



**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Curso de Biomedicina**

ENDRIELLE MARIA DE BARROS WANDERLEY

**POTENCIAL *IN VITRO* DE NOVAS FORMULAÇÕES
DE DERIVADOS TIOFÊNICOS FRENTE CÉLULAS
PLANCTÔNICAS E BIOFILME DE ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Candida***

Recife
2023

ENDRIELLE MARIA DE BARROS WANDERLEY

**POTENCIAL *IN VITRO* DE NOVAS FORMULAÇÕES
DE DERIVADOS TIOFÊNICOS FRENTE CÉLULAS
PLANCTÔNICAS E BIOFILME DE ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Candida***

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.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Rejane Pereira Neves

Coorientador: Dr. Cícero Pinheiro Inácio

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

Barros Wanderley, Endrielle Maria de.

Potencial in vitro de novas formulações de derivados tiofênicos frente
células planctônicas e biofilme de isolados clínicos de Candida / Endrielle Maria
de Barros Wanderley. - Recife, 2023.

42p., tab.

Orientador(a): Rejane Pereira Neves

Coorientador(a): Cícero Pinheiro Inácio

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

1. Antifúngico. 2. CLSI. 3. Levedura. 4. Susceptibilidade. 5. Tiofeno. I.
Neves, Rejane Pereira. (Orientação). II. Inácio, Cícero Pinheiro. (Coorientação).
IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

ENDRIELLE MARIA DE BARROS WANDERLEY

**POTENCIAL *IN VITRO* DE NOVAS FORMULAÇÕES
DE DERIVADOS TIOFÊNICOS FRENTE CÉLULAS
PLANCTÔNICAS E BIOFILME DE ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Candida***

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: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rejane Pereira Neves
Universidade Federal de Pernambuco / Departamento de Micologia Médica

Dr.^a Maria Daniela Silva Buonafina Paz
Universidade Federal de Pernambuco / Departamento de Micologia Médica

Dr.^a Bruna Rodrigues de Sousa
Universidade Federal de Pernambuco / Departamento de Medicina Tropical

— Para onde, moça?

— Para as estrelas!

Titanic

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Prof. Dr^a Rejane Pereira Neves pela oportunidade, incentivo e orientação peculiar. Ao meu coorientador, Dr. Cícero Pinheiro Inácio, pelo auxílio durante minha trajetória no projeto de Iniciação Científica. A Dra. Maria Daniela Silva Buonafina Paz por toda paciência, disponibilidade e ajuda. Agradeço também a todos que fazem parte do Departamento de Micologia Médica, principalmente aos cooperadores do laboratório Sylvio Campos.

Meu agradecimento também vai para o CNPQ, pelo fomento à minha pesquisa de iniciação científica durante a graduação. E pelo ambiente acolhedor que tive durante esses anos, agradeço a UFPE e ao Centro de Biociências.

E o meu maior agradecimento é para Jeová, que me moveu a suportar todos os desafios diários, me dando esperança, força, coragem e ainda me presenteando com uma família excepcional que foram e sempre serão essenciais na minha vida. Em especial ao meu pai, Waldir Wanderley, e a minha mãe, Maria Helena Wanderley, obrigada por me tornarem 'eu' e por nunca me deixarem só.

As professoras Dr^a Elba Verônica Matoso Maciel de Carvalho e Dr^a Kêsia Xisto da Fonseca Ribeiro de Sena pelo conhecimento passado, pelo carinho, pelos conselhos e puxões de orelha, pelas risadas, pelo apoio, pela paciência, pela amizade e pelo amor. Além de outros excelentes professores que cruzei, recebi e doei um grande carinho.

Aos maravilhosos amigos da vida antes da universidade que sempre me instigaram e aqueles que a UFPE me entregou, em especial os que saíram da sala de aula, e em específico neste período de escrita, a Patriky Pereira e José Pedro Lima por me assegurar do apoio que precisei. E, aqueles que saíram do laboratório presente, Alice, Débora, Isa, Léo e Raquel. Sem vocês 'tudin' por todos esses anos, com toda certeza, não seria tão risonho, tão suportável, tão leve, tão inteligente e tão acolhedor.

