



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

CIBELE QUEIROZ

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ALTERAÇÕES MORFOESTRUTURAIS DE
DERIVADOS DE TIOFENO FRENTE A ISOLADOS DE *Candida***

**Recife
2023**

CIBELE QUEIROZ

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ALTERAÇÕES MORFOESTRUTURAIS DE
DERIVADOS DE TIOFENO FRENTE A ISOLADOS DE *Candida***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia de Fungos. Área de concentração: Micologia Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Rejane Pereira Neves (UFPE)

Coorientador: Dr. Cícero Pinheiro Inácio (UFPE)

Recife
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Queiroz, Cibele

Atividade antifúngica e alterações morfoestruturais de derivados de tiofeno frente a isolados de *Candida* / Cibele Queiroz– 2023.

57 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Rejane Pereira Neves
Coorientador: Cícero Pinheiro Inácio

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Recife, 2023.

Inclui referências e apêndice.

1. Infecções nosocomiais 2. *Candida* 3. Tiofenos I. Neves, Rejane Pereira (orient.) II. Inácio, Cícero Pinheiro (coorient.) III. Título

617.22

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023 -174

CIBELE QUEIROZ

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ALTERAÇÕES
MORFOESTRUTURAIS DE DERIVADOS DE TIOFENO FRENTE A
ISOLADOS DE *Candida***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 28 / 02 / 2023.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof.^a Dr.^a Maria Daniela Silva Buonafina Paz (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Oliane Maria Correia Magalhães (Examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco

A minha amada mãe.

AGRADECIMENTOS

Sou profundamente agradecida ao bondoso Deus por me permitir viver essa experiência, preenchendo a minha existência com infinita luz divina; agradeço a todas as consciências superiores, que nos protegem e orientam para o esclarecimento e expansão consciencial - dando força e sabedoria durante toda esta caminhada. Aos meus avós (*in memoriam*), que com amor, dedicaram suas vidas à família e a sociedade.

Agradeço à Universidade Federal de Pernambuco.

Ao Instituto Keizo Asami (iLIKA/UFPE).

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa de mestrado nº 131908/2020-0.

A Professora Dra. Rejane Pereira Neves, pela oportunidade deste aprendizado único, que agregou crescimento pessoal e profissional durante esse curto período de mestrado. Agradeço a confiança plena que depositou em mim e no meu trabalho.

Ao Dr. Cícero Pinheiro Inácio pelo convívio amistoso e pacífico durante esse período, e pelo apoio recebido.

Ao professor Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior, da Universidade Federal da Paraíba, por fornecer os compostos de tiofeno para a realização dos testes.

Aos professores Dr. Fábio André Brayner e Dr. Luis Carlos Alves, responsáveis pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do Instituto Keizo Asami (iLIKA/UFPE), e especialmente aos técnicos Gabriel Gazzoni Araújo Gonçalves e Rafael José Ribeiro Padilha pela ajuda na realização do ensaio de microscopia com tanta disponibilidade e dedicação.

Aos membros da minha banca examinadora: Dra. Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo, Dra. Maria Daniela Silva Buonafina Paz, Dra. Oliane Maria Correia Magalhães e Dra. Melyna Chaves Leite pela disposição em participar, contribuindo para o aperfeiçoamento desta pesquisa.

Ao professor do Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos, o Dr. Armando Marsden Lacerda Filho, pela disposição em ensinar um pouco do fascinante universo da micologia.

Aos meus colegas de laboratório, que em muitos momentos, foram meus companheiros durante toda essa jornada, em especial a Pós-Doc Daniela Buonafina pela ajuda com a técnica de sensibilidade antifúngica, e aos graduandos que frequentemente se ofereciam a observar meus experimentos sempre que possível;

Aos técnicos Raquel, Débora e Léo, pela cumplicidade e auxílio, facilitando os caminhos dos docentes da pós. Só tenho que agradecer! Foi um prazer conhecê-los. Sentirei saudades.

A Tiago, que me proporcionou o suporte emocional que a minha necessidade afetiva precisava.

Aos meus alegres e carinhosos *pets* (e por que não os agradecer? São antiestressantes melhores que Rivotril!).

A todos os meus amigos que a vida me presenteou, que me aconselham e vibram para o meu crescimento. Obrigada por sempre estarem ao meu lado e me apoiar em todas as decisões. Nosso amor é além dessa vida!

Aos meus colegas da pós, agradeço o convívio e as colaborações mútuas durante as aulas.

Aos professores do programa, ao qual me atenderam e me deram suporte quando necessário, e ao programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos.

“Para começar a estudar é preciso, de início, capinar. Capinar, capinar, capinar... Intensamente. Somente, após longo trabalho de capinação é que você poderá trocar o ancinho por um longo pente, e passá-lo sedosamente nos cabelos de uma mulher.”

Nise da Silveira (1905-1999), cientista alagoana.

RESUMO

O crescente aumento da taxa de infecções fúngicas hospitalares têm levantado um alerta à comunidade científica. Devido à gravidade do assunto, a OMS emitiu um relatório listando os patógenos prioritários para infecções fúngicas de importância à saúde pública, e pede por ações de fomento à pesquisa e desenvolvimento da promoção de medidas de combate, bem como na busca de novas drogas promissoras para o tratamento de infecções fúngicas. O gênero *Candida* corresponde a cerca de 80% das infecções fúngicas documentadas, e as duas espécies de maior incidência são *C. albicans*, seguido de *C. tropicalis*. Este trabalho teve como compromisso, avaliar o perfil farmacológico e os danos ultraestruturais de novas moléculas derivadas de tiofeno frente a isolados clínicos de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, possibilitando uma nova abordagem de tratamento, bem como, auxiliará futuros trabalhos na área. Para a análise, os isolados foram inoculados em placas de petri, por 7 dias, para avaliar sua macro e micromorfologia. Bem como, foram submetidos a testes de susceptibilidade antifúngicas pelo método de microdiluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM); e microscopia eletrônica de transmissão (MET) para verificar prováveis aspectos da influência sobre as ultraestruturas celulares fúngicas provocados pelos derivados tiofênicos. Os compostos 6CN-ME, 6EST e 6EST-ACET apresentaram atividade antifúngicas com CIM de 8,4 a 400µg/mL para as espécies testadas. As análises ultraestruturais mostraram a incidência de alterações como invaginações na membrana plasmática, aparecimento de uma morfologia incomum na parede celular, entre outras. Finalmente, os resultados obtidos são úteis para o melhor entendimento do perfil de ação antifúngica desta classe de moléculas estudada, e podem auxiliar no desenvolvimento de novos tratamentos para essas infecções.

Palavras-chave: Infecções nosocomiais; Derivados tiofênicos; Ultraestrutura celular.

ABSTRACT

The increasing rate of nosocomial fungal infections has raised an alert to the scientific community. Due to the seriousness of the subject, the WHO issued a report listing the priority pathogens for fungal infections of public health importance, and calls for actions to encourage research and development to promote combat measures, as well as the search for new promising drugs to the treatment of fungal infections. The genus *Candida* corresponds to about 80% of documented fungal infections, and the two species with the highest incidence are *C. albicans*, followed by *C. tropicalis*. This work was committed to evaluate the pharmacological profile and ultrastructural damage of new thiophene-derived molecules against clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*, enabling a new treatment approach, as well as helping future work in the area. For the analysis, the isolates were inoculated in petri dishes, for 7 days, to evaluate their macro and micromorphology. As well as, they were submitted to antifungal susceptibility tests by the broth microdilution method to determine the Minimum Inhibitory Concentration; and transmission electron microscopy (TEM) to verify probable aspects of influence on fungal cell ultrastructures caused by thiophene derivatives. The compounds 6CN-ME, 6EST and 6EST-ACET showed antifungal activity with MIC from 8.4 to 400µg/mL for the tested species. The ultrastructural analyzes showed the incidence of alterations such as invaginations in the plasma membrane, appearance of an unusual morphology in the cell wall, among others. Finally, the results obtained are useful for a better understanding of the antifungal action profile of this class of molecules studied, and may help in the development of new treatments for these infections.

Keywords: Nosocomial infections; Thiophene derivatives; Cellular ultrastructure.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Mecanismo de ação dos agentes antifúngicos comerciais e seus alvos de atuação.	22
Figura 2 –	Estrutura química da molécula de tiofeno.	23
Figura 3 –	Estrutura química da molécula de 2-amino-tiofeno.	24
Figura 4 –	Preparação do inóculo de leveduras segundo a metodologia do CLSI.	29
Figura 5 –	Microscópio Eletrônico de Transmissão modelo Tecnai Spirit Biotwin G2 / Marca FEI.	31
Figura 6 –	Colônias de cepas de <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> isoladas de casos clínicos apresentando diferentes morfologias.	33
Figura 7 –	Morfotipos celulares de espécies de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida tropicalis</i> .	34
Figura 8 –	Células opacas coradas com azul de Amann	35
Gráfico 1 –	Média geométrica dos resultados das CIMs dos derivados de tiofeno testados, e análise da variância.	36
Figura 9 –	Micrografia das leveduras controle de <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> sem alterações ultra estruturais, apresentando sua integridade de parede e membrana celular, além da preservação de sua área citoplasmática	37
Figura 10 –	Micrografia das leveduras de <i>C. albicans</i> (A-C) e <i>C. tropicalis</i> (D-E) quando submetidas ao composto 6EST. (A-B) <i>C. albicans</i> apresentou invaginações na membrana plasmática, aparecimento de uma morfologia incomum na parede celular e na membrana nuclear, desorganização e formação de vacúolos do conteúdo citoplasmático. (D-E) <i>C. tropicalis</i> exibiu invaginações na membrana plasmática.	38
Figura 11 –	Micrografia das leveduras de <i>C. tropicalis</i> quando submetida ao composto 6CN-Me mostrando graves deformações, onde descaracteriza sua forma celular normal.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Relação de isolados oriundos de casos clínicos de <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> .	27
Tabela 2 –	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL dos derivados de tiofeno e Fluconazol (FLU), frente aos Isolados de <i>C. albicans</i> e <i>C. tropicalis</i> .	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC®	Marca registrada da <i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FLU	Fluconazol
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MOPS	Ácido 3-[N-Morfolino] propanosulfônico
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Meio de cultura em cultivo celular)
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1	INFECÇÕES FÚNGICAS HOSPITALARES CAUSADAS PELO GÊNERO <i>CANDIDA</i>	17
2.1.1	<i>Candida albicans</i>	19
2.1.2	<i>Candida tropicalis</i>	20
2.2	TRATABILIDADE COMERCIAL E PROBLEMAS EXISTENTES NOS TRATAMENTOS CONVENCIONAIS	21
2.3	DERIVADOS TIOFÊNICOS, E O 2-AMINO-TIOFENO	23
3	OBJETIVOS	26
3.1	OBJETIVO GERAL	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	DELINEAMENTO DA PESQUISA	26
4.2	LOCAL DA PESQUISA	26
4.3	TRIAGEM E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS	27
4.4	REVISÃO DAS CARACTERÍSTICAS MACRO E MICROMORFOLÓGICAS	27

4.5	AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DOS ISOLADOS FRENTE A DERIVADOS DE TIOFENO	28
4.6	ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ESTRUTURAIS	30
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1	REVISÃO DAS CARACTERÍSTICAS MACROMORFOLÓGICAS	32
5.2	REVISÃO DAS CARACTERÍSTICAS MICROMORFOLÓGICAS	33
5.3	TESTE DE SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i>	35
5.4	ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ESTRUTURAIS	37
6	CONCLUSÃO	42
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	42
	REFERÊNCIAS	43
	APÊNDICE	56

1. INTRODUÇÃO

O crescente aumento das infecções fúngicas hospitalares, principalmente entre grupos de pacientes críticos que necessitam de internação prolongada, tem preocupado a comunidade médica mundial (Kontoyiannis; Wessel; Bodey, 2021; Verma; Prasad, 2022), e apesar dos avanços nas ferramentas de cuidados à saúde, tais infecções fúngicas podem acarretar à hospitalizações prolongadas, numa média de 16 dias, com taxa de mortalidade em torno de 28,8% ao ano (Webb *et al.*, 2018).

Dentre infecções fúngicas invasivas sistêmicas em humanos, há uma prevalência do gênero *Candida* em número de incidências, sendo responsável por uma média de 80-95% dos casos reportados (Banerjee *et al.*, 1991; Jain *et al.*, 2021), e é considerada uma das principais causas de sepse em pacientes hospitalizados. O diagnóstico preciso da candidemia é fundamental para a escolha do tratamento apropriado, bem como para prevenir a disseminação da infecção (Sanguinetti *et al.*, 2021). *Candida albicans*, que embora seja um microrganismo da microbiota humana, é o agente etiológico de maior ocorrência, apresentando uma taxa em torno de 60% dos isolados clínicos (Mora Carpio, Climaco, 2019). A segunda espécie a apresentar maior ocorrência é *Candida tropicalis*, que possui maior semelhança genética com *C. albicans* do que as outras espécies de *Candida* de interesse médico (Butler *et al.*, 2009; Zuza-Alves, Silva-Rocha e Chaves, 2017).

A epidemiologia da candidemia tem sido extensivamente estudada em todo o mundo para melhor compreender os fatores de risco, incidência e resultados associados a esta infecção. O tratamento da candidemia pode ser desafiador devido a vários fatores, como Resistência antifúngica, difícil identificação das espécies, atraso no diagnóstico, falta de terapias eficazes em casos de infecções refratárias, Toxicidade, entre outros (Poulakou, Bassetti, 2021; Badiee, Kordbacheh, 2021).

A tratabilidade de tais quadros de candidemia fundamenta-se em três pilares fundamentais: o estado de saúde clínico do paciente, a espécie de *Candida* isolada, e seu perfil de sensibilidade aos antifúngicos (BRASIL. Ministério da Saúde, 2021). As classes principais de medicamentos antifúngicos mais utilizados para o tratamento da candidíase invasiva são os azólicos, como o fluconazol e voriconazol, que atuam na inibição seletiva da atividade da lanosterol desmetilase, responsável pela síntese de ergosterol, e por conseguinte, facilitando uma ruptura da membrana fúngica; as equinocandinas, como caspofungina, micafungina e anidulafungina, que agem inibindo a síntese de β -glucano na parede celular do fungo por meio

da inibição da enzima 1, 3-beta-glucano sintase; e os poliênicos, como a anfotericina B e nistatina, que atuam se ligando aos esteróis na membrana celular do fungo, formando poros que desestabilizam a estrutura da membrana, levando à perda dos componentes celulares e consequentemente, à morte celular (Bassetti *et al.*, 2019).

Destes agentes antifúngicos, os azóis são a classe de medicamentos de recomendação inicial, por possuírem excelentes perfis de segurança, não apresentando citotoxicidade, e são biodisponíveis por via oral; entretanto, um fator limitante do uso deste composto é a existência de cepas de *Candida* resistentes aos derivados azólicos, como constatado por Xisto e colaboradores (2017), em que foi observada essa resistência em torno de 27% de todos os isolados. Com base neste e em outros dados publicados, bem como nas dificuldades reais no manejo terapêutico, pacientes com infecções por *Candida* refratárias aos fármacos comerciais disponíveis representam um problema relevante (Lupetti, 2002; Johnson *et al.*, 2008; Tarang *et al.*, 2020).

Diante deste contexto, na busca de uma droga promissora como adjuvante para o tratamento de infecções fúngicas, o tiofeno, uma molécula bioativa presente de variados compostos ativos com aplicações consideráveis no campo da química medicinal, tem atraído grande interesse na indústria da saúde e no meio acadêmico, com atividades como anti-inflamatório, antioxidante, antipsicótico, antiarrítmico, ansiolítico, modulador do receptor de estrogênio, antimitótico, antimicrobiano, inibidores de quinases, anticancerígenos, entre outros (Shah, Verma, 2018). Com as inovações dos processos de produção da química medicinal, a síntese de tiofenos também sofreu avanços e modificações, e através da elucidação da reação de Gewald, foi possível obter a molécula de 2-amino-tiofeno (Gewald, 1965).

