



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

JULIE MORAES DE LIMA

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE COMPOSTOS DERIVADOS DE TIOFENOS
FRENTE A ESPÉCIES DE *Candida*

Recife
2025

JULIE MORAES DE LIMA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE COMPOSTOS DERIVADOS DE TIOFENOS
FRENTE A ESPÉCIES DE *Candida***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de mestre(a) em Medicina Tropical.
Área de concentração: Medicina Tropical

Orientadora: Profa. Dra. Rejane Pereira Neves

Coorientador: Dr. Cícero Pinheiro Inácio

Recife

2025

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Lima, Julie Moraes de.

Atividade antifúngica de compostos derivados de tiofenos frente a espécies de *Candida* / Julie Moraes de Lima. - Recife, 2025.

77f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Médicas, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2025.

Orientação: Rejane Pereira Neves.

Coorientação: Cícero Pinheiro Inácio.

Inclui referências.

1. *Candida*; 2. Antifúngicos; 3. Tiofenos; 4. Azóis; 5. PCR.
I. Neves, Rejane Pereira. II. Inácio, Cícero Pinheiro. III.
Título.

UFPE-Biblioteca Central

JULIE MORAES DE LIMA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE COMPOSTOS DERIVADOS DE TIOFENOS
FRENTE A ESPÉCIES DE *Candida***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de mestre(a) em Medicina Tropical.
Área de concentração: Medicina Tropical

Aprovada em: 26/02/2025

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Rejane Pereira Neves (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Carolina Maria da Silva (Examinadora Externa)
Universidade de Pernambuco - UPE

Prof^a. Dr^a. Julliana Ribeiro Alves dos Santos (Examinadora Externa)
Universidade de Pernambuco - UPE

Aos meus amados pais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gratidão à Deus por abençoar e iluminar em todos os momentos escuros, por toda força e sabedoria durante toda minha trajetória.

À minha mãe, Marlene e ao meu pai, Júlio (*in memoriam*), por todo amor, carinho e apoio, sempre acreditando em mim.

À professora Dra. Rejane Pereira Neves e ao Dr. Cícero Pinheiro Inácio, por toda orientação, aprendizado proporcionado e auxílio na realização deste trabalho.

A todos do Laboratório de Micologia Médica, mas principalmente, a Isabelly, Giovana, Alice e Mário, por tornarem essa jornada mais leve e também por todos os ensinamentos e colaboração nos experimentos. Também gostaria de agradecer pela ajuda da Dra. Bruna Rodrigues e Dra. Daniela Buonafina pelos ensinamentos sobre os testes de susceptibilidade e as técnicas Raquel e Débora por todo auxílio.

Aos meus colegas de mestrado, agradeço por todo convívio e conhecimentos trocados durante as disciplinas.

A todos os meus amigos, que sempre estão comigo, me aconselham, me apoiam, me animam e vibram com meu crescimento.

À Universidade Federal de Pernambuco, ao Departamento de Micologia e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical pelo apoio de infraestrutura e científico.

Ao órgão de fomento, Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) por proporcionar a concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro.

Aos responsáveis pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do Instituto Keizo Asami (iLIKA/UFPE), especialmente aos técnicos Gabriel, Jana e Rafael por toda ajuda na realização das análises de microscopia com tamanha disponibilidade, simpatia e dedicação.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade para avaliação e contribuição para o aperfeiçoamento desta pesquisa.

Minha profunda gratidão a todos que participaram, mesmo que apenas um pouco, mas foram essenciais nessa trajetória.

“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é, senão, uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

O gênero *Candida* compreende um grupo com diversas espécies de leveduras, que podem ser comensais ou patogênicas para os seres humanos. Nos últimos anos, há um aumento no número de infecções ocasionadas por espécies de *Candida*, como também o crescimento no número de cepas resistentes aos antifúngicos convencionais utilizados na prática clínica, assim, limitando a disponibilidade de opções para o tratamento e contribuindo para um pior prognóstico do paciente. Além disso, esses antifúngicos apresentam significativa toxicidade e efeitos colaterais, como também variação em sua eficácia frente às espécies. Desta maneira, torna-se fundamental a pesquisa por novas moléculas que possuam eficiente inibição contra o crescimento fúngico, especialmente, de cepas resistentes. Nesse contexto, os derivados tiofenos são compostos heterocíclicos que possuem atividade *in vitro* contra espécies de leveduras e fungos filamentosos. Com base no exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial farmacológico de novos compostos derivados de tiofeno frente às espécies de *Candida*, estocados na Coleção de Culturas Micoteca URM/UFPE. Para a análise, foram selecionados 25 isolados das espécies de *Candida*. Em seguida, os isolados foram semeados em Meio Ágar Sabouraud e realizadas a autenticação taxonômica das espécies através do sequenciamento parcial do gene da região LSU 28S do rDNA. Bem como, foram submetidos aos testes de susceptibilidade antifúngica frente ao fluconazol e aos compostos derivados de tiofeno (6CN, 7CN, 5B200 e 7CN12) pelo método de microdiluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), como também, o teste de tabuleiro de xadrez, no qual foram testados ambos em associação, para a determinação da Concentração Inibitória Fracionada (FIC). Além disso, foi realizado a visualização das estruturas celulares fúngicas por meio da microscopia eletrônica de transmissão para análise dos prováveis aspectos de ação ocasionados pelos derivados tiofeno. A identificação molecular demonstrou que mais de 60% das espécies foram divergentes da identificação fenotípica prévia. Para os testes com o fluconazol, constataram 5 isolados resistentes de *Candida não-albicans*. Os compostos 6CN e 7CN foram os derivados tiofenos que apresentaram resultados mais significativos de inibição do crescimento fúngico, com variações de CIM entre 16µg/mL à 1024 µg/mL. A ação do fluconazol em

combinação com os compostos 6CN e 7CN demonstraram interação sinérgica em mais de 60% e 80% dos isolados, respectivamente. A visualização no microscópio eletrônico de transmissão demonstrou alterações celulares como irregularidades da membrana plasmática e nuclear, espessamento da membrana plasmática e intensa vacuolização do citoplasma. Portanto, conclui-se que as cepas de *Candida albicans* apresentaram sensibilidade ao fluconazol e as espécies *Candida pseudohaemulonii*, *Candida haemulonii* e *Candida parapsilosis* stricto sensu apresentaram resistência. Ademais, foi verificado que os compostos derivados de tiofeno testados demonstraram maior ação fungistática do que fungicida. A interação sinérgica entre as moléculas evidenciou que a associação dos dois compostos resultou em um efeito maior de inibição do crescimento fúngico do que a inibição apresentada individualmente. A microscopia eletrônica de transmissão demonstrou que os derivados tiofenos apresentaram ação significativa na estrutura da célula fúngica, com visualização pela primeira vez da ocorrência de intensa vacuolização citoplasmática, indicando apoptose celular.

Palavras-Chaves: *Candida*; antifúngicos; tiofenos; azóis; PCR.

ABSTRACT

The *Candida* genus comprises a group of diverse yeast species, which can be commensal or pathogenic to humans. In recent years, there has been an increase in the number of infections caused by *Candida* species, as well as an increase in the number of strains resistant to the conventional antifungal drugs used in clinical practice, thus limiting the availability of treatment options and contributing to a worse prognosis for the patient. In addition, these antifungals have significant toxicity and side effects, as well as varying efficacy from species to species. This makes it essential to search for new molecules that can efficiently inhibit fungal growth, especially resistant strains. In this context, thiophene derivatives are heterocyclic compounds that have in vitro activity against yeast species and filamentous fungi. Based on the above, the aim of this study was to evaluate the pharmacological potential of new compounds derived from thiophene against *Candida* species stored in the URM/UFPE Mycotheque Culture Collection. For the analysis, 25 isolates of *Candida* species were selected. The isolates were then seeded on Sabouraud agar medium and the taxonomic authentication of the species was carried out through partial sequencing of the LSU 28S rDNA gene. They were also subjected to antifungal susceptibility tests against fluconazole and thiophene-derived compounds (6CN, 7CN, 5B200 and 7CN12) using the broth microdilution method to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), as well as the checkerboard test, in which both were tested in combination to determine the Fractional Inhibitory Concentration (FIC). In addition, the fungal cell structures were visualized using transmission electron microscopy to analyze the probable aspects of action caused by the thiophene derivatives. Molecular identification showed that more than 60% of the species differed from the previous phenotypic identification. The tests with fluconazole found 5 resistant isolates of *Candida non-albicans*. Compounds 6CN and 7CN were the thiophene derivatives that showed the most significant results in inhibiting fungal growth, with MIC variations between 16 µg/mL and 1024 µg/mL. The action of fluconazole in combination with compounds 6CN and 7CN showed synergistic interaction in more than 60% and 80% of the isolates, respectively. Visualization under the transmission electron microscope showed cellular alterations such as irregularities in the plasma and nuclear membranes, thickening of the plasma membrane and

intense vacuolization of the cytoplasm. It can therefore be concluded that the *Candida albicans* strains showed sensitivity to fluconazole and the *Candida pseudohaemulonii*, *Candida haemulonii* and *Candida parapsilosis* stricto sensu species showed resistance. In addition, it was found that the thiophene-derived compounds tested showed greater fungistatic action than fungicidal action. The synergistic interaction between the molecules showed that the combination of the two compounds resulted in a greater inhibition of fungal growth than the inhibition presented individually. Transmission electron microscopy showed that the thiophene derivatives had a significant effect on the structure of the fungal cell, with intense cytoplasmic vacuolization being seen for the first time, indicating cell apoptosis.

Keywords: *Candida*; antifungals; thiophenes; azoles; PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Desenho esquemático da distribuição dos fármacos na placa de microtitulação para o teste de tabuleiro de xadrez	39
Figura 2 - Cálculo da Concentração Inibitória Fracionada (FIC)	40
Figura 3 - Micrografia do controle dos isolados ATCC750 e URM6555 de <i>Candida tropicalis</i> e <i>Candida haemulonii</i> , respectivamente, sem alterações estruturais	54
Figura 4 - Micrografia do isolado ATCC750 tratado com o derivado tiofeno 6CN	55
Figura 5 - Micrografia do isolado URM6555 tratado com o derivado tiofeno 6CN	56
Figura 6 - Micrografia do isolado ATCC750 tratado com o derivado tiofeno 7CN	57
Figura 7 - Micrografia do isolado URM6555 tratado com o derivado tiofeno 7CN	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação dos isolados selecionados com seus respectivos códigos de identificação da Micoteca/URM e suas espécies.	34
Tabela 2- Isolados de <i>Candida</i> da Micoteca URM e suas respectivas identificações fenotípicas prévias e confirmação genotípica	41
Tabela 3 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL dos isolados de <i>Candida</i> frente ao fluconazol com inibição de 50%.....	43
Tabela 4 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL dos isolados de <i>Candida</i> frente aos compostos 6CN e 7CN com inibições de 100% e 50%	47
Tabela 5 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL dos isolados de <i>Candida</i> frente aos compostos SB200 e 7CN12 com inibições de 100% e 50%	49
Tabela 6 - Determinação da Concentração Inibitória Fracionada (FIC) em µg/mL dos isolados de <i>Candida</i> frente aos compostos em combinação com o fluconazol	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
CTAB	Brometo de Cetrimônio
DDH ₂ O	Água Bidestilada
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNTP	Ácido Desoxirribonucleotídeo Polimerase
FIC	Concentração Inibitória Fracionada
FLU	Fluconazol
GELRED	Corante de ácido nucleico fluorescente
GLB	Green Loading Buffer
LSVM	Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MILIQ	Água ultrapura
MGCL ₂	Cloreto de Magnésio
MOPS	Ácido 3-[N-Morfolino] propanosulfônico
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação de Cadeia Polimerase
PES	Polietersulfona
pH	Potencial Hidrogeniônico
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute
SAPs	Proteases Aspárticas Segregadas
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TAQ	DNA Ácido Desoxirribonucleico Polimerase
URM	Coleção de Culturas Micoteca

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 GÊNERO <i>Candida</i>	18
2.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	23
2.3 MECANISMOS DE VIRULÊNCIA	24
2.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA	26
2.5 DROGAS ANTIFÚNGICAS	28
2.5.1 Polienos	28
2.5.2 Equinocandinas	28
2.5.3 Azólicos	29
2.6 DERIVADOS TIOFENOS	31
2.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	32
3 DEFINIÇÃO DE OBJETOS	33
3.1 OBJETIVO GERAL	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 SELEÇÃO E OBTENÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS	34
4.2 AUTENTICAÇÃO TAXONÔMICA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	35
4.2.1 Extração e Quantificação do DNA	35
4.2.2 Reação em Cadeia de Polimerase	35
4.3 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>in vitro</i> DOS ISOLADOS FRENTE AO FLUCONAZOL E AOS DERIVADOS TIOFENOS	36
4.3.1 Preparação e padronização dos inóculos	37
4.3.2 Fluconazol	37

4.3.3 Compostos Derivados dos Tiofenos	37
4.3.4 Procedimentos do teste de susceptibilidade antifúngica <i>in vitro</i>.....	38
4.4 ESTUDO DE INTERAÇÃO DOS TIOFENOS COM O FLUCONAZOL ATRAVÉS DO MÉTODO TABULEIRO DE XADREZ.....	38
4.5 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	41
5.2 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE COM O FLUCONAZOL.....	42
5.3 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE COM OS DERIVADOS TIOFENOS	46
5.4 AVALIAÇÃO DO SINERGISMO ENTRE O FLUCONAZOL E OS DERIVADOS TIOFENOS	51
5.5 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS ...	53
6 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas tornaram-se um importante problema de saúde pública, devido ao expressivo aumento no número de casos, como também, o crescimento de cepas resistentes (Perlin *et al.*, 2017; Verma; Prasad, 2022). As espécies de *Candida* são fungos heterotróficos que necessitam de energia através da lise de moléculas orgânicas, principalmente, carboidratos. Reproduzem-se de forma assexuada por meio de brotamento (Tortora *et al.*, 2000). São fungos que podem ser comensais ou patogênicos, devido a condições favoráveis de desequilíbrio microbiano ou alterações no sistema imunológico do hospedeiro, podem se comportarem como patógenos oportunistas (Bongomin *et al.*, 2020).

O gênero *Candida* é constituído por cerca de 200 espécies de leveduras, que ocasionam infecções fúngicas tanto superficiais como sistêmicas, sendo as de maior interesse médico as espécies: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida Krsusei*, *Candida lusitaniae* e *Candida auris*. Dentre essas espécies, a *C. albicans* é a espécie mais comumente associada a quadros de infecções fúngicas. Entretanto, recentemente tem sido observado um aumento no crescimento de infecções fúngicas hospitalares ocasionadas por espécies de *Candida não-albicans* (Costa, 2020; Rather *et al.*, 2021).

A identificação é comumente realizada através de métodos fenotípicos, como a cultura. No entanto, há métodos mais rápidos e precisos, como métodos moleculares, por exemplo, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que utiliza enzimas sintéticas ou inibidores (primers) para amplificação exponencial de sequências específicas. E o método por espectrometria de massa que utiliza o equipamento MALDI-TOF, produz um perfil proteico exclusivo de cada microrganismo, comparando com base de dados para identificação das espécies (Hassanopour *et al.*, 2023; Maldonado *et al.*, 2017; Siller-Ruiz *et al.*, 2017).

As espécies de *Candida* expressam diversos fatores de virulência que auxiliam seu potencial de infecção, como a transição da fase leveduriforme para filamentosa, as enzimas hidrolíticas, as proteinases e os mecanismos de evasão do reconhecimento do sistema imunológico (Lopes; Lionakis, 2022; Bohner *et al.*, 2022). Devido à sua plasticidade, algumas espécies possuem grande capacidade de desenvolverem resistência aos antifúngicos. Fatores como períodos prolongados de internação e tratamento, a formação de biofilme, a mutação ou super expressão de

enzimas alvos dos fármacos e a ativação de genes que codificam as bombas de efluxo, favorecem o desenvolvimento da resistência antifúngica (Revie *et al.*, 2018).

Para o tratamento de infecções sistêmicas, atualmente, existem três grupos de antifúngicos mais utilizados na prática clínica. A classe dos polienos, representados principalmente pela anfotericina B, a classe das equinocandinas, representadas pela caspofungina, anidulafungina, micafungina e rezafungina, a classe dos azólicos, representado principalmente pelo fluconazol (Borges *et al.*, 2021).

Destes agentes antifúngicos, o fluconazol é a terceira opção terapêutica segundo recomendação da ANVISA, sendo o antifúngico da classe dos azólicos mais utilizado na prática clínica devido a boa absorção oral, o amplo espectro de ação e baixo custo (Paramythiotou *et al.*, 2014). Porém, apesar da boa tolerância nos pacientes, pode ocasionar hepatotoxicidade. Devido a sua ação fungistática, com inibição do crescimento fúngico, mas, sem eliminá-los definitivamente, ao decorrer do tratamento o fungo pode desenvolver resistência ao antifúngico. Outro fator limitante da utilização deste composto é a existência de cepas de *Candida* com resistência intrínseca aos derivados azólicos (Berkow; Shawn, 2018; Mcmanus; Shah, 2019; Xisto *et al.*, 2017).

Diante desse contexto, tornou-se relevante o desenvolvimento de novos compostos com potencial antifúngico para o tratamento de infecções fúngicas. O tiofeno é uma molécula bioativa presente em diversos compostos ativos com aplicações significativas no campo medicinal, como atividades antimicrobianas, antioxidantes, anticancerígenas e antituberculose (Bozorov *et al.*, 2017). Dentre essas atividades, as propriedades antifúngicas também foram destacadas, sendo compostos com potencial promissor como agentes antifúngicos para aplicações terapêuticas. Algumas moléculas demonstraram ser capazes de inibir espécies fúngicas, como dermatófitos, *Epidermophyton* e *Trichophyton*, como também, leveduras do gênero *Candida* (Neves *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2021; Vieira *et al.*, 2021).

Sendo assim, o estudo teve como objetivo avaliar o potencial antifúngico de compostos derivados de tiofeno, com o intuito de alcançarem inibição do crescimento, principalmente, de cepas resistentes de espécies de *Candida* através da análise da atividade antifúngica *in vitro*. Além disso, realizar autenticação taxonômica por meio da identificação molecular dos isolados e análise ultraestrutural da ação das moléculas na célula fúngica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GÊNERO *Candida*

O gênero *Candida* compreende um grupo de fungos que apresentam algumas espécies comensais da microbiota humana, colonizando a superfície da pele e mucosas, como as do trato gastrointestinal e trato urogenital, como também, inclui fungos patogênicos. Em condições de desequilíbrio microbiano ou alterações no sistema imunológico, favorecem essas espécies se tornarem patógenos oportunistas, desencadeando infecções fúngicas (Borgomin *et al.*, 2020).

Como outros fungos, são microrganismos eucariontes heterotróficos que necessitam obter energia através da lise de moléculas orgânicas, principalmente de carboidratos, como glicogênio (Tortora *et al.*, 2000). Reproduzem-se de forma assexuada por meio de brotamento. Possuem uma parede celular constituída por três principais polissacarídeos β -glucana (β -1,3 glucana e β -1,6 glucana), manoproteínas e quitina. Sendo a camada mais interna formada por glucana e quitina, enquanto a camada mais externa por manoproteínas. É uma estrutura importante para sobrevivência do fungo, que apresenta diversas funções, como proteção física, estabilidade osmótica, suporte de enzimas, adesão celular, barreira de permeabilidade e promove transporte de nutrientes para o citoplasma, garantindo a integridade, metabolismo e o crescimento celular (Fleuri *et al.*, 2008; Barbosa *et al.*, 2020). Além disso, possui a membrana citoplasmática, constituída de fosfolipídeos, por proteínas enzimáticas e ergosterol (Antunes *et al.*, 2020).

Macroscopicamente, essas leveduras apresentam colônias cremosas, brilhantes ou opacas, com colorações que variam do branco ao creme, mas que também podem apresentar tonalidades que variam do marfim ao vermelho (Penã, 2021). Na microscopia, na fase leveduriforme apresentam células com formato oval ou arredondadas, geralmente apresentando brotamentos, os blastoconídios. Na fase filamentosa exibem estruturas alongadas que podem ser pseudo-hifas ou hifas verdadeiras (Rocha *et al.*, 2021).

Constituído por cerca de 200 espécies de leveduras, sendo as de maior interesse clínico, agentes patogênicos que ocasionam infecções fúngicas tanto superficiais como sistêmicas, as espécies como *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida Krsusei*, *Candida lusitaniae* e *Candida auris*. Dentre essas espécies, a *C. albicans* é a mais frequente associada ao

quadro de infecções fúngicas. No entanto, a prevalência de colonização e infecções fúngicas hospitalares causadas por espécies de *Candida não-albicans* demonstram um crescimento expressivo nas últimas décadas, com taxas superiores a 50% das infecções não superficiais ocasionadas pelo gênero. Algumas espécies foram reclassificadas para outros gêneros, como a *C. lusitanae*, nomeada para *Clavispora Lusitanae*. Entretanto, como eram espécies pertencentes ao gênero e ocasionam infecções equivalentes a candidíase, portanto, ainda são tratadas como espécies de *Candida* pela área médica (Costa, 2020; Rather *et al.*, 2021; Miceli; Díaz; Lee, 2011; Pappas *et al.*, 2018).

Estudos recentes demonstram um crescente aumento das infecções invasivas ocasionadas por fungos do gênero *Candida* no ambiente hospitalar, principalmente, em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). Como relatado em estudo de Arendrup e Patterson (2021), que as infecções fúngicas causadas por espécies de *Candida* correspondem a cerca de 70% das infecções fúngicas em UTIs. Sendo, cerca de 80% das infecções fúngicas hospitalares ocasionadas por *C. albicans* (Matsuno *et al.*, 2021).

A espécie *Candida albicans* é uma levedura comensal da microbiota humana, mas que em determinadas condições, pode se tornar um agente patogênico, sendo uma das principais leveduras patogênicas oportunistas (Khan *et al.*, 2021; Kashem *et al.*, 2015). É um fungo polimórfico que se apresenta na forma leveduriforme no estado saprofítico, com blastoconídios, que são essenciais para a disseminação no ambiente e hospedeiro, como também, apresentam a forma filamentosa no estado patogênico, com pseudo-hifas ou hifas verdadeiras, que são fundamentais para adesão e invasão tecidual no hospedeiro (Alvares *et al.*, 2007). Além disso, possui alta capacidade adaptativa aos extremos fisiológicos do organismo humano, aderência a diferentes membranas epiteliais, formação de biofilme, dimorfismo na invasão dos tecidos, termotolerância, evasão do sistema imune, produção de exoenzimas hidrolíticas, que são fatores que contribuem para sua patogênese e a tornam um patógeno de complexo tratamento (Mishra; Ali; Shukla, 2021). Devido a esses fatores de virulência, é o principal agente etiológico de candidíase em pacientes adultos e pediátricos (Pappas *et al.*, 2018).

Candida auris ou *Candidozyma auris*, nova nomenclatura com base na sua recente reclassificação para outro gênero. Foi isolada pela primeira vez do canal auricular externo de paciente no Japão em 2009 (Liu *et al.*, 2024; Satoh *et al.*, 2009).

Porém, já é considerada um patógeno emergente causador de surtos nosocomiais de candidíase invasiva (Ruiz-Gaitan *et al.*, 2018). Apresenta em sua morfologia blastoconídios isolados, em pares ou agrupados, porém, também podem apresentar diversos fenótipos morfológicos em resposta a diferentes condições de cultivo, como ovóides, elipsoidais ou alongadas e variação nas cores de suas colônias, que variam em tons de rosa claro, rosa escuro, bege e roxo (Sikora *et al.*, 2023; Cortegiani *et al.*, 2018). A formação de hifas e pseudo-hifas é mais rara, diferente das outras espécies de *Candida*, que possuem a capacidade de formar estruturas filamentosas na fase patogênica. No entanto, altas concentrações de cloreto de sódio (>10%NaCl) induzem a formação de estruturas semelhantes a pseudo-hifas (Chaves *et al.*, 2021). Em virtude dessa espécie possuir a capacidade de crescimento à temperatura de 42°C, assim, essa característica de maior tolerância térmica à diferencia das outras espécies, como também, indica uma mudança morfológica adaptativa às condições estressantes (Casadevall *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2018). Além disso, tem a capacidade de ser transmitida de um paciente para o outro, indicando resistência ao sistema imune inato, bem como, sobrevivência na pele humana e aderência às superfícies, como equipamentos médicos, durante semanas e resistência à alguns desinfetantes (Eyre *et al.*, 2018). Apresenta uma resistência antifúngica adquirida que pode abranger as três classes antifúngicas mais utilizadas, os polienos, os azóis e as equinocandinas, sendo mais de 90% das cepas resistentes ao fluconazol, tal como, podem ser multirresistentes às classes de antifúngicos (Ostrowsky *et al.*, 2020).

O Complexo *Candida haemulonii* compreende leveduras patogênicas oportunistas emergentes, constituída pelas espécies *C. haemulonii* stricto sensu *C. duobushaemulonii*, *C. haemulonii var.vulnera*, *C. vulturna*, *C. pseudohaemulonii* e *C. khanbhai*. A *Candida auris* é uma espécie filogeneticamente relacionada a este complexo, visto que pertencem ao mesmo clado, *Metschnikowiaceae*, assim, compartilham características como adesão a materiais protéticos, mudança fenotípica e resistência a múltiplos medicamentos (Ramos *et al.*, 2020; Gade *et al.*, 2020). As espécies pertencentes a esse complexo apresentam como característica importante a transição fenotípica, visto que podem apresentar uma morfologia que varia de colônias lisas e redondas à colônias com coloração branca, violeta e rosa, em resposta às condições de cultura (Deng *et al.*, 2021; Ramos *et al.*, 2015). Também possuem a capacidade de formação de biofilmes de diferentes biomassas em vários tipos de superfícies, como dispositivos médicos internos, incluindo cateteres vasculares,

urinários, nasoentéricos e nasogástricos (Ramos *et al.*, 2020). Ainda são considerados fungos patogênicos de ocorrências raras em infecções fúngicas em seres humanos, no entanto, são espécies que podem causar infecções tanto superficiais como sistêmicas (Gómez-Gaviria *et al.*, 2023).

Candida lusitanae foi isolada pela primeira vez em 1959 como *Candida obtusa*, mas em estudos posteriores a identificaram como *C. lusitanae*, no entanto uma característica incomum, a produção de ascósporos clavados permitiu propor ser realocada para outro gênero, assim, atualmente sendo reclassificada como *Clavispora Lusitanae* (Kidd *et al.*, 2023; Pappagianis *et al.*, 1979; Rodrigues de Miranda, 1979). É um fungo dimórfico que apresenta células leveduriformes ovóides, elipsoidais ou alongadas e colônias cremosas e macias, característica comumente encontrada também em outras espécies de *Candida*. Porém, não forma hifas verdadeiras, apenas pseudo-hifas, além do dimorfismo está relacionado, principalmente, pela resistência à anfotericina B. (Hawkins *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2012). É um patógeno oportunista nosocomial emergente de baixa frequência e suscetível aos antifúngicos convencionais, no entanto, algumas cepas podem apresentar resistência a múltiplos fármacos, como a anfotericina B e ao fluconazol, devido a estar filogeneticamente associada a espécie *C. auris* (Munõz *et al.*, 2018; (Zhang *et al.*, 2010).

Candida famata é um fungo comensal que inicialmente foi isolado de ambientes marinhos, seu principal habitat, mas, também pode ser encontrada em outras fontes naturais e produtos alimentícios, como queijos e laticínios. Sendo reclassificada como *Debaryomyces hansenii* (Breuer; Harms, 2006; Quiros *et al.*, 2006; Pfaller; Diekema, 2007). É uma levedura osmotolerante, halotolerante e xerotolerante (Sharma *et al.*, 2005). É uma espécie capaz de se desenvolver em condições extremas com altos níveis de sal ou pH alcalino, como também, possui alta atividade respiratória e baixa atividade fermentativa (Navarrete *et al.*, 2021; Sánchez *et al.*, 2006). Além disso, apresenta um potencial como agente de controle biológico contra fungos patogênicos, como os encontrados em frutas, carnes, laticínios e cereais (Medina-Córdova *et al.*, 2018). São fungos que já foram utilizados para produção de produtos industrializados, como xilitol, trealose e vitaminas lipossolúveis (Navarrete; Martínez, 2020). Pode ocasionar infecções fúngicas como candidemia e candidíase invasiva (Pfaller; Diekema, 2007; Pisa *et al.*, 2008). Também apresentam resistência aos antifúngicos convencionais que dificultam o tratamento de infecções sistêmicas causadas por essa espécie (Pfaller *et al.*, 2003).

Candida rugosa, foi nomeada pela primeira vez como *Mycoderma rugosa*, mas, atualmente foi reclassificada como *Diutina rugosa* (Moretti *et al.*, 2000). Apresenta fenotipicamente a formação de colônias enrugadas que variam da cor branca ao creme e blastoconídios e pseudo-hifas (Hoog *et al.*, 2000). É uma levedura rara como agente causador de doenças infecciosas fúngicas, sendo comumente encontrada em fontes ambientais (Pfaller *et al.*, 2006). No entanto, tem sido relatada como causa de alguns casos de candidemia em pacientes graves (Singh *et al.*, 2011). Além da candidemia, alguns isolados podem ocasionar infecções no trato respiratório, pele e peritonite (Paredes *et al.*, 2012). Também é um dos agentes causadores da mastite bovina, que é uma das principais doenças em vacas (Scaccabarozzi *et al.*, 2011).

Candida intermedia, reclassificada como *Sungouiella intermedia*, é uma levedura que pode ser encontrada na superfície de queijos e na cavidade orofaríngea humana, sendo raramente relatada em infecções fúngicas em seres humanos (Melo *et al.*, 2004). No entanto, essa espécie é relatada em estudo de Sheng *et al.* (2010) como um possível patógeno com capacidade de ocasionar fungemia associada a pacientes em uso de cateteres com nutrição parenteral ou intravenosa por períodos prolongados. Possui um potencial de fabricação de células, como a produção de etanol, xilitol e proteína unicelular a partir da xilose derivada de biomassa lignocelulósica, como também, tem sido usada para biorremediação de lactose encontrada no soro de queijo industrial secundário e produção de peptídeo antimicrobianos para preservação de vinhos (Geijer *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2018; Yonten; Aktas, 2014; Peña; Ganga, 2019).

Candida tropicalis são leveduras dimórficas com células elipsoidais em brotamento ou como um pseudomicélio, com estruturas longas e ramificadas com conídios isoladamente, em cadeias curtas ou grupos, também podem formar hifas verdadeiras (Ann Chai *et al.*, 2010). Apresentam macroscopicamente colônias que variam de tons de branco ao creme, com textura cremosa, lisa e podem apresentar bordas levemente enrugadas (Kurzman *et al.*, 2011). Em comparação com as outras espécies, são mais frequentemente resistentes aos antifúngicos da classe dos triazóis (Fan *et al.*, 2017). É uma das espécies mais comuns que causam infecções fúngicas em pacientes de UTIs, sendo frequentemente relatada em candidemias e candidíases invasivas. Pode ocasionar infecções sistêmicas mais persistentes do que a *C. albicans* e uma maior taxa de mortalidade do que as outras espécies, como também,

caracteriza-se pela alta capacidade de formação de biofilmes (Zuza-Alves *et al.*, 2017).

O complexo *Candida parapsilosis* é composto pelas espécies *C. parapsilosis* stricto sensu, *C.* e a *C. metapsilosis* (Tavanti *et al.*, 2005). São leveduras que apresentam células em forma oval, redonda ou cilíndrica e colônias em tons de branco ao creme, concêntrica, lisa ou cratera. Não formam hifas verdadeiras, apenas crescendo como levedura ou pseudo-hifas (Trofa *et al.*, 2008). Possuem significativa incidência em ambientes hospitalares, sendo um dos principais patógenos oportunistas causadores de infecções fúngicas em UTIs (Guo *et al.*, 2021; Rolling *et al.*, 2021; Mamali *et al.*, 2022). Essas espécies podem apresentar resistência aos azóis, como o fluconazol, mas também resistência intrínseca as equinocandinas. Possuem alta capacidade de formação de biofilmes em superfícies orgânicas ou inorgânicas, como em materiais inanimados, assim sobrevivendo no ambiente, estimulando altas taxas de colonização em ambientes hospitalares, ocasionando disseminação hospitalar por meio de transmissão de paciente para paciente através do contato com os profissionais da saúde (Branco *et al.*, 2023; Diaz-Garcia *et al.*, 2021; Zhai *et al.*, 2020).

2.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

A identificação de espécies de *Candida* pode ser realizada através de métodos fenotípicos, por meio da visualização das características morfológicas, microscópicas ou macroscópicas, como também pelo perfil bioquímico. A caracterização morfológica consiste na presença de blastoconídios, hifas ou pseudo-hifas e em espécies como *C. albicans*, pode ocorrer a presença de clamidoconídios. Macroscopicamente, as colônias podem variar de coloração branca ao creme e o seu aspecto pode ser pastoso, brilhoso ou opaco com textura lisa ou levemente rugosa. A caracterização do perfil bioquímico ocorre por assimilação de nitrogênio e carboidratos (auxanograma), fermentação de carboidratos (zimograma), ausência de urease e presença de tubo germinativo (Colombo *et al.*, 2013). O meio de cultura CHROMagar *Candida* é um meio seletivo que proporciona a identificação rápida de forma pressuposta de algumas espécies do gênero, sendo as espécies reconhecidas devido a produção de cor nas colônias através de reações enzimáticas específicas. Apresentam variedade nos tons de coloração, como por exemplo, a *C. albicans* e *C. tropicalis* que exibem, respectivamente, as cores verde e azul (Barbedo; Sgarbi, 2010). Também há sistemas

de identificação de leveduras disponíveis comercialmente baseados em testes fenotípicos, como o Vitek 2, que testam a capacidade metabólica dos microrganismos por meio da assimilação de carbono, álcool e outros compostos, além de avaliar a capacidade de crescimento em diferentes condições de pH e temperatura (Jamal *et al.*, 2014).

A identificação molecular por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método *in vitro* que se utiliza enzimas sintéticas ou iniciadores (primers) para amplificação exponencial de sequências específicas de ácido desoxirribonucleico (DNA) ou de ácido ribonucleico (RNA). Associados ao sequenciamento genético tem proporcionado identificação das espécies de forma precisa e mais rápida. Além disso, métodos auxiliares como os testes de susceptibilidade antifúngica desempenham relevância para orientação do tratamento. Destacam-se a microdiluição em caldo e a difusão em disco, que permite avaliar a resistência aos antifúngicos, desse modo, auxiliando na conduta médica para escolha da terapia mais apropriada para cada paciente (Hassanopour *et al.*, 2023; Ribeiro *et al.*, 2011). O método por MALDI-TOF é um sistema que utiliza a espectrometria de massa para gerar um perfil proteico único de cada microrganismo e compara com uma base de dados para identificação da espécie, proporcionando resultados com rapidez e precisão (Maldonado *et al.*, 2017; Siller-Ruiz *et al.*, 2017).

2.3 MECANISMOS DE VIRULÊNCIA

Os mecanismos de defesa do hospedeiro agem harmoniosamente sobre a microbiota bacteriana natural, permitindo o crescimento comensal de microrganismos como *Candida*, no entanto, ao ter mudanças no sistema de defesa ou do ambiente ecológico do hospedeiro, favorecem esses fungos se desenvolverem como espécies patogênicas (Rabaan *et al.*, 2023). As espécies dimórficas, como *C. albicans*, apresentam a transição da forma de levedura para a forma de hifa, um importante fator associado à sua virulência, em conjunto com vários outros fatores, como adesão que promove a fixação das células fúngicas às células do hospedeiro, enzimas hidrolíticas, como proteinases, que aumentam a propriedade de adesão e possibilita a destruição do tecido e moléculas responsáveis pela modulação das funções das células imunes (Lopes; Lionakis, 2022; Bohner *et al.*, 2022)

As espécies de *Candida* evoluíram em conjunto com os seres humanos e desenvolveram estratégias para evadir do reconhecimento do sistema imunológico,

assim, não estimulando a resposta inflamatória. Como exemplo, o mecanismo de evasão da *C. albicans*, que para esquivar-se do reconhecimento pelos fagócitos, realiza o mascaramento da camada β -1,3-glucano da parede celular fúngica com manoproteínas. Essa camada β -1,3-glucano induz a resposta pró-inflamatória (Gantner *et al.*, 2005; Gow *et al.*, 2007). Outra tática de evasão, compreende as proteases aspárticas que destroem componentes do sistema imune inato, como a lactoferrina salivar, a lactoperoxidase, a catepsina D, complemento, interleucina-1 β e α 2- macroglobulina (Naglik *et al.*, 2004).

Além disso, Miramón e colaboradores (2013) relata que a *C. albicans* pode produzir filamento ao serem fagocitadas por fagócitos, causando perfuração dessas células de defesa, permitindo que o patógeno escape. Além da capacidade de filamentar, *C. albicans* também expressa fatores de virulência como a formação de biofilme e a produção de exotoxinas, a candidalisina. Esta produzida a partir do gene *HYR1* quando está na forma invasiva, desempenhando um papel crucial nas infecções mucosas e sistêmicas, por ativarem as células de defesa do sistema imune inato. A candidalisina possui a capacidade de interação com a membrana celular das células do hospedeiro, ocasionando poros e conseqüentemente danos à membrana plasmática (Naglik *et al.*, 2019). Ademais, outra estratégia dessa espécie é a piroptose, uma morte celular programada parcialmente dependente da morfogênese das hifas, causando a morte dos macrófagos após a infecção fúngica, reagindo de maneira rápida e robusta ao estresse oxidativo (Vylkova; Lorenz, 2017; Roetzer *et al.*, 2011).

Ao ser ativada a resposta imune do hospedeiro, macrófagos, neutrófilos e células fagocíticas combatem as células fúngicas produzindo altos níveis de oxigênio reativo e óxido nítrico, ocasionando um estresse oxidativo e nitrosativo. Dessa maneira, a ativação de respostas antioxidantes é uma das principais estratégias do patógeno ao ser fagocitado. *C. albicans*, *C. tropicalis* e a *C. parapsilosis* expressam a proteína *Yap1* que é responsável pelo sistema antioxidante, como também pela produção de energia e metabolismo de carboidratos (Pais *et al.*, 2016). A reprogramação do metabolismo de carboidratos e aminoácidos é outra característica envolvida na evasão dos fagócitos por espécies de *Candida* patogênicas, visto que as condições dentro das células fagocitárias são escassas de nutrientes, principalmente, fontes de nitrogênio e aminoácidos (Pérez-Delos; Riego-Ruiz, 2016).

Os neutrófilos são as células predominantes do sistema imune inato, responsáveis pelo controle de patógenos fúngicos. Como estratégia para destruição dos fungos, realiza a fagocitose ou liberação de NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*). (Branzk *et al.*, 2014). Entretanto, foi relatado que os neutrófilos não conseguem realizar a fagocitose ou liberar NETs que consigam eliminar a espécie *C. auris*, ao contrário do que ocorre em espécies como *C. albicans*, sugerindo um mecanismo de evasão da *C. auris* ainda não elucidado (Jhonson *et al.*, 2018). Em estudo de Navarro-Arias *et al.* (2019), observaram que a *C. auris* estimulou minimamente a produção de *TNF α* , *IL-6*, *IL-1 β* ou *IL-10* em humanos, quando comparado a outras espécies como *C. tropicalis*, desta maneira, este poderia ser um possível mecanismo de evasão do sistema imunológico inato desta espécie.

2.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

Um dos principais problemas de saúde pública para o tratamento e manejo de colonização e infecções fúngicas tem sido o expressivo crescimento da resistência fúngica, tanto a resistência associada às classes individuais como a multirresistência (Perlin *et al.*, 2017). O termo resistência é utilizado para designar a redução da susceptibilidade de inibição de um fungo por um fármaco antifúngico. Essa resistência pode ser de forma intrínseca (primária), quando o fungo possui naturalmente características de autoproteção mesmo sem ter sido exposto ao fármaco ou de forma adquirida (secundária), quando o fungo é previamente exposto ao fármaco e após o contato começa a expressar um perfil de resistência (Kanafani, Perfect, 2018).

Devido à sua plasticidade, algumas espécies de *Candida* possuem grande capacidade de desenvolverem resistência aos antifúngicos. Fatores como períodos prolongados de internação e tratamento, a formação de biofilme, a mutação ou super expressão de enzimas alvos dos fármacos e a ativação de genes que codificam as bombas de efluxo, favorecem o desenvolvimento da resistência antifúngica (Revie *et al.*, 2018).

Um dos mais importantes mecanismos de resistência de algumas espécies de *Candida* é a formação do biofilme. Os biofilmes são eficientes em resistir ao sistema imunológico, aos antifúngicos, como também à alguns agentes de desinfecção, desta forma, protege e dificulta a eliminação do fungo, possibilitando as infecções serem mais resistentes e recorrentes (Ziccardi *et al.*, 2015). Na espécie *C. albicans*, mais de mil genes são responsáveis por administrar a formação de biofilme, sendo constituído,

principalmente, por seis reguladores de transcrição mestre, como *Efg1*, *Bcr1*, *Brg1*, *Ndt80*, *Tec1* e *Rob1* (Chong *et al.*, 2018). Para que ocorra a formação do biofilme, estão envolvidas várias etapas, como a adesão das células fúngicas ao substrato, a proliferação dessas células, síntese de matriz extracelular e formação das hifas que promovem a fixação das células proliferadas. A matriz extracelular, envolvendo as células fúngicas, entra em contato com as células imunes. Composta por proteínas em abundância, seguida por carboidratos, lipídios e outros materiais genéticos (Sharma *et al.*, 2024).

Dentre os mecanismos de resistência, também se destacam alterações estruturais na enzima lanosterol 14 α -desmetilase, é a enzima alvo dos fármacos da classe dos azóis, codificada pelo gene *ERG11*, sendo esta a forma de resistência mais relatada em espécies de *Candida*, ocasionando a redução da afinidade do fármaco pelo alvo, assim, limitando seu potencial de ação. Também pode ocorrer a regulação positiva do gene *ERG11* devido às mutações em genes reguladores, como o *UPC2* e superexpressão de bombas de efluxo codificadas pelos genes *CDR1* e *MDR1* (Lima *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2021). São também colaboradores da resistência, as proteínas de membrana responsáveis pelo transporte de substâncias através da membrana celular que constituem as bombas de efluxo, que fazem parte da superfamília de ligação de *ATP* (ABC) e dos principais facilitadores (MFS) (Sharma *et al.*, 2024).

Variações na quantidade de cópias, como aneuploidia de cromossomos inteiros e ampliações de curto alcance, também são modificações no genoma que favorecem o aumento da resistência. O isocromossomo (5L), uma aneuploidia específica da espécie *C. albicans*, produz a formação de duas cópias extras do braço esquerdo do cromossomo 5, assim, origina cópias extras de *TAC1* e *ERG11*. Como também, pode produzir cópias extras do braço direito do cromossomo 3 de *CDR1* e *MRR1*, que codificam transportador ABC e um ativador transcricional de *MDR1*, aumentam a resistência fúngica (Mount *et al.*, 2018; Todd *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2019)

A perda de heterozigosidade (LOH), outro mecanismo de resistência frequente em algumas espécies. Nesse fenômeno pode ocorrer a homozigose de uma região do braço esquerdo do cromossomo 5 que inclui uma mutação pontual no gene *ERG11*. Alguns fármacos podem aumentar a instabilidade do genoma fúngico, propiciando aneuploidia e LOH de cromossomo inteiro, como, a exposição ao fluconazol que

promove LOH de cromossomos inteiros por meio de divisões mitóticas incomuns, duplicações e perdas de cromossomos (Ford *et al.*, 2015; Harrison *et al.*, 2014; Ene *et al.*, 2018).

A resistência à fármacos da classe das equinocandinas correspondem, quase exclusivamente, à mutações nos genes *FKS1* e *FKS2*, que codificam a enzima alvo do medicamento, a 1,3- β -glucano sintase. Mutações pontuais em uma das duas regiões específicas de pontos críticos dos genes *FKS* aumentam a concentração de inibição máxima pela metade (IC50) de uma equinocandina *in vitro*. Para a classe dos polienos, os mecanismos de resistência fúngica estão relacionados a diminuição do ergosterol na membrana plasmática, como também mutações em genes *ERG11*, visto que o fator de transcrição *UPC2* administra a via de biossíntese do ergosterol por meio da regulação de *ERG11* (Armstrong-James *et al.*, 2017; Berman *et al.*, 2020; Perlin *et al.*, 2015; Garcia-Effron *et al.*, 2009; Whaley *et al.*, 2014).

2.5 DROGAS ANTIFÚNGICAS

Atualmente, três classes de antifúngicos são as mais utilizados na prática clínica para o tratamento de infecções sistêmicas por espécies de *Candida*. A classe dos polienos, representados, principalmente, pela anfotericina B, a classe das equinocandinas, representadas pela caspofungina, anidulafungina, micafungina e rezafungina, a classe dos azólicos, que possuem como principal agente antifúngico o fluconazol (Borges *et al.*, 2021).

2.5.1 Polienos

O mecanismo de ação dos polienos ocorre por meio de ligações hidrofóbicas de forma irreversível ao ergosterol da membrana citoplasmática fúngica, ocasionando a formação de poros com posterior morte da célula fúngica, devido ao extravasamento dos componentes citoplasmáticos (Hamill, 2020). Esta classe de antifúngico é representada, principalmente, pela anfotericina B. Embora apresente um vasto espectro de atividade em infecções sistêmicas, oferece risco de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (Nett; Andes, 2016).

2.5.2 Equinocandinas

As equinocandinas tem como mecanismo de ação a inibição da enzima (1,3) β -D-glucana sintase, responsável pela síntese do polissacarídeo 1,3 β -D-glucano, que

constitui em grandes concentrações a parede celular fúngica, sendo fundamental para rigidez da parede celular (Arendrup; Perlin, 2014). A inibição dessa enzima impede a síntese da parede celular, causando desestabilização da integridade da parede celular e redução na rigidez estrutural, assim, provocando a morte por lise celular (Prasad *et al.*, 2016). Tem como representantes a caspofungina, micafungina e anidulafungina. Apesar de serem bem tolerados e não apresentarem graves efeitos colaterais, seu uso clínico é limitado devido sua baixa absorção por via oral, sendo disponível apenas em fórmulas endovenosas (Denning, 2003; Nett; Andes, 2016).

2.5.3 Azólicos

O mecanismo de ação dos azólicos acontece por inibição da enzima, lanosterol-14 α -demitilase, presente no citocromo P450, fundamental para síntese do ergosterol. Essa enzima tem uma porção heme em seu sítio ativo, no qual os azólicos possuem átomos de nitrogênio que se ligam com o ferro do grupo heme e inibem a ativação de oxigênio essencial para conversão de lanosterol em ergosterol. Devido à essa inibição da síntese do ergosterol, ocorre o acúmulo de 14- α -metil-3,6-diol, um ergosterol tóxico para membrana celular, ocasionando estresse celular e interrupção do ciclo celular fúngico (Hani *et al.*, 2015).

São representados pelo fluconazol, miconazol, voriconazol, cetoconazol, itraconazol e posaconazol. Podem apresentar efeitos adversos como hepatotoxicidade, intolerância gastrointestinal e hipersensibilidade (Nett; Andes, 2016). Tem como grande desvantagem para sua utilização serem drogas fungistáticas (Vicente *et al.*, 2003).

O fluconazol é o antifúngico mais prescrito por ser um antifúngico de primeira linha no tratamento de candidemias devido ao bom perfil de segurança, estabilidade na formulação, boa penetração tecidual, absorção oral, ausência de interações medicamentosas importantes e baixo custo no tratamento (Charlie, 2006; Kneale *et al.*, 2016).

O fluconazol é a terceira opção terapêutica segundo recomendação da ANVISA, sendo os antifúngicos da classe das equinocandinas e a anfotericina B a primeira e segunda opção, respectivamente. É o antifúngico da classe dos azólicos mais utilizado na prática clínica em infecções causadas por espécies de *Candida*, devido ao amplo espectro de ação e baixo custo (Paramythiotou *et al.*, 2014). Possui boa absorção por via oral, porém, apesar da boa tolerância nos pacientes, pode

ocasionar efeitos colaterais como cefaleia, náuseas e hepatotoxicidade. Além disso, dispõe de baixa atividade contra enzimas do citocromo 450, deste modo, ocasionando ação inferior de inibição das enzimas (Mcmanus; Shah, 2019). Devido à sua ação fungistática, com inibição do crescimento fúngico, mas, sem eliminá-los definitivamente, ao decorrer do tratamento o fungo pode desenvolver resistência ao antifúngico (Berkow; Shawn, 2018).

Uma problemática crescente tem sido o surgimento de fungos com resistência natural ou adquirida ao fluconazol relatada entre algumas espécies de *Candida* e espécies multirresistentes como o caso da *C. auris*. (Lockhart *et al.*, 2016; Xisto *et al.*, 2017). O desenvolvimento de resistência adquirida pode estar relacionado com tratamentos de longos períodos, como acima de seis meses (Khan *et al.*, 2019).

A utilização de técnicas moleculares possibilitou entender os mecanismos envolvidos na resistência ao fluconazol. Cerca de quatro mecanismos têm sido relatados em estudos, sendo: a mutação no gene que codifica a enzima lanosterol 14 α -desmetilase, a regulação positiva de bombas de efluxo, mutação no gene *MDR1* e superexpressão do gene *ERG11*. É relatado que a presença de dois ou mais desses fatores acarretam na diminuição da concentração do fármaco na célula fúngica (Liu *et al.*, 2018; Salari *et al.*, 2016).

Em estudo realizado por Córdoba e colaboradores (2018), que analisaram a resistência ao fluconazol de cepas de *C. albicans* em quatro períodos do tempo: 1996-2000, 2001-2005, 2006-2010 e 2011-2017, observaram que no período de 1996-2000, cerca de 6% dos isolados eram resistentes ao fluconazol, no entanto, no período entre 2011-2017, foram constatados cerca de 45% de isolados resistentes. Este expressivo aumento tem média de 13,6% com $p < 0,05$ ao longo de 20 anos.

Além disso, Khan *et al.* (2019), ao realizar estudo com 108 isolados do gênero *Candida* procedentes de infecções vulvovaginais em relação a susceptibilidade antifúngica, observaram que cerca de 60% das cepas foram resistentes ao fluconazol. Sendo relatado que todas as cepas estudadas de *C. krusei* apresentaram resistência ao antifúngico, que 72,7% de *C. dubliniensis*, 62,5% de *C. glabrata*, 53,3% de *C. albicans* e 38,8% de *C. tropicalis* demonstraram resistência também ao fluconazol, dessa forma, o estudo evidenciou que a resistência ocorreu em todas as espécies analisadas no estudo.

2.6 DERIVADOS TIOFENOS

Os compostos heterocíclicos são estruturas encontradas em abundância na natureza que compõe diversos compostos biológicos, como o DNA e carboidratos (Keri *et al.*, 2017). Os tiofenos pertencem a esta classe de moléculas e caracterizam-se como uma molécula heterocíclica insaturada com cinco membros, incluindo o enxofre como heteroátomo (Jha *et al.*, 2012). Suas características tornam o núcleo tiofeno muito utilizado na indústria e na química medicinal, sendo o 2-amino-tiofeno e seus derivados um dos compostos de grande relevância (Bozorov *et al.*, 2017).

Moléculas com o núcleo principal composto por 2-amino-tiofeno possuem variadas atividades biológicas e farmacológicas, sendo conhecido por demonstrarem atividade antimicrobiana, antituberculose, antiviral, antioxidante, como também por atuarem como ligante ao receptor de adenosina e inibidor de cinase (Bozorov *et al.*, 2017). As tiossemicarbazonas também são derivados de tiofenos com o núcleo composto por tioureia, um quelante de íons metálicos, que possui atividade biológica anticancerígena (Gou *et al.*, 2016).

Eleamen e colaboradores (2017), apresentaram um estudo em que o complexo de derivados de tiofenos e ciclodextrina foi significativamente eficaz contra *Cryptococcus neoformans*, com uma CIM de 46,66µg/mL, sendo relatado que houve o aumento da solubilidade da molécula devido a associação com a ciclodextrina, ocasionando uma melhora no perfil antifúngico.

Neves (2019), avaliou o perfil de sensibilidade dos fungos dermatófitos *Epidermophyton floccosum* e de espécies de *Trichophyton* frente a moléculas de derivados de tiofenos. O autor identificou que estes compostos promoveram inibição do crescimento das cepas de *E. floccosum* com CIM entre 16µg/mL à 1024µg/mL e também de todas as espécies analisadas de *Trichophyton* com CIMs entre 32µg/mL à 1024µg/mL). Ademais, Neves 2019, também avaliou compostos derivados de tiofenos frente às espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans*. Para as espécies de *Candida* foram encontrados CIMs de 128µg/mL à 1024µg/mL e para *C. neoformans* CIMs de 16µg/mL à 1024µg/mL.

Li *et al.* (2021), analisaram a ação de moléculas de tiossemicarbazona frente à cepas de *C. auris* e compararam a atividade com drogas antifúngicas padrões como fluconazol, voriconazol, anfotericina B e micafungina. Observou-se que o composto teve ação contra todas as cepas de *C. auris*, incluindo as cepas resistentes aos antifúngicos padrões, obtendo CIMs de 0,125µg/mL à 0,25µg/mL. Porém, foi relatado

que numa situação de infecção a ação antifúngica da droga é excelente, entretanto, possui atividade fungistática.

2.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) gera imagens bidimensionais ao utilizar um feixe de elétrons que atravessa uma camada ultrafina da amostra. Essa abordagem permite a visualização detalhada de organelas e estruturas macromoleculares presentes nas células de microrganismos. Nessa técnica estão incluídas etapas de fixação, desidratação, lavagem com tampão, infiltração da resina, corte e contrastação. Para fixação, um dos fixadores mais utilizados é o tetróxido de ósmio, que preserva de forma eficiente a estrutura celular, interagindo com lipídios insaturados, como fosfolipídios e lipoproteínas (Frankl *et al.*, 2015).

As observações de fungos na microscopia foram determinantes para compreensão de sua estrutura. O primeiro trabalho registrado sobre a ultraestrutura de células fúngicas ocorreu em 1958 com o *Trametes versicolor*, um basidiomiceto de decomposição da madeira (Faoro *et al.*, 2022). Também é uma técnica amplamente utilizada para observação das características morfológicas da parede celular fúngica nos diferentes estágios de crescimento, visto que a parede celular é uma estrutura dinâmica, sujeita a modificações constantes, dependendo das condições de cultura e do estágio de desenvolvimento, como durante a expansão e divisão celular em leveduras, assim como também em resposta às condições de estresse (Gow *et al.*, 2017; Riquelme *et al.*, 2018).

3 DEFINIÇÃO DE OBJETOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antifúngico *in vitro* de compostos derivados de tiofenos contra espécies de *Candida*, validá-las taxonomicamente por meio da identificação genotípica e avaliar os efeitos das moléculas sobre a célula fúngica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Selecionar isolados de *Candida* estocados na Coleção de Culturas Micoteca (URM);
- ✓ Validar taxonomicamente as cepas através de identificação molecular;
- ✓ Avaliar o perfil de susceptibilidade, *in vitro*, dos isolados de *Candida* frente ao fluconazol;
- ✓ Avaliar o potencial antifúngico, *in vitro*, dos compostos derivados de tiofenos frente aos isolados de *Candida*;
- ✓ Avaliar ação antifúngica sinérgica dos derivados tiofenos combinados com o fluconazol frente às cepas de *Candida*;
- ✓ Avaliar os efeitos celulares dos derivados tiofenos sobre a célula fúngica através da MET (Microscopia Eletrônica de Transmissão).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO E OBTENÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS

Para o estudo, foram selecionados isolados armazenados na Coleção de Culturas Micoteca (URM) do Departamento de Micologia/UFPE. Utilizou-se como critério selecionar cepas de *Candida albicans* e espécies pertencentes ao clado da *Candida auris*, devido à sua maior probabilidade de apresentarem resistência ao fluconazol. No total foram selecionados 25 isolados das espécies: *Candida albicans*, *Candida haemulonii*, *Candida duobushaemulonii*, *Candida lusitaniae*, *Candida famata*, *Candida rugosa* e *Candida intermedia*. As leveduras foram cultivadas em meio SDA (Saboraud Dextrose Ágar) e armazenadas em temperatura ambiente para posterior realização dos testes.

Tabela 1 - Relação dos isolados selecionados com seus respectivos códigos de identificação da Micoteca/URM e suas espécies.

Micoteca/URM	Espécies
6554	<i>Candida haemulonii</i>
6555	<i>Candida haemulonii</i>
7231	<i>Candida haemulonii</i>
7237	<i>Candida duobushaemulonii</i>
7238	<i>Candida duobushaemulonii</i>
7239	<i>Candida duobushaemulonii</i>
7240	<i>Candida duobushaemulonii</i>
7093	<i>Candida lusitaniae</i>
6371	<i>Candida lusitaniae</i>
923	<i>Candida famata</i>
968	<i>Candida rugosa</i>
1111	<i>Candida famata</i>
1812	<i>Candida lusitaniae</i>
2101	<i>Candida lusitaniae</i>
6556	<i>Candida famata</i>
7085	<i>Candida famata</i>
7096	<i>Candida famata</i>
1007	<i>Candida intermedia</i>
7328	<i>Candida intermedia</i>
907	<i>Candida intermedia</i>
4990	<i>Candida albicans</i>
4388	<i>Candida albicans</i>
6394	<i>Candida albicans</i>

6395	<i>Candida albicans</i>
6396	<i>Candida albicans</i>
750	<i>Candida tropicalis</i> (ATCC)

Fonte: A autora (2025).

4.2 AUTENTICAÇÃO TAXONÔMICA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Foi realizada a reavaliação taxonômica dos isolados, uma vez que sua identificação prévia foi baseada exclusivamente em métodos fenotípicos, assim, existindo a possibilidade de erro na identificação.

4.2.1 Extração e Quantificação do DNA

Primeiramente, foram realizadas culturas em meio SDA por 48hrs. Fragmentos do fungo foram transferidos para tubos eppendorfs para extração do DNA. Foram adicionados em cada amostra 650µL de CTAB 2%, homogeneizado a 5.5 m/s por 30 segundos em FastPrep® (BIO 101, Farmingdale, New York, USA) e incubados no termobloco (banho seco) por 15 minutos à 65°C. Novamente foram homogeneizados por 20s e centrifugados à 12.000rpm por 10 minutos na centrífuga. Em um novo tubo, foram adicionados 650µL de sobrenadante e a mesma proporção para adição do clorofórmio álcool-isoamilico (24:1), homogeneizado e centrifugado à 12.000rpm durante 10 minutos. Ao término da centrifugação, foram transferidos 400µL de sobrenadante para outro tubo com 40µL de acetato de sódio 3M e 400µL de isopropanol refrigerado, homogeneizado e centrifugado à 12.000rpm por 10 minutos. Em seguida, foram descartados os sobrenadantes e adicionado 1000µL de etanol 70% e centrifugado à 12.000rpm durante 2 minutos. Posteriormente, os sobrenadantes foram descartados e os tubos eppendorfs contendo o DNA irão para secagem. Ao fim do processo, foram adicionados 50µL de água MiliQ em cada amostra para ressuspensão do DNA e conservados à 4°C até o início das análises. Para quantificação das amostras, o DNA de cada isolado foi quantificado quantitativamente através de espectrofotometria em aparelho Locus XXX (INÁCIO *et al.*, 2016).

4.2.2 Reação em cadeia da Polimerase

As amostras de DNA foram amplificadas com sequenciamento parcial da região LSU 28S do rDNA utilizando os primers espécie-específico NL1 (5'-

GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). As reações da PCR foram efetuadas em volumes finais de 12,5µL contendo 7,45µL de ddH₂O, 1µL de cada primer (5 pmol), 1,25 µL do tampão da PCR, 0,5µL de MgCl₂ (50mM), 0.25µL de dNTP (10mM), 0.05µL de Taq DNA polymerase 5U (Invitrogen, Brasil) e 1µL de DNA molde. No termociclador foram inseridas às seguintes configurações: desnaturação à 95°C por 10 minutos com 38 ciclos de desnaturação à 95°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 50 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e finalizados com mais uma extensão de 72°C por 10 minutos (Marimon *et al.* 2007; Oliveira *et al.*, 2015). Posteriormente, após a amplificação do DNA, foi mensurado qualitativamente por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em cuba com o tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE)   uma voltagem de 100v durante 20 minutos.

Os fragmentos de DNA obtidos da PCR foram purificados com a utilização do kit GenJET PCR Purification (Fermentas, UK), de acordo com sugestão do fabricante. Para o sequenciamento, as amostras foram enviadas para Plataforma de Sequenciamento LABCEN/CCB (UFPE) e realizadas através do sequenciador ABI 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As reações foram realizadas com o kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), conforme recomendações do fabricante. As seq ncias adquiridas foram editadas por meio do programa Sequencher 4.9 Genes Code Corporation para obtenção dos arquivos no formato fasta e formação das seq ncias consensus. Os isolados foram diferenciados em relação a espécie por meio de pesquisa por seq ncias semelhantes armazenadas no GenBank com colaboração da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) e análise filogenética das seq ncias consensus através do programa MEGA (Molecular Genetics Analysis)

4.3 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA *in vitro* DOS ISOLADOS FRENTE AO FLUCONAZOL E AOS DERIVADOS TIOFENOS

Para analisar quantitativamente o espectro de a o *in vitro* do potencial dos agentes antifúngicos contra os isolados fúngicos, realizou-se o teste de susceptibilidade antifúngica. Para isso, utilizou-se o método de microdiluição em caldo em meio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute), conforme as recomendações descritas no documento M27-A3 do CLSI, 2008 (Clinical Laboratory Standards

Institute). Foram realizados separadamente testes de susceptibilidade dos isolados frente ao fluconazol e aos compostos derivados de tiofeno.

4.3.1 Preparação e padronização dos inóculos

As suspensões dos isolados foram preparadas em 5mL de solução salina esterilizada, a partir das culturas das espécies de *Candida*, cultivadas em meio Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) por 24hrs. A padronização da concentração de cada isolado foi mensurada através de transmitância por espectrofotômetro, com uma solução-padrão 0,5 da escala de McFarland no comprimento de onda de 530nm, caracterizando uma suspensão numa concentração de entre 1×10^6 a 5×10^6 células/mL. Posteriormente, as suspensões contendo os isolados foram diluídas numa proporção de 1:100 em salina, em seguida, na proporção de 1:20 em meio RPMI-1640, resultando na concentração de 5×10^2 a $2,5 \times 10^3$.

4.3.2 Fluconazol

Foi utilizado a droga em forma de comprimido de 150mg, pesada em balança analítica de precisão em eppendorfs. A solução seguida para estoque foi de 6400 μ g da droga/mL, sendo solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos em meio RPMI-1640 para obtenção das concentrações dos testes de 64 μ g/mL à 0,125 μ g/mL. A concentração final de DMSO nas diluições foi inferior a 5%, como recomendado na literatura.

4.3.3 Compostos Derivados dos Tiofenos

Os compostos derivados de tiofeno foram fornecidos pelo Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Foram testados quatro compostos derivados do 2-amino-tiofeno: 6CN, 7CN, 5B200 e 7CN12. Foram pesados em balança analítica de precisão em eppendorfs. A proporção seguida para solução estoque foi de 4096mg da droga/mL do solvente, sendo solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos em meio RPMI-1640 para obtenção das concentrações dos testes de 1024 μ g/mL à 2 μ g/mL. A concentração final de DMSO nas diluições foi inferior a 5%, como recomendado na literatura, visto que concentrações acima de 20% são tóxicas para célula fúngica (Farias *et al.*, 2018). Foi utilizado 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) em pH 7,2-7,4 com esterilização por meio do sistema de filtração a vácuo com membrana PES 0.22 μm .

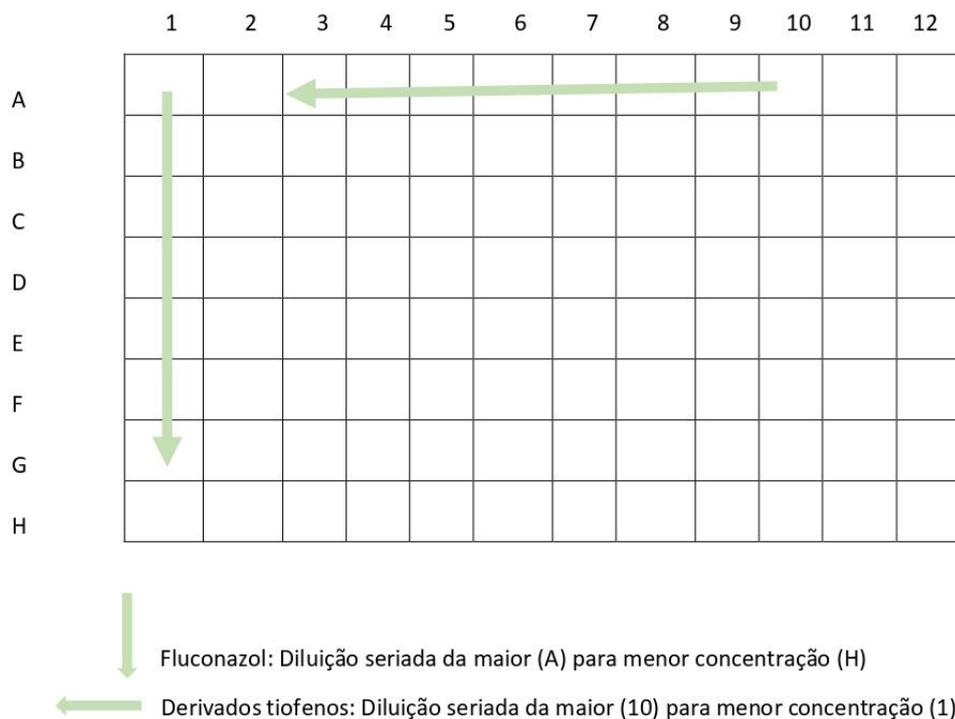
4.3.4 Procedimentos do teste de susceptibilidade antifúngica *in vitro*

O teste de susceptibilidade foi realizado de acordo com as diretrizes fornecidas pelos documentos M27-A3 e M60 (CLSI 2008, CLSI 2020). Foram utilizadas placas de microtitulação com 96 poços, nos quais o fluconazol e os derivados de tiofeno foram diluídos sequencialmente em meio RPMI 1640 para a obtenção das concentrações de 64 $\mu\text{g/mL}$ à 0,125 $\mu\text{g/mL}$ e 1024 $\mu\text{g/mL}$ à 2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Para os testes com o fluconazol, em cada poço foram adicionados 100 μL de RPMI, das suspensões celulares padronizadas e do fluconazol. Além disso, nos testes que apresentaram o fenômeno *trailing* foi utilizado o RPMI 1640 com pH mais ácido (4,5 – 5,0). Para os testes com os compostos derivado de tiofeno, em cada poço foram adicionados 100 μL de RPMI, das suspensões celulares padronizadas e do composto testado. Além disso, foram colocados poços para controle da esterilidade do meio (controle negativo) e controle de crescimento fúngico (controle positivo). Por fim, as placas foram vedadas e incubadas a 35°C durante 48hrs. As leituras para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para os testes realizados isoladamente com o fluconazol foram realizadas visualmente após 48hrs. Para os testes isoladamente com os compostos derivados de tiofeno, foram realizadas a leitura visual após 48hrs, como também, em seguida, foram realizados os retrocultivos, semeando uma fração do fungo exposto à droga em uma placa de cultura em meio Ágar Sabouraud Dextrose, incubado por 48hrs e depois avaliado o crescimento fúngico, para validação da tolerância ou resistência a droga. Em relação ao fluconazol, considerou-se para os valores do CIM os que inibiram 50% do crescimento quando comparados ao controle positivo e para os derivados de tiofeno os valores do CIM foram os que inibiram 50% e 100% do crescimento em comparação ao controle positivo. Para validação do método, como controle de qualidade foram utilizados nos testes de susceptibilidade antifúngica a cepa referência *Candida tropicalis* ATCC® 750.

4.4 ESTUDO DE INTERAÇÃO DOS TIOFENOS COM O FLUCONAZOL ATRAVÉS DO MÉTODO TABULEIRO DE XADREZ

Combinação do fluconazol e o composto derivado de tiofenos foram avaliados utilizando o método CLSI adaptado. O inóculo inicial foi preparado e padronizado como descrito para o teste de susceptibilidade antifúngica. As leituras foram determinadas visualmente e também por meio de retrocultivo. Os resultados foram após 48hrs. Para avaliar as interações dos antifúngicos, a concentração inibitória fracionada (FIC) foi calculada para cada combinação. O FIC foi calculado para cada agente dividindo a concentração inibitória de cada antifúngico quando usado em combinação pela CIM. Os valores FIC foram adicionados para definição da interação da combinação. A sinergia foi definida como FIC de $\leq 0,5$, aditividade definida como um FIC de $> 0,5$, mas < 1 e a indiferença definida como um FIC de ≥ 1 , mas < 4 , enquanto o antagonismo definido como um FIC de ≥ 4 (Lewis *et al.*, 2002).

Figura 1 - Desenho esquemático da distribuição dos fármacos na placa de microtitulação para o teste de tabuleiro de xadrez.



Na placa, as linhas A-H foram a diluição seriada do fluconazol, na coluna 10-1 foram a diluição seriada do composto derivado de tiofeno. Na coluna 11, foram os poços controle negativos e na coluna 12 os poços controle positivos. Fonte: A autora (2025).

Figura 2 - Cálculo da Concentração Inibitória Fracionada (FIC)

Fórmula:

$$\text{Índice de FIC} = \frac{\text{CIM do fármaco A em combinação}}{\text{CIM do fármaco A sozinho}} + \frac{\text{CIM do fármaco B em combinação}}{\text{CIM do fármaco B sozinho}}$$

A autora (2025).

4.5 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Foram realizadas a análise das estruturas celulares fúngicas dos isolados de *Candida* tratadas e não tratadas através da microscopia eletrônica de transmissão (MET) em relação à ação das moléculas derivadas de tiofenos. Seguindo o método de Karnovsky (1965) para preparação das amostras para a microscopia de transmissão. As células foram recuperadas por centrifugação em tubos eppendorfs de 1,5mL para o fracionamento e retirada do meio de cultura, seguida por sucessivas lavagens com tampão fosfato-salino (PBS) a 0,1M e pH 7.1, com 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 7,2) durante 2hrs à 4°C. Em seguida, foram efetuadas 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 hrs, na ausência de luz, e temperatura ambiente. Mais uma sequência de lavagens com tampão cacodilato foi executada, e por fim, iniciou-se a etapa de desidratação da amostra adicionando acetona à 30% por 15 minutos. Esse processo foi realizado por mais quatro etapas com variação da concentração de acetona em 50%, 70%, 90% e 100%, logo após, mais cinco etapas combinando 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. Em seguida, foi realizada a inclusão da resina Epon-828 em formas de silicone (etapa de emblocamento), e mantidas em estufa à 60°C durante 72hs. Após a formação do bloco de resina, foram feitos cortes ultrafinos no material utilizando um ultramicrotomo, corados com acetato de uranila e citrato de chumbo (5% e 2% respectivamente) para o contraste e

observados no Microscópio Eletrônico de transmissão FEI Tecnai™ Spirit G 2 BioTWIN (FEI, Oregon, EUA) da Fiocruz-PE.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Por meio da análise molecular, foram confirmados a identificação taxonômica dos 25 isolados da Micoteca URM, sendo das espécies *C. albicans* (36%), *C. tropicalis* (4%), *C. parapsilosis* stricto sensu (12%), *C. orthopsilosis* (4%), *C. pseudohaemulonii* (20%), *C. lusitaniae* (12%), *C. intermedia* (8%) e *C. haemulonii* (4%). A tabela 2 compara a identificação molecular confirmada com a previamente realizada por métodos fenotípicos.

Tabela 2 – Isolados de *Candida* da Micoteca URM e suas respectivas identificações fenotípicas prévias e confirmação genotípica.

Isolados (URM)	Identificação fenotípica	Identificação genotípica (PCR)
6554	<i>Candida haemulonii</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
6555	<i>Candida haemulonii</i>	<i>Candida pseudohaemulonii</i>
7231	<i>Candida haemulonii</i>	<i>Candida haemulonii</i>
7237	<i>Candida duobushaemulonii</i>	<i>Candida pseudohaemulonii</i>
7238	<i>Candida duobushaemulonii</i>	<i>Candida pseudohaemulonii</i>
7239	<i>Candida duobushaemulonii</i>	<i>Candida pseudohaemulonii</i>
7240	<i>Candida duobushaemulonii</i>	<i>Candida pseudohaemulonii</i>
7093	<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Candida albicans</i>
6371	<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
923	<i>Candida famata</i>	<i>Candida albicans</i>
968	<i>Candida rugosa</i>	<i>Candida albicans</i>
1111	<i>Candida famata</i>	<i>Candida lusitaniae</i>
1812	<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Candida lusitaniae</i>
2101	<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Candida lusitaniae</i>
6556	<i>Candida famata</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
7085	<i>Candida famata</i>	<i>Candida albicans</i>
7096	<i>Candida famata</i>	<i>Candida albicans</i>
1007	<i>Candida intermedia</i>	<i>Candida orthopsilosis</i>
7328	<i>Candida intermedia</i>	<i>Candida intermedia</i>
907	<i>Candida intermedia</i>	<i>Candida intermedia</i>
4990	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
4388	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
6394	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>

6395	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>
6396	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
750	<i>Candida tropicalis</i> (ATCC)	<i>Candida tropicalis</i> (ATCC)

Fonte: A autora (2025).

A identificação genômica permitiu identificar com maior precisão as espécies dos isolados da Micoteca/UFPE. Assim, foi possível confirmar que dos 25 isolados analisados, mais de 60% das cepas tinham sido identificadas erroneamente. Como foi observado com a identificação das espécies *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* stricto sensu e *C. pseudohaemulonii*, que não estavam incluídas nas espécies selecionadas. Em estudo de Del Negro (2008) com identificação de espécies de *Candida* em amostras de sangue de pacientes pediátricos, constatou que os resultados obtidos pela técnica de PCR demonstraram maior sensibilidade e especificidade quando comparada a métodos convencionais de diagnóstico, como a hemocultura.

A espécie *C. albicans* demonstrou a maior quantidade de isolados (36%), seguida por *C. pseudohaemulonii* (20%). A espécie *C. albicans* é a mais frequentemente identificada. Apesar deste estudo não ter sido do tipo prospectivo, podemos estabelecer relação com trabalhos anteriores como Siri e colaboradores (2017), que em pacientes adultos com candidemia de um hospital universitário no Chile, onde 55% dos isolados eram da espécie *C. albicans*. No entanto, há relatos do crescimento de infecções fúngicas causadas por espécies de *Candida não-albicans*, como relatado em estudo de Lima e colaboradores (2023), que observaram que no ano de 2020 houve um predomínio de *Candida não-albicans* com cerca de 65% dos isolados identificados de pacientes hospitalizados em hospitais de Juiz de Fora, Minas Gerais. Como também observado por Arraes *et al.* (2023) que relataram um maior isolamento de *C. parapsilosis* nos anos de 2021 e 2022 em amostras de sangue de pacientes de hospital em Salvador, Bahia.

5.2 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE COM O FLUCONAZOL

Para a determinação do perfil de susceptibilidade dos isolados ao fluconazol, foram obtidas as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM), considerando uma inibição de 50% para o fluconazol. Os isolados apresentaram concentrações que variaram entre 0,12µg/mL à 64µg/mL, como demonstrado na tabela 3.

Tabela 3 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL dos isolados de *Candida* frente ao fluconazol com inibição de 50%.

Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)			
Isolados (URM)	Fluconazol	URM	Fluconazol
6554	8µg/mL	2101	0,25µg/mL
6555	1µg/mL	6556	0,25µg/mL
7231	64µg/mL	7085	0,25µg/mL
7237	0,12µg/mL	7096	0,25µg/mL
7238	64µg/mL	1007	0,5µg/mL
7239	32µg/mL	7328	0,12µg/mL
7240	32µg/mL	907	0,12µg/mL
7093	0,12µg/mL	4990	0,25µg/mL
6371	0,25µg/mL	4388	0,12µg/mL
923	0,12µg/mL	6394	0,25µg/mL
968	0,25µg/mL	6395	0,25µg/mL
1111	0,25µg/mL	6396	2µg/mL
1812	0,5µg/mL	750	2µg/mL

Fonte: A autora (2025).

De acordo com o documento M60 (CLSI, 2020), que informa pontos de interrupção (*breakpoints*) para testes de susceptibilidade de diluição em caldo *in vitro* para espécies de *Candida*. Poucas espécies possuem seus *breakpoints* definidos para o fluconazol, sendo estas as *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* stricto sensu e *C. tropicalis*. Dessas espécies, no estudo foram identificadas as espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis* stricto sensu e *C. tropicalis*. No presente estudo para *C.*

albicans foram obtidos CIMs entre 0,12µg/mL à 2µg/mL, sendo consideradas cepas sensíveis ao fluconazol, visto que são consideradas sensíveis quando são iguais ou menor que 2µg/mL. A espécie *C. parapsilosis* stricto sensu, obteve um isolado com CIM de 8µg/mL, que indica ser uma cepa resistente ao fluconazol, devido à ser considerada uma espécie resistente quando apresenta maior ou igual a 8µg/mL e duas cepas que apresentaram CIM de 0,25µg/mL, que indica serem sensíveis, pois é um valor menor que 2µg/mL. A espécie *C. tropicalis* expressou um CIM de 0,25µg/mL, que demonstra ser uma cepa sensível, pois são consideradas sensíveis quando são iguais ou menor que 2µg/mL. A ATCC 750 também da espécie *C. tropicalis* apresentou um CIM de 2µg/mL, indicando ser sensível ao fluconazol, com resultado de acordo com o recomendado pelo documento CLSI, que indica ser valores na faixa entre 1µg/mL à 4 µg/mL.

Em relação às outras espécies identificadas, sendo estas *C. pseudohaemulonii*, *C. lusitaniae*, *C. orthopsilosis*, *C. intermedia* e *C. haemulonii*, ainda não possuem *breakpoints* definidos para o fluconazol no CLSI. Nesse contexto, estudos focados nessas espécies geralmente baseiam-se nos pontos de cortes do CLSI estabelecidos para o gênero *Candida* (Silva *et al.*, 2020). Para obter um parâmetro mínimo para interpretação dos dados, os pontos de corte clínicos para defini-las como suscetíveis, suscetível-dependente ou resistente, às espécies *C. orthopsilosis*, *C. intermedia* e *C. lusitaniae*, foram da seguinte maneira: Suscetível ≤ 2 µg/mL, suscetível-dependente 4µg/mL, e resistente como ≥ 8 µg/mL.

Para as espécies *C. haemulonii*, *C. pseudohaemulonii*, em razão de apresentarem similaridade e pertencerem ao mesmo clado da espécie *C. auris*, foram utilizados os mesmos parâmetros utilizados para essa espécie. No entanto, também não há *breakpoints* definidos para a espécie *C. auris*. Mas, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estabeleceu diretrizes que fornecem orientação para a interpretação dos valores da CIM de *C. auris*, baseado em informações estabelecidas para espécies de *Candida* e também na opinião de especialistas (Kordalewska *et al.*, 2019). O ponto de corte provisório para definir como resistente ao fluconazol é igual ou maior que 32µg/mL, pois os isolados que apresentaram CIM com esse valor demonstraram uma mutação de resistência no gene *ERG11*, tornando improvável que respondam ao fluconazol. Assim, foram considerados resistentes as espécies *C. haemulonii*, *C. pseudohaemulonii* que obtiveram valores de CIM igual ou maior que 32µg/mL. Foi evidenciado dos 25 isolados testados, que 5 cepas foram resistentes ao

fluconazol. Sendo as cepas: URM6554 (8µg/mL), URM7231(64µg/mL), URM7238 (64µg/mL), URM7239 (32µg/mL) e 7240 (32µg/mL), das espécies *Candida pseudohaemulonii*, *Candida haemulonii* e *Candida parapsilosis* stricto sensu.

Também foi possível observar nos testes dos isolados frente ao fluconazol, que 7 cepas apresentaram o fenômeno denominado de *trailing*, que se caracteriza por uma resposta atípica das cepas fúngicas ao antifúngico testado, onde não ocorre uma inibição total do crescimento fúngico, mas, uma diminuição progressiva do crescimento, comumente, observado para drogas da classe dos azólicos. Esse crescimento dificulta e confunde a leitura dos valores da CIM, como também afeta o tempo de leitura do teste, visto que o isolado pode se apresentar sensível em 24hrs de incubação, mas, apresentar como resistente em 48hrs. As causas desse fenômeno ainda não são bem definidas, entretanto, podem estar associados ao tamanho do inóculo, tempo de incubação, concentração de glicose, tampão e pH do meio de cultura e características intrínsecas dos fungos (Agrawal *et al.*, 2007); Coenye *et al.*, 2008; Malacarne, 2010). Esse fenômeno foi observado em cerca de 30% dos isolados, sendo estes: URM7085, URM7096, URM7231, URM7238, URM6396, URM6394 e URM6554 das espécies *C. albicans*, *C. pseudohaemulonii* e *C. haemulonii*. Como observado no estudo de Malacarne (2010) que realizou testes de susceptibilidade com isolados de *C. tropicalis* para o fluconazol e itraconazol e cerca de 30% dos isolados apresentaram *trailing* para uma ou para as duas drogas, sendo principalmente observado nos testes com o fluconazol.

Para confirmação do fenômeno *trailing* ou constatar a resistência dos isolados, foi realizada nova avaliação da susceptibilidade desses isolados, no entanto, utilizando o RPMI com pH mais ácido (5,0), como indicado em estudo de Marr e colaboradores (1999) que relata que ao utilizá-lo com pH mais ácido, entre 4,5 e 5, não há a ocorrência desse fenômeno. Após realizado o teste, observou-se que realmente não houve o desenvolvimento de *trailing* e que os isolados URM7231 e URM7238 eram resistentes ao fluconazol e os outros 3 isolados eram sensíveis ao fluconazol.

No que se refere aos fármacos mais utilizados na terapia antifúngica convencional, pode-se observar condições favoráveis ao surgimento de resistência intrínseca aos azóis, sobretudo ao fluconazol. A disseminação de isolados resistentes associado às poucas opções de fármacos disponíveis tem influenciado de forma negativa no tratamento e prognóstico de pacientes (Sharafutdinov *et al.*, 2020).

O tratamento de infecções fúngicas em países subdesenvolvidos tem como principal opção o fluconazol. Entretanto, com o expressivo aumento da resistência fúngica a este medicamento, torna-se um fator preocupante, visto que há uma grande variabilidade genética relacionada a resistência inter e intra espécie, com alguns mecanismos associados à resistência ainda desconhecidos (Berkow; Lockhart, 2017).

Os resultados obtidos no estudo condizem com o relatado na literatura. Como, por exemplo, as espécies do Complexo *Candida haemulonii* apresentarem resistência ao fluconazol, visto que são espécies que apresentam multirresistência aos fármacos, como resistência às drogas da classe dos azóis (Zhang *et al.*, 2019). Conforme relatado no estudo de Gade e colaboradores (2020) que aproximadamente 18% das cepas de *C. haemulonii* e 33% de *C. pseudohaemulonii* apresentaram CIM no valor de 32µg/mL ou mais para o fluconazol.

Apesar dos números de cepas do Complexo *Candida parapsilosis* resistentes ao fluconazol estarem aumentando em vários países, é uma espécie considerada suscetível ao fluconazol e a classe dos triazóis. Essa espécie, por ter a capacidade de formação de biofilmes, pode ocorrer a resistência ao fluconazol em alguns isolados (Diaz-Garcia *et al.*, 2021). Como também ocorre nas espécies *C. albicans* e *C. tropicalis*, visto que são cepas intrinsecamente suscetíveis a ação do fluconazol, mas que possuem a capacidade de adquirir resistência ao fármaco (Lo *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2021). As espécies de *Candida não-albicans*, como *C. lusitaniae* e *C. intermedia*, comumente apresentam suscetibilidade a ação do fluconazol, mas que também podem desenvolver resistência (Asner *et al.*, 2015; Ruan *et al.*, 2010)

5.3 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE COM OS DERIVADOS TIOFENOS

Para determinação do perfil de susceptibilidade dos 25 isolados aos derivados tiofenos, foram obtidas as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM), considerando uma inibição de 50% e 100% para os derivados tiofenos, de acordo com os resultados obtidos após realizado o retrocultivo dos isolados.

Foram testados quatro compostos (6CN, 7CN, SB200 e 7CN12), nos quais apresentaram concentrações que variaram entre 16µg/mL à 1024µg/mL. Os compostos 6CN e 7CN apresentaram significativa inibição do desenvolvimento fúngico em alguns isolados, principalmente, em 50% de inibição do crescimento. Sendo observado para o 6CN100% concentrações que variaram de 64µg/mL à 512µg/mL e 6CN50% de 16µg/mL à 1024µg/mL. Para o 7CN100% obteve

concentrações que variaram de 512µg/mL à 1024µg/mL e o 7CN50% de 64µg/mL à 1024µg/mL. O composto 6CN apresentou 100% de inibição para 3 isolados (URM7237, URM7239, URM7240) e demonstrou 50% de inibição para 8 isolados (URM6554, URM6555, URM7237, URM7239, URM7240, URM2101, URM6556, URM1007). O 7CN demonstrou 100% de inibição para 7 isolados (URM6554, URM6555, URM7231, URM7237, URM7238, URM7239, URM7240) e apresentou 50% de inibição para 14 isolados (URM6554, URM6555, URM7231, URM7237, URM7238, URM7239, URM7240, URM6371, URM923, URM1111, URM2101, URM6556, URM1007, URM4990). A tabela 4 mostra os resultados das concentrações obtidas dos isolados para os compostos 6CN e 7CN.

Tabela 4 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL dos isolados de *Candida* frente aos compostos 6CN e 7CN com inibições de 100% e 50%.

Isolados (URM)	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)			
	6CN 100%	6CN 50%	7CN 100%	7CN 50%
6554	>1024µg/mL	512µg/mL	512µg/mL	256µg/mL
6555	>1024µg/mL	256µg/mL	512µg/mL	256µg/mL
7231	>1024µg/mL	>1024µg/mL	1024µg/mL	128µg/mL
7237	64µg/mL	16µg/mL	512µg/mL	128µg/mL
7238	>1024µg/mL	>1024µg/mL	512µg/mL	256µg/mL
7239	512µg/mL	128µg/mL	1024µg/mL	128µg/mL
7240	64µg/mL	16µg/mL	512µg/mL	64µg/mL
7093	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
6371	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	512µg/mL
923	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	512µg/mL
968	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
1111	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	1024µg/mL

1812	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
2101	>1024µg/mL	1024µg/mL	>1024µg/mL	512µg/mL
6556	>1024µg/mL	512µg/mL	>1024µg/mL	512µg/mL
7085	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
7096	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
1007	>1024µg/mL	1024µg/mL	>1024µg/mL	512µg/mL
7328	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
907	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
4990	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	512µg/mL
4388	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
6394	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
6395	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
6396	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
750	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL

Fonte: A autora (2025).

Os outros dois compostos, SB200 e 7CN12, não apresentaram atividade para mais de 90% dos isolados nas concentrações testadas. Entretanto, o SB200 apresentou atividade para o isolado URM4990 com 100% de inibição na concentração de 256µg/mL e 50% de inibição com 128µg/mL. O 7CN12 apresentou atividade para o isolado URM6554 com 100% de inibição na concentração de 512µg/mL e 50% de inibição com 64µg/mL, o isolado URM923 com 100% de inibição na concentração de 1024µg/mL e 50% de inibição com 128µg/mL e para o isolado URM4990 demonstrou 100% de inibição na concentração de 1024µg/mL e 50% de inibição com 512µg/mL. A tabela 5 mostra os resultados das concentrações obtidas dos isolados para os compostos SB200 e 7CN12.

Tabela 5 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL dos isolados de *Candida* frente aos compostos SB200 e 7CN12 com inibições de 100% e 50%.

Isolados (URM)	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)			
	SB200 100%	SB200 50%	7CN12 100%	7CN12 50%
6554	>1024µg/mL	>1024µg/mL	512µg/mL	64µg/mL
6555	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
7231	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
7237	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
7238	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
7239	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
7240	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
7093	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
6371	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
923	>1024µg/mL	1024µg/mL	1024µg/mL	128µg/mL
968	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
1111	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
1812	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
2101	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
6556	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
7085	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
7096	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
1007	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
7328	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL

907	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
4990	256µg/mL	128µg/mL	1024µg/mL	512µg/mL
4388	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
6394	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
6395	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
6396	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL
750	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL	>1024µg/mL

Fonte: A autora (2025).

Estes resultados corroboram com estudo de Queiroz (2023), que testou compostos derivados de tiofeno frente a isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* na faixa de 400µg/mL à 0,78125 µg/mL e obteve como resultado concentrações da CIMs que variaram entre 6,25µg/mL à maior que 400µg/mL, demonstrando atividade significativa dos compostos no crescimento fúngico. Como também foi observado nos testes realizado por Arruda (2023), que testou compostos derivados de tiofeno, numa faixa de 200µg/mL à 0,781 µg/mL frente isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, obtendo valores das concentrações de CIMs que variaram entre 6,25µg/mL à maior que 200µg/mL.

No estudo realizado por Mello (2022), foram testados derivados do 2-aminotiofeno, na faixa entre 1024µg/mL à 0,5 µg/mL, em espécies de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, obtendo como valor da CIM 200µg/mL para todos os compostos testados, dessa forma, demonstrando que os compostos derivados de tiofenos utilizados nesse estudo obtiveram um potencial de ação frente a isolados de *Candida* mais significativos quando comparados a esta pesquisa.

Neves (2019), realizou estudo com cepas de *C. albicans*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans* frente à compostos derivados de tiofenos na faixa de 0,32µg/mL à 333,33µg/mL, obtendo valores de CIMs entre 41,6 µg/mL à 333,33µg/mL para as espécies de *Candida* e 166,66µg/mL à 333,33µg/mL para cepas de *C. neofeormans*, desse modo, também apresenta compostos derivados de tiofenos com relevante inibição do crescimento de cepas de *Candida*.

Segundo Guimarães e colaboradores (2014), a incorporação de derivados de tiofeno em preparações farmacêuticas ocasionam um crescimento na atividade antifúngica dos compostos, como observaram que a incorporação em um sistema de microemulsão, aumentou cerca de sete vezes a atividade contra *C. neoformans*, reduzindo o CIM de 17 µg/mL para 2,2 µg/mL. De acordo com Franca *et al.* (2015), pequenas alterações na estrutura do tiofeno ocasionam notáveis diferenças nos perfis biológicos e farmacológicos. Como realizado por Araújo Neto *et al.* (2020), que ao testar um derivado de tiofeno-tiossemicarbazona, inibiu o crescimento de cepas de espécie de *Candida* com valores de CIM variando entre 2 µg/mL à 8 µg/mL.

Alguns outros estudos também demonstraram o potencial antifúngico de compostos derivados de tiofeno. Como por exemplo de Zhou e colaboradores (2016), que sintetizaram alguns derivados de tiofeno para testar frente *C. albicans*, descobriram que vários dos compostos expressaram atividade antifúngica significativa, exibindo atividade comparável ao do fármaco fluconazol com CIMs entre 8 µg/mL à 128 µg/mL. Da mesma maneira, Nandi *et al.* (2017) sintetizou vários derivados do 1,2,3-triazol à base de tiofeno e avaliaram sua atividade antifúngica frente à cepas de fungos, como da espécie de *Candida*. Constataram que vários dos compostos expressaram atividade antifúngica contra *C. albicans*, na faixa entre 4 µg/mL à 32 µg/mL, apresentando atividade superior às drogas controle. Como também demonstrado no trabalho de Yang e colaboradores (2018), que testaram compostos derivados de tiofeno-2,5-dicarboxamida, tiofeno-2,4-dicarboxamida e hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico, que expressaram atividade antifúngica contra espécies de *C. albicans* e *C. tropicalis*, com CIMs variando entre 0,5 µg/mL à 8 µg/mL e 1 µg/mL à 8 µg/mL, respectivamente.

5.4 AVALIAÇÃO DO SINERGISMO ENTRE O FLUCONAZOL E OS DERIVADOS TIOFENOS

Para avaliação da ocorrência de ação antifúngica sinérgica entre o fluconazol e os derivados tiofenos, foram selecionados os dois compostos tiofenos que apresentaram atividade antifúngica mais significativa, o 6CN e 7CN. Sendo testados em combinação com o fluconazol frente à 5 isolados e ATCC 750. Foram testados nos isolados que apresentaram resistência ao fluconazol para analisar se a atuação do composto derivado de tiofeno associado ao fluconazol teria um potencial de ação

aprimorado sobre o fungo quando comparado à utilização das drogas testadas individualmente.

Com a determinação da Concentração Inibitória Fracionada (FIC), foi possível definir a interação da combinação das drogas, como sinérgicas, aditivas, indiferentes ou antagônicas. Para cada isolado foi calculado o valor da FIC em relação a cada composto combinado com o fluconazol, como mostra na tabela 6 os valores obtidos.

Tabela 6 - Determinação da Concentração Inibitória Fracionada (FIC) em $\mu\text{g/mL}$ dos isolados de *Candida* frente aos compostos em combinação com o fluconazol

Concentração Inibitória Fracionada								
URM	Fluconazol	6CN (100%)	Fluconazol / 6CN	FIC	Fluconazol	7CN (100%)	Fluconazol / 7CN	FIC
6554	8 $\mu\text{g/mL}$	>1024 $\mu\text{g/mL}$	2 $\mu\text{g/mL}$ / 64 $\mu\text{g/mL}$	0,3	8 $\mu\text{g/mL}$	512 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$ / 128 $\mu\text{g/mL}$	0,3
7231	64 $\mu\text{g/mL}$	>1024 $\mu\text{g/mL}$	2 $\mu\text{g/mL}$ / 64 $\mu\text{g/mL}$	0,09	64 $\mu\text{g/mL}$	1024 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$ / 64 $\mu\text{g/mL}$	0,07
7238	64 $\mu\text{g/mL}$	>1024 $\mu\text{g/mL}$	2 $\mu\text{g/mL}$ / 512 $\mu\text{g/mL}$	0,5	64 $\mu\text{g/mL}$	512 $\mu\text{g/mL}$	0,5 $\mu\text{g/mL}$ / 1024 $\mu\text{g/mL}$	2
7239	32 $\mu\text{g/mL}$	512 $\mu\text{g/mL}$	0,5 $\mu\text{g/mL}$ / 128 $\mu\text{g/mL}$	0,2	32 $\mu\text{g/mL}$	1024 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$ / 64 $\mu\text{g/mL}$	0,09
7240	32 $\mu\text{g/mL}$	64 $\mu\text{g/mL}$	0,5 $\mu\text{g/mL}$ / 64 $\mu\text{g/mL}$	1	32 $\mu\text{g/mL}$	512 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$ / 64 $\mu\text{g/mL}$	0,15
750	2 $\mu\text{g/mL}$	>1024 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$ / 256 $\mu\text{g/mL}$	0,75	2 $\mu\text{g/mL}$	>1024 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$ / 32 $\mu\text{g/mL}$	0,5

Fonte: A autora (2025).

Para a associação entre o fluconazol e o 6CN, o isolado URM6554 obteve o valor da FIC de 0,3, uma associação sinérgica entre as drogas, visto que há um sinergismo quando o valor da FIC é igual ou menor que 0,5. Também apresentaram sinergismo, os isolados URM7231 (FIC 0,09), URM7238 (FIC 0,5) e URM7239 (FIC 0,2). O isolado URM7240, apresentou um valor de FIC de 1 $\mu\text{g/mL}$, definida como indiferença, visto que a interação entre os compostos é considerada indiferente quando o valor da FIC é igual ou maior que 1, mas menor que 4. A ATCC 750 apresentou um valor de FIC de 0,75 $\mu\text{g/mL}$, uma aditividade, pois uma interação é considerada aditiva quando o valor da FIC é maior que 0,5, mas menor que 1.

Para o 7CN, os isolados URM6564 (0,3 $\mu\text{g/mL}$), URM7231 (0,07 $\mu\text{g/mL}$), URM729 (0,09 $\mu\text{g/mL}$), URM7240 (0,15 $\mu\text{g/mL}$) e ATCC 750 (0,5 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram sinergismo com a interação do composto associado ao fluconazol. Para o isolado URM7238, obteve um valor da FIC de 2 $\mu\text{g/mL}$, que indica uma indiferença na

interação, visto que a indiferença é definida quando o valor da FIC é igual ou maior que 1, mas menor que 4.

O surgimento de cepas resistentes prejudica a eficácia de fármacos da classe dos azóis, que são antifúngicos amplamente utilizados e a única opção de tratamento oral disponível para casos de candidemia. Uma estratégia promissora para intensificar a eficácia do fluconazol é identificar drogas sinérgicas que podem aumentar seu efeito antifúngico, ou mesmo reduzir o aparecimento da resistência, tornando-a uma droga fungicida (Escribano *et al.*, 2022).

A ação sinérgica da interação dos compostos tiofenos também foi evidenciada em estudo de Silva Alves e colaboradores (2024), no qual relataram que a ação antifúngica de um composto derivado de tiofeno quando associado ao fluconazol apresentou efeito sinérgico contra cepas resistentes das espécies de *Candida*.

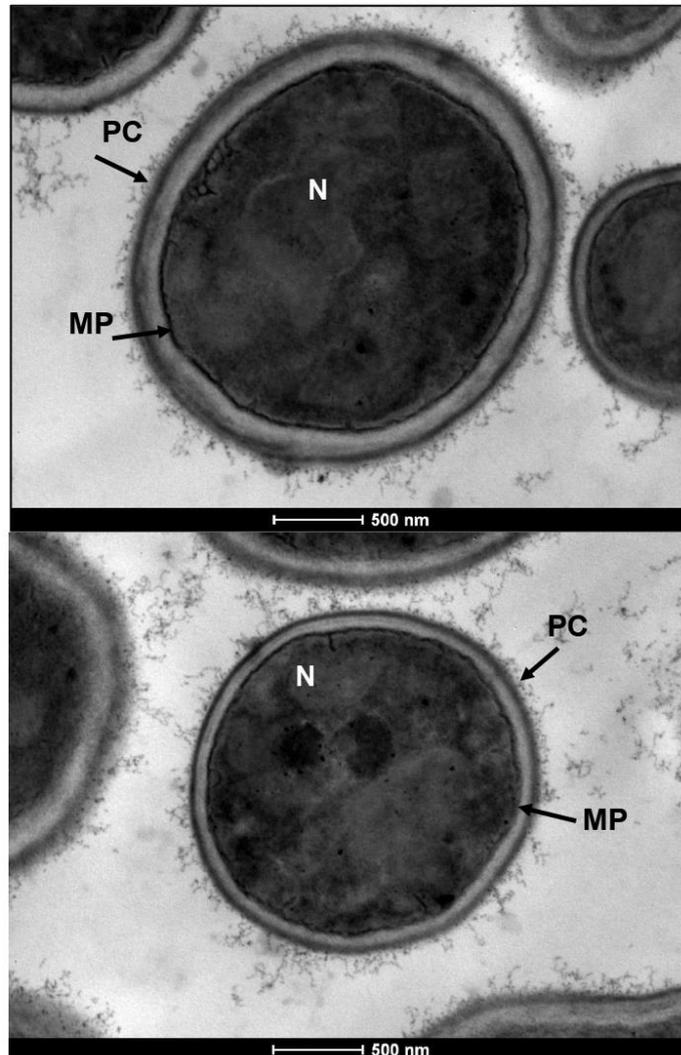
O potencial sinérgico dos compostos derivados de tiofeno também foi observado por Mohammed *et al.* (2022), no qual analisaram derivados de pirazol contendo o anel de tiofeno, que demonstraram efeitos sinérgicos quando combinados com os fármacos ciprofloxacino e cetoconazol, reduzindo os valores das CIMs em bactérias e fungos resistentes.

5.5 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS

Com as imagens obtidas através da microscopia eletrônica de transmissão foi possível observar as estruturas da célula fúngica sem tratamento e com tratamento pelos derivados tiofenos. Foram analisados a ação das moléculas que obtiveram melhores atividades antifúngicas nos testes de susceptibilidade, que foram as moléculas 6CN e 7CN. As cepas de *Candida* utilizadas para as análises foram a ATCC750 e URM6555 das espécies *C. tropicalis* e *C. haemulonii*, respectivamente.

A amostra controle das leveduras, ou seja, que não foram tratadas com as moléculas, apresentaram-se intactas, com a integridade da parede e membrana celular, como também o citoplasma preservado, como observado na figura 3.

Figura 3 - Micrografia do controle dos isolados ATCC750 e URM6555 de *Candida tropicalis* e *Candida haemulonii*, respectivamente, sem alterações estruturais.

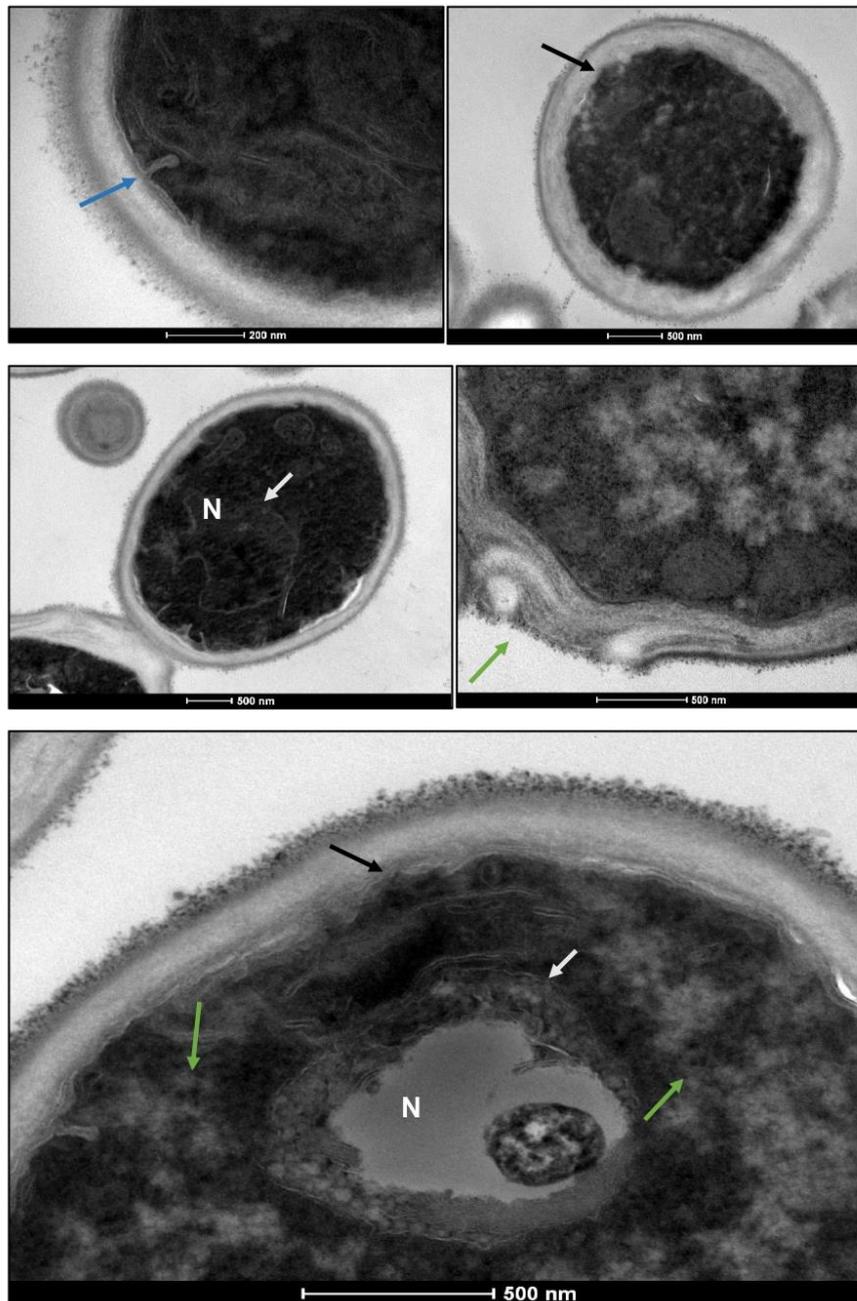


Evidenciando a integridade da parede celular (PC), membrana plasmática (MP) e núcleo (N), além de preservação da área citoplasmática. Fonte: A autora (2025).

No entanto, as células tratadas com as moléculas derivadas de tiofenos apresentaram-se estruturalmente alteradas em comparação com o controle. No composto 6CN, foi possível observar anormalidades na estrutura celular em ambas as espécies. Na ATCC750 observou-se o aparecimento de irregularidades na membrana plasmática, demonstrando invaginações e retração da membrana, assim, pressupõe que houve estresse devido a peroxidações lipídicas causadas por espécies reativas de oxigênio, ocasionando o afastamento da parede celular, como também, morfologia anormal da membrana nuclear. Na cepa URM6555, apresentou o surgimento de morfologia anormal e espessamento da parede celular, formação de

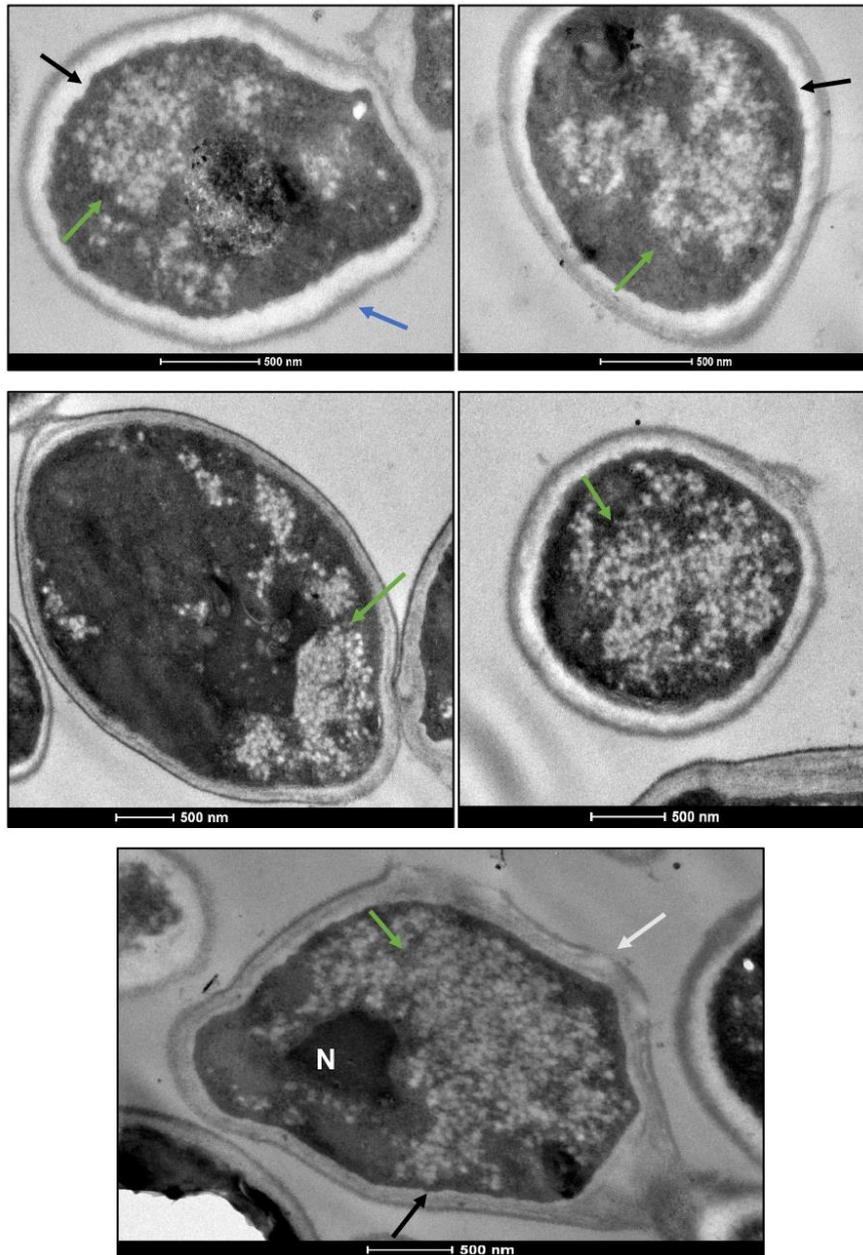
vacúolos com degradação do conteúdo citoplasmático e irregularidades da membrana plasmática. Para o composto 7CN, ambas as espécies apresentaram uma significativa degradação do conteúdo citoplasmático com formação de vacúolos, possivelmente indicando morte celular apoptótica, além de retrações da membrana plasmática e morfologia anormal da membrana nuclear com espessamento e deformações da parede celular, como demonstrado nas figuras 4-7.

Figura 4 - Micrografia do isolado ATCC750 tratado com o derivado tiofeno 6CN.



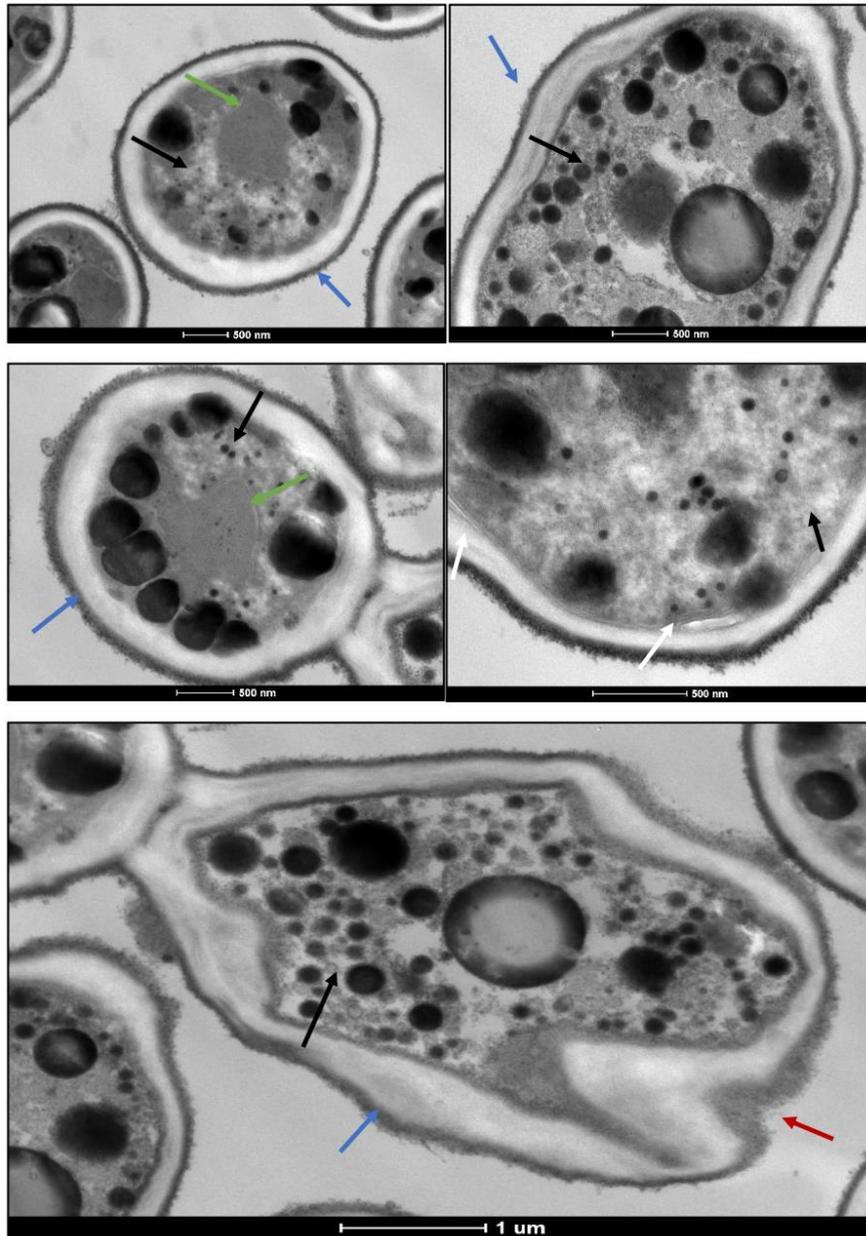
A levedura ao ser submetida ao composto 6CN, evidenciando invaginações na membrana plasmática (seta azul), irregularidades na membrana plasmática (seta preta), morfologia anormal do núcleo (seta branca) e degradação da área citoplasmática (seta verde). Fonte: A autora (2025).

Figura 5 - Micrografia do isolado URM6555 tratado com o derivado tiofeno 6CN.



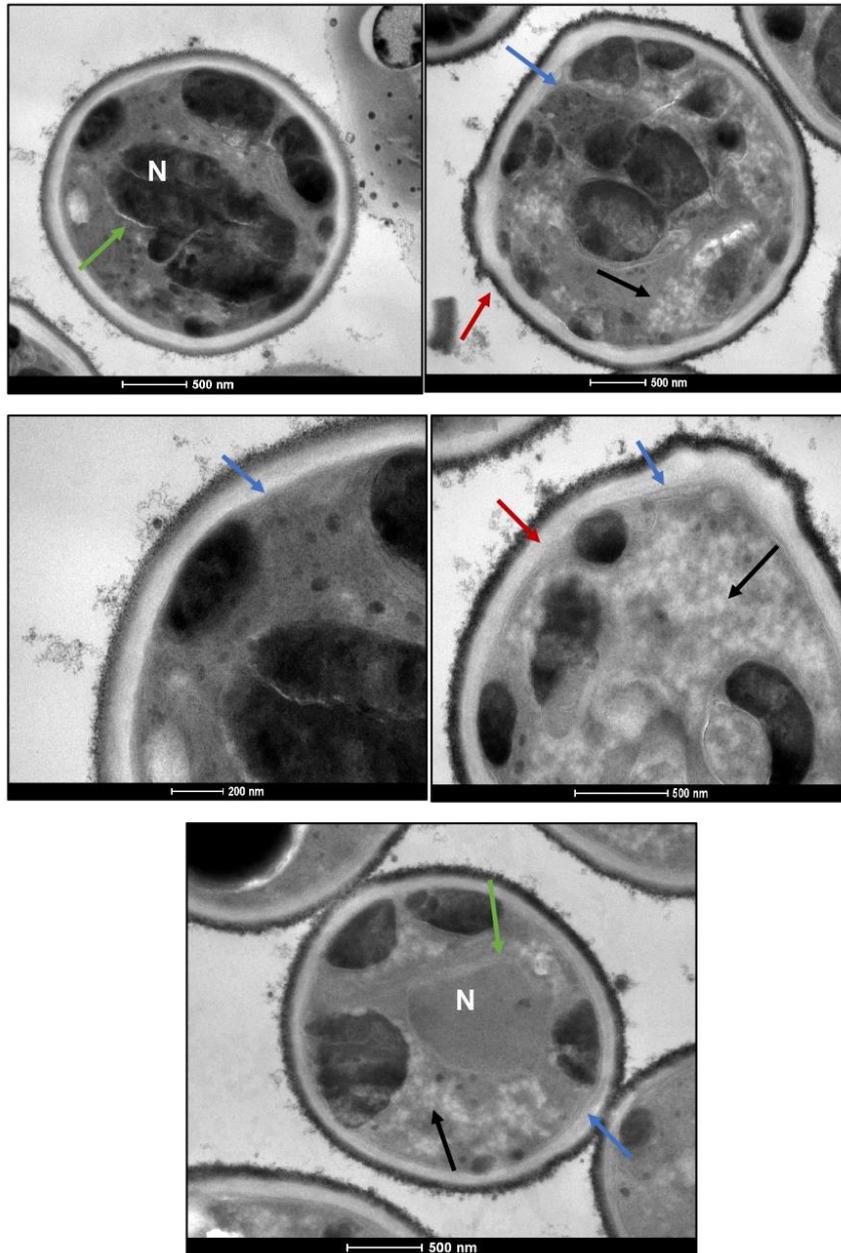
A levedura ao ser submetida ao composto 6CN, evidenciando irregularidades na membrana plasmática (seta preta), morfologia anormal da parede celular (seta branca), degradação da área citoplasmática com vacuolização (seta verde) e espessamento da parede celular (seta azul). Fonte: A autora (2025).

Figura 6 - Micrografia do isolado ATCC750 tratado com o derivado tiofeno 7CN.



A levedura ao ser submetida ao composto 7CN, evidenciando significativa degradação da área citoplasmática com fenômeno de vacuolização citoplasmática (seta preta), morfologia anormal nuclear (seta verde), retração da membrana plasmática e espessamento (seta azul) e deformações (seta vermelha) da parede celular. Fonte: A autora (2025).

Figura 7 - Micrografia do isolado URM6555 tratado com o derivado tiofeno 7CN.



A levedura ao ser submetida ao composto 7CN, evidenciando degradação da área citoplasmática com fenômeno de vacuolização (seta preta), morfologia anormal nuclear (seta verde), retração da membrana plasmática (seta azul) e espessamento da parede celular (seta vermelha) Fonte: A autora (2025).

Os resultados estão de acordo com estudo de Queiroz (2023) que analisou a ação de moléculas derivadas de tiofenos na estrutura fúngica de espécies de *C. albicans* e *C. tropicalis* através da microscopia eletrônica de transmissão, onde observou surgimento de invaginações na membrana plasmática associado a uma morfologia anormal da parede celular e da membrana nuclear. Da mesma maneira

Araújo Neto e colaboradores (2020) obtiveram achados equivalentes ao determinar que o tiofeno-tiossemicarbazona causou retração da membrana plasmática e alterações na forma do núcleo, causando apoptose em células de *C. albicans* devido ao estresse oxidativo. Assim como Silva Alves *et al.* (2024), demonstraram que as células tratadas com tiofenos exibiram alterações morfológicas características de apoptose como condensação e marginação da cromatina, desintegração da membrana, presença de agregações de pequenos vacúolos, além de espessamento da parede celular. Em outro estudo de Fayed *et al.* (2022) constataram que o ciclohepta[b]tiofeno pode induzir danos a enzimas importantes para os processos biológicos essenciais das leveduras. Entretanto, cabe ressaltar que aqui demonstramos pela primeira vez a presença de intensa vacuolização citoplasmática, que pode estar associada ao fenômeno de apoptose.

Ao compararmos os resultados com a literatura científica, estas alterações na estrutura celular são comuns nos antifúngicos recomendados para o tratamento de espécies de *Candida*, como ocorre no fluconazol, que apresenta um perfil de microscopia semelhante, evidenciando enrugamento da parede celular, depressões, cavitação e colapso da membrana plasmática. Como também ocorre na anfotericina B e no miconazol, um desequilíbrio dinâmico da célula que desestabiliza a membrana plasmática. Além disso, a visualização de agregações de pequenos vacúolos, também são encontrados no mecanismo de ação da anfotericina B nas células fúngicas (Dornelas -Ribeiro *et al.*, 2012); Grela *et al.*, 2019). Como foi observado no estudo de Grela e colaboradores (2019), que relataram células de *Candida* apresentando agregações de pequenos vacúolos quando expostas à anfotericina B, relacionando os vacúolos a uma condição de autodefesa quando a célula fúngica é exposta à atividades tóxicas.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos apresentados, foi possível concluir que:

- Isolados de *Candida* foram autenticados, sendo evidente a necessidade de ferramentas moleculares.
- As cepas de *Candida albicans* apresentaram sensibilidade ao fluconazol, enquanto isolados de *Candida pseudohaemulonii*, *Candida parapsilosis* stricto sensu e *Candida haemulonii* apresentaram resistência;
- Os compostos 6CN e 7CN foram os derivados de tiofeno que apresentaram resultados mais significativos na inibição do crescimento do fungo;
- Os compostos derivados de tiofeno testados demonstraram maior ação fungistática (50% de inibição), indicando serem moléculas com maior ação fungistática do que fungicida;
- A ação do fluconazol em combinação com os derivados tiofenos demonstrou interação sinérgica na maioria dos isolados, evidenciando que os compostos avaliados em associação com o fluconazol resultam em um efeito maior de inibição do crescimento fúngico do que a inibição apresentada individualmente;
- A microscopia eletrônica de transmissão demonstrou que os derivados tiofenos apresentaram ação significativa na estrutura da célula fúngica de espécies de *Candida*, com visualização pela primeira vez da ocorrência de intensa vacuolização citoplasmática, indicando apoptose celular.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, D. et al. Trailing end-point phenotype of *Candida* spp. in antifungal susceptibility testing to fluconazole is eliminated by altering incubation temperature. **J Med Microbiol**, v. 56, n. 7, p. 1003-1004, 2007.
- ALMEIDA, S.R.; WILSON, D.; HUBE B. *Candida albicans* iron acquisition within *albicans* Adaptation on Simulated Human Body Fluids under Different Ph the host. **FEMS Yeast Res**, p. 1000-1012, 2009.
- ÁLVARES, Cassiana Aparecida; SVIDZINSKI, Terezinha Inez Estivalet; CONSOLARO, Márcia Edilaine Lopes. Vulvovaginal candidiasis: susceptibility factors of the host and virulence of the yeasts. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, p. 319-327, 2007.
- ANDREOLA, P. et al. Estudo comparativo entre a produção de fosfolipases extracelulares e proteinases do gênero *Candida* isoladas a partir de infecções de cavidade oral. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 45, n. 4, p. 219-226, 2016.
- ANTUNES, F. et al. *Candida auris*: emergência recente de um fungo patogênico multirresistente. **Acta Médica Portuguesa**, v. 33, n. 10, p. 680-684, 2020.
- ANN CHAI, L. Y.; DENNING, D. W.; WARN, P. *Candida tropicalis* in human disease. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 282-298, 2010.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA)**. Nota Técnica GVIMS/GGTES/ANVISA nº 04/2021: Orientações para vigilância, identificação, prevenção e controle de infecções fúngicas invasivas em serviços de saúde no contexto da pandemia da COVID-19. Brasília, 14 jun. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/ptbr/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/notas-tecnicas/notas-tecnicas-vigentes/nota-tecnica-04-2021-infeccoes-fungicas-e-covid19.pdf/view>. Acesso em: 14/02/2025.
- ARRAES, Ana Carolina Palmeira et al. Frequência de espécies de *Candida* isoladas de infecção de corrente sanguínea no período 2010 a 2022 em um hospital da cidade de Salvador-Bahia. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 27, p. 103292, 2023.
- ARAÚJO-NETO, L. N.; Lima, M. C. A.; OLIVEIRA J. F.; BUONAFINA, E. R. S; SILVA, M. D.; ANJOS, M. N. V.; BRAYNER, F. A.; ALVES, L. C.; NEVES, R. P; MENDONÇA-JUNIOR, F. J. B. Synthesis, cytotoxicity and antifungal activity of 5-nitro-thiophene-thiosemicarbazones derivatives. **Chemico-biological interactions**, v. 272, p. 172-181, 2017.
- ARAÚJO-NETO, L. N.; LIMA, M. C. A.; OLIVEIRA, J. F.; SOUZA, E. R.; MACHADO, S. E. F.; LIMA, G. M. S.; BUONAFINA, M. D. S.; BRAYNER, F. A.; ALVES, L. C.; SANDES, J. M. Thiophene-thiosemicarbazone derivative (L10) exerts antifungal activity mediated by oxidative stress and apoptosis in *C. albicans*. **Chemico-biological Interactions**, v. 320, p. 1-30, 2020

ARENDRUP, M. C.; PERLIN, D. S. *Echinocandin resistance: an emerging clinical problem*. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 27, n. 6, 484-492, 2014.

ARENDRUP, M. C.; PATTERSON, T. F. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. **Journal of Infectious Diseases**, v. 223, n. Suppl 2, p. S193-S198, 2021.

ARMSTRONG-JAMES, D. et al. Immunotherapeutic approaches to treatment of fungal diseases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. e393-e402, 2017.

ARRUDA, S. V. A. **Abordagem molecular na caracterização de isolados clínicos de *Candida spp.* e perfil de susceptibilidade antifúngica**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

ASNER, S. A. et al. Acquired multidrug antifungal resistance in *Candida lusitanae* during therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7715-7722, 2015.

BARBEDO, L. S; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, p. 22-38, 2010.

BARBOSA, A. et al. *Candida albicans* adaptation on simulated human body fluids under different pH. **Microorganisms**, v. 8, n. 4, p. 511, 2020.

BERKOW, E.; LOCKHART, S. Fluconazole resistance in *Candida* species: A current perspective. **Infection and Drug Resistance**, v. 10, p. 237–245, jul. 2017.

BERKOW, E. L; SHAWN, R. L. Activity of novel antifungal compound APX001A against a large collection of *Candida auris*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 73, n. 11, p. 3060-3062, 2018.

BERMAN, J.; KRYSAN, D. J. Drug resistance and tolerance in fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 319-331, 2020.

BERNARDO, K. M. R.; LIMA, A. P. W. Ocorrência de candidíase no exame citológico de pacientes do hospital geral de Curitiba. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 8, n. 4, p. 98-206, 2015.

BOHNER, F.; PAPP, C.; GÁCSEK, A. The effect of antifungal resistance development on the virulence of *Candida* species. **FEMS Yeast Research**, v. 22, n. 1, 2022.

BONGOMIN, F. et al. Global and multi-national prevalence of fungal diseases estimate precision. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 75, 2020.

BORGES, C. A. et al. Diagnosis and forms of treatment of oral candidiasis: a literature review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. 1-9, 2021.

BORMAN, A. M.; SZEKELY, A.; JOHNSON, E. M. Comparative Pathogenicity of United Kingdom Isolates of the Emerging Pathogen *Candida auris* and Other Key Pathogenic *Candida* Species. **mSphere**, 2016.

BOZOROV, K.; NIE, L. F.; ZHAO, J.; AISA, H. A. "2-aminothiophene scaffolds: Diverse Biological and Pharmacological Attributes in Medicinal Chemistry". **Eu. J. Med. Chem**, v. 140, p. 465-493, 2017.

BRANCO, J.; MIRANDA, I. M.; RODRIGUES, A. G. *Candida parapsilosis* virulence and antifungal resistance mechanisms: a comprehensive review of key determinants. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 1, p. 80, 2023.

BRANZK, N.; LUBOJEMSKA A.; HARDISON, S. E.; WANG, Q.; GUTIERREZ, M. G, BROWN, G. D, PAPAYANNOPOULOS, V. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. **Nat. Immunol.** v.15, p. 1017–1025, 2014.

BREUER, U.; HARMS, H. *Debaryomyces hansenii* - an extremophilic yeast with biotechnological potential. **Yeast**, v. 23, n. 6, p. 415-437, 2006.

BROWN, J. L, DELANEY, C.; SHORT, B.; BUTCHER, M. C.; MCCLOUD, E.; WILLIAMS, C.; KEAN, R.; RAMAGE, G. *Candida auris* Phenotypic Heterogeneity Determines Pathogenicity *In Vitro*. **MSphere**, 2020

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. *Virulence factors of Candida albicans* Trends. **Microbiol**, v. 9, n. 7, p. 327-35, 2001

CASADEVALL A.; KONTOYIANNIS, D. P.; ROBERT, V. On the Emergence of *Candida auris*: Climate Change, Azoles, Swamps, and Birds. **MBio**, 2019.

CAUCHIE, M.; DESMET, S.; LAGROU, K. *Candida* and its dual lifestyle as a comensal and a pathogen. **Research in Microbiology**, v. 9-10, n. 168, p. 802-810, 2017.

CHAVES, Á. G.; COSTA, V. M. D.; BRITO, M. D. V. *Candida auris*: Iminência de uma nova pandemia? **RECIMA21: Revista Científica Multidisciplinar**, v. 4, p. e24287, 2021.

CHARLIE, C. *Fluconazole for the management of invasive candidiasis: where do we stand after 15 years?* **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 384–410, 2006.

CHAKRABARTI, A.; SOOD P. On the emergence, spread and resistance of *Candida auris*: host, pathogen and environmental tipping points. **J. Med. Microbiol**, 2021.

CHONG, P. P. et al. Transcriptomic and genomic approaches for unravelling *Candida albicans* biofilm formation and drug resistance - an update. **Genes**, v. 9, n. 11, p. 540, 2018.

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.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 2nd ed. CLSI supplement M60. Wayne, PA, 2020.

COENYE, Tom et al. Factors influencing the trailing endpoint observed in *Candida albicans* susceptibility testing using the CLSI procedure. **Clinical microbiology and infection**, v. 14, n. 5, p. 495-497, 2008.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T.; CAMARGO, L. F. A. et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis- a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia e Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **Braz J Infect Dis**, v. 17, n. 3, p. 283-312, 2013.

CÓRDOBA, S.; TAVERNA, C.; VIVOT, W.; SZUSZ, W.; VIVOT, M.; ISLA, G.; DAVEL, G. Emergence of resistance to fluconazole in *Candida albicans* isolated from Vaginal Discharge. **Current Fungal Infection Reports**, 2018.

CORTEGIANI, A. et al. Epidemiology, clinical characteristics, resistance, and treatment of infections by *Candida auris*. **Journal of Intensive Care**, v. 6, n. 1, 2018.

COSTA, P. C. T. Análise da atividade antifúngica de derivados furânicos contra *Candida* spp. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais e Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2020.

DADAR, M.; TIWARI, R.; KARTHIK, K. et al. *Candida albicans* – biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – an update. **Microb Pathog**, v. 117, p. 128-138, 2018.

DENG, Y. et al. Phenotypic switching and filamentation in *Candida haemulonii*, an emerging opportunistic pathogen of humans. **Microbiology Spectrum**, v. 9, 2021.

DENNING, D. W. *Echinocandin antifungal drugs*. **The Lancet**, v. 362, p. 0–1151, 2003.

DEL NEGRO, G. M. D. **Identificação de cinco espécies de *Candida* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e por hemoculturas em pacientes pediátricos com risco para candidemia**. 2008. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós Graduação em Pediatria, Centro de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

DÍAZ-GARCÍA, J. et al. Monitoring the epidemiology and antifungal resistance of yeasts causing fungemia in a tertiary care hospital in Madrid, Spain: any relevant changes in the last 13 years? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. 10.1128/aac.01827-20, 2021.

DORNELAS-RIBEIRO, Marcos et al. Cellular characterisation of *Candida tropicalis* presenting fluconazole-related trailing growth. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 31-38, 2012.

ELEAMEN, G. R.; COSTA, S. C.; LIMA-NETO, R. G.; NEVES, R. P.; ROLIM, L. A.; ROLIM-NETO, P. J.; MOURA, R. O.; AQUINO, T.M.; BENTO, E.S.; SCOTTI, M.T.; MENDONÇA-JUNIOR, F. J. Improvement of solubility and antifungal activity of a new aminothiophene derivative by complexation with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 1, p. 116-125, 2017.

ENE, I. V. et al. Global analysis of mutations driving microevolution of a heterozygous diploid fungal pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 37, p. E8688-E8697, 2018.

ESCRIBANO, P.; GUINEA, J. Fluconazole-resistant *Candida parapsilosis*: a new emerging threat in the fungi arena. **Frontiers in Fungal Biology**, v. 3, p. 1010782, 2022.

EYRE, D.W.; SHEPPARD, A.E.; MADDER, H.; MOIR, I.; MORONEY, R.; QUAN, T.P. et al. Um surto de *Candida auris* e seu controle em um ambiente de terapia intensiva. **N Engl J Med**, v. 379, n. 14, p. 1322–1331, 2018.

FAN, X. et al. Notable increasing trend in azole non-susceptible *Candida tropicalis* causing invasive candidiasis in China (August 2009 to July 2014): Molecular epidemiology and clinical azole consumption. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 464, 2017.

FAORO, F.; FACCIO, A.; BALESTRINI, R. Contributions of ultrastructural studies to the knowledge of filamentous fungi biology and fungi-plant interactions. **Frontiers in Fungal Biology**, v. 2, p. 805739, 2022.

FARIAS, C. D. S. et al. **Potencial antimicrobiano do dimetilsulfóxido (DMSO) frente a diversas cepas bacterianas**. In: III CONBRACIS. Campina Grande: Realize Editora, 2018.

FAYED, Eman A. et al. Novel cyclohepta [b] thiophene derivative incorporating pyrimidine, pyridine, and chromene moiety as potential antimicrobial agents targeting DNA gyrase. **Journal of Molecular Structure**, v. 1262, p. 133028, 2022.

FLEURI, L. et al. Estudo da influência de diferentes parâmetros na produção de enzimas líticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 2, 2008.

FORD, C. B. et al. The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. **eLife**, v. 4, 2015.

FRANCA RODRIGUES, K. A. et al. 2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation in vitro. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 106, p. 1-14, 2015.

FRANKL, A. et al. Electron microscopy for ultrastructural analysis and protein localization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell**, v. 2, n. 11, p. 412-428, 2015.

GADE, L.; MUNÓZ, J. F.; SHETH, M. et al. Understanding the emergence of multidrug-resistant *Candida*: Using whole-Genome sequencing to describe the population structure of *Candida haemulonii* species complex. **Frente. Geneta**, v. 11, 2020.

GANTNER, B. N.; SIMMONS, R. M.; UNDERHILL, D. M. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. **Embo J**, v. 24, p. 1277–1286, 2005.

GARCIA-EFFRON, G. et al. Effect of *Candida glabrata* FKS1 and FKS2 mutations on echinocandin sensitivity and kinetics of 1,3- β -d-glucan synthase: implication for the existing susceptibility breakpoint. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3690-3699, 2009.

GEIJER, C. et al. Genomic and transcriptomic analysis of *Candida intermedia* reveals the genetic determinants for its xylose-converting capacity. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, p. 1-15, 2020.

GÓMEZ-GAVIRIA, M.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, J. A.; CHÁVEZ-SANTIAGO, J. O.; MORA-MONTES, H. M. *Candida haemulonii* Complex and *Candida auris*: Biology, Virulence Factors, Immune Response, and Multidrug Resistance. **Infectar. Resistência às Drogas**, v. 16, p. 1455–1470, 2023.

GOU, Y.; WANG, J.; CHEN, S.; ZHANG, Z. et al. α – N -heterocyclic thiosemicarbazone Fe (III) complex: Characterization of its antitumor activity and identification of anticancer mechanism. **European Journal of Medicinal Chemistry**, n. 123, p. 354-364, 2016.

GOW, N. A.; NETEA, M. G.; MUNRO, C. A.; FERWERDA, G.; BATES, S.; MORA-MONTES, H. M.; WALKER, L.; JANSEN T.; JACOBS, L.; TSONI, V. et al. Immune recognition of *Candida albicans* beta-glucan by dectin-1. **J. Infectar. Dis**, v.196, p. 1565–1571, 2007.

GOW, Neil AR; LATGE, Jean-Paul; MUNRO, Carol A. The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 3, 2017.

GRELA, Ewa et al. Modes of the antibiotic activity of amphotericin B against *Candida albicans*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 17029, 2019.

GUIMARÃES, G. P.; REIS, M. Y. F. A.; DA SILVA, D. T. C. et al. Antifungal activity of topical microemulsion containing a thiophene derivative. **Braz J Microb**, v. 45, n. 2, p. 545-550, 2014.

GUO, J. et al. Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida parapsilosis* species complex in Eastern China: A 15-year retrospective study by ECIFIG. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 644000, 2021.

HAMILL, R. J. *Amphotericin B. Mechanism of Action: Pharmacology of Antifungal agents*. In **Antimicrobial Drug Resistance**, p. 781-794, 2020

HANI, L.; SHIVAKUMAR, H. G.; VAGHELA, R.; OSMANI, R. A.; SHRIVASTAVA, A. Candidiasis: a fungal infection-current challenges and progress in prevention and treatment. **Infectious Disorders-Drug Targets**, v. 15, p. 42-52, 2015.

HARRISON, B. D. et al. A tetraploid intermediate precedes aneuploid formation in yeasts exposed to fluconazole. **PLoS Biology**, v. 12, n. 3, 2014.

HASSANOPOUR, P. et al. Molecular diagnosis, phylogenetic analysis, and antifungal susceptibility profiles of *Candida* species isolated from neutropenic oncological patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 23, p. 765, 2023.

HAWKINS, J. L.; BADDOUR, L. M. *Candida lusitanae* infections in the era of fluconazole availability. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 2, p. e14–18, 2003.

HOENIGL, M.; SPRUTE, R.; EGGER, M.; ARASTEHFAR, A.; CORNELLY, A. O. et al. The Antifungal Pipeline: Fosmanogepix, Ibrexafungerp, Olorofim, Opelconazole, and Rezafungin. **Drugs**, v. 81, n. 15, 2021.

HOOG, G. S. et al. **Atlas of Clinical Fungi**. 2000.

INÁCIO, C. P.; ROCHA, A. P.; BARBOSA, R. N.; OLIVEIRA, N. T.; SILVA, J. C.; LIMANETO, R. G.; MACÊDO, D. P.; NEVES, R. P. Experimental white piedra: a robust approach to ultrastructural analysis, scanning electron microscopy and etiological discoveries. **Exp Dermatol**, v. 25, p. 79-81, 2016.

JAMAL, W. Y. et al. Comparative evaluation of two matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of clinically significant yeasts. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 167-170, 2014.

JHA, K. K.; KUMAR, S.; ISHA, T.; MISHRA, R. Thiophene: the molecule of diverse medicinal importance. **J. Pharm. Res**, v. 5, p. 560-566, 2012.

JOHNSON, C. J.; DAVIS, J. M.; HUTTENLOCHER, A.; KERNIEN, J. F.; NETT, J. E. Emerging Fungal Pathogen *Candida auris* Evades Neutrophil Attack. **MBio**, v. 9, 2018.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n.1, p. 120–128, 2008.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochim Pol**, v. 56, n. 2, p. 211-24, 2009.

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

KASHEM, S. W.; IGYARTO, B. Z.; GERAMI-NEJAD, M.; KUMAMOTO, Y.; MOMAMMED, J.; JARRETT, E.; DRUMMOND, R. A.; ZURAWSKI, S. M.; ZURAWSKI,

G.; BERMAN, J. *Candida albicans* morphology and dendritic cell subsets determine T helper cell differentiation. **Immunity**, v. 42, p. 356- 366, 2015.

KERI, R. S.; CHAND, K.; BUNDAGUMPI, S.; SOMAPPA, S. B.; PATIL, S. A.; NAGARAJA, B. M. An overview of benzo (b) thiophene-based medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 138, p. 1002-1033, 2017.

KHAN, I.; KANUGALA, S.; SHAREEF, M. A.; GANAPATHI, T.; SHAIK, A. B.; SHEKAR, K. C.; KAMAL, A.; KUMAR, C. G. Synthesis of new bis-pyrazole linked hydrazides and their in vitro evaluation as antimicrobial and anti-biofilm agents: A mechanistic role on ergosterol biosynthesis inhibition in *Candida albicans*. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 94, n. 1, p. 1339-1351, 2019.

KHAN, M. S.; AHMAD, I.; ALKHEDHAIRY, A. A.; ALZOHAIRY, M. A. *Candida albicans*: a current review of its epidemiology, pathogenesis, and treatment options. **Mycoses**, v. 64, n. 8, p. 860-872, 2021.

KHAN, Z.; AHMAD S.; AL-SWEIH, N. et al. Changing trends epidemiology and antifungal susceptibility patterns of six bloodstream *Candida* species isolates over a 12-year period in Kuwait. **PLoS One**, v. 14, n. 5, 2019.

KIDD, S. E.; ABDOLRASOULI, A.; HAGEN, F. Fungal nomenclature: managing change is the name of the game. In: **Open Forum Infectious Diseases**, US: Oxford University Press, 2023.

KNEALE, M.; BARTHOLOMEW, J. S.; DAVIES, E.; DENNING, D. W. *Global access to antifungal therapy and its variable cost*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 12, p. 3599-3606, 2016.

KORDALEWSKA, M.; PERLIN, D. S. Identification of drug resistant *Candida auris*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1918, 2019.

KSIEZOPOLSKA, E.; GABALDÓN, T. Evolutionary Emergence of Drug Resistance in *Candida* Opportunistic Pathogens. **Genes**, v. 9, n. 9, p. 1-10, 2018.

KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts: a taxonomic study**. **Elsevier**, 2011.

LEWIS, R. E.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, S.A.; PFALLER, M.A.; KLEPSE, M. E. Comparison of Etest, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **J Antimicrob Chemother**, v. 49, n. 2, p. 345-351, 2002.

LI, J. et al. Assessment of the *In vitro* and *In vivo* antifungal activity of NSC319726 against *Candida auris*. **Microbiology spectrum**, v. 9, n. 3, 2021.

LIMA, R. et al. The emerging threat antifungal-resistant *Candida tropicalis* in humans, animals, and environment. **Frontiers in Fungal Biology**, v. 3, p. 957021, 2022.

LIMA, Y. et al. Epidemiologia das infecções por *Candida* spp. em pacientes comunitários e hospitalizados em Juiz de Fora-MG. *Pasteur*, v.3, p. 176-187, 2023.

LIU, N.; TU, J.; DONG, G.; WANG, Y.; SHENG C. Emerging New Targets for the Treatment of Resistant Fungal Infections. *J Med Chem*, v. 61, n. 13, p. 5484-5511, 2018.

LIU, F. et al. Phylogenomic analysis of the *Candida auris*-*Candida haemulonii* clade and related taxa in the *Metschnikowiaceae*, and proposal of thirteen new genera, fifty-five new combinations and nine new species. *Persoonia*, v. 52, p. 22-43, ago. 2024.

LO, W.-H. et al. Synergistic antifungal activity of chitosan with fluconazole against *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, and fluconazole-resistant strains. *Molecules*, v. 25, n. 21, p. 5114, 2020.

LOCKHART, S. R.; ETIENNE, K. A. et al. Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on three Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. *Clinical Infectious Diseases*, v. 64, n. 2, p. 134-140, 2016.

LOPES, J. P.; LIONAKIS, M. S. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence*, v. 13, n. 1, p. 89-121, 2022.

LU, H. et al. *Candida albicans* targets that potentially synergize with fluconazole. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 47, n. 3, p. 323-337, 2021.

MARR, Kieren A. et al. The trailing end point phenotype in antifungal susceptibility testing is pH dependent. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 43, n. 6, p. 1383-1386, 1999.

MALACARNE, B. **Ocorrência de *C. tropicalis* no hospital universitário Cassiano Antônio de Moraes, estudo de sua suscetibilidade a antifúngicos com propostas de métodos modificados para aprimoramento dos testes *in vitro*.** 2010. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) - Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2010.

MALDONADO, N.; ROBLEDO, C.; ROBLEDO, J. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. *Infectio*, v. 1, n. 22, p. 35-45, 2017.

MAMALI, V. et al. Increasing incidence and shifting epidemiology of candidemia in Greece: results from the first nationwide 10-year survey. *Journal of Fungi*, v. 8, n. 2, p. 116, 2022.

MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D. A.; KAWASAKI, M.; GUARRO, J. *Sporothrix Brasiliensis*, *S. Globosa*, and *S. Mexicana*, Three New *Sporothrix* Species of Clinical Interest. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 3198-3206, 2007.

MATSUNO, V. K. et al. Abordagem PK/PD do fluconazol para garantir a efetividade da terapia antifúngica em pacientes sépticos grandes queimados em terapia intensiva

com infecção sistêmica por *Candida glabrata* (CIM até 32 mg/L). **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 25, p. 181, 2021.

MAYR, A.; LASS-FLORL, C. *Epidemiology and antifungal resistance in invasive aspergillosis according to primary disease - review of the literature*. **European Journal of Medical Research**, v. 16, n. 4, p.153, 2011.

MCMANUS, D. S.; SHAH, S. Antifungal drugs. **Side effects of Drugs Annual**, p. 41, 2019.

MEDINA-CÓRDOVA, N. et al. The potential use of *Debaryomyces hansenii* for the biological control of pathogenic fungi in food. **Biological Control**, v. 121, p. 216–222, 2018.

MELO, N. R.; TAGUCHI, H.; JORGE, J.; PEDRO, R. J.; ALMEIDA, O. P.; FUKUSHIMA, K. *et al.* Flora oral de *Candida* de pacientes brasileiros infectados pelo vírus da imunodeficiência humana na era da terapia antirretroviral altamente ativa. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, 2004.

MELLO, M. E. F. **Atividade antifúngica e antivirulência de derivados 2-aminotiofeno frente a isolados clínicos de *Candida sp.*** 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Biomedicina. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 142-151, fev. 2011.

MIRAMÓN, P.; LORENZ, M. C. A feast for *Candida*: Metabolic plasticity confers an edge for virulence. **PLoS Pathog**, v. 13, 2017.

MIRAMÓN, P.; KASPER, L.; HUBE B. Prosperando no hospedeiro: *Candida* spp. interações com células fagocíticas. **Med. Microbiol. Imunol**, v. 202, p. 183–195, 2013.

MISHRA, N. N.; ALI, S.; SHUKLA, P. K. *Candida infections and therapeutic strategies: Mechanisms of action for traditional and alternative agents*. **Pharmacological Research**, v. 169, 2021.

MOHAMED, H. A. et al. In vitro antimicrobial evaluation, single-point resistance study, and radiosterilization of novel pyrazole incorporating thiazol-4-one/thiophene derivatives as dual DNA gyrase and DHFR inhibitors against MDR pathogens. **ACS Omega**, v. 7, n. 6, p. 4970, 2022.

MORETTI, A. et al. Isolation of *Candida rugosa* from turkeys. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 47, n. 6, p. 433-439, 2000.

MOUNT, H. O. et al. Global analysis of genetic circuitry and adaptive mechanisms enabling resistance to the azole antifungal drugs. **PLoS Genetics**, v. 14, n. 4, p. e1007319, 2018.

MUNÕZ, J. F.; GADE, L.; CHOW, N. A. et al. Genomic insights into multidrug-resistance, mating and virulence in *Candida auris* and related emerging species. **Nat Commun**, 2018.

NAGLIK, J.; ALBRECHT, A.; BADER, O.; HUBE, B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Célula. Microbiol**, v. 6, p. 915–926, 2004.

NAGLIK, J. R. et al. Candidalysin: discovery and function in *Candida albicans* infections. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p. 100-109, 2019.

NANDI, S.; SWAIN, B.; JHA, T.; MISHRA, A.; MISHRA, B. Synthesis and antifungal activity of thiophene-based 1,2,3-triazoles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 125, p. 62-70, 2017.

NAVARRETE, C.; MARTÍNEZ, J. L. Non-conventional yeasts as superior production platforms for sustainable fermentation-based bio-manufacturing processes. **AIMS Bioengineering**, v. 7, n. 4, p. 289-305, 2020.

NAVARRETE, C. et al. A physiological characterization in controlled bioreactors reveals a novel survival strategy for *Debaryomyces hansenii* at high salinity. **Yeast**, v. 38, p. 302–315, 2021.

NAVARRO-FARIAS, M. J.; HERNÁNDEZ-CHÁVEZ, M. J.; GARCÍA-CARNERO, L. C. et al. Differential recognition of *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, and *Candida auris* by human innate immune cells. **Infectar. Resistência às Drogas**, v. 12, p. 783–794, 2019.

NETT, J. E.; David R. A. “Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology and Clinical Indications.” **Infectious disease clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 51-83, 2016.

NEVES, Wendell W. **Derivados como agentes antifúngicos**. 2019. Tese (Doutorado) – Inovação Terapêutica. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

OBISESAN, O. J.; OLOWE, O. A.; TAIWO, S. S. Detecção fenotípica de candidíase geniturinária entre participantes de clínicas de doenças sexualmente transmissíveis no Hospital Universitário Ladoke Akintola, Osogbo, Nigéria. **J Meio Ambiente Saúde Pública**, 2015.

OLIVEIRA, M. M.; SANTOS, C.; SAMPAIO, P. et al. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. **Res Microbiol.**, v. 166, p. 102–110, 2015.

OLIVER, J. C.; FERREIRA, C. B. R. J.; SILVA, N. C.; DIAS, A. L. T. *Candida* spp. and phagocytosis: multiple evasion mechanisms. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 112, n. 10, p. 1409-1423, 2020.

OSTROWSKY, B.; GREENKO, J.; ADAMS, E. et al. *Candida auris* Isolates Resistant to Three Classes of Antifungal Medications - New York, 2019. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v. 69, n. 1, p. 6-9, 2020.

PAIS, P.; COSTA C.; CAVALHEIRO, M.; ROMÃO, D.; TEIXEIRA, M. C. Controlo transcricional da resistência aos medicamentos, virulência e evasão do sistema imunitário em fungos patogénicos: Uma comparação entre espécies. **Frente. Célula. Infectar. Microbiol**, v. 6, p. 131, 2016.

PAPPAGIANIS, D. et al. Development of resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae* infecting a human. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 16, n. 2, p. 123-126, 1979.

PAPPAS, P.G.; KAUFFMAN, C.A.; ANDES, D.; BENJAMIN, D. K. Jr., CALANDRA, T.F.; EDWARDS, J. E. Jr.; FILLER, S.G.; FISHER, J. F.; KULLBERG, B. J., OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A.C.; REX, J. H.; WALSH, T. J, SOBEL, J. D. Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v. 48, n. 5, p. 503-35, 2009.

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

PARAMYTHIOTOU, E. et al. Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 1085-1089, 2014.

PAREDES, K. et al Molecular identification and antifungal susceptibility testing of clinical isolates of the *Candida rugosa* species complex and proposal of the new species *Candida neorugosa*. **J. Clin. Microbiol**, v. 50, p. 2397 – 2403, 2012.

PEÑA, R.; GANGA, M. A. Novel antimicrobial peptides produced by *Candida intermedia* LAMAP1790 active against the wine-spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 112, n. 2, p. 297-304, 2019.

PENÃ, A. V. **Tópicos nas Ciências da Saúde: Volume VII**. Nova Xavantina, MT: Pantanal Editora, 2021.

PÉREZ-DELOS, S. F. J.; RIEGO-RUIZ, L. Gln3 é o principal regulador da assimilação de nitrogênio em *Candida glabrata*. **Microbiologia**, v. 162, p. 1490–1499, 2016.

PERLIN, D. S. Echinocandin resistance in *Candida*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. suppl_6, p. S612-S617, 2015.

PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-R., R.; ALASTRUEY-L., A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet Infectious Diseases**, 2017.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J.; JONES, R. N. *In vitro* activities of caspofungin compared with those of fluconazole and itraconazole

against 3,959 clinical isolates of *Candida* spp., including 157 fluconazole-resistant isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 3, p. 1068-1071, 2003.

PFALLER, M. A. et al. *Candida rugosa*, an emerging fungal pathogen with resistance to azoles: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. **J. Clin. Microbiol**, v. 44, p. 3578 – 3582, 2006.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 133–163, 2007.

PISA, D.; RAMOS, M.; GARCÍA, P.; ESCOTO, R.; BARRAQUER, R.; MOLINA, S.; CARRASCO, L. Fungal infection in patients with serpiginous choroiditis or acute zonal occult outer retinopathy. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 1, p.130-135, 2018.

PRASAD, R.; SHAH, A. H.; RAWAL, M. K. Antifungals: mechanism of action and drug resistance. **Yeast Membrane Transport**, p. 327-349, 2016.

PRASAD, R. ***Candida albicans: Cellular and Molecular Biology***. 2017.

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

QUIROS, M.; MARTORELL, P.; VALDERRAMA, M. J. et al. PCR-RFLP analysis of the IGS region of rDNA: a useful tool for the practical discrimination between species of the genus *Debaryomyces*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 90, p. 211–219, 2006.

RABAAN, A. A. et al. Antibodies to combat fungal infections: development strategies and progress. **Microorganisms**, v. 11, n. 3, p. 671, 2023.

RAMOS, L. S. et al. *Candida haemulonii* complex: species identification and antifungal susceptibility profiles of clinical isolates from Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, p. 111–115, 2015.

RAMOS, L. S. et al. Biofilm formed by *Candida haemulonii* species complex: structural analysis and extracellular matrix composition. **Journal of Fungi (Basel)**, v. 6, p. 46, 2020.

RAMOS, L. S. et al. Surface, adhesiveness and virulence aspects of *Candida haemulonii* species complex. **Medical Mycology**, v. 58, p. 973–986, 2020.

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

RIBEIRO, P. M. et al. Research on *Candida dubliniensis* in a Brazilian yeast collection obtained from cardiac transplant, tuberculosis, and HIV-positive patients, and evaluation of phenotypic tests using agar screening methods. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 71, n. 1, p. 81-86, 2011.

RIQUELME, Meritxell et al. Fungal morphogenesis, from the polarized growth of hyphae to complex reproduction and infection structures. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 82, n. 2, 2018.

ROCHA, W. R. V. et al. *Candida* genus: virulence factors, epidemiology, candidiasis and resistance mechanisms. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, 2021.

RODRIGUES DE MIRANDA, L. *Clavispora*, a new yeast genus of the *Saccharomycetales*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 45, p. 479-483, 1979.

ROETZER, A.; KLOPF, E.; GRATZ N.; MARCET-HOUBEN, M.; HILLER, E.; RUPP, S.; GABALDÓN, T.; KOVARIK, P.; SCHULLER, C. Regulation of *Candida glabrata* oxidative stress resistance is adapted to host environment. **FEBS Lett**, v. 585, p. 319–327, 2011.

ROLLING, T. et al. Haematopoietic cell transplantation outcomes are linked to intestinal mycobiota dynamics and an expansion of *Candida parapsilosis* complex species. **Nature Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1505-1515, 2021.

RUAN, S.Y. et al. Catheter-related fungemia caused by *Candida intermedia*. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. e147-e149, 2010.

RUIZ-GAITAN, A.; MORET, A. M.; TASIAS-PITARCH, M. et al. An outbreak due to *Candida auris* with prolonged colonisation and candidaemia in a tertiary care European Hospital. **Micoses**, v. 61, p. 498–505, 2018.

SALARI, S.; KHOSRAVI, A. R, MOUSAVI, S. A, NIKBAKHT-BROJENI, G. H. Mechanisms of resistance to fluconazole in *Candida albicans* clinical isolates from Iranian HIV-infected patients with oropharyngeal candidiasis. **J Mycol Med**, v. 26, n. 1, p. 35-40, 2016.

SÁNCHEZ, N. S. et al. Glycolytic sequence and respiration of *Debaryomyces hansenii* as compared to *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 23, p. 361–374, 2006.

SANTOS JÚNIOR, P. F. S. Planejamento e avaliação de novos derivados 2-iminotiofen-tiazolidínicos como inibidores de cisteína proteases de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonenses*. 2022. Tese (Doutorado) – Química e Biotecnologia. Universidade Federal de Alagoas, Maceió., 2022.

SANTOS, P.S. ***Candida auris*: emergência e epidemiologia de uma levedura altamente** patogênica. Monografia (Graduação). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, p.19,2017.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA A. M. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **J Med Microbiol**, v. 62, p. 10-24, 2013.

SATOH, K.; MAKIMURA, K.; HASUMI, Y.; NISHIYAMA, Y.; UCHIDA, K.; YAMAGUCHI, H. *Candida auris* sp. nov., uma nova levedura ascomicetosa isolada do

canal auditivo externo de um paciente internado em um hospital japonês. **Microbiol Immunol**, v. 53, p. 41–44, 2009.

SCACCABAROZZI, L. et al. Epidemiology and genotyping of *Candida rugosa* strains responsible for persistent intramammary infections in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 9, p. 4574-4577, 2011.

SCHALLER, M.; BORELLI, C.; KORTING, H. C.; HUBE, B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, n. 6, v. 48, p. 365-377, 2005.

SHARAFUTDINOV, I. S. et al. Increasing susceptibility of drug-resistant *Candida albicans* to fluconazole and terbinafine by 2(5H)-furanone derivative. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 642, 2020.

SHARMA, P. et al. *Debaryomyces hansenii*, a highly osmotolerant and halotolerant yeast, maintains activated Dhog1p in the cytoplasm during its growth under severe osmotic stress. **Current Genetics**, v. 48, n. 3, p. 162-170, 2005.

SHARMA, K.; PARMANU, P. K.; SHARMA, M. Mechanisms of antifungal resistance and developments in alternative strategies to combat *Candida albicans* infection. **Archives of Microbiology**, v. 206, p. 95, 2024.

SIDRIM J.J.C.; Rocha, M.F.G. Micologia Médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro. **Guanaba Koogan**, p. 265-274, 2004.

SIKORA, A.; HASHMI, M. F.; ZAHRA, F. *Candida auris*. **StatPearls Publishing**, 2023.

SILVA, L. N. et al. Insights into the multi-azole resistance profile in *Candida haemulonii* species complex. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 215, 2020.

SILVA ALVES, A. I. et al. Synergistic antifungal effect of thiophene derivative as an inhibitor of fluconazole-resistant *Candida spp.* biofilms. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-11, 2024.

SILVA DANTAS, A. et al. "Cell biology of *Candida albicans*-host interactions." **Current opinion in microbiology**, v. 34, p. 111-118, 2016.

SINGH, R. I. et al. Epidemiology of candidaemia in critically ill trauma patients: experiences of a level I trauma centre in North India. **J. Med. Microbiol**, v. 60, p. 342 – 348, 2011.

SIRI, Leonardo et al. Cambios clínicos y epidemiológicos de candidemias en pacientes adultos desde 2000 a 2013. **Revista chilena de infectología**, v. 34, n. 1, p. 19-26, 2017.

SHENG-YUAN, R.; JUNG-YIEN, C.; YI-CHUNG, H.; PO-REN, H. Catheter-related fungemia caused by *Candida intermedia*. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 147-149, 2010.

TALAPKO, J et al. *Candida albicans* – the virulence factors and clinical manifestations of infection. **J Fungi (Basel)**, v. 7, p. 79, 2021.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N. A.; MAIDEN, M. C.; ODDS, F. C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. To Replace *Candida parapsilosis* Groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 284–292, 2005.

TODD, R. T. et al. Genome plasticity in *Candida albicans* is driven by long repeat sequences. **eLife**, v. 8, p. e45954, 2019.

TORTORA, J. et al. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

TROFA, D.; GÁCSEK, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 606-625, 2008.

VERMA, A. K.; PRASAD, K. N. Fungal infections in intensive care unit patients: epidemiology, risk factors and management strategies. **Current opinion in infectious diseases**, v. 35, n. 1, p. 41-50, 2022.

VIEIRA, G. S. et al. New compounds with antifungal activity based on 2-aminothiophene structures. **Bioorganic Chemistry**, v. 109, p. 104719, 2021.

VICENTE, M. F.; BASILIO, A.; CABELLO, A.; PELAEZ, F. Microbial natural products as a source of antifungals. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 9, n. 1, p. 15-32, 2003.

VYLKOVA, S.; LORENZ, M. C. Phagosomal Neutralization by the Fungal Pathogen *Candida albicans* Induces Macrophage Pyroptosis. **Infectar. Imune**, v. 85, 2017.

WANG, X.; BING, J.; ZHENG, Q.; ZHANG, F.; LIU, J.; YUE, H. et al. The first isolate of *Candida auris* in China: clinical and biological aspects. **Emerg Microbes Infect**, v. 7, n. 1, p. 93, 2018

WANG, Y. et al. Design, synthesis and anticancer activity of novel nopinone-based thiosemicarbazone derivatives. **Bioorg. Med Chem. Lett**, v. 27, p. 2360-2363, 2017.

WHALEY, S. G.; BERKOW, E. L.; RYBAK, J. M.; NISHIMOTO, A. T.; BARKER, K. S.; ROGERS, P. D. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-albicans *Candida* Species. **Frontiers In Microbiology**, v. 7, p. 1-12, 2017.

WANG, D. et al. *Candida tropicalis* distribution and drug resistance is correlated with *ERG11* and *UPC2* expression. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 10, p. 1-9, 2021.

WHALEY, S. G. et al. *UPC2A* is required for high-level azole antifungal resistance in *Candida glabrata*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4543-4554, 2014.

WU, J. et al. Single-cell protein and xylitol production by a novel yeast strain *Candida intermedia* FL023 from lignocellulosic hydrolysates and xylose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 185, p. 163-178, 2018.

XISTO, M. I. et al. Pan-azole-resistant *Candida tropicalis* carrying homozygous *ERG11* mutations at position K143R: a new emerging superbug? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 4, p. 988-992, 2017.

YANG, L.; CHEN, S.; WANG, J.; WU, X.; ZHANG, X. Design, synthesis and biological evaluation of thiophene-2-carboxylic acid hydrazide derivatives as potent antifungal agents. **Letter de Química Bioorgânica e Medicinal**, v. 28, n. 9, p. 1506-1510, 2018.

YANG, F. et al. Aneuploidy enables cross-adaptation to unrelated drugs. **Molecular Biology and Evolution**, v. 36, n. 8, p. 1768-1782, 2019.

YÖNTEN, V.; AKTAŞ, N. Exploring the optimum conditions for maximizing the microbial growth of *Candida intermedia* by response surface methodology. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 26-39, 2014.

ZHAI, B. et al. High-resolution mycobiota analysis reveals dynamic intestinal translocation preceding invasive candidiasis. **Nature Medicine**, v. 26, n. 1, p. 59-64, 2020.

ZHANG, H.; RAN, Y.; LI, D. et al. *Clavispora lusitaniae* e *Chaetomium atrobrunneum* como agentes raros de infecção cutânea. **Micopatologia**, v. 169, n. 5, p. 373–380, 2010.

ZHANG, J. et al. Calcineurin is required for pseudohyphal growth, virulence, and drug resistance in *Candida lusitaniae*. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e44192, 2012.

ZHANG, H. et al. Global screening of genomic and transcriptomic factors associated with phenotype differences between multidrug-resistant and-susceptible *Candida haemulonii* strains. **MSystems**, v. 4, n. 6, p. e00459-19, 2019

ZHOU, L.; DING, K. Synthesis and antifungal activity of novel thiophene derivatives containing 1,2,4-triazole moiety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 13, p. 3159-3161, 2016.

ZICCARDI, M. et al. *Candida parapsilosis* (sensu lato) isolated from hospitals located in the Southeast of Brazil: Species distribution, antifungal susceptibility and virulence attributes. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 305, n. 8, p. 848-859, 2015.

ZUZA-ALVES, D. L.; SILVA-ROCHA, W. P.; CHAVES, G. M. An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1927, 2017.