WANDERLEY, Endrielle Maria de Barros. **POTENCIAL *IN VITRO* DE NOVAS FORMULAÇÕES TIOFÊNICOS FRENTE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILME DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Candida***. 2023. 44. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

RESUMO

As infecções causadas por fungos têm sido cada vez mais frequentes, sobretudo as causadas por leveduras do gênero *Candida*. Historicamente, *C. albicans* é a espécie responsável pelo maior número de casos. Contudo, nas últimas décadas, mudanças têm ocorrido com notável surgimento de novas espécies, raras ou emergentes. Ademais, é notório e preocupante o alto índice de resistência antifúngica. Nesse contexto, o trabalho objetivou avaliar substâncias derivadas de compostos tiofenos quanto ao potencial antifúngico frente espécies clínicas de *Candida*. Foram incorporadas 12 cepas clínicas de *Candida* obtidas do grupo de pesquisa “Fungos de Interesse Médico e Leveduras de Interesse Biotecnológico”. Inicialmente, as amostras foram revisadas quanto à viabilidade utilizando-se caldo glicosado e o meio Sabouraud Dextrose Ágar-SDA com avaliação do crescimento em colônia central por até 72 horas de cultivo. Ainda, as culturas passaram por análise quanto à pureza a partir de observação macroscópica das colônias e do microcultivo analisado em lâminas ao microscópio óptico. Para as culturas que não estiveram puras, foram preparadas suspensões em água destilada esterilizada acrescida de 50mg/L de cloranfenicol. Destas, 0,5 mL foram semeados por “esgotamento” na superfície de SDA contido em placas de Petri mantidas a temperatura ambiente 21°C a 6°C por 72 horas. Após o surgimento das colônias, estas foram semeadas em tubos para realização dos testes de susceptibilidade antifúngica seguindo o M27 A4 Suplemento M60 do Clinical Laboratory Standard Institute-CLSI. Assim, a partir de culturas com 24 horas de crescimento foram preparadas suspensões em salina a fim de serem avaliadas quanto a sensibilidade/resistência ao fluconazol (droga controle) e 8 moléculas de tiofenos (nova opção terapêutica). As diluições foram feitas no meio Roswell Park Memorial Institute- RPMI suplementado com L-glutamina, não contendo bicarbonato de sódio e pH de 7,0 a 0,1, ajustado com ácido Morfolino Propano Sulfônico (MOPS) em uma concentração de 0,165 mol/L. A interpretação do teste foi baseada na Concentração Mínima Inibitória (CIM) que caracterizou a cepa fúngica como sensível, dose dependente ou resistente a fluconazol. Quanto aos tiofenos, foi interpretado como a menor concentração capaz de inibir ou matar o fungo. No ensaio de sensibilidade ao fluconazol, as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) variaram entre 1,0 a 32 µg/mL. Entre os isolados testados, observou-se que um foi classificado como sensível, enquanto dois demonstraram resistência ao fluconazol. No que diz respeito aos compostos tiofênicos, não se verificaram alternâncias, com inibição observada em uma concentração de 200 µg/mL para alguns isolados. Foi evidente a capacidade de formação de biofilme por todos os isolados, embora com diferentes intensidades. Portanto, destaca-se atividade antifúngica dos derivados tiofênicos em relação aos isolados de *Candida*, indicando seu potencial como uma potencial alternativa terapêutica para o tratamento de candidíase invasiva no futuro.

Palavras-chave: Antifúngicos. CLSI. Levedura. Susceptibilidade. Tiofenos.

WANDERLEY, Endrielle Maria de Barros. **IN VITRO POTENTIAL OF NEW THIOPHEN FORMULATIONS AGAINST PLANKTONIC CELLS AND BIOFILM FROM CLINICAL *Candida* ISOLATES.** . 2023. 44. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