No presente, a versatilidade do ligante 2-amino-tiofeno compreende um conjunto interminável de bibliotecas de triagem com uma diversificada serventia, possuindo uma ampla gama de compostos moleculares presentes em vários fármacos comerciais (Puterová *et al.*, 2009; Tietze *et al.*, 2021). Dentre essas atividades, as propriedades antifúngicas também foram descobertas oriundas de derivados de 2-amino-tiofeno, sendo portanto, compostos promissores com potencial de auxiliar na descoberta de novos agentes antifúngicos para aplicações terapêuticas em humanos e animais (Mendonça Junior *et al.*, 2011; Fogue *et al.*, 2012; Guimarães *et al.*, 2014; Abo-Salem *et al.*, 2014; Vieira *et al.*, 2021). Algumas moléculas já mostraram ser capazes de inibir espécies fúngicas, como dermatófitos (Gupta; Cooper; Ryder,

2008), *Aspergillus*, *Cryptococcus* e até mesmo a leveduras do gênero *Candida* (Cornely *et al.*, 2007).

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivos avaliar novos agentes com atividade antifúngica derivados de tiofeno, com eficácia no combate de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, propondo novos candidatos a protótipos de fármacos antifúngicos através da análise de sua atividade antifúngica *in vitro*, definindo a Concentração Inibitória Mínima (CIM) destes derivados de tiofeno, e avaliar as possíveis alterações morfológicas intracelulares provocadas por estas drogas em *C. albicans* e *C. tropicalis* por microscopia eletrônica de transmissão.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Infecções fúngicas hospitalares causadas pelo gênero *Candida*

Infecções fúngicas têm emergido consistentemente, e representam uma séria ameaça à saúde global. A Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2020, conjuntamente com um grupo de especialistas em antifúngicos de diversas partes do mundo, emitiram um relatório onde lista os patógenos prioritários para infecções fúngicas de importância para a saúde pública, ao qual incluem as espécies do gênero *Candida* resistentes aos tratamentos convencionais (World Health Organization - WHO, 2020).

Embora *Candida* spp. componha a microbiota humana, sendo adquirida pela transmissão materno-neonatal imediatamente após o nascimento, ao qual cumpre a função de sobrevivência evolutiva através do preparo do organismo estéril do bebê a se adaptar ao meio ambiente, algumas dessas espécies também possuem um caráter oportunista quando em condições favoráveis (Filippidi *et al.*, 2014; Xiao; Fiscella; Gill, 2020). Tais espécies de interesse médico são uma das causas mais comuns de infecções nosocomiais (infecções associadas aos cuidados de saúde), sendo responsáveis por mais de quatrocentos mil casos anuais no mundo, apresentando uma taxa de incidência de 0,24 a 34,3 pacientes a cada mil admissões em UTI (Bassetti *et al.*, 2019; Cortegiani *et al.*, 2018), e segundo uma revisão sistêmica e meta-análise mais recente, possui uma taxa de mortalidade próxima de 30,2%, que é fortemente afetada pelas condições subjacentes e pela presença de sepse ou choque séptico

(Liu, Zhang, Wang, 2020). No Brasil, essa taxa de mortalidade geralmente ultrapassa 50% (Colombo *et al.*, 2014; Canassa, Cruz, 2019).

Segundo o levantamento epidemiológico brasileiro de pacientes com candidemias, por Doi *et al.* (2016), os casos mais expressivos advinham de condições subjacentes como doenças malignas, doenças gastrointestinais e neurológicas, submetidos a cateter venoso central, ventilação mecânica, ou hemodiálise, apresentando uma mortalidade bruta durante a internação hospitalar de 72%.

A incidência global de candidemia teve um aumento alarmante, de mais de cinco vezes na última década (Barchiesi *et al.*, 2016), o que representa uma séria ameaça na área médica, devido às dificuldades de diagnóstico e manejo terapêutico complexo (Kontoyiannis, Wessel, Bodey, 2021; Verma, Prasad, 2022), além de carecer de um gasto econômico elevado na intervenção da doença correspondente ao tempo prolongado de permanência (Zaoutis *et al.*, 2005; Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2021) como constatado por Choi *et al.* (2019), que mensurou a média do total de custos médicos com a média do tempo de internação de hospitais na Coreia do Sul, apresentando um ônus de 7.295 dólares/17 dias de internamento *per capita* do estudo.

Além disso, essas infecções nosocomiais por *Candida* spp. também apresentam outros riscos correlacionados pós-episódio dessas fungemias, como o aparecimento de sequelas graves, tal qual, comprometimento de órgãos, como coração, cérebro e olhos, complicações neurológicas decorrentes de meningites fúngicas por *Candida*, endocardite, endoftalmite, acometimento de articulações e falência renal (Colombo, Guimarães, 2003; Bassetti *et al.*, 2020).

Devido à alta heterogeneidade de infecções das espécies do gênero *Candida* e sua distribuição geográfica dispersa, as manifestações clínicas variam consideravelmente e são imprecisas, podendo ser assintomáticas, apresentar sinais convencionais de infecções, como febre mínima, ou até mesmo em casos graves, o desenvolvimento de choque séptico (Clancy *et al.*, 2000; Pappas *et al.*, 2018).

Há uma variedade de fatores endógenos e exógenos que promovem a crescente incidência de infecções pelo gênero *Candida* (Frans *et al.*, 1999; Scully, Fidel, 2021). Dentre os fatores de risco incluem pacientes com idade avançada, azotemia, hemodiálise, uso prévio de antibióticos, nutrição parenteral, transfusão sanguínea, quimioterapia, cirurgias abdominais, barreira mucosa danificada, entre outras (Frans *et al.*, 1999; Yapar *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2017; Scully, Fidel, 2021). E a transmissibilidade hospitalar geralmente acontece horizontalmente, via cateteres intravasculares, alimentação parenteral total, cateteres urinários de demora,

cateteres venosos centrais (incluindo Port-A-Cath ou cateter de Foley), e sondas gástricas de demora (Kao *et al.*, 1999; Pfaller, Diekema, 2007; Liu *et al.*, 2017).

O método de diagnóstico laboratorial padrão de infecções invasivas por *Candida* é a hemocultura seguido da presença de evidências empíricas dos sinais clínicos de infecção. No entanto, esse teste de diagnóstico apresenta fatores limitantes, como baixa sensibilidade de resultados, e atraso na identificação da espécie isolada, que pode levar em média 2 dias ou mais para a detecção do crescimento, o que acaba retardando o início do tratamento antifúngico apropriado, e essa intervenção tardia está associada significativamente alta morbidade e mortalidade, podendo elevar essa taxa bruta de mortalidade em duas vezes em um atraso de tratamento de 12-24h (Mikulska *et al.*, 2012). Outros métodos de detecção que podem ser utilizados nesses tipos de infecção são os ensaios de detecção molecular em reações em cadeia da polimerase (PCR) e testes sorológicos com detecção de antígenos (Pappas *et al.*, 2018).

2.1.1. *Candida albicans*

Tratando-se da espécie mais comum do gênero *Candida*, e importante do ponto de vista clínico e epidemiológico, *C. albicans* é uma levedura diplóide, sapróbios, comensal natural da microbiota humana e animal, presente no trato digestivo, urogenital, e na cavidade oral; porém em determinadas condições, pode-se apresentar com um perfil altamente patogênico, como nos casos das infecções sistêmicas fatais. Atualmente, trata-se de uma das principais leveduras patogênicas oportunistas (Giolo, Svidzinski, 2010; Khan *et al.*, 2021).

Dentre as espécies de *Candida* capazes de se desenvolver reversivelmente tanto entre células de levedura unicelulares (crescimento isotrópico) e uma forma de crescimento filamentoso pluricelular, as hifas e pseudo-hifas (crescimento apical), *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentam tal característica, e por isso são definidas como polimórficas (Calderone; Fonzi, 2001).

Ademais, esses microrganismos possuem uma grande capacidade adaptativa ao extremos fisiológicos dentro do hospedeiro humano, como aderência a diferentes membranas epiteliais oriundas de vários locais anatomicamente distintos e formação de biofilme, dimorfismo na invasão de tecidos, termotolerância, evasão do sistema imune, robusta produção de exoenzimas hidrolíticas, entre outras; tais fatores de virulência contribuem para a patogênese, e tornam as espécies de *C. albicans* um dos agentes infecciosos de difícil tratamento (Calderone; Fonzi, 2001; Mishra; Ali; Shukla, 2021).

2.1.2. *Candida tropicalis*

C. tropicalis é uma levedura diplóide, normalmente de reprodução assexuada, porém há estudos que relatam a ocorrência de parassexualidade entre duas células diplóides formando uma tetraplóide (Seervai *et al.*, 2013), e polimórfica, podendo apresentar-se na forma de células de brotamento, pseudomicélio contendo conídios individualmente, e em raras situações, apresentam hifas verdadeiras, igualmente como relatado nas espécies de *C. albicans* (Suzuki *et al.*, 1991; Kumar, Sharma, Prasad, 2021). Trata-se de uma espécie pertencente à microbiota humana natural, normalmente presente na pele, sistema gastrointestinal, geniturinário e respiratório (Zuza-Alves *et al.*, 2017), porém também é um patógeno humano oportunista capaz de causar infecções sistêmicas graves (Webster; Odds, 1988; Takahashi *et al.*, 2021).

Sua epidemiologia a classifica como a segunda espécie do gênero *Candida* mais comumente isolada, com uma taxa de 22,7% dos casos relatados em muitos centros no Brasil (Colombo *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2021), porém essa incidência fúngica é significativamente variável nas diferentes localizações geográficas, onde até então, são nas regiões equatoriais que possuem um maior número de casos (Ann Chai, Denning, Warn, 2010; Pereira *et al.*, 2019), podendo assegurar a possibilidade dos fatores clima, temperatura e grau de umidade sejam determinantes para essa adaptação da espécie (Vogel *et al.* 2007; Lima *et al.*, 2021).

C. tropicalis tem-se mostrado como um patógeno hospitalar, sobretudo, sendo prevalente em pacientes em tratamento oncológico, apresentando como fatores de risco associados à infecção a leucemia aguda, neutropenia e terapia antineoplásica (Ann Chai, Denning, Warn, 2010; Dantas *et al.*, 2020), entretanto, o seu alcance como agente patogênico é amplo, sendo também responsável por promover infecções oculares em pacientes (Dozier *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2021), colonizar em próteses valvares mitrais provocando endocardites (Nagaraja *et al.*, 2005), bem como causar artrites sépticas (Vicari *et al.*, 2003). Seu grau de virulência e patogenicidade é bastante considerável, possuindo uma alta disseminação, como constatado por e Khan *et al.* (2020), que, através de estudos comparativos entre espécies de *Candida*, *C. albicans* e *C. tropicalis*, se mostraram altamente patogênicas.

Uma das preocupações mundiais no tratamento e manejo de infecções fúngicas é o surgimento crescente da resistência microbiológica, tanto a resistência relacionada às classes únicas, quanto a multirresistência, o que leva, muitas vezes, ao fracasso terapêutico (Perlin, Rautemaa, Alastruey, 2017). O termo “resistência” diz respeito a redução da suscetibilidade de inibição de um microrganismo a um fármaco antifúngico diante de análises *in vitro*, que quantificam o valor das concentrações inibitórias mínimas (CIM ou, do inglês *Minimum Inhibitory Concentration* - MIC) dos isolados (Mayr, Lass-Flörl, 2011). Essa resistência pode

ser de caráter intrínseco (primário) quando o microrganismo possui naturalmente características de autoproteção sem nunca ter sido exposto a droga em questão; ou de forma adquirida (secundária), quando o microrganismo que era previamente suscetível, começa a apresentar um perfil de resistência após o contato com a droga (Kanafani; Perfect, 2008).

Assim como *C. albicans* possui competentes mecanismos de resistência e virulência, *C. tropicalis* similarmente, dispõe de estratégias equipotentes, como formação de biofilme, presença de adesinas, polimorfismo, produção de exoenzimas, entre outras (Ann Chai; Denning; Warn, 2010; Zuza-Alves *et al.*, 2017).

2.2 Tratabilidade comercial e os problemas existentes nos tratamentos convencionais

O tratamento de infecções sistêmicas pelo gênero *Candida* se baseia tanto na espécie isolada quanto no perfil de susceptibilidade aos antifúngicos. As classes de drogas tradicionais para o tratamento das infecções possuem um repertório antifúngico limitado, e são mostradas na figura 1 com seus respectivos alvos moleculares. São elas:

- Equinocandinas: Tem como representantes caspofungina, micafungina e anidulafungina; Seu mecanismo de ação se deve à inibição da enzima UDP-glucose β -(1,3)-D-glucano- β (3)-D-glicosiltransferase (ou 1,3- β -D-glucano sintase), que é responsável pela síntese de 1,3- β -D-glucano (BG), um polissacarídeo específico presente em grandes concentrações na parede celular de fungos que incluem as espécies *Candida*, sendo responsável pela rigidez da parede celular (Lipke; Ovalle, 1998; Arendrup; Perlin, 2014). Tal inibição, provoca, por consequência, uma desestabilização da integridade da parede celular, causando uma redução na rigidez estrutural, o que incapacita na resistência às pressões osmóticas, promovendo a morte destes microrganismos por lise celular (Prasad; Shah; Rawal, 2016). Porém, seu uso clínico é restrito devido à sua baixa absorção oral, sendo disponível apenas em formulações endovenosas, e o seu espectro de ação é restrito entre algumas espécies de *Candida* e *Aspergillus* (Denning, 2003).
- Poliênicos: Como anfotericina B e formulações lipídicas de anfotericina B; possuem como mecanismo de ação principal a formação de poros na membrana citoplasmática

do fungo através de ligações hidrofóbicas nos esteróis fúngicos (preferencialmente no ergosterol), o que favorece a morte celular por extravasamento dos componentes citoplasmáticos (Catalán; Montejo, 2006; Hamill, 2020). Embora essa classe de fármaco apresente um amplo espectro de atividade, seu uso traz principalmente riscos renais, acometendo as células tubulares, reduzindo a função renal dos pacientes que chegam a usar (Clements; Peacock, 1990; Lubber *et al.*, 1999; Bates *et al.*, 2001).

- Pirimidinas: Equivalido pelo composto sintético flucitosina (5-fluorocitocina; 5-FC); Esse fármaco age na inibição da biossíntese de DNA graças a inibição da enzima timidilato sintetase (enzima chave envolvida na síntese de DNA e na divisão nuclear), como também, atua na inibição da síntese protéica e modificação da sequência de aminoácidos quando incorporado no RNA dos fungos, o que resulta em lise e morte celular (Vermes *et al.*, 2000). Porém, o uso desse composto como monoterapia tem sido questionado devido ao surgimento de uma vertiginosa seleção de resistência, toxicidade e espectro limitado (Rang *et al.*, 2011; Chandra; Ghannoum, 2017).
- Alilaminas: Tem como drogas a terbinafina e naftifina. Trata-se de um inibidor da produção de ergosterol através de um bloqueio específico e seletivo na enzima esqualeno epoxidase, que é envolvida na síntese de ergosterol, gerando um acúmulo de esqualeno e reduzindo a produção da biossíntese de ergosterol, e interrompendo o crescimento celular (Shear *et al.*, 1991; Murray *et al.*, 2014). Possui poucos efeitos adversos, porém sua aplicação é limitada apenas ao tratamento de dermatomicoses (Balfour; Faulds, 1992).
- Derivados azólicos: Corresponde a maior classe de antifúngicos, sendo representada pelos compostos sintéticos como miconazol, fluconazol, voriconazol, cetoconazol, itraconazol, voriconazol, e posaconazol; Tratam-se basicamente de inibidores da biossíntese do ergosterol através da inibição da enzima lanosterol 14 α -desmetilase, presente no citocromo P450, sendo a responsável pela oxidação da molécula do lanosterol. Os azóis possuem átomos de nitrogênio que se ligam ao grupo heme férrico localizado no sítio regulatório da lanosterol 14 α -desmetilase, atuando assim como um inibidor não competitivo, e essa inibição causa o bloqueio da conversão de lanosterol em ergosterol (Sanglard *et al.*, 1998). Possuindo um perfil tóxico às células fúngicas, esse acúmulo de lanosterol levará a uma desestabilização que resultará em morte celular

(Kelly; Arnoldi; Kelly, 1993). A grande desvantagem na utilização é o seu caráter fungistático (Vicente *et al.*, 2003). Porém, de todos os compostos azólicos disponíveis, o mais prescrito é o fluconazol por ser um dos antifúngicos de primeira linha no tratamento de candidemia, estando na lista de medicamentos essenciais aprovados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Kneale *et al.*, 2016) devido ao seu ótimo perfil de segurança (mesmo em pacientes debilitados e com insuficiências renais), estabilidade na formulação das várias apresentações comerciais, boa penetração tecidual, absorção oral confiável, ausência de interações medicamentosas importantes e baixo custo de tratamento (Charlier, 2006). Outra problemática crescente é o aparecimento de resistência natural e adquirida ao fluconazol, que foi relatada dentre as espécies de *Candida*, inclusive o surgimento de espécies multirresistentes, como é o caso da *Candida auris* (Lockhart *et al.*, 2016).

