleos essenciais contendo limoneno (KIM *et al.*, 1995), atividade antifúngica do análogo sintético, do óxido de limoneno (BELETTI *et al.*, 2004) e do óleo essencial, atividade antitumoral do limoneno, do óxido e seus derivados (AGGARWAL *et al.*, 2006; UEDO *et al.*, 1999; CROWEL *et al.*, 1999) atividade ascaricida e inseticida (PRATES *et al.*, 2002; CROWEL *et al.*, 1999) e atividade antiparasitária (ROSA *et al.*, 2003; ANTHONY *et al.*, 2005).

Mazzanti *et al.* (1998) determinaram a ação antimicrobiana eficaz do Limoneno frente a Bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e á isolados de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*.

Viriato *et al.* (2014) ao analisarem 15 substâncias da classe dos terpenóides, verificaram que o R-(+)limoneno apresentou atividade antifúngica em todas as espécies de *Candida* testadas, com CIM de 46,87 µg/mL para *C. krusei* e *C. guilliermondii*; 93,75 µg/mL para *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*; 375 µg/mL para *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*.

Segundo Romero *et al.* (2012) a inibição de microrganismos por óleos essenciais pode ocorrer por diferentes mecanismos de ação. Os efeitos tóxicos na estrutura e função da membrana celular têm sido utilizados para explicar a ação antimicrobiana dos óleos essenciais e de seus componentes isolados. Esses efeitos estão associados ao caráter lipofílico dos constituintes dos óleos essenciais, que sofrem partição da fase aquosa para dentro da membrana celular. Isto conduz à expansão da membrana, aumento da fluidez e da permeabilidade da célula, permitindo a liberação dos componentes intracelulares vitais à sobrevivência do microrganismo.

Contudo, alguns estudos sugerem que a ação antimicrobiana dos óleos essenciais pode ser consequência da inativação de enzimas, incluindo aquelas envolvidas na produção de energia e na síntese de componentes estruturais do microrganismo, além da destruição ou inativação de material genético (ROMERO *et al.*, 2012).

Thakre e colaboradores em 2018 ao analisarem a ação do Limoneno em isolados de *C. albicans* sugeriram que o mesmo induziu danos na parede celular e na membrana levando ao estresse oxidativo, causando dano ao DNA e induzindo a apoptose por meio da via dependente da caspase (CaMca 1) e independente (estresse nucleolar).

Além disso, os polímeros provenientes dessas fontes naturais são materiais de grande interesse, uma vez que apresentam baixa toxicidade, menor quantidade de formação de resíduos durante a fase de síntese e baixo custo de produção e processamento (THAKRE *et al.*, 2018). O limoneno é descrito como um dos principais constituintes do óleo cítrico e o terpeno mais usado na indústria de alimentos e bebidas devido à sua agradável fragrância, ausência de toxicidade, e geralmente é reconhecido como agente aromatizante seguro, bem como opção de tratamento em muitas doenças gastrointestinais.

Su e colaboradores (2007), afirmaram que o consumo de doses diárias deste terpeno por mais de um ano em humanos, apresentou baixíssima toxicidade. Ainda, este composto é rapidamente e quase que completamente absorvido pela via oral tanto em humanos quanto em animais experimentais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Diagnosticar laboratorialmente candidíase invasiva em pacientes oncológicos, caracterizar quanto ao potencial de virulência, leveduras clínicas do complexo *Candida parapsilosis* recém-isoladas e estocadas na Coleção de Culturas Micoteca URM, bem como avaliar a ação antivirulência e antifúngica do D-Limoneno frente aos isolados do complexo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a incidência de candidíase invasiva em portadores de neoplasias malignas;
- Autenticar taxonomicamente os isolados de leveduras por técnica proteômica;
- Caracterizar os isolados clínicos do complexo *Candida parapsilosis* quanto à morfogênese;
- Avaliar os isolados clínicos do complexo *Candida parapsilosis* quanto à capacidade de aderência as células epiteliais;
- Verificar a ação *in vitro* do D-Limoneno como bloqueador da morfogênese das leveduras do complexo *C. parapsilosis*;
- Verificar a ação *in vitro* do D-Limoneno como bloqueador da capacidade de aderência das leveduras do complexo *C. parapsilosis*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do D-Limoneno e antifúngicos comerciais frente a leveduras do complexo *C. parapsilosis*.

4 OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA

4.1 COMITE DE ÉTICA

Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco. Após aprovação (CAAE 88376918.0.0000.5208), foram iniciadas as coletas de amostras clínicas de pacientes com suspeita de candidíase invasiva. Foi diagnosticado a candidíase invasiva em pacientes críticos com diversas doenças de base, no entanto foram incluídos no estudo, apenas os pacientes oncológicos.

4.2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL MICOLÓGICO

4.2.1 Obtenção das amostras clínicas

As coletas foram realizadas de acordo com a solicitação médica em pacientes com suspeita de leveduroses internados em um hospital público na cidade de Recife-PE. As amostras clínicas foram compostas por sangue, líquido cefalorraquidiano e secreções. Estas foram coletadas por profissionais de saúde do referido hospital e, posteriormente conduzidas ao Laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco, para o diagnóstico laboratorial micológico.

4.2.2 Realização do diagnóstico micológico

Após a obtenção das amostras foram preparadas lâminas sem adição de corante ou clarificante e, quando necessário, coradas com Giemsa. Concomitantemente, as amostras clínicas foram semeadas em duplicata na superfície do meio ágar Sabouraud (DIFCO) adicionado de 50mg/L de cloranfenicol contido em placas de Petri, mantidas à temperatura de 30°C e 37°C por até 15 dias. Após o surgimento das colônias, estas foram purificadas e identificadas por meio da espectrometria de massa MALDI-TOF.

4.2.3 Obtenção e autenticação taxonômica dos isolados de leveduras

Foi avaliada a viabilidade e realizada autenticação taxonômica seguindo os protocolos propostos por Putignani et al. (2011) e Veen et al. (2010) de 40 isolados de leveduras clínicas

do Complexo *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*) depositados na Coleção de Culturas Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco.

4.2.4 Viabilidade das culturas de leveduras

As culturas foram expostas a caldo glicosado por até cinco dias. Posteriormente, foram semeadas na superfície do meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar contido em placas de Petri mantidas a 30 °C por até três dias. Após esse período foi avaliado se houve crescimento das culturas.

4.2.5 Autenticação taxonômica

Os isolados foram submetidos à análise direta por espectrometria de massa (MALDI-TOF Autoflex III Bruker Laser nd:yag smartbeam, Bruker Daltonics Inc., USA/Germany).

O cultivo e manutenção dos isolados de leveduras foram em meio Dextrose Peptona Extrato de Levedura (YEPD). Células de *Escherichia coli*, utilizadas como calibrante, foram cultivadas e mantidas em meio ágar Luria-Bertani (LB). *Trichophyton rubrum* foi cultivado em YEPD e incorporado nas análises com um controle externo. Incubações foram padronizadas em 20h e as linhagens se desenvolverão aerobicamente a 37°C. Todas as culturas foram analisadas antes do uso quanto à pureza e foram novamente repicadas pelo menos uma vez antes da análise pelo MALDI TOF IMS.

Fragmento de células (cerca de 50 µg) foi diretamente transferido do meio de cultura para os 48 anéis da placa. Imediatamente, foi adicionado sobre todas as amostras de leveduras 0,5 µL de ácido fórmico a 25% e misturado levemente com o material biológico. Após a total evaporação do meio líquido, foi adicionado 0,5 µL da solução matrix (75 mg/mL de 2,5-ácido dihidroxibenzóico [DHB] em etanol/água/acetonitrila [1:1:1] com 0,03% de ácido trifluoroacético [TFA]) e levemente misturado. Para *E. coli* a adição da solução matrix foi realizada sem tratamento prévio com ácido fórmico.

Todas as amostras foram cristalizadas em temperatura ambiente (28 ± 2 °C). Cada amostra foi transferida em duplicata para testar a reprodutibilidade. Durante as análises todas as soluções foram preparadas e estocadas a +5 °C (PUTIGNANI et al., 2010; VEEN et al., 2010).

Os espectros para determinação do perfil protéico dos isolados foram obtidos através de um laser de nitrogênio (337 nm), onde a intensidade do laser foi ajustada ligeiramente

acima do limiar para a produção de íons. *E. coli* DH5 α com valores conhecidos de massa das proteínas ribossomais foi usada para calibração. A variação de massa entre 2.000 a 20.000 Da foi registrado usando modo linear com pulso de 104 ns em uma voltagem de +20 kV. Espectros finais foram gerados através da soma de 20 tiros de laser acumulados por perfil e 50 perfis produzidos por amostra, levando a um total de 10.800 disparos de laser somados por espectro. A lista de picos obtidos foi exportada ao software SARAMIS™ (Spectral Archiving and Microbial Identification System, Anagnostec, Postdam-Golm, Germany, www.anagnostec.eu) onde as identificações finais foram alcançadas. Identificação através do software SARAMIS™ foi baseada apenas na presença ou ausência de cada pico no espectro.

4.3 CARACTERIZAÇÃO QUANTO A VIRULÊNCIA DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS DO COMPLEXO *C. parapsilosis*

4.3.1 Ensaio da morfogênese

O ensaio foi realizado seguindo Chaves et al., (2007) na presença e ausência do D-Limoneno, no qual as células de leveduras do complexo *C. parapsilosis* foram crescidas “overnight” em meio NGY (30°C - 100rpm). A absorbância da densidade óptica do crescimento foi determinada em espectrofotômetro à 600nm. O valor da absorbância obtido na leitura das amostras estava compreendido entre 0,8 e 1,2 o que corresponde a uma concentração aproximada de 2×10^8 células/mL. As células de leveduras foram padronizadas para 1×10^6 células/mL, o que corresponde a 50 μ l do crescimento compreendido entre 0,8 e 1,2 de absorbância.

Para a indução do tubo germinativo, o volume total da suspensão de leveduras foi inoculado em caldo YPD e incubadas sob agitação mecânica à temperatura de 37 °C a 100rpm, por um período de 1h e 3h de incubação para posterior leitura microscópica.

Nas amostras retiradas com 1h de incubação foram observadas 100 leveduras em microscopia óptica (400x de magnificação; CX21, Olympus) para a determinação da porcentagem da formação de tubos germinativos. Para as amostras incubadas por um período de 3h, as células também foram observadas da mesma forma previamente descrita, para o cálculo do índice de morfologia. Para as células esféricas de leveduras que apresentavam morfologia de blastoconídio foi atribuído o valor IM=1, células apresentando diâmetro com o dobro do comprimento, IM=2, células com aparência de pseudo-hifas, IM=3 e hifas longas de

lados paralelos, I.M=4. Para a determinação do índice de morfologia foi empregada a fórmula:

$$I.M = \frac{(N^{\circ} IM1 \times 1) + (N^{\circ} IM2 \times 2) + (N^{\circ} IM3 \times 3) + (N^{\circ} IM4 \times 4)}{100}$$

4.3.2 Ensaio da capacidade de aderência das leveduras às células epiteliais

Os testes de aderência foram realizados na presença e ausência do D-Limoneno baseados nos trabalhos de Kearns et al. (1983) e Bates et al. (2006). As células epiteliais foram obtidas da cavidade oral de doador jovem, clinicamente são e isento de cáries. Em todas as etapas relacionadas aos testes de aderência foi utilizado o tampão *Phosphate Buffered Saline* - PBS (NaCl 8g/L; KCl 0,2g/L; Na₂HPO₃ 1,44g/L, KH₂PO₄ 0,24 g/L, pH 7,2). As suspensões celulares obtidas foram mantidas em banho de gelo, a fim de evitar alterações celulares.

Cultivo das amostras

1ª Etapa: Os isolados de *Candida* foram semeados no meio ágar Sabouraud adicionado de 0,5% extrato de levedura e mantidos a temperatura de 30°C durante 72h. Após este período, as células de leveduras foram suspensas em 2ml de PBS contidos em tubos de ensaio, centrifugadas três vezes a 1.580 rpm por 10 minutos e ressuspensas para uma concentração final de 2×10^7 cels/mL.

A remoção das células epiteliais foi realizada através de suave escarificação da mucosa da cavidade oral com auxílio de swab e, em seguida, foram suspensas em 7ml de PBS contidos em tubos de ensaio, centrifugadas três vezes e ressuspensas para uma concentração final de 4×10^4 cels/ml.

Depois de lavadas, as células de leveduras e as células epiteliais foram examinadas quanto à viabilidade e integridade para avaliação de possíveis alterações em função das lavagens.

2ª Etapa: Após a obtenção das suspensões de culturas de *Candida* e das células epiteliais da cavidade oral foi procedida mistura e homogeneização. Em seguida, agitadas durante duas horas, sendo posteriormente, realizada a microscopia, através de preparação em lâmina com azul de metileno. Os resultados foram expressos pela média aritmética de dez campos observados onde serão avaliadas 100 células epiteliais com relação à percentagem de sua área

superficial aderidas pelas leveduras e graduada como forte aderência (F) para adesão entre 50% a 100% da área de superfície, fraca aderência (f) para adesão até 49% e sem aderência visível (0).

4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Foram utilizados os antifúngicos padrões anfotericina B, fluconazol, anidulafungina, caspofungina e micafungina e o D-Limoneno para testes de sensibilidade antifúngica seguindo o protocolo proposto pelo documento M27 A3 (CLSI, 2008) e M27-S4 (CLSI, 2012).

O isolado de *C. parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizado como controle. O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, pH $7,0 \pm 0,1$, com ácido morfolino propano sulfônico (MOPS; $0,165 \text{ mol.L}^{-1}$; Sigma-Aldrich). Concentrações diferentes dos antifúngicos foram preparadas de acordo com o documento.

As leveduras foram mantidas em meio Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) e incubadas a 35°C . As suspensões dos isolados foram preparadas em solução salina, e sua densidade ajustada de acordo com a escala 0.5 de MacFarland em 90% da transmitância utilizando um espectrofotômetro a 530nm. O volume do inóculo foi ajustado para 5,0 mL de solução salina esterilizada e, posteriormente, diluído em RPMI 1640 para uma concentração de $2\text{-}5 \times 10^3$ céls/mL.

Para os testes de sensibilidade, foram utilizadas placas de microtitulação planas de 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). O inóculo foi adicionado aos poços com as drogas a serem testadas nas concentrações de 0,03 a $16 \mu\text{g/mL}$ para anfotericina B, anidulafungina, caspofungina e micafungina, 0,125 a $64 \mu\text{g/mL}$ para fluconazol e 2 a $1024 \mu\text{g/mL}$ para o D-limoneno, e as placas foram incubadas a 35°C durante 24 e 48 horas.

As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) foram determinadas com inibição $\geq 50\%$ (para fluconazol, em comparação ao poço controle) ou até 100% em relação ao poço controle para anfotericina B, equinocandinas e D-Limoneno.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados referentes à produção e tratamento de tubo germinativo foram analisados estatisticamente pelo ANOVA e teste de Tukey, com o nível de significância de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 ARTIGO 1 - GRANDE VEGETAÇÃO FÚNGICA EM PRÓTESE AÓRTICA DEVIDA À *Candida parapsilosis*: UMA APRESENTAÇÃO INCOMMON

Artigo Publicado na Revista Mycopathologia.

Qualis A4, Fator de Impacto 2,278

Resumo: Relatamos o caso de uma mulher com diagnóstico de endocardite fúngica atípica. A paciente apresentava uma grande vegetação móvel formada por *Candida parapsilosis*, encontrada em sua valva aórtica. A paciente foi tratada com fluconazol/anfotericina B, no entanto, não respondeu bem ao tratamento, evoluindo para morte.

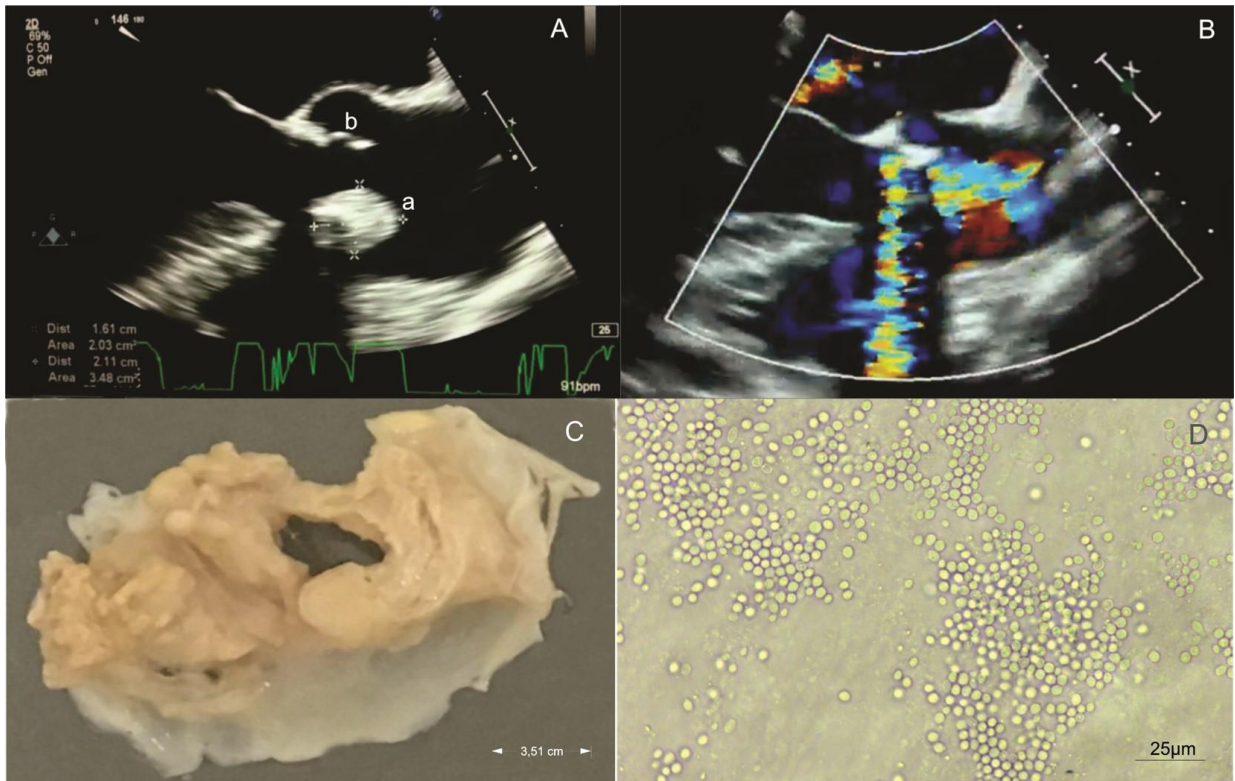
Keywords: *Candida* sp.; Cancer; Endocardite infecciosa.