ABSTRACT

Infections caused by fungi have become increasingly common, especially those caused by yeasts of the *Candida* genus. Historically, *C. albicans* has been the species responsible for the largest number of cases. However, in recent decades, changes have occurred with the notable emergence of new, rare or emerging species. Furthermore, the high rate of antifungal resistance is notorious and worrying. In this context, the aim of this study was to evaluate substances derived from thiophene compounds for their antifungal potential against clinical *Candida* species. Twelve clinical strains of *Candida* obtained from the "Fungi of Medical Interest and Yeasts of Biotechnological Interest" research group were incorporated. Initially, the samples were checked for viability using glucose broth and Sabouraud Dextrose Agar-SDA medium, assessing central colony growth for up to 72 hours of cultivation. The cultures were also analyzed for purity using macroscopic observation of the colonies and microcultures analyzed on slides under an optical microscope. For cultures that were not pure, suspensions were prepared in sterilized distilled water plus 50mg/L of chloramphenicol. Of these, 0.5 mL were sown by "depletion" on the surface of SDA contained in Petri dishes kept at room temperature 21°C to 6°C for 72 hours. After the colonies appeared, they were sown in tubes for antifungal susceptibility testing according to M27 A4 Supplement M60 of the Clinical Laboratory Standard Institute-CLSI. Suspensions in saline were prepared from cultures that had grown for 24 hours in order to assess their sensitivity/resistance to fluconazole (control drug) and 8 molecules of thiophene (new therapeutic option). The dilutions were made in Roswell Park Memorial Institute- RPMI medium supplemented with L-glutamine, containing no sodium bicarbonate and a pH of 7.0 to 0.1, adjusted with Morpholino Propane Sulphonic Acid (MOPS) at a concentration of 0.165 mol/L. The interpretation of the test was based on the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) which characterized the fungal strain as sensitive, dose-dependent or resistant to fluconazole. For thiophenes, it was interpreted as the lowest concentration capable of inhibiting or killing the fungus. In the fluconazole sensitivity test, the Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) ranged from 1.0 to 32 µg/mL. Among the isolates tested, one was classified as sensitive, while two showed resistance to fluconazole. With regard to thiophenic compounds, there were no alternations, with inhibition observed at a concentration of 200 µg/mL for some isolates. The ability of all isolates to form biofilms was evident, albeit with different intensities. Therefore, the antifungal activity of thiophenic derivatives in relation to *Candida* isolates stands out, indicating their potential as a potential therapeutic alternative for the treatment of invasive candidiasis in the future.

Keywords: Antifungals. CLSI. Susceptibility. Thiophenes. Yeast.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Formação de biofilme de *C. albicans* **19**

Figura 2 – Estrutura química dos derivados tiofênicos (AG1-8) **22**

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Isolados de leveduras clínicas do gênero <i>Candida</i>	24
Tabela 1 – Susceptibilidade antifúngica de isolados de leveduras clínicas do gênero <i>Candida</i> frente Fluconazol e derivados 2-aminotiofenos	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	Composto Dimetilsulfóxido
EPS	Substâncias Poliméricas Extracelulares
HEPES	Ácido Sulfônico Zwitteriônico
MOPS	Ácido Morfolino Propano Sulfônico
MTT	Ensaio Colorimétrico
PBS	Tampão Fosfato-Salino
RPMI	Gibco Roswell Park Memorial Institute
SDA	Ágar Sabouraud Dextrose
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 Candida spp.	16
3.2 FATORES DE VIRULÊNCIA DE Candida spp.	18
3.3 BIOFILMES	19
3.4 ANTIFÚNGICOS	21
3.5 TIOFENOS	22
4 METODOLOGIA	24
4.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS CLÍNICAS	24
4.2 OBTENÇÃO DE NOVAS FORMULAÇÕES DE DERIVADOS TIOFÊNICOS	25
4.3 SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA IN VITRO	26
4.4 INDUÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME	27
4.5 QUANTIFICAÇÃO DO BIOFILME	27
4.6 TRATAMENTO DO BIOFILME	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS CLÍNICAS	28
5.2 SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA IN VITRO DE ISOLADOS CLÍNICOS DE LEVEDURAS DO GÊNERO CANDIDA FRENTE A FLUCONAZOL E DERIVADOS TIOFÊNICOS	29
5.3 INDUÇÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ESPÉCIES DE Candida	31
5.4 TRATAMENTO DO BIOFILME DE ESPÉCIES DE Candida	32
6 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas são um grande problema de saúde pública e sua incidência tem aumentado significativamente nas últimas décadas. Dentre estas, as infecções por espécies de *Candida* representam cerca de 80% dos casos em seres humanos. A candidemia, infecção sanguínea causada por estes microrganismos, representam 10% das infecções relacionadas à assistência à saúde, com uma mortalidade variando de 49 a 61% (LEE; KIM; GUPTA; MANOHARAN; LEE, 2018; GHRENASSIA; MOKART; MAYAUX; DEMOULE; REZINE; KERHUEL; CALVET; JONG; AZOULAY; DARMON, 2019). Dentre as espécies, *Candida albicans* ainda é o principal agente encontrado em casos de candidemia, embora outras espécies *Candida* não- *C. albicans* estejam emergindo como patógenos oportunistas, como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (OLIVER; FERREIRA; SILVA; DIAS, 2020).