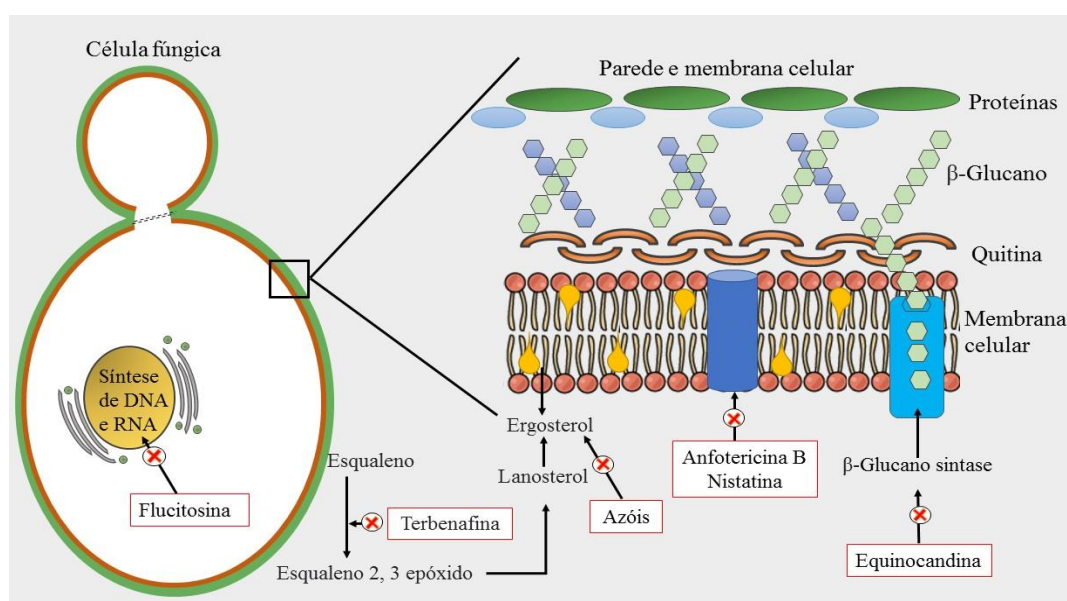


Figura 1: Mecanismo de ação dos agentes antifúngicos comerciais e seus alvos de atuação.

Fonte: autor (2022), adaptado de Katzung *et al.* (2012).

2.3. Derivados tiofênicos, e o 2-amino-tiofeno

Em 1883, Victor Meyer isolou pela primeira vez o tiofeno (Figura 2), uma molécula bioativa heteroaromática contendo enxofre como heteroátomo, e que possui fórmula molecular C_4H_4S (Joule, Smith, 1972; Jha *et al.*, 2012). Posteriormente, elucidou-se a presença desta

estrutura em diversos produtos naturais e compostos ativos que possuem atividades farmacológicas notáveis, como analgésico e anti-inflamatório (Fakhr *et al.*, 2008), anti-hipertensivo (Russell *et al.*, 1988), agente quimioterápico (Al-said *et al.*, 2011; Dallemagne *et al.*, 2003), antimicrobiano (Ahmed, Nour, 1982; Ferreira *et al.*, 2004), entre outros. Uma propriedade que confere vantagens terapêuticas desse composto é a possibilidade de incorporar a outros compostos heterocíclicos, potencializando sua atividade biológica, como por exemplo, as tienopirimidinas, que são antimetabólitos potenciais por serem análogos estruturais de purinas biogênicas (Jha *et al.*, 2012).

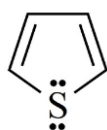


Figura 2: Estrutura química da molécula de tiofeno. Fonte: autor (desenhada no software ChemOffice Cloud).

Devido ao crescente interesse farmacêutico em novas moléculas terapêuticas, estratégias de composição e modificação molecular com um potencial ativo em alvos biológicos expandiram a química medicinal, e a síntese de tiofenos também sofreu avanços. Na segunda metade da década de 60, através de reações de condensação multicomponentes, utilizando uma molécula de cetona ou aldeído, um composto com metileno ativo em meio básico, e acrescido do elemento enxofre, Karl Gewald obteve a molécula 2-aminotiofeno (Figura 3) (Gewald, 1965; Gewald; Schinke; Böttcher, 1966). Trata-se de uma síntese química com condições reacionais de baixa exigência, facilidade de isolamento do produto e rendimento considerável, e que ao longo dos anos, passou por várias técnicas de melhoramento dos seus meios de produção para potencializar sua síntese, tais como: uso de líquido iônico como suporte solúvel para a síntese (Hu *et al.*, 2006), irradiação de microondas (Sridhar *et al.*, 2007), energia ultrassônica (Mojtahedi *et al.*, 2010), indução por energia solar (Mekheimer *et al.*, 2008), uso de PEG como solvente (Liang *et al.*, 2014), utilização de catalisadores de zeólitos (Kurmach; Yaremov; Shvets; 2022), entre outros.

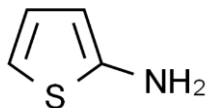


Figura 3: Estrutura química da molécula de 2-amino-tiofeno. Fonte: autor (desenhada no software ChemOffice Cloud).

Hoje, o ligante 2-amino-tiofeno compreende um conjunto interminável de bibliotecas de triagem com funcionalidades diversas, apresentando uma ampla gama de compostos moleculares presentes em vários fármacos comerciais (Puterová *et al.*, 2009), como Zyprexa® (Olanzapina), Etizolam (Yoshitomi Pharmaceutical Ltda), Tinoridina (Yasuda *et al.*, 1980), com suas respectivas atividades farmacológicas: antipsicótico, ansiolítico, e anti-inflamatório e analgésico não esteroideal.

Propriedades antifúngicas também foram descobertas oriundas de derivados de 2-amino-tiofeno, como o composto de nomenclatura 2-[(3,4-dicloro-benzilideno)-amino] -5,6-di-hidro-4H-ciclopenta[è]tiofeno-3-carbonitrila, com atividade fungicida em algumas espécies de *Candida*, e em *Cryptococcus neoformans* (Mendonça Junior *et al.*, 2011; Guimarães *et al.*, 2014); com também, os três compostos: 3-Amino-4-imino-4H-tieno [3,4-c] [1] benzopirano, 3-Amino-4H-tieno [3,4-c] [1] benzopiran-4-ona e 3-Amino-4H-tieno [3,4-c] [1] naftopiran-4-ona, que agem interferindo na síntese protéica no fungo dermatófito *Microsporum gypseum* (Fogue *et al.*, 2012); e o composto 2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofeno-3-carbonitrila, que combinado a quitosana, demonstrou atividade contra três espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*) (Oliveira *et al.*, 2022); entre outros.

Diante do limitado espectro de ação dos antifúngicos comerciais, bem como de suas contra indicações, efeitos colaterais e evolução da resistência medicamentosa, a busca e descoberta de novos fármacos que sejam tão ou mais seguros e eficazes que os já aprovados ao uso se faz necessária (Zida *et al.*, 2016). Moléculas com 2-amino-tiofeno podem ser usadas como precursores para o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos (Forero *et al.*, 2011), do mesmo modo que o uso de terapias combinadas por meio de agentes antifúngicos que apresentem diferentes modos de ação tem sido cada vez mais defendida e usada nos tratamentos de infecções refratárias, conforme a ocorrência crescente de uma eficácia reduzida por parte dos agentes antifúngicos comerciais atuais, além de suplementarmente, minimizar o surgimento de resistência (Sussman *et al.*, 2004).

Nesse contexto, propusemos investigar o potencial de oito derivados de 2-amino-tiofeno frente a isolados clínicos de *C. albicans* e *C. tropicalis* no intuito de identificar novos

agentes terapêuticos eficazes no combate de infecções fúngicas, dificultando o desenvolvimento do processo infeccioso.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar *in vitro* novos agentes com atividade antifúngica derivados de tiofeno, com eficácia no combate de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, propondo novos candidatos a protótipos de fármacos antifúngicos.

3.2. Objetivos Específicos

- Selecionar os isolados clínicos de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*;
- Revisar morfológicamente as culturas dos complexos *C. albicans* e *C. tropicalis* isoladas de amostras clínicas depositadas na Micoteca URM/UFPE quanto às características macroscópicas e microscópicas (morfologia celular)
- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro*, e definir a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos derivados de tiofeno;
- Avaliar as possíveis alterações morfológicas intracelulares provocadas pelas drogas em *C. albicans* e *C. tropicalis* por microscopia eletrônica de transmissão;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento da pesquisa

Trata-se de um estudo de natureza básica, laboratorial, *in vitro*, de caráter transversal prospectivo, experimental, cuja análise foi quantitativa e qualitativa.

4.2 Local da pesquisa

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos, localizado no Centro de Biociências (CB), e Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME)

do Instituto Keizo Asami (iLIKA), da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Campus I - Cidade Universitária, Recife/PE.

4.3. Triagem e manutenção dos isolados

A triagem dos isolados foi realizada segundo as espécies de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, oriundos de amostras de pacientes de hospitais públicos do Recife – PE, armazenados na Micoteca URM/UFPE, conforme tabela 1. Utilizou-se meio ágar Sabouraud para reativação, cultivo e manutenção das espécies.

Código GenBank	Código Micoteca URM	Espécie
	URM8666	<i>C. albicans</i>
MW829732	URM8668	<i>C. albicans</i>
	URM8667	<i>C. albicans</i>
MW829734	URM8669	<i>C. albicans</i>
MW861537	URM8368	<i>C. albicans</i>
MW829742	URM8670	<i>C. tropicalis</i>
MW829740	URM8377	<i>C. tropicalis</i>
MW829743	URM8374	<i>C. tropicalis</i>
MW829738	URM8671	<i>C. tropicalis</i>
MW829739	URM8672	<i>C. tropicalis</i>

Tabela 1 – Relação dos isolados selecionados após triagem com seus respectivos códigos de identificação das espécies de *Candida albicans* e *C. tropicalis*.

4.4. Revisão de Características Macro e Micromorfológicas

As características macromorfológicas foram avaliadas por método comum de cultivo, após inoculação e crescimento em placas de Petri (90 mm) contendo meio ágar Sabouraud à temperatura de 37°C após 7 dias. A interpretação dos resultados foi realizada através de avaliação morfovisual das distintas variantes apresentadas pelos isolados.

Para as características micromorfológicas, analisando as células vegetativas como critério taxonômico, foi realizado através de cultivo em lâmina contendo meio ágar Sabouraud, à temperatura de 37°C. Após 7 dias de incubação, as lamínulas foram coradas utilizando corante azul de Amann (lactofenol blue), e observados através de microscopia os diferentes morfotipos celulares (globosa, subglobosa, elipsoidal, cilíndrica, ovalada, alongada, ogival, botuliforme ou lunata) (Cursino; Silva; Melo, 2017).

4.5. Avaliação da suscetibilidade antifúngica *in vitro* dos isolados frente a derivados de tiofeno

Para avaliar quantitativamente o espectro de ação *in vitro* dos potenciais agentes antimicrobianos contra os isolados fúngicos, realizou-se o teste de suscetibilidade de microdiluição em caldo frente aos derivados de tiofeno. O agente antifúngico utilizado para o controle do experimento foi o fluconazol (FLU). Para isso, utilizou-se o teste de suscetibilidade pelo método de microdiluição em caldo (MDC) em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI), conforme as recomendações descritas no documento M27-A3 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI®, 2008).

- Preparo e padronização dos inóculos

Os inóculos foram preparados em 5ml de solução salina esterilizada, a partir das culturas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, subcultivadas em meio ágar Sabouraud dextrose por 24h (overnight). A padronização da concentração do inóculo foi programada através de mensuração da transmitância por espectrofotômetro, que corresponde a turvação equivalente de uma solução-padrão 0,5 da escala de McFarland no comprimento de onda de 530nm, configurando uma suspensão numa concentração entre 1×10^6 a 5×10^6 células/mL. Em seguida, as suspensões contendo os inóculos foram diluídas numa proporção de 1:100 em salina, e posteriormente, na proporção de 1:20 no meio RPMI-1640, resultando numa suspensão na concentração de 5×10^2 a $2,5 \times 10^3$ (Figura 4).

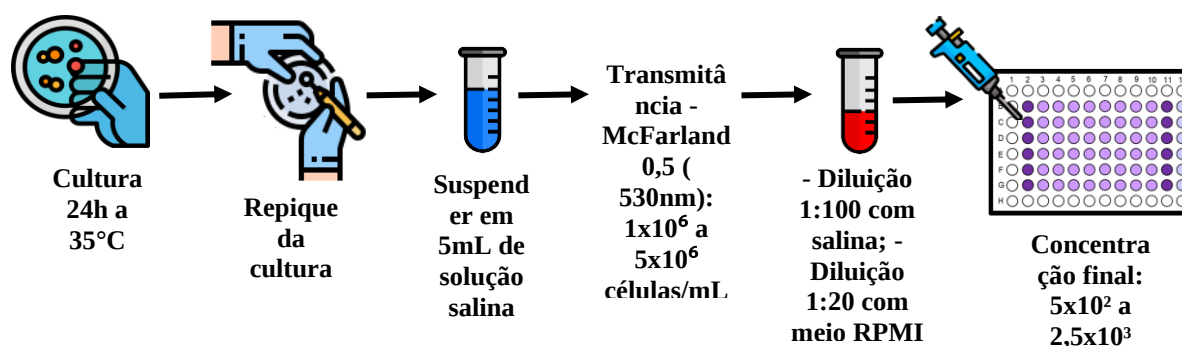


Figura 4: Preparação do inóculo de leveduras segundo a metodologia do CLSI.

- Compostos derivados de tiofeno e seus preparos

Os derivados de tiofeno utilizados neste trabalho foram fornecidos pelo Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Foram testados os seguintes derivados: 6EST, 6EST-ACET, SB44, 6CN-Me, 7CN12, LNN03, SB83, SB200. Esses oito compostos foram pesados em balança analítica de precisão dentro de eppendorfs. A proporção seguida para solução estoque foi de 3200mg da droga / 1mL dos solventes, sendo solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) e etanol, e diluídos em meio RPMI-1640 até a obtenção das concentrações de testes de 400 a 0,78125µg/mL. A concentração final de DMSO nas diluições foi inferior a 5%, conforme recomendações descritas na literatura, dado que concentrações acima de 20% se tornam tóxicas para as células (Farias *et al.*, 2018). Manteve-se a temperatura ambiente por 24 horas antes do ensaio.

- Meio de cultivos

Utilizou-se o meio de cultura RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) com adição de L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, tamponado com ácido 3-[N-Morfolino] propanosulfônico (MOPS; Sigma-Aldrich) num pH 7,2-7,4. Para esterilização, filtrou-o utilizando um sistema de filtração a vácuo com membrana PES 0.22 µm.