Texto

A endocardite é uma doença infecciosa grave com alta taxa de mortalidade. Os casos decorrentes de *Candida* são uma apresentação incomum que representam apenas 1% a 2% de todos os episódios de endocardite infecciosa, sendo *C. albicans* a mais relatada. A endocardite fúngica também está associada a *C. parapsilosis*, um agente infeccioso associado a dispositivos vasculares devido à capacidade de formar biofilme em dispositivos médicos. Relatamos aqui um caso incomum de uma mulher de 64 anos com diagnóstico de grande vegetação fúngica formada por *C. parapsilosis* em sua prótese aórtica. A paciente com válvula aórtica bioprotética implantada há nove anos e meio, com história prévia de câncer do colo do útero e que recebeu alta há dois anos após concluir o último ciclo de radioterapia, procurou um serviço hospitalar com queixas de dispnéia progressiva, ortopnéia, e dispnéia noturna paroxística com hospitalização necessária. Inicialmente, foi realizado um ecocardiograma mostrando disfunção da prótese aórtica devido a sinais de ruptura do folheto e insuficiência mitral. A paciente apresentou picos de febre, após o qual foi iniciada terapia antimicrobiana com meropenem (1000 mg a cada oito horas por sete dias) associado ao fluconazol (400 mg / dia por sete dias). No 15^o dia da internação, foi realizado um ecocardiograma transesofágico, revelando disfunção da prótese biológica com sinais de ruptura de folheto, regurgitação transprotética e presença sugestiva de vegetação. Posteriormente, a terapia antifúngica foi imediatamente alterada para anfotericina B (20mg, dia) e foi necessária a substituição da válvula. No entanto, nenhuma melhora clínica ocorreu

após catorze dias e outro ecocardiograma transesofágico foi realizado, mostrando uma grande massa móvel (tamanho de 2, 11cm por 1, 6cm) localizada na válvula aórtica, característica da vegetação fúngica (Fig. 1A, B). Após essa descoberta, a paciente foi submetida à substituição da válvula aórtica, sendo mantida no tratamento com anfotericina B. Durante o procedimento cirúrgico, observou-se abscesso entre os postes comissurais e a grande vegetação fúngica ligada à prótese aórtica. Para investigar o agente fúngico envolvido na formação da vegetação fúngica, uma amostra protética da válvula (Fig. 1C) foi submetida a testes laboratoriais, que incluíram exame microscópico direto com KOH (20%) e cultura em Sabouraud Dextrose Agar. O exame microscópico direto do tecido mostrou numerosas células de leveduras hialinas (Fig. 1D). Após sete dias de incubação a 37 °C, cresceram colônias de leveduras brancas e cremosas. O isolado foi identificado como *C. parapsilosis* por LSU, sequenciamento de 26 rDNA D1 / D2 e a nova sequência gerada foi depositada no GenBank com número de acesso MH744739, com uma amostra sendo depositada na Coleção de Culturas Micoteca URM (URM8012). Após a cirurgia, a condição clínica da paciente se deteriorizou rapidamente e devido à condição enfraquecida da paciente; o tratamento foi ineficaz, com a paciente desenvolvendo parada cardio-respiratória e morte, apesar das tentativas de ressuscitação cardíaca. Certamente, as condições prévias consideráveis da paciente levaram a outras situações clínicas desfavoráveis, contribuindo para o estabelecimento e a gravidade da endocardite infecciosa. Assim, o manejo terapêutico foi ineficaz, resultando na morte da paciente, reforçando as altas taxas de mortalidade associadas a esses casos. O desenho do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, e o estudo estava de acordo com a Declaração de Helsinque.

Figura 1 - Ecocardiograma transtorácico paraesternal, mostrando vegetação de prótese valvar aórtica grave, com grande massa móvel 2,11 x 1,61 cm (a), associada ao espessamento do folheto valvar (b) e projeção de vegetação na aorta (A). Além disso, pode ser observado refluxo discreto (B). Ainda, pode-se observar a amostra protética da válvula (C) e células ovais de levedura e hialina clarificada com hidróxido de potássio a 20% (KOH) observado ao microscópio óptico (aum 400x) (D).



Fonte: Elaborado pela autora

5.2 ARTIGO 2 - CANDIDEMIA EM PACIENTES NEOPLÁSICOS: UMA SÉRIE DE CASOS

Artigo submetido à Revista Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases Qualis A3, Fator de Impacto 2.314

Resumo: A candidíase invasiva é uma das principais causas de morbimortalidade em pacientes com câncer internados em Unidades de Terapia Intensiva. O estado imunológico destes pacientes, bem como a utilização de nutrição parenteral, cateteres e neutropenia favorecem o desenvolvimento dessa infecção fúngica altamente letal. Ademais, a terapia profilática com antifúngico e o surgimento de espécies de *Candida* não *C. albicans*, as quais têm se mostrado mais refratárias aos tratamentos, ressalta a necessidade de vigilância epidemiológica e o uso racional de antifúngicos em pacientes com neoplasias malignas. Aqui, descrevemos uma série de seis casos de candidemia em pacientes oncológicos e a avaliação da susceptibilidade antifúngica *in vitro*.

Palavras-chave: Câncer, *Candida* sp., Diagnóstico micológico, Susceptibilidade antifúngica.

Introdução

A candidíase invasiva é uma infecção altamente letal associada a taxas de mortalidade que variam entre 40 e 60% (Leroy et al. 2016; Li et al., 2017). De acordo com estudos epidemiológicos, a candidíase invasiva afeta mais de 250.000 pessoas em todo o mundo a cada ano e é a causa de mais de 50.000 mortes. Ainda, as taxas de incidência de candidemia foram relatadas como sendo entre 2 e 14 casos por 100.000 pessoas em estudos de base populacional (Cleveland et al., 2015).

Dentre as condições que favorecem o surgimento desta infecção, destaca-se o estado imunológico do paciente, sobretudo em pacientes gravemente doentes, como aqueles acometidos por neoplasias malignas (Sousa et al., 2016). Dentre os principais fatores predisponentes dos pacientes com câncer para desenvolver a candidíase invasiva estão nutrição parenteral, neutropenia, quimioterapia e terapia profilática com antifúngico (Sun et al., 2019).

Em um estudo retrospectivo do tipo caso-controle, realizado por Li e colaboradores (2017), entre 2006 a 2013, para avaliar os fatores de risco de pacientes com câncer desenvolverem candidemia, foi observado que a nutrição parenteral (> 5 dias), uso de cateter urinário (> 2 dias), quimioterapia, metástase de órgãos distantes e câncer gastrointestinal foram os fatores de risco para desenvolver a infecção fúngica.

Pacientes com câncer apresentam alta probabilidade de desenvolver infecções mucocutâneas e da corrente sanguínea por fungos, sobretudo por espécies de *Candida* (Alnuaimi et al., 2015). Além do aumento da incidência global de candidíase invasiva em pacientes oncológicos, a distribuição das espécies de *Candida* em unidades de oncologia mudou nas últimas duas décadas, com o aumento de espécies de *Candida* não *C. albicans* mais resistentes aos tratamentos. Dentre as espécies mais incidentes, estão *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (Sun et al., 2019).

Portanto, o conhecimento acerca das espécies de *Candida*, agentes de candidíase invasiva, em pacientes oncológico torna-se de extrema importância para a instituição terapêutica adequada. Aqui, descrevemos seis casos de candidemia em pacientes oncológicos, bem como a susceptibilidade antifúngica *in vitro* dos agentes etiológicos isolados em cultura.

Pacientes e métodos

A pesquisa foi realizada após a aprovação pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos, registro CAAE 88376918.0.0000.5208.

Caso 1

Uma mulher, 71 anos, deu entrada no serviço hospitalar com semi-obstrução intestinal por tumor de ângulo esplênico e foi submetida à uma laparotomia exploratória. A mesma apresentou tumor estenosante de cólon transversal próximo ao ângulo esplênico com invasão de estômago e jejuno proximal e moderada quantidade de ascite. Posteriormente, apresentou dispnéia súbita e evoluiu com insuficiência respiratória aguda, sendo necessária intubação. Em julho de 2017, a paciente apresentou leucocitose (2800 céls/mm^3) e foi diagnosticado fungemia por *Candida parapsilosis*, sendo iniciado esquema terapêutico com Anidulafungina (100mg/dia). Em agosto, a sepse fúngica havia sido superada e a paciente apresentou melhora clínica, recebendo alta.

Caso 2

Uma mulher, 66 anos, recém-operada, ingressou no serviço hospitalar com relato de constipação há dois meses e eliminação de sangue nas fezes. Foi submetida à colonoscopia, sendo submetida à cirurgia que evidenciou lesão tumoral em reto superior com aderência de íleo distal. Após procedimento cirúrgico a paciente apresentou tosse com expectoração purulenta e leucocitose com desvio à esquerda. Foi diagnosticado fungemia por *C. glabrata*,

sendo iniciado esquema terapêutico com Fluconazol (200mg/dia) por 15 dias. Após superação da sepse fúngica, a paciente recebeu alta.

Caso 3

Um homem, 56 anos, procurou o serviço hospitalar com relato de dor lombar irradiando para mesogastro bilateral há um mês, associado com icterícia. Referia perda de peso não intencional (8kg). Foi realizada uma laparotomia exploratória que evidenciou ascite moderada e implantes tumorais no fígado, vesícula biliar e jejuno. Após sintomas de sepse, foi diagnosticada em hemocultura *C. glabrata* e iniciado o tratamento com Fluconazol (200mg/dia). Após apresentar bom resultado clínico, o mesmo recebeu alta.

Caso 4

Uma mulher, 63 anos, cometida por um tumor em cabeça de pâncreas foi admitida no serviço hospitalar sendo submetida à duodenopancreatômia e colecistectomia. Apresentou sintomas de sepse pós-cirurgia, sendo diagnosticada *C. albicans* em hemocultura. Foi iniciado o tratamento com Fluconazol (200mg/dia), no entanto, quatro dias após início do tratamento a paciente apresentou parada cardiorrespiratória irreversível e evoluiu para o óbito.

Caso 5

Uma mulher, 65 anos foi internado com hipótese diagnóstica de neoplasia de endométrio, evoluindo com piora clínica. A paciente apresentou dispneia e hipotensão, por provável sepse de foco respiratório, além de edema abdominal e perda de peso. Em hemocultura, foi diagnosticada *C. glabrata* e iniciado o tratamento com fluconazol (200mg/dia). Após agravamento do quadro clínico foi encaminhada à UTI em estado gravíssimo, em choque, e após parada cardiorrespiratória irreversível foi constatado o óbito.

Caso 6

Um homem, 35 anos, admitido na emergência com relato de dor em fossa ilíaca direita há quatro meses, associada a perda de peso (3kg/mês), relatando hematoquezia. Foi submetido à laparotomia exploratória, a qual evidenciou tumor de cólon transversal. O paciente foi submetido à cirurgia para retirada do mesmo, no entanto apresentou complicações cirúrgicas, sendo submetido a duas reoperações em dois dias. O paciente evoluiu com piora do estado geral, apresentando quadro de sepse com leucocitose e febre sendo diagnosticado *C. tropicalis*

em cultura de ponta de cateter e hemocultura. Foi iniciado esquema terapêutico com Fluconazol (200mg/dia) e após superação da sepse fúngica, o paciente recebeu alta.

Uma visão geral dos casos e possíveis fatores de risco é demonstrada na Tabela 1.

Tabela 1 - Características clínicas de seis pacientes portadores de neoplasias com candidemia.

Casos	Tipo de neoplasia	Uso de dispositivo médico invasivo	Uso prévio de antibióticos	Profilaxia antifúngica	Terapia Antifúngica
Caso 1	Tumor de Cólon	Sim	Sim	Não	AN
Caso 2	Tumor de Cólon	Sim	Sim	Não	FL
Caso 3	Tumor no fígado, vesícula biliar e jejuno	Sim	Sim	Não	FL
Caso 4	Tumor em cabeça de pâncreas	Sim	Sim	Não	FL
Caso 5	Neoplasia de endométrio	Sim	Sim	Não	FL
Caso 6	Tumor de cólon transversal	Sim	Sim	Não	FL

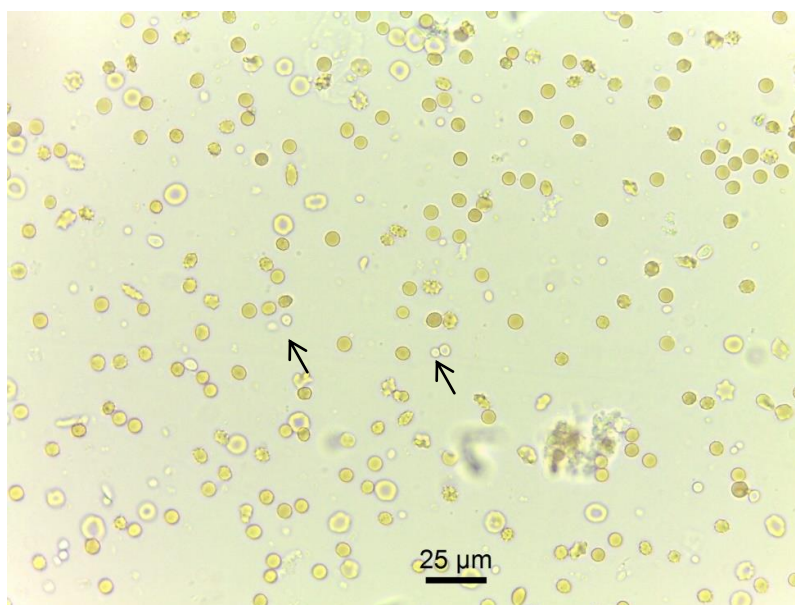
AN anidulafungina, FL fluconazol

Em todos os casos, foram coletadas duas amostras de sangue em dias consecutivos, assepticamente por punção venosa com anticoagulante EDTA de pacientes internados em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de um Hospital Público Brasileiro entre junho a dezembro de 2018. As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco. As amostras biológicas foram processados por métodos padrão (exame direto e isolamento em cultura) para diagnóstico micológico.

O exame direto das amostras clínicas foi realizado sem adição de clarificante e coradas com Giemsa. Ao mesmo tempo, as culturas foram preparadas usando o ágar Sabouraud dextrose adicionado de cloranfenicol (50mg/L) (Difco) incubadas a 30 e 37 °C em atmosfera aeróbica por 15 dias. A identificação dos agentes etiológicos foi realizada após a purificação das culturas por técnica proteômica de espectrometria de massas MALDI-TOF.

O exame direto revelou numerosas células de leveduras ovais e hialinas em todas as amostras clínicas (Figura 1). As culturas de crescimento ocorreram em ambas as temperaturas (30 e 37 °C). As culturas de leveduras foram identificadas como *Candida parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Figura 1 - Microscopia direta de amostra de sangue de paciente com candidemia. As setas indicam as células de leveduras ovais e hialinas presentes na amostra. (Aum 400X).



Fonte: Elaborado pela autora

O teste de susceptibilidade antifúngica fluconazol (Pfizer), caspofungina (Pfizer), anidulafungina (Pfizer) e micafungina (Pfizer) foi realizado pelo método de microdiluição em caldo, seguindo as diretrizes do CLSI encontrados no documento M27-A3 / M60. O controle de qualidade foi realizado testando a cepa recomendada pelo CLSI *C. parapsilosis* ATCC22019. Os resultados do teste de susceptibilidade estão demonstrados na tabela 2.

Tabela 2 - Concentrações Inibitórias Mínimas dos isolados de *Candida* sp. frente aos antifúngicos da classe dos azólicos e equinocandinas.

Casos	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)			
	Fluconazol	Caspofungina	Anidulafungina	Micafungina
Caso 1	8 (R)	4 (DD)	2 (S)	16 (R)
Caso 2	0,125 (S)	0,125 (S)	0,25(DD)	0,03 (S)

Caso 3	1 (DD)	0,5 (R)	0,06 (S)	0,03 (S)
Caso 4	32 (R)	>16 (R)	>16 (R)	>16 (R)
Caso 5	1 (DD)	0,5 (R)	0,5 (R)	0,03 (S)
Caso 6	0,5 (S)	0,03 (S)	0,125 (S)	0,03 (S)

R Resistente, DD Dose-dependência, S Sensível

Discussão

As infecções fúngicas invasivas, principalmente as causadas por *Candida* são uma das principais causas de morbimortalidade em pacientes com câncer internados em UTIs (Granwehr et al., 2019). Adicionalmente, além da taxa de mortalidade, essas infecções não apenas prolongam a permanência hospitalar, mas também tornam o tratamento mais oneroso (Taur et al., 2010).

Uma característica epidemiológica comum relatada recentemente é o aumento do isolamento de *Candida* não *C. albicans*, associado a uma taxa de mortalidade de 48,9%. Entre essas espécies, *C. glabrata* tem sido associada a uma mortalidade mais alta (Cesaro et al., 2018), fato que não ocorreu nos casos relatados, em que dos três pacientes que apresentaram candidemia por *C. glabrata* apenas um foi a óbito. Ainda, dos seis pacientes descritos, apenas um foi acometido por *C. albicans*, o que reforça a mudança epidemiológica da candidemia em pacientes com cancer.

Os pacientes neoplásicos geralmente exibem múltiplos fatores de risco para desenvolver a candidíase invasiva, incluindo uso de drenos e cateteres, efeitos de quimioterapia, neutropenia, disfunção renal e/ou hepática, cirurgia intra-abdominal e nutrição parenteral total (Granwehr et al., 2019). Nesta série de casos, os pacientes foram submetidos a cirurgia intra-abdominal, uso de drenos e cateteres e nutrição parenteral total, vários fatores que poderiam predispor ao estabelecimento da doença fúngica.

Como descreve Jung et al. (2015), o atraso no início da terapia antifúngica afeta significativamente a mortalidade relacionada à *Candida*. Estes autores ainda, afirmam que qualquer paciente de UTI com alto risco para infecção por *Candida*, com uma doença febril que não responde aos antibióticos deve ser considerado para terapia antifúngica presuntiva. Neste estudo, nenhum dos pacientes recebeu terapia antifúngica prévia e em dois casos (Casos 4 e 5) a terapia antifúngica instituída não foi eficaz para o bom prognóstico dos pacientes. Ainda, o paciente do caso 5 foi tratado com fluconazol, o qual apresentou isolado de *Candida* dose dependente a este fármaco, no entanto este mesmo isolado foi sensível para micafungina.

Bilal e colaboradores 2018 afirmam que não receber agentes antifúngicos oportunos aumenta a taxa de mortalidade em pacientes neoplásicos.

Observamos aqui, um número variado de espécies de *Candida* agentes de candidemia em pacientes com câncer apresentando altas taxas de resistência aos antifúngicos. Contudo, essa variedade epidemiológica muda de acordo com as regiões geográficas e os fatores de risco locais. Ainda, o aumento da incidência de isolados de *Candida* não *C. albicans* potencialmente resistentes na corrente sanguínea ressalta a necessidade de vigilância institucional e o uso racional de antifúngicos em pacientes com neoplasias malignas.

Conflito de interesse

Os autores declaram que não há conflitos de interesse em relação a este trabalho.

Financiamento

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

Alnuaimi AD, Wiesenfeld D, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC, McCullough MJ. Oral *Candida* colonization in oral cancer patients and its relationship with traditional risk factors of oral cancer: a matched case-control study. *Oral Oncol.* 2015;51:139–45. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.11.008>

Bilal HM, Ayaz S, Iqbal N. Predictors of Candidemia infections and its associated risk of mortality among adult and pediatric cancer patients: A retrospective study in Lahore, Punjab, Pakistan. *Arch Cancer Sci Ther.* 2018; 2: 001-007. <https://doi.org/10.29328/journal.acst.1001003>

Cesaro S, Tridello G, Blijlevens N, Ljungman P, Craddock C, Mohty M, Maertens J, Passweg J, Petersen E, Nihtinen A, Isaksson C, Milpied N, Rohlich PR, Deconinck E, Crawley C, Ledoux MP, Hoek J, Nagler A, Styczynski J, Michallet M, Martin A, Snowden JA. Incidence, Risk Factors, and Long-term Outcome of Acute Leukemia Patients With Early Candidemia After Allogeneic Stem Cell Transplantation: A Study by the Acute Leukemia and Infectious

Diseases Working Parties of European Society for Blood and Marrow Transplantation. Clinical Infectious Diseases. 2018; 67:564–72. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy150>

Cleveland AA, Harrison LH, Farley MM, Hollick R, Stein B, Chiller TM, Lockhart SR, Park BJ. Declining Incidence of Candidemia and the Shifting Epidemiology of Candida Resistance in Two US Metropolitan Areas, 2008–2013: Results from Population-Based Surveillance. PLoS ONE. 2015; 10(3): e0120452. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120452>

CLSI. (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-second edition, Clin. Lab. Stand. Inst. Wayne, PA U. S. A. Vol. M27-A3.

CLSI. (2012). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-second edition, Clin. Lab. Stand. Inst. Wayne, PA U. S. A. Vol. S4.

Granwehr BP, Sipsas NV, Kontoyiannis DP. Fungal Infections in Cancer Patients. Oncologic Critical Care. 2019; 1-24. https://doi.org/10.1007/978-3-319-74698-2_121-1

Jung DS, Farmakiotis D, Jiang Y, Tarrand JJ, Kontoyiannis DP. Uncommon Candida species fungemia among cancer patients, Houston, Texas, USA. Emerg Infect Dis. 2015; 21:1942–50. <https://doi.org/10.3201/eid2111.150404>

Leroy O, Gangneux JP, Montravers P. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive Candida infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005–2006). Crit Care Med. 2009; 37:1612–8. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31819efac0>

Li D, Xia R, Zhang Q, Bai C, Li Z, Zhang P. Evaluation of candidemia in epidemiology and risk factors among cancer patients in a cancer center of China: an 8-year case-control study. BMC Infectious Diseases. 2017; 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2636-x>

Sousa LVNF, Santos VL, Monteiro AS, Dias-Souza MV, Marques SG, Faria ES, Assunção EAO, Santo SG, Zonis JM, Alvarenga DG, Holanda RA, Sousa JG, Santos KV, Stoianoff MAR. Isolation and identification of *Candida* species in patients with orogastric cancer:

susceptibility to antifungal drugs, attributes of virulence in vitro and immune response phenotype. *Infectious Diseases*. 2016; 16:86. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1431-4>

Sun M, Chen C, Xiao W, Chang Y, Liu C Xu Q. Increase in *Candida parapsilosis* Candidemia in Cancer Patients. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2019; 11(1): e2019012. <http://dx.doi.org/10.4084/MJHID.2019.012>

Taur Y, Cohen N, Dubnow S, Paskovaty A, Seo SK. Effect of antifungal therapy timing on mortality in cancer patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54: 184-190. <https://doi.org/10.1128/AAC.00945-09>

5.3 ARTIGO 3 - MECANISMO DE AÇÃO E POTENCIAL ANTIVIRULÊNCIA DO D-LIMONENO FRENTE A LEVEDURAS CLÍNICAS DO COMPLEXO *Candida parapsilosis*

Artigo submetido à Revista Food Chemistry

Qualis A1, Fator de Impacto 5,399

Resumo: As leveduras do complexo *Candida parapsilosis* apresentam relevância clínica devido ao alto potencial de virulência e patogenicidade, como a aderência às células epiteliais e emissão de estruturas filamentosas, além da baixa susceptibilidade aos antifúngicos. Assim, o D-Limoneno, um composto natural surge como uma alternativa promissora, com atividade antibacteriana, antiparasitária e antifúngica descritas, no entanto, seu mecanismo de ação e atividade antivirulência frente às espécies do complexo *C. parapsilosis* não estão elucidadas. Portanto, este estudo objetivou avaliar a ação antifúngica, antivirulência e o mecanismo de ação do D-Limoneno frente á isolados deste complexo. Foi verificado que o D-Limoneno exibiu atividade antifúngica frente às leveduras do complexo *C. parapsilosis*, além de uma excelente atividade antivirulência na inibição da morfogênese e aderência das leveduras ao epitélio humano. Ainda, o mecanismo apoptótico induzido por esse composto representa um alvo importante para o desenvolvimento de novos medicamentos antifúngicos, o qual não é induzido por estresse oxidativo.

Palavras-chave: Aderência; *Candida parapsilosis*, Mecanismo de ação; Morfogênese; Terpenóide.

1 Introdução

O aumento da incidência de infecções invasivas pelas leveduras do complexo *Candida parapsilosis* representa grande relevância clínica, uma vez que sua frequência como agente da candidíase invasiva tem superado o isolamento de *C. albicans* (Netea et al., 2015). Além disso, as leveduras pertencentes a esse complexo têm demonstrado alto potencial de virulência e patogenicidade, como a aderência às células epiteliais e emissão de estruturas filamentosas, as quais representam os fatores de virulência indispensáveis para o estabelecimento da doença, uma vez que são responsáveis pelo o estágio inicial da infecção e a invasão no hospedeiro humano (Pappas et al., 2018).

Ademais, apesar das infecções por *C. parapsilosis* geralmente resultarem em taxas de morbimortalidade mais baixas quando comparadas as infecções por *C. albicans*, autores tem relatado que vários isolados clínicos destas espécies são menos suscetíveis a equinocandinas e, em algumas regiões, também foi observada resistência ao tratamento com azólicos, o que

dificulta a escolha da terapia antifúngica adequada (Govender et al., 2016; Meletiadiis et al., 2017; Tóth et al., 2019).

Aliado a isto, as opções terapêuticas disponíveis são limitadas e vêm conduzindo ao aumento das taxas de mortalidade pelas espécies do complexo *C. parapsilosis*, sendo necessária a busca por novos agentes antifúngicos (Thakre et al., 2018). Assim, os produtos naturais de origem vegetal, especialmente os óleos essenciais, surgem como alternativa terapêutica e é descrito como um tratamento promissor contra microrganismos patogênicos (Weber et al., 2014; Marasini et al., 2015).

O limoneno é um dos principais constituintes do óleo cítrico e é o terpeno mais utilizado na indústria de alimentos e bebidas devido à sua agradável fragrância e não toxicidade (Thakre et al., 2018). Além disso, o limoneno tem se mostrado um excelente redutor de população de microrganismos, sobretudo, os fungos. Em vários estudos, este composto apresenta diversas atividades farmacológicas, tais como: atividade antimicrobiana, em particular a antifúngica (Beletti et al., 2004), atividade antitumoral (Aggarwal et al., 2006) atividade ascaricida e inseticida (Prates et al., 2002) e atividade antiparasitária (Rosa et al., 2003; Anthony et al., 2005).

Ainda, o mecanismo de ação do limoneno frente às leveduras do gênero *Candida* ainda não está completamente elucidado. Thakre et al. (2018) sugerem que o limoneno induz danos na parede celular e na membrana levando ao estresse oxidativo, causando dano ao DNA e induzindo a apoptose em *Candida albicans*. No entanto, seu pontencial antifúngico frente às leveduras do complexo *C. parapsilosis*, seu mecanismo de ação bem como sua atividade no controle de fatores de virulência produzidos por estes microrganismos ainda é escasso.

Assim, é importante elucidar a ação antivirulência do limoneno frente às leveduras do complexo *C. parapsilosis*, visto que a inibição da aderência e morfogênese das leveduras podem impedir o estabelecimento da infecção, e dessa forma, melhorar o prognóstico dos pacientes acometidos pela candidíase invasiva.

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ação antifúngica, antivirulência e o mecanismo de ação do D-Limoneno frente á isolados clínicos do complexo *C. parapsilosis*.

2 Material e Métodos

2.1 Cepas de *Candida* e condições de cultura

Foram analisados 40 isolados clínicos do Complexo *Candida parapsilosis* obtidos da Coleção de Culturas Micoteca URM e do Laboratório de micologia Médica Sylvio Campos,

ambos da Universidade Federal de Pernambuco, sendo estes: *C. parapsilosis* stricto sensu (URM6338, URM 6365, URM 6387, URM 6404, URM 6405, URM 6406, URM 6407, URM 6409, URM 6410, URM 6411, URM 6412, URM 6905, URM 6939, URM 6944, URM 6948, URM 7087, URM 7421, URM 7425, URM 7426, URM 7428, URM 7429, URM 7430, URM 7431, URM 7432, URM 7433, URM 7443, URM 7444, URM 7445, URM 7446, URM 7448, URM 7449, URM 7450, HAM17, MM12199 e HAM 26), *C. orthopsilosis* (URM 7434 e URM 7447) e *C. metapsilosis* (URM 6408, URM 7423 e URM 7427).

Além disso, foram utilizadas cepas de referências *C. parapsilosis* ATCC 22019 *C. parapsilosis*, ATCC96143 *C. metapsilosis*, ATCC96141 *C. orthopsilosis*.

Todas as cepas foram cultivadas na superfície do meio de cultura Sabouraud dextrose ágar e incubadas a 37° C por 24 horas antes dos experimentos.

2.2 Atividade Antifúngica

Foram utilizados os antifúngicos padrões anfotericina B, fluconazol, anidulafungina, caspofungina e micafungina, e o D-Limoneno (Sigma Aldrich) para testes de sensibilidade antifúngica seguindo o protocolo proposto pelo documento M27 A3 (CLSI, 2008; CLSI, 2012).

O isolado de *C. parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizado como controle. O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, pH 7,0 $\pm$ 0,1, com ácido morfolino propano sulfônico (MOPS; 0,165 mol.L⁻¹; Sigma-Aldrich). Concentrações diferentes dos antifúngicos foram preparadas de acordo com o documento.

As leveduras foram mantidas em meio Sabouraud dextrose ágar (SDA) e incubadas a 35°C. As suspensões dos isolados foram preparadas em solução salina, e sua densidade ajustada de acordo com a escala 0.5 de MacFarland em 90% da transmitância utilizando um espectrofotômetro a 530nm. O volume do inóculo foi ajustado para 5,0 mL de solução salina esterilizada e, posteriormente, diluído em RPMI 1640 para uma concentração de 2-5x10³ céls/mL.

Para os testes de sensibilidade, foram utilizadas placas de microtitulação planas de 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). O inóculo foi adicionado aos poços com as drogas a serem testadas nas concentrações de 0,03 a 16µg/mL para anfotericina B, anidulafungina, caspofungina e micafungina, 0,125 a 64 µg/mL para fluconazol e 2 a 1024 µg/mL para o D-limoneno, e as placas foram incubadas a 35°C durante 24 e 48 horas.

As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) foram determinadas com inibição $\geq 50\%$ ou até 100% em relação ao poço controle a depender do antifúngico.

2.3 Caracterização quanto a virulência dos isolados de leveduras do complexo *C. parapsilosis* e atividade antivirulência do D-Limoneno

2.3.1 Ensaio da morfogênese

O ensaio foi realizado seguindo Chaves et al., (2007) na presença e ausência do D-Limoneno, no qual as células de leveduras do complexo *C. parapsilosis* foram crescidas por 24 horas em meio NGY (Difco Neopeptona 1 g/L, Dextrose 4 g/L; Difco extrato de levedura 1 g/L). (30°C - 100 rpm). A absorbância da densidade óptica do crescimento foi determinada em espectrofotômetro à 600 nm entre 0,8 e 1,2 o que corresponde a uma concentração aproximada de 2×10^8 células/mL. As células de leveduras foram padronizadas para 1×10^6 células/mL, o que corresponde a 50 μ L do crescimento compreendido entre 0,8 e 1,2 de absorbância.

Para a indução do tubo germinativo, o volume total da suspensão de leveduras foi inoculado em caldo YPD (Dextrose 2 g, Peptona 2 g, Extrato de levedura 1 g, e Água destilada, 100 mL) e incubadas sob agitação mecânica à temperatura de 37° C a 100 rpm, por um período de 1h e 3h de incubação para posterior leitura microscópica.

Nas amostras retiradas com 1h de incubação foram observadas 100 leveduras em microscopia óptica (400x de magnificação; CX21, Olympus) para a determinação da porcentagem da formação de tubos germinativos. Para as amostras incubadas por um período de 3 horas, as células também foram observadas da mesma forma previamente descrita, para o cálculo do índice de morfologia. Para células esféricas de leveduras que apresentavam morfologia de blastoconídio foi atribuído o valor IM=1, células apresentando diâmetro com o dobro do comprimento, IM=2, células com aparência de pseudo-hifas, IM=3 e hifas longas de lados paralelos, I.M=4. Para a determinação do índice de morfologia foi empregada à fórmula:

$$I.M = \frac{(n^{\circ} IM1 \times 1) + (n^{\circ} IM2 \times 2) + (n^{\circ} IM3 \times 3) + (n^{\circ} IM4 \times 4)}{100}$$

2.3.2 Ensaio da capacidade de aderência das leveduras às células epiteliais

Os testes de aderência foram realizados na presença e ausência do D-Limoneno baseados nos trabalhos de Kearns et al. (1983) e Bates et al. (2006). As células epiteliais foram obtidas da cavidade bucal de doador jovem, clinicamente são e isento de cáries. Em todas as etapas relacionadas aos testes de aderência foi utilizado o tampão *Phosphate Buffered Saline* - PBS. As suspensões celulares obtidas foram mantidas em banho de gelo, a fim de evitar alterações celulares.

Os isolados de *Candida* foram semeados no meio Sabouraud dextrose ágar adicionado de 0,5% extrato de levedura e mantidos a temperatura de 30°C durante 72 horas. Após este período, as células de leveduras foram suspensas em 2 mL de PBS contidos em tubos de ensaio, centrifugadas três vezes a 1.580 rpm por 10 minutos e ressuspensas para uma concentração final de 2×10^7 cels/mL.

A remoção das células epiteliais foi realizada através de suave escarificação da mucosa da cavidade oral com auxílio de swab e, em seguida, foram suspensas em 7 mL de PBS contidos em tubos de ensaio, centrifugadas três vezes e ressuspensas para uma concentração final de 4×10^4 cels/mL. Depois de lavadas, as células de leveduras e as células epiteliais foram examinadas quanto à viabilidade e integridade para avaliação de possíveis alterações em função das lavagens.

Após a obtenção das suspensões de culturas de *Candida* e das células epiteliais da cavidade oral foi procedida mistura e homogeneização. Em seguida, agitadas durante duas horas, sendo posteriormente, realizada a microscopia, através de preparação em lâmina com azul de metileno. Os resultados foram expressos pela média aritmética de dez campos observados onde serão avaliadas 100 células epiteliais com relação à percentagem de sua área superficial aderidas pelas leveduras e graduada como forte aderência para adesão entre 50% a 100% da área de superfície, fraca aderência para adesão até 49% e sem aderência visível.

2.4 Avaliação do mecanismo de ação do D-Limoneno

Para a avaliação quanto ao mecanismo de ação do D-Limoneno foi utilizado um representante de cada espécie do complexo *C. parapsilosis* (URM7423 *C. metapsilosis*, URM7434 *C. orthopsilosis* e URM7445 *C. parapsilosis* stricto sensu).

2.4.1 Perfil de Morte Celular

As células de levedura tratadas e não tratadas foram lavadas e ressuspensas em 0,5 mL de PBS e marcadas com iodeto de propio (PI) e anexina V utilizando o kit de detecção de apoptose anexina V-FITC (Ebioscience, San Diego, EUA) de acordo com as instruções do

fabricante. Em seguida, as células foram imediatamente analisadas em um citômetro de fluxo FACS-Calibur (Becton-Dickinson, San Jose, CA, EUA), utilizando um detector de sinais de 530/30 nm (FL1-H) para detecção de AV-FITC e 585/42 nm detector de sinal (FL2) para emissão de PI. A intensidade de fluorescência foi adquirida para 20.000 eventos na região fechada. Os dados foram analisados utilizando FlowJo (Tree Star Inc ©, Ashland, EUA) e expressos como a percentagem de células em cada fenótipo de população em comparação com o controle (células sem tratamento). Dois experimentos independentes foram realizados (n = 4) (Sandes et al., 2014).

2.4.2 Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

Para a quantificação das espécies reativas de oxigênio (ERO) foi utilizado o marcador Diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA). Após as concentrações inibitórias mínimas serem determinadas no teste de sensibilidade antifúngica (CLSI, 2002), foram coletadas amostras, lavadas com PBS e marcadas com 10 µL do marcador a uma concentração de 10 µg/mL. Foi utilizado controle sem tratamento com o D-Limoneno com e sem marcação com DCFH-DA. As amostras foram analisadas em por citometria de fluxo (FACS-Calibur/Becton-Dickinson, San Jose, CA, EUA) e a intensidade de fluorescência foi adquirida para 20.000 eventos na região fechada. Os dados foram analisados usando FlowJo (Tree Star Inc©, Ashland, EUA). Alterações nas intensidades de fluorescência de DCFH-DA (FL1-H/ 515-545nm) foram quantificadas pelo índice de variação (IV) obtido pela equação (TM-CM)/CM, onde TM é a mediana da fluorescência para células tratadas e CM é a do controle (não tratado). Dois experimentos independentes foram realizados (n = 4) (Sandes et al., 2014).

2.4.3 Ensaio de malondialdeído (MDA)

O ensaio de peroxidação lipídica foi determinado pela reação colorimétrica (532 nm) do MDA com ácido tiobarbitúrico (TBA) utilizando o Kit de ensaio MDA (Sigma-Aldrich), seguindo as condições do fabricante.

2.4.4 Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial

As células tratadas e não tratadas foram lavadas e ressuspensas em 0,5 mL de PBS com 10mg/mL de Rodamina 123 (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) durante 20 minutos. Após a marcação, as células foram lavadas duas vezes com 1 mL de PBS e imediatamente analisadas por citometria de fluxo (FACS-Calibur/Becton-Dickinson, San Jose, CA, EUA), onde as

intensidades de fluorescência para Rodamina 123 (potencial de membrana mitocondrial) foram quantificadas. A intensidade de fluorescência foi adquirida para 20.000 eventos na região fechada. Os dados foram analisados usando FlowJo (Tree Star Inc®, Ashland, EUA). As alterações nas intensidades de fluorescência da Rodamina 123 (FL1-H/515-545 nm) foram quantificadas pelo índice de variação (IV) obtido pela equação (TM-CM)/CM, onde TM é a mediana da fluorescência para células tratadas e CM é a do controle (não tratado). Dois experimentos independentes foram realizados (n = 4) (Sandes et al., 2014).

3 Resultados e Discussão

3.1 Atividade Antifúngica

A avaliação da atividade antifúngica do D-Limoneno frente às cepas do complexo *C. parapsilosis* utilizadas apresentou resultados significativos obtendo valores de CIM de 256 µg/mL, 512 µg/mL e 1024 µg/mL com atividade fungicida. Entretanto, em alguns isolados não foi possível à inibição de 100% das células e, portanto, apresentaram valores de CIM $\geq$ 1024 µg / mL.

Viriato et al. (2014) ao analisarem 15 substâncias da classe dos terpenóides, verificaram que o Limoneno apresentou atividade antifúngica em todas as espécies de *Candida* testadas, e entre elas as leveduras do complexo *C. parapsilosis* com CIM de 93,75 µg/mL para *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*. Embora estes resultados apresentem CIM inferiores ao encontrados neste estudo, já foi relatado que o Limoneno é atóxico, mesmo em doses altas de 15 g/dia (Sun et al., 2007). Além disso, a susceptibilidade antifúngica a drogas é inerente a cada cepa, e por isso nossos resultados são promissores para o tratamento da candidíase.

Como drogas controle, foram utilizados os antifúngicos comerciais fluconazol, anfotericina B, micafungina, anidulafungina e caspofungina. Todas as cepas utilizadas no estudo foram sensíveis ao fluconazol e a anfotericina B com CIM variando de 0,125 a 1 µg/mL. Para as equinocandinas, a variação dos valores de CIM foi de 0,06 a 4 µg/mL para a caspofungina, sendo os isolados com CIM de 4 µg/mL considerados dose-dependentes. A micafungina apresentou variação de 0,03 a 4 µg/mL, também apresentando isolados dose-dependentes (CIM 4µg/Ml); já a anidulafungina apresentou variação de 0,03 a 8 µg/mL, apresentando isolados dose-dependentes (CIM 4 µg/mL) e resistentes ($\geq$ 8 µg/mL).

Neste estudo foram observados isolados resistentes e dose-dependentes à classe das equinocandinas. Valores elevados de CIM para as equinocandinas são frequentemente

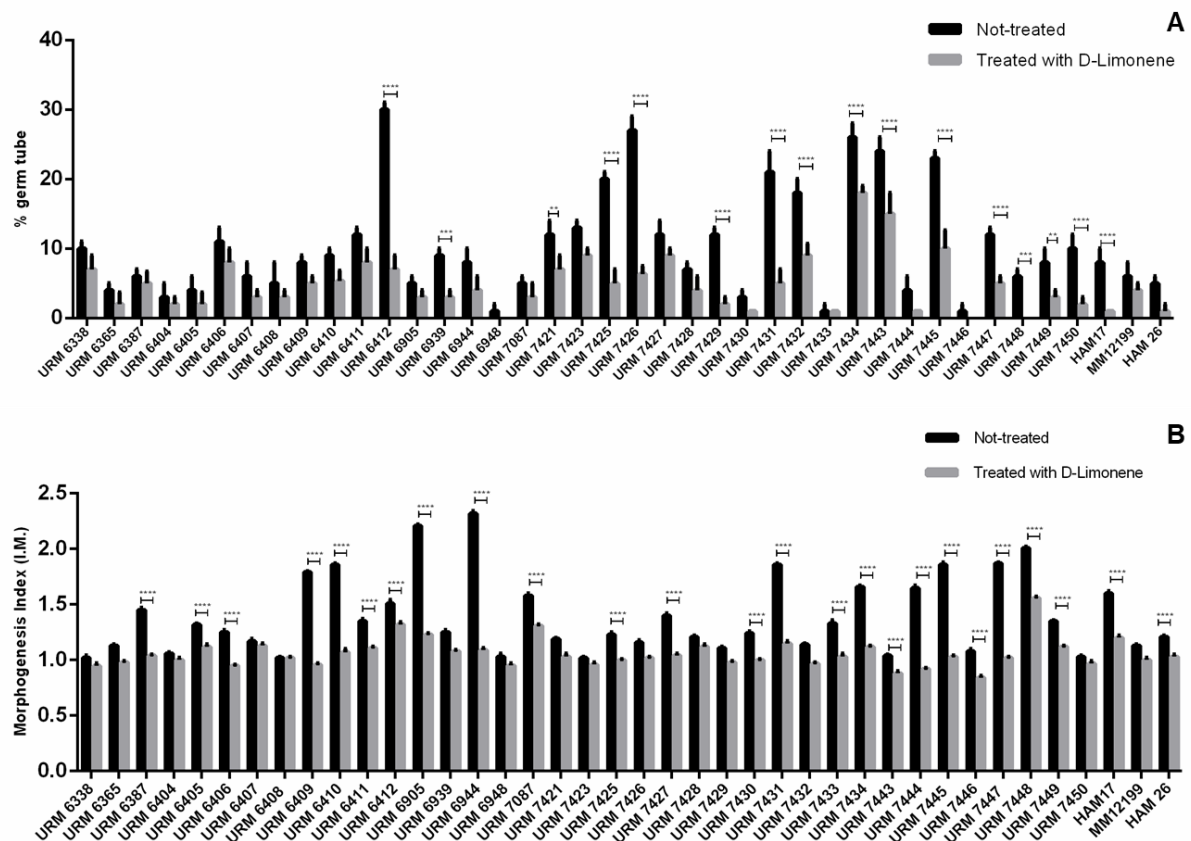
encontradas para leveduras do complexo *Candida parapsilosis* (Chiotos et al., 2016; Kontoyiannis et al., 2017). *C. orthopsilosis* já foi descrita como resistente à caspofungina, assim como *C. metapsilosis* (Brilhante et al., 2014; Brilhante et al., 2018).

3.2 Ensaio da morfogênese

A avaliação da produção de tubo germinativo (evaginação lateral) foi realizada com os 40 isolados após 1h de incubação. Foi observado que a porcentagem de células que emitiam tubo germinativo variou de 2-30% e que esta produção não foi específica para cada espécie, mas inerente a cada cepa avaliada. No entanto, quando avaliadas na presença do D-limoneno foi verificado que houve uma diminuição na produção deste fator de virulência que variou desde a inibição completa da formação de tubo germinativo a 18% (Figura 1A).

Ao analisar as células com 3h de incubação, foi possível determinar o índice de morfologia (I.M), com o qual foi observado um I.M médio de 1,32 para cepas do complexo *C. parapsilosis* o que indica uma prevalência das formas de blastoconídeos. Apenas os isolados URM6905, URM6944 e URM7448 apresentaram células predominantemente na forma de pseudomicélio, com I.M de 2,21, 2,32 e 2,01 respectivamente, no entanto, não se observou a capacidade dos isolados em formar hifa verdadeira. Este índice também foi reduzido na presença do D-Limoneno, o qual apresentou valor máximo de I.M 1,56 (Figura 1B).

Figura 1 - Avaliação da inibição da morfogênese de leveduras do complexo *Candida parapsilosis* pelo D-Limoneno. (A) Emissão de tubo germinativo após 1 hora de incubação e (B) índice de morfogênese (IM) após 3h de incubação. Os dados representam a média e desvio padrão em triplicata (n_3). Para a análise, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi realizado para todas as médias obtidas ao nível de significância de 5%. Os símbolos “***”, “****”, “*****” indicam diferenças significativas entre a porcentagem de emissão de tubo germinativo e índice de morfogênese ($p \leq 0,001$), ($p \leq 0,0003$) e ($p \leq 0,0001$), respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora.

A transição broto-hifa das leveduras do gênero *Candida* é uma etapa fundamental para o estabelecimento da infecção, contribuindo para a invasão tecidual (Silva-Rocha et al., 2015). Estudos demonstram que as alterações na morfologia da célula fúngica causadas por óleos essenciais podem estar relacionadas com a interferência dos seus constituintes químicos sobre enzimas responsáveis pela biossíntese ou manutenção da parede celular, afetando o crescimento e morfogênese fúngica (Zambonelli et al., 1996; Debillerbeck et al., 2001). Em nossa pesquisa, foi evidenciado que o D-Limoneno foi capaz de reduzir a capacidade de formar tubos germinativos e pseudo-hifas para os isolados do complexo *C. parapsilosis*, caracterizando este composto como um promissor agente antivirulência.

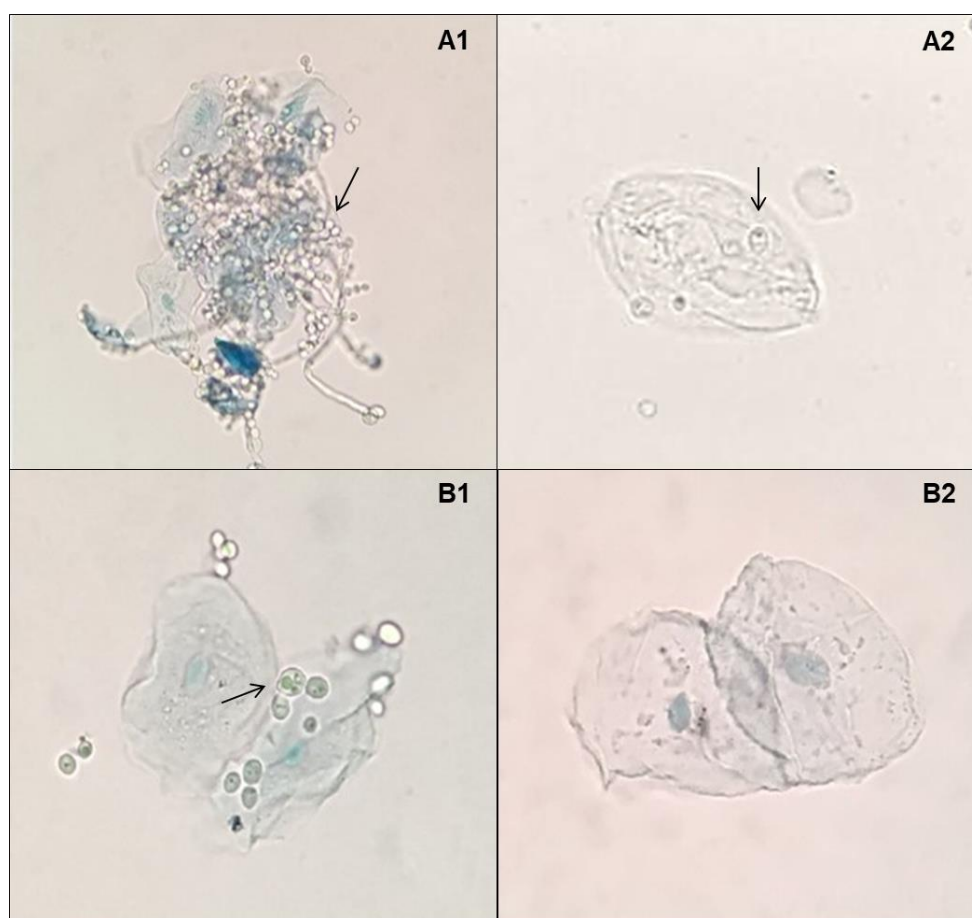
Vários estudos com outras espécies de leveduras também avaliaram a inibição da morfogênese pelo Limoneno. Liu et al. (2013) e Brennan et al. (2014) relataram que os danos na parede celular e na membrana mediados pelo Limoneno inibem o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* e dessa forma, sua transformação em hifa. Assim como Thakre et al. (2018) ao avaliarem o efeito do Limoneno na morfogênese de *C. albicans*. Contudo, este é o primeiro estudo ao avaliar a inibição da morfogênese das leveduras do complexo *C. parapsilosis* pelo D-Limoneno.

3.4 Ensaio da capacidade de aderência das leveduras às células epiteliais

Foi possível observar a presença dos três níveis de aderência das espécies do complexo *C. parapsilosis* às células epiteliais. Das 40 cepas avaliadas 10 (22,5%) isolados se destacaram apresentando forte capacidade de aderência, 25 (62,5%) isolados apresentaram fraca capacidade de adesão e cinco (12,5%) não apresentaram capacidade de adesão às células epiteliais humanas.

Na presença do D-Limoneno, foi verificado que a adesão das leveduras às células epiteliais foi fortemente reduzida. Isolados que apresentaram uma aderência forte ou fraca, perderam essa capacidade ou diminuíram em sua intensidade (Figura 2 A1-A2, B1-B2). Esses dados mostram uma tendência notável de redução na adesão de espécies do complexo quando cultivadas na presença desse produto natural, reforçando que, além da inibição do crescimento, o D-Limoneno pode interferir diretamente na adesão de células de *C. parapsilosis* ao epitélio. E, portanto, pode ser particularmente útil na prevenção da candidíase uma vez que para o estabelecimento da doença é necessária este processo de adesão (Modrzewska et al., 2015). Ademais, a inibição deste fator contribui para o não desenvolvimento do biofilme, visto que a aderência é a etapa inicial para sua formação. Além disso, o biofilme é responsável pelo aumento da resistência à defesas imunes do hospedeiro, bem como a terapia antifúngica (Leite-Andrade et al., 2017).

Figura 2 - Inibição da capacidade de aderência às células epiteliais de leveduras do complexo *Candida parapsilosis* pelo D-Limoneno. (A1-A2) URM 7445 *Candida parapsilosis* stricto sensu apresentando forte aderência antes do tratamento e fraca aderência após tratamento com o D-Limoneno e (B1-B2) URM 7434 *Candida orthopsilosis* apresentando fraca aderência antes do tratamento e aderência ausente após tratamento com o D-Limoneno. As setas indicam as células de leveduras aderidas as células epiteliais humanas.



Fonte: Elaborado pela autora.

A inibição da aderência de espécies de *Candida* também já foi verificada com outros produtos naturais como o extrato de *Phyllanthus emblica* Linn. (Thaweboon et al., 2011) e a *Eugenia uniflora* (Souza et al., 2018), ambos para *C. albicans*. No entanto, não há outros estudos que demonstrem a inibição da aderência de leveduras do complexo *C. parapsilosis* pelo D-Limoneno.