Apesar disso, é importante ressaltar que a distribuição de *Candida* spp. causando candidemia apresenta variações populacionais e geográficas, juntamente com a considerável influência das características do paciente, administração antifúngica e práticas clínicas utilizadas durante a internação (MEDEIROS; MELO; BENTO; SOUZA; BEZERRA NETO; GARCIA; ZUZA-ALVES; FRANCISCO; MELO; CHAVES, 2019). Entretanto, é importante destacar que os pacientes com imunossupressão são frequentemente os mais impactados pela candidemia. Nesses indivíduos, a infecção normalmente surge devido à quebra de barreiras anatômicas, neutropenia, presença de neoplasias e a manifestação da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA). Outros elementos também podem influenciar o surgimento de infecções fúngicas hospitalares, como intervenções médicas invasivas, utilização de dispositivos intravasculares, alimentação parenteral, suporte de ventilação mecânica, permanência hospitalar prolongada, administração de corticosteróides, e o emprego prolongado de antibióticos de amplo espectro (OLIVER; FERREIRA; SILVA; DIAS, 2020), bem como vinculados aos aspectos de virulência expressos pelos microrganismos.

A habilidade de desenvolver biofilme é um dos principais elementos de virulência observados em várias espécies de *Candida*, e pode ser descrita como uma agregação de um ou mais micro-organismos imersos em uma matriz extracelular composta por carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos. Esse processo de formação se desenrola de forma sequencial, inicialmente com a aderência a um substrato e a ligação entre células, seguida pela multiplicação das células e uma subsequente ampliação da comunidade do patógeno, culminando na criação de estruturas invasivas que favorecem sua disseminação. Os biofilmes podem ser encontrados aderidos a tecidos vivos ou superfícies inertes, e apresentam uma notável resistência aos tratamentos convencionais, desempenhando um papel fundamental na viabilidade do microrganismo dentro do hospedeiro (FANNING et al., 2012).

Atualmente, existem três principais categorias de agentes antifúngicos acessíveis para a aplicação clínica: azóis, polienos e equinocandinas. Os polienos são componentes de uma classe de antifúngicos de origem natural produzidos por organismos do gênero *Streptomyces*, e entre eles destaca-se a anfotericina B como o representante principal. Esta substância possui um amplo alcance de atividade devido à sua natureza fungicida, no entanto, traz consigo riscos consideráveis de nefrotoxicidade. Por outro lado, os azóis são antifúngicos sintéticos que operam de maneira fungistática e carregam índices inferiores de toxicidade quando contrastados à anfotericina B. Enquanto isso, as equinocandinas são peptídeos lipídicos parcialmente sintéticos, e diferentemente das anfotericinas B e dos azólicos, elas focam na parede fúngica, resultando em efeitos adversos menos frequentes em comparação com a anfotericina B. Além disso, a probabilidade de interação com outros medicamentos é menor em relação aos fármacos azólicos. (KSIEZOPOLSKA; GABALDÓN, 2018, ARENDRUP et al 2014).

Embora significativos progressos tenham sido feitos com relação ao manejo de pacientes com candidemia, o aparecimento de cepas resistentes a antifúngicos são um problema sério em relação à profilaxia e estratégias de tratamento empírico (KHAN; KANUGALA; SHAREEF; GANAPATHI; SHAIK; SHEKAR; KAMAL; KUMAR, 2019).

Devido ao aumento de cepas resistentes aos antifúngicos utilizados na clínica médica, e ainda, fatores como a hepatotoxicidade associada aos azólicos, nefrotoxicidade associada aos polienos e resistência as equinocandinas, a escolha terapêutica é limitada, e contribui para um prognóstico negativo do paciente (NETEA et al., 2015). Diante disso, torna-se imprescindível a busca por novas substâncias bioativas que sejam capazes de inibir o crescimento fúngico e controlar fatores de virulência destes microrganismos, como a formação de biofilme, expressando, assim, atividade antifúngica.

Diante disso, as probabilidades de um tratamento com êxito se tornam reduzidas, elevando a perspectiva de um desfecho fatal caso o agente patogênico causador da infecção revele resistência a um ou mais medicamentos. Dessa forma, tem sido intensamente investigada a criação de novos compostos farmacêuticos, visando opções mais seguras e eficazes. Entre essas substâncias, os compostos derivados do núcleo tiofênico emergem como substâncias antimicrobianas de destaque, exibindo um vasto leque de aplicações de natureza biológica. Atualmente, os derivados tiofênicos são amplamente encontrados como a estrutura principal de vários compostos farmacologicamente ativos. No entanto, o potencial antifúngico dessas substâncias em relação às espécies de *Candida* e suas implicações nas células fúngicas permanecem de forma vaga e pouco esclarecida (MABKHOT; KAAL; ALTERARY; MUBARAK; ALSAYARI; MUHSINAH, 2019).

Os tiofenos 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). 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*, *Cryptococcus* sp., *Syncephalastrum racemosum*, *Geotrichum candidum*, e *Candida albicans*. Contudo, os relatos de sua ação frente a biofilmes de espécies de *Candida* ainda

são incipientes (SCOTTI et al., 2012; ABDEL-RAHMAN et al., 2017; SULEYMANOGLU et al., 2019).

Diante deste contexto, a compreensão efetiva de todo o processo de formação, estrutura e constituintes do biofilme fúngico é importante para elencar novos alvos terapêuticos. Ainda, constitui-se relevante, o desenvolvimento de fármacos mais eficazes a descoberta de novas alternativas terapêuticas assim como a elucidação de seus alvos biológicos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar, *in vitro*, a capacidade antifúngica de formulações contendo compostos tiofênicos em relação a cepas clínicas de *Candida*, bem como compreender o mecanismo pelo qual atuam nas células fúngicas planctônicas e de biofilme.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter isolados clínicos de *Candida* e autenticar em nível de espécie;
- Avaliar o potencial de antifúngico frente aos isolados;
- Avaliar o potencial de derivados tiofênicos frente aos isolados,
- Avaliar o biofilme produzido por essas cepas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Candida* spp.

Variedades de fungos do gênero *Candida* constituem uma componente natural da microbiota do corpo humano (DA ROCHA, 2021). O registro científico inaugural desses microrganismos remonta ao ano de 1839, graças aos estudos de Bernhard von Langenbeck, que culminaram na observação e isolamento de estruturas microscópicas que, em tempos atuais, são reconhecidas como blastoconídeos de *Candida albicans*. No entanto, somente em 1923, a espécie foi definitivamente identificada como parte deste gênero, mérito atribuído a Robin Berkhout (SIDRIM, 2004).

Segundo a taxonomia, do gênero *Candida* spp. está incluído no filo Ascomycota, na classe Saccharomycetes, na família Debaryomycetaceae. (TAKASHIMA et al., 2022). O gênero *Candida* são fungos patogênicos oportunistas que integram a microbiota de indivíduos saudáveis, e estão amplamente disseminados no meio ambiente, na água, no solo, bem como na fauna e na flora (FERREIRA et al., 2009). Entretanto, esses microrganismos têm o potencial de despertar o desenvolvimento de infecções, como a candidemia, que representa a forma mais prevalente da candidíase invasiva. Pacientes acometidos por neoplasias, trasplantados, uso de dispositivos médico-invasivos, uso prolongado de corticóides, quimioterapia e outras condições clínicas, são mais vulneráveis (AUZINGER et al., 2015).

Essa condição infecciosa pode ter origem endógena, quando o microrganismo, presente na microbiota do hospedeiro, prolifera e migra para diferentes locais no organismo, ou por via exógena, quando a levedura invade o paciente proveniente de fontes externas. Dentro do panorama das infecções fúngicas documentadas em instituições hospitalares, o gênero *Candida* figura como responsável por aproximadamente 80% dessas ocorrências no mundo (GEHRING, et al., 2015).

É um tipo de fungo que tem a capacidade de adotar formas distintas: ou de levedura, ou de pseudo-hifa ou de hifa verdadeira. Esses fungos proliferam em superfícies e fluidos biológicos, e sua morfologia de levedura é caracterizada por brotos ovais ou globosos.

A presença predominante da forma de levedura sugere um comportamento comensal, indicando que a *Candida* está apenas existindo normalmente no corpo hospedeiro. Por outro lado, quando se apresenta na forma de hifa, isso geralmente sugere a instalação da infecção, já que esta forma filamentosa está associada à atividade patogênica desses fungos (ÁLVARES et al., 2007).

Este gênero envolve mais de 200 espécies, e revela que a maioria das infecções, são causadas por *Candida albicans*, mas outras espécies como *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*, também são destacadas. (CAMARGO et al., 2008).

Recentemente, em janeiro de 2022, a ANVISA confirmou um novo surto de *Candida auris* no Brasil, na cidade do Recife, em Pernambuco. A cepa foi identificada pelo método de espectrometria de massas (MALDI-TOF), e o hospital estabeleceu as medidas necessárias para prevenção e controle de surto (ANVISA nº 01/2020).

A proporção da candidíase invasiva é influenciada por uma série de fatores relacionados às condições do paciente, tanto como o sistema imunológico como os fatores de virulência do fungo (JALAL, et al., 2019). Portanto, torna-se imprescindível a exploração e esclarecimento dos fatores de virulência, a fim de aprofundar o conhecimento das propriedades desse fungo.

3.2 FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Candida* spp.

A habilidade de *Candida* desencadear infecções no hospedeiro é influenciada por uma gama diversificada de fatores de virulência, somados às variáveis inerentes ao hospedeiro, tais como imunossupressão e imunodepressão. Aspectos como a produção de tubos germinativos, a atividade de enzimas extracelulares, a formação de biofilmes, a tolerância a temperaturas elevadas e a capacidade de aderir às células epiteliais constituem elementos de virulência frequentemente associados ao gênero *Candida* contribuindo para a sua patogenicidade (KOGA-ITO et al., 2006). As leveduras do gênero *Candida*, são capazes de produzir e secretar enzimas hidrolíticas, tais como proteases e fosfolipases, reconhecidas como cruciais para o procedimento de invasão às células do hospedeiro. Essas, estão intimamente ligada à capacidade do microrganismo de invadir o tecido epitelial e introduzir-se as células, pois, demonstram habilidade para degradar os componentes fosfolipídicos da membrana celular, o que simplifica a entrada e a ancoragem das hifas no citoplasma (CIUREA et al., 2020; SCHALLER, et al., 2005).

Adicionalmente, a tolerância a temperaturas elevadas, que se refere à capacidade do fungo para crescer e subsistir em ambientes com uma temperatura de 37°C, desempenha um papel crítico em sua sobrevivência no organismo humano. Espécies que demonstram a habilidade de desenvolver nesse regime térmico são categorizadas como potencialmente patogênicas. Pois, é capaz de adaptar-se a várias condições em diferentes sítios do hospedeiro, como diferentes níveis de temperatura, pH, concentração de CO₂, hipóxia, e disponibilidade de nutrientes (CIUREA et al., 2020; SIDRIM, 2004).

Além disso, a ligação de *Candida* a células e tecidos do hospedeiro, assim como a superfícies inertes, representa um passo crucial no estabelecimento da infecção e na persistência do fungo no organismo. A aderência constitui o primeiro estágio, precedendo a invasão e a disseminação no interior do organismo do hospedeiro. Quando se trata de superfícies inertes, a primeira etapa é a aderência com a formação de biofilmes (FANNING et al., 2012; KARKOWSKA-KULETA et al., 2009).

Eles demonstram a habilidade de enfrentar as defesas do sistema imunológico do hospedeiro, bem como a ação de agentes antifúngicos e substâncias desinfetantes, o que resulta em uma notável potência que dificulta significativamente sua erradicação. Isso, contribui para a criação de infecções persistentes que exibem resistência e tendem a recorrer (ZICCARDI et al., 2015).

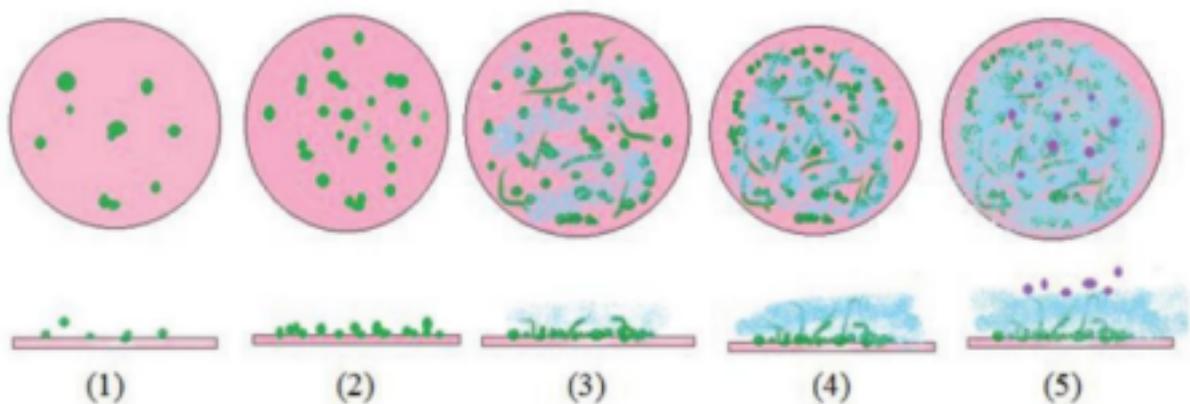
3.3 BIOFILMES

A formação de biofilme está intimamente vinculada aos elementos de patogenicidade das espécies de *Candida*, assim como a sua associação com os mecanismos de resistência que esses microrganismos desenvolvem em resposta aos antifúngicos (KRISHNASAMY et al., 2020). Os biofilmes são descritos como uma matriz polimérica, imersa em meio líquido, aderidos em uma superfície sólida constituída de células microbianas e substâncias poliméricas extracelulares (LANGER et al., 2018). Podem surgir e se fixar tanto em superfícies bióticas não esterilizadas, como tecidos humanos, quanto em superfícies abióticas, exemplificadas por dispositivos médicos. Além da matriz extracelular, algumas particularidades inerentes aos biofilmes justificam sua elevada capacidade de resistência contra agentes antimicrobianos. Isso inclui uma reduzida taxa de crescimento, em resposta a condições estressantes do ambiente, bem como a expressão de bomba de fluxo, *quorum-sensing* e

alterações nos níveis de esterol em determinadas fases do biofilme. (FAUVART, 2011)

As células do microrganismo, quando presentes na forma de leveduras, podem se fixar a diferentes tipos de células do hospedeiro, dependendo da disponibilidade de carboidratos, variações de temperatura, pH e a produção de enzimas extracelulares. A aderência e a formação de biofilmes são processos que se desenvolvem em fases distintas. A formação de biofilmes por *Candida* spp. é dividida em três fases: a fase inicial (0-6 horas), fase intermediária (7-12 horas) e fase madura (13-48 horas) (GHANNOUM et al., 2015) (**Figura 1**).

Figura 1 – Formação de biofilme de *C. albicans*



Fonte: Gu, Xu e Sun (2015).

(1) Inicialmente, ocorre a adesão por parte de células planctônicas, ou seja, células que estão em estado livre e isolado, que se ligam ao tecido do hospedeiro de forma aleatória ou por meio de quimiotaxia, bem como por meio de interações eletrostáticas e hidrofóbicas com a superfície; (2) posteriormente, na chamada fase de adesão irreversível, as leveduras agregam-se em microcolônias, as quais produzem polissacarídeos extracelulares (EPS) e ativam genes específicos que alteram a arquitetura da estrutura, fazendo com que as leveduras se transformem em hifas (3) e por fim, a maturação do biofilme ocorre à medida que novos microrganismos se multiplicam e se agregam. Conseqüentemente, a matriz extracelular do biofilme absorve camadas adicionais de células, gerando uma estrutura tridimensional (LANGER et al., 2018).

A constituição de biofilmes se apresenta como um notável obstáculo nos cenários de resistência aos agentes antifúngicos. Essas estruturas complexas e altamente

desenvolvidas atuam como barreiras que limitam a penetração e disseminação no interior da arquitetura do biofilme, proporcionando proteção contra as respostas imunológicas do hospedeiro e a ação de medicamentos. Além disso, biofilmes maduros desencadeiam transformações fenotípicas nas células microbianas e promovem a ativação de genes relacionados à resistência (AL-FATTANI & DOUGLAS, 2004).

O fator principal que certifica complexidade aos biofilmes são as EPS, que não apenas estabelecem uma barreira física e química significativa, mas também dificultam o reconhecimento do patógeno pelas células sinalizadoras do hospedeiro. Isso ocorre mesmo sem a penetração eficaz no interior do biofilme. Ainda, quando submetido a ação de agentes antifúngicos, uma fração de células em estado latente permanece resiliente e, portanto, representa o núcleo responsável por eventuais reinfecções (LANGER et al., 2018).

Conseqüentemente, os antifúngicos atualmente em uso precisam ser aplicados em concentrações que excedem em até 1.000 vezes a quantidade típica necessária para controlar microrganismos na forma planctônica em estado isolado (LANGER et al., 2018). Isso enfatiza a urgência de investigações voltadas para novas modalidades de tratamento e aprimoramento das opções terapêuticas já disponíveis, tanto para enfrentar os desafios impostos pelos biofilmes quanto para contrariar os mecanismos de resistência dos antifúngicos.

3.4 ANTIFÚNGICOS

Os fármacos antifúngicos empregados na terapêutica de infecções fúngicas, incluindo a candidíase, são categorizados em três classes: polienos, azóis e equinocandinas (LI et al., 2018).

Nos anos 1950, ocorreu um marco significativo no desenvolvimento de fármacos antifúngicos sistêmicos com a aprovação da anfotericina B, pertencente à classe dos polienos. Esses agentes operam interagindo com o ergosterol presente na membrana plasmática das células fúngicas, resultando na formação de canais na membrana e assim, perda de íons, o que culmina na lise celular. Entretanto, vale notar que esses antifúngicos podem também causar danos às células do hospedeiro, uma vez que se ligam ao colesterol presente nas membranas de células animais. Apesar de seu potencial tóxico, os polienos permanecem como os antifúngicos mais eficazes e abrangentes disponíveis para uso clínico. Entretanto, nos anos 1990,

houve o desenvolvimento de formulações lipídicas da anfotericina B, resultando em uma redução dos efeitos colaterais, como disfunção renal (PERFECT, 2017; ODDS et al., 2003).

Os antifúngicos da classe dos azóis sistêmicos foram introduzidos no cenário médico nos anos de 1970, primeiramente com a disponibilização do miconazol intravenoso e do cetoconazol oral, representando a primeira geração dessa categoria terapêutica. Estes compostos inicialmente ganharam destaque como opções de tratamento de primeira escolha para infecções fúngicas invasivas. Com a evolução das pesquisas, surgiram a segunda geração (fluconazol e itraconazol) e a terceira geração de azóis (voriconazol, posaconazol e isavuconazol).

Essa classe atua através do bloqueio da síntese de ergosterol, tendo como alvo a enzima citocromo P450 lanosterol 14- α -desmetilase, a qual interfere no produto codificado pelo gene Erg11 em leveduras. Como o ergosterol é uma molécula fundamental na estrutura da membrana celular, descontinuar sua formação acarreta desequilíbrio na fluidez e resulta na perda de integridade da membrana plasmática, desencadeando consequências críticas para a célula fúngica (PERFECT, 2017; REVIE et al., 2018).

A classe das equinocandinas emergiu mais recentemente na indústria farmacêutica, introduzida nos anos 2000. Uma das vantagens notáveis desses compostos reside na sua baixa toxicidade para as células do hospedeiro, tornando-os opções atraentes para uso contínuo em ambientes hospitalares. Essa característica é atribuída à capacidade das equinocandinas de bloquear a atividade da 1,3- β -glucano sintase, uma proteína crucial na formação da parede celular fúngica, componente ausente nas células humanas. A combinação de sua eficácia antifúngica de amplo espectro com sua segurança na utilização, devido à baixa toxicidade, levou à sua adoção como tratamento de primeira escolha para infecções por *Candida*. Alguns dos antifúngicos pertencentes a essa classe incluem a caspofungina, micafungina e anidulafungina (PERFECT, 2017; PAPPAS et al., 2016).

3.5 TIOFENOS

Os compostos heterocíclicos constituem uma classe de estruturas amplamente presentes na natureza e que desempenham um papel significativo em várias moléculas biológicas, como o DNA e os carboidratos.

Além de sua abundância na natureza, esses compostos também são altamente valorizados devido à sua versatilidade como andaimes moleculares com diversas atividades biológicas (KERI et al., 2017).

O núcleo tiofeno, pertencente a essa classe de compostos heterocíclicos, foi inicialmente descoberto por Meyer em 1883, embora tenha levado algum tempo até que os cientistas começassem a explorar seu potencial na concepção de medicamentos. Os tiofenos são caracterizados por sua estrutura molecular heterocíclica insaturada de cinco membros, com enxofre como heteroátomo. Essa combinação de características torna o núcleo tiofênico uma entidade de considerável importância na indústria química e farmacêutica, com os 2-amino-tiofênicos e seus derivados destacando-se como compostos de grande relevância (JHA et al., 2012; BOZOROV et al., 2017).

As tiossemicarbazonas representam uma classe de compostos tiofenos que incluem o núcleo com uma funcionalidade baseada de tioureia. Essas substâncias atuam como quelantes de íons metálicos e exibem notável atividade biológica, