



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA  
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

SAULO VINÍCIUS DE ALBUQUERQUE ARRUDA

**ABORDAGEM MOLECULAR NA CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS CLÍNICOS  
DE *Candida* spp. E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA**

RECIFE

2023

SAULO VINÍCIUS DE ALBUQUERQUE ARRUDA

**ABORDAGEM MOLECULAR NA CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS CLÍNICOS  
DE *Candida* spp. E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rejane Pereira Neves

Coorientador (a): Dr<sup>a</sup>. Maria Daniela Silva Buonafina Paz

RECIFE

2023

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

Arruda, Saulo Vinícius de Albuquerque.

Abordagem molecular na caracterização de isolados clínicos de *Candida* spp. e perfil de susceptibilidade antifúngica / Saulo Vinícius de Albuquerque Arruda. - Recife, 2023.

53 : il., tab.

Orientador(a): Rejane Pereira Neves

Coorientador(a): Maria Daniela Silva Buonafina Paz

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas - Bacharelado, 2023.

1. *Candida* sp.. 2. Taxonomia molecular. 3. Derivados tiofenos. 4. Atividade antifúngica. 5. Resistência antifúngica. I. Neves, Rejane Pereira. (Orientação). II. Paz, Maria Daniela Silva Buonafina. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)

SAULO VINÍCIUS DE ALBUQUERQUE ARRUDA

**ABORDAGEM MOLECULAR NA CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS CLÍNICOS  
DE *Candida* spp. E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 29/08/2023

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rejane Pereira Neves (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Franz de Assis Graciano dos Santos (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr<sup>a</sup>. Bruna Rodrigues de Sousa (Examinador interno)

Universidade Federal de Pernambuco

**A minha amada mãe, família e amigos.**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente quero expressar minha profunda gratidão ao generoso Deus por permitir-me vivenciar esta experiência, iluminando minha jornada. Agradeço a todas as consciências superiores que nos guiam e protegem, fomentando nosso esclarecimento e expansão de consciência. Sua força e sabedoria têm sido guias constantes nesta trajetória.

Aos meus pais, Marliuda e Ronaldo, pelo apoio em minhas decisões, e por todo apoio emocional, psicológico e financeiro que sempre me proporcionaram, toda essa trajetória não teria sido concretizada se não fosse por vocês. Também as minhas irmãs, Sabrina e Sofia, e toda minha família por todo apoio incondicional, amo vocês demais.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Rejane Pereira Neves, sou profundamente grato pela oportunidade de aprendizado proporcionada. Durante todo tempo não apenas contribuiu para meu crescimento pessoal, mas também me enriqueceu profissionalmente. A confiança que depositou em mim e em meu trabalho é inestimável. Também gostaria de expressar minha sincera apreciação à Dr<sup>a</sup>. Maria Daniela Silva Buonafina Paz, pelo convívio amigável e pacífico durante este período, bem como pelo apoio oferecido.

Também agradeço ao Dr. Armando Marsden Lacerda Filho, do Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos, por sua disposição em compartilhar seu conhecimento sobre o fascinante mundo da micologia.

Minha profunda gratidão se estende aos membros de minha banca examinadora: Dr. Franz de Assis Graciano, Dra. Bruna Rodrigues de Sousa, e M.e Walter de Paula Pinto Neto.

Aos colegas do Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos, Alice, Eduarda, Diego, Giovana, Endrielle e Stéphane, cuja companhia e colaborações enriqueceram esta jornada, em especial ao Dr. Cícero Pinheiro Inácio pela orientação nas técnicas moleculares, e a outros graduandos, que gentilmente ofereceram suas perspectivas e auxílio em meus experimentos. Agradeço também as técnicas Raquel e Débora pela assistência durante todo período.

Aos colegas que fiz durante a graduação, em especial, Gabriel, Ailton, Rafael, Erick, Pedro, Marjori, Laís, Duda, Júlia, Eduarda, Amaury, Ellian, Rafael, Flávio, João dentre tantos outros, agradeço a todos pela nossa convivência e colaborações mútuas ao longo de toda a trajetória.

Não posso deixar de agradecer também aos outros amigos que a vida me presenteou. Que me aconselham e celebram meu sucesso e progresso. Obrigado por estarem comigo, minha gratidão ultrapassa limites, pois a presença constante e o apoio inabalável que oferecem são verdadeiramente eternos

Minha gratidão se estende à Universidade Federal de Pernambuco e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio durante minha graduação. E também aos dedicados profissionais da pesquisa, que investem suas vidas na geração e difusão de ideias e saberes, contribuindo para o enriquecimento intelectual e crítico de inúmeras pessoas.

Minha profunda gratidão a todos por sempre confiarem em mim.

“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos”

(Friedrich Nietzsche)

## RESUMO

Atualmente, as infecções fúngicas invasivas causadas pelo gênero *Candida* têm contribuído de forma considerável para o aumento dos índices de morbidade e mortalidade. Dentre essas infecções, a candidemia tem ocupado lugar de destaque, principalmente em pacientes críticos, com maior incidência em um contexto mundial, da espécie *C. albicans*, seguida de *C. tropicalis*. Este cenário pode estar relacionado com a baixa sensibilidade das técnicas tradicionais de diagnóstico e tratamento ineficaz e tardio, resultando assim, na impotência da terapia antifúngica. Sendo assim, em busca de repercutir uma identificação precoce e melhor prognóstico dos pacientes, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar taxonomicamente os isolados clínicos de *Candida* sp. de forma precisa e precoce, utilizando-se de bases moleculares para a identificação das espécies responsáveis por infecções sistêmicas. A partir da obtenção de forma aleatória dos isolados clínicos disponibilizados pelo grupo de pesquisa, utilizou-se de técnicas moleculares para identificação dos isolados, e realização de testes de susceptibilidade antifúngica com antifúngicos convencionais (anfotericina B, anidulafungina, caspofungina, fluconazol, micafungina e voriconazol), e derivados tiofênicos, visando estabelecer o perfil de susceptibilidade antifúngica em busca de novos agentes com potencial antifúngico. Por meio de PCR e sequenciamento, foram identificados 14 isolados clínicos advindos do acervo do grupo de pesquisa, com predominância de espécies de *Candida* não-*C. albicans* (n=8) em detrimento de espécies de *C. albicans* (n=6). No teste de susceptibilidade, através da análise de Concentração Inibitória Mínima (CIM), todos os isolados foram sensíveis à anfotericina B, micafungina e anidulafungina. Observou-se resistência em cinco isolados frente fluconazol, 13 frente voriconazol e um frente caspofungina. “6CN” (100 à 200µg/mL), “7CN” (100 à >200µg/mL), “6NP” (6,25 à 100µg/mL) e “6EST” (6,25 à 100µg/mL) foram os compostos tiofênicos utilizados e podem ser considerados promissores pelos dados apresentados. O estudo realça a relevância do DNA na identificação de *Candida* spp. e o potencial dos compostos tiofênicos contra infecções fúngicas.

**Palavras-chave:** *Candida* sp., taxonomia molecular, derivados tiofenos, atividade antifúngica, resistência antifúngica.

## ABSTRACT

Currently, invasive fungal infections caused by the *Candida* genus have contributed considerably to the increase in morbidity and mortality rates. Among these infections, candidemia has occupied a prominent place, especially in critically ill patients, with a higher incidence in a global context, of the species *C. albicans*, followed by *C. tropicalis*. This scenario may be related to the low sensitivity of traditional diagnostic techniques and ineffective and late treatment, thus resulting in the impotence of antifungal therapy. Therefore, in order to achieve early identification and a better prognosis for patients, the present work aimed to taxonomically characterize clinical isolates of *Candida* sp. accurately and early, using molecular bases to identify the species responsible for systemic infections. After randomly obtaining clinical isolates made available by the research group, molecular techniques were used to identify the isolates, and antifungal susceptibility tests were carried out with conventional antifungals (amphotericin B, anidulafungin, caspofungin, fluconazole, micafungin and voriconazole), and thiophenic derivatives, aiming to establish the antifungal susceptibility profile in search of new agents with antifungal potential. Using PCR and sequencing, 14 clinical isolates were identified from the research group's collection, with a predominance of non-*C. albicans* species (n=8) to the detriment of *C. albicans* species (n=6). In the susceptibility test, through Minimum Inhibitory Concentration (MIC) analysis, all isolates were sensitive to amphotericin B, micafungin and anidulafungin. Resistance was observed in five isolates against fluconazole, 13 against voriconazole and one against caspofungin. "6CN" (100 to 200µg/mL), "7CN" (100 to >200µg/mL), "6NP" (6.25 to 100µg/mL) and "6EST" (6.25 to 100µg/mL) were the thiophenic compounds used and can be considered promising based on the data presented. The study highlights the relevance of DNA in identifying *Candida* spp. and the potential of thiophenic compounds against fungal infections.

**Keywords:** *Candida* sp., molecular taxonomy, thiophene derivatives, antifungal activity, antifungal resistance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura química do anel de cinco membros com enxofre como heteroátomo de derivados tiofênicos.	25
Figura 2	Estrutura química dos compostos tiofênicos	26
Figura 3	Preparação do inóculo de leveduras segundo a metodologia do CLSI.	31
Gráfico 1	Distribuição de espécies do gênero <i>Candida</i> , após identificação genômica dos isolados clínicos.	33
Gráfico 2	Ocorrência de espécies de <i>Candida</i> não- <i>C. albicans</i> e <i>Candida albicans</i> entre os isolados.	33

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Identificação genômica dos isolados clínicos de <i>Candida</i> por meio da utilização de bases moleculares.	32
Tabela 2	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antifúngicos, anfotericina B (Anf), fluconazol (Flu), voriconazol (Vor), caspofungina (Cas), micafungina (Mic) e anidulafungina (Ani), além dos derivados tiofênicos (6CN; 7CN; 6CNP e 6EST), frente aos isolados clínicos de <i>Candida</i> sp. de hospitais públicos de Recife-PE.	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANF- Anfotericina B

ANI - Anidulafungina

CAS - Caspofungina

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

DMSP - Dimetil-sulfóxido

DNA - Deoxyribonucleic Acid

DNTP - Desoxirribonucleotídeo Trifosfato

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

EUCAST - European Union Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FLU - Fluconazol

HIV - Human Immunodeficiency Virus

MIC - Micafungina

PCR - Polymerase Chain Reaction

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

VOR - Voriconazol

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Gênero <i>Candida</i>	16
2.1.1	<i>Candida albicans</i>	16
2.1.2	<i>Candida tropicalis</i>	17
2.1.3	<i>Candida parapsilosis</i>	18
2.1.4	<i>Candida Krusei</i>	18
2.2	Candidemia	19
2.3	Identificação de espécies de <i>Candida</i>	20
2.4	Tratamentos e dificuldades associadas	21
2.5	Fármacos convencionais	22
2.5.1	Azóis: Fluconazol e Voriconazol	22
2.5.2	Equinocandinas: Anidulafungina, Micafungina e Caspofungina	23
2.5.3	Polienos: Anfotericina B	23
2.6	Teste de susceptibilidade antifúngica	24
2.7	Novas abordagens antifúngicas através de derivados tiofênicos	24
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVO GERAL	27
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	METODOLOGIA	28
4.1	OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS	28
4.2	IDENTIFICAÇÃO GENÔMICA	28
4.2.1	OBTENÇÃO DE BIOMASSA E EXTRAÇÃO DO DNA	28
4.2.2	CONDIÇÕES DA PCR	29
4.2.3	ANÁLISE BIOINFORMÁTICA	29
4.3	TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i>	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
6	CONCLUSÕES	38
7	REFERÊNCIAS	39

## 1 INTRODUÇÃO

Durante a última década, as infecções fúngicas afetam mais de um bilhão de pessoas anualmente, com taxas de mortalidade semelhantes à tuberculose e mais elevadas do que a malária (BONGOMIN *et al.*, 2017). Dentre estas infecções, a candidemia tem ocupado lugar de destaque, principalmente em pacientes gravemente doentes, como aqueles convivendo com vírus da imunodeficiência adquirida (*Human Immunodeficiency Virus* - HIV), transplantados, cardiopatas, portadores de neoplasias malignas e ainda aqueles expostos a dispositivos médicos-invasivos (AUZINGER *et al.*, 2015). Com mais de 400.000 casos anuais em todo o mundo, incidência de 0,24 a 34,3 pacientes a cada 1.000 internações em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), e mortalidade que se aproxima a 40%, as infecções da corrente sanguínea por *Candida* sp. constituem a terceira causa mais frequente de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) em todo o mundo (BASSETTI *et al.*, 2017).

Devido ao fato do gênero *Candida* estar presente na microbiota do hospedeiro humano e à presença de várias formas morfológicas, torna-se difícil interpretar as infecções fúngicas com base nos sintomas clínicos, uma vez que são inespecíficos, contribuindo assim, para as altas taxas de morbimortalidade da candidemia (TSCHERNER *et al.*, 2019). Portanto, a correta e precoce identificação dos agentes etiológicos da candidemia é de extrema relevância, tanto para melhor prognóstico e direcionamento terapêutico dos pacientes, quanto para fins de vigilância epidemiológica, reduzindo o tempo de internamento hospitalar e, conseqüentemente, o custo financeiro para o Estado (RODRIGUES *et al.*, 2015).

A técnica padrão-ouro para diagnóstico laboratorial da candidemia é a hemocultura, através do isolamento do agente etiológico. No entanto, a sensibilidade deste exame é baixa, cerca de 50% a 60% e a positividade varia de 21% a 71% (CLANCY *et al.*, 2013). Portanto, há uma necessidade urgente da associação de técnicas moleculares de identificação para um diagnóstico mais confiável e rápido da candidemia, particularmente em pacientes imunocomprometidos, visto que, por meio da macro-micromorfologia da colônia só se é possível definir o gênero (PATHAKUMARI *et al.*, 2020). Assim como realizado aqui, outros autores apontam que a utilização do *Deoxyribonucleic Acid* (DNA) como ferramenta de diagnóstico e identificação pode ter uma perspectiva valiosa e superior aos obtidos pelos métodos

convencionais mais utilizados nos laboratórios, representados pelo exame microscópico do material biológico e isolamento do agente etiológico em cultura. Como principais fatores limitantes dos métodos tradicionais de identificação, podem ser citados a complexa diversidade morfofisiológica dos agentes etiológicos, morosidade inerente ao método utilizado para isolamento e identificação das leveduras. Estas características podem representar fortes impactos na conduta terapêutica e prognóstico da candidíase invasiva (BEYDA *et al.*, 2013; HAMULA *et al.*, 2016; KULLBERG e ARENDRUP, 2015).

Adicionalmente, a descoberta de novos medicamentos a fim de acelerar o desenvolvimento de uma nova geração de antifúngicos ainda mais efetivos ou capazes de restabelecer a susceptibilidade às drogas antifúngicas, é altamente desejada. Segundo Liu *et al.* (2018), a resistência desenvolvida por esses microrganismos está associada ao uso indiscriminado de medicamentos antifúngicos disponíveis, o que tem limitado a eficiência e eficácia destes. Assim, identificar tendências epidemiológicas associadas ao surgimento de resistência aos fármacos antifúngicos reflete diretamente na melhor sobrevida dos pacientes com candidíase sistêmica e, desse modo, no menor índice de mortalidade (LEITE-ANDRADE *et al.*, 2017).

Portanto, com a finalidade de melhorar o arsenal terapêutico, alguns estudos prévios têm sido elaborados com compostos tiofênicos, que são moléculas com um grupo heterocíclico aromático que é estruturalmente importante em vários novos compostos farmacêuticos e químicos (MEOTTI *et al.*, 2003). E que podem demonstrar grande contribuição na pesquisa para prevenção e tratamento de doenças, além de possuir um rico espectro de atividades biológicas (SINGH *et al.*, 2020), podendo ser elas: antimicrobiana, antifúngica e antibacteriana (SILVA-JÚNIOR *et al.*, 2016; MABKHOT *et al.*, 2017; ZAČÍČ *et al.*, 2016), além de atividades anticancerígenas e anti inflamatórias (MABKHOT *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2017; DE OLIVEIRA *et al.*, 2015). Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar taxonomicamente isolados clínicos através de uma abordagem molecular e estabelecer o perfil de susceptibilidade antifúngica com antifúngicos disponíveis no mercado e novos compostos bioativos de *Candida*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Gênero *Candida*

Por serem comuns no meio ambiente, os fungos podem estar associados aos animais e humanos como comensais, mas também podem se tornar patogênicos ou oportunistas após alteração do sistema imunológico do hospedeiro (PIQUERAS, 2003). Arelado a isso, dos aproximadamente 1,5 a 5,1 milhões de espécies de fungos presentes na Terra, apenas cerca de 400 causam doenças em humanos (KÖHLER *et al.*, 2015). Tais fungos são chamados de fungos patogênicos, e são responsáveis por aproximadamente um bilhão de infecções e mais de 1,6 milhões de mortes anualmente no mundo, com destaque para as infecções causadas por *Candida* spp.

As leveduras pertencentes ao gênero *Candida* apresentam-se como comensais no hospedeiro humano, no entanto, alterações no sistema imunológico podem provocar um desequilíbrio na microbiota e desencadear infecções sistêmicas graves em pacientes críticos (ALNUAIMI *et al.*, 2015; NETEA *et al.*, 2015). Tais números em questão podem ser justificados pelo aumento da população imunocomprometida e pelo uso de drogas antifúngicas, que acarretaram um aumento vertiginoso no número de infecções, apresentando assim uma séria ameaça à saúde global (DE OLIVEIRA *et al.*, 2018; ROKAS, 2022; WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2020).

#### 2.1.1 *Candida albicans*

Tratando da espécie mais comum do gênero *Candida*, *C. albicans* é uma levedura diplóide, sapróbia, comensal natural da microbiota humana e animal, presente na cavidade oral, trato gastrointestinal, geniturinária, entre outras. Essa espécie de fungo pode se disseminar na corrente sanguínea e colonizar órgãos internos, resultando em infecções sistêmicas com risco de vida, classificando-se como um dos principais agentes de todas as infecções da corrente sanguínea (BROWN *et al.*, 2012; KHAN *et al.*, 2021; PFALLER *et al.*, 2019).

Esses microrganismos possuem uma capacidade adaptativa considerável com relação aos extremos fisiológicos dentro do hospedeiro humano, como aderência às

diferentes membranas epiteliais oriundas de vários locais anatomicamente distintos e formação de biofilme, dimorfismo na invasão de tecidos, termotolerância, evasão do sistema imune, robusta produção de exoenzimas hidrolíticas, entre outras. Diversos elementos de virulência desempenham um papel crucial na patogênese de *C. albicans*, o que confere a essa espécie uma notável resistência terapêutica, tornando-a um agente infeccioso de difícil tratamento (CALDERONE e FONZI, 2001; MISHRA, ALI e SHUKLA, 2021).

### **2.1.2 *Candida tropicalis***

*Candida tropicalis* é uma levedura de configuração diploide, tipicamente envolvida em reprodução assexuada e caracterizada por sua natureza polimórfica. Esta espécie exibe uma diversidade de formas, abrangendo desde células em processo de brotamento até pseudomicélios contendo conídios individuais. Em raros cenários, até mesmo hifas verdadeiras podem ser observadas, assemelhando-se ao padrão observado nas espécies de *C. albicans* (SUZUKI *et al.*, 1991; KUMAR, SHARMA e PRASAD, 2021). Dentro da microbiota humana, *C. tropicalis* ocupa um lugar, sendo comumente encontrado na pele, bem como nos sistemas gastrointestinal, geniturinário e respiratório (ZUZA-ALVES *et al.*, 2017).

Atualmente, *C. tropicalis* é uma das espécies de *Candida* não-*C. albicans* mais relevantes (CAVALHEIRO e TEIXEIRA, 2018). É classificada como a segunda ou terceira espécie do gênero *Candida* mais comumente isolada, e sendo a causa etiológica mais comum como agente de candidemia na América Latina, inclusive no Brasil com uma taxa de 22,7% (BERGAMASCO *et al.*, 2013; COLOMBO *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2021). Esta espécie tem-se mostrado como um patógeno hospitalar, sobretudo, sendo prevalente em pacientes com cateterismo prolongado e tratamento com antibióticos de amplo espectro (SILVA *et al.*, 2012).

Da mesma forma que *C. albicans* apresenta mecanismos robustos de resistência e virulência, *C. tropicalis* também possui estratégias igualmente eficazes, isso inclui a capacidade de desenvolver biofilmes, a presença de adesinas, variação em sua forma, o polimorfismo, a produção de exoenzimas e diversas outras táticas (ZUZA-ALVES *et al.*, 2017).

### **2.1.3 *Candida parapsilosis***

As células de levedura de *C. parapsilosis* exibem uma forma oval, redonda ou cilíndrica. Diferentemente de *C. albicans*, esta espécie não forma hifas verdadeiras, apenas apresentando-se como levedura ou em pseudohifas (LAFHEY *et al.*, 2005; TROFA *et al.*, 2008). Esta levedura tem sucesso ao colonizar a pele humana e às membranas mucosas como um microrganismo comensal (BONASSOLI *et al.*, 2005), podendo representar um alto risco para indivíduos imunocomprometidos, como portadores de HIV e pacientes cirúrgicos, particularmente aqueles submetidos a cirurgia do trato gastrointestinal.

Além disso, os pacientes que necessitam de uso prolongado de cateter venoso central ou outros dispositivos permanentes correm alto risco, devido à capacidade inata de *C. parapsilosis* de aderir às superfícies protéticas e dispositivos médicos implantados. Em casos como esse, a formação de biofilme normalmente começa logo após a fixação. Quando a estrutura está madura, diminui bastante a capacidade dos antifúngicos de atingir as células, podendo ter consequências potencialmente fatais para o hospedeiro (NEMETH *et al.*, 2013; CUELLAR-CRUZ *et al.*, 2012).

Com relação a distribuição de *C. parapsilosis*, vários estudos realizados em diferentes áreas geográficas mostram que a sua dominância difere de acordo com a região. Podendo ser a terceira ou segunda espécie mais comum de *Candida* em países da América Latina, como Argentina, Peru e Brasil (GUINEA, 2014).

#### **2.1.4 *Candida Krusei***

*C. krusei* é uma espécie dimórfica que existe como levedura ascomicetosa unicelular ou em forma de pseudohifas, sua reprodução é assexuada por brotamento, em geral habitam a mucosa de indivíduos saudáveis. No entanto, esta levedura pode causar infecções com risco de vida em pacientes imunocomprometidos. Em termos de epidemiologia, a *C. krusei* é considerada menos comum em comparação com outras espécies de *Candida* (SAMARANAYAKE; SAMARANAYAKE, 1994; YADAV *et al.*, 2012; JAMIU *et al.*, 2021).

Os fatores de virulência de *C. krusei* são iguais aos de *C. albicans*, e a transição dimórfica de *C. krusei* é um de seus traços de virulência mais destacáveis. Ao contrário da forma de levedura, as pseudohifas são invasivas, conferindo-lhe a capacidade de invadir os tecidos do hospedeiro. No entanto, estudos mostraram que hifas de *C.*

*albicans* colonizam os tecidos e também penetram nos tecidos profundos de forma mais eficaz do que as pseudohifas de *C. krusei* (SAMARANAYAKE *et al.*, 1998; DORKO *et al.*, 2001).

## 2.2 Candidemia

A Candidemia é uma infecção da corrente sanguínea causada por *Candida* spp. É a quarta infecção da corrente sanguínea associada aos cuidados de saúde mais frequente e a infecção fúngica grave mais frequente que se desenvolve em pacientes imunocomprometidos em unidades de terapia intensiva (CUERVO *et al.*, 2019; BOUZA e MUÑOZ, 2008; MARCHETTI *et al.*, 2004).

*Candida* spp. anualmente, são responsáveis por mais de 400 mil casos de infecções nosocomiais (Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde - IRAS), apresentando uma taxa de incidência de 0,24 a 34,3 pacientes a cada mil admissões em UTI (BASSETTI *et al.*, 2019; CORTEGIANI *et al.*, 2018). Além de apresentarem uma taxa de mortalidade de 30,2% em estudos de revisão sistêmica (ZHANG *et al.*, 2020). No Brasil, essa taxa de mortalidade chega a ultrapassar 50% (CANASSA e CRUZ, 2019).

Sua incidência aumentou significativamente nos últimos anos, estando associada a internações prolongadas, aumentando assim os custos hospitalares, além de ser responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade entre pacientes críticos. Chegando a ser responsável por 80% das infecções hospitalares de todas as infecções fúngicas (GIOLO e SVIDZINSKI, 2010; PAPPAS *et al.*, 2009; OSTROSKY-ZEICHNER e PAPPAS, 2006). A taxa de mortalidade geral da candidemia é de 22–75%. A prevalência de candidemia difere em várias regiões geográficas, com 0,32/1.000 admissões no sudeste da China e até 2,49/1.000 admissões no Brasil (LIU *et al.*, 2021).

Os principais fatores de risco associados a candidemia são o uso de antibióticos de amplo espectro, internações prolongadas, neutropenia, nutrição parenteral, cateter vesical, cateter venoso central, ventilação mecânica e colonização de múltiplos sítios anatômicos por leveduras (FRANÇA *et al.*, 2008).

### 2.3 Identificação de espécies de *Candida*

Atualmente, existem vários métodos para a identificação de leveduras em amostras clínicas. Esses incluem métodos tradicionais, por exemplo, teste de tubo germinativo, estudos de morfologia; métodos rápidos, por exemplo, testes enzimáticos e fluorogênicos; métodos comercialmente disponíveis; sistemas automatizados; e técnicas moleculares recentemente desenvolvidas (CARDENES *et al.*, 2004).

Os métodos convencionais para identificação de espécies de *Candida* são baseados em atributos morfológicos e fisiológicos. A identificação completa por métodos convencionais, além de não possuírem um grau de sensibilidade e especificidade que garanta um diagnóstico confiável e precoce se tratando de infecções invasivas por *Candida*, podem levar de 24 a 48 horas ou até mais na hemocultura, se tornando um processo complexo e demorado, levando a atrasos no tratamento adequado, podendo resultar em aumento da mortalidade (ELLEPOLA e MORRISON, 2005; CLANCY e NGUYEN, 2018; TAIRA *et al.*, 2014; WHITE *et al.*, 2003).

Sendo assim, a baixa sensibilidade dos métodos “padrão ouro” levou ao desenvolvimento de técnicas laboratoriais não culturais e não histopatológicas para o diagnóstico de candidíase invasiva (CLANCY e NGUYEN, 2018). Nesse contexto, com a necessidade de sistemas de identificação mais sensíveis e direcionados, o avanço das técnicas moleculares vem se destacando por apresentarem mais especificidade, com menor tempo de resposta e mais sensibilidade na identificação de espécies de *Candida* (KIDD *et al.*, 2020; PERLIN e WIEDERHOLD, 2017; NEPPELENBROEK, 2006).

Dentre elas, a tecnologia de base molecular, por meio de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), teve o maior impacto no diagnóstico clínico de infecções por *Candida*. Esta técnica possibilita detectar quantidades altamente limitadas de ácido nucleico microbiano a partir de sangue, amostras de tecidos, bem como microrganismos cultivados (CARVALHO *et al.*, 2007). A PCR fornece a identificação de *Candida* sp., entre duas à quatro horas e a possibilidade de monitorar a infecção indicando persistência ou resolução, demonstrando alta especificidade e sensibilidade em um ensaio (92% e 95%, respectivamente) (NIETO *et al.*, 2019). Sendo assim, essa técnica

pode possibilitar um diagnóstico e identificação precoce, acarretando em um melhor tratamento e consequente melhora do paciente (BARANTSEVICH e BARANTSEVICH, 2022).

## 2.4 Tratamentos e dificuldades associadas

O manejo de infecções sistêmicas causadas pelo grupo de microrganismos *Candida* depende tanto da identificação da espécie envolvida quanto da avaliação de quais antifúngicos seriam eficazes contra ela. As opções terapêuticas convencionais para tratar essas infecções apresentam um leque restrito de agentes antifúngicos à disposição (LEE *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2018). De modo geral, a criação de novos medicamentos antifúngicos tem enfrentado uma progressão lenta, principalmente devido à complexidade das células fúngicas.

Enfrentar os desafios relacionados à capacidade do composto penetrar nas paredes e membranas celulares dos fungos, juntamente com a limitada disposição da indústria farmacêutica para investir em pesquisas para desenvolver novos antifúngicos, também tem contribuído para essa lentidão (PERLIN *et al.*, 2017; ROEMER e KRYSAN, 2014).

Outra dificuldade associada é o surgimento de resistência entre espécies de *Candida*, que tem sido intimamente ligada à utilização generalizada e não direcionada de medicamentos antifúngicos disponíveis. Esta tendência predominante de uso indiscriminado reduziu significativamente a eficácia e eficiência global destes agentes terapêuticos. Como consequência desta prática prevalente, estes microrganismos desenvolveram progressivamente uma susceptibilidade reduzida aos outrora potentes tratamentos antifúngicos. Esta intrincada interação entre a utilização excessiva de medicamentos antifúngicos e a subsequente evolução da resistência levou a um momento crítico no domínio do tratamento médico (LIU *et al.*, 2018; DA SILVA *et al.*, 2023; LEE *et al.*, 2021; KAUR e NOBILE, 2023).

A capacidade de resposta diminuída destes microrganismos às intervenções antifúngicas convencionais sublinha a necessidade premente de abordagens mais criteriosas e personalizadas para a administração de medicamentos. Enfrentar este desafio exige uma reavaliação abrangente das práticas de prescrição, um foco na otimização dos regimes de tratamento e um esforço de investigação concertado para

desenvolver estratégias antifúngicas inovadoras. O não cumprimento destes imperativos poderá inaugurar uma nova era em que as infecções fúngicas recuperarão uma posição formidável, comprometendo potencialmente os ganhos terapêuticos alcançados ao longo dos anos (LEITE-ANDRADE *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2021).

## **2.5 Fármacos convencionais**

Ao contrário da ampla gama de categorias dos fármacos antibióticos disponíveis para combater patógenos bacterianos, somente três categorias principais de medicamentos antifúngicos são utilizadas no tratamento de infecções fúngicas invasivas: azóis, equinocandinas e polienos (KAUR e NOBILE, 2023).

### **2.5.1 Azóis: Fluconazol e Voriconazol**

Desde sua introdução na década de 1980, os azólicos têm sido amplamente utilizados na prática clínica como a categoria de medicamentos mais frequente. Esses compostos heterocíclicos sintéticos possuem propriedades antifúngicas ao interromper a síntese de ergosterol, um componente crucial na estrutura da membrana celular dos fungos. Esse mecanismo resulta em distúrbios na estabilidade, permeabilidade e funcionamento das enzimas associadas à membrana (PERFECT, 2017; ROBBINS *et al.*, 2016).

Azóis é a classe mais prescrita de medicamentos antifúngicos usados para tratar infecções fúngicas sistêmicas e superficiais. Porém, de todos os compostos azólicos disponíveis, o mais prescrito é o fluconazol por ser um dos antifúngicos de primeira linha no tratamento de candidemia, estando na lista de medicamentos essenciais aprovados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (KNEALE *et al.*, 2016; BERKOW e LOCKHART, 2017), devido à sua notável segurança, inclusive em pacientes debilitados e com disfunção renal, estabilidade comprovada em diferentes formulações comerciais, capacidade de penetrar bem nos tecidos, absorção oral consistente, ausência de interações medicamentosas significativas e custo acessível de terapia (CHARLIER, 2006; ENOCH *et al.*, 2017).

Porém, ainda assim possuem limitações em sua utilização, principalmente pelo seu caráter fungistático (VICENTE *et al.*, 2003), e pelo seu uso prolongado poder estar associado à hepatotoxicidade e efeitos relacionados aos hormônios, incluindo ginecomastia, alopecia, diminuição da libido, oligospermia, azoospermia, impotência,

hipocalcemia e insuficiência adrenal (BENITEZ e CARVER, 2019; ROEMER e KRYSAN, 2014). Uma outra problemática em ascensão envolve a emergência de resistência intrínseca e desenvolvida em relação ao fluconazol. Isso tem sido observado em várias espécies de *Candida*, e até mesmo o surgimento de cepas multirresistentes, exemplificado pelo caso da *Candida auris*. (LOCKHART *et al.*, 2017).

### **2.5.2 Equinocandinas: Anidulafungina, Micafungina e Caspofungina**

Pertencem a nova classe de medicamentos antifúngicos normalmente usados para tratar infecções fúngicas recalcitrantes. Tem como representantes caspofungina, micafungina e anidulafungina, sendo que, seu mecanismo de ação se deve à inibição da enzima UDP-glucose  $\beta$ -(1,3)-D-glucano- $\beta$  (3)-D-glicosiltransferase (ou 1,3- $\beta$ -D-glucano sintase), que é responsável pela síntese de 1,3- $\beta$ -D-glucano (BG).