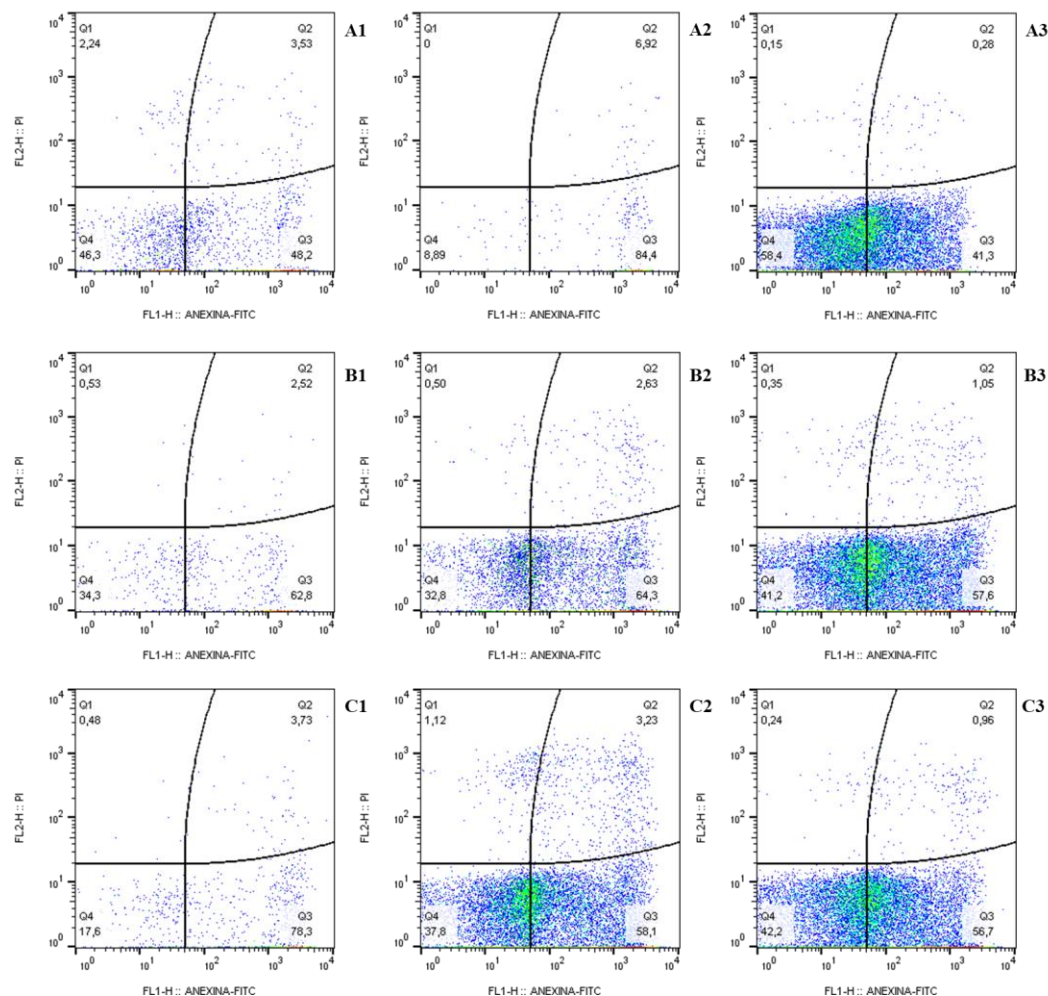
3.5 Avaliação do mecanismo de ação do D-Limoneno

3.5.1 Perfil da morte celular

O tratamento com o D-Limoneno mostra uma ação apoptótica inicial (fenótipo AV⁺/PI⁻) que variou de 41,3 a 84,4% para o isolado URM7445 *C. parapsilosis* stricto sensu (Figura 3 A1-A3), 57,6 a 64,3% para URM7434 *C. orthopsilosis* (Figura 3 B1-B3) e 56,7 a 78,3% para URM7423 *C. metapsilosis* (Figura 3 C1-C3), marcados pela anexina V (AV) nas células analisadas. Ademais, o fenótipo necrótico (AV⁻/PI⁺) foi representado por menos de 2,3% da população de leveduras analisada. A avaliação da apoptose e necrose por citometria de fluxo geralmente é realizada pelo uso combinado da anexina V-FITC, que acessa a

fosfatidilserina a qual é exposta na membrana externa na fase inicial da apoptose e o iodeto de propídeo (PI), que permite a identificação de alterações nucleares nos estágios finais da apoptose ou necrose como consequência do aumento da permeabilidade da membrana (Sandes et al., 2014). Nossos resultados mostraram que a incubação das células do complexo *C. parapsilosis* com o D-limoneno produziram perdas significativas na viabilidade celular, provocando características apoptóticas nas leveduras.

Figura 3: Citometria de fluxo para análises de apoptose com Anexina V e Iodeto de Propídeo em células de *Candida parapsilosis* URM7445 A) *C. orthopsilosis* URM 7434 (B) e *C. metapsilosis* URM7423 (C) 24h pós-tratamento com D-limoneno. (A1, A2 e A3): células expostas a 1024µg/mL de D-limoneno, 512µg/mL e 256µg/mL respectivamente, (B1, B2 e B3): células expostas a 512µg/mL de D-limoneno, 256µg/mL e 128µg/mL respectivamente e (C1, C2 e C3): células expostas a 2048µg/mL de D-limoneno, 1024µg/mL e 512µg/mL respectivamente.



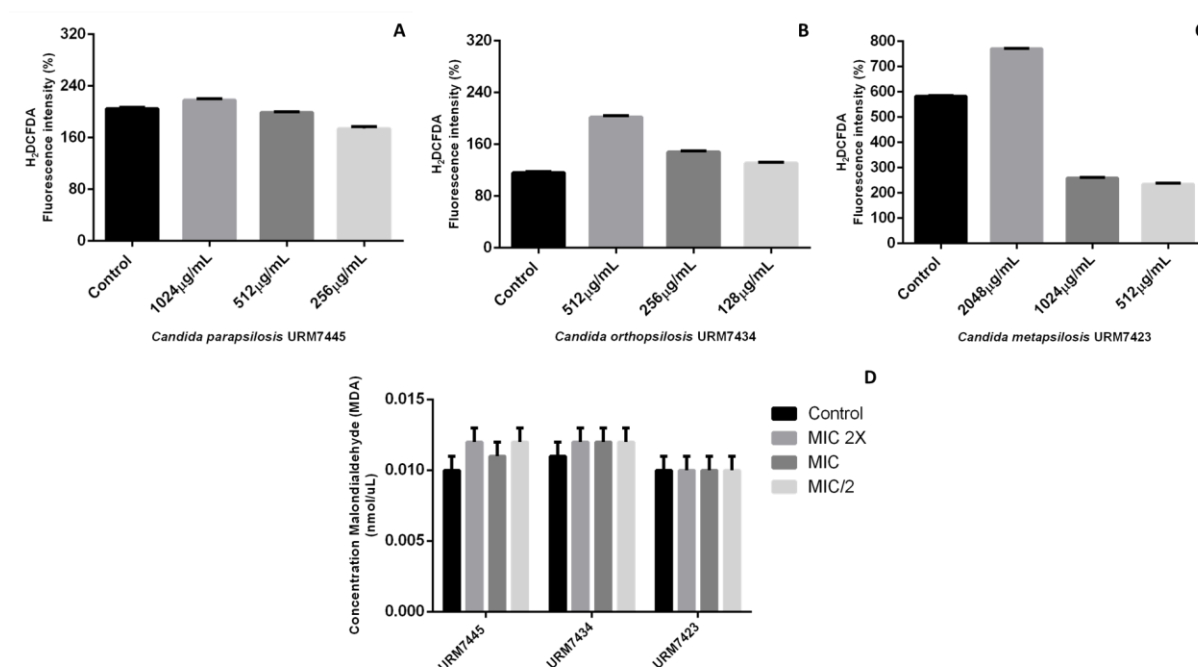
Fonte: Elaborado pela autora.

Aliado a isto, o perfil de morte observado representa um alvo importante para o desenvolvimento de novos medicamentos antifúngicos, visto que a via necrótica poderia ativar mecanismos pró-inflamatórios no hospedeiro humano (Shirazi et al., 2015).

3.5.2 Quantificação de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e Peroxidação Lipídica

O teste de detecção para espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica é mostrado na Figura 4. Os dados apontam para uma maior produção de ERO nas concentrações 2048 $\mu\text{g/mL}$ e 512 $\mu\text{g/mL}$ para as cepas URM7423 *C. metapsilosis*, e URM7434 *C. orthopsilosis*, respectivamente. Já a cepa URM7445 *C. parapsilosis* strictu sensu apresentou um discreto aumento na produção de ERO a 1024 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 4 A-C). No entanto, esses dados não apresentam diferença estatística significativa ($p \geq 0,5$) em relação ao controle.

Figura 4 - Detecção de espécies reativas de oxigênio (A-C) e peroxidação lipídica (D) para as espécies do complexo *Candida parapsilosis*. Para a análise, o teste de comparações múltiplas de Tukey foi realizado para todas as médias obtidas ao nível de significância de 5%.



Fonte: Elaborado pela autora.

Neste estudo constatamos que o D-Limoneno não provocou estresse oxidativo nas células do complexo *C. parapsilosis*, mas apenas o aumento das ERO que pode ser atribuído ao metabolismo estritamente aeróbico dessas cepas (Nosek et al., 2009).

Além disso, o ensaio de peroxidação lipídica não demonstrou o aumento no conteúdo relativo de MDA nos tratamentos em comparação com o controle (Figura 4 D). Este efeito confirma que o D-Limoneno não perturbou o estado redox das células do complexo *C. parapsilosis* e, portanto, não causou peroxidação lipídica. Uma vez que a peroxidação de lipídeos é o principal alvo molecular do dano oxidativo e que são formados por espécies reativas (Lee et al., 2017).

3.5.3 Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial

Verificou-se que o D-Limoneno não causou despolarização da membrana mitocondrial nas cepas de leveduras avaliadas. O isolado URM7423 apresentou índices de variação de 0,44, 0,61 e 0,81 para as concentrações de 2048 µg/mL, 1024 µg/mL e 512 µg/mL, respectivamente. O mesmo fenômeno ocorreu com os isolados URM7445, com índices de variação de 0,37, 0,39 e 0,41 e URM7434 com 0,63, 0,66 e 1,46.

Neste estudo foi observado que não ocorreu o dano na membrana mitocondrial nas leveduras do complexo *C. parapsilosis* tratadas com o D-Limoneno. Isso pode ter ocorrido devido a uma característica peculiar das mitocôndrias das espécies do complexo que é o desacoplamento da respiração da fosforilação, presumivelmente causada pela presença da proteína desacopladora (UCP) (Jarmuszkiewicz et al. 2000).

Além disso, as cepas URM7445 e URM7434 apresentaram dose-dependência à anidulafungina com CIM de 4 µg/mL e a cepa URM 7427 apresentou resistência a este fármaco com CIM de 8 µg/mL, o que pode ter contribuído para a não despolarização da membrana mitocondrial, uma vez que perturbações na parede celular por esse antifúngico pode ter levado ao desenvolvimento de um mecanismo que contribuiu para a resistência ao estresse oxidativo (Shirazi et al., 2015).

4 Conclusão

Este estudo revelou que o D-Limoneno exibe atividade antifúngica frente às leveduras do complexo *C. parapsilosis*, além de apresentar excelente atividade antivirulência na inibição da morfogênese e aderência das leveduras ao epitélio humano. O fato de este composto afetar parede e membranas, como cita Thakre et al.(2018) contribuem para

alterações nos constituintes dessas estruturas impedindo a adesão ao epitélio e alterando a morfogênese da célula, conduzindo a mesma à morte. Ademais, o mecanismo apoptótico induzido por esse composto representa um alvo importante para o desenvolvimento de novos medicamentos antifúngicos, visto que não ativa respostas inflamatórias no hospedeiro (Shirazi et al., 2015).

Além disso, verificamos também que o D-Limoneno não causa estresse oxidativo nas leveduras do complexo *C. parapsilosis* e como foi comprovado pelo ensaio com MDA, portanto a indução de apoptose deve estar relacionada a distúrbios em programas específicos de diferenciação celular mediado por aminoácidos da membrana celular causados pela ação do limoneno (Nosek et al., 2009).

Ainda, este é o primeiro estudo a avaliar a atividade antivirulência do D-Limoneno frente a leveduras do complexo *C. parapsilosis* e os resultados caracterizam este composto como promissor para o tratamento da candidíase invasiva, contribuindo para um melhor prognóstico e sobrevida dos pacientes visto que a aderência às células epiteliais e a morfogênese são cruciais para o estabelecimento e agravamento (formação de biofilme) da infecção fúngica.

Conflito de interesse

Os autores declaram que não há conflitos de interesse em relação a este trabalho.

Financiamento

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

Aggarwal BB, Shishodia S. (2006). Inflammation and câncer: How hot is the link? *Biochemical Pharmacology*.72, 1605-1621.

Anthony JP, Fyfe L, Smith H. (2005). Plant active componentes-a resource for antiparasitic agentes? *Trends in Parasitology*. 21. 462-468.

Bates DD, Mims JW. (2006). Invasive fungal sinusitis caused by *Pseudallescheria boydii*: case report and literature review. *Ear Nose Throat and Journal*. 85 (11):729-37. PMID: 17168149.

Belletti N, Ndagijimana M, Sisto C, Guerzoni ME, Lanciotti R, Gardini F. (2004). Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6932–6938.

Brennan TCR, Kromer JO, Nielsen LK. (2014). Physiological and transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to D-Limonene show changes to the cell wall but not to the plasma membrane. *Applied Environmental Microbiology*. 79 (12): 14–17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00463-13>.

Brilhante RS, de Jesus SRT, de Souza CMCBD, Teixeira CE, Brito MR et al. (2014). Antifungal susceptibility and virulence attributes of animal-derived isolates of *Candida parapsilosis* complex. *Journal of Medical Microbiology*, 63, 1568–1572. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.076216-0>.

Brilhante RSN, Sales JA, Silva MLQ, Oliveira JS, Pereira LA, Pereira-Neto WA, et al. (2018). Antifungal susceptibility and virulence of *Candida parapsilosis* species complex: an overview of their pathogenic potential. *Journal of Medical Microbiology*. 67: 903–914. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000756>.

Chaves GM, Bates S, Maccallum DM, Odds FC. (2007). *Candida albicans* GRX2, encoding a putative glutaredoxin, is required for virulence in a murine model. *Genetics and Molecular Research*, 6, 1051-1063.

Chiotos K, Vendetti N, Zaoutis TE, et al. (2016). Comparative effectiveness of echinocandins versus fluconazole therapy for the treatment of adult candidaemia due to *Candida parapsilosis*: a retrospective observational cohort study of the Mycoses Study Group (MSG-12). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71, 3536-3539.

Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*. 2nd edition. CLSI Document M27-A2. Philadelphia, Pa, USA: CLSI; 2002.

CLSI. (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-second edition, Clin. Lab. Stand. Inst. Wayne, PA U. S. A. Vol. M27-A3.

CLSI. (2012). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-second edition, Clin. Lab. Stand. Inst. Wayne, PA U. S. A. Vol. S4.

De Billerbeck VG, Roques CG, Bessière J-, Fonvieille J- Dargent R. (2001). Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, 47, (1):9–17.

Shirazi F, Lewis RE, Kontoyiannis DP. (2015). Micafungin induced apoptosis in *Candida parapsilosis* independent of its susceptibility to micafungin. *Microbial Cell*, 2(11): 445–450. <https://doi.org/10.15698/mic2015.11.236>.

Govender NP, Patel J, Magobo RE, Naicker S, Wadula J, Whitelaw A, et al. (2016). Emergence of azole-resistant *Candida parapsilosis* causing bloodstream infection: results from laboratory-based sentinel surveillance in South Africa. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71, 1994–2004. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw091>.

Jarmuszkiewicz W, Milani G, Fortes F, Schreiber AZ, Sluse FE, Vercesi AE (2000). First evidence and characterization of an uncoupling protein in fungi kingdom: CpUCP of *Candida parapsilosis*. *FEBS Letters*, 467, 145–149.

Kearns MJ, Davies P, Smith H. (1983). Variability of the adherence of *Candida albicans* strains to human buccal epithelial cells: inconsistency of differences between strains related to virulence. *Sabouraudia*. 21(2), 93-8.

Kontoyiannis DP, Bassetti M, Nucci M, Capparella MR, Yan LJ, Aram J, Hogan PA. (2017). Anidulafungin for the treatment of candidaemia caused by *Candida parapsilosis*: Analysis of pooled data from six prospective clinical studies. *Mycoses*, 60, 663–667. <https://doi.org/10.1111/myc.12641>.

Lee W, Lee DG. (2018). Reactive oxygen species modulate itraconazole induced apoptosis via mitochondrial disruption in *Candida albicans*. *Free Radical Research*. 52: 1, 39-50. <https://doi.org/10.1080/10715762.2017.1407412>.

Leite-Andrade MC, Soares-Oliveira MA, Santos FAG, Ximenes Vilela PB, Silva MN, Macêdo DPC, et al. (2017). A new approach by optical coherence tomography for elucidating biofilm formation by emergent *Candida species*. *PLoS ONE*, 12 (11): e0188020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188020>.

Liu J, Zhu Y, Du G et al. (2013). Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Dlimonene-induced oxidative stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 6467–6475. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4931-9>.

Marasinib BP, Baral P, Aryal P, Ghimire KR, Neupane S, Dahal N, et al. (2015). Evaluation of antibacterial activity of some traditionally used medicinal plants against human pathogenic bacteria. *BioMed Research International*. <https://doi.org/10.1155/2015/265425>.

Meletiadiis J, Curfs-Breuker I, Meis JF, Mouton JW. (2017). *In vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida* isolates with the EUCAST methodology, a new method for ECOFF determination. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61:e02372-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02372-16>.

Modrzewska B, Kurnatowski P, Modrezewka B, Kurnatowski P. (2015). Adherence of *Candida* sp. to host tissues and cells as one of its pathogenicity features. *Annals of Parasitology*. 61(1): 3–9. PMID: 25911031.

Netea M G, Joosten L A, Van der Meer J W, Kullberg B J & Van de Veerdonk F L. (2015). Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nature Reviews Immunology*. 15, 630–642. <https://doi.org/10.1038/nri3897>.

Nosek J, Holesova Z, Kosa P, Gacser A, Tomaska L. (2009). Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Current Genetics*. 55(5): 497-509. <https://doi.org/10.1007/s00294-009-0268-4>.

Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. (2018). Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*. 4, 18026. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.26>.

Prates HT, Santos JP. (2002). Óleos essenciais no controle de pragas de grãos armazenados. 443-461. IN: Lorini I, Miike LH, Senssel VM (ed.), Armazenagem de grãos. Campinas: Instituto Bio Geneziz, 1000.

Rosa MSS, Mendonça-Filho RR, Bizzo HR, Soares RMA, Souto-Padrón T, Alviano CS, et al. (2003). Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47, 1895-1901.

Sandes JM, Fontes A, Regis-da-Silva CG, Castro MCAB, Lima-Junior CG, Silva FPL, et al. (2014). *Trypanosoma cruzi* Cell Death Induced by the Morita-Baylis-Hillman Adduct 3-Hydroxy-2 Methylene-3(4-Nitrophenylpropanenitrile). *PLoS ONE*. 9(4): e93936. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093936>.

Silva-RochaWP, Lemos VLB, Ferreira MRA, Soares LAL, Svidzinski TIE, Milan EP, et al. (2015). Effect of the crude extract of *Eugenia uniflora* in morphogenesis and secretion of hydrolytic enzymes in *Candida albicans* from the oral cavity of kidney transplant recipients. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 15:6. <https://doi.org/10.1186/s12906-015-0522-x>.

Souza LBFC, Silva-Rocha WP, Ferreira MRA, Soares LAL, Svidzinski TIE, Milan EP, et al. (2018). Influence of *Eugenia uniflora* Extract on Adhesion to Human Buccal Epithelial Cells, Biofilm Formation, and Cell Surface Hydrophobicity of *Candida* spp. from the Oral Cavity of Kidney Transplant Recipients. *Molecules*. 23(10),2418. <https://doi.org/10.3390/molecules23102418>

Sun J. (2007). D-Limonene: Safety and clinical applications. *Alternative Medicine Review*. 12 (3): 259–264. PMID: 18072821

Thakre A, Zore1 G, Kodgire1 S, Kazi S, Mulange1 S, Patil R et al. (2018). Limonene inhibits *Candida albicans* growth by inducing apoptosis. *Medical Mycology*. 56, 565–578. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx074>.

Thaweboon B, Thaweboon S. (2011). Effect of *Phyllanthus emblica* Linn. on *Candida* adhesion to oral epithelium and denture acrylic. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 4, 41–45. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60029-1](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60029-1).

Tóth R, Nosek J, Mora-Montes HM, Gabaldon T, Bliss JM, Nosanchuk JD. (2019). *Candida parapsilosis*: from Genes to the Bedside. *Clinical Microbiology Reviews*. 32: e00111-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00111-18>.

Viriato A. (2014). Terpenoides com atividade antifúngica para *Candida Berkhout*, causadoras de infecções hospitalares. *Revista O Mundo da Saúde*, 38, (1):40-50.

Weber LD, Pinto FGS, Scur MC, Souza JGL, Costa WF, Leite CW. (2014). Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and various plant extracts from *Prunus myrtifolia*. *African Journal of Agricultural Research*, 9, 846-853. <https://doi.org/10.5897/AJAR2013.8260>.

Zambonelli A, D'aurelio AZ, Bianchi A, Albasin A. (1996). Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. *Journal of Phytopathology*, 144 (3), 491-494.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que:

- Espécies de *Candida* não *C. albicans*, com destaque para *C. glabrata* e *C. parapsilosis* stricto sensu apresentam uma incidência relevante na candidíase invasiva em portadores de neoplasias malignas.
- A ferramenta proteômica MALDI-TOF MS é eficaz para diferenciar as espécies do complexo *C. parapsilosis*.
- As espécies do complexo *C. parapsilosis* apresentam variedade na capacidade de aderência às células epiteliais e morfogênese, sendo estas características inerentes a cada isolado como característica de virulência.
- A classe das equinocandinas não foi eficaz *in vitro* frente às cepas do complexo *C. parapsilosis* apresentando isolados resistentes e dose-dependentes.
- O D-Limoneno é um composto eficaz no tratamento e inibição de fatores de virulência, aderências às células epiteliais e morfogênese, das leveduras do complexo *C. parapsilosis*.
- O mecanismo de ação do D-Limoneno frente à leveduras do complexo *C. parapsilosis* não ocorre por estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

- ADLER-MOORE, J.P.; GANGNEUX, J.P.; PAPPAS, P.G. Comparison between liposomal formulations of amphotericin B. **Med Mycol**, v. 54, p. 223–231, 2016.
- AGGARWAL, B.B.; SHISHODIA, S. Inflammation and câncer: How hot is the link? **Biochemical Pharmacology**, v.72, p.1605-1621, 2006.
- AHMAD, S.; KHAN, Z.; AL-SWEIH, N.; ALFOUZAN, W.; JOSEPH, L. *Candida auris* in various hospitals across Kuwait and their susceptibility and molecular basis of resistance to antifungal drugs. **Mycoses**, 2019.
- AKINS, R.A. An update on antifungal agents and mechanism of resistance in *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 42, p. 285-318, 2005.
- ALEXANDER, B.D. et al. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. **Clin. Infect. Dis.** v.56, p.1724–1732, 2013.
- ALNUAIMI, A.D.; WIESENFELD, D.; O'BRIEN-SIMPSON, N.M.; REYNOLDS, E.C.; MCCULLOUGH, M.J. Oral *Candida* colonization in oral cancer patients and its relationship with traditional risk factors of oral cancer: a matched case-control study. **Oral Oncol**, v. 51, p. 139–45, 2015.
- ANDERSON, T.M.; CLAY, M.C.; CIOFFI, A.G.; DIAZ, K.A.; HISAO, G.S.; TUTTLE, M.D.; NIEUWKOOP, A.J.; COMELLAS, G.; MARYUM, N.; WANG, S.; UNO, B.E.; WILDEMAN, E.L.; GONEN, T.; RIENSTRA, C.M.; BURKE, M.D. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. **Nat Chem Biol**, v. 10, p. 400–406, 2014.
- ANDES, D. R. et al. Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: a patient-level quantitative review of randomized trials. **Clin. Infect. Dis.**, v. 54, p. 1110–1122, 2012.
- ANTHONY, J.P.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components-a resource for antiparasitic agents? **Trends in Parasitology**, v. 21, p. 462-468, 2005.
- ARENDRUP, M. C. et al. Detection of candidaemia in patients with and without underlying haematological disease. **Clin Microbiol Infect**, v. 16, p. 855–862, 2010.
- ARENDRUP, M. C. et al. Differential in vivo activities of anidulafungin, caspofungin, and micafungin against *Candida glabrata* isolates with and without FKS resistance mutations. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 56, p. 2435–2442, 2012.
- ASHFORD, B. Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 8, p. 507–538, 1928.
- ATAIDES, F.S.; COSTA, C.R.; HASIMOTO, L.K.; FERNANDES, O.F.L.; JESUINO, R.S.A.; SILVA, M.R.R. Molecular identification and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis* complex species isolated from culture collection of clinical samples. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 4, p. 454-459, 2015.

AUZINGER, G.; PLAYFORD, E. G.; N. C.; KNOX, H. N.; WEINSTEIN, D.; KANTECKI, M.; SCHALAMM, H.; CHARBONNEAU, C. Cost-Effectiveness Analysis of Anidulafungin for the Treatment of Candidaemia and Other Forms of Invasive Candidiasis. **Infectious Diseases**, v. 15, p. 463, 2015.

BACKES, P.; SANTOS, J.I.; BORSATTO, E.M.; REIS, M. Laboratory diagnosis of *Cryptococcus* sp. in cerebrospinal fluid. **RBAC**, v. 48, p. 10-14, 2016.

BAILLY, S.; MAUBON, D.; FOURNIER, P.; PELLOUX, H.; SCHWEBEL, C.; CHAPUIS, C. FORONI, L.; CARTUCHO, M.; JEAN-FRANÇOIS, T. Impacto da prescrição antifúngica na distribuição relativa e suscetibilidade de *Candida* spp. Tendências com mais de 10 anos. **Journal of Infection**, v.72, p. 103-111, 2016.

BARBEDO, L.S.; VAZ, C.; PAIS, C.; FIGUEIREDO-CARVALHO, M.H.G.; MUNIZ, M.M.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; SAMPAIO, P. Different scenarios for *Candida parapsilosis* fungaemia reveal high numbers of mixed *C. parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* infections. **Journal of Medical Microbiology**, v.64, n. 1, 2015.

BARNES, S. D.; DOHLMAN, C. H.; DURAND, M. L. Fungal colonization and infection in Boston keratoprosthesis. **Cornea**, v. 26, p. 9-15, 2007.

BARNETT, J.A.; PAINE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification**. 3ed., Cambridge, Cambridge University Press, 2000.

BARRETT-BEE, K.; HAYES, Y.; WILSON, R. G.; RYLEY, J. F. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. **J. Gen. Microbiol.**, v. 131, p. 1217–1221, 1985.

BASSETTI, M.; GARNACHO-MONTERO, J.; CALANDRA, T. et al. Intensive Care medicine research agenda on invasive fungal infection in critically ill patients. **Intensive Care Med.**, v. 43, p. 1225-1238, 2017.

BATES, D.D.; MIMS, J.W. Invasive fungal sinusitis caused by *Pseudallescheria boydii*: case report and literature review. **Ear Nose Throat J**, v. 85, n. 11, p. 729-737, 2006.

BAUTERS, T. G.; DHONT, M. A.; TEMMERMAN, M. I.; NELIS, H. J. Prevalence of vulvovaginal candidíases and susceptibility to fluconazole in women. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 187, p. 569–574, 2002.

BELLETTI, N.; NDAGIJIMANA, M.; SISTO, C.; GUERZONI, M.E.; LANCIOTTI, R.; GARDINI, F. Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae* . **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6932–6938, 2004.

BEN-AMI, R.; OLSHTAIN-POPS, K.; KRIEGER, M.; OREN, I.; BISHARA, J.; DAN, M.; WIENER-WELL, Y.; WEINBERGER, M.; ZIMHONY, O.; CHOWERS, M.; WEBER, G.; POTASMAN, I.; CHAZAN, B.; KASSIS, I.; SHALIT, I.; BLOCK, C.; KELLER, N.; KONTOYIANNIS, D.P.; GILADI, M. Antibiotic exposure as a risk factor for fluconazoleresistant *Candida* bloodstream infection. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, p. 2518 –2523, 2012.

BERGAMASCO, M.D.; GARNICA, M.; COLOMBO, A.L.; NUCCI, M. Epidemiology of candidemia in patients with hematologic malignancies and solid tumours in Brazil. **Mycoses**, v. 56, p. 256–63, 2013.

BEYDA, N. D.; ALAM, M. J.; GAREY, K. W. Comparison of the T2Dx instrument with T2*Candida* assay and automated blood culture in the detection of *Candida* species using seeded blood samples. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 77, n. 4, p. 324–326, 2013.

BITAR, D.; LORTHOLARY, O.; LE STRAT, Y.; NICOLAU, J.; COIGNARD, B.; TATTEVIN, P. Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001–2010. **Emerg Infect Dis**, v.20 1149–1155, 2014.

BIZZINI, A.; DURUSSEL, C.; BILLE, J.; GREUB, G.; PROD'HOM, G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 1549–54, 2010.

BONFIETTI, L. X.; MARTINS M. A.; SZESZS M. W.; PUKISKAS S. B.; PURISCO S. U.; PIMENTEL, F. C. Prevalence, distribution and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* bloodstream isolates. **J Med Microbiol.**, v. 61, n. 7, p. 1003–1008, 2012.

BRILHANTE, R.S.; DE JESUS, S.R.T.; DE SOUZA, C.M.C.B.D.; TEIXEIRA, C.E.; BRITO, M.R. et al. Antifungal susceptibility and virulence attributes of animal-derived isolates of *Candida parapsilosis* complex. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, p. 1568–1572, 2014.

BRILHANTE, R.S.N.; SALES, J.A.; SILVA, M.L.Q.; OLIVEIRA, J.S.; PEREIRA, L.A., PEREIRA-NETO, W.A. et al. Antifungal susceptibility and virulence of *Candida parapsilosis* species complex: an overview of their pathogenic potential. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, p. 903–914, 2018.

BUSTAMANTE, B.; MARTINS, M.A.; BONFIETTI, L.X.; SZESZS, M.W.; JACOBS, J.; GARCIA, C.; MELHEM, M.S. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* isolates from bloodstream infections in Lima, Peru. **J Med Microbiol**, v. 63, p.855–860, 2014.

CALANDRA, T.; ROBERTS, J.A.; ANTONELLI, M.; BASSETTI, M.; VINCENT, J.L. Diagnosis and management of invasive candidiasis in the ICU: an updated approach to an old enemy. **Critical Care**, v. 20, p. 125, 2016.

CASSONE, A.; DE BERNARDIS, F.; PONTIERI, E.; CARRUBA, G.; MARTINO, P.; FERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, M.; QUINDÓS, G.; PONTÓN, J. Biotype Diversity of *Candida parapsilosis* and Its Relationship to the Clinical Source and Experimental Pathogenicity. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 171, n. 4, p. 967–975, 1995.

CASTANHEIRA, M.; MESSER, S. A.; RHOMBERG, P. R.; PFALLER, M. A. Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates: results of the SENTRY antifungal surveillance program. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 85, p. 200–204, 2016.

CEREGHETTI, D.M.; CARREIRA, E.M. Amphotericin B: 50 Years of Chemistry and Biochemistry. **Synthesis**, v. 6, p. 914-942, 2006.

CHAVES, G.M.; BATES, S.; MACCALLUM, D.M.; ODDS, F.C. *Candida albicans* GRX2, encoding a putative glutaredoxin, is required for virulence in a murine model. **Genet Mol Res**, v. 5, p. 1051–1063, 2007.

CHEN, C.Y. et al. Clinical characteristics and treatment outcomes of pulmonary invasive fungal infection among adult patients with hematological malignancy in a medical centre in Taiwan, 2008-2013. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 2018.

CHIOTOS, K.; VENDETTI, N.; ZAOUTIS, T.E. et al. Comparative effectiveness of echinocandins versus fluconazole therapy for the treatment of adult candidaemia due to *Candida parapsilosis*: a retrospective observational cohort study of the Mycoses Study Group (MSG-12). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, p. 3536-3539, 2016.

CHOWDHARY, A.; SHARMA, C.; MEIS, J. F. *Candida auris*: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. **PLoS Pathog**, v. 13, e1006290, 2017.

CHOWDHARY, A.; SHARMA, C.; MEIS, J. F. *Candida auris*: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. **PLoS Pathog**, v. 13, e1006290, 2017.

CLANCY, C. J.; NGUYEN, M. H. Emergence of *Candida auris*: an international call to arms. **Clin. Infect. Dis.**, v. 64, p. 141–143, 2017.

CLANCY, C. J.; NGUYEN, M. H. Finding the “missing 50%” of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. **Clin. Infect. Dis.**, v. 56, p. 1284–1292, 2013.

CLANCY, C.J.; NGUYEN, M.H. Non-Culture Diagnostics for Invasive Candidiasis: Promise and Unintended Consequences. **J. Fungi**, v. 4, n. 1, p. 27, 2018.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-second edition. **Clin. Lab. Stand. Inst. Wayne, PA U. S. A.** v. M27-A3, 2008.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-second edition, **Clin. Lab. Stand. Inst. Wayne, PA U. S. A.** Vol. S4, 2012.

CORTÉS, J.A.; RUSSI J.A.N. Echinocandins. **Rev Chil Infect**, v. 28, n. 6, p. 529-536, 2011.

COUTO, E.M.P., CARLOS, D., MACHADO, E.R. Candidíase em neonatos: uma revisão epidemiológica. **Ensaio e ciência**, v. 15, p. 197-213, 2011.

CROWELL, P.L. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **J Nutr**, v. 129, p. 775-778, 1999.

DE CAROLIS, E., HENSGENS, L.A.M., VELLA, A., POSTERARO, B., SANGUINETTI, M., SENESI, S., TAVANTI, A. Identification and typing of the *Candida parapsilosis* complex: MALDI-TOF MS vs. AFLP. **Medical Mycology**, p. 1–8, 2014.

DEMYTTENAERE, J.C.R.; BELLEGHEM, K.V.; KIMPE, N. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(-)-limonene by fungi and the use of solid phase microextraction for screening. **Phytochemistry**, v. 57, n. 2, p. 199-208, 2001.

DOI, A.M. et al. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial Candidemia from a Brazilian national surveillance program. **PLoS ONE**, v. 11, e0146909, 2016.

ESPINA, L.; SOMOLINOS, M.; LORÁN, S.; CONCHELLO, P.; GARCÍA, D.; PAGÁN, R. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. **Food Control**, v. 22, n. 6, p. 896-902, 2011.

FALCI, R.D.; PASQUALOTTO, A.C. Amphotericin B: areview on diferente formulations, side effects, and toxicity. **Clin Biomed Res**, v. 35, n. 2, p. 65-82, 2015.

FAROOQI, J.Q.; JABEEN, K.; SAEED, N.; IQBAL, N.; MALIK, B.; LOCKHART, S.R.; ZAFAR, A.; BRANDT, M.E.; HASAN, R. Invasive candidiasis in Pakistan: clinical characteristics, species distribution and antifungal susceptibility. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p. 259–268, 2013.

FISHER, M. C.; HENK, D. A.; BRIGGS, C. J.; BROWNSTEIN, J. S.; MADOFF, L. C.; MCCRAW, S. L.; GURR, S. J. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, v. 484, n. 7393, p. 186-194, 2012.

FRASER, M.; BROWN, Z.; HOULDSWORTH, M.; BORMAN, A.M.; JOHNSON, E.M. Rapid identification of 6328 isolates of pathogenic yeasts using MALDI-ToF MS and a simplified, rapid extraction procedure that is compatible with the Bruker Biotyper platform and database. **Medical Mycology**, v. 54, n.1, p. 80–88, 2016.

GACSER, A. Adhesins in *Candida parapsilosis*: Understudied players in Virulence. **Virulence**, v. 7, n. 2, p. 65-67, 2016.

GÁCSE, A.; SCHAFER, W.; NOSANCHUK, J. S.; SALOMON, S.; NOSANCHUK, J.D. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. **Fungal Genet Biol.**, n. 44, p. 1336-1341, 2007.

GAREY, K. W. et al. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, p. 25–31, 2006.