- Procedimentos do teste de suscetibilidade antifúngica *in vitro*

A experimentação do teste de suscetibilidade foi executada em capela de fluxo laminar. Utilizou-se placas de microtitulação planas de 96 poços, nos quais os oito derivados de tiofeno foram diluídos sequencialmente em meio RPMI-1640 para a obtenção das concentrações de 400 a 0,78125µg/mL, e em cada poço, foram adicionadas alíquotas de 100µL das suspensões celulares. Montou-se ainda o controle de esterilidade do meio (controle negativo) e o controle de crescimento do inóculo fúngico (controle positivo). Ao final, as placas foram vedadas, e incubadas a 35°C. As leituras de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram executadas visualmente entre 24 e 48h. E considerou-se para os valores para a CIM aqueles que inibiram 100% o crescimento quando comparados com o controle. Na validação do método utilizado no teste de suscetibilidade antifúngica, para checar fatores como deterioração significativa do agente antifúngico, entre outros, foi realizado análises com duas cepas de controle de qualidade, *C. parapsilosis* ATCC® 22019, e *C. albicans* ATCC® 14053 (cepas consideradas aceitáveis), e uma cepa referência, *C. tropicalis* ATCC® 750 (cepa útil para realizar estudos de referência), que se mostraram de acordo com as recomendações, apresentando um MIC para fluconazol dentro do intervalo aceito pelo documento M27-A3 do CLSI.

4.6. Análise ultraestrutural de alterações morfológicas e estruturais

A verificação de prováveis aspectos da influência sobre as estruturas celulares fúngicas provocados pelos derivados de tiofeno foi conduzida através de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Após os resultados da análise da sensibilidade antifúngica, foi realizado um ensaio com as células de duas linhagens de leveduras (URM8668 e URM8377), onde dividiu-se as células tratadas em concentrações subinibitórias das drogas e células não tratadas (controle negativo). Seguiu o método de Karnovsky (1965) para preparar as amostras para microscopia de transmissão. As células foram recuperadas através de centrifugação em tubos de eppendorf de 1,5 mL para a separação e retirada do meio de cultura, prosseguindo com sucessivas lavagens com tampão fosfato-salino (PBS) a 0,1M e pH 7.1, e posterior fixação das estruturas celulares utilizando solução de Karnovsky (mistura de glutaraldeído a 2,5% e formaldeído a 4%, pH 7.2, em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7,4) (Karnovsky, 1965). Após 24h no fixador, efetuou-se sucessivas lavagens com tampão cacodilato, e ao final, adicionou-se o tetróxido de ósmio (pós-fixador e contraste) na proporção 1:1 Ósmio 1% + tampão Cacodilato 0,1M por 2 horas, na ausência de luz, e temperatura ambiente. Mais uma sequência de lavagens com tampão cacodilato é executada, e por fim, inicia-se a etapa de desidratação da amostra adicionando acetona à 30% por 15 minutos. Esse processo prossegue em mais quatro etapas, variando a concentração de acetona em 50, 70, 90 e 100% (pura), e mais 5 etapas misturando proporções de acetona + resina do tipo epóxi (Epoxy Embedding Medium kit - Sigma-Aldrich) em estado líquido (proporções de 4:1; 3:1, 2:1; 1:1; 1:2) até a adição da resina pura à amostra. Fez-se a inclusão desta resina em formas de silicone (etapa de emblocamento), e manteve em estufa a 60°C. Após a formação do bloco de resina, o material foi cortado em secções ultra finas utilizando um ultramicrotomo, corados com acetato de uranila e citrato de chumbo para o contraste, e analisados através de bombardeamento de elétrons no Microscópio Tecnai Spirit Biotwin G2/FEI (Figura 5) da Fiocruz-PE.

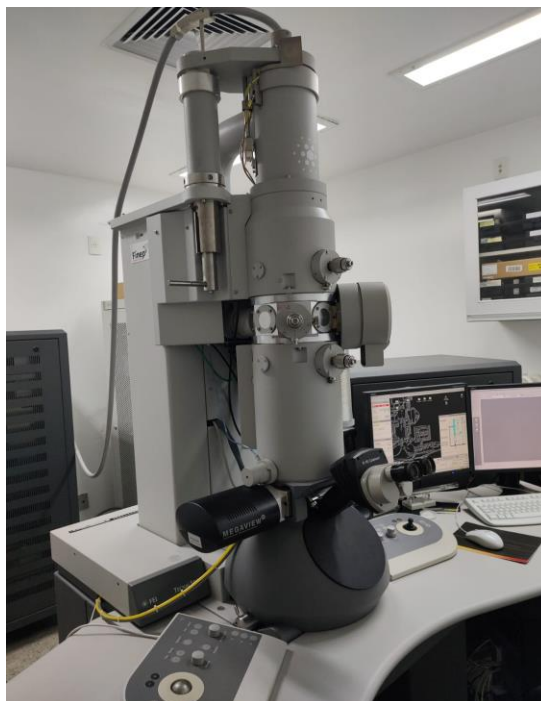


Figura 5: Microscópio Eletrônico de Transmissão modelo Tecnai Spirit Biotwin G2 / Marca FEI. Fonte: autor (2023).

4.7. Análise estatística

O registro dos dados foi feito na forma de banco de dados do Microsoft Office Excel - Windows, e analisados por meio de estatística descritiva, através de tabelas. As CIMs foram expressas pelas médias geométricas para facilitar as comparações das atividades dos compostos. As diferenças entre as médias foram comparadas utilizando o teste de ANOVA (após verificação da distribuição normal dos dados), seguidos pelo teste post-hoc de Tukey, sendo consideradas diferenças significantes no nível de 95% ($P < 0,05$), com o auxílio do software GNU-PSPP® versão 1.6.2. Os gráficos foram gerados utilizando os programas Origin Pro. Para todos os testes realizados neste trabalho, foram utilizados experimentos em duplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Revisão das Características Macromorfológicas

Analisando os aspectos morfológicos das colônias de cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*, submetidas às mesmas condições ambientais, constatamos o surgimento de morfologias amplamente variadas, conforme descritos por Slutsky, Buffo, Soll (1985) e Phongpaichit, Mackenzie, Fraser, (1987), elucidados na figura 6. Para ambas espécies, a coloração variou de branco-leitoso a cor creme; de aspecto úmido, viscoso, cremoso, aveludado e seco; brilhosos e opacos; margens inteiras, onduladas, lobuladas e cotonosas; e estrutura da superfície das colônias variadas: semi-lisa, anelada, crateriforme, celebriforme e rugosa, porém um único fenótipo não foi expresso: a forma lisa.

Essas diferentes morfologias em espécies de *Candida* têm sido apontadas supostamente como fatores que oferecem maiores condições de variabilidades adaptativas em diferentes ambientes dentro daquelas populações (Soll, 2009), e isso contribuiria para sua patogênese (França *et al.*, 2011; Gow *et al.*, 2017). Essas alterações morfológicas são reversíveis, espontâneas e independem de sinais externos (Soll, 1992), e já foram observadas em *C. albicans* (Slutsky *et al.*, 1985; Soll *et al.*, 1993), *C. tropicalis* (Soll *et al.*, 1988), *C. parapsilosis* (Lott *et al.*, 1993), *C. lusitaniae* (Yoon *et al.*, 1999) e *C. glabrata* (Lachke *et al.*, 2000, 2002).

França e colaboradores (2011), utilizando de análises ultraestruturais da arquitetura de colônias com diferentes morfologias, constataram existir uma diferença na estrutura e composição interna dos diferentes fenótipos de colônias. Em populações que apresentaram arquiteturas mais complexas, como em anel e rugosas, houve a presença de material extracelular exclusivamente nas áreas de depressões dessas colônias, o que infere sobre a possibilidade desse material contribuir para a formação e manutenção da arquitetura desses fenótipos em colônias de *Candida*. Além disso, esse material extracelular também foi correlacionado à contribuição da constituição do biofilme, que em colônias com estruturas mais simples, como é o caso do fenótipo liso, a formação do biofilme não foi tão expressiva; enquanto os fenótipos mais complexos formaram os maiores biofilmes.

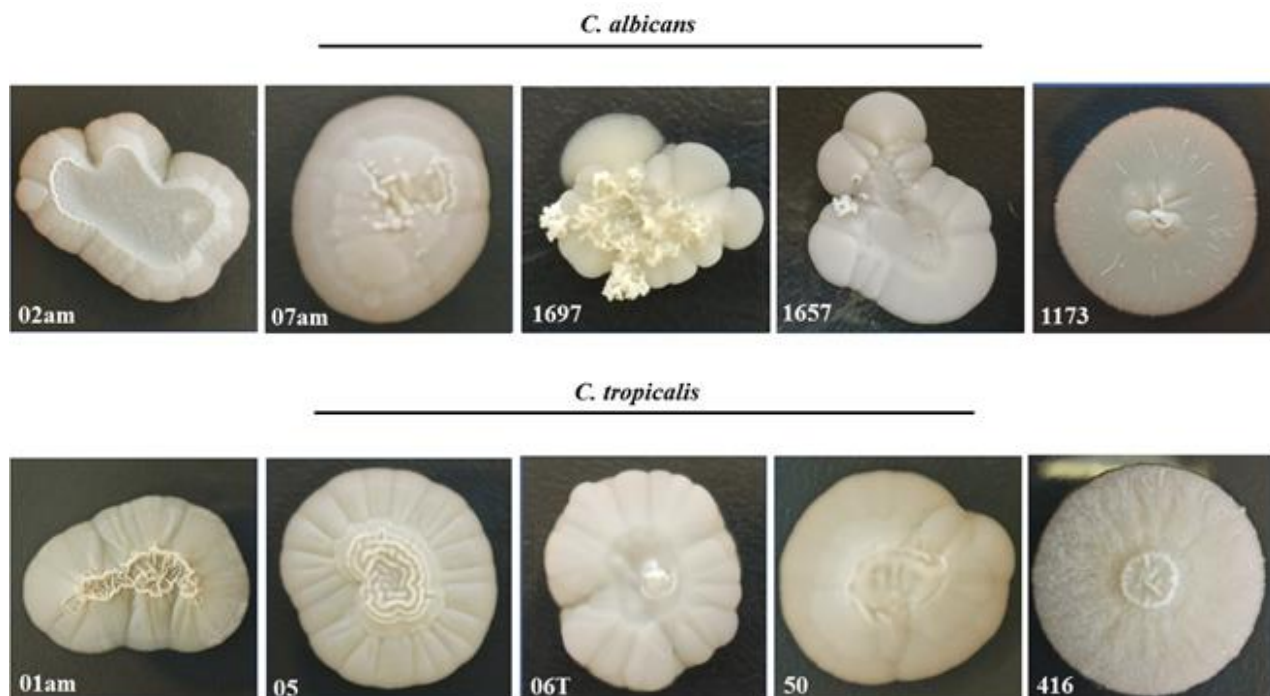


Figura 6: Colônias de cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* isoladas de casos clínicos apresentando diferentes morfologias, à temperatura de 37°C, por 7 dias. Fonte: autor (2022).

5.2. Revisão das Características Micromorfológicas

Por tratar-se de um gênero que apresenta como uma de suas características biológicas o polimorfismo, a avaliação da morfologia celular é outro alvo marcante das pesquisas nessa área. Muito se especula a respeito dessa alternância fenotípica celular, alegando que essa capacidade de alternar entre as formas de levedura, hifas e pseudo-hifas são fatores que garantem vantagens de alguma maneira para a virulência (Sudbery; Gow; Berman, 2004; Hirakawa *et al.*, 2015).

De modo geral, leveduras podem apresentar diferentes morfotipos celulares, como globosa, subglobosa, elipsoidal, cilíndrica, ovalada, alongada, ogival, botuliforme, semilunata e triangular (Kurtzman *et al.*, 2011), porém, as formas mais comumente encontradas em espécies de *Candida*, e obtidas neste trabalho conforme consta na figura 7, indiferentes entre as espécies e espécimes, são os fenótipos ovais a oblongos, com grande presença de brotamentos (Jones, 1990), e que segundo Sudbery, Gow e Berman (2004), essa morfologia celular auxilia na disseminação do fungo pela corrente sanguínea.

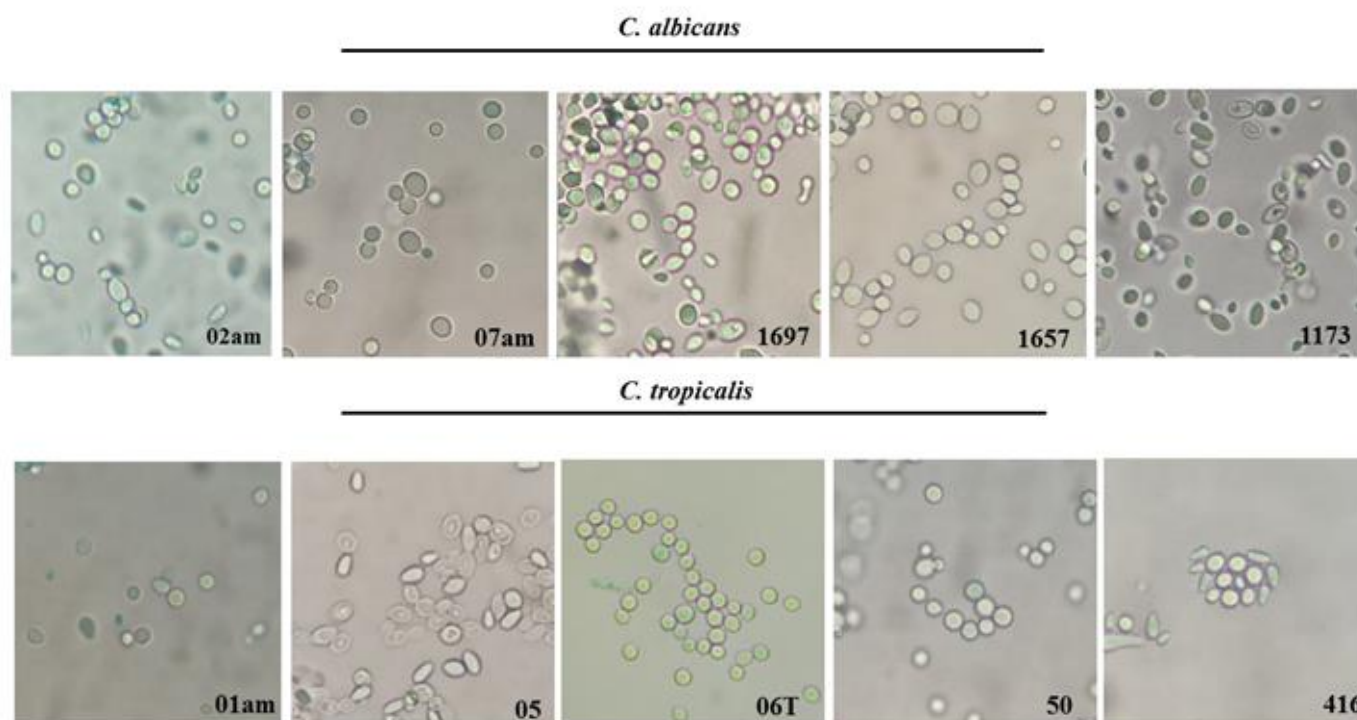


Figura 7: Morfotipos celulares de espécies de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, num aumento de 400x. Fonte: autor (2022).

Outro morfotipo encontrado de forma excepcional, apenas na estirpe 07am, foram as células opacas, que são um pouco maiores e mais oblongas do que as células convencionais, como mostra na Figura 8, descritas pelo sistema de Comutação Branco-Opaco em *Candida albicans*. Trata-se de uma mudança epigenética, reversível, que transforma as células assexuais, ditas como brancas, em células competentes para o acasalamento sexual (opacas) (Prasad, 2017). Essa mudança é vista como uma estratégia de sobrevivência: as células brancas são geralmente mais robustas do que as células opacas, o que auxiliaria na manutenção da linhagem celular até o momento apropriado para o acasalamento (Miller; Johnson; 2002).

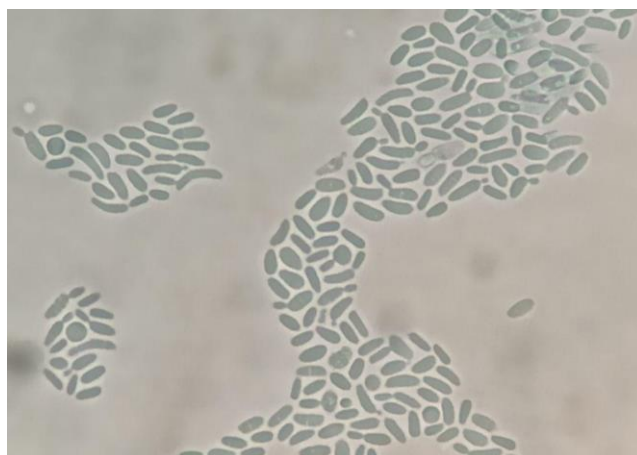


Figura 8: Células opacas de *Candida albicans* coradas com azul de Amann, em um aumento de 400x. Fonte: autor (2022).

5.3. Teste de susceptibilidade antifúngica *in vitro*

A avaliação da suscetibilidade antifúngica dos isolados frente aos derivados de tiofenos foi realizada através da determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM), considerando uma inibição de 100%. Dos oito compostos testados, três apresentaram uma inibição significativa do crescimento fúngico. Para os demais compostos, não houve atividade nas concentrações testadas. A tabela 2 exibe os resultados da CIM dos isolados frente aos compostos.

	Strains	CIM (µg/mL)								FLU
		SB83	SB200	SB44	7CN12	LNN03	6CN-ME	6EST	6EST-ACET	
<i>C. albicans</i>	URM8666	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	100	6,25	50	8
	URM8668	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	400	50	> 400	0,25
	URM8368	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	25	> 400	4
	URM8669	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	200	12,5	400	0,5
	URM8667	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	100	12,5	50	0,5
<i>C. tropicalis</i>	URM8670	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	200	25	400	0,5
	URM8671	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	200	100	200	4
	URM8672	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	400	25	200	0,5
	URM8377	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	400	200	> 400	32
	URM8374	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	400	100	400	64
ATCC	14053	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	25	6,25	12,5	0,5
	750	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	200	200	200	1
	22019	> 400	> 400	> 400	> 400	> 400	6,25	6,25	12,5	2

Atividade inibitória dentro da faixa de concentração testada;

Tabela 2 – Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL dos derivados de tiofeno e Fluconazol (FLU), frente aos Isolados oriundos de casos clínicos de *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Fluconazol (FLU) alcançou uma CIM que variou de 0,25 µg/mL a 64 µg/mL em todas as espécies, o composto 6CN-ME atingiu CIMs de 70,7 µg/mL a >400 µg/mL para *C. albicans*, e 141,4 µg/mL a 282,8 µg/mL para *C. tropicalis*, o composto 6EST-ACET apresentou um CIMs de 35,3 µg/mL a 282,8 µg/mL para *C. albicans*, e 141,4 µg/mL a 282,8 µg/mL para *C. tropicalis*, e por fim, o composto 6EST obteve valores de 8,4 a 35,3 µg/mL para *C. albicans*, e 17,3 a 141,4 µg/mL para *C. tropicalis*, respectivamente, conforme pode-se ver no gráfico 1, as média geométrica dos resultados das CIMs dos derivados de tiofeno testados, e análise da variância entre os grupos. Os demais compostos apresentaram um CIM maior que a máxima concentração testada.

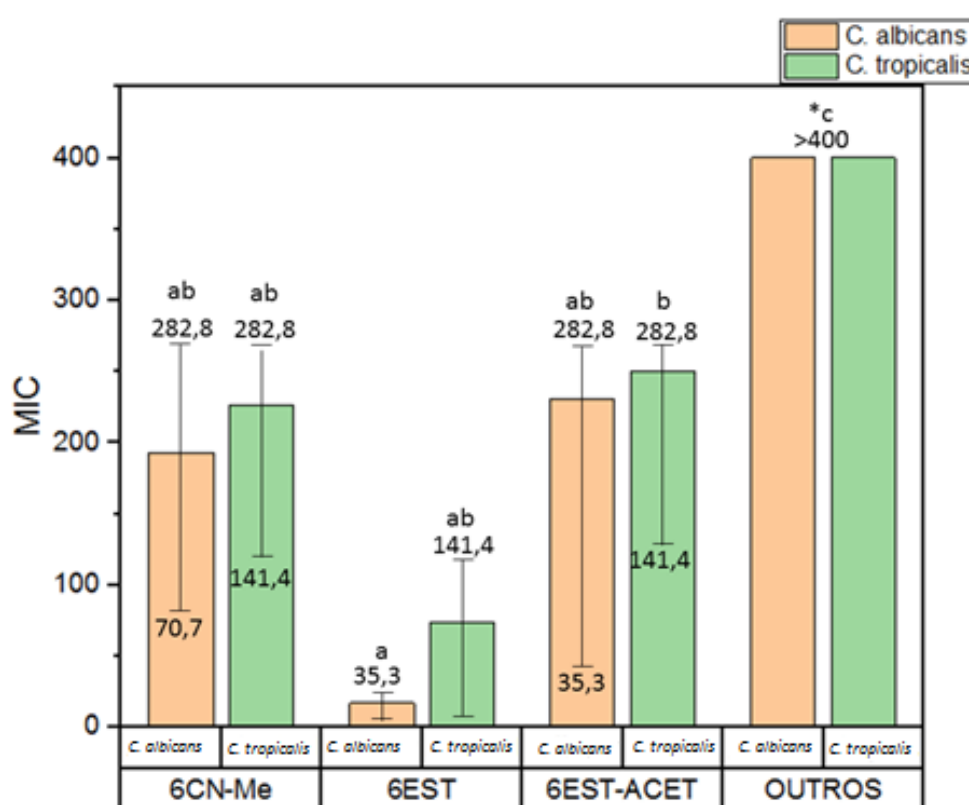


Gráfico 1 - Média geométrica dos resultados das CIMs dos derivados de tiofeno testados, e análise da variância entre os grupos.

Comparando aos trabalhos de Vasconcelos e colaboradores (2013), que testaram atividade antifúngica do composto timol (2-isopropil-5-metil-fenol) em cepas de *C. albicans*, obtiveram um CIM caracterizada pela ausência total de atividade celular de 350 µg/mL, mostrando um perfil de inibição menor do que os compostos de tiofenos. Caiana *et al.* (2020), submeteram a testes antifúngicos o composto benzil 2,3-didesoxi- α -D-eritro-hex-2-enopiranosídeo contra espécies de *Candida*, onde obtiveram um resultado de CIM de

1024µg/mL para as espécies de *C. albicans*, e >1024µg/mL para uma estirpe de *C. tropicalis*. Já Cruz e colaboradores (2018), através de análises de derivados hidrazino-tiazólicos, também submetidos a teste de susceptibilidade em isolados clínicos de *C. albicans*, as quatro substâncias testadas apresentaram valores menores de CIM, de 0,125 a 16,0 µg/mL, apresentando um perfil de inibição maior do que os compostos de tiofenos.

Alguns estudos demonstram o potencial dos derivados do tiofeno como agentes antifúngicos contra espécies de *Candida*. Por exemplo, Zhou *et al.* (2015-2016), que pretendendo desenvolver compostos com atividade antifúngica melhorada contra *Candida albicans*, sintetizou uma série de derivados de tiofeno e avaliou sua atividade antifúngica. Os autores descobriram que vários dos compostos exibiram atividade antifúngica significativa, com alguns exibindo atividade comparável à do fármaco controle fluconazol, apresentando valores de MIC variando de 8 a 128 µg/mL. Da mesma forma, Nandi *et al.* (2017) sintetizou uma série de derivados de 1,2,3-triazol à base de tiofeno e avaliaram sua atividade antifúngica contra várias cepas de fungos, incluindo *Candida albicans*. Os autores descobriram que vários dos compostos exibiram atividade antifúngica potente contra *Candida albicans*, com alguns mostrando atividade superior à das drogas de controle, exibindo MICs de 4 a 32 µg/mL.

Nos trabalhos de Yang e colaboradores (2016-2018), testou-se os compostos derivados de tiofeno-2,5-dicarboxamida, tiofeno-2,4-dicarboxamida e hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico, que exibiram potentes atividades antifúngicas contra *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, com MICs variando de 0,125 a 8 µg/mL, 0,5 a 8 µg/mL e 1 a 8 µg/mL respectivamente. Eles também mostraram baixa citotoxicidade para células hepáticas humanas, indicando um bom potencial como uma nova classe de compostos antifúngicos seguros e eficazes.

5.4. Análise ultraestrutural de alterações morfológicas e estruturais

Com o processamento de imagens através da microscopia eletrônica de transmissão (MET) é possível evidenciar os aspectos das influências dos compostos de tiofeno testados sobre a ultraestrutura celular das linhagens submetidas a estudo, e elucidar os mecanismos de ação dessas drogas.

Como mostra na Figura 9, as leveduras controle de *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentam-se intactas, com sua integridade de parede e membrana celular, além da preservação de sua área citoplasmática.

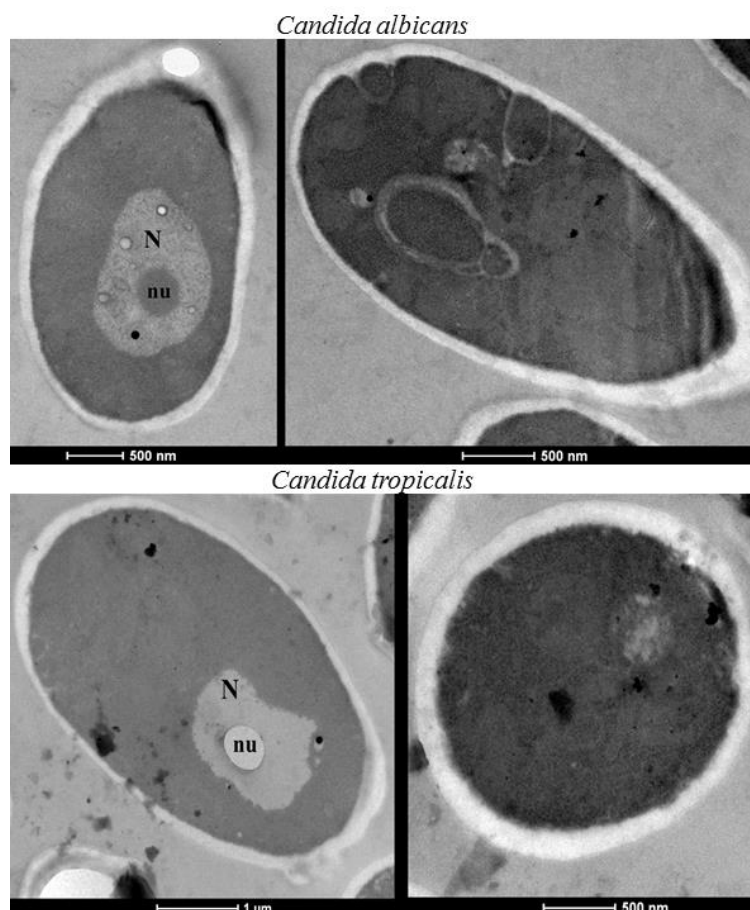


Figura 9: Micrografia das leveduras controle de *C. albicans* e *C. tropicalis* sem alterações ultra estruturais, apresentando sua integridade de parede e membrana celular, além da preservação de sua área citoplasmática [núcleo (N), nucléolo (nu)]. Fonte: autor (2023).

Em contrapartida, as células submetidas ao tratamento com os derivados de tiofeno mostraram-se estruturalmente alteradas em comparação com o controle (Figuras 10). No composto 6-EST, podemos ver anormalidades celulares em ambas as espécies. *C. tropicalis* apresentou na sua ultraestrutura, o surgimento de várias invaginações na membrana plasmática, o que claramente se supõe que houve um estresse de membrana capaz de provocar um descolamento da parede celular conforme vemos na Figura 10 D-E. Em leveduras de *C. albicans*, o dano celular foi expresso, além das invaginações na membrana plasmática, conjuntamente, ocorreram o aparecimento de uma morfologia incomum na parede celular e na membrana nuclear, desorganização e formação de vacúolos do conteúdo citoplasmático (Figura 10 A-C). Para o composto 6CN-Me, *C. tropicalis* exibiu uma grave morfologia distorcida,

chegando à perda de sua forma celular normal (Figura 11). Na espécie *C. albicans*, não foi possível obter imagens de microscopia para o composto 6CN-Me; acreditamos que o material celular foi insuficiente para os cortes da amostra.

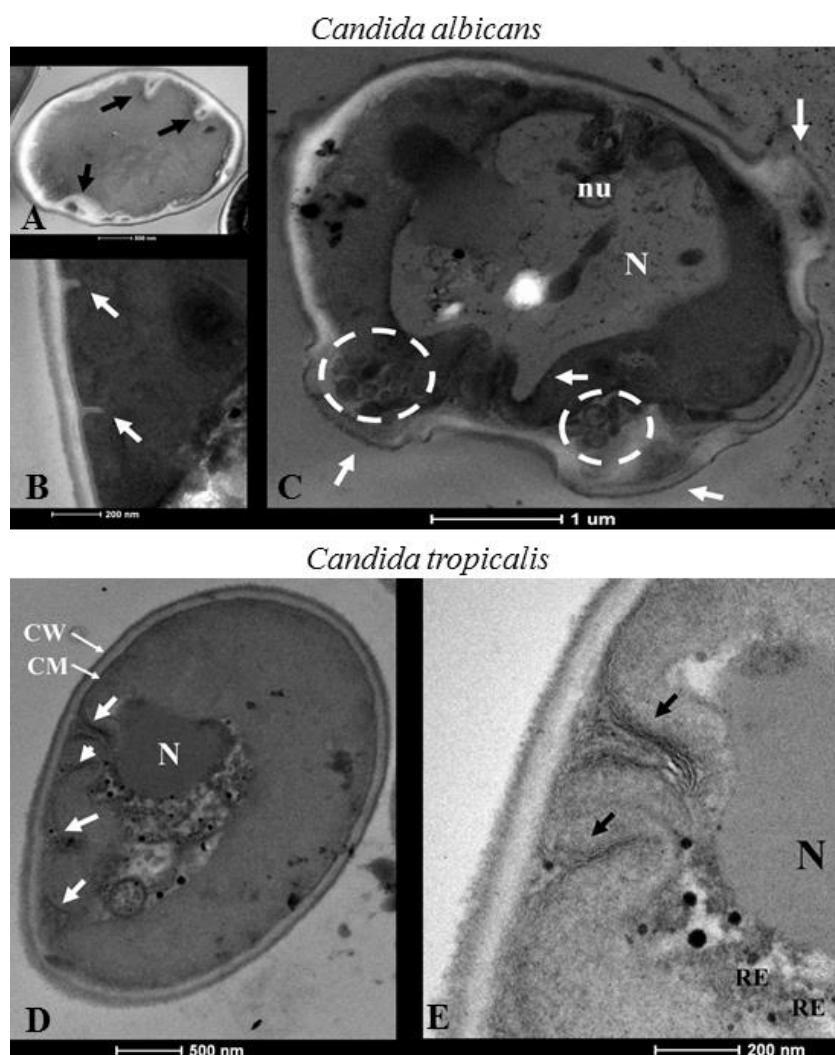


Figura 10: Micrografia das leveduras de *C. albicans* (A-C) e *C. tropicalis* (D-E) quando submetidas ao composto 6EST. (A-B) *C. albicans* evidenciando invaginações na membrana plasmática (setas), conjuntamente, ao aparecimento de uma morfologia anormal na parede celular (C-setas) e na membrana nuclear [núcleo (N), nucléolo (nu)], desorganização e formação de vacúolos do conteúdo citoplasmático (círculo). (D-E) *C. tropicalis* exibiu invaginações na membrana plasmática (CM) e parede celular (CW) (setas) [núcleo (N), retículo endoplasmático (RE)]. Fonte: autor (2023).

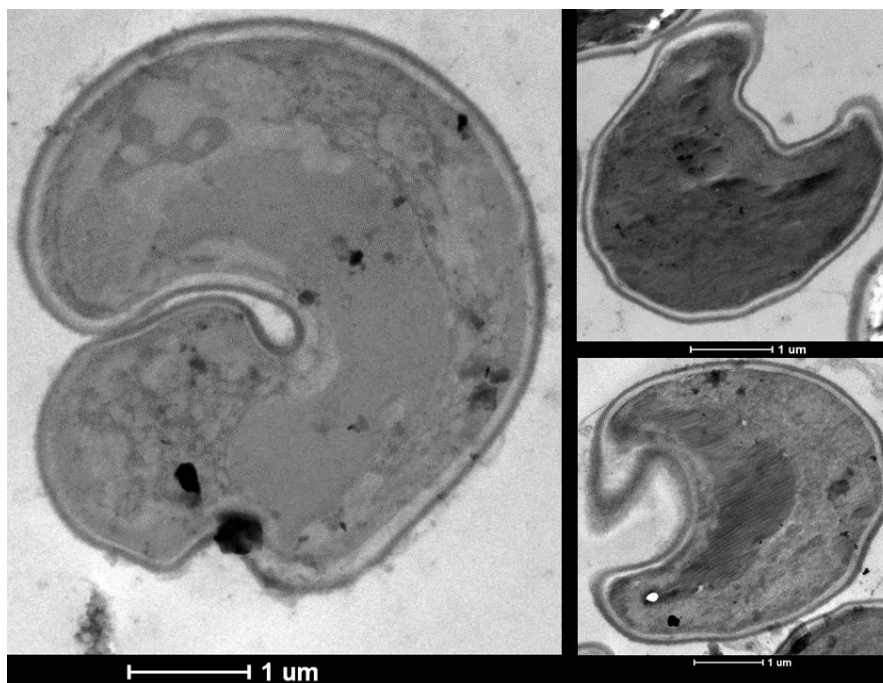


Figura 11: Micrografia das leveduras de *C. tropicalis* quando submetida ao composto 6CN-Me evidenciou graves deformações, chegando a descaracterizar sua forma celular normal. Fonte: autor (2023).

Além dessas anormalidades ultraestruturais, notamos que não houve registros de brotamentos nas micrografias submetidas aos tratamentos, o que pode ser um indício de um bloqueio na replicação celular; todavia, tal descoberta carece de mais análises.

Ao compararmos tais resultados com relatos da literatura científica, estas alterações e distorções na estrutura celular são comuns entre as classes de medicamentos recomendados e disponíveis para tratamento do gênero *Candida*, como é o caso do fluconazol, que possui um perfil de microscopia similar, apresentando enrugamento da superfície lisa da parede celular e depressões, cavitação e colapso ultraestruturais na membrana (Liss; Letourneau, 1989; Dornelas-Ribeiro *et al.*, 2012), bem como a anfotericina B e o miconazol, que mostraram um desequilíbrio dinâmico e instável da célula ao desestabilizar a membrana plasmática (Grela *et al.*, 2019; De Nollin; Borgers, 1975). Da mesma forma, novos estudos propondo tratamentos inéditos também demonstraram semelhanças nos resultados microscópicos, como é o caso do tratamento com peptídeos antimicrobianos plantaricina em *C. albicans* que apresentou descontinuidade e ruptura na membrana celular, encolhimento protoplasmático, morfologia irregular da célula e região nuclear, e vacuolização (Sharma; Srivastava, 2014), entre outras.

Assim como os poliênicos, que consistem de moléculas anfifílicas, capazes de diminuir a fluidez da membrana, aumentando a propensão a poros e levando a morte celular

(Vandeputte; Ferrari; Coste, 2012), e a classe dos antifúngicos azólicos, que exercem uma atuação direta na depleção de ergosterol, causando deteriorações na estrutura e funcionamento na membrana, inibindo o crescimento celular (Lupetti *et al.*, 2002), as suas eficácias são comprovada através de estudos de mecanismo de ação.

Em estudos avaliando os possíveis mecanismos de ação de alguns compostos derivados de tiofeno, moléculas compostas de hidrato de hidrazina e tiofenos substituídos que apresentaram atividade antifúngica contra cepas de fungos, incluindo *Candida albicans*, com valores de MIC variando de 0,125 a 1,0 µg/mL, através de análises de ancoragem molecular para examinar a interação dos compostos com o local ativo da enzima fúngica lanosterol 14 α -demetilase (CYP51). Esses estudos de *docking* molecular sugeriram que os derivados do tiofeno podem interagir com o sítio ativo do CYP51, inibindo assim sua atividade. Essa interação pode envolver a formação de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre os derivados do tiofeno e os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo do CYP51. A lanosterol 14 α -demetilase é uma enzima chave envolvida na biossíntese do ergosterol, que é um componente essencial da membrana celular fúngica. A inibição do CYP51 resulta na depleção dos níveis de ergosterol, levando ao rompimento da membrana celular fúngica e subsequente morte celular, resultando em atividade antifúngica contra espécies de *Candida albicans* (Abdelwahab *et al.*, 2020).

Contudo, ainda custa elucidar a nível molecular, a farmacodinâmica da ação exata e seu espectro de especificidade fúngica dos derivados de tiofeno apresentados neste trabalho. Pesquisas futuras são necessárias para propor os mecanismos moleculares completos de ação que expliquem a eficácia no combate aos fungos, bem como sua farmacocinética, garantindo uma grande oportunidade para introdução de novas terapias.

Até o presente momento, constatamos que este trabalho se trata do primeiro a utilizar de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) para estudar a atividade antifúngica de derivados do tiofeno contra espécies de *Candida*.

6. CONCLUSÃO

Então, de acordo com os objetivos apresentados, é possível concluir que:

- As cepas de *Candida albicans* e *C. tropicalis* apresentaram morfotipos de colônias variadas, independente da espécie, com exceção da ausência da forma lisa;
- Pela análise microscópica, a morfologia celular foi indiferente entre as espécies, e espécimes testadas.
- Os derivados de tiofeno 6CN-Me, 6EST e 6EST-ACET apresentaram atividade inibitória contra os isolados clínicos de *C. albicans* e *C. tropicalis*;
- As análises micrográficas evidenciam que os compostos derivados de tiofeno testados tiveram efeitos pronunciados na ultraestrutura celular de *C. albicans* e *C. tropicalis*.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos evidenciaram que derivados de tiofeno podem possuir capacidade antifúngica contra espécies patogênicas de *Candida*, podendo ser boas alternativas como terapias de controle de crescimento e combate. A gravidade das infecções provocadas por *Candida*, o aumento de casos de resistência, conjuntamente com a limitada disponibilidade de medicamentos, agrava a urgência em desenvolver novas classes de fármacos. Porém, análises complementares ainda necessitam serem realizadas para demarcar os limites e possíveis otimizações que tais drogas podem sofrer a fim de encontrar um medicamento seguro, com atividade potente específica para patógenos fúngicos, menos tóxicos, ou com comportamento farmacocinético aperfeiçoado.

Tais resultados sinalizaram a possibilidade de futuros estudos envolvendo esta classe de moléculas, que caracterizem e elucidem os mecanismos de ação e ampliem seu espectro de ação contra outras espécies de fungos.

REFERÊNCIAS

Abdelwahab, N. S.; Alharbi, W. D.; Al-Sawahli, M. M. 2020. *Novel thiophene-containing hydrazones: Synthesis, molecular docking, and antifungal activity*. *Molecules*, 25(17), 4014.

Abo-Salem, H. M.; El-Sawy, E. R.; Fathy, A.; Mandour, A. H. 2014. *Synthesis, antifungal activity, and molecular docking study of some novel highly substituted 3-indolylthiophene derivatives*. *Egypt Pharmaceut. J.* 13 (2), 71–86. doi: 10.4103/1687-4315.147064.

Ahmed, A. El-M.; Nour, A. M. 1982. *Synthesis of some new thiophene derivatives with antimicrobial activity*. part I. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Chemical Technology*, 33(1), 25–32. doi:10.1002/jctb.504330104.

Al-said, M. S.; Bashandy, M. S.; Al-Qasoumi, S. I.; Ghorab M. M. 2011, *Anti-breast cancer activity of some novel 1,2-dihydropyridine, thiophene and thiazole derivatives*. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, No. 46, pp. 137-141.

Ann Chai, L. Y.; Denning, D. W.; Warn, P. 2010. *Candida tropicalis in human disease*. *Critical Reviews in Microbiology*, 36(4), 282–298. doi:10.3109/1040841x.2010.489506.

Arendrup, M. C.; Perlin, D. S. 2014. *Echinocandin resistance: an emerging clinical problem*. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 27(6), 484-492. Doi: 10.1097/QCO.0000000000000119.

Badiee, P.; Kordbacheh, P. 2021. *Diagnosis and treatment of candidemia: a review*. *Journal of medical microbiology*, 70(10).

Balfour, J. A.; Faulds, D. 1992. *Terbinafine*. *Drugs* 43, 259–284. <https://doi.org/10.2165/00003495-199243020-00010>.

Banerjee, S. N.; Emori, T. G.; Culver, D. H.; Gaynes, R. P.; Jarvis, W. R.; Horan, T.; Edwards, J. R.; Tolson, J.; Henderson, T.; Martone, W. J. 1991. *Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States 1980-1989*. National Nosocomial Infections Surveillance System. *American Journal of Medicine* 91:86S-89S.

Bassetti, M.; Giacobbe, D. R.; Vena, A.; Wolff, M. 2019. *Diagnosis and Treatment of Candidemia in the Intensive Care Unit*. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 40(04), 524–539. doi:10.1055/s-0039-1693704.

Bassetti, M.; Peghin, M.; Timsit, J. F. 2020. *The current treatment landscape: candidiasis*. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(Suppl 1):i14-i22. Doi: 10.1093/jac/dkaa447.

Bates, D. W.; Su, L.; Yu, D. T.; Chertow, G. M.; Seger, D. L.; Gomes, D. R.; Dasbach, E. J.; Platt, R. 2001. *Mortality and costs of acute renal failure associated with amphotericin B therapy*. Clin. Infect. Dis., 32: 686-693.

BRASIL. Ministério da Saúde. Candidíase sistêmica. Brasília, 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/candidiase-sistemica-1>>. Acesso em: 20 de outubro de 2021.

Butler, G.; Rasmussen, M. D.; Lin, M. F.; Santos, M. A.; Sakthikumar, S.; Munro, C. A. 2009. *Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight Candida genomes*. Nature 459, 657–662. doi: 10.1038/nature08064.

Clancy, C. J.; F. Barchiesi; L. Falconi DiFrancesco; A. J. Morris; D. R. Snyderman; V. L. Yu; G. Scalise; M. H. Nguyen. 2000. *Clinical Manifestations and Molecular Epidemiology of Late Recurrent Candidemia, and Implications for Management*, 19(8), 585–592. doi:10.1007/s100960000335..

Caiana, R. R. A.; Santos, J. M. B.; Silva Júnior, J. P.; Silva, J. F.; Oliveira, W. A.; Freitas, J. C. R. 2020. *Síntese e avaliação antifúngica do benzil 2,3-didesoxi- α -D-eritro-hex-2-enopiranosídeo contra espécies de Candida spp. e estudo da associação com anfotericina B*. Archives Of Health Investigation, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 395-402, 20 abr. 2020. Archives of Health Investigation. <http://dx.doi.org/10.21270/archi.v9i5.4867>.

Calderone, R. A.; Fonzi, W. A. 2001. *Virulence factors of Candida albicans* Trends Microbiol. 2001;9(7):327-35. doi: 10.1016/s0966-842x(01)02094-7.

Canassa, A. L.; Cruz, D. T. 2019. *Candidemia incidence and susceptibility profile in a public hospital in Mato Grosso do Sul state, Brazil*. Rev. Bras. Pesq. Saúde, Vitória, 21(4): 110-117.

Catalán, M.; Montejo, J. C. 2006. *Antifúngicos sistêmico*. Farmacodinamica y farmacocinetica. Rev. Iberoamericana de Micología, 23: 39-49, 2006.

Chandra, J.; Ghannoum, M. A. 2017. *Flucytosine treatment and resistance mechanisms*. In: Mayers D, Sobel J, Ouellette M, Kaye K, Marchaim D. (eds) Antimicrobial Drug Resistance. Springer, Cham. p 407-13. Doi:10.1007/978-3-319-46718-4_28.

Charlier, C. 2006. *Fluconazole for the management of invasive candidiasis: where do we stand after 15 years?*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 57(3), 384–410. doi:10.1093/jac/dki473.

Chen, X.; Wang, Y.; Chen, Y.; Zhang, L.; Lin, X.; Zhu, X.; Chen, Q.; Chen, B. 2021. *Ocular candidiasis caused by Candida tropicalis: clinical characteristics and antifungal susceptibility*. Frontiers in Microbiology, 12, 6282201. Doi: 10.3389/fmicb.2021.628201.

Clements, J. S.; Peacock, J. E. 1990. *Amphotericin B revisited: reassessment of toxicity*. American Journal of Medicine 88, Suppl. 5N, 22N–7N.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved standard – 3 ed. CLSI document M27-A3, Wayne, Pennsylvania, USA, 2008.

Colombo, A. L.; Nucci, M.; Park, B. J.; Nouér, S. A.; Arthington-Skaggs, B.; Matta, D. A.; Warnock, D.; Morgan, J. 2006. *Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers*. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v.44, n.8, p.2816-2823.

Cornely, O. A.; Vehreschild, J. J.; Vehreschild, M. J.; Würthwein, G.; Arenz, D.; Schwartz, S.; Ullmann, A. J. 2007. *Phase II dose escalation study of the pharmacokinetics, safety, and tolerability of oral posaconazole in neutropenic patients with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 51(3), 958-963.

Costa, K. R.; Araújo, M. L.; Silva, M. B.; Monteiro, S. G.; Souza, L. B.; Fernandes, O. F. 2021. *Epidemiology of Candida spp. Infections in Brazilian tertiary care hospital*. Mycoses, 64(2), 166-172. Doi: 10.1111/myc.13210.

Cruz, L. I. B.; Lopes, L. F. F.; Ribeiro, F. C.; Sá, N. P.; Lino, C. I.; Tharmalingam, N.; Oliveira, R. B.; Rosa, C. A.; Mylonakis, E.; Fuchs, B.; Johann, S. 2018. *Anti-Candida albicans Activity of Thiazolylhydrazone Derivatives in Invertebrate and Murine Models*. Journal of Fungi, 4(4), 134. doi:10.3390/jof4040134.

Cursino, M. A.; Silva, W. J.; Melo, I. S. 2017. *Evaluation of virulence factors and antifungal susceptibility of candida spp. Isolated from dental prostheses*. BMC oral health, 17(1), 34.

Dallemagne, P.; Khanh, L. P.; Alsaidi, A.; Varlet, I.; Collot, V.; Paillet, M.; Bureau, R.; Rault, S. 2003. *Synthesis and biological evaluation of five-membered heterocycles fused to cyclopenta[c]thiophene as new antitumor agents*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 11, pp. 1161-1167.

Dantas, K. C. L.; Souza, F. G. C.; Barros, M. B. L.; Vasconcelos, L. R. S.; Lima-Neto, R. G. 2020. *Candidemia in patients with hematological malignancies: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality in a Brazilian cancer center*. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 24(5), 395-401. Doi:10.1016/j.bjid.2020.08.003.

De Nollin, S.; Borgers, M. 1975. *Scanning Electron Microscopy of Candida albicans After In Vitro Treatment with Miconazole*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 7(5), 704–711. doi:10.1128/aac.7.5.704.

Denning, D. W. 2003. *Echinocandin antifungal drugs*. The Lancet. vol 362, October 4, 2003, 362(9390), 0–1151. doi:10.1016/s0140-6736(03)14472-8.

Dornelas-Ribeiro, M.; Pinheiro, E. O.; Guerra, C.; Braga-Silva, L. A.; Carvalho, S. M. F. de; Santos, A. L. S. dos; Rozental, S.; Fracalanza, S. E. L. 2012. *Cellular characterisation of Candida tropicalis presenting fluconazole-related trailing growth*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 107(1), 31–38. doi:10.1590/s0074-02762012000100005.

Dozier, C. C.; Tarantola, R. M.; Jiramongkolchai, K.; Donahue, S. P. 2011. *Fungal eye disease at a tertiary care center: the utility of routine inpatient consultation*. Ophthalmology 118, 1671–1676. doi: 10.1016/j.opthta.2011.01.038.

EUCAST. 2000. *Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents*. Clin Microbiol Infect 6:503–508.

Fakhr, I. M.; Radwan, M. A.; El-Batran, S.; Abdel-Salam, O. M.; Elshenawy, S. M. 2008. *Synthesis and pharmacological evaluation of 2-substituted benzo[b]thiophenes as anti-inflammatory and analgesic agents*, European Journal of Medicinal Chemistry, Vol. 44, No. 4, pp. 1718-25.

Farias, C. D. S.; Trajano, I. M. R.; Júnior, J. N.; Rocha-Júnior, A. C. S.; Lima, Z. N. 2018. *Potencial antimicrobiano do dimetilsulfóxido (dmso) frente a diversas cepas bacterianas*. Anais III CONBRACIS. Campina Grande: Realize Editora. Disponível em: <<https://www.editorarealize.com.br/index.php/artigo/visualizar/41292>>. Acesso em: 06/10/2022.

Ferreira, I. C. F. R.; Calhelha, R.C.; Estevinho, L. M.; Queiroz, M. 2004. *Screening of antimicrobial activity of diarylamines in the 2,3,5-trimethylbenzo[b]thiophenes series: a structure-activity evaluation study*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol. 14, pp. 5831-5833.

Fogue, P. S.; Lungu, P. K.; Fondjo, E. S.; Tamokou, J. D. D.; Thaddée, B.; Tsemeugne, J.; Tchapi, A. T.; Kuiate, J. R. 2012. *Substituted 2-aminothiophenes: antifungal activities and effect on *Microsporium gypseum* protein profile*, 55(4), 0–0. doi:10.1111/j.1439-0507.2011.02089.x.

Forero, J. S. B.; Carvalho, E. M.; Junior, J. J.; Silva, F. M. 2011. *A New Protocol or The Synthesis of 2-Aminothiophenes Through The Gewald Reaction in Solvent-Free Conditions*. Heterocyclic Letters. Vol. 1, N°. 1, 61-67.

França, E. J. G.; Andrade, C. G. T. J.; Furlaneto-Maia, L.; Serpa, R.; Oliveira, M. T.; Quesada, R. M. B.; Furlaneto, M. C. 2011. *Ultrastructural Architecture of colonies of Different Morphologies Produced by Phenotypic Switching of a Clinical Strain of Candida tropicalis and biofilm formation by Variant Phenotypes*. Micron. v. 42, p. 726- 732.

Frans, M. V. L.; Jacques F. G. M. M.; Voss, A. 1999. *Nosocomial fungal infections: candidemia*. , 34(3), 0–220. doi:10.1016/s0732-8893(99)00035-8.

Gewald, K. 1965. *2-Amiono-thiophene aus α -oxo-mercaptanen undmethylenaktiven nitrilen*, Chemische Berichte, Vol. 98, pp. 3571-3577.

Gewald, K.; Schinke, E.; Bottcher, H. 1966. *2-Amiono-thiophene ausmethylenaktiven nitrilen, Carbonylverbindungen und schwefel*, ChemischeBerichte, Vol. 99, pp. 94-100. <https://doi.org/10.1002/cber.19660990116>.

Giolo, M. P.; Svidzinski, T. I. E. 2010. *Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia*. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, 46(3), 225–234. doi:10.1590/s1676-24442010000300009.

Gow, N. A. R.; Van de Veerdonk, F. L.; Brown, A. J. P.; Netea, M. G. 2017. *Fungal morphogenesis, from the polarized growth of hyphae to complex reproduction and infection structures*. Nature Reviews Microbiology, 15(9), 655-668. Doi: 10.1038/nrmicro.2017.42.

Grela, E.; Zdybicka-Barabas, A.; Pawlikowska-Pawlega, B.; Cytrynska, M.; Włodarczyk, M.; Grudziński, W.; Luchowski, R.; Gruszecki, W. I. 2019. *Modes of the antibiotic activity of amphotericin B against Candida albicans*. Sci Rep 9, 17029). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53517-3>.

Guimarães, G. P.; Reis, M. Y. F. A.; Silva, D. T. C.; Mendonça Junior, F. J. B.; Converti, A.; Pessoa Jr, A.; Damasceno, B. P. G. L.; Silva, J. A. 2014. *Antifungal activity of topical microemulsion containing a thiophene derivative*. Brazilian Journal of Microbiology, 45(2), 545–550. doi:10.1590/s1517-83822014000200024.

Gupta, A. K.; Cooper, E. A.; Ryder, J. E. 2008. *Terbinafine in the treatment of dermatophyte toenail onychomycosis: a meta-analysis of efficacy for continuous and intermitente regimens*. Journal of Cutaneous Medicine and Surgery, 12(6), 255-267.

Hamill, R. J. 2020. *Amphotericin B. Mechanism of Action: Pharmacology of Antifungal agents*. In Antimicrobial Drug Resistance (pp. 781-794). Humana, New York, NY. Doi: 10.1007/978-1-0716-0340-7_49.

Hirakawa, M. P.; Martinez, D. A.; Sakthikumar, S. 2015. *Genetic and phenotypic intra-species variation in Candida albicans*. Genome Res. 2015;25(3):413-425. Doi: 10.1101/gr.174623.114.

Hu,Y.; Wei, P.; Huang, H.; Han, S. Q.; Ouyang, P. K. 2006. *Synthesis of 2-Aminothiophenes on Ionic Liquid Phase Support using the Gewald Reaction*, Synthetic Communications, 36:11, 1543-1548, DOI: 10.1080/00397910600588819

Jain, N.; Jansone, I.; Obidenova, T.; Simanis, R.; Meisters, J.; Straupmane, D.; Reinis, A. 2021. *Epidemiological Characterization of Clinical Fungal Isolates from Pauls Stradiņš*

Clinical University Hospital, Latvia: A 4-Year Surveillance Report. *Life*, 11, 1002. <https://doi.org/10.3390/life11101002>.

Jha, K. K.; Kumar, S.; Isha, T.; Mishra, R. 2012. *Thiophene: the molecule of diverse medicinal importance*. *J. Pharm. Res*, v.5, p. 560-566.

Jones, J. M. 1990. *Laboratory diagnosis of invasive candidiasis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 3(1), 32–45. doi:10.1128/cmr.3.1.32.

Joule J. A.; Smith G. F. 1972. In: Van Norstrand Reinhold; *Heterocyclic Chemistry*; London.

Kanafani, Z. A.; Perfect, J. R. 2008. *Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact*. *Clinical Infectious Diseases*, 46(1), 120–128. doi:10.1086/524071.

Kao, A. S.; Brandt, M. E.; Pruitt, W. R.; Conn, L. A.; Perkins, B. A.; Stephens, D. S.; Baughman, W. S.; Reingold, A. L.; Rothrock, G. A.; Pfaller, M. A.; Pinner, R. W.; Hajjeh, R. A. 1999. *The Epidemiology of Candidemia in Two United States Cities: Results of a Population-Based Active Surveillance*. *Clinical Infectious Diseases*, 29(5), 1164–1170. doi:10.1086/313450.

Karnovsky, M. J. 1965. *A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron-microscopy*. *Journal of Cell Biology*, 27, 137-138A.

Katzung, B. G.; Masters, S. B.; Trevor, A. J. 2012. *Pharmacology Examination & Board Review*. 10 ed. New York (NY): Lange Medical Books/McGraw-Hill.

Kelly, S. L.; Arnoldi, A.; Kelly, D. E. 1993. *Molecular genetic analysis of azole antifungal mode of action*. *Biochemical Society Transactions*, 21(4), 1034–1038. doi:10.1042/bst0211034.

Khan, Z. U.; Al-Thani, A. A.; Al-Ansari, N.; Musher, D. M. 2020. *The virulence attributes and pathogenicity of Candida tropicalis from clinical and environmental origins*. *Virulence*, 11(1), 1116-1128. Doi: 10.1080/21505594.2020.1842918.

Khan, M. S.; Ahmad, I.; Alkhedhairy, A. A.; Alzohairy, M. A. 2021. *Candida albicans: a current review of its epidemiology, pathogenesis, and treatment options*. *Mycoses*, 64(8), 860-872. Doi: 10.1111/myc.13308.

Kneale, M.; Bartholomew, J. S.; Davies, E.; Denning, D. W. 2016. *Global access to antifungal therapy and its variable cost*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(12):3599-06. doi:10.1093/jac/dkw325.

Kontoyiannis, D. P.; Wessel, V. C.; Bodey, G. P. 2021. *Emerging and recent trends in the treatment of invasive fungal infections in cancer patients*. *Expert review of anticancer therapy*, 21(12), 1271-1280.

Kumar, M.; Sharma, R.; Prasad, R. 2021. *Candida tropicalis: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole*. Journal of Medical Microbiology, 70(6). Doi: 10.1099/jmm.0.001317.

Kurmach, M.; Yaremov, P.; Shven, O. 2022. *Cs-containing hierarchical zeolites as catalysts for Gewald reaction*. Materials Today: Proceedings Journal, Vol.62 (15), Pág. 7745-7750. doi:10.1016/j.matpr.2022.04.766.

Kurtzman, C. P.; Fell, W. F.; Boekhout, T.; Robert, V. 2011. *Methods for isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts*. In C.P. Kurtzman, J.W Fell, T. Boekhout. 5^o Edition. The Yeasts. A taxonomic study. Vol 1, pp. 87-107. Elsevier, London. doi:10.1016/b978-0-444-52149-1.00007-0.

Lachke, S. A.; Joly, S.; Daniels, K.; Soll, D. R., 2002. *Phenotypic switching and filamentation in Candida glabrata*. Microbiology 148, 2661–2674.

Lachke, S. A.; Srikantha, T.; Tsai, L. K.; Daniels, K.; Soll, D. R. 2000. *Phenotypic switching in Candida glabrata involves phase-specific regulation of the metallothionein gene MT-II and the newly discovered hemolysin gene HLP*. Infect. Immun. 68, 884–895.

Li, D.; Xia, R.; Zhang, Q.; Bai, C.; Li, Z.; Zhang, P. 2017. *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, 17(1). doi:10.1186/s12879-017-2636-x.

Liang, C.; Zhishu Tang, W. Q.; Chunyang, H. S. 2014, *Ultrasound-promoted synthesis of 2-aminothiophenes accelerated by DABCO utilizing PEG-200 as solvent*, Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, Vol. 6, No.4, pp. 798-802.

Lima, G. M. A.; Costa, L. S.; Silva, C. R.; Souza, L. K. H. 2021. *Ecology and pathogenicity of Candida tropicalis: A review*. Mycoses, 64(3), 215-227. Doi: 10.1111/myc.13231.

Lipke, P.N.; Ovalle, R. 1998. *Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges*. Journal of Bacteriology. v.180, n.15, p. 3735-3740.

Liss, R. H; Letourneau, R. J. 1989. *Fungispecificity of fluconazole against Candida albicans.*, 108(3), 173–178. doi:10.1007/bf00436222.

Liu, W.-L.; Lai, C.-C.; Li, M.-C.; Wu, C.; Ko, W.; Hung, Y.; Tang, H.; Hsueh, P. R. 2017. *Clinical manifestations of candidemia caused by uncommon Candida species and antifungal susceptibility of the isolates in a regional hospital in Taiwan, 2007–2014*. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, (), S1684118217301883–. doi:10.1016/j.jmii.2017.08.007.

Liu, Y.; Zhang, L.; Wang, X. 2020. *Global epidemiology of candidemia: review of incidence, disease characteristics, and outcomes*. Rev Infect Dis. Jul 16;72(4):672-683. Doi: 10.1093/infdis/jiaa330.

Lockhart, S. R.; Etienne, K. A.; Vallabhaneni, S.; Farooqi, J.; Chowdhary, A.; Govender, N. P.; Colombo, A. L.; Calvo, B.; Cuomo, C. A.; Desjardins, C. A.; Berkow, E. L.; Castanheira, M.; Magobo, R. E.; Jabeen, K.; Asghar, R. J.; Meis, J. F.; Jackson, B.; Chiller, T.; Litvintseva, A. P. 2016. *Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant Candida auris on three Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses*. Clinical Infectious Diseases. Jan 15;64(2):134-140. doi: 10.1093/cid/ciw691. Epub 2016 Oct 20. Erratum in: Clin Infect Dis. 2018 Aug 31;67(6):987. PMID: 27988485; PMCID: PMC5215215.

Lott, T. J.; Kuykendall, R. J.; Welbel, S. F.; Pramanik, A.; Lasker, B. A., 1993. *Genomic heterogeneity in the yeast Candida parapsilosis*. Curr. Genet. 23, 463–467.

Luber, A. D.; Maa, L.; Lam, M.; Guglielmo, B. J. 1999. *Risk factors for amphotericin B-induced nephrotoxicity*. J Antimicrob Chemother. 43(2):267-71. doi:10.1093/jac/43.2.267.

Lupetti, A.; Danesi, R.; Campa, M.; Del Tacca, M.; Kelly, S. 2002. *Molecular basis of resistance to azole antifungals*. Trends Mol Med, v. 8, n. 2, p. 76-81, doi:10.1016/s1471-4914(02)02280-3.

Mayr, A; Lass-Flörl, C. 2011. *Epidemiology and antifungal resistance in invasive aspergillosis according to primary disease - review of the literature*. European Journal of Medical Research, 16(4), 153–. doi:10.1186/2047-783x-16-4-153

Mekheimer, R. A.; Ameen, M. A.; Sadek, K. U. 2008. *Solar thermochemical reactions III: Synthesis of 2-aminothiophenes via Gewald reaction induced by solar thermal energy*. , 19(7), 788–790. doi:10.1016/j.cclet.2008.04.041.

Mendonça Junior, F. J. B.; Lima-Neto, R. G.; Oliveira, T. B.; Lima, M. C. A.; Pitta, I. R.; Galdino, S. L.; Cruz, R. M. D.; Araújo, R. S. A.; Neves, R. P. 2011. *Synthesis and evaluation of the antifungal activity of 2-(substituted-amino)-4,5-dialkyl-thiophene-3-carbonitrile derivatives*. Lat Am J Pharm 30:1492-1499.

Mikulska, M.; Del Bono, V.; Ratto, S.; Viscoli, C. 2012. *Occurrence, presentation and treatment of candidemia*. Expert Review of Clinical Immunology, 8(8), 755–765. doi:10.1586/eci.12.52.

Miller, M. G.; Johnson, A. D. 2002. *White-Opaque Switching in Candida albicans Is Controlled by Mating-Type Locus Homeodomain Proteins and Allows Efficient Mating*. Cell, 110(3), 293–302. doi:10.1016/s0092-8674(02)00837-1.

Mishra, N. N.; Ali, S.; Shukla, P. K. 2021. *Candida infections and therapeutic strategies: Mechanisms of action for traditional and alternative agents*. Pharmacological Research, 169, 105636. Doi: 10.1016/j.phrs.2021.105636.

Mojtahedi, M. M.; Abaee, M. S.; Mahmoodi, P.; Adib, M. 2010. *Convenient Synthesis of 2-Aminothiophene Derivatives by Acceleration of Gewald Reaction Under Ultrasonic Aqueous Conditions*. Synthetic Communications, 40:14, 2067-2074, DOI: 10.1080/00397910903219435.

Mora Carpio, A. L.; Climaco, A. 2019. *Candidiasis, fungemia*. StatPearls Publishing LLC.

Murray, P. R.; Rosenthal, K. S.; Pfaller, M. A. 2014. Microbiologia Médica, 6. ed. e 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier.

Nagaraja, P.; Mathew, T.; Shetty, D. 2005. *Candida tropicalis* causing prosthetic valve endocarditis. *Indian J. Med. Microbiol.* 23:139. doi: 10.4103/0255-0857.16059.

Nandi, S.; Swain, B.; Jha, T.; Mishra, A.; Mishra, B. B. 2017. *Synthesis and antifungal activity of thiophene-based 1, 2, 3-triazoles*. European Journal of Medicinal Chemistry, 125, 62-70.

Oliveira, V. D. S.; Cruz, M. M.; Bezerra, G. S.; Silva, N. E. S.; Nogueira, F. H. A.; Chaves, G. M.; Sobrinho, J. L. S.; Mendonça-Junior, F. J. B.; Damasceno, B. P. G. L.; Converti, A.; Lima, Á.A.N.d. *Chitosan-Based Films with 2-Aminothiophene Derivative: Formulation, Characterization and Potential Antifungal Activity*. Mar. Drugs 2022, 20, 103. doi: 10.3390/md20020103.

Ostrosky-Zeichner, L.; Habel, L. A.; Torres, J. 2021. *Candidemia hospital costs: a multicenter study*. Clin Infect Dis. 2021;72(Suppl 2): S121-S127. Doi: 10.1093/cid/ciaa1627.

Pappas, P. G.; Lionakis, Michail S.; Arendrup, Maiken Cavling; Ostrosky-Zeichner, Luis; Kullberg, Bart Jan. 2018. *Invasive candidiasis*. Nature Reviews Disease Primers, 4(), 18026–. doi:10.1038/nrdp.2018.26.

Pereira, M. F.; Rossi, F.; Patussi Correia, K.; Alves da Cunha, M. A.; Passos Ximenes, V. F.; Guerra, A. M. S.; Colombo, A., L. 2019. *Distribution and antifungal susceptibility profiles of Candida species causing candidemia in a Brazilian tertiary care hospital*. BMC Infectious Diseases, 19(1), 1-8. Doi: 10.1186/s12879-019-4038-0.

Perlin, D. S; Rautemaa-R., R.; Alastruey-I., A. 2017. *The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management*. The Lancet Infectious Diseases, (), S147330991730316X–. doi:10.1016/S1473-3099(17)30316-X.

Phongpaichit, S.; Mackenzie, D. W. R.; Fraser, C. 1998. *Strain differentiation of Candida albicans by morphotyping*. Epidemiology and Infection, 99(02), 421–428. doi:10.1017/s0950268800067911.

Poulakou, G.; Bassetti, M. 2021. *Candidemia: epidemiology, risk factors and outcomes*. Current opinion in infectious diseases, 34(4), 315-320.

Prasad, R. (Ed.). 2017. *Candida albicans: Cellular and Molecular Biology*. doi:10.1007/978-3-319-50409-4.

Prasad, R.; Shah, A. H.; Rawal, M. K. 2016. *Antifungals: mechanism of action and drug resistance*. Yeast Membrane Transport, p. 327-349. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25304-6_14.

Puterová, Z.; Krutosikova, A.; Vegh, D. 2009. *Applications substituted 2-aminothiophenes in drug design*, Nova Biotechnological, Vol .9, No. 2, pp. 167-173

Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J.; Henderson, G. 2011. Rang Dale - Farmacologia. Ed. 7. Rio de Janeiro. Elsevier. p. 768.

Russell, R. K.; Press, J. B.; Rampulla, R. A.; McNally, J. J.; Falotico, R.; Keiser, J. A.; Bright, D. A.; Tobia, A. 1988. *Thiophene systems. 9. Thienopyrimidinedione derivatives as potential antihypertensive agents*. Journal of Medicinal Chemistry, 31(9), 1786–1793. doi:10.1021/jm00117a019.

Sanglard, D.; Ischer, F.; Koymans, L. Bille, J. 1998. *Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 α -demethylase (CYP51A1) from azole-resistant Candida albicans clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents*. Antimicrob Agents Chemother 42, 241-253.

Sanguinetti, M.; Posteraro, B.; Lass-Flörl, C.; Antachopoulos, C. 2021. *Advances in the diagnosis of candidemia and the role of non-culture based methods*. International journal of molecular sciences, 22(14), 7659. doi: 10.3390/ijms22147659

Scully, E. P.; Fidel, P. L. 2021. *Factors promoting Candida infections*. Current Opinion in Microbiology, 62, 65-70. Doi: 10.1016/j.mib.2021.02.005.

Seervai, R. N. H.; Jones, S. K. Jr.; Hirakawa, M. P.; Porman, A. M.; Bennett, R. J. 2013. *Parasexuality and ploidy change in Candida tropicalis*. Eukaryot. Cell 12, 1629–1640. doi: 10.1128/EC.00128-13.

Shah, R.; Verma, P. K. 2018. *Therapeutic importance of synthetic thiophene*. Chemistry Central Journal, 12(1). doi:10.1186/s13065-018-0511-5

Sharma, A.; Srivastava, S. 2014. *Anti-Candida activity of two-peptide bacteriocins, plantaricins (Pln E/F and J/K) and their mode of action*. Fungal Biology, 118(2), 264–275. doi:10.1016/j.funbio.2013.12.006.

Shear, N. H.; Villars, V. V.; Marsolais, C. 1991. *Terbinafine: An oral and topical antifungal agent*. Clinics in Dermatology, 9(4), 487–495. doi:10.1016/0738-081X(91)90077-X.

Slutsky, B.; Buffo, J.; Soll, D. 1985. *High-frequency switching of colony morphology in Candida albicans*. Science, 230(4726), 666–669. doi:10.1126/science.3901258 - https://sci-hub.se/10.1126/science.3901258.

Soll, D.R. 1992. *High-frequency switching in Candida albicans*. Clin. Microbiol. Rev. 5, 183–203.

Soll, D.R. 2009. *Why does Candida albicans switch?* FEMS Yeast Res. 9, 973–989. Doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00562.x.

Soll, D.R.; Morrow, B.; Srikantha, T. 1993. *High frequency phenotypic switching in Candida albicans*. Trends Genet. 9, 61–65.

Soll, D.R.; Staebell, M.; Langtimm, C.; Pfaller, M.; Hicks, J.; Gopala Rao, T.V. 1988. *Multiple Candida strains in the course of a single systemic infection*. J. Clin. Microbiol. 26, 1448–1459.

Sridhar, M.; Rao, R. M.; Baba, N. H. K.; Kumbhare, R. M. 2007. *Microwave accelerated Gewald reaction: synthesis of 2-aminothiophenes*, 48(18), 3171–3172. doi:10.1016/j.tetlet.2007.03.052.

Sudbery, P.; Gow, N.; Berman, J. 2004. *The distinct morphogenic states of Candida albicans.*, TRENDS in Microbiology Vol.12 No.7 July 2004. 12(7), 0–324. doi:10.1016/j.tim.2004.05.008.

Suzuki, T.; Miyamae, Y.; Ishida, I. 1991. *Variation of colony morphology and chromosomal rearrangement in Candida tropicalis pK233*. J Gen Microbiol 137, 7.

Takahashi, T.; Hagiwara, S.; Sakurai, A.; Kusaka, A.; Kuroda, M.; Hirayama, T.; Miyazaki, T.; Nakamura, S.; Kakeya, H. 2021. *Emerging trends in candidemia caused by Candida tropicalis: a retrospective analysis of a 10-year period*. Medical Mycology, 59(5), 466–474. Doi: 10.1093/mmy/myaa121.

Tietze, L. F.; Modi, A.; Konig, S. 2021. *The 2-Aminothiophene Scaffold as a Versatile Tool in Medicinal Chemistry*. Molecules, 26(10), 3107. Doi:10.3390/molecules26103107.

Vandeputte, P.; Ferrari, S.; Coste, A. T. 2012. *Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections*. International Journal of Microbiology, 1–26. doi:10.1155/2012/713687.

Vasconcelos, L. C. de.; Sampaio, F. C.; Albuquerque, A. de J. dos R.; Vasconcelos, L. C. de S. 2013. *Cell Viability of Candida albicans Against the Antifungal Activity of Thymol*.

Brazilian Dental Journal, 25 (Braz. Dent. J., 2014 25(4)). <https://doi.org/10.1590/0103-6440201300052>.

Verma, A. K.; Prasad, K. N. 2022. *Fungal infections in intensive care unit patients: epidemiology, risk factors and management strategies*. Current opinion in infectious diseases, 35(1), 41-50.

Vermes, A.; Guchelaar, H.-J.; Dankert, J. 2000. *Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 46(2), 171-179. <https://doi.org/10.1093/jac/46.2.171>.

Vicari, P.; Feitosa Pinheiro, R.; de Chauffaille, M. L.; Yamamoto, M.; Figueiredo, M. S. 2003. *Septic arthritis as the first sign of Candida tropicalis fungaemia in an acute lymphoid leukemia patient*. Braz. J. Infect. Dis. 7, 426–428. doi: 10.1590/S1413-86702003000600012.

Vicente, M. F.; Basilio, A.; Cabello, A.; Peláez, F. 2003. *Microbial natural products as a source of antifungals*. Clin.Microbiol. Infect., Oxford, v. 9, n. 1, p. 15-32, doi:10.1046/j.1469-0691.2003.00489.x.

Vieira, G. S.; Oliveira, V. F.; Melo, T. M.; Almeida, M. V.; Dias, M. L. 2021. *New compounds with antifungal activity based on 2-amino-thiophene structures*. Bioorganic Chemistry, 109, 104719.

Vogel, C.; Rogerson, A.; Schatz, S.; Laubach, H.; Tallman, A.; Fell, J. 2007. *Prevalence of yeasts in beach sand at three bathing beaches in South Florida*. Water Res 41, 1915–1920.

Webster, C. E.; Odds, F. C. 1988. *Growth of pathogenic Candida isolates anaerobically and under elevated concentrations of CO₂ in air*. J Med Vet Mycol. 1987 Feb;25(1):47-53. Erratum in: J Med Vet Mycol Feb;26(1):75. PMID: 3106612.

Yang, L.; Chen, S.; Wang, J.; Wu, X.; Zhang, X. 2018. *Projeto, síntese e avaliação biológica de derivados de hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico como potentes agentes antifúngicos*. Letter de química bioorgânica e medicinal, 28(9), 1506-1510.

Yang, L.; Chen, S.; Liu, Y.; Wu, X.; Zhang, X. 2017. *Desenho, síntese e avaliação biológica de derivados tiofeno-2,5-dicarboxamida como potentes agentes antifúngicos*. Letter de química bioorgânica e medicinal, 27(7), 1538-1542.

Yang, L.; Chen, S.; Liu, Y.; Wu, X.; Zhang, X. 2016. *Desenho, síntese e avaliação biológica de derivados tiofeno-2,4-dicarboxamida como potentes agentes antifúngicos*. Letter de química bioorgânica e medicinal, 26(2), 568-572.

Yapar, N.; Pullukcu, H.; Avkan-Oguz, V.; Sayin-Kutlu, S.; Ertugrul, B.; Sacar, S.; Cetin, B.; Kaya, O. 2011. *Evaluation of species distribution and risk factors of candidemia: a multicenter case-control study*. Med Mycol.49:26–31. doi: 10.3109/13693786.2010.501344.

Yasuda, H.; Izumi, N.; Shimada, O.; Kobayakawa, T.; Nakanishi, M. 1980. *The protective effect of tinoridine against carbon tetrachloride hepatotoxicity*. Toxicology and Applied Pharmacology, 52(3), 407–413. doi:10.1016/0041-008x(80)90335-x.

Yoon, S. A.; Vasquez, J. A.; Steffan, P. E.; Sobel, J. D.; Akins, R. A. 1999. *High-frequency, in vitro reversible switching of Candida lusitanae clinical isolates from amphotericin B susceptibility to resistance*. Antimicrob. Agents Chemother. 43, 836–845.

Zhou, L; Zhang, L.; Ding, K. 2015. *Synthesis and antifungal activity of novel thiophene derivatives*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 25(13), 2674-2676.

Zhou, L; Ding, K. 2016. *Synthesis and antifungal activity of novel thiophene derivatives containing 1, 2, 4-triazole moiety*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 26(13), 3159-3161.

Zida, A.; Bamba, S.; Yacouba, A.; Ouedraogo-Traore, R.; Guiguemdé, R. T. 2016. *Anti-Candida albicans natural products, sources of new antifungal drugs: A review*. Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology, (), S1156523316302220-. Doi:10.1016/j.mycmed.2016.10.002.

Zuza-Alves, D. L.; Silva-Rocha, W. P.; Chaves, G. M. 2017. *An update on Candida tropicalis based on basic and clinical approaches*. Frontiers in Microbiology; 8:1927. doi:10.3314/jjmm.47.231.

APÊNDICE - ANÁLISE ESTATÍSTICA

```
ONEWAY /VARIABLES= MIC BY Grupo
      /STATISTICS=DESCRIPTIVES HOMOGENEITY .
```

Descritivas

Grupo	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	95% Confidence Interval for Mean		Mínimo	Máximo
					Intervalo inferior	Intervalo superior		
MIC 1	5	193,12	144,47	64,61	13,73	372,51	70,70	400,00
2	5	17,10	12,46	5,57	1,63	32,57	8,40	35,30
3	5	230,68	184,66	82,58	1,39	459,97	35,30	400,00
4	5	226,24	77,45	34,64	130,08	322,40	141,40	282,80
5	5	74,16	44,13	19,74	19,36	128,96	17,30	141,40
6	5	249,68	109,82	49,11	113,32	386,04	141,40	400,00
Total	30	165,16	135,35	24,71	114,62	215,71	8,40	400,00

Test of Homogeneity of Variances

	Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
MIC	8,39	5	24	,000

ANOVA

		Soma dos quadrados	df	Mean Square	F	Sig.
MIC	Between Groups	230759,0	5	46151,79	3,69	,013
	Within Groups	300534,6	24	12522,27		
	Total	531293,5	29			

```
ONEWAY /VARIABLES= MIC BY Grupo
      /STATISTICS=DESCRIPTIVES HOMOGENEITY
      /POSTHOC=TUKEY .
```

Descritivas

Grupo	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	95% Confidence Interval for Mean		Mínimo	Máximo
					Intervalo inferior	Intervalo superior		
MIC 1	5	193,12	144,47	64,61	13,73	372,51	70,70	400,00
2	5	17,10	12,46	5,57	1,63	32,57	8,40	35,30
3	5	230,68	184,66	82,58	1,39	459,97	35,30	400,00
4	5	226,24	77,45	34,64	130,08	322,40	141,40	282,80
5	5	74,16	44,13	19,74	19,36	128,96	17,30	141,40
6	5	249,68	109,82	49,11	113,32	386,04	141,40	400,00
Total	30	165,16	135,35	24,71	114,62	215,71	8,40	400,00

Test of Homogeneity of Variances

	Estatística de Levene	df1	df2	Sig.
MIC	8,39	5	24	,000

ANOVA

		Soma dos quadrados	df	Mean Square	F	Sig.
MIC	Between Groups	230759,0	5	46151,79	3,69	,013
	Within Groups	300534,6	24	12522,27		
	Total	531293,5	29			

Multiple Comparisons (MIC)

	(J) Family	(J) Family	Mean Difference (I - J)	Erro padrão	Sig.	95% Confidence Interval	
						Intervalo inferior	Intervalo superior
Tukey HSD	1	2	176,02	70,77	,168	-42,81	394,85
		3	-37,56	70,77	,994	-256,39	181,27
		4	-33,12	70,77	,997	-251,95	185,71
		5	118,96	70,77	,557	-99,87	337,79
		6	-56,56	70,77	,965	-275,39	162,27
	2	1	-176,02	70,77	,168	-394,85	42,81
		3	-213,58	70,77	,059	-432,41	5,25
		4	-209,14	70,77	,067	-427,97	9,69
		5	-57,06	70,77	,964	-275,89	161,77
		6	-232,58	70,77	,033	-451,41	-13,75
	3	1	37,56	70,77	,994	-181,27	256,39
		2	213,58	70,77	,059	-5,25	432,41
		4	4,44	70,77	1,000	-214,39	223,27
		5	156,52	70,77	,269	-62,31	375,35
		6	-19,00	70,77	1,000	-237,83	199,83
	4	1	33,12	70,77	,997	-185,71	251,95
		2	209,14	70,77	,067	-9,69	427,97
		3	-4,44	70,77	1,000	-223,27	214,39
		5	152,08	70,77	,297	-66,75	370,91
		6	-23,44	70,77	,999	-242,27	195,39
	5	1	-118,96	70,77	,557	-337,79	99,87
		2	57,06	70,77	,964	-161,77	275,89
		3	-156,52	70,77	,269	-375,35	62,31
		4	-152,08	70,77	,297	-370,91	66,75
		6	-175,52	70,77	,170	-394,35	43,31
	6	1	56,56	70,77	,965	-162,27	275,39
		2	232,58	70,77	,033	13,75	451,41
		3	19,00	70,77	1,000	-199,83	237,83
		4	23,44	70,77	,999	-195,39	242,27
		5	175,52	70,77	,170	-43,31	394,35