



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

MARIA EDUARDA FERRO DE MELLO

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIVIRULÊNCIA DE
DERIVADOS 2-AMINOTIOFENO FRENTE A ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Candida* sp.**

Recife
2022

MARIA EDUARDA FERRO DE MELLO

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIVIRULÊNCIA DE
DERIVADOS 2-AMINOTIOFENO FRENTE A ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Candida sp.***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientadora: Dra. Melyna Chaves Leite de
Andrade.

Coorientadora: Prof^a Dra. Rejane Pereira
Neves.

Recife
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Mello, Maria Eduarda Ferro de.

Atividade antifúngica e antivirulência de derivados 2-aminotiofeno frente
a isolados clínicos de *Candida* sp. / Maria Eduarda Ferro de Mello. - Recife,
2022.

52 : il., tab.

Orientador(a): Melyna Chaves Leite de Andrade

Cooorientador(a): Rejane Pereira Neves

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2022.

1. Candidíase invasiva. 2. Fatores de virulência. 3. Fluconazol. 4.
Derivados tiofênicos. 5. Biofilme. I. Andrade, Melyna Chaves Leite de.
(Orientação). II. Neves, Rejane Pereira. (Coorientação). III. Título.

610 CDD (22.ed.)

MARIA EDUARDA FERRO DE MELLO

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIVIRULÊNCIA DE DERIVADOS 2-AMINOTIOFENO FRENTE A ISOLADOS CLÍNICOS DE *CANDIDA SP.*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 31/07/2022

BANCA EXAMINADORA

Melyna Chaves Leite de Andrade

Orientador: Dra. Melyna Chaves Leite de Andrade
Universidade Federal de Pernambuco / Departamento de Micologia

Maria Daniela Silva Buonafina Paz

Dra. Maria Daniela Silva Buonafina-Paz
Universidade Federal de Pernambuco / Departamento de Micologia

Bruna Rodrigues de Sousa

Ma. Bruna Rodrigues de Sousa
Universidade Federal de Pernambuco / Departamento de Micologia

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Dra. Melyna Chaves Leite de Andrade por todo o aprendizado, acolhimento, compreensão, paciência em me ensinar e pelo carinho em todos esses anos.

A minha coorientadora Dra. Rejane Pereira Neves por todas as oportunidades em me ingressar na pesquisa e por todo conhecimento passado.

A todo o grupo de pesquisa, Franz, Daniela, Luiz, Adrielly, Bruna, Jucieli e Carlos por todo o acolhimento e aprendizado ao longo dos anos.

Agradeço sobretudo a minha família, Albiene Ferro, Paulo César e Arthur Flôr, por serem meu porto seguro e apoio em todos os momentos da minha vida.

A minhas amigas Beatriz, Danielly e Luana por terem caminhado ao meu lado durante a graduação, por terem me dado apoio e deixado esses anos mais leves e divertidos.

Aos meus amigos Renata, Ianne, Leonardo, Emilly, Maria Jacynta, Millena e Mariana por estarem ao meu lado todos esses anos e torcerem por mim.

Aos membros da banca, Dra. Maria Daniela Silva Buonafina-Paz, Ma. Bruna Rodrigues de Sousa e Dr. Franz de Assis Graciano dos Santos pelo enriquecimento do trabalho.

A Universidade Federal de Pernambuco, ao Centro de Biociências, ao Departamento de Micologia, ao Laboratório de Micologia Médica Sylvio-Campos pela estrutura e oportunidade.

Ao grupo de pesquisa "Síntese e Vetorização de Moléculas" da Universidade Estadual da Paraíba por viabilizar as moléculas de derivados tiofênicos.

RESUMO

O gênero *Candida* apresenta-se como comensal no hospedeiro humano, porém alterações no sistema imune podem desencadear infecções sistêmicas graves em pacientes em estado crítico. A levedura *Candida albicans* é comumente relatada como agente de candidíase invasiva, entretanto outras espécies como as do complexo *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* têm sido frequentemente descritas como causadoras de candidemia. A formação de biofilme é um dos importantes fatores de virulência desse gênero. Este pode estar aderido em tecidos vivos ou superfícies inertes e tem alta resistência aos tratamentos convencionais. O aumento de cepas resistentes aos antifúngicos utilizados na clínica médica e seus fatores citotóxicos limitam a escolha terapêutica e contribuem para um prognóstico negativo do paciente. Dessa forma a busca por uma nova substância bioativa que seja capaz de inibir o crescimento fúngico e controlar fatores de virulência é essencial. Os derivados tiofênicos são compostos heterocíclicos importantes que possuem ampla atividade biológica e estão presentes em diversos compostos farmacologicamente ativos e produtos naturais. Essas moléculas são comprovadamente eficazes contra algumas espécies de fungos filamentosos e leveduras. Contudo, os relatos de sua ação frente a espécies de *Candida* ainda são incipientes. Diante disso, o projeto teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica de nove derivados 2-aminotiofeno no tratamento de biofilmes de espécies de *Candida*. Para isso, foram obtidos 25 isolados clínicos do grupo de pesquisa "Fungos de Interesse Médico e Leveduras de Interesse Biotecnológico" da Universidade Federal de Pernambuco. Os derivados 2-aminotiofenos foram obtidos em parceria com o grupo de pesquisa "Síntese e Vetorização de Moléculas" da Universidade Estadual da Paraíba. Posteriormente, os isolados foram submetidos a testes de sensibilidade antifúngica, utilizando o fluconazol e os derivados 2-aminotiofenos para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Posteriormente, foi avaliada a capacidade de formação de biofilmes dos isolados e quantificação. Ainda, foi feito o tratamento do biofilme com o fluconazol e os derivados 2-aminotiofenos que apresentarem melhor atividade *in vitro*. Foram obtidos nove isolados pertencentes à espécie *C. albicans*, nove *C. parapsilosis* e oito *C. tropicalis*. No teste de sensibilidade ao fluconazol, os CIMs variaram entre 0,03 e >64 µg/mL. Dos isolados testados, 18 foram sensíveis, 1 dose-dependente e 5 resistentes. Quanto aos derivados 2-aminotiofenos, não expressaram diferenças com inibição na concentração de 200 µg/mL. Todos os isolados foram capazes de formar biofilme em diferentes intensidades, destacando os isolados HAM18, HAM32 e HGV04 que formaram em maior intensidade entre suas espécies. No tratamento do biofilme, foi observado que em todos os isolados, os derivados 2-aminotiofenos estatisticamente apresentaram uma boa resposta ao tratamento dos biofilmes. No isolado HAM32 a molécula AG3 e o fluconazol foram estatisticamente iguais quanto ao tratamento, já o AG7 conseguiu tratar em uma menor concentração. Dessa forma, é notória a atividade antifúngica dos derivados 2-aminotiofenos frente a isolados de *Candida*, podendo ser considerado, futuramente, uma alternativa terapêutica no tratamento de candidíase invasiva.

Palavras-chave: Candidíase invasiva; fatores de virulência; fluconazol; derivados tiofênicos; biofilme.

ABSTRACT

Candida is a genus that presents itself as a commensal in the human host, but changes in the immune system can trigger serious systemic infections in critically ill patients. The yeast *Candida albicans* is commonly reported as an agent of invasive candidiasis, however other species such as the complex *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. krusei* have been frequently described as causing candidemia. Biofilm formation is one of the important virulence factors of this genus. This can be adhered to living tissues or inert surfaces and has high resistance to conventional treatments. The increase in strains resistant to antifungals used in clinical medicine and their cytotoxic factors limit the therapeutic choice and contribute to a negative prognosis for the patient. Thus, the search for a new bioactive substance that is capable of inhibiting fungal growth and controlling virulence factors is essential. Thiophene derivatives are important heterocyclic compounds that have broad biological activity and are present in several pharmacologically active compounds and natural products. These molecules are proven effective against some filamentous fungi and yeast species. However, reports of its action against *Candida* species are still incipient. Therefore, the project aimed to evaluate the antifungal activity of nine 2-aminothiophene derivatives in the treatment of *Candida* species biofilms. For this, 25 clinical isolates were obtained from the research group "Fungi of Medical Interest and Yeasts of Biotechnological Interest" at the Federal University of Pernambuco. The 2-aminothiophene derivatives were obtained in partnership with the research group "Synthesis and Vectorization of Molecules" at the State University of Paraíba. Subsequently, the isolates were subjected to antifungal sensitivity tests, using fluconazole and the 2-aminothiophene derivatives to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). Thereafter, the biofilm formation capacity of the isolates was evaluated following the methodology. Furthermore, the biofilm was treated with fluconazole and the 2-aminothiophene derivatives that showed better *in vitro* activity. Nine isolates belonging to the species *C. albicans*, nine to *C. parapsilosis* and eight to *C. tropicalis* were obtained. In the fluconazole sensitivity test, the MICs ranged from 0.03 to >64 µg/mL. About the isolated tests, 18 isolates were sensitive, one dose-dependent and five resistant. As for the 2-aminothiophene derivatives, they did not express differences with inhibition at the concentration of 200 µg/mL. All isolates were able to form biofilms at different intensities, highlighting the isolates HAM18, HAM32 and HGV04 that formed in greater intensity among their species. In the treatment of biofilm, it was observed that in all isolates, the 2-aminothiophene derivatives statistically showed a good response to the treatment of biofilms. In the HAM32 isolate, the AG3 molecule and fluconazole were statistically equal in terms of treatment, whereas AG7 was able to treat at a lower concentration. Thus, the antifungal activity of 2-aminothiophene derivatives against *Candida* isolates is evident, and may be considered, in the future, as a therapeutic alternative in the treatment of invasive candidiasis.

Key words: Invasive candidiasis; virulence factors; fluconazole; thiophenic derivatives; biofilm.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura química dos Derivados 2-aminotiofeno (AG1-AG9).....	20
Figura 2: Características macroscópicas (A) e microscópicas (B) do isolado HGV 23 <i>Candida tropicalis</i> com 7 dias de crescimento à 35°C em meio ágar Dextrose Sabouraud. A seta indica o brotamento das leveduras, formando pseudo-hifas	24
Figura 3: Perfil de susceptibilidade antifúngica dos isolados clínicos de <i>Candida</i> frente ao fluconazol (64-0,125 µg/mL). C+: Controle positivo C-: Controle negativo	26
Figura 4: Intensidade de formação do biofilme dos isolados clínicos.....	28
Figura 5: Atividade oxidativa do tratamento de biofilme por isolados clínicos do gênero <i>Candida</i> . Os dados representam a média e desvio padrão da absorbância do MTT durante a produção do biofilme com pelo menos três repetições.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Identificação das espécies de Candida obtidas do grupo de pesquisa “Fungos de Interesse Médico e Leveduras de Interesse Biotecnológico” da UFPE	23
Tabela 2: Concentração inibitória mínima dos isolados clínicos de Candida frente ao fluconazol e aos derivados tiofênicos	25

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Gênero <i>Candida</i>	3
2.2 Fatores de virulência	6
2.3 Biofilme	8
2.4 Tratamento	10
2.5 Fluconazol	13
2.6 Derivados tiofênicos	15
3 OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo Geral	18
3.2 Objetivos Específicos	18
3 METODOLOGIA	19
3.1 Obtenção dos isolados clínicos	19
3.2 Obtenção dos derivados tiofênicos	19
3.3 Teste de susceptibilidade antifúngica	20
3.4 Indução da formação de biofilme	21
3.4.1 Quantificação do biofilme	21
3.5 Tratamento do biofilme	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 Obtenção dos isolados clínicos	23
4.2 Teste de susceptibilidade antifúngica	25
4.3 Indução e quantificação do biofilme	27
4.4 Tratamento do biofilme	29
5 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

Infecções hospitalares acometem frequentemente pacientes que estão em Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Esses pacientes apresentam um quadro clínico sensível e são mais susceptíveis às infecções pela supressão do sistema imunológico e aos procedimentos clínicos invasivos aos quais são submetidos. As infecções fúngicas podem ocorrer devido a proliferação de microrganismos da microbiota, sendo essa a via endógena, e também devido a fontes externas, como uso de dispositivos intravenosos, tendo origem exógena (SANTOS et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2011).

O gênero *Candida* apresenta-se como comensal no hospedeiro humano, porém alterações no sistema imune podem desencadear infecções sistêmicas graves em pacientes em estado crítico (SANTOS, 2017). A mortalidade referente à candidemia é considerada alta, sendo a terapia inadequada e controle da fonte de infecção incorreto determinantes para o aumento dessa taxa (RUIZ e PEREIRA, 2016).

A levedura *Candida albicans* é comumente relatada como agente de candidíase invasiva, entretanto há um aumento gradativo na incidência de outras espécies de *Candida* não-*C. albicans*. Espécies como as pertencentes ao complexo *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* têm sido frequentemente descritas como causadoras de candidemia, variando entre regiões geográficas (RUIZ e PEREIRA, 2016).

A capacidade de formar biofilme é um dos importantes fatores de virulência de *Candida* spp., e pode ser definido como um conjunto de um ou mais microrganismos envolvidos em uma matriz polimérica extracelular rica em carboidratos, proteínas e ácido nucléico. A sua formação ocorre em um processo sequencial que se inicia pela aderência a um substrato e pela adesão intercelular, posteriormente, há proliferação de células e um aumento da população do patógeno onde são formadas estruturas invasivas para sua dispersão. O biofilme pode estar aderido em tecidos vivos ou superfícies inertes e tem alta resistência aos tratamentos convencionais, sendo essencial para a sobrevivência do microrganismo no organismo do hospedeiro (FANNING et al., 2012).

Com o aumento de cepas resistentes aos antifúngicos utilizados na clínica

médica e ainda, fatores como a hepatotoxicidade associada aos azólicos, nefrotoxicidade associada aos polienos e alto custo das equinocandinas, limitam a escolha terapêutica e contribuem para um prognóstico negativo do paciente (NETEA et al., 2015). Dessa forma, é imprescindível a busca por novas substâncias bioativas que sejam capazes de inibir o crescimento fúngico e controlar fatores de virulência, como a formação de biofilme, expressando assim atividade antifúngica.

O tiofeno e seus derivados são uma classe importante de compostos heterocíclicos que possuem ampla atividade biológica e estão presentes em diversos compostos farmacologicamente ativos e produtos naturais (BOZOROV et al., 2017; ROSSETTI et al., 2019). Essas moléculas, possuem uma estrutura orgânica cíclica constituída por quatro átomos de carbono e um átomo de enxofre com duas insaturações nas posições 2 e 4, formando um sistema aromático. A síntese de Gewald é amplamente utilizada para a formação de derivados e consiste em reagir um composto carbonilado e um composto metileno ativo na presença de enxofre elementar e uma base, formando 2-aminotiofeno com diversas substituições (RODRIGUEZ et al., 2015). O 2-aminotiofeno é uma porção estrutural especial presente em muitas moléculas biologicamente ativas (HUANG e DOMLING, 2011). O 2-amino-4,5-di-hidrotiofeno I exibe propriedades antibacterianas e antifúngicas (DARWISH, 2008). Assim, o núcleo tiofeno e seus derivados são comprovadamente eficazes contra fungos como *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus* sp. Contudo, os relatos de sua ação frente a espécies de *Candida* ainda são incipientes (SCOTTI et al., 2012; ABDEL-RAHMAN et al., 2017).

Diante disso, a compreensão efetiva de todo o processo de formação, estrutura e constituintes do biofilme fúngico é importante para elencar novos alvos terapêuticos. Assim, esse conhecimento permite o direcionamento para novos tratamentos, minimizando a piora clínica e mortalidade, viabilizando dados que servirão de alvo para pesquisas futuras com produtos sintéticos e/ou naturais com excelência antifúngica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GÊNERO *CANDIDA*

A levedura *Candida* foi primeiramente descrita por Langenbeck, em 1839, após o isolamento da cavidade oral de um paciente com afta bucal, sendo esse o primeiro relato caracterizando esse microrganismo (KAUFFMAN, CA, 2018). Somente em 1923, Berkhout definiu esse fungo pertencente ao gênero *Candida* e descreveu a espécie *Candida albicans*. Dessa forma, as espécies do gênero *Candida*, segundo a taxonomia, localizam-se em: Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales. (GUARRO et al., 1999).

O gênero *Candida* é considerado comensal e está presente na microbiota gastrointestinal, vaginal, pulmonar e urogenital (GUPTA et al., 2018). No entanto, quando ocorre um desequilíbrio no sistema imunológico ou na microbiota do hospedeiro, essas leveduras tendem a se manifestar como patógeno, podendo desencadear o desenvolvimento da doença que pode evoluir para sua forma grave (JOSEP et al., 2015). (PEIXOTO et al., 2014).

A identificação de *Candida* spp. pode ser feita por meio da observação de suas características morfológicas (microscópicas e macroscópicas) e perfil bioquímico. A caracterização morfológica, da maioria das espécies do gênero *Candida*, consiste na presença de blastoconídios, pseudo-hifas e, em espécies como *C. albicans* e *C. dubliniensis*, clamidoconídios. A sua colônia pode variar de coloração branca ao creme e seu aspecto pastoso, brilhoso ou opaco, de textura lisa ou ligeiramente rugosa. O seu perfil bioquímico é caracterizado pela assimilação de nitrogênio e carboidratos (auxonograma), fermentação de carboidratos (zimograma), ausência de urease e presença do tubo germinativo (COLOMBO et al., 2013). Ainda, o meio de cultura CHROMagar *Candida* possibilita a identificação rápida, de forma presuntiva, de algumas espécies desse gênero. Nesse, o reconhecimento das espécies é dado pela produção de cor nas colônias, realizado por reações enzimáticas específicas (BARBEDO; SAGARBI, 2010).

O termo candidemia se refere à presença de espécies de *Candida* no sangue, sendo a manifestação mais comum da candidíase invasiva. Essa infecção pode ter origem pela via endógena, quando o microrganismo

proveniente da microbiota do hospedeiro prolifera ou muda seu sítio, ou pela via exógena, quando por fontes externas a levedura infecta o paciente. Entre as infecções fúngicas documentadas em hospitais terciários, o gênero *Candida* é responsável por em média 80% dessas infecções (GEHRING, et al., 2015).

Embora *C. albicans* seja a espécie mais descrita como causadora de candidemia, as alterações geográficas estão influenciando na epidemiologia das diferentes espécies nos países. Com isso, há uma mudança na prevalência global e espécies de *Candida* não-*C. albicans* surgem como principais responsáveis pela candidíase invasiva (DOVNIK, et al., 2015).

Doi et al. (2016) analisaram 137 casos de candidemia em 16 hospitais brasileiros e identificaram que apenas 34,3% desses pertenciam a espécie *C. albicans*. As espécies de *Candida* não-*C. albicans* mais isoladas foram *Candida parapsilosis* (24,1%), *Candida tropicalis* (15,3%) e *Candida glabrata* (10,2%). Os autores relataram que os pacientes possuíam fatores predisponentes como uso de cateteres venosos, ventilação mecânica e hemodiálise quando diagnosticados com candidemia.

Em um estudo feito no Mato Grosso do Sul, Canassa e Cruz (2019) analisaram 135 amostras positivas para *Candida* e relataram que 33,3% amostras foram identificadas como *C. albicans*, seguidas por 24,5% amostras de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* em 20% e *C. glabrata* em 16,3% das amostras. Ainda, isolaram outras espécies menos frequentes de *Candida* spp., demonstrando um aumento na incidência de outras espécies de *Candida* não-*C. albicans*.

Santolaya et al. (2019) observaram que *C. glabrata* foi a terceira espécie mais isolada em pacientes idosos com candidemia no Chile. Ainda, Colombo et al. (2017), relatou que nas instituições privadas no Brasil, *C. glabrata* é uma espécie emergente frequentemente isolada.

No Brasil, a espécie *C. tropicalis* é a segunda mais isolada como agente de candidíase invasiva (COLOMBO; MUCCI, 2007). Rocha et al. (2020) analisaram 56 amostras fúngicas de pacientes de uma Unidade de Terapia Intensiva, nos hospitais de referência da cidade de Recife-Pernambuco, com infecção fúngica sistêmica, e identificaram 32,1% dos isolados como *C. tropicalis*, um número superior aos isolados de *C. albicans*, com 28,5%.

Na América do Sul, os estudos epidemiológicos relatam que as espécies

de *Candida* não-*C. albicans* com maior incidência pertencem ao complexo *C. parapsilosis* (*C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. parapsilosis stricto sensu*) e *C. glabrata*. Conforme a Rede Nacional de Candidemia, a epidemiologia dos casos no Brasil aponta que em média a espécie *C. albicans* é responsável por 40,9% dos casos, seguida por *C. tropicalis* (20,9%), *C. parapsilosis* (20,5%) e *C. glabrata* (4,9%) (COLOMBO et al., 2006; NUCCI et al., 2010; COSTA et al., 2014; DA MATTA et al., 2017).

O surgimento de espécies emergentes multirresistentes, como *C. auris*, atrai discussão científica no mundo inteiro. Nos últimos anos, diversos casos foram relatados de infecções graves ocasionadas por *C. auris*, sendo isolada de feridas, sangue, urina, secreção resultante de expectoração e sítios corpóreos não invasivos. Levando em consideração a difícil identificação de *C. auris*, a cepa pode ficar negligenciada e levar a disseminação de sua transmissão (MACHADO et al., 2021).

Prestel, et al. (2021), reportaram um caso específico em um hospital na Flórida-Estados Unidos, onde foram detectadas 35 isolados de *C. auris* em pacientes internados com COVID-19. Foi relatado que vários fatores contribuíram para esse surto, como lapsos na limpeza e desinfestação de equipamentos compartilhados, uso prolongado de equipamento de proteção individual e falha na higienização das mãos dos profissionais de saúde. Após o hospital remover essas fontes e aprimorar o sistema de higienização, não foi detectada nenhuma outra transmissão de *C. auris* nos estudos posteriores.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o primeiro caso de *C. auris* foi notificado e confirmado na Bahia em dezembro de 2020. O fungo foi isolado de uma cultura derivada de ponta do cateter de um paciente internado e foi identificado pelo método de espectrometria de massas MALDI-TOF. Ainda, o paciente teria sido internado devido a complicações da COVID-19. Recentemente, janeiro de 2022, a ANVISA confirmou um novo surto de *C. auris* no Brasil, na cidade do Recife-PE. A cepa também foi identificada pelo método MALDI-TOF, e o hospital estabeleceu as medidas necessárias para prevenção e controle de surto (ANVISA nº 01/2020).

Nesse contexto, há uma incidência crescente da candidíase invasiva principalmente em pacientes gravemente doentes, como aqueles internos em UTI. Essas infecções fúngicas tem gradativamente se elevado durante os últimos

anos e, consequentemente, elevando os índices de mortalidade. Pacientes acometidos por doenças hematológicas malignas, neoplasias, transplantados, uso de dispositivos médico-invasivos, antibioticoterapia e uso prolongado de corticoides, quimioterapia e outras condições clínicas, são mais vulneráveis a candidemia (AUZINGER et al., 2015, PERREIRA et al., 2016). Ademais, Motta et al. (2017) descreveu uma taxa de mortalidade de 32% em pacientes com candidíase invasiva, um índice alto e preocupante na clínica médica.

A proporção da candidíase invasiva é influenciada por uma série de fatores relacionados as condições do paciente, tais como sistema imunológico comprometido e severidade da doença de base; características da levedura, como patogenicidade, produção de fatores de virulência e susceptibilidade aos antifúngicos; e o tratamento realizado, relacionado a farmacocinética e sinergismo com outras drogas (JALAL, et al., 2019). Assim, se faz necessária a elucidação dos fatores de virulência para maior compreensão das propriedades do fungo.

2.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

A capacidade de *Candida* causar infecção no hospedeiro irá depender da expressão de diferentes fatores de virulência, além dos fatores relacionado ao hospedeiro como imunossupressão e alteração da microbiota natural. A produção do tubo germinativo e enzimas extracelulares, formação de biofilme, termotolerância e aderência as células epiteliais são fatores de virulência frequentemente associados ao gênero *Candida* e colaboram para sua patogenicidade (KOGA-ITO et al., 2006; ANDREOLA et al., 2016).

A secreção de enzimas hidrolíticas, como a fosfolipase, lipases extra e intracelulares, está relacionado com a invasão do microorganismo no epitélio e penetração celular. Essas enzimas tem capacidade de degradar substratos fosfolipídicos da membrana celular, facilitando a entrada e ancoragem das hifas no citoplasma. Ainda, as Proteases Aspárticas Segregadas (SAPs) estão envolvidas com a destruição na integridade da membrana das células infectadas, que resulta em sua ineficiência. As SAPs estão presentes em algumas espécies do gênero, como *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (SCHALLER, et al., 2005; ANDREOLA et al., 2016; CAUCHIE, et al., 2017).

Em um estudo feito por Vieira et al., 2018, verificaram a sensibilidade

antifúngica e expressão dos genes SAP 1-3 em isolados de *Candida*. O gene SAP 2 foi incidente em isolados de *Candida* não-*C. albicans*, entretanto, em *C. albicans* foi predominante o gene SAP 1. O gene SAP 3 não foi identificado nos isolados. Quanto a sensibilidade, as espécies de *Candida* não-*C. albicans* foram menos sensíveis ao Cetoconazol, fluconazol e itraconazol, propondo uma possível patogenicidade distinta.

Além disso, a termotolerância, que é a capacidade do fungo em crescer e se manter em ambientes com temperatura de 37°C, é um importante fator de sobrevivência no hospedeiro humano e espécies que conseguem se desenvolver nessa temperatura são consideradas potencialmente patogênicas (SIDRIM & ROCHA, 2004). De acordo com Silva-Dantas et al. (2016), um dos principais fatores para que *Candida* seja considerado um patógeno virulento é sua capacidade em adaptar-se em várias condições presentes em diferentes sítios do hospedeiro, como diferentes níveis de temperatura, pH, concentração de CO₂, hipóxia, e disponibilidade de nutrientes.

Em um estudo feito por Canela, 2017, foi analisada a capacidade de produção de enzimas hidrolíticas em espécies de *Candida* e a produção de hemolisina foi bastante presente no estudo, dando destaque nas espécies *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* que apresentaram atividade hemolítica superior que outras linhagens.

Conforme Fourie et al., 2018, o ferro é considerado um nutriente vital para todos os organismos vivos, fazendo parte de vários processos biológicos. Por sua vez, o ferro está englobado por proteínas que bloqueiam sua interação com radicais livres de oxigênio que poderiam alterar a integridade celular. A levedura *Candida* tem capacidade hemolítica e obtém esse mineral destruindo as ligações com as proteínas. Esse ferro é utilizado para crescimento e atividades metabólicas durante a invasão no tecido do hospedeiro, sendo um mecanismo de defesa essencial para sua sobrevivência (LINARES et al., 2007; ALMEIDA et al., 2009).

Ademais, a adesão de *Candida* em células e tecidos do hospedeiro, bem como superfícies inertes, é essencial para o desenvolvimento da infecção e sobrevivência do fungo no organismo. A aderência é o primeiro estágio no processo infeccioso, há a invasão e disseminação fúngica no organismo do hospedeiro. Em superfícies inertes, a aderência é a primeira etapa para formação do biofilme

(KARKOWSKA-KULETA et al., 2009).

Menezes et al., 2013, em sua pesquisa estudaram a capacidade de diferentes espécies de *Candida* em aderir a superfícies inertes, como a lamínula de vidro. Foi visto que todas as espécies analisadas foram capazes de aderir a superfície, contudo, espécies de *Candida* não-*C. albicans* apresentaram maior capacidade de aderência (81,4%) do que isolados *C. albicans* (76,3%). Dessa forma, a adesão em superfícies inertes entre espécies de *Candida* são distintas e indica possível aderência a células vivas.

Desse modo, após o microrganismo aderir a superfície, é iniciada a formação do biofilme. Os biofilmes são capazes de resistir ao sistema imunológico do hospedeiro, aos antifúngicos e a alguns agentes de desinfecção, sendo consequentemente difícil de aniquilar, tornando as infecções resistentes e recorrentes (ZICCARDI et al., 2015).

2.3 BIOFILME

O biofilme é definido como uma comunidade microbiana envolvida por uma matriz de polissacarídeos extracelular que estão aderidas em uma superfície, que pode ser inerte ou viva. Essa comunidade é altamente organizada e estruturada o que confere uma alta resistência as defesas do hospedeiro e antimicrobianos, causando várias complicações clínicas (BETTIO, 2010; CHANDRA, MUKHRJEE, 2015).

Estruturalmente, o biofilme maduro é bem consolidado e formado por substâncias chamadas exopolissacarídeos que constituem uma matriz extracelular forte, que por sua vez realiza ligações da célula a superfície, ligação entre as células e agrupamento arquitetado. No gênero *Candida*, a matriz é composta em geral por carboidratos, proteínas, hexosamina, ácido urônico e fósforo. O biofilme pode ser de um mesmo microrganismo ou de dois ou mais, chamado biofilme polimicrobiano. Ainda, sua matriz é responsável por manter a barreira mecânica estável e proteger a comunidade microbiana das defesas do hospedeiro e de drogas antimicrobianas, garantindo sua sobrevivência no organismo e representando papel na resistência aos medicamentos (Al-Fattani & Douglas, 2006; Flemming & Wingender, 2010; Koo et al., 2017; Perlin et al., 2017).

Dessa forma, o processo de formação do biofilme é dividido em quatro

etapas: adesão primária, adesão irreversível, maturação e dispersão. Para essa comunidade microbiana se formar é necessário a adesão primária da levedura na superfície, podendo ser inerte (abiótica) ou na célula do hospedeiro (biótica) (JANIEL; ANDES, 2015).

A fase inicial de aderência é reversível e requer mediação da interação entre as moléculas por ligações do tipo ligante-receptor específicas nas células da levedura e do hospedeiro. Contudo, em superfícies inertes, a adesão é mediada por interações físico-químicas não específicas, como forças hidrodinâmicas, forças de Van der Waals, interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Essas interações garantem a fixação do microrganismo. Assim, ocorre o transporte das células microbianas do meio aquoso para a superfície inerte por meio da gravidade, motilidade e quimiotaxia (SUZUKI, 2009, JANIEL; ANDES, 2015).

Após ser formada a primeira camada do microrganismo, na adesão primária, a aderência da levedura é facilitada. Posteriormente, ocorre a adesão secundária, que se dá pela produção de hifas e EPS, sendo um processo irreversível. Em seguida, há multiplicação e agregação dos microrganismos em microcolônias, originando o biofilme maduro. À medida que a densidade aumenta, é iniciada a produção de moléculas auto indutoras, conhecidas como moléculas *quorum-sensing* (MQS), para iniciar a transcrição de genes específicos que regulam a motilidade, produção de EPS e formação de mais biofilme (ALBUQUERQUE; CASADEVALL, 2012, WALL et al., 2018).

Em condições favoráveis, o biofilme pode persistir se desenvolvendo por um longo prazo. Contudo, em condições desfavoráveis há o desprendimento do biofilme, as células superficiais são dispersadas resultando em sua disseminação (BERNARDIS et al., 2018).

De acordo com Langer et al., 2018, a matriz polimérica extracelular é considerada a principal resistência das infecções relacionadas ao biofilme. Essa matriz o torna mais resistente à radiação UV, ao ataque de protozoários e desidratação, garantindo a sobrevivência da levedura.

Ademais, a formação de biofilme multiespécies é relatada por Xu et al., 2014, em um modelo *in vitro* que expressou interações sinérgicas entre *C. albicans* e bactérias da mucosa oral *Streptococcus oralis* e *Streptococcus gordonii*. Essa interação foi benéfica para ambas espécies quanto capacidade

em invadir e formar biofilmes patogênicos. De Barros et al., 2017, relataram que também pode haver competição entre as espécies do gênero *Candida*, onde isolados de *C. glabrata* e *C. krusei* conseguiram formar biofilme juntamente a *C. albicans*.

Marak et al., 2018, descreveram que entre 41 isolados de *C. albicans*, 21 (51,2%) foram capazes de formar biofilme. Ainda, entre 49 espécies de *Candida* não *C. albicans*, 28 (57,14%) isolados produziram biofilme. As cepas de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* foram evidentes na formação de biofilmes. Dessa forma, esse estudo corrobora o fato de que infecções por *Candida* não-*C. albicans* adquiriram maior destaque, pelo aumento de sua incidência, ao longo dos últimos anos.

A relevância clínica dos biofilmes na clínica tornou-se cada vez mais estudada, aproximadamente 80% das infecções hospitalares estão associadas a biofilmes, principalmente aquelas que envolvem dispositivos médico-invasivos. Essas infecções possuem alta gravidade e resultam na disfunção do dispositivo e aumento da morbimortalidade (MOTTA et al., 2017).

Entre os setores hospitalares, a UTI é o mais vulnerável a infecções desse tipo pois nele há a realização constante de procedimentos invasivos, uso de materiais implantados como cateteres e sondas, além do comprometimento das condições imunológicas dos pacientes. Em um estudo realizado por De Oliveira et al., 2014, descreveram um surto em uma UTI neonatal brasileira onde foram isoladas 10 cepas de *C. albicans* e 4 cepas de *C. tropicalis*. Ainda, Barac et al., 2020, relataram um surto de *C. tropicalis* que ocorreu em pacientes em diálise peritoneal, no qual alguns foram a óbito, e a cepa relacionada as infecções foi isolada de material médico. Desse modo, infecções por *Candida* spp. apresentam risco considerável de morbidade e mortalidade e além disso, com o surgimento de cepas resistentes apresentam dificuldade quanto ao tratamento, o que demanda um tratamento antifúngico adequado (MARINS et al., 2018).

2.4 TRATAMENTO

O tratamento comumente utilizado em casos de candidíase invasiva são os antifúngicos dos grupos farmacêuticos dos polienos, equinocandinas e triazólicos (COLOMBO et al., 2013; PAPPAS et al., 2016).

2.4.1 Polienos

O mecanismo de ação dos polienos está relacionado com a interação com o ergosterol, um abundante constituinte da membrana celular fúngica. Essa ligação resulta no desenvolvimento de poros transmembrana, originando um canal iônico que causa o extravasamento de íons intracelulares (KRISTANC et al., 2019). Os poros transmembrana são resultantes da estrutura anfipática característica dos polienos. A parte hidrofóbica, expressa pela cadeia poliênica, interage com as moléculas de esterol da membrana, e ao mesmo tempo, a parte hidrofílica, expressada pela cadeia poliol, fica no ambiente aquoso formando o poro. Este poro causa efusão de íons, como K^+ , Na^+ e Cl^- , resultando no desequilíbrio eletroquímico (SERHAN et al., 2014).

Os polienos têm como principais representantes a anfotericina B e nistatina, entretanto, somente o primeiro é utilizado no tratamento contra infecções sistêmicas. A anfotericina B é eficiente contra várias espécies de *Candida*, contudo, apresenta alta hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (NETT; ANDES, 2016).

Lotfali et al. (2017), buscaram mutações nos genes reguladores da síntese de ergosterol ERG3, ERG6 e ERG11 para resistência em *Candida parapsilosis* e concluíram que mutações nesses genes diminuem a expressão do alvo de ação dos polienos. Ainda, os autores concluíram que apesar da resistência aos polienos ser incomum, pode ser adquirida pelas mutações de perda de função do ERG3. Essa mutação inibe a formação do complexo fármaco-lípido, previne a lise osmótica celular e conseqüentemente, bloqueia a formação da síntese do ergosterol.

2.4.2 Equinocandinas

O mecanismo utilizado pelas equinocandinas é inibir a síntese da parede celular de fungos, através da inibição não competitiva da enzima (1,3)- β -D-glucana sintase, que é responsável pela síntese do polímero (1,3)- β -D-glucana. Esta molécula se liga covalentemente a outro polímero chamado (1,6)- β -D-glucana e juntos com a quitina formam uma rede tridimensional complexa de microfibrilas. A inibição dessa enzima impossibilita a biossíntese da parede celular do fungo, causando a lise e quebra da integridade celular (PRASAD et al., 2016).

Estudos mostram que a resistência as equinocandinas está relacionada com a mutação no gene *FKS*, onde há substituição de aminoácidos em duas regiões *hot spot* de *FKS1* em *Candida* spp. e *FKS2* em *C. glabrata*. Essas mutações aumentam a concentração inibitória mínima das cepas, resultando na falha do tratamento (PERLIN et al., 2017; KORDALEWSKA et al., 2018; PRISTOV; GHANNOUM, 2019).

Conforme Perlin et al. (2017) analisaram mutações no gene *FKS*, e concluíram que podem estar relacionadas com o estresse devido a exposição prolongada de drogas dessa classe. Esse gene codifica a enzima 1,3- β -glucana sintetase, alvo das equinocandinas e responsável pela síntese de um composto importante da parede celular de espécies de *Candida*.

Os principais antifúngicos dessa classe são caspofungina, micafungina e anidulafungina, os quais são bem tolerados e não apresentam efeitos colaterais graves. A Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, a Sociedade Brasileira de Infectologia e a Sociedade Paulista de Infectologia recomendam que em casos de pacientes não-neutropênicos com candidemia, deve-se iniciar o tratamento com uma equinocandina, exceto em casos de *C. parapsilosis* devido sua alta concentração inibitória mínima (NETT; ANDES, 2016).

2.4.3 Azólicos

Os antifúngicos azólicos inibem a enzima do citocromo P450 14 α -lanosterol desmetilase que é fundamental na rota de biossíntese de ergosterol nos fungos. Essa enzima tem uma porção heme no seu sítio ativo, o nitrogênio da molécula dos azóis age com o átomo de ferro englobado na porção heme e inibe a ativação do oxigênio necessário na reação de desmetilação do lanosterol em ergosterol pela atividade dessa enzima. Em consequência da inibição da biossíntese de ergosterol, há o acúmulo de 14- α -metil-3,6-diol, um ergosterol tóxico, na membrana celular. Esse composto causa estresse celular e interrompe a cadeia do ciclo celular do fungo (HANI et al., 2015).

No gênero *Candida* a enzima 14 α -lanosterol desmetilase é codificada pelo *ERG11*, sendo uma das enzimas encarregadas pela conversão de lanosterol em ergosterol. Ainda, os azólicos atuam inibindo a transformação da morfologia unicelular de *Candida* em hifas e pseudo-hifas, sendo a forma invasiva e patogênica do fungo (RANG et al., 2007, PRASAD et al., 2016).

Os antifúngicos azólicos podem apresentar efeitos adversos como hepatotoxicidade, intolerância gastrointestinal e hipersensibilidade. Entre as drogas dessa classe está o voriconazol, itraconazol, posaconazol e fluconazol (NETT, ANDES, 2016). O fluconazol demonstra boa ação e é muito utilizado na clínica em casos de infecções por *Candida*, além disso, é utilizado na criptococose, em infecções urinárias e do sistema nervoso central por fungos susceptíveis (AUTMIZGUINE et al., 2018).

2.5 FLUCONAZOL

O fluconazol é um antifúngico azólico frequentemente prescrito na clínica em infecções por *Candida* spp., pelo seu espectro de ação e baixo custo (PARAMYTHIOTOU et al., 2014). Como ressaltado, o fluconazol age inibindo o citocromo P450 enzima lanosterol demetilase (14 α -desmetilase), codificada pelo ERG11, na via de biossíntese do ergosterol. Possui biodisponibilidade por via oral e apresenta atividade contra fungos endêmicos. Ao contrário dos outros triazólicos, o fluconazol contém baixa atividade para enzimas do CYP450, dessa forma, causa menor inibição dessas isoenzimas. (MCMANUS & SHAH, 2019). Essa droga é fungistática, ou seja, inibe o desenvolvimento fúngico sem exterminá-lo completamente, assim, durante o tratamento o fungo pode desenvolver resistência ao antifúngico (BERKOW & LOCKHART, 2018).

Nas últimas décadas, a resistência ao fluconazol têm sido reportada em diversos estudos no mundo inteiro. Essa dificuldade pode estar relacionada com o desenvolvimento de resistência adquirida após um longo período de tratamento (acima de 6 meses) (SHAHID & SOBEL, 2009; KHAN et al., 2018).

Com o avanço das técnicas moleculares, foi possível compreender os mecanismos moleculares da resistência ao fluconazol. Ao menos quatro mecanismos de resistência têm sido relatados nos estudos, sendo eles: mutação na enzima lanosterol 14 α -desmetilase, regulação positiva da bomba de efluxo (transporte de proteína, transportador ABC CDR1 e CDR2), mutação no gene MDR1 e superexpressão do gene ERG11. Foi reportado que a ocorrência de dois ou mais desses fatores levam a diminuição da concentração do fármaco na célula fúngica (LIU et al., 2018; SALARI et al., 2016).

Em um estudo realizado por Khosravi et al. (2016), relataram relação entre a expressão dos genes CDR1, CDR2 e MDR1 e a resistência ao fluconazol. Foi

visto resistência ao fármaco em isolados de *C. albicans* com regulação positiva do CDR1 e CDR2. Esse mecanismo foi o mais importante, seguido da superexpressão dos genes MDR1 e ERG11 para o desenvolvimento da resistência.

Na Argentina, Córdoba et al. (2018), analisaram a resistência do fluconazol em isolados de *C. albicans* nos períodos de 1996-2000, 2001-2005, 2006-2010, 2011-2017. Foi observado que o período de 1996-2005, 6,6% dos isolados eram resistentes ao antifúngico, entretanto, no período de 2011-2017, foi visto 45,7% de resistência. Um aumento significativo com média de 13,6%, $p < 0,05$ ao longo dos 20 anos. Ainda, autores relatam que essa crescente pode refletir uma tendência, mas destacam o fato do aprimoramento das técnicas de detecção em laboratórios.

Ademais, Khan et al. (2018), ao analisarem 108 isolados de *Candida* spp. provenientes de infecções vulvovaginais quanto a susceptibilidade antifúngica, observaram que 62% desses foram considerados resistentes ao fluconazol. Ainda, destacam que todas as cepas pertencentes à espécie *C. krusei* apresentaram resistência a droga. Foi observado também que 72,7% dos isolados de *C. dubliniensis* foram resistentes, assim como 62,5% de *C. glabrata*, 53,3% de *C. albicans*, 38,8% de *C. tropicalis*, evidenciando resistência em cepas de todas as espécies identificadas.

Outro fator que influencia o tratamento de candidemia é a capacidade de formação de biofilme (PONGRA'CZ et al., 2016). Melo et al. (2011), relataram biofilmes de isolados de *C. albicans* e *C. tropicalis* com alta resistência ao fluconazol. Ainda, Sasani et al. (2021), analisaram a susceptibilidade ao fluconazol no tratamento do biofilme de isolados *C. tropicalis*, e concluíram que 7,7% foram resistentes. Além disso, destacam que a resistência do biofilme aos antifúngicos é um dos fatores associados a alta mortalidade em pacientes com candidemia.

Os antifúngicos que são atualmente utilizados na clínica, para serem eficazes contra biofilmes, é preciso que sejam aplicados em doses até 1.000 vezes maiores do que as concentrações indicadas para células fúngicas isoladas (LANGER et al., 2018).

Apesar do fluconazol ter uma boa tolerabilidade, efeitos colaterais como cefaleia, náuseas e hepatotoxicidade são relatados. Ainda, há possibilidade de

interação medicamentosa quando associado a outros fármacos, o que requer atenção dos profissionais de saúde no tratamento (MCMANUS & SHAH, 2019).

Portanto, a busca por novas terapias que sejam capazes de combater os biofilmes e aos mecanismos de resistência, tal qual melhorias nas alternativas disponíveis atualmente é indispensável. Assim, os derivados tiofênicos surgem como substâncias bioativas com diversas ações farmacológicas, incluindo atividade antifúngica (ROSSETTI et al., 2019).

2.6 DERIVADOS TIOFÊNICOS

Os compostos heterocíclicos são estruturas encontradas na natureza que constituem grande parte de compostos biológicos, como DNA e carboidratos. Além de serem encontrados na natureza em abundância, podem ser utilizados como *scaffolds* com ampla atividade biológica (KERI et al., 2017). Nessa classe de moléculas, destaca-se o conjunto classificado como núcleo tiofênico (JHA et al., 2012).

O núcleo tiofeno foi descoberto por Meyer, em 1883, porém somente anos depois foi usado pelos cientistas no design de fármacos. Os tiofenos se caracterizam por serem uma molécula heterocíclica insaturada de cinco membros, contendo o enxofre como heteroátomo (SAKER, NAHAR, 2009; JHA et al., 2012). A associação dessas características torna o núcleo tiofênico bastante utilizado na indústria e química medicinal, tendo os 2-amino-tiofênicos e seus derivados um dos compostos de grande importância (BOZOROV et al., 2017).

Algumas drogas comerciais como Clotiazepam® (utilizado no tratamento de ansiedade e insônia) e Surgam® (anti-inflamatório não esteroideal AINES) possuem como principal núcleo o 2-amino-tiofeno (SAINI et al., 2017). Além disso, esses compostos possuem outras atividades biológicas e farmacológicas, sendo conhecidos por apresentarem atividade antimicrobiana, antitubercular, antiviral, antioxidante, assim como podem atuar como ligantes do receptor de Adenosina A1, inibidores de cinase (BOZOROV et al., 2017).

Tiossemicarbazona são derivados tiofenos que contém o núcleo com base funcional de tioureia, um quelante de íons metálicos, que possuem atividade biológica especialmente anticancerígena (GOU et al., 2016). Em um estudo realizado por Wang et al., 2017, foi visto que derivados

tiossemicarbazona apresentaram atividade contra linhagens de células tumorais adenocarcinoma de mama, de hepatocarcinoma e câncer cervical. Autores relatam que o derivado atuou induzindo a apoptose celular pela inibição do ciclo celular na fase G2, resultando em um dano irreversível ao DNA.

Silva-Júnior et al., 2016, observaram atividade biológica de derivados 2-amino-tiofeno contra amastigotas de *Trypanosoma cruzi* com mecanismos de inibição da enzima cruzaina, uma enzima essencial para sobrevivência do parasita. Ainda, Rodriguez et al., 2015, relataram atividade leishmanicida para promastigotas de *L. amazonensis* com os derivados tiofênicos agindo contra os macrófagos infectados, modulando a resposta imune.

Santos Júnior, 2022, relata que os derivados tiofênicos testados apresentaram atividade promissora frente amastigotas de *T. cruzi* tendo um resultado mais potente que o fármaco-padrão (antimoniato de meglumina) e menos citotóxico que anfotericina B. Ademais, foi possível observar que os compostos estudados apresentaram atividade leishmanicida frente ambas as formas amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis* com resultado menos citotóxico que anfotericina B.

Na atividade antifúngica, Eleamen et al., 2017 demonstrou que o complexo entre derivados tiofênicos e ciclodextrina foi bastante efetivo contra *Cryptococcus neoformans* (CIM: 46,66 µg/mL). Além disso, relataram que essa complexação com ciclodextrina foi possível elevar a solubilidade da molécula, resultando em uma melhora no perfil antifúngico.

Spadola et al., 2020, analisaram a ação da atividade de derivados tiossemicarbazona contra a micotoxina aflatoxina produzida por *Aspergillus flavus*. Foi visto que as moléculas tiossemicarbazona complexadas ao Pluronic® F-127, um surfactante hidrofílico, foram capazes de inibir o acúmulo de aflatoxina. Autores relataram que esse complexo pode controlar efetivamente a proliferação de fungos micotoxigênicos, diminuindo a sua disseminação e persistência no ambiente. Entretanto, reforçam a necessidade de se avaliar outros fatores como fitotoxicidade e aplicações práticas.

Em um estudo realizado por Neves, 2019, foi avaliado o perfil de sensibilidade de fungos dermatófitos como *Epidermophyton floccosum* e espécies de *Trichophyton* frente a compostos de derivado tiofênicos. Os compostos inibiram o crescimento dos isolados de *E. floccosum* com

concentrações variando entre 16 a 1024 µg/mL. As moléculas foram capazes de inibir todas as espécies de *Trichophyton* testadas em diferentes concentrações (1024-32 µg/mL).

Ainda, Neves, 2019, testou as moléculas de derivados tiofênicos frente a leveduras, como espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans*. As espécies de *Candida* foram susceptíveis com concentrações inibitórias mínimas de 1024-128 µg/mL. Já os isolados de *Cryptococcus neoformans* foi inibido em concentrações de 1024-16 µg/mL.

Li et al., 2021, avaliaram a ação da tiossemicarbazona NSC319726 frente a 22 isolados de *C. auris* e compararam a atividade com as drogas antifúngicas fluconazol, voriconazol, anfotericina B e micafungina. Foi visto que a NSC319726 teve ação contra todas as cepas de *C. auris*, inclusive as que foram consideradas resistentes aos antifúngicos comparados. A concentração inibitória mínima foi de 0,125 a 0,25 µg/mL. Autores relatam que em uma situação de infecção não tratada, a ação antifúngica da droga é excelente, no entanto, sua atividade se manteve como fungistática.

Ademais, estudos acerca do tratamento de biofilme por espécies de leveduras são incipientes, sendo necessário estudos para avaliação desses compostos no tratamento desse fator de virulência.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antifúngica de nove derivados 2-aminotiofeno no tratamento de biofilmes de espécies de *Candida*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as cepas clínicas do gênero *Candida* quanto à capacidade formação de biofilme;
- Estabelecer o perfil de susceptibilidade antifúngica *in vitro* de células de leveduras frente ao fluconazol e aos derivados 2-aminotiofeno;
- Avaliar a ação antifúngica do fluconazol e dos derivados 2-aminotiofeno no tratamento de biofilme.

3 METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS

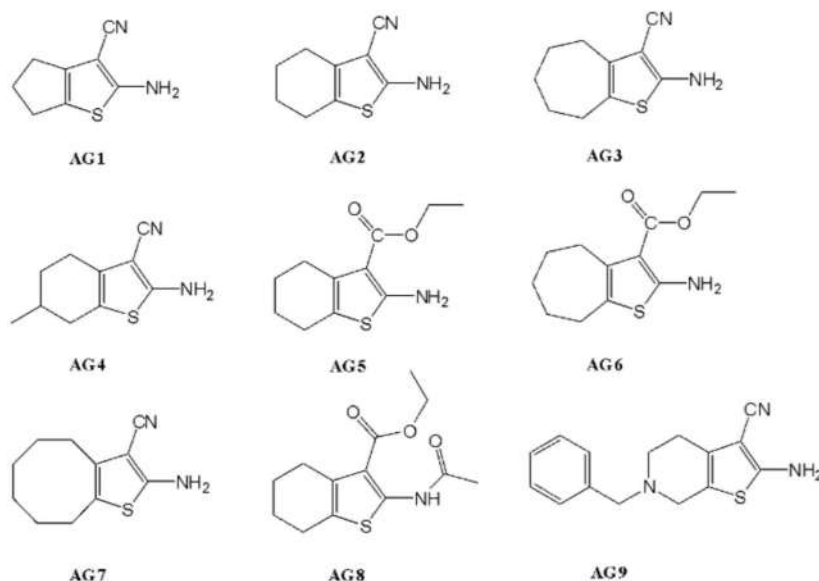
Os isolados clínicos de *Candida* utilizados neste estudo foram obtidos do grupo de pesquisa “Fungos de Interesse Médico e Leveduras de Interesse Biotecnológico” do Laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco, sendo estes previamente identificados por análise proteômica.

3.2 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS TIOFÊNICOS

Os derivados tiofênicos foram adquiridos por doação através do grupo de pesquisa “Síntese e Vetorização de Moléculas” da Universidade Estadual da Paraíba. Foram nomeados de AG1 a AG9 de acordo com sua estrutura química (Figura 1):

- 2-amino-5,6-di-hidro-4H-ciclopenta[b]tiofeno-3-carbonitrila (AG1);
- 2-amino-4,5,6,7-tetra-hidrobenczo[b]tiofeno-3-carbonitrila (AG2);
- 2-amino-5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclo-hepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (AG3);
- 2-amino-6-metil-4,5,6,7-tetra-hidrobenczo[b]tiofeno-3-carbonitrila (AG4);
- etil-2-amino-4,5,6,7-tetra-hidrobenczo[b]tiofeno-3-carboxilato (AG5);
- etil-2-amino-5,6,7,8-tetra-hidro-4H-ciclo-hepta[b]tiofeno-3-carboxilato (AG6);
- 2-amino-4,5,6,7,8,9-hexa-hidrocicloocta[b]tiofeno-3-carbonitrila (AG7);
- etil-2-acetamido-4,5,6,7-tetra-hidrobenczo[b]tiofeno-3-carboxilato (AG8);
- 2-amino-6-benzil-4,5,6,7-tetra-hidrotieno[2,3-c]piridina-3-carbonitrila (AG9).

Figura 1: Estrutura química dos Derivados 2-aminotiofeno (AG1-AG9)



3.3 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA

O método utilizado seguiu as condições descritas no documento em M27-A3 e M60 (CLSI, 2008, CLSI 2017) para leveduras. O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, pH7,0 $\pm$ 0,1, com ácido morfolino propano sulfônico (MOPS; 0,165 mol.L⁻¹; Sigma- Aldrich). O meio de cultura foi esterilizado em membranas de 0,22 μ m (Millipore, Darmstadt, Alemanha). O agente antifúngico comercial utilizado foi o fluconazol (Pfizer, Nova York, EUA) e os derivados 2-aminotiofenos preparados em água destilada.

Concentrações diferentes dos antifúngicos foram preparados e usados nos intervalos de 0,5 a 1024 μ g.mL⁻¹ para os derivados 2-aminotiofenos e 0,125 a 64 μ g.mL⁻¹ para fluconazol. Os isolados controles foram ATCC *Candida parapsilosis* 22019 e ATCC *Candida albicans* 90028. As espécies de leveduras foram mantidas em meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) e incubadas a 35°C. As suspensões dos isolados foram preparadas em solução salina, e sua densidade foi ajustada de acordo com a escala 0.5 de MacFarland em 90% de transmitância utilizando um espectrofotômetro a 530nm. O volume do inóculo foi ajustado para 5,0mL de solução salina esterilizada e, posteriormente, diluído em RPMI 1640 para uma concentração de $2-5 \times 10^3$ céls.mL⁻¹. Para os testes de susceptibilidade, foram utilizadas placas de microtitulação planas de 96 poços

(TPP; Trasadingen, Suíça). O inóculo foi adicionado aos poços com as drogas a serem testadas, e as placas foram incubadas a 35°C durante 48 horas para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). As CIMs para os derivados 2-aminotiofenos foram determinadas para 100% e do fluconazol para $\geq 50\%$ de inibição em relação aos poços controles.

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

3.4 INDUÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME

As leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud Dextrose por 24h a 37°C, em seguida foram suspensas em meio RPMI Medium 1640 tamponado com HEPES (Gibco®) e ajustada para concentração de 10^6 células/mL. Posteriormente, 100µL foram adicionados em poços das placas de poliestireno contendo 96 poços, sendo mantidas a 37°C por 48 horas. Após cada tempo, os poços foram lavados três vezes com tampão fosfato salino (PBS) para remover as células planctônicas. O isolado de *Candida albicans* ATCC90028 foi utilizado como controle.

3.4.1 QUANTIFICAÇÃO DO BIOFILME

A quantificação dos biofilmes foi realizada com o ensaio de redução de sal de 1- (4,5-Dimethylthiazol-2- yl) -3,5- diphenylformazan (MTT- Sigma Chemical, St. Louis, MO), no qual 20µL, na proporção de 5µL para 1mL de tampão PBS, esterilizado por filtração em membrana (Millipore, poros de 0,22µm) foi adicionado à cada poço da placa de microtitulação. As placas foram incubadas na ausência de luz à temperatura de 37°C, por 18 horas. Posteriormente, o corante foi aspirado e então adicionado 20µL de isopropanol (BERRIDGE; HERST; TAN; 2005; KROM et al., 2007). As placas foram mantidas em repouso por 15 minutos e em seguida foram transferidos 100µL do conteúdo de cada poço para nova placa de microtitulação, a fim de proceder à leitura em leitor de microplacas a 570nm de comprimento de onda (RAMAGE et al., 2002; KROM et al., 2006; PIERCE et al., 2008).

3.5 TRATAMENTO DO BIOFILME

Os biofilmes foram formados seguindo a metodologia descrita por Berridge, Herst e Tan (2005) e Krom et al. (2007) detalhada anteriormente. Para o tratamento, foi selecionado duas moléculas de derivados 2-aminotiofenos de acordo com sua disponibilidade material e o fluconazol. Após o período de 48 horas, os poços contendo os biofilmes foram preenchidos com 180µL da solução contendo a nova substância bioativa, separadamente. Os controles foram preparados onde estes continham apenas o inóculo fúngico. Seis horas após a adição da substância, os biofilmes foram quantificados usando o método ensaio de redução de sal de tetrazólio (MTT), em que 20µL, na proporção de 5µL a 1mL de tampão PBS, esterilizados por filtração por membrana (poros de 0,22µm, Millipore, St. Louis, MO 63103, EUA) foi adicionada a cada poço da placa de microtitulação, incluindo poços de controle. As placas foram incubadas na ausência de luz a 37°C por 18h. Depois disso, o corante foi aspirado e foram adicionados 200µL de isopropanol. As placas foram deixadas em repouso por 15 minutos, em seguida, 100µL do conteúdo de cada poço foram transferidos para uma nova placa de microtitulação para leitura em um leitor de microplacas com comprimento de onda de 570nm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS

Foram obtidos 26 isolados clínicos de leveduras oriundos de hemoculturas e todos foram previamente identificados. Oito isolados identificados pertencentes à espécie *C. albicans*, oito isolados da espécie *C. tropicalis* e oito isolados da espécie *C. parapsilosis* e duas ATCC para controle dos experimentos (Tabela 1).

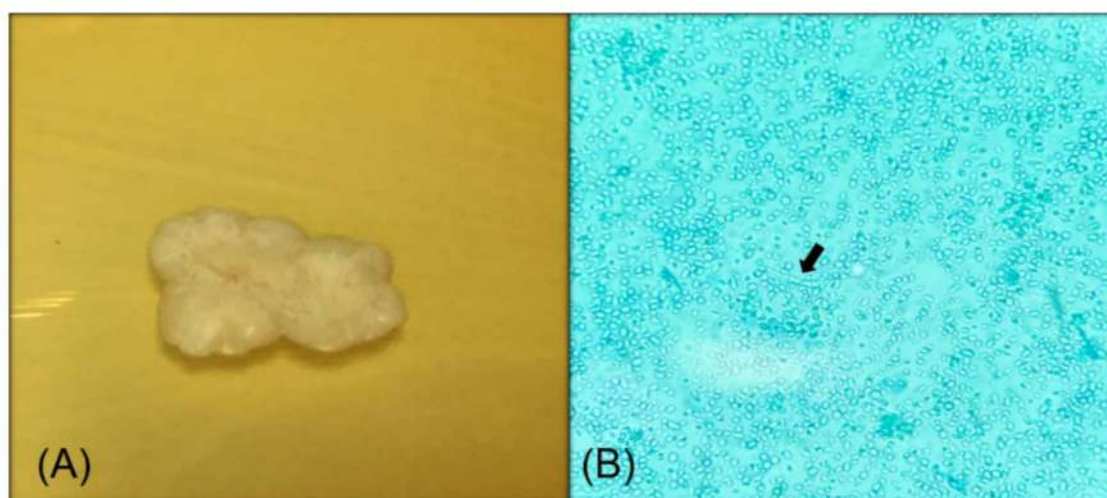
Tabela 1: Identificação das espécies de *Candida* obtidas do grupo de pesquisa "Fungos de Interesse Médico e Leveduras de Interesse Biotecnológico" da UFPE

Isolado clínico	Espécie
HAM 02	<i>Candida albicans</i>
HAM 04	<i>C. albicans</i>
HAM 11	<i>C. albicans</i>
HAM 12	<i>C. albicans</i>
HAM 13	<i>C. albicans</i>
HAM 15	<i>C. albicans</i>
HAM 17	<i>C. albicans</i>
HAM 18	<i>C. albicans</i>
HAM 06	<i>C. tropicalis</i>
HAM 09	<i>C. tropicalis</i>
HAM 23	<i>C. tropicalis</i>
HAM 30	<i>C. tropicalis</i>
HAM 31	<i>C. tropicalis</i>
HAM 32	<i>C. tropicalis</i>
HAM 33	<i>C. tropicalis</i>
HAM 44	<i>C. tropicalis</i>
HAM 14	<i>C. parapsilosis</i>
HAM 21	<i>C. parapsilosis</i>
HAM 36	<i>C. parapsilosis</i>
HAM 50	<i>C. parapsilosis</i>
HGV 04	<i>C. parapsilosis</i>
HGV 41	<i>C. parapsilosis</i>
HGV 54.1	<i>C. parapsilosis</i>
HGV 54.2	<i>C. parapsilosis</i>
ATCC 90028	<i>C. albicans</i>
ATCC 22019	<i>C. parapsilosis</i>

Fonte: O autor (2022).

Estes isolados foram cultivados em meio ágar Sabouraud (SDA) por 24h a 37°C e mostraram características morfológicas como colônia de cor creme, textura cremosa e bordas irregulares na macroscopia e estruturas ovais, com brotamento e formação de pseudo-hifa na microscopia. As características foram compatíveis com o gênero (Figura 2).

Figura 2: Características macroscópicas (A) e microscópicas (B) do isolado HGV 23 *Candida tropicalis* com 7 dias de crescimento à 35°C em meio ágar Dextrose Sabouraud. A seta indica o brotamento das leveduras, formando pseudo-hifas



Fonte: O autor (2022).

Estudos sugerem que a relação de isolamento entre as espécies de *C. albicans* e *Candida*- não *C.albicans* como agentes de infecções fúngicas invasivas tem sofrido mudanças nas últimas décadas em relação às proporções estimadas. Em estudo realizado na Índia por Chakrabarti et al. (2015) considerando apenas os isolados de UTI, 80% correspondiam a espécies de *Candida*- não *C.albicans*. Este estudo sugere que a distribuição geral das espécies depende da distribuição geográfica e das características clínicas associadas aos pacientes.

Estudos realizados na América do Sul, têm demonstrado que *C. tropicalis* é o isolado de *Candida* - não *C.albicans* mais comumente isolado representando cerca de 20% dos casos (NOREEN et al 2015).

De acordo com um estudo feito por Fonseca et al., 2022, foi analisado 208

pacientes com Covid-19 e desses foram coletadas 71 amostras positivas para *Candida*. Foi identificado que, a maioria das amostras, 81,9% pertenciam a espécies de *Candida* não *C. albicans* e apenas 18,1% pertenciam à *C. albicans*. Entre os isolados, *C. tropicalis* teve maior incidência, 36,3%, seguido de *C. parapsilosis* com 29,5% dos casos. Esse estudo ressalta a mudança no quadro epidemiológico e que os pacientes com candidemia apresentaram piores desfechos no prognóstico, seguindo de sepse secundária e aumento da mortalidade.

4.2 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA

Os isolados de *Candida* foram avaliados quanto à susceptibilidade frente ao fluconazol e aos derivados tiofênicos, apresentando respectivamente as concentrações inibitórias mínimas (CIM) na Tabela 2 abaixo. Na sensibilidade ao fluconazol, as concentrações inibitórias mínimas variaram de 0,125 a 64 µg/mL sendo 18 isolados considerados sensíveis, um dose-dependente e cinco resistente. Quanto aos derivados tiofênicos, não expressaram diferenças, com inibição fungicida na concentração de 200 µg/mL (Figura 3).

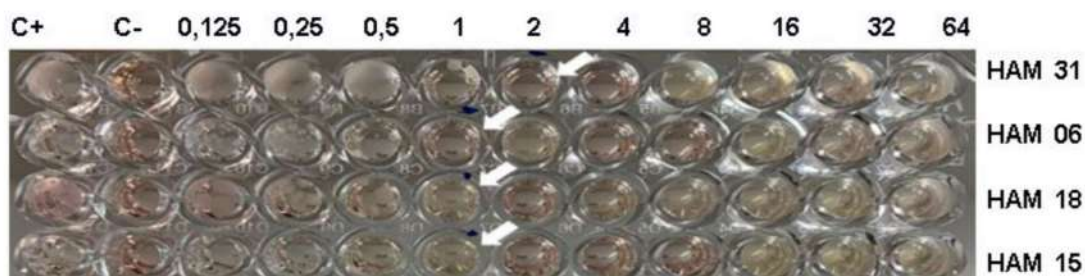
Tabela 2: Concentração inibitória mínima dos isolados clínicos de *Candida* frente ao fluconazol e aos derivados tiofênicos

Isolados Clínicos	Fluconazol (0,125-64 µg/mL)	Derivados tiofênicos (0,5-1024 µg/mL)
HAM 02	0,5 µg/mL	200 µg/mL
HAM 04	0,03 µg/mL	200 µg/mL
HAM 11	0,5 µg/mL	200 µg/mL
HAM 12	0,125 µg/mL	200 µg/mL
HAM 13	4 µg/mL	200 µg/mL
HAM 15	1 µg/mL	200 µg/mL
HAM 17	2 µg/mL	200 µg/mL
HAM 18	1 µg/mL	200 µg/mL
HAM 06	1 µg/mL	200 µg/mL
HAM 09	16 µg/mL	200 µg/mL
HAM 23	0,03 µg/mL	200 µg/mL

HAM 30	0,5 µg/mL	200 µg/mL
HAM 31	2 µg/mL	200 µg/mL
HAM 32	0,03 µg/mL	200 µg/mL
HAM 33	16 µg/mL	200 µg/mL
HAM 44	1 µg/mL	200 µg/mL
HAM 14	>64 µg/mL	200 µg/mL
HAM 21	0,5 µg/mL	200 µg/mL
HAM 36	8 µg/mL	200 µg/mL
HAM 50	0,5 µg/mL	200 µg/mL
HGV 04	0,5 µg/mL	200 µg/mL
HGV 41	0,125 µg/mL	200 µg/mL
HGV 54.1	8 µg/mL	200 µg/mL
HGV 54.2	0,5 µg/mL	200 µg/mL

Fonte: O autor (2022).

Figura 3: Perfil de susceptibilidade antifúngica dos isolados clínicos de *Candida* frente ao fluconazol (64-0,125 µg/mL). C+: Controle positivo C-: Controle negativo



Fonte: O autor (2022).

Em nosso estudo foi visto que diferentes cepas de uma mesma espécie apresentaram concentrações inibitórias mínimas diferentes frente ao fluconazol, sendo uma característica pertencente a cada isolado. Como demonstrado na Figura 2, isolados de *C. tropicalis* HAM 31 e HAM 06 apresentaram CIM de 2 µg/mL e 1 µg/mL, respectivamente. Entre os 24 isolados testados foi visto que o fluconazol conseguiu inibir o crescimento de 75% deles. Em um estudo realizado por Rodrigues, 2020, foram testadas 144 cepas de *Candida* quanto a susceptibilidade ao fluconazol e somente três (03) cepas da espécie *C.*

parapsilosis foram resistentes ao antifúngico, resultado similar ao nosso.

A sensibilidade do fluconazol também foi relatada por Vieira e colaboradores, 2018, onde todos os isolados de *C. albicans* foram sensíveis e isolados de *Candida* não *C. albicans*, foram sensíveis dose dependente, resultados semelhantes ao nosso estudo. Ainda, Terças et al., 2017, observaram sensibilidade em 96% das cepas testadas e relataram resistência em isolados de *C. krusei* e *C. glabrata*.

Entretanto, Da Matta et al., 2017, descrevem um aumento de até 2,6% na resistência ao fluconazol em isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* na América Latina. No Paraguai, Aguilar e colaboradores, 2020, analisaram casos de candidemia em sete hospitais no período de 2010 a 2018 e relataram resistência em 4,4% dos isolados de *C. parapsilosis*, 2,8% de *C. albicans* e 8% de *C. glabrata* ao fluconazol.

No Brasil, Medeiros et al., 2019, analisaram 68 casos de candidemia no hospital terciário em Natal - Rio Grande do Norte e relataram que 2% dos isolados foram resistentes ao fluconazol e 20,5% foram sensível dose dependente, concordando com nosso estudo.

Ainda, Lamoth e colaboradores, 2018, associam essa resistência crescente em infecções por leveduras com a resistência adquirida ou intrínseca da espécie, sendo preocupante a limitação dos fármacos nas opções terapêuticas.

Os derivados tiofenos apresentaram resposta satisfatória na inibição dos isolados. De acordo com Araújo Neto et al., 2017, os derivados 2-nitrotiofeno testados apresentam um potencial antifúngico promissor contra espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans* com citotoxicidade moderada.

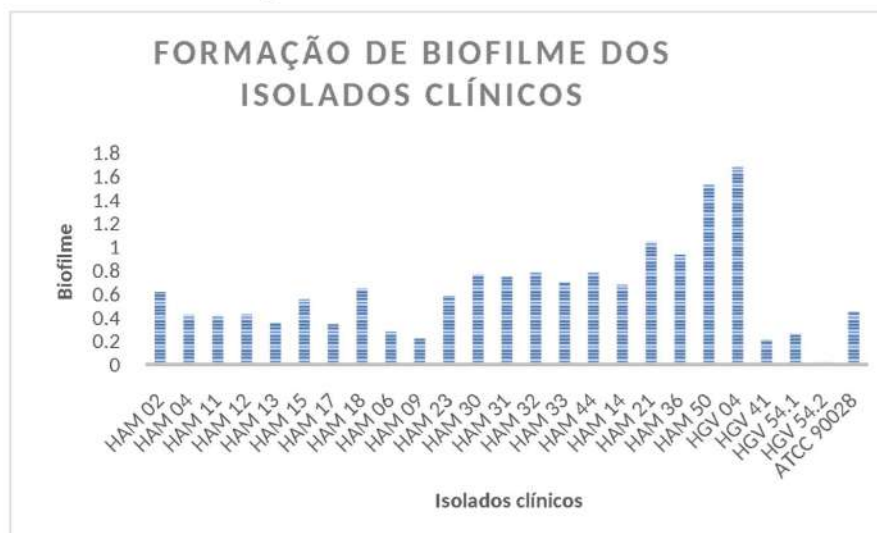
Da mesma maneira, Neves, 2019, relatou atividade antifúngica satisfatória em moléculas de derivados tiofênicos complexadas com ciclodextrina contra *Candida sp.*, podendo ser considerado uma alternativa favorável como terapia farmacêutica futura.

4.3 INDUÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO BIOFILME

Na formação do biofilme foi visto que todos os isolados foram capazes de formar biofilme em diferentes intensidades (Figura 4). Os isolados HAM18, HAM32 e HGV04, pertencentes às espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C.*

parapsilosis respectivamente, foram as cepas que se destacaram na produção do biofilme entre cepas de suas espécies.

Figura 4: Intensidade de formação do biofilme dos isolados clínicos



Fonte: O autor (2022)

Em um estudo realizado por Oliveira et al. (2019), ao analisar cepas clínicas das espécies de leveduras, *C. albicans* e *Candida* não-*C. albicans*, foi observado que os biofilmes formados por isolados clínicos de *Candida* não-*C. albicans* apresentaram atividades metabólicas mais elevadas do que biofilmes de *C. albicans*, o que também foi observado em nosso estudo.

Da mesma maneira, Sahal & Bilkay (2018), avaliaram espécies de *Candida* isoladas de hemoculturas quanto a sua produção de biofilme e concluíram que *C. tropicalis* foi considerado com alta formação de biofilme, quando comparado a *C. albicans* que não produziu biofilme. Os autores relataram alta patogenicidade nas cepas, incluindo resistência a vários antifúngicos.

Soldini et al. (2017), estudaram a produção de biofilme em 190 isolados de *C. parapsilosis* e mais da metade, 55,8%, foram capazes de produzir biofilme em alta ou moderada intensidade. Ainda, relataram que pacientes infectados com cepas de alta ou moderada intensidade de biofilme tiveram menores taxas de sobrevivência quando comparado aos isolados de baixa intensidade.

A produção do biofilme, em conjunto com a intensidade e biomassa, afeta

diretamente nas taxas de mortalidade em pacientes com candidemia, sendo um fator de virulência que necessita de uma terapia adequada para sobrevivência do paciente (SOLDINI et al., 2017).

4.4 TRATAMENTO DO BIOFILME

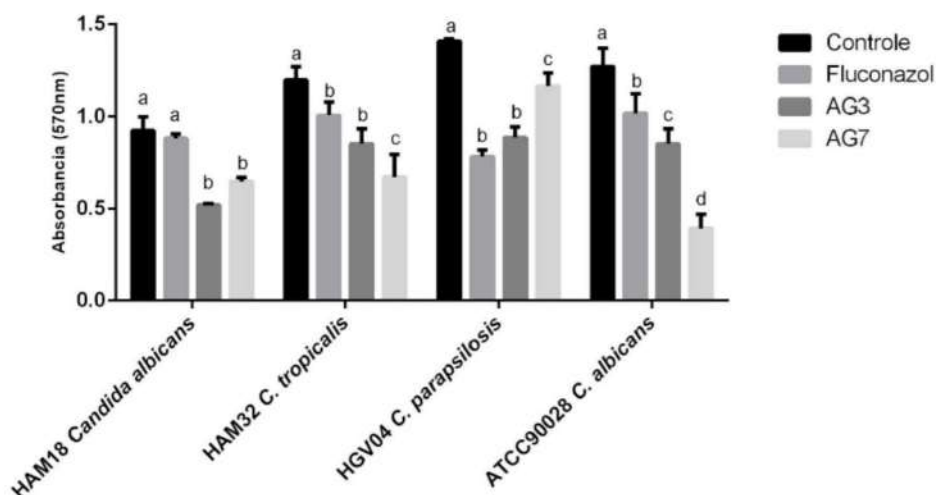
Para o tratamento do biofilme, foram selecionadas cepas que produziram biofilme em alta intensidade como representantes de cada espécie e utilizado o fluconazol e as moléculas tiofênicas AG3 e AG7 para o tratamento (Figura 5). As moléculas foram selecionadas de acordo com sua disponibilidade em material, já que previamente foi visto que não há diferenças na inibição do crescimento fúngico na concentração de 200 µg/mL.

Foi observado que em todos os isolados, os derivados tiofênicos estatisticamente apresentaram uma boa resposta ao tratamento dos biofilmes. No isolado HAM32 foi observado que o tratamento com o AG3 e o fluconazol foram estatisticamente semelhantes, quanto ao tratamento, já o AG7 conseguiu tratar em uma menor concentração.

No isolado HAM18 foi visto que estatisticamente o controle e o fluconazol são semelhantes, portanto, a droga não foi capaz de inibir o crescimento do biofilme. Porém, as moléculas AG3 e AG7 foram capazes de tratar o biofilme em concentrações menores.

Sobre o HGV04, estatisticamente o fluconazol e o AG3 foram semelhantes e capazes de inibir a formação do biofilme. A moléculas AG7 também inibiu o crescimento, porém em uma concentração maior.

Figura 5: Atividade oxidativa do tratamento de biofilme por isolados clínicos do gênero *Candida*. Os dados representam a média e desvio padrão da absorbância do MTT durante a produção do biofilme com pelo menos três repetições ($n \geq 3$)



Fonte: O autor (2022).

Em um estudo realizado por Araújo Neto et al. (2017), foi observado atividade antifúngica em Tiossemicarbazonas tiofênicas analisadas frente a leveduras do gênero *Candida*, resultado similar ao nosso onde derivados de tiofeno apresentam atividade antifúngica contra *Candida*. Ainda, foram analisadas mudanças estruturais na N4 na substituição da Tiossemicarbazona, sendo os compostos que apresentam p-Et-fenil e p-Me-fenil como porções substituintes mostraram excelente atividade antifúngica (Araújo Neto, et al., 2017).

Sun e colaboradores, (2017), estudaram um composto de Tiossemicarbazonas, chamado NSC319726, e observaram uma atividade antifúngica significativa frente a *Candida*. Foi visto que a droga isolada foi capaz de inibir o crescimento de isolados de *C. albicans* e *C. krusei* resistentes ao fluconazol, concordando com nosso estudo. Ainda, relatam um bom sinergismo das drogas combinadas.

Logu et al. (2005), avaliaram um composto de isotiossemicarbazona frente a 114 isolados clínicos de *Candida*, incluindo cepas resistentes ao fluconazol. No estudo, foi verificado MIC₅₀ de 29,20 µg/mL em biofilmes de *Candida* enquanto o fluconazol não teve efeito nas cepas testadas, validando o

efeito antifúngico da molécula.

Assim, os estudos com derivados tiofênicos devem continuar para que futuramente possam ser implementados como nova alternativa terapêutica, melhorando o prognóstico do paciente. É necessário avaliar sua atividade citotóxica e posteriormente avaliar seu mecanismo de ação e eficácia *in vivo* para o desenvolvimento de novos antifúngicos.

No entanto, não havia estudos que demonstrassem a eficácia deste grupo de drogas frente ao tratamento do biofilme. Sendo este estudo pioneiro.

5 CONCLUSÃO

Através dos resultados apresentados, pode-se concluir que:

- Cepas de uma mesma espécie de *Candida*, apresentam-se como resistentes, dose-dependentes ou sensíveis ao fluconazol.
- Todos os compostos de derivado de tiofeno utilizados apresentam atividade fungicida contra cepas clínicas de *Candida* na concentração de 200 µg/mL.
- Isolados clínicos de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são capazes de produzir biofilmes em diferentes intensidades entre mesmas espécies e entre espécies diferentes.
- Derivados tiofênicos AG3 e AG7 apresentaram atividade antifúngica contra biofilme de espécies de *Candida*.
- Mudanças estruturais nos derivados tiofênicos influenciam diretamente na sua ação antifúngica.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, Somaya A.; EL-GOHARY, Nadia S.; EL-BENDARY, Eman R.; EL-ASHRY, Saadia M.; SHAABAN, Mona I. Synthesis, antimicrobial, anti-quorum-sensing, antitumor and cytotoxic activities of new series of cyclopenta(hepta)[b]thiophene and fused cyclohepta[b]thiophene analogs. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.140, p. 200-211, 2017.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BR). Brasil: Alerta de Risco GVIMS/GGTES/Anvisa nº 01/2020. Identificação de possível caso de *Candida auris* no Brasil; 07 de dezembro de 2020. [acesso em 17 dez 2021]. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/identificacao-de-possivel-caso-de-candida-auris-no-brasil/ALERTA-012020CANDIDAAURIS07.12.2020_2.pdf

AGUILAR G, ARAUJO P, LIRD G, et al. Identificación y perfil de sensibilidad de *Candida* spp. aisladas de hemocultivos en hospitales de Paraguay [Identification and susceptibility profile of *Candida* species isolated from hemocultures in hospitals in Paraguay. **Rev Panam Salud Publica**. v.44, e34. Published 2020 Sep 23. doi:10.26633/RPSP.2020.34

ALBUQUERQUE P, CASADEVALL A. Quorum sensing in fungi: a review. **Med Mycol**. v.50, n. 4, p.337-45, 2012. <http://dx.doi.org/10.3109/13693786.2011.652201>. PMID:22268493.

ALMEIDA, S. R.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* iron acquisition within the host. **FEMS Yeast Res**. p. 1000-1012. 2009.

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.

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

AUTMIZGUINE, JULIE et al. "Effect of fluconazole prophylaxis on *Candida* fluconazole susceptibility in premature infants." **The Journal of antimicrobial chemotherapy** vol. 73, n.12, p. 3482-3487, 2018. doi:10.1093/jac/dky353

AUZINGER, G., PLAYFORD, E.G., GRAHAM, N.C., KNOX, H.N., WEINSTEIN, D., KANTECKI, M., SCHLAMM, H., CHARBONNEAU, C. Cost-Effectiveness Analysis of Anidulafungin for the Treatment of Candidemia and Other Forms of Invasive Candidiasis. **Infect Dis** v.15, p.463, 2015.

BARAC A et al. Investigation of a healthcare-associated *Candida tropicalis* candidiasis cluster in a haematology unit and a systematic review of nosocomial outbreaks. **Mycoses**, v. 63, n.4, p. 326-333, 2020.

BARBEDO LS, SGARBI DBG. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis** v.22, p.22-38, 2010.

BERKOW, E. L, SHAWN R. L. Activity of novel antifungal compound APX001A against a large collection of *Candida auris*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy** vol. 73, n.11, p. 3060-3062, 2018. doi:10.1093/jac/dky302

BERNARDIS F et al., *Candida* vaginitis: virulence, host response and vaccine prospects. **Medical Micology**, v. 56, p. 26-31, 2018.

BERRIDGE, Michael V.; HERST, Patries M.; TAN, An S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnol. Annu. Rev.** v.11, p.127-152, 2005.

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.

CANASSA AL, CRUZ DT, Incidência e perfil de suscetibilidade de candidemias de um hospital público em Mato Grosso do Sul, Brasil, **Rev. Bras. Pesq. Saúde**, n.21, v.4, p.110-117, 2019.

CANELA, HELIARA MARIA SPINA. **Perfil fenotípico e genotípico de isolados de *Candida* spp. em episódios de candidemia no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP-USP**. Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia) – Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, p. 117. 2017.

CAUCHIE, M., DESMET, S., & LAGROU, K. *Candida* and its dual lifestyle as a commensal and a pathogen. **Research in Microbiology**, v.9-10 n.168, p. 802 – 810, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.02.005>

CHAKRABARTI A, SOOD P, RUDRAMURTHY SM, CHEN S, et al.. Incidence, characteristics and outcome of ICU-acquired candidemia in India. **Intensive Care Med**, v.41, n. 2, p. 285-95, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Second Edition. CLSI document M27-A3 [ISBN 1-56238-666-2]. CLSI, Pennsylvania, USA 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth

informational supplement. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012 (Document M27-S4).

COLOMBO AL, GARNICA M, ARANHA CAMARGO LF, et al. *Candida glabrata*: an emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. **Med Mycol.**, v.51, p38-44, 2013a.

COLOMBO AL, GUIMARÃES T, CAMARGO LFA, 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 and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **Braz J Infect Dis** v.17, n.3, p. 283-312, 2013b.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J. et al. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.44, n.8, p.2816-2823, ago. 2006.

COLOMBO, A L et al. "*Candida* and invasive mould diseases in non-neutropenic critically ill patients and patients with haematological cancer." **The Lancet. Infectious diseases** vol. 17, n. 11, 2017: e344-e356. doi:10.1016/S1473-3099(17)30304-3

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. doi:10.1007/s12281-018-0329-6

COSTA, V. G.; QUESADA, R. M.; ABE, A. T. et al. Nosocomial Bloodstream *Candida* Infections in a Tertiary-Care Hospital in South Brazil: A 4-Year Survey. **Mycopathologia, The Hague**, v. 178, n. 3–4, p. 243–250, 2014

DA MATTA, D. A.; SOUZA, A. C. R.; COLOMBO, A. L. Revisiting Species Distribution and Antifungal Susceptibility of *Candida* Bloodstream Isolates from Latin American Medical Centers. **Journal of Fungi**, Basel, v.3, n.2, pii: E24, mai. 2017

DARWISH, Elham S., Facile synthesis of heterocycles via 2-picolinium bromide and antimicrobial activities of the products. **Molecules**. v.13,5, p. 1066-78, 2008.

DE BARROS, P. P., FREIRE, F., ROSSONI, R. D., JUNQUEIRA, J. C., JORGE, A. O. C. *Candida krusei* and *Candida glabrata* reduce the filamentation of *Candida albicans* by downregulating expression of HWP1 gene. **Folia Microbiologica**, v. 62, n. 4, p. 317–323, 2017. doi:10.1007/s12223-017-0500-4

DE LOGU, A., SADDI, M., CARDIA, M. C., BORGNA, R., SANNA, C., SADDI, B., & MACCIONI, E. *In vitro* activity of 2-cyclohexylidenhydrazo-4-phenyl-thiazole compared with those of amphotericin B and fluconazole against clinical isolates of *Candida* spp. and fluconazole-resistant *Candida albicans*. **Journal of**

Antimicrobial Chemotherapy, v. 55, n. 5, p. 692–698. 2005.
doi:10.1093/jac/dki084

DE OLIVEIRA VCM, SARACENI V, SAFE IP, et al. Fatal outbreak of polyclonal candidemia in a neonatal intensive care unit. **Infect Control Hosp Epidemiol.** n.35, v.8, p.1077-1079, 2014.

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

DOVNIK A, GOLLE A, NOVAK, D, et al. Treatment of vulvovaginal candidiasis: a review of the literature. **Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.**, v.24, p.5-7, 2015.

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. 116-25, 2017.

FANNING, Saranna; MITCHELL, Aaron P. Fungal Biofilms. **PLoS Pathog.** n.8, v.4, e1002585, 2012.

FONSECA, SOUZA, B. F., CUNHA, L.C., OLIVEIRA, A., et al., Candidemia associada à Covid-19: Perfil de pacientes em uma unidade de terapia intensiva do Recife, Pernambuco, Brasil, **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, ISSN 1413-8670, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2021.102218>.

FOURIE, R. et al. Iron at the Centre of Candida albicans Interactions. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 185, 5 jun. 2018.

GEHRING GM, CARRILHO CMM, PELISSON M, PERUGINI M, TANO ZN. Candidemia: revisão bibliográfica. **J Infect Control.**, v.4, n.4, p.1-19, 2015.

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. doi:10.1016/j.ejmech.2016.07.04

GUPTA V, MALHOTRA A, CHHINA D, SINGH A. Characterization of *Candida* species in blood stream infections. **Sociedad Iberoamericana de Información Científica**, vol. 22.; 2018.

GUARRO J, GENÉ J, STCHIGEL AM. Developments in fungal taxonomy. **Clin28. Microbiol Rev**, v.12, n. 3, p. 454-500.

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. doi.org/10.2174/1871526515666150320162036.

HUANG, Y., DOMLING, A. The Gewald multicomponent reaction. **Mol. Diversity**, v.15, p.3, 2011.

JALAL, M.; ANSARI, M.A.; ALZOHAIY, M.A.; ALI, S.G.; KHAN, H.M.; ALMATROUDI, A.; SIDDIQUI, M.I. AntiCandidal activity of biosynthesized silver nanoparticles: effect on growth, cell morphology, and key virulence attributes of *Candida* species. **International Journal of Nanomedicine**, v.14, p.4667–4679, 2019.

JANIEL EN, ANDES D. Fungal Biofilms: In vivo models for discovery of anti-biofilm drugs. **Rev. Microbiol Spectr.** v.3, n. 5, p. 1-25, 2015.

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

JOSEP M, TORRES-RODRÍGUEZ YM Y OL. *Candida glabrata*: un patógeno emergente., **Biociencias**, v. 10, p. 89–102, 2015.

KAUFFMAN CA. Treatment of candidemia and invasive candidiasis in adults. **UpToDate** [Internet]. 2018 [acessado em 10 dez.2021]. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/management-of-candidemia-and-invasive-candidiasis-n-adults>.

KERI, R. S., CHAND, K., BUDAGUMPI, 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 Z, AHMAD S, AL-SWEIH N, et al. Changing trends in epidemiology and antifungal susceptibility patterns of six bloodstream *Candida* species isolates over a 12-year period in Kuwait. **PLoS One**. v. 14, n. 5, e0216250, 2019. doi:10.1371/journal.pone.0216250

KOGA-ITO, C. Y. et al. Virulence Factors and Antifungal Susceptibility of *Candida albicans* Isolates from Oral Candidosis Patients and Control Individuals. **Mycopathologia**, v. 161, n. 4, p. 219–223, abr. 2006.

KORDALEWSKA, MILENA et al. Understanding Echinocandin Resistance in the Emerging Pathogen *Candida auris*. **Antimicrobial agents and chemotherapy** vol. 62,6 e00238-18. 25 May. 2018, doi:10.1128/AAC.00238-18

KRISTANC, L., BOŽIČ, B., JOKHADAR, Š. Z., DOLENC, M. S., X GOMIŠČEK, G. The pore-forming action of polyenes: From model membranes to living

organisms. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1861, n. 2, p. 418-430, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.11.006>

KROM, B. P.; COHEN, J. B.; FESER, G. E. M.; CIHLAR, R. L. Optimized candidal biofilm microtiter assay. **J. Microbiol. Methods**, v.68, p. 421-423, 2007.

LAMOTH, FREDERIC et al. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. **The Journal of antimicrobial chemotherapy** vol. 73, 2018. doi:10.1093/jac/dkx444

LANGER LTA, STAUDT, KJ; CARMO, RL; ALVES, IA. Biofilmes em infecção por *Candida*: uma revisão da literatura Biofilmes, **Revista Interdisciplinar em Ciências da Saúde e Biológicas**, v. 2, n. 2, p. 1-15, 2018.

LI, JIZHOU et al. Assessment of the *In Vitro* and *In Vivo* Antifungal Activity of NSC319726 against *Candida auris*. **Microbiology spectrum** vol. 9, n. 3, e0139521, 2021. doi:10.1128/Spectrum.01395-21

LINARES, C. E. B. et al. Enzymatic and hemolytic activities of *Candida dubliniensis* strains. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 4, p. 203–206, ago. 2007.

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. 5484–511, 2018.

LOTFALI, E.; SHAHVERDI, A. R.; MOHAMMADI, R.; NOORBAKHSH, F.; GHAJARI, A.; ANSARI, S.; REZAIE, S. in vitro Activity of Two Nanoparticles on Clinical Isolates of *Candida parapsilosis*, Showing Resistance Against Antifungal Agents in Children. **Archives of Clinical Infectious Diseases**, 2017. doi:10.5812/archcid.13853

NASCIMENTO, A. R. **Infecção relacionada a assistência a saúde causada por leveduras do gênero *Candida***. Monografia (Graduação). Universidade Federal de Minas Gerais UFMG. Minas Gerais; p. 30, 2011.

MACHADO, GS; DALMOLIN, TV; BRANDÃO, F. *Candida auris* – fungo emergente que ameaça a saúde global. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, p. 9673 - 9681 jan. 2021

MARAK, M.B.; DHANASHREE, B. Antifungal susceptibility and biofilm production of *Candida* spp. isolated from clinical samples. **Int J Microbiol.**, 2018.

MARINS, T.A.; MARRA, A.R.; EDMOND, M.B.; MARTINO, M.D.V.; YOKOTA, P.K.O.; MAFRA, A.C.C.N.; JUNIOR, M.S.D. Evaluation of *Candida* bloodstream infection and antifungal utilization in a tertiary care hospital. **BMC Infectious Diseases.**, v. 18, 2018

MCMANUS D. S., SHAH S. Antifungal drugs. **Side Effects of Drugs Annual**. p. 41, 2019. doi: 10.1016/bs.seda.2019.09.002.

MEDEIROS, M. A. P. DE, MELO, A. P. V. DE, BENTO, A. DE O., SOUZA, L. B. F. C.

DE, NETO, F. DE A. B., GARCIA, J. B.-L., ... CHAVES, G. M. Epidemiology and prognostic factors of nosocomial candidemia in Northeast Brazil: A six-year retrospective study. **PLOS ONE**, v.14, n. 8, e0221033. 2019. doi:10.1371/journal.pone.022103

MELO, A. S. et al. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. Isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. **Medical Mycology**. v.49, p.253-262, 2011.

MOTTA, F. A., DALLA-COSTA, L. M., MURO, M. D., CARDOSO, M. N., PICHARSKI, G. L., JAEGER, G., & BURGER, M. Risk factors for candidemia mortality in hospitalized children. **Jornal de Pediatria**, v. 93, n. 2, p. 165–171, 2017. doi:10.1016/j.jped.2016.05.007

NETT, JENIEL E, DAVID R ANDES. “Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications.” **Infectious disease clinics of North America** vol. 30, n.1, p. 51-83, 2016. doi:10.1016/j.idc.2015.10.012

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

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

NOREEN M, ARSHAD M. Association of TLR1, TLR2, TLR4, TLR6, and TIRAP polymorphisms with disease susceptibility. *Immunology Resvis*.;62(2):234–52. 2015.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A.M. et al. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 51, n. 5, p. 561–570, 2010.

OLIVEIRA, W. V.; SANTOS, W. S.; GOMES, B. S.; LIMA, J. L. C. Etiologia e perfil de susceptibilidade dos microrganismos isolados de hemoculturas no Hospital das Clínicas da UFPE no período de janeiro a dezembro de 2014. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 51, n. 1, p. 40-5, 2019.

PAPPAS PG, KAUFFMAN CA, ANDES DR, et al. Clinical Practice Guideline for the management of candidiasis: update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v. 62, p. 50, 2016.

PEIXOTO JV, ROCHA MG, NASCIMENTO RTL, et al. Candidíase - uma revisão de literatura. **Braz J Surg Clin** v.8, n.2, p. 75-82, 2014.

PARAMYTHIOTOU, E. et al. Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat. **Molecules** vol. 19, n. 1, p.1085-119. 17 Jan. 2014, doi:10.3390/molecules19011085

PERLIN DS, RAUTEMAA-RICHARDSON R, ALASTRUEY- IZQUIERDO A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **Lancet Infect Dis**, v.17, n. 12, p. 383–392, 2017. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30316-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30316-X)

PONGRÁCZ J, BENEDEK K, JUHÁSZ E, IVÁN M, KRISTÓF K. *In vitro* biofilm production of *Candida* bloodstream isolates: any association with clinical characteristics? **J Med Microbiol**. v. 65, n. 4, p. 272–277, 2016. 10.1099/jmm.0.000207

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

PRESTEL, CHRISTOPHER et al. "Candida auris Outbreak in a COVID-19 Specialty Care Unit - Florida, July-August 2020." **MMWR. Morbidity and mortality weekly report** vol. 70,2 56-57. 15 Jan. 2021, doi:10.15585/mmwr.mm7002e3

PRISTOV, K E, AND M A GHANNOUM. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases** vol. 25, n. 7, p. 792-798, 2019. doi:10.1016/j.cmi.2019.03.028

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., & MOORE, P. K. **Farmacologia**. (6a ed.), Guabanara-Koogan AS, 2007.

ROCHA, APS, NUNES, M; SANTOS, FAG; ARAÚJO-NETO, LN; OLIVEIRA, TF; ALVES, AIS; ANDRADE, MCL; BOUNAFINA-PAZ, MDS. Perfil epidemiológico das leveduras sistêmicas em Unidades de Terapia Intensiva de hospitais públicos da cidade do Recife – PE, Brasil, **Brazilian Journal of health Review** **Braz. J. Hea. Rev**, Curitiba, v. 3, n. 6, p. 19098-19111. nov./dez. 2020. ISSN 2595-6825

RODRIGUES, DALITY K. B., **Distribuição das espécies de Candida em isolados de corrente sanguínea no estado de São Paulo: identificação e perfil de sensibilidade antifúngica**. 2020. Dissertação (Mestrado) – Ciências da Coordenadoria do Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, 2020.

RODRIGUEZ, K. A. F.; DIAS, C. N. S.; NÉRIS, P. L. N. 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.

ROSSETTI, A., BONO, N., CANDIANI, G., MENEGHETTI, F., RODA, G., SACCHETTI, A. Synthesis and antimicrobial evaluation of novel chiral 2-amino-4,5,6,7-tetrahydrothieno[2,3-c]pyridine derivatives. **Chemistry & Biodiversity**. v.1, p.1-10, 2019.

RUIZ, L.S.; PEREIRA, V. B. R. Importância dos fungos no ambiente hospitalar. **Bol Inst Adolfo Lutz**, v. 26, n. 2, p. 2-4, 2016.

SAHAL, G., & BILKAY, I. S. Distribution of clinical isolates of *Candida* spp. and antifungal susceptibility of high biofilm-forming *Candida* isolates. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 5, p. 644–650. 2018. doi:10.1590/0037-8682-0136-2018

SAINI, P., BARI, S. S., BANIK, B. K., & BHALLA, A. Synthetic route for the novel pyrimidine-substituted alkanolate, acetohydrazide, and imines: Synthon for β -lactams. **Synthetic Communications**, v. 47, n. 10, p. 982–989, 2017. doi:10.1080/00397911.2017.13014

SAKER, S.D; NAHAR, L. **Química para estudantes de farmácia. química geral, orgânica e de produtos naturais**. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan, 2009

SALARI S, KHOSRAVI AR, MOUSAVI SA, NIKBAKHT-BROJENI GH. 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.35–4, 2016.

SANTOLAYA ME, THOMPSON L, BENADOF D, et al. A prospective, multi-center study of *candida* bloodstream infections in Chile. **PLoS ONE**. v.14, p1–12, 2019.

SANTOS, A. V.; SILVA, M. R. P.; CARVALHO, M.M.; CARVALHO, L. R. B.; MOURA, M. E. B. Perfil das infecções hospitalares nas unidades de terapia intensiva de um hospital de urgência. **Rev enferm UFPE**. v.10, e. 1, p.194-201, 2016.

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

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

SASANI, E., KHODAVAISY, S., REZAIE, S., SALEHI, M., & YADEGARI, M. H. The relationship between biofilm formation and mortality in patients with *Candida tropicalis* candidemia. **Microbial Pathogenesis**, p.155, e.104889, 2021. doi:10.1016/j.micpath.2021.1048

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. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2005.01165.x>

SERHAN, G, STACK, C. M., PERRONE, G. G., & MORTON, C. O. The polyene antifungals, amphotericin B and nystatin, cause cell death in *Saccharomyces cerevisiae* by a distinct mechanism to amphibian-derived antimicrobial peptides. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 13, n. 1, p. 18. 2014. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-13-18>

SHAHID, ZAINAB, SOBEL, JACK D. Reduced fluconazole susceptibility of *Candida albicans* isolates in women with recurrent vulvovaginal candidiasis: effects of long-term fluconazole therapy. **Diagnostic microbiology and infectious disease** vol. 64, n. 3, p. 354-356. 2009. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2009.03.021

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

SILVA DANTAS, ALESSANDRA et al. "Cell biology of *Candida albicans*-host interactions." **Current opinion in microbiology** vol. 34 p. 111-118, 2016. doi:10.1016/j.mib.2016.08.006

SILVA-JÚNIOR, E. F.; SILVA, E. P. S.; FRANÇA, P. H. B.; SILVA, J. P. N.; BARRETO, E. O.; SILVA, E. B.; FERREIRA, R. S. Design, synthesis, molecular docking and biological evaluation of thiophen-2- iminothiazolidine derivatives for use against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v.24, n. 18, 2016

SPADOLA, G., SANNA, V., BARTOLI, J., CARCELLI, M., PELOSI, G., BISCEGLIE, F., ... ROGOLINO, D. Thiosemicarbazone nano-formulation for the control of *Aspergillus flavus*. **Environmental Science and Pollution Research**. 2020. doi:10.1007/s11356-020-08532-7

SOLDINI, S., POSTERARO, B., VELLA, A., DE CAROLIS, E., BORGHI, E., FALLEN, M., ... TUMBARELLO, M. Microbiologic and clinical characteristics of biofilm-forming *Candida parapsilosis* isolates associated with fungemia and their impact on mortality. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 7, p. 771–777. 2018. doi:10.1016/j.cmi.2017.11.005

SUN N, LI D, ZHANG Y, KILLEEN K, GROUTAS W, CALDERONE R. Repurposing an inhibitor of ribosomal biogenesis with broad anti-fungal activity. **Sci Rep.** v. 7, n. 1, e. 17014. Published 2017 Dec 5. doi:10.1038/s41598-017-17147-x

SUZUKI LC. **Desenvolvimento de biofilme formado por *Candida albicans* in vitro para estudo da terapia fotodinâmica.** Dissertação [Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares Associada à Universidade de São Paulo; 2009.

TERÇAS, A. L. G., MARQUES, S. G., MOFFA, E. B., ALVES, M. B., DE AZEVEDO, C. M. P. S., SIQUEIRA, W. L., & MONTEIRO, C. A. Antifungal Drug Susceptibility of *Candida* Species Isolated from HIV-Positive Patients Recruited at a Public Hospital in São Luís, Maranhão, Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017. doi:10.3389/fmicb.2017.00298

VIEIRA, C. A. Comparative study of *Candida* species: antifungal susceptibility and virulence genes. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 23, n. 54, p. 14, 2018a.

VIEIRA, C. A., DE SOUZA, W. W. R., DE LIMA, J. S., & GOULART, L. S. Estudo comparativo das espécies de *Candida*: Sensibilidade antifúngica e genes de virulência. **Multitemas**, v. 23, n. 54, p. 169–182. 2018b. <https://doi.org/10.20435/multi.v23i54.1709>

WALL, GINA et al. “*Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis.” **Current opinion in microbiology** vol. 52, p.1-6, 2019. doi:10.1016/j.mib.2019.04.001

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

XU, H.; JENKINSON, H.F.; DONGARI-BAGTZOGLOU, A. Innocent until proven guilty: mechanisms and roles of *Streptococcus-Candida* interactions in oral health and disease. **Mol Oral Microbiol.**, v.29, p.99–116, 2014.