GHRENASSIA, E.; MOKART, D.; MAYAUX, J.; DEMOULE, A.; REZINE1, I.; KERHUEL, L.; CALVET, L.; DE JONG, A.; AZOULAY, E.; DARMON, M. Candidemia in critically ill immunocompromised patients: report of a retrospective multicenter cohort study. **Ann. Intensive Care**, v.9, p.62, 2019.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Physiopathogenesis, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GONÇALVES, S.S.; SOUZA, A.C.R.; CHOWDHARY, A.; MEIS, J.F.; COLOMBO, A. L. Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. **Mycoses**, v. 59, p. 4, p. 198-219.

GOVENDER, N.P.; PATEL, J.; MAGOBO, R.E.; NAICKER, S.; WADULA, J.; WHITELAW, A.; COOVADIA, Y.; KULARATNE, R.; GOVIND, C.; LOCKHART, S.R.; ZIETSMAN, I.L. Emergence of azole-resistant *Candida parapsilosis* causing bloodstream infection: results from laboratory-based sentinel surveillance in South Africa. **J Antimicrob Chemother**, v.71, p. 1994-2004, 2016.

GOW, N.A.; VAN DE VEERDONK, F.L.; BROWN, A.J.; NETEA, M.G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, p. 112–122, 2011.

GRANWEHR, B.P.; SIPSAS, N.V.; KONTOYIANNIS, D.P. Fungal Infections in Cancer Patients. **Oncologic Critical Care**, 2019.

GROOT, P. W.; BADER, O.; BOER, A. D.; WEIG, M.; CHAUHAN, N. Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. **Eukaryot Cell**, v. 12, p. 470-481, 2013.

HOOG, G.S.; GUARRO, J.; GENE, J.; FIGUERAS, M.J. **Atlas of Clinical Fungi**, 2ed., Utrecht/Reus, Centraal bureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili. 2000.

HUANG, A.M.; NEWTON, D.; KUNAPULI, A.; GANDHI, T.N.; WASHER, L.L.; ISIP, J.; COLLINS, C.D.; NAGEL, J.L. Impact of Rapid Organism Identification via Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Combined With Antimicrobial Stewardship Team Intervention in Adult Patients With Bacteremia and Candidemia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 9, p. 1237–1245, 2013.

INCA. **Estimativa de Câncer no Brasil**, 2018.

JACOBSEN, I.D.; WILSON, D.; WACHTLER, B.; BRUNKE, S.; NAGLIK, J.R.; HUBE, B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v.10, p. 85–93, 2012.

JENSEN, R. H.; JUSTESEN, U. S.; REWES, A.; PERLIN, D. S.; ARENDRUP, M. C. Echinocandin failure case due to a previously unreported FKS1 mutation in *Candida krusei*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, p. 3550–3552, 2014.

JOACHIM, H.; POLAYES, S. Subacute endocarditis and systemic mycosis (monilia). **JAMA**, p. 205–208, 1940.

JUNG, D.S.; FARMAKIOTIS, D.; JIANG, Y.; TARRANT, J.J.; KONTOYIANNIS, D.P. Uncommon *Candida* species fungemia among cancer patients, Houston, Texas, USA. **Emerg Infect Dis**, v. 21, p. 1942–50, 2015.

KAKEYA, H.; YAMADA, K.; KANEKO, Y.; YANAGIHARA, K.; TATEDA, K.; MAESAKI, S.; TAKESUE, Y.; TOMONO, K.; KADOTA, J.I.; KAKU, M.; MIYAZAKI, Y.; KAMEI, K.; SHIBUYA, K.; NIKI, Y.; YOSHIDA, M.; SEI, Y. National trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia in Japan from 2003 to 2014. **Med Mycol J**, v. 59, p.19-22, 2018.

KAUFFMAN, C. A.; PAPPAS, P.G.; SOBEL, J.D.; DISMUKES, W.E. Essentials of Clinical Mycology. **Springer**, 2011.

KEARNS, M.J.; DAVIES, P.; SMITH, H. Variability of the adherence of *Candida albicans* strains to human buccal epithelial cells: inconsistency of differences between strains related to virulence. **Sabouraudia**, v. 21, n. 2, p. 93-98, 1983.

KIM, J.; MARSHALL, M.R.; WEI, C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **J Agric Food Chem**, v. 43, n. 11, p. 2839-2845, 1995.

KIM, S.K.; EL BISSATI, K.; MAMOUN, C.B. Amino acids mediate colony and cell differentiation in the fungal pathogen *Candida parapsilosis*. **Microbiology**, v. 152, p. 2885–2894, 2006.

KING, R.D.; LEE, J.C.; MORRIS, A.L. Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells. **Infect. Immun**, v. 27, p. 667-674, 1980.

KLEIN, S.; ZIMMERMANN, S.; KÖHLER, C.; MISCHNIK, A.; ALLE, W.; BODE, K.A. Integration of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in blood culture diagnostics: a fast and effective approach. **Journal of Medical Microbiology**, v.61, n.3, 2012.

KLEINBERG, M. What is the current and future status of conventional amphotericin B? **Int J Antimicrob Agents**, v. 27, p. 12-16, 2006.

KONTOYIANNIS, D.P., BASSETTI, M., NUCCI, M., CAPPARELLA, M.R., YAN, L.J., ARAM, J., HOGAN, P.A. Anidulafungin for the treatment of candidaemia caused by *Candida parapsilosis*: Analysis of pooled data from six prospective clinical studies. **Mycoses**, v. 60, p. 663–667, 2017.

KOZIK, A.; KARKOWSKA-KULETA, J.; ZAJAC, D.; BOCHENSKA, O.; KEDRACKA-KROK, S.; JANKOWSKA, U.; RAPALA-KORIZ, M. Fibronectin-, vitronectin- and laminin-binding proteins at the cell walls of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* pathogenic yeasts. **BMC Microbiol.**, v. 15, p. 197, 2015.

KRIENGKAUYKIAT, J.; ITO, J. I.; DADWAL, S. S. Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections. **Clin Epidemiol.**, v. 3, p. 175-191, 2011.

KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, M. C. Invasive Candidiasis. **N Eng J Med**, v. 373, p. 1445-1456, 2015.

LAFHEY, S. F.; AND G. BUTLER. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. **Microbiology**, v. 15, p. 1073–1081, 2005.

LAURENCE, A.N.E.; JEAN-PAUL, K.M.; BOUATENIN, F.K.; N'GUESSAN, M.K.C. Virulence factors and determination of antifungal susceptibilities of *Candida* species isolated from palm wine and sorghum beer. **Microbial Pathogenesis**, v.124, p. 5–10, p. 2018.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A.F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 68, n. 2, p. 151-62, 2005.

LEROY, O.; BAILLY, S.; GANGNEUX, J.P.; MIRA, J.P.; DEVOS, P.; DUPONT, H.; et al. Systemic antifungal therapy for proven or suspected invasive candidiasis: the AmarCAND 2 study. **Ann Intensive Care**, v.6, p.2, 2016.

LI, D.; XIA, R.; ZHANG, Q.; BAI, C.; LI, Z.; ZHANG, P. Evaluation of candidemia in epidemiology and risk factors among cancer patients in a cancer center of China: an 8-year case-control study. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, p. 1, 2017.

LIM, J. H.; SARDESAO, M. G.; FERREIRA, M. J. R.; MOE, K. S. Transorbital neuroendoscopic management of sinogenic complications involving the frontal sinus, orbit, and anterior cranial fossa. **J Neurol Surg B Skull Base**, v. 73, n. 6, p. 394-400, 2012.

LIMA-NETO, R. G.; BELTRÃO, E. I.; OLIVEIRA, P. C.; NEVES, R. P. Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. **Mycoses**, v. 54, p. 23-29, 2011.

LOCKHART, S. R. et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. **Clin. Infect. Dis.**, v. 64, p. 134–140, 2017.

LOCKHART, S. R.; IQBAL, N.; CLEVELAND, A. A.; FARLEY, M. M.; HARRISON, L. H.; BOLDEN, C. B.; BAUGHMAN, W.; STEIN, B.; HOLLIICK, R.; PARK, B. J. et al. Species identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* bloodstream isolates from population-based surveillance studies in two U.S. cities from 2008 to 2011. **J Clin Microbiol.**, v. 50, p. 3435-3442, 2012.

LOCKHART, S.R. et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. **Clin Infect Dis**, v.64, p.134–140, 2017.

MAGILL, S.S. et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. **N. Engl. J. Med**, v. 370, p. 1198–1208, 2014.

MARASINI, B.P.; BARAL, P.; ARYAL, P.; GHIMIRE, K.R.; NEUPANE, S.; DAHAL, N. et al. Evaluation of antibacterial activity of some traditionally used medicinal plants against human pathogenic bacteria. **BioMed Research International**, 2015.

MARCOS J.Y.; PINCUS D.H. Fungal Diagnostics: Review of Commercially Available Methods. In: O'Connor L., Glynn B. (eds) **Fungal Diagnostics**. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 968. Humana Press, Totowa, NJ p. 25-54, 2013.

MAUBON, D.; GARNAUD, C.; CALANDRA, T.; SANGLARD, D.; CORNET, M. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? **Intensive Care Medicine**, v. 40, n. 9, p. 1241-1255, 2014.

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

MAZZANTI, G.; BATTINELLI, L.; SALVATORE, G. Antimicrobial properties of the linalol-rich essential oil of *Hyssopus officinalis* L. var *decumbens* (Lamiaceae). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, p. 289-294, 1998.

MCCARTY, T.P.; PAPPAS, P.G. Invasive candidiasis. **J. Infect. Dis. Clin. North Am**, v.30, p.103–124, 2016.

MELETIADIS, J.; CURFS-BREUKER, I.; MEIS, J.F.; MOUTON, J.W. *In vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida* isolates with the EUCAST methodology, a new method for ECOFF determination. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61:e02372-16, 2017.

MÉNDEZ-TOVAR, L. J.; RODRIGUEZ-SÁNCHEZ, J. F.; MANZANO- GAYOSSO, P.; HERNANDEZ-HERNÁNDEZ, F.; BLANCAS-VALÊNCIA, J. M.; SILVA-GONZÁLEZ. Candidíase esofágica em pacientes de um hospital especializado. **Rev Med Inst. Mex Seguro Soc**, v. 57, n.2, p. 74-81, 2019.

MENEZES, V.M., FARIAS-VALE, I.N., MONTEIRO, S.G., GONÇALVES, L.H.B., FIGUEIREDO, P.M.S., MONTEIRO, C.A. Classificação da capacidade de adesão de isolados clínicos de *Candida* spp em padrões de arranjos celulares distintos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, n. 3, p. 289-300, 2013.

MESA-ARANGO, A.C.; FORASTIERO, A.; BERNAL-MARTÍNEZ, L.; CUENCA-ESTRELLA, M.; MELLADO, E.; ZARAGOZA, O. The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. **Med Mycol**, v. 51, p. 461-72, 2013.

MODRZEWSKA, B.; KURNATOWSKI, P.; MODREZEWKA, B.; KURNATOWSKI, P. Adherence of *Candida* sp. to host tissues and cells as one of its pathogenicity features. **Annals of Parasitology**, v. 61, n. 1, p.3–9, 2015.

MOHAMMADI R, FOROUGHIFAR E,. *Candida* infections among neutropenic patients. **Caspian Journal of Internal Medicine**, v. 7, n. 2, p. 71-77, 2016.

NEMETH, T.; TOTH, A.; SZENZENSTEIN, J.; HORVATH, P.; NOSANCHUK, J.D.; GROZER, Z.; TOTH, R.; PAPP, C.; HAMARI, Z.; VAGVOLGYI, C.; GACSER, A. Characterization of virulence properties in the *C. parapsilosis sensu lato* species. **PLoS One**, 8:e68704, 2013.

NETEA, M.G.; JOOSTEN, L.A.; VAN DER MEER, J.W.; KULLBERG, B.J.; VAN DE VEERDONK, F.L. Immune defence against *Candida* fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v.15, p. 630–642, 2015.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; ALVARADO-MATUTE, T.; TIRABOSCHI, I. N.; CORTES, J.; ZURITA, J.; GUZMAN-BLANCO, M.; SANTOLAVA, M. E.; THOMPSON, L.; SIFUENTES-OSORNIO, J. et al. Latin American Invasive Mycosis Network. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. **PLoS One**, v. 8, e59373, 2013.

NUNEZ-BELTRAN, A.; LOPEZ-ROMERO, E.; CUELLAR-CRUZ, M. Identification of proteins involved in the adhesion of *Candida* species to diferente medical devices. **Microb Pathog**, v. 107, n. 293–303, 2017.

PAM, V. K.; AKPAN, J. U.; ODUYEBO, O. O.; NWAOKORIE, F. O.; FOWORA, M. A.; OLADELE, R. O.; OGUNSOLA, F. T.; SMITH, S. I. Flucanazole susceptibility and ERG11 gene expression in vaginal *Candida* species isolated from lagos Nigeria. **Journal of Molecular Epidemiology and Genetics**, v. 3, n. 1, p. 84-90, 2012.

PAMMI, M.; HOLLAND, L.; BUTLER, G.; GACSER, A.; BLISS, J.M. *Candida parapsilosis* is a Significant Neonatal Pathogen: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Pediatr Infect Dis J**, 2013 v. 32, n.5, e206–e216, 2013.

PANAGODA, G.J.; ELLEPOLA, A.N.; SAMARANAYAKE, L.P. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. **Mycoses**, v. 44, p. 29 –35, 2001.

PAPPAS, P.G.; ALEXANDER, B.D.; ANDES, D.R.; HADLEY, S.; KAUFFMAN, C.A.; FREIFELD, A. Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). **Clin Infect Dis**, v. 50, n. 8, p. 1101-11, 2010.

PAPPAS, P.G.; KAUFFMAN, C.A.; ANDES, D.R.; CLANCY, C.J.; MARR, K.A.; et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v. 62, p. 1–50, 2016.

PAPPAS, P.G.; LIONAKIS, M.S.; ARENDRUP, M.C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; KULLBERG, B.J. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 18026, 2018.

PARAMYTHIOTOU, E.; FRANTZESKAKI, F.; FLEVARI, A.; ARMAGANIDIS, A.; DIMOPOULOS, G. Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat. **Molecules**, v.19, p.1085–1119, 2014.

PATIL, S.; RAO, R.S.; MAJUMDAR, B.; ANIL, S. Clinical appearance of oral *Candida* infection and therapeutic strategies. **Front Microbiol.**, v. 6, p. 1-10, 2016.

PFALLER, M. A.; RHOMBERG, P. R.; MESSER, S. A.; JONES, R. N.; CASTANHEIRA, M. Isavuconazole, micafungin, and 8 comparator antifungal agents' susceptibility profiles for common and uncommon opportunistic fungi collected in 2013: temporal analysis of antifungal drug resistance using CLSI species-specific clinical breakpoints and proposed epidemiological cutoff values. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 82, n. 4: p. 303-13, 2015.

PFALLER, M.A.; CASTANHEIRA, M.; MESSER S.A.; MOET, G.J.; JONES, R.N. Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, n. 3, p. 278–283, 2010.

PFEIFFER, C.D.; GARCIA-EFFRON, G.; ZAAS, A.K.; PERFECT, J.R.; PERLIN, D.S.; ALEXANDER, B.D. Breakthrough invasive candidiasis in patients on micafungin. **J Clin Microbiol**, v. 48, p. 2373–2380, 2011.

PRATES, H.T.; SANTOS, J.P. Óleos essenciais no controle de pragas de grãos armazenados. 443-461. IN: Lorini I, Miike LH, Senssel VM (ed.), **Armazenagem de grãos**. Campinas: Instituto Bio Geneziz, 1000, 2002.

PUTUGNANI, L.; DEL, F.; CHIERICO, M.; ONORI, L.; MANCINELLI, M.; ARGENTIERI, P.; BERNASCHI, L.; COLTELLA, B.; LUCIGNANO, L.; PANSANI, S.; RANNO, C.; RUSSO, A.; URBANI, G.; FEDERICI, D. MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi. **Mol. BioSyst**, v. 7, p. 620-629, 2011.

REBOLI, A.C.; ROTSTEIN, C.; PAPPAS, P.G.; CHAPMAN, S.W.; KETT, D.H.; KUMAR, D. et al. Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis. **N Engl J Med**, v. 356, n. 24, p. 2472-82, 2007.

REVIE, N.M.; RIYER, K.; ROBBINS, N.; COWEN, L.E. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Current Opinion in Microbiology**, v. 45, p. 70-76, 2018.

ROBBINS, N.; CAPLAN, T.; COWEN, L.E. Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. **Annual Review of Microbiology**, v.71, p. 753-775, 2017.

ROMEO, G. P.; DAVIES, S.; COSTELLO, B. J. A method for direct fabrication of a lingual splint for management of pediatric mandibular fractures. **Plast Reconstr Surg Glob Open**, v. 7, n. 1, p. 51, 2013.

ROSA, M.S.S.; MENDONÇA-FILHO, R.R.; BIZZO, H.R.; SOARES, R.M.A.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C.S. et al. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, p. 1895-1901, 2003.

SARDI JC, SCORZONI L, BERNARDI T, FUSCO-ALMEIDA AM, MENDES GIANNINI MJ. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **J Med Microbiol**, v. 62, p. 10-24. 2013.

SCHELENZ, S.; OWENS, K.; GUY, R.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; MANUEL, R.J.; RICHARDSON, M.; MOORE, C.; ENOCH, D.A. et al. English Surveillance Programme for Antimicrobial Utilisation and Resistance (ESPAUR). National mycology laboratory diagnostic capacity for invasive fungal diseases in 2017: Evidence of sub-optimal practice. **Journal of Infection**, v. 79, p. 167–173, 2019.

SHU-SHENG, J.; GUANG-PENG, X.; ZHANG, M.;YAN-BO C.; LEI, B, XIN-SHU, D.; YAN-MEI, Y. Induction of apoptosis by D-limonene is mediated by inactivation of Akt in LS174T human colon cancer cells. **Oncology Reports**, v. 29, p. 349-354, 2013.

SILVA, C.M.; PARAHYM, A. M. R. C.; MACEDO, D. P. C.; LIMA-NETO, R. G.; FRANCISCO, E. C.; MELO, A. S. A.; SILVA, M. C. M.; JUCÁ, M.B.; MELO, L. R. B.; AMORIM, R.; NEVES, R. P. Neonatal Candidemia Caused by *Candida haemulonii*: Case Report and Review of Literature. **Mycopathologia**, v. 179, p. 1-5, 2015.

SILVA, E. et al. Prevalência e desfechos clínicos de infecções em UTIs brasileiras: subanálise do estudo EPIC II. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 24, n. 2, 2012.

SILVA, F. D. et al. Effects of microplusin, a copper- chelating antimicrobial peptide, against *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Microbiol let**, v. 324, n. 1, p. 64-72, 2011.

SILVA-DIAS, A.; MIRANDA, I.M.; BRANCO, J.; MONTEIRO-SOARES, M.; PINA-VAZ C, RODRIGUES, A.G. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. **Front Microbiol**, v.6, p. 205, 2015.

SLAVIN, M.A.; SORRELL, T.C.; MARRIOTT, D.; THURSKY, K.A.; NGUYEN, Q.; ELLIS, D.H. Candidaemia in adult cancer patients: risks for fluconazole-resistant isolates and death. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n.5, p. 1042–51, 2010.

STEFANIUK, E.; BARANIAK, A.; FORTUNA, M.; HRYNIEWICZ, W. Usefulness of CHROMagar *Candida* Medium, Biochemical Methods – API ID32C and VITEK 2 Compact and Two MALDI-TOF MS Systems for *Candida* spp. Identification. **Polish Journal of Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 111–114, 2016.

SUDBERY, P. E. Growth of *Candida albicans* hyphae, **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 9, p. 737–748, 2011.

SUN, J. D-Limonene: Safety and clinical applications. **Alternative Medicine Review**, v. 12 n. 3, p. 259–264, 2007.

SUTCU, M., SALMAN, N., AKTURK, H., DALGIC, N., TUREL, O., KUZDAN, C., KADAYIFCI, E. K., SENER, D., KARBUZ, A., ERTURAN, Z., SOMER, A. Epidemiologic and microbiologic evaluation of nosocomial infections associated with *Candida* spp in children: A multicenter study from Istanbul, Turkey. **American Journal of Infection Control**, v. 44, p. 1139-1143, 2016.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N. A.; MAIDEN, M. C.; ODDS, F. C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **J Clin Microbiol.**, v. 43, n. 1, p. 284-292, 2005.

TAVANTI, A.; HENSGENS, L. A.; MOGAVERO, S.; MAJOROS, L.; SENESI, S.; CAMPA, M. Genotypic and phenotypic properties of *Candida parapsilosis sensu strictu* [sic] strains isolated from different geographic regions and body sites. **BMC Microbiol.**, v. 10, p. 203, 2010.

THAKRE, A.; ZORE, G.; KODGIRE, S.; KAZI, S.; MULANGE, S.; PATIL, R. et al. Limonene inhibits *Candida albicans* growth by inducing apoptosis. **Medical Mycology**, v. 56, p. 565–578, 2018.

TING, J.; ROBERTS, A.; SYNNESE, A.; CANNING, R.; BODANI, J.; MONTEROSSA, L.; SHAH, P.S. Invasive fungal infections in neonates in Canada: epidemiology and outcomes. **Pediatr Infect Dis J**, v. 37, p. 1154–1159, 2018.

TIRAPELLI, C.R.; AMBROSIO, S.R. et al. Diterpenes: A therapeutic promise for cardiovascular diseases. **Recent patents on cardiovascular drug discovery**, v.3, p.1-8, 2008.

TÓTH, R.; NOSEK, J.; MORA-MONTES, H.M.; GABALDON, T.; BLISS, J.M.; NOSANCHUK, J.D. *Candida parapsilosis*: from Genes to the Bedside. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32: e00111-18, 2019.

TOTH, R.; TOTH, A.; PAPP, C.; JANKOVICS, F.; VAGVOLGYI, C.; ALONSO, M.F.; BAIN, J.M.; ERWIG, L.P.; GACSER, A. Kinetic studies of *Candida parapsilosis* phagocytosis by macrophages and detection of intracellular survival mechanisms. **Front Microbiol**, v. 5, p. 633, 2014.

TREVIJANO-CONTADOR, N.; RUEDA, C.; ZARAGOZA, O. Fungal morphogenetic changes inside the mammalian host. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 57, p. 100–109, 2016.

TREVINO-RANGEL, R.D.E.J.; RODRIGUEZ-SANCHEZ, I.P.; ELIZONDO-ZERTUCHE, M.; MARTINEZ-FIERRO, M.L.; GARZA-VELOZ, I.; ROMERO-DIAZ, V.J.; GONZALEZ, J.G.; GONZALEZ, G.M. Evaluation of in vivo pathogenicity of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* with diferente enzymatic profiles in a murine model of disseminated candidiasis. **Med Mycol**, v. 52, p. 240-5, 2014.

TROUVÉ, C.; BLOT, S.; HAYETTE M.P.; JONCKHEERE, S.; PATTEET, S.; RODRIGUEZ-VILLALOBOS, H.; SYMOENS, F.; WIJNGAERDEN, E.V.; LAGROU, K. Epidemiology and reporting of candidaemia in Belgium: a multi-centre study. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 36, n. 4, p. 649-655, 2017.

UEDO, N.; TATSUTA, M.; IISHI, H. Inhibition by D-limonene of gastric carcinogenesis induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Wistar rats. **Cancer Lett**, v.137, p. 131-136, 1999.

VAEZIA, A.; FAKHIMCD, J. H.; JAVIDNIAAB, S.; KHODAVAISSY, Z.; ABTAHIANF, M.; VOJODIAB, F.; NOURBAKHSHA, H. Pesticide behavior in paddy fields and development of azole-resistant *Aspergillus fumigatus*: Should we be concerned? **Journal de Mycologie Médicale**, v. 28, n. 1, p. 59-64, 2018.

VAZQUEZ, J. et al. Evaluation of an early step-down strategy from intravenous anidulafungin to oral azole therapy for the treatment of candidemia and other forms of invasive candidiasis: results from an open-label trial. **BMC Infect. Dis.**, v. 14, p. 97, 2014.

VEEN, Q.; CLAAS, E.C.; KUIJPER, E.J. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. **J Clin Microbiol**, v. 48, p. 900-907, 2010.

VERSTREPEN, K.J.; KLIS, F.M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 5 – 15, 2006.

VIEIRA, F.; NASCIMENTO, T. Resistência a Fármacos Antifúngicos por *Candida* e Abordagem Terapêutica *Candida* Antifungal Resistance and Therapeutic Approach. **Rey Port Farmacoter**, v. 9, p. 161-168, 2017.

VINCENT, B.M.; LANCASTER, A.K.; SCHERZ-SHOUVAL, R.; WHITESELL, L.; LINDQUIST, S. As compensações por condicionamento físico restringem a evolução da resistência à anfotericina B. **PLoS Biol**, v.11, p. e1001692, 2013.

VIRIATO A. Terpenoides com atividade antifúngica para *Candida Berkhout*, causadoras de infecções hospitalares. **Revista O Mundo da Saúde**, v. 38, n.1, p. 40-50, 2014.

VON LILIENFELD-TOAL, M.; WAGENER, J.; EINSELE, H.; CORNELLY, O. A.; KURZAI, O. Infecção Fúngica Invasiva. **Dtsch Arztebl Int**, v. 116, n. 16, p. 271-278, 2019.

WEBER, L.D.; PINTO, F.G.S.; SCUR, M.C.; SOUZA, J.G.L.; COSTA, W.F.; LEITE, C.W. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and various plant extracts from *Prunus myrtifolia*. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, p. 846-853, 2014.

WHALEY, S.G.; BERKOW, E.L. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans Candida* Species. **Front. Microbiol**, 2017.

WILLIAMS, D.W.; JORDAN, R.P.C., XIAO-QING W.; ALVES, C.T.; WISE, M.P.; WILSON, M.J.; LEWIS, M.A.O. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. **Journal of Oral Microbiology**, v.5, n.1, 2013.

XIAO, L.J.; ALSPAUGH, A.; LIU, H.; HARRIS, S. Fungal Morphogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v.5, a019679, 2015.

YANG, W.; YAN, L.; WU, C.; ZHAO, X.; TANG, J. Fungal invasion of epithelial cells. **Microbiol. Res**, v.169, p. 803–810, 2014.

ZHANG, L.; XIAO, M.; WATTS, M.R.; WANG, H.; FAN, X.; KONG, F.; XU, Y.C. Development of fluconazole resistance in a series of *Candida parapsilosis* isolates from a persistent candidemia patient with prolonged antifungal therapy. **BMC Infect Dis**, v.15, p. 340, 2015.

ZICCARDI, M.; SOUZA, L.O.; GANDRA, R.M.; GALDINO, A.C.; BAPTISTA, A.R.; NUNES, A.P.; RIBEIRO, M.A.; BRANQUINHA, M.H.; SANTOS, A.L. *Candida parapsilosis* (*sensu lato*) isolated from hospitals located in the southeast of Brazil: species distribution, antifungal susceptibility and virulence attributes. **Int J Med Microbiol**, v. 305, p. 848–859, 2015.

APENDICE A – LARGE AORTIC PROTESIS VEGETATION DUE TO *Candida parapsilosis*: NA UNCOMMON PRESENTATION

Mycopathologia
https://doi.org/10.1007/s11046-019-00401-3



MYCOPATHOLOGIAIMAGE

Large Aortic Prosthesis Fungal Vegetation Due to *Candida parapsilosis*: An Uncommon Presentation

Received: 12 September 2019 / Accepted: 16 October 2019
© Springer Nature B.V. 2019

Endocarditis is a severe infectious disease with a high mortality rate. Cases arising from *Candida* are an uncommon presentation that represents only 1 to 2% of all episodes of infective endocarditis, with *C. albicans* being the most reported. Fungal endocarditis is also associated with *C. parapsilosis*, an infectious agent associated with vascular devices due to ability to form biofilm in medical devices. Here, we report an uncommon case of a 64-year-old woman diagnosed with large fungal vegetation formed by *C. parapsilosis* in her aortic prosthesis. A patient with a bioprosthetic aortic valve implanted 9 and a half years prior, with a previous history of cervical cancer and who was discharged 2 years ago after concluding the last cycle of radio therapy, sought a hospital service with complaints of progressive dyspnea, orthopnea, and paroxysmal nocturnal dyspnea with necessary hospitalization. An echocardiogram was initially performed showing aortic prosthesis dysfunction due to signs of leaflet rupture and mitral regurgitation. The patient presented with fever spikes, following which antimicrobial therapy with meropenem (1000 mg every 8 h for 7 days) associated with fluconazole (400 mg/day for 7 days) was started. On hospitalization day 15, a transesophageal echocardiogram was performed revealing biological prosthesis dysfunction with signs of leaflet rupture, transprosthetic regurgitation and a suggestive presence of vegetation. Thereafter,

antifungal therapy was immediately changed to amphotericin B (20 mg day) and a valve replacement was required. However, no clinical improvements occurred following 14 days and another transesophageal echocardiogram was performed, showing a large mobile mass (2.11 cm by 1.61 cm in size) localized on the aortic valve, characteristic of fungal vegetation (Fig. 1A, B). After this discovery, the patient underwent aortic valve replacement being maintained on amphotericin B treatment. During the surgical procedure, an abscess between the commissural posts and large fungal vegetation attached to the aortic prosthesis were seen. To investigate the fungal agent involved in the formation of the fungal vegetation, a prosthetic valve sample (Fig. 1C) was submitted to laboratory tests, which included direct microscopic examination in KOH (20%) and Sabouraud Dextrose Agar culture. Direct microscopic examination of the tissue showed numerous hyaline yeast cells (Fig. 1D). After 7 days of incubation at 37 °C, white and creamy yeast colonies grew. The isolates were identified as *C. parapsilosis* by LSU, 26 rDNA D1/D2 domain sequencing and the newly generated sequence was deposited in GenBank under the accession number MH744739, with a sample being deposited in the Cultures Collection Micoteca URM (URM8012). After surgery, the clinical condition of the patient deteriorated rapidly, and due to the

ANEXO A - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO À REVISTA DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASE

05/02/2020

Gmail - Track your co-authored submission to Diagnostic Microbiology & Infectious Disease



Melyna Chaves <melynaleite@gmail.com>

Track your co-authored submission to Diagnostic Microbiology & Infectious Disease

1 mensagem

Diagnostic Microbiology & Infectious Disease <EviseSupport@elsevier.com>
Responder a: EviseSupport@elsevier.com
Para: melynaleite@gmail.com

5 de fevereiro de 2020 21:12

Dear Mrs Chaves Leite de Andrade,

Submission no: DMID_2020_113

Submission title: CANDIDEMIA IN NEOPLASTIC PATIENTS: A SERIES OF CASES

Corresponding author: Dr Rejane Neves

Listed co-author(s): Mrs Melyna Chaves Leite de Andrade, Mr Franz de Assis Santos, Mr Michellangelo Nunes, Miss Eduarda Mello, Dr Luiz Nascimento de Araújo-Neto, Dr Maria Amália Vasconcelos

Dr Neves has submitted a manuscript to Diagnostic Microbiology & Infectious Disease and listed you as a co-author. This email is to let you know we will be in contact with updates at each decision stage of the submission process.

The link below takes you to a webpage where you can sign in to our submission system using your existing Elsevier profile credentials or register to create a new profile. You will then have the opportunity to tailor these updates and view reviewer and editor comments once they become available.

http://www.evise.com/profile/api/navigate/DMID?resourceUrl=%2Fco-author%2F%3Fdgcid%3Dinvite_email_coauthoroutreach07328893%23%2FDMID%2Fsubmission%2FDMID_2020_113

If you are not a co-author of this manuscript, please contact Researcher Support at: <https://service.elsevier.com>

Thank you very much for your submission and we will be in touch as soon as we have any news to share.

Diagnostic Microbiology & Infectious Disease

If you do not wish to receive further update emails on your co-authored submission, you can unsubscribe via this link:

http://www.evise.com/co-author/#/DMID/unsubscribe/melynaleite@gmail.com/b1gGc0tBMQx8qUKYBAhXlhy-I8JulraYQYNR92xDXsOaKrc8Rh27JBDsvi-13GpaAQsrYGGsD_Qr8vzBkaDeJA

ANEXO B - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO À REVISTA FOOD CHEMISTRY

14/01/2020

Yahoo Mail - A manuscript number has been assigned: FOODCHEM-D-20-00146

A manuscript number has been assigned: FOODCHEM-D-20-00146

De: Food Chemistry (eesserver@eesmail.elsevier.com)

Para: rejadel@yahoo.com.br

Data: quinta-feira, 9 de janeiro de 2020 10:24 BRT

*** Automated email sent by the system ***

Ms. Ref. No.: FOODCHEM-D-20-00146

Title: D-LIMONENE MECHANISM OF ACTION AND ANTIVIRULENCE POTENTIAL AGAINST CLINICAL YEASTS FROM THE *Candida parapsilosis* COMPLEX
Food Chemistry

Dear Rejane,

Your submission entitled "D-LIMONENE MECHANISM OF ACTION AND ANTIVIRULENCE POTENTIAL AGAINST CLINICAL YEASTS FROM THE *Candida parapsilosis* COMPLEX" has been assigned the following manuscript number: FOODCHEM-D-20-00146.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <https://ees.elsevier.com/foodchem/>.

Your username is: rejadel@yahoo.com.br

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/foodchem/automail_query.asp.

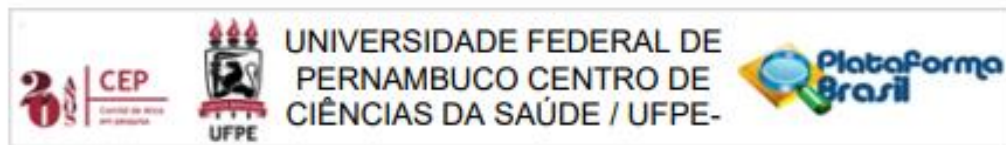
Thank you for submitting your work to this journal.

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Kind regards,

Food Chemistry

ANEXO C – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Leveduras clínicas do complexo *Candida parapsilosis*: virulência e controle por ação de microplusina como bloqueador da morfogênese, aderência e crescimento

Pesquisador: MELYNIA CHAVES LEITE DE ANDRADE

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 88376918.0.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.695.555

Apresentação do Projeto:

Projeto de Pesquisa de Doutorado apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Objetivo da Pesquisa:

Estudar a virulência de leveduras clínicas de candidíase invasiva (*Candida parapsilosis*) de pacientes oncológicos e testar efeito de um peptídeo microbiano

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos referentes aos documentos poderá ocorrer quebra de sigilo ou extravio do material. Constrangimento no momento entrevista. Para minimizar este risco a abordagem inicial será realizada pela equipe de psicologia da unidade de terapia intensiva.

Benefícios: fornecer ao paciente laudo sobre presença de tipos específicos de leveduras; possivelmente fornecer novo antimicrobiano eficiente; divulgar entre a equipe de saúde conhecimentos específicos sobre candidíase;

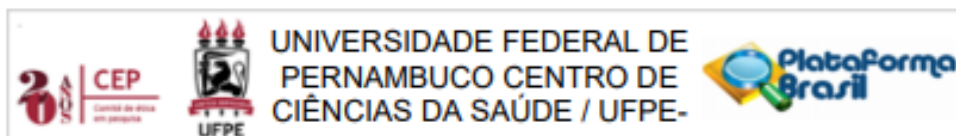
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto viável e dentro do que se recomenda sobre abordagem ética na pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos presentes

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.695.555

Recomendações:

não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

não há

Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio da Notificação com o Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética, relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

O CEP/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1006379.pdf	25/04/2018 10:46:58		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	Projeto.pdf	24/04/2018 20:29:36	MELYNA CHAVES LEITE DE ANDRADE	Aceito

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br