O 1,3- $\beta$ -D-glucano (BG) é um polissacarídeo específico presente em grandes concentrações na parede celular de fungos que incluem as espécies *Candida*, sendo responsável pela rigidez da parede celular (LIPKE e OVALLE, 1998; ARENDRUP e PERLIN, 2014). Porém, como desvantagem seu uso clínico é restrito, devido à sua baixa absorção oral, está disponível apenas em formulações endovenosas e o seu espectro de ação ser restrito entre algumas espécies de *Candida* e *Aspergillus* (DENNING, 2003; LETSCHER-BRU, 2003).

### **2.5.3 Polienos: Anfotericina B**

Polienos são a classe mais antiga de medicamentos antifúngicos usados para tratar infecções fúngicas sistêmicas graves (ROBBINS *et al.*, 2016). Tendo como representante a anfotericina B e formulações lipídicas, tem como principal modo de ação a criação de poros na membrana citoplasmática do fungo. Isso ocorre através de interações hidrofóbicas com os esteróis fúngicos, com predileção pelo ergosterol. Essa ação promove a morte celular ao causar a liberação de componentes citoplasmáticos por vazamento (CATALÁN e MONTEJO, 2006; HAMILL, 2020).

Apesar de exibir uma vasta gama de ação, o emprego desses medicamentos carrega principalmente preocupações relacionadas aos rins, afetando as células tubulares e comprometendo a função renal em pacientes submetidos ao tratamento (BATES *et al.*, 2001; LUBER *et al.*, 1999; OSTROSKY-ZEICHNER *et al.*, 2010).

## 2.6 Teste de susceptibilidade antifúngica

A determinação da sensibilidade antifúngica de uma cepa de *Candida* por meio de testes é essencial para orientar a seleção do agente antimicrobiano e, assim, guiar o tratamento de casos de candidíase invasiva. Duas importantes entidades emitem periodicamente diretrizes para a realização desses testes de sensibilidade a antifúngicos. A exemplo do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e o *European Union Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) proeminentes instituições que fornecem orientações atualizadas nesse sentido (CLSI, 2020; EUCAST, 2020).

A execução dos procedimentos de acordo com as diretrizes do CLSI ou do EUCAST demanda profissionais altamente qualificados. Geralmente, tais análises são conduzidas em laboratórios de referência, o que pode resultar em demoras na obtenção dos resultados pelos pacientes. Esse aspecto é de crucial importância para assegurar a seleção precisa da terapia e a interpretação dos desfechos (ALTINBAŞ *et al.*, 2020; CILO e ENER, 2021).

## 2.7 Novas abordagens antifúngicas através de derivados tiofênicos

Tendo em vista a necessidade pela busca por potenciais moléculas para a criação de novos antifúngicos, além das restrições no alcance das ações dos antifúngicos disponíveis no mercado, assim como às suas restrições de uso, impactos adversos e o crescente desenvolvimento de resistência por parte dos patógenos, emerge a imperatividade de procurar e identificar novos fármacos que possuam a mesma segurança e eficácia, ou possivelmente superiores, quando comparados aos tratamentos já validados (ZIDA *et al.*, 2017).

Dessa forma, pode se observar que a ampliação do arsenal terapêutico pode ser aprimorada por meio de estudos anteriores que se debruçaram sobre compostos tiofênicos. Estes compostos possuem um grupo heterocíclico aromático, cuja relevância estrutural reverbera em diversas formulações farmacêuticas e produtos químicos inovadores (MEOTTI *et al.*, 2003).

Posteriormente, elucidou-se a presença desta estrutura em diversos produtos naturais e compostos ativos que possuem um grande escopo para atuar como agentes, ou como potenciais compostos para desenvolvimento de novos agentes, por

possuírem desempenharem atividades antimicrobiana, antifúngica e antibacteriana, além de outras diversas atividades (SILVA-JÚNIOR *et al.*, 2016; MABKHOT *et al.*, 2017; AJDAČIĆ *et al.*, 2016). Isto é especialmente relevante considerando que moléculas contendo a estrutura de 2-amino-tiofeno têm a potencialidade de servir como precursoras cruciais para a concepção e criação de novos compostos farmacológicos voltados ao combate antifúngico (FORETO *et al.*, 2011).

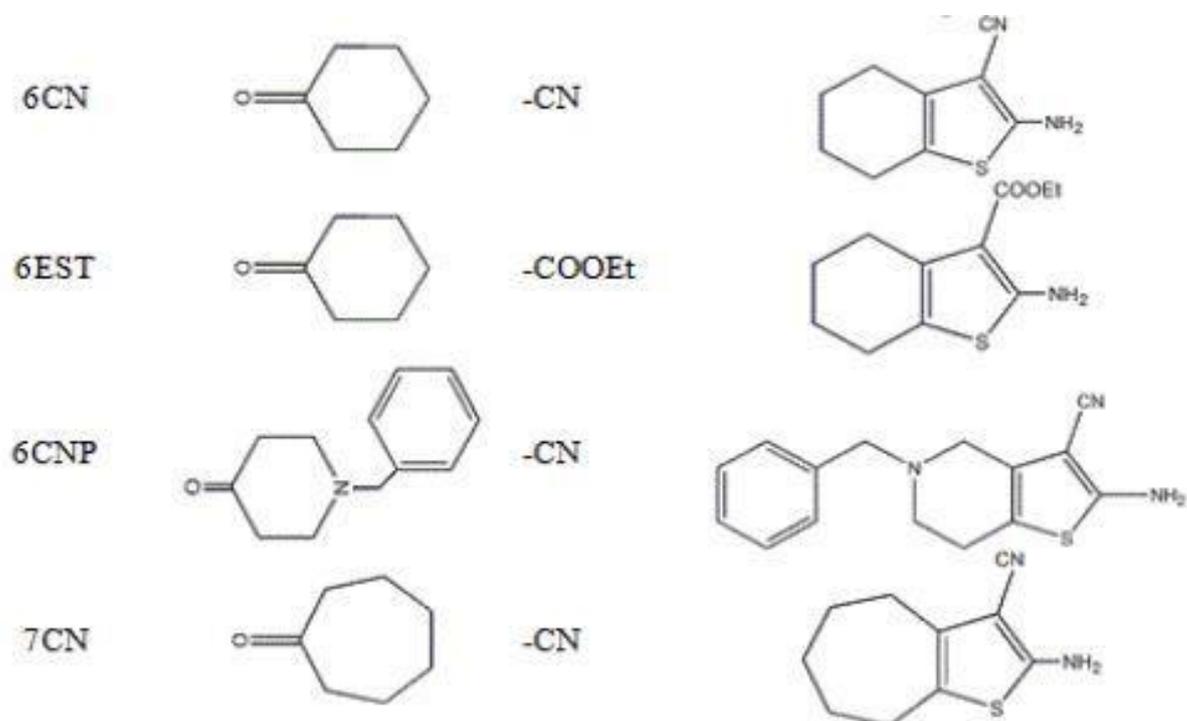
Os tiofenos referem-se a um domínio de compostos heterocíclicos contendo um anel de cinco membros com enxofre como heteroátomo com a fórmula  $C_4H_4S$  (Figura 1), que podem ser encontrados no petróleo ou no carvão (MANCUSO *et al.*, 2014). Dentre os derivados tiofênicos, destacam-se os compostos 2-amino-tiofeno que tem sido bastante relatado nos estudos de investigação de novas drogas. Além disso, compostos sintetizados a partir de 2-amino-tiofeno podem ser importantes intermediários da síntese de compostos farmacologicamente ativos (CALLIGARO *et al.*, 1997).

Foram utilizados quatro derivados tiofênicos, obtidos da parceria com o grupo de pesquisa de Farmacologia, Fisiologia e Química Medicinal da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) Figura (2). Os derivados: 2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (6CN), 2-amino-5,6,7,8-tetraidro-4H-ciclohepta[b]tiofeno-3-carbonitrila (7CN), 2-amino-5-benzil-4,5,6,7-tetrahidro-tieno[3,2-c]piridina-3-carbonitrila (6CNP), e um último composto denominado éster etílico do ácido 2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofeno-3-carboxílico (6EST).

**Figura 1** – Estrutura química do anel de cinco membros com enxofre como heteroátomo de derivados tiofênicos.



**Fonte:** Sigma-Aldrich (2016).

**Figura 2** – Estrutura química dos compostos tiofênicos.

Fonte: Sigma-Aldrich (2016).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar taxonomicamente isolados clínicos de *Candida* spp. por meio de uma abordagem molecular e estabelecer o perfil de susceptibilidade antifúngica com fármacos disponíveis no mercado e novos compostos bioativos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a frequência de espécies de *Candida* identificadas por abordagem molecular;
- Validar o uso de primers espécies-específicos na identificação de *Candida* spp;
- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro*, e definir a Concentração Inibitória Mínima (CIM).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS

As leveduras do gênero *Candida* foram obtidas de forma aleatória do acervo do grupo de pesquisa “Fungos de Interesse Médico e Leveduras de Interesse Biotecnológico” do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE.

### 4.2 IDENTIFICAÇÃO GENÔMICA (SANTIWONGKARN *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2000)

#### 4.2.1 OBTENÇÃO DE BIOMASSA E EXTRAÇÃO DO DNA

Para análise molecular, se obteve massa celular das culturas crescidas em meio Sabouraud Dextrose Agar e incubadas a 37°C por 24h (FREDRICKS *et al.*, 2005). Após esse período, a massa celular foi transferida para tubos de tampa rosqueável, contendo matriz de pérolas de vidro e 500µL do tampão de extração (CTAB 2%, NaCl 1.5 M, 100mM de Tris-HCl, 20mM de EDTA e polivinilpirrolidona 1%), e as células congeladas a -20°C.

As células foram rompidas por agitação (5.5 m/s por 60s) em FastPrep® (BIO 101, Farmingdale, New York, USA) e foram incubadas a 65 °C por 10min. Logo após, foram adicionadas a cada tubo 500 µL de Clorofórmio álcool-isoamílico (24:1) e o material centrifugado a 13000g por 10min. O sobrenadante foi transferido para tubos limpos, sendo então adicionada a mesma proporção de isopropanol e 20µL de acetato de sódio (0,3 M, pH 6).

Em seguida, a amostra foi centrifugada (13000g por 10min), sendo o pellet de DNA lavado com etanol 70% e seco por 10 min a 30°C. No final deste processo, o DNA foi ressuspendido em 50µl de água ultrapura e mantido a 4°C até o momento das análises. Alguns *primers* foram utilizados no estudo, sendo eles espécie-específico para *Candida albicans* (CA, 5'- TCAACTTGTCACAGATTATT3'), *C. tropicalis*, (CT, 5'-AAGAATTTAACGTGGAAACTTA-3'), *C. krusei* (CK, 5'-GATTTAGTACTACTGCGTC A-3'), *C. glabrata* (CGLA, 5'-CAC GAC TCG ACA CTT TCT AAT T-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3') como *primer* reverso.

Além destes, foram utilizados *primers* para as espécies do complexo *Candida parapsilosis*, como: *C. parapsilosis* (CPAF, 5'-TTTGCTTTGGTAGGCCTTCTA-3'; CPAR, 5'- GAGGTCTGAATTTGGAAGAAGT-3'), *C. orthopsilosis* (CORF, 5'-TTTGGTGGCCCACGGCCT-3'; CORR, 5'-TGAGGTCTGAATTTGGAAGAATT-3') e *C. metapsilosis* (CMEF, 5'-TTTGGTGGGCCCACGGCT3'; CMER (5'-GAGGTCTGAATTTGGAAGAATGT-3') (ASADZADEH *et al.*, 2009; WHITE *et al.*, 1990).

Para os isolados de levedura aos quais não foi possível obter um *primer* espécie-específico foi adotado o sequenciamento parcial do domínio D1/D2 da região LSU (28S) do rDNA utilizando os *primers* NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG - 3') e NL4 (5' – GGTCCGTGTTTCAAGACGG - 3') (KURTZMAN; ROBNETT, 1998).

#### 4.2.2 CONDIÇÕES DA PCR

Com relação às condições da PCR, todas as reações foram realizadas em volumes finais de 12,5 µL contendo 7,45µL de ddH<sub>2</sub>O, 1µL de cada *primer* (5 pmol), 1,25 µL do tampão da PCR, 0,5 µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0.25 µL de dNTP (10mM), 0.05 µL de Taq DNA *polymerase* 5U (Invitrogen, Brasil) e 1µL de DNA molde. Os parâmetros utilizados nas reações de PCR consistiram na desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, realizada em 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, 11 anelamento a 57 °C por 30s, extensão a 72 °C por 30s e extensão final a 72 °C por 10 min.

Ao fim do processo, as amostras foram montadas (5µL do produto da PCR, 2µL GLB e 2 µL GelRed) em parafilme e submetidas a eletroforese (100v por 20min) em gel de agarose a 1%, para avaliação dos produtos da PCR. Para as cepas que seguiram para o sequenciamento, os produtos da PCR foram purificados com o uso do kit GenJET PCR Purification (Fermentas, UK) e sequenciadas na Plataforma de sequenciamento-LABCEN/CB (UFPE) segundo protocolos padronizados.

#### 4.2.3 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA

Para as cepas submetidas a sequenciamento, realizou-se uma análise bioinformática, onde as sequências consenso foram obtidas por meio do programa Sequencher 4.7. Sequências de nucleotídeos foram submetidas a ferramenta BLAST do GenBank (*National Center of Biotechnology Information*,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para busca por similaridade. As novas sequências foram alinhadas com as sequências de confiança depositadas no banco de dados e analisadas filogeneticamente com o auxílio do programa MEGA7.

### **4.3 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA *in vitro***

O método utilizado seguiu as instruções descritas nos documentos M27-A4 e M60 (CLSI 2008, CLSI 2017). O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA), esterilizado em membranas de 0,22µm (Millipore, Darmstadt, Alemanha), suplementado com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, pH 7,0 ± 0,1, com Ácido Morfolino Propano Sulfônico (MOPS; 0,165 mol.L<sup>-1</sup>; Sigma-Aldrich).

Os agentes antifúngicos utilizados foram o fluconazol (Pfizer) preparado em água deionizada, o voriconazol (Sigma-Aldrich, EUA), a anfotericina B (Bristol-Myers Squibb), a caspofungina (Merck Sharp & amp; Dohme), micafungina (Astellas Pharma Tech CO) e anidulafungina (Pfizer) todos diluídos em Dimetil-sulfóxido (DMSO), além das novas formulações antifúngicas.

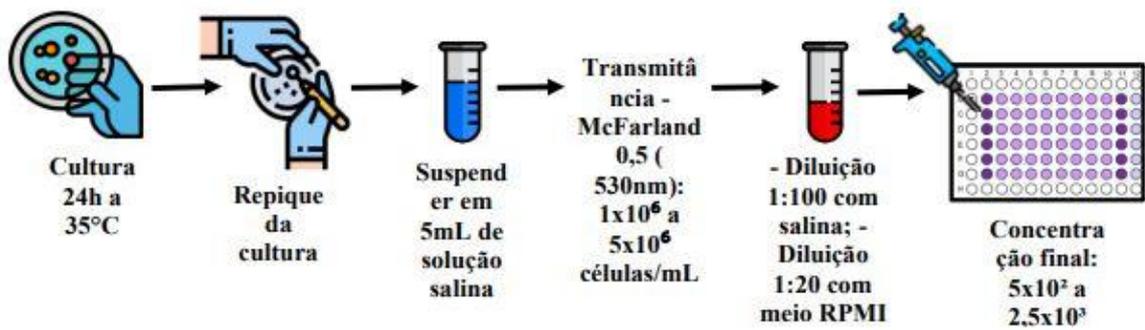
As concentrações de teste avaliadas para os diferentes agentes antifúngicos e compostos foram definidas da seguinte forma: Anfotericina B variando de 0,03 a 16 µg/ml, Fluconazol com faixa de concentração de 0,125 a 64 µg/ml, Voriconazol com concentrações testadas entre 0,125 e 64 µg/ml, Caspofungina abrangendo concentrações de 0,03 a 16 µg/ml, Micafungina com variação de concentração de 0,03 a 16 µg/ml, Anidulafungina também com concentrações entre 0,03 a 16 µg/ml, 6CNP com intervalo de concentração de 0,781 a 200 µg/ml, 7CN com faixa de concentração de 0,781 a 200 µg/ml, 6NP abrangendo concentrações de 0,781 a 200 µg/ml, e 6EST com concentrações testadas entre 0,781 a 200 µg/ml. Estes intervalos foram escolhidos com o objetivo de realizar uma avaliação abrangente da atividade dos agentes antifúngicos e compostos em questão.

As espécies de leveduras foram mantidas em meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) e incubadas a 35°C (Figura 3). 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 530 nm. O volume do inóculo foi ajustado para 5,0mL de solução salina esterilizada e, posteriormente, diluído em RPMI 1640 para uma concentração de 2-5x10<sup>3</sup> céls/ mL.

Para os testes de sensibilidade, foram utilizadas placas de microtitulação planas de 96 poços (Kasvi).

O inóculo foi adicionado aos poços com os antifúngicos e as placas foram incubadas a 35°C, durante 48h. As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) foram determinadas com inibição de 100% para anfotericina B e novas formulações, e 50% em relação ao poço controle para o fluconazol, voriconazol, caspofungina, micafungina e anidulafungina.

**Figura 3** - Preparação do inóculo de leveduras segundo a metodologia do CLSI.



Fonte: Queiroz (2023)

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Assim, por meio de análises moleculares foram identificados 14 isolados clínicos de *Candida*, pertencentes às espécies de *Candida albicans* (42,9%), *C. tropicalis* (35,7%), *C. parapsilosis* (14,3%) e *C. krusei* (7,1%) (Tabela 1).

**Tabela 1** – Identificação genômica dos isolados clínicos de *Candida* por meio da utilização de bases moleculares.

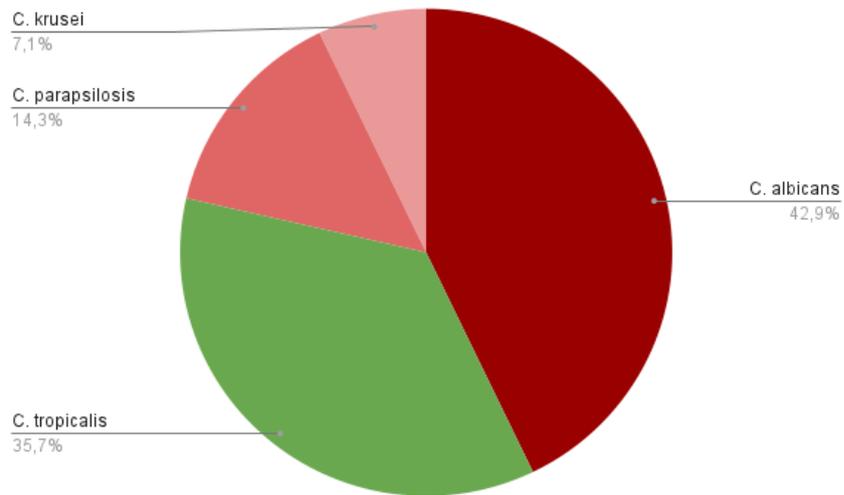
Isolado	Código GenBank	Cepa
1657	-----	<i>Candida albicans</i>
03	MW861538	<i>C. albicans</i>
07am	MW829732	<i>C. albicans</i>
1697	MW829734	<i>C. albicans</i>
02am	MW861537	<i>C. albicans</i>
1173	-----	<i>C. albicans</i>
01am	MW829738	<i>C. tropicalis</i>
416	MW829743	<i>C. tropicalis</i>
06t	MW829740	<i>C. tropicalis</i>
05	MW829734	<i>C. tropicalis</i>
50	MW829742	<i>C. tropicalis</i>
04am	MW829749	<i>C. parapsilosis</i>
6410	MW829748	<i>C. parapsilosis</i>
06k	MW829750	<i>C. krusei</i>

Fonte: O autor (2023).

A identificação genômica permitiu identificar todos os espécimes clínicos, e a partir dos resultados obtidos, pode-se observar em totalidade, uma maior predominância de espécies de *Candida* não-*C. albicans* (n=8) em detrimento de espécies de *C. albicans* (n=6) (Gráfico 2). Com uma distribuição de *C. albicans* (42,9%), *C. tropicalis* (35,7%), *C. parapsilosis* (14,3%), e *C. krusei* (7,1%) (Gráfico 1). Resultados estes, que se assemelham com o estudo de Rocha *et al*, (2020) que observou uma maior ocorrência de espécies de *Candida* não-*C. albicans*, onde observaram *C. tropicalis* (32,1%), seguido por *C. parapsilosis* (16%), *C. glabrata*, e *C.*

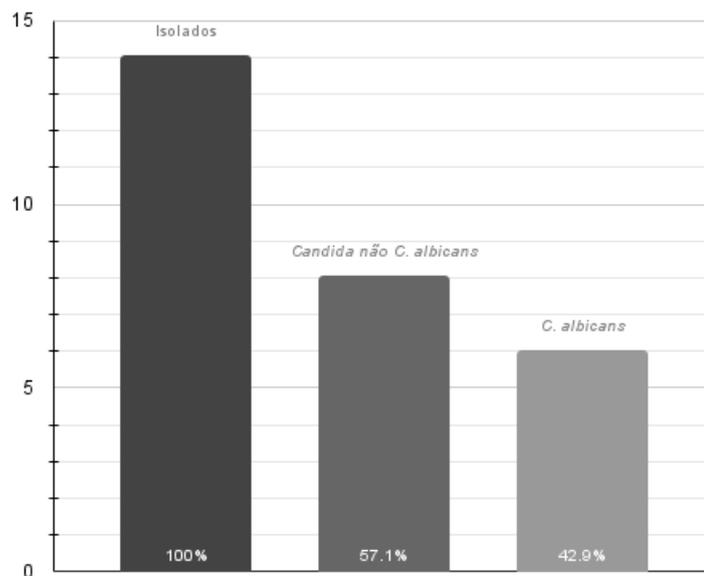
*norvegensis* (1,7%), representando uma parcela de incidência total maior que *C. albicans* (28,5%).

**Gráfico 1** – Distribuição de espécies do gênero *Candida*, após identificação genômica dos isolados clínicos.



**Fonte:** O autor (2023).

**Gráfico 2** – Ocorrência de espécies de *Candida* não-*C. albicans* e *Candida albicans* entre os isolados.



**Fonte:** O autor (2023).

Ainda assim, em um estudo realizado por Mariette *et al.* (2017), um grupo de pacientes de UTI diagnosticados com malignidade hematológica, apresentaram na sua totalidade, infecção fúngica sistêmica por *C. albicans* (46–56%). Ademais, como visto por Pappas *et al.* (2018), a espécie *C. albicans* ainda permanece sendo a mais comum, em caso de infecções sistêmicas, contudo, a prevalência dessa levedura pode variar de acordo com localização geográfica.

Portanto, considerando a variável geográfica, é importante destacar pesquisas que se assemelham com os resultados vistos na atual pesquisa, e que foram realizadas na mesma região. Conforme visto por Inácio *et al.* (2021), que ao realizar diagnósticos em 22 pacientes de candidemia elegíveis do Hospital das Clínicas-UFPE, Hospital Agamenon Magalhães e Hospital de Câncer de Pernambuco, detectou maior incidência de espécies de *Candida* não-*C. albicans*, onde observaram casos de *C. tropicalis* (50%), *C. parapsilosis* (19%), e de *C. albicans* (22.73%).

Dessa forma, pode ser dito que os resultados aqui obtidos são semelhantes a outros estudos que apontam para uma maior ocorrência total de espécies de *Candida* não-*C. albicans*, em paralelo a *C. albicans*, com destaque para *C. tropicalis*, sendo esta uma das espécies de *Candida* não-*C. albicans* mais relevantes (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018), a qual tem sido frequentemente detectada nos casos de candidemia na UTI (ROCHA *et al.*, 2020) uma vez que, seu isolamento na maioria das vezes, está atrelado aos quadros de neutropenia e em pacientes transplantados de medula óssea (ALVES *et al.*, 2014).

Em vista disso, o aparecimento de espécies de *Candida* não-*C. albicans* vem se destacando e gerando mudanças no perfil epidemiológico, onde *C. albicans* ainda permanece como o patógeno mais causador de óbitos nas infecções sistêmicas (KRASHIN *et al.*, 2015). Essa mudança na distribuição das espécies, pode estar relacionada com o potencial de virulência destes microrganismos, com destaque para a transição morfológica entre as formas de levedura e hifas, a expressão de adesinas, formação de biofilmes, troca fenotípica e secreção de enzimas hidrolíticas (PATHAKUMARI *et al.*, 2020).

Assim como, a resistência desenvolvida por estes microrganismos associada ao uso indiscriminado de medicamentos antifúngicos disponíveis (LIU *et al.*, 2018). Diante destes problemas, a busca por conhecimento e estudo de espécies

emergentes se faz de extrema importância para a saúde pública, devido a possíveis surtos de microrganismos com alta patogenicidade, e sua resistência aos fármacos disponíveis.

**Tabela 2** – Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antifúngicos anfotericina B (Anf), fluconazol (Flu), voriconazol (Vor), caspofungina (Cas), micafungina (Mic) e anidulafungina (Ani), além dos derivados tiofênicos (6CN; 7CN; 6NP e 6EST) frente aos isolados de *Candida* sp. Um mapa de cores foi utilizado para representar o perfil de suscetibilidade dos isolados, utilizando as cores verde (suscetível), amarelo (suscetível dose dependente) e vermelho (resistente).

Isolado	Cepa	Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL									
		Anf	Flu	Vor	Cas	Mic	Ani	6CNP	7CN	6NP	6EST
1173	<i>Candida albicans</i>	0,125	8	16	0,125	0,03	0,03	200	>200	25	6,25
03	<i>C. albicans</i>	0,25	4	16	0,125	0,03	0,03	cont.	cont.	cont.	cont.
07am	<i>C. albicans</i>	0,25	0,25	16	0,125	0,03	0,03	200	>200	50	50
1697	<i>C. albicans</i>	0,25	0,5	8	0,06	0,03	0,03	200	>200	25	12,5
02am	<i>C. albicans</i>	0,25	4	16	0,125	0,03	0,03	200	>200	50	25
1657	<i>C. albicans</i>	0,25	0,5	8	0,06	0,03	0,03	200	>200	25	12,5
01am	<i>C. tropicalis</i>	0,25	4	16	0,06	0,03	0,03	200	>200	50	100
06t	<i>C. tropicalis</i>	0,5	32	4	1	0,06	0,125	200	>200	50	200
50	<i>C. tropicalis</i>	0,5	0,5	16	0,06	0,06	0,06	200	>200	25	25
05	<i>C. tropicalis</i>	0,25	0,5	8	0,06	0,03	0,03	200	>200	50	25
416	<i>C. tropicalis</i>	0,25	64	16	0,03	0,06	0,03	200	>200	100	100
6410	<i>C. parapsilosis</i>	0,06	64	16	0,06	0,03	0,06	200	>200	50	12,5
04am	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	0,5	0,25	1	2	4	200	>200	25	12,5
06k	<i>C. krusei</i>	0,25	64	16	0,25	0,03	0,06	100	100	6,25	6,25

cont. = contaminação

**Fonte:** O autor (2023).

No que concerne ao perfil de susceptibilidade antifúngica dos isolados clínicos de *Candida*, foi observado através da concentração inibitória mínima que todas as cepas provenientes do estudo foram sensíveis a anfotericina B, micafungina e anidulafungina (Tabela 2).

Além disso, foi evidenciado o fenômeno de resistência em cinco isolados ao fluconazol, em 13 isolados ao voriconazol, e em um isolado a caspofungina. Com

relação aos intervalos de CIM's entre os antifúngicos convencionais utilizados que apresentaram resistência, foi observado que, o fluconazol apresentou um intervalo para resistência de 8 à 64µg/mL, e voriconazol de 4 à 64µg/mL.

Levando em consideração que esses valores foram determinados para inibir 50% em relação ao poço controle, pode se dizer que tais resultados evidenciam uma menor potência e uma possível menor eficácia dessas drogas no tratamento de leveduroses. Em contrapartida, os intervalos apresentados para anidulafungina, micafungina e caspofungina foram de 0,03 à 4µg/mL, 0,03 à 2µg/mL e 0,3 à 0,25µg/mL, respectivamente, o que sugere uma maior potência e uma possível maior eficácia dessas drogas no tratamento de leveduroses.

Com relação aos resultados da utilização dos compostos tiofênicos nos isolados clínicos, foi observado que, no composto denominado "6CN" foi observado valores no intervalo de 100 à 200µg/mL, "7CN" no intervalo de 100 à >200µg/mL o que pode sugerir uma possível menor potência desses compostos contra *Candida* sp.

Em contrapartida, os dados obtidos com os compostos tiofênicos "6NP" (6,25 à 100µg/mL) e "6EST" (6,25 à 100µg/mL) podem ser considerados promissores e podem representar um novo marco no cenário atual de tratamento das infecções fúngicas invasivas, por apresentar por parte dos isolados de *Candida* sp. baixas concentrações inibitórias mínimas.

Ao observar os resultados referentes aos fármacos mais utilizados na terapia antifúngica convencional, como o fluconazol e o voriconazol, pode se observar um cenário desfavorável ao surgimento de resistência intrínseca aos azóis, sobretudo ao fluconazol e voriconazol. Trabalhos recentes têm relatado padrões parecidos relacionados ao aumento da resistência a estes antifúngicos. A disseminação pelo globo de isolados resistentes e as poucas opções terapêuticas disponíveis tem influenciado negativamente o tratamento e prognósticos dos pacientes (SHARAFUTDINOV, *et al.*, 2020).

Além disso, atualmente, as diretrizes mais recentes no tratamento das infecções fúngicas tem se recomendado o fluconazol como a opção primária para terapia no combate dessas infecções em países subdesenvolvidos. Contudo, tem havido relatos crescentes no aumento da resistência inerente a este medicamento.

Outro fator preocupante diz respeito a grande variabilidade de resistência inter e intra espécie, bem como o surgimento de mecanismos desconhecidos de resistência ao fluconazol que podem representar uma ameaça global à saúde (BERKOW; LOCKHART, 2017).

Outro fato, é que muitos desses fármacos disponíveis apresentam baixa eficácia, alta toxicidade, desvantagens em relação ao seu espectro de atividade, baixa potência (geralmente fungistática) e propriedades farmacocinéticas inadequadas (SCOTTI *et al.*, 2012). Devido à esta problemática, se faz necessária a busca por novos compostos com propriedades promissoras para a produção de novos medicamentos a fim de acelerar o desenvolvimento de uma nova geração de antifúngicos mais efetivos.

E como observado nos resultados deste presente trabalho, alguns dos compostos tiofênicos apresentaram dados promissores com baixas concentrações frente a *Candida* sp. Em outros trabalhos como em Oliveira *et al.* (2022), onde foi observado que filmes à base de quitosana com o derivado composto tiofênico 2-amino-4,5,6,7-tetra-hidrobenzo[b]tiofeno-3-carbonitrila (6CN), apresentou em concentrações de 0,80 mg·ml<sup>-1</sup> e 1,28 mg·ml<sup>-1</sup>, atividade antifúngica contra *C. albicans*, *C. tropicalis*, e *C. parapsilosis*, enquanto aquele com a menor concentração do composto (0,48 mg·ml<sup>-1</sup>) obteve atividade apenas contra as duas primeiras espécies, demonstrando assim um padrão dependente da concentração do composto.

Ademais, segundo uma revisão realizada por Da França *et al.* (2015), estudos confirmam que pequenas alterações na estrutura do tiofeno causam grandes diferenças nos perfis biológicos e farmacológicos. Assim como visto por De Araújo *et al.* (2020), onde se notou que um derivado tiofeno-tiossemicarbazona, o composto 2-((5-nitrotiofeno-2-yl)metileno)-N-(piridina-3-yl) hidrazina carbotioamida (L10) em meio não suplementado com ácido ascórbico inibiu o crescimento de cepas de *C. albicans*, com valores de CIM variando entre 2,0 a 128,0 µg/mL. Por tais motivos, tais derivados tiofênicos podem ser considerados moléculas com potencial antifúngico.

## 6 CONCLUSÕES

O desenvolvimento das etapas executadas contribuiu para a obtenção de resultados relevantes à saúde. Dessa forma, este estudo ressalta a importância crescente da abordagem baseada em DNA como uma ferramenta altamente valiosa para a identificação de espécies, superando os métodos convencionais comumente empregados em configurações laboratoriais. Além disso, os resultados promissores apresentados pelos compostos tiofênicos indicam um potencial significativo para essas substâncias, visto que demonstraram atividade contra os isolados clínicos de *Candida* sp. em concentrações relativamente baixas.

Em um panorama mais amplo, esta pesquisa enfatiza a utilidade da análise molecular na identificação precisa das diferentes espécies de *Candida*, ressaltando a notável predominância das não-*C. albicans*. As descobertas das avaliações de susceptibilidade também proporcionam insights valiosos sobre as respostas antifúngicas, tanto para os agentes antifúngicos convencionais quanto para os compostos tiofênicos. Esses achados apontam para novos horizontes na busca por estratégias terapêuticas mais eficazes contra infecções fúngicas.

Portanto, esta pesquisa não apenas contribui para o entendimento mais profundo da diversidade das espécies de *Candida* e suas respostas a diferentes tratamentos, mas também abre portas para possíveis inovações na abordagem terapêutica, fornecendo informações valiosas para aprimorar a gestão e tratamento de infecções fúngicas de maneira mais eficaz e direcionada.

## 7 REFERÊNCIAS

- AJDAČIĆ, V. *et al.* Synthesis and evaluation of thiophene-based guanylhydrazones (iminoguanidines) efficient against panel of voriconazole-resistant fungal isolates. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 6, p. 1277–1291, mar. 2016.
- ALNUAIMI, A. D. *et al.* Oral *Candida* colonization in oral cancer patients and its relationship with traditional risk factors of oral cancer: A matched case-control study. **Oral Oncology**, v. 51, n. 2, p. 139–145, fev. 2015.
- ALTINBAŞ, R. *et al.* Comparison of the Sensititre YeastOne antifungal method with the CLSI M27-A3 reference method to determine the activity of antifungal agents against clinical isolates of *Candida* spp. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 50, n. 8, p. 2024–2031, 2020.
- ALVES, M. *et al.* Hemoculturas Positivas de Pacientes da Unidade de Terapia Intensiva de um Hospital Escola de Goiânia-Go, Entre 2010 E 2013. **Revista EVS - Revista de Ciências Ambientais e Saúde**, v. 41, n. 3, 2014.
- ARENDRUP, Maiken Cavling; PERLIN, David S. Echinocandin resistance: an emerging clinical problem?. **Current opinion in infectious diseases**, v. 27, n. 6, p. 484, 2014.
- ARNOLD, H. M. *et al.* Hospital Resource Utilization and Costs of Inappropriate Treatment of Candidemia. **Pharmacotherapy**, v. 30, n. 4, p. 361–368, 2010.
- ASADZADEH, Mohammad *et al.* Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* strains isolated from clinical specimens in Kuwait. **Journal of medical microbiology**, v. 58, n. 6, p. 745-752, 2009.
- AUZINGER, G. *et al.* Cost-effectiveness analysis of anidulafungin for the treatment of candidaemia and other forms of invasive candidiasis. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 463, 2015.
- BARANTSEVICH, N.; BARANTSEVICH, E. Diagnosis and Treatment of Invasive Candidiasis. **Antibiotics**, v. 11, n. 6, p. 718, 26 maio 2022.

BASSETTI, M. *et al.* Diagnosis and Treatment of Candidemia in the Intensive Care Unit. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 40, n. 04, p. 524–539, ago. 2019.

BASSETTI, M. *et al.* Intensive care medicine research agenda on invasive fungal infection in critically ill patients. **Intensive Care Medicine**, v. 43, n. 9, p. 1225–1238, set. 2017.

BATES, D. W. *et al.* Mortality and Costs of Acute Renal Failure Associated with Amphotericin B Therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 5, p. 686–693, 1 mar. 2001.

BENITEZ, L. L.; CARVER, P. L. Adverse Effects Associated with Long-Term Administration of Azole Antifungal Agents. **Drugs**, v. 79, n. 8, p. 833–853, jun. 2019.

BERGAMASCO, M. D. *et al.* Epidemiology of candidemia in patients with hematologic malignancies and solid tumours in Brazil: Candidemia in cancer patients. **Mycoses**, v. 56, n. 3, p. 256–263, maio 2013.

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

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

BILIR, S. P. *et al.* The economic impact of rapid *Candida* species identification by T2*Candida* among high-risk patients. **Future Microbiology**, v. 10, n. 7, p. 1133–1144, jul. 2015.

BONASSOLI, L. A.; BERTOLI, M.; SVIDZINSKI, T. I. E. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. **Journal of Hospital Infection**, v. 59, n. 2, p. 159–162, fev. 2005.

- BONGOMIN, F. *et al.* Chronic Pulmonary Aspergillosis: Notes for a Clinician in a Resource-Limited Setting Where There Is No Mycologist. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 2, p. 75, jun. 2020.
- BOUZA, E.; MUÑOZ, P. Epidemiology of candidemia in intensive care units. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, p. S87–S91, nov. 2008.
- BROWN, G. D. *et al.* Hidden Killers: Human Fungal Infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, 19 dez. 2012.
- CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 327–335, jul. 2001.
- CALLIGARO, D. O. *et al.* The synthesis and biological activity of some known and putative metabolites of the atypical antipsychotic agent olanzapine (LY170053). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 7, n. 1, p. 25–30, jan. 1997.
- CANASSA, Ana Luiza; TEIXEIRA DA CRUZ, Débora. Incidência e perfil de suscetibilidade de candidemias de um hospital público em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Brazilian Journal of Health Research**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 110–117, 2019.
- CÁRDENES, C. D. *et al.* Comparative evaluation of four commercial tests for presumptive identification of *Candida albicans*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 59, n. 2, p. 293–297, nov. 2004.
- CARVALHO, A. *et al.* Multiplex PCR identification of eight clinically relevant *Candida* species. **Medical Mycology**, v. 45, n. 7, p. 619–627, jan. 2007.
- CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, n. 1, p. 39–49, mar. 2006.
- CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. **Frontiers in Medicine**, v. 5, p. 28, 13 fev. 2018.
- CHARLIER, C. *et al.* Fluconazole for the management of invasive candidiasis: where do we stand after 15 years? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 384–410, 1 mar. 2006.

CLANCY, C. J.; NGUYEN, M. H. Diagnosing Invasive Candidiasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 5, p. e01909-17, maio 2018.

CLANCY, C. J.; NGUYEN, M. H. Emergence of *Candida auris*: An International Call to Arms. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 2, p. 141–143, 15 jan. 2017.

CLANCY, C. J.; NGUYEN, M. H. Finding the “Missing 50%” of Invasive Candidiasis: How Nonculture Diagnostics Will Improve Understanding of Disease Spectrum and Transform Patient Care. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 9, p. 1284–1292, 1 maio 2013.

COLOMBO, A. L. *et al.* Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816–2823, ago. 2006.

CORTEGIANI, A. *et al.* Epidemiology, clinical characteristics, resistance, and treatment of infections by *Candida auris*. **Journal of Intensive Care**, v. 6, n. 1, p. 69, dez. 2018.

COSTA, K. R. *et al.* Epidemiology of *Candida* spp. Infections in Brazilian tertiary care hospital. **Mycoses**, 64(2), 166-172. 2021.

CUÉLLAR-CRUZ, M. *et al.* *Candida* species: new insights into biofilm formation. **Future Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 755–771, jun. 2012.

CUERVO, G. *et al.* Usefulness of guideline recommendations for prognosis in patients with candidemia. **Medical Mycology**, v. 57, n. 6, p. 659–667, 1 ago. 2019.

DA SILVA, C. M. *et al.* Candidemia in Brazilian neonatal intensive care units: risk factors, epidemiology, and antifungal resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 817–825, jun. 2023.

DALYAN CILO, B.; ENER, B. Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) Microdilution Method and VITEK 2 Automated Antifungal Susceptibility System for the Determination of Antifungal Susceptibility of *Candida* Species. **Cureus**, 6 dez. 2021.

DE ARAÚJO NETO, L. N. *et al.* Thiophene-thiosemicarbazone derivative (L10) exerts antifungal activity mediated by oxidative stress and apoptosis in *C. albicans*.

**Chemico-Biological Interactions**, v. 320, p. 109028, abr. 2020.

DE OLIVEIRA SANTOS, G. C. *et al.* *Candida* Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. **Frontiers in**

**Microbiology**, v. 9, p. 1351, 3 jul. 2018.

DE OLIVEIRA, J. F. *et al.* Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activities. **European Journal of**

**Medicinal Chemistry**, v. 104, p. 148–156, nov. 2015.

DENNING, D. W. Echinocandin antifungal drugs. **The Lancet**, v. 362, n. 9390, p. 1142–1151, out. 2003.

DORKO, E. *et al.* The histopathological characterization of oral *Candida leukoplakias*. **Folia Microbiologica**, v. 46, n. 5, p. 447–451, out. 2001.

ELLEPOLA, A. N. B.; MORRISON, C. J. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. **Journal of Microbiology** (Seoul, Korea), v. 43 Spec No, p. 65–84, fev. 2005.

ENOCH, D. A. *et al.* The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. Em: LION, T. (Ed.). **Human Fungal Pathogen Identification**. New York, NY: Springer New York, 2017. v. 1508p. 17–65.

FAN, H. *et al.* Retrospective Analysis of Clinical Features in 101 Death Cases with COVID-19. [s.l.] **Intensive Care and Critical Care Medicine**, 12 mar. 2020.

FORERO, J. S. B. *et al.* A new protocol for the synthesis of 2-aminothiophenes through the Gewald reaction in solvent-free conditions. **Heterocyclic Lett**, v. 1, p. 61-67, 2011.

FRANÇA, J. C. B.; RIBEIRO, C. E. L.; QUEIROZ-TELLES, F. D. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 1, p. 23–28, fev. 2008.

FREDRICKS, David N.; SMITH, Caitlin; MEIER, Amalia. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 10, p. 5122-5128, 2005.

GAUR, P. *et al.* Interpretation of Antimicrobial Susceptibility Testing Using European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Breakpoints: Analysis of Agreement. **Cureus**, 31 mar. 2023.

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

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p. 5–10, jun. 2014.

Hamill, R. J. Amphotericin B. Mechanism of Action: Pharmacology of Antifungal agents. **Antimicrobial Drug Resistance** (pp. 781-794). Humana, New York, NY. 2020.

HAMULA, C. L. *et al.* T2*Candida* Provides Rapid and Accurate Species Identification in Pediatric Cases of Candidemia. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 145, n. 6, p. 858–861, jun. 2016.

HINRICHSEN, S. Commentary: “Candidemia in tertiary hospitals in northeastern Brazil”. **Journal of Infectiology**, v. 2, n. 3, p. 13–14, 1 maio 2019.

INÁCIO, C. P. *et al.* Epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Candida* species in tertiary hospitals: Update on regional trends. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e59810414462, 24 abr. 2021.

JAMIU, A. T. *et al.* Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. **Medical Mycology**, v. 59, n. 1, p. 14–30, 4 jan. 2021.

KAUR, J.; NOBILE, C. J. Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 71, p. 102237, fev. 2023.

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

KIDD, S. E. *et al.* A New Age in Molecular Diagnostics for Invasive Fungal Disease: Are We Ready? **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2903, 14 jan. 2020.

KNEALE, M. *et al.* Global access to antifungal therapy and its variable cost. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 12, p. 3599–3606, dez. 2016.

KOHLER, J. R.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J. The Spectrum of Fungi That Infects Humans. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 1, p. a019273–a019273, 1 jan. 2015.

KRASHIN, E. *et al.* *Candida albicans* in peritoneal fluid in a patient with hepatic encephalopathy. **The Israel Medical Association journal: IMAJ**, v. 17, n. 3, p. 193–194, mar. 2015.

KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, M. C. Invasive Candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 15, p. 1445–1456, 8 out. 2015.

KUMAR, M.; SHARMA, R.; PRASAD, R. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **Journal of Medical Microbiology**, 70(6). 2021.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 331-371, 1998.

LAFHEY, S. F.; BUTLER, G. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. **Microbiology**, v. 151, n. 4, p. 1073–1081, 1 abr. 2005.

LE, A. K. *et al.* Development and Validation of a Risk Score for Liver Cirrhosis Prediction in Untreated and Treated Chronic Hepatitis B. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 223, n. 1, p. 139–146, 4 jan. 2021.

LEE, Y. *et al.* Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 6, p. 3390–3411, 24 mar. 2021.

LEITE DE ANDRADE, M. C. *et al.* A new approach by optical coherence tomography for elucidating biofilm formation by emergent *Candida* species. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0188020, 16 nov. 2017.

LETSCHER-BRU, V. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 513–521, 1 mar. 2003.

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

LIU, F. *et al.* Clinical Features, Strain Distribution, Antifungal Resistance and Prognosis of Patients with Non-albicans Candidemia: A Retrospective Observational Study. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 14, p. 3233–3246, ago. 2021.

LIU, N. *et al.* Emerging New Targets for the Treatment of Resistant Fungal Infections. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 13, p. 5484–5511, 12 jul. 2018.

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

LOCKHART, S. R. *et al.* Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 2, p. 134–140, 15 jan. 2017.

LUBER, A. D. Risk factors for amphotericin B- induced nephrotoxicity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, n. 2, p. 267–271, 1 fev. 1999.

MABKHOT, Y. N. *et al.* Antimicrobial activity of thiophene derivatives derived from ethyl (E)-5-(3-(dimethylamino)acryloyl)-4-methyl-2-(phenylamino)thiophene-3-carboxylate. **Chemistry Central Journal**, v. 11, n. 1, p. 75, dez. 2017.

MABKHOT, Y. N. *et al.* Substituted thieno[2,3- b ]thiophenes and related congeners: Synthesis,  $\beta$ -glucuronidase inhibition activity, crystal structure, and POM analyses. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 23, p. 6715–6725, dez. 2014.

MANCUSO, R.; GABRIELE, B. Recent Advances in the Synthesis of Thiophene Derivatives by Cyclization of Functionalized Alkynes. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 15687–15719, 29 set. 2014.

MARCHETTI, O. *et al.* Epidemiology of Candidemia in Swiss Tertiary Care Hospitals: Secular Trends, 1991–2000. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 3, p. 311–320, fev. 2004.

MARIETTE, C. *et al.* Epidemiology of invasive fungal infections during induction therapy in adults with acute lymphoblastic leukemia: a GRAALL-2005 study. **Leukemia & Lymphoma**, v. 58, n. 3, p. 586–593, 4 mar. 2017.

MEOTTI, F. C. *et al.* Thiophenes and furans derivatives: a new class of potential pharmacological agents. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 15, n. 1, p. 37–44, dez. 2003.

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

NÉMETH, T. *et al.* Characterization of Virulence Properties in the *C. parapsilosis* Sensu Lato Species. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e68704, 9 jul. 2013.

NEPPELENBROEK, K. *et al.* Molecular fingerprinting methods for the discrimination between *C. albicans* and *C. dubliniensis*. **Oral Diseases**, v. 12, n. 3, p. 242–253, maio 2006.

NETEA, M. G. *et al.* Immune defence against *Candida* fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 10, p. 630–642, out. 2015.

NIETO, M. *et al.* Polymerase Chain Reaction Versus Blood Culture to Detect *Candida* Species in High-Risk Patients with Suspected Invasive Candidiasis: The MICAFEM Study. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 8, n. 3, p. 429–444, 24 maio 2019.

OLIVEIRA, V. D. S. *et al.* Chitosan-Based Films with 2-Aminothiophene Derivative: Formulation, Characterization and Potential Antifungal Activity. **Marine Drugs**, v. 20, n. 2, p. 103, 26 jan. 2022.

OSTROSKY-ZEICHNER, L. *et al.* An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 9, p. 719–727, set. 2010.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; PAPPAS, P. G. Invasive candidiasis in the intensive care unit: **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 3, p. 857–863, mar. 2006.

PAPPAS, P. G. *et al.* Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. e1–e50, 15 fev. 2016.

PAPPAS, P. G. *et al.* Clinical Practice Guidelines for the Management Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 5, p. 503–535, 1 mar. 2009.

PAPPAS, P. G. *et al.* Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 18026, 11 maio 2018.

PATHAKUMARI, B.; LIANG, G.; LIU, W. Immune defence to invasive fungal infections: A comprehensive review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 130, p. 110550, out. 2020.

PERFECT, J. R. The antifungal pipeline: a reality check. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 9, p. 603–616, set. 2017.

PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. e383–e392, dez. 2017.

PERLIN, D. S.; WIEDERHOLD, N. P. Culture-Independent Molecular Methods for Detection of Antifungal Resistance Mechanisms and Fungal Identification. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. suppl\_3, p. S458–S465, 15 ago. 2017.

PERRY, J. L.; MILLER, G. R. Umbelliferyl-labeled galactosaminide as an aid in identification of *Candida albicans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 12, p. 2424–2425, dez. 1987.

PFALLER, M. A. *et al.* Twenty Years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* Species From 1997–2016. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. Supplement\_1, p. S79–S94, 15 mar. 2019.

PIQUERAS, M. Robert I. Krasner: The microbial challenge. Human–microbe interactions: ASM Press, Washington, D.C. 2002. 433 pp. 28.7×22.2 cm (ISBN: 1-55581-241-4) US\$ 90.00. **International Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 83–84, mar. 2003.

PROCOP, G. W.; AND, C. Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts. Wayne, Pa, Usa: **Clinical And Laboratory Standards Institute**, 2020.

RICHARDSON, J.; HO, J.; NAGLIK, J. *Candida*–Epithelial Interactions. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 1, p. 22, 8 fev. 2018.

ROBBINS, N.; WRIGHT, G. D.; COWEN, L. E. Antifungal Drugs: The Current Armamentarium and Development of New Agents. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 5, p. 4.5.19, 14 out. 2016.

ROCHA, A. P. S. *et al.* Perfil epidemiológico das leveduroses sistêmicas em Unidades de Terapia Intensiva de hospitais públicos da cidade do Recife – PE, Brasil / Epidemiological profile of systemic yeasts in Intensive Care Units of public hospitals in the city of Recife - PE, Brazil. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 6, p. 19098–19111, 2020.

RODRIGUES, C. F.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 33, n. 5, p. 673–688, maio 2014.

RODRIGUES, K. A. D. F. *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, dez. 2015.

ROEMER, T.; KRYSAN, D. J. Antifungal Drug Development: Challenges, Unmet Clinical Needs, and New Approaches. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 5, p. a019703–a019703, 1 maio 2014.

ROKAS, A. Evolution of the human pathogenic lifestyle in fungi. **Nature Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 607–619, 4 maio 2022.

SAMARANAYAKE, Y. H. *et al.* The Relative Pathogenicity of *Candida Krusei* and *C. albicans* in the Rat Oral Mucosa. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, n. 12, p. 1047–1057, 1 dez. 1998.

SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 295–310, 1 nov. 1994.

SANTIWONGKARN, P. *et al.* Prevalence of oral *Candida* carriage in Thai adolescents: Prevalence of oral *Candida* in adolescents. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, v. 3, n. 1, p. 51–55, fev. 2012.

SCOTTI, L. *et al.* Experimental Methodologies and Evaluations of Computer-Aided Drug Design Methodologies Applied to a Series of 2-Aminothiophene Derivatives with Antifungal Activities. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 2298–2315, 24 fev. 2012.

SCOTTI, L. *et al.* Experimental Methodologies and Evaluations of Computer-Aided Drug Design Methodologies Applied to a Series of 2-Aminothiophene Derivatives with Antifungal Activities. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 2298–2315, 24 fev. 2012.

SHARAFUTDINOV, I. S. *et al.* Increasing Susceptibility of Drug-Resistant *Candida albicans* to Fluconazole and Terbinafine by 2(5H)-Furanone Derivative. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 642, 2 fev. 2020.

SILVA, E. *et al.* Prevalência e desfechos clínicos de infecções em UTIs brasileiras: subanálise do estudo EPIC II. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 24, n. 2, p. 143–150, jun. 2012.

SILVA-JÚNIOR, E. F. *et al.* Design, synthesis, molecular docking and biological evaluation of thiophen-2-iminothiazolidine derivatives for use against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 18, p. 4228–4240, set. 2016.

SINGH, A.; SINGH, G.; BEDI, P. M. S. Thiophene derivatives: A potent multitargeted pharmacological scaffold. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 57, n. 7, p. 2658–2703, jul. 2020.

SUZUKI, T.; MIYAMAE, Y.; ISHIDA, I. Variation of colony morphology and chromosomal rearrangement in *Candida tropicalis* pK233. **Microbiology**, v. 137, n. 1, p. 161–167, 1 jan. 1991.

TAIRA, C. L. *et al.* A multiplex nested PCR for the detection and identification of *Candida* species in blood samples of critically ill paediatric patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 406, dez. 2014.

TROFA, D.; GÁCSEK, A.; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 606–625, out. 2008.

TSCHERNER, M. *et al.* A Synthetic System That Senses *Candida albicans* and Inhibits Virulence Factors. **ACS Synthetic Biology**, v. 8, n. 2, p. 434–444, 15 fev. 2019.

VICENTE, M. F. *et al.* Microbial natural products as a source of antifungals. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 9, n. 1, p. 15–32, jan. 2003.

WHITE, P. L.; SHETTY, A.; BARNES, R. A. Detection of seven *Candida* species using the Light-Cycler system. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 229–238, 1 mar. 2003.

WHITE, T. J. *et al.* AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. Em: **PCR Protocols**. [s.l.] Elsevier, 1990. p. 315–322.

XU, J. *et al.* Clonal and Spontaneous Origins of Fluconazole Resistance in *Candida albicans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1214–1220, mar. 2000.

YADAV, J. S. S. *et al.* *Candida krusei*: biotechnological potentials and concerns about its safety. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 937–952, ago. 2012.

ZHANG, W. *et al.* Antagonizing STAT3 activation with benzo[b]thiophene 1, 1-dioxide based small molecules. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 125, p. 538–550, jan. 2017.

ZHANG, W. *et al.* Epidemiology, species distribution, and predictive factors for mortality of candidemia in adult surgical patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, 13 jul. 2020.

ZIDA, A. *et al.* Anti- *Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 27, n. 1, p. 1–19, mar. 2017.

ZUZA-ALVES, D. L.; SILVA-ROCHA, W. P.; CHAVES, G. M. An Update on *Candida tropicalis* Based on Basic and Clinical Approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1927, 13 out. 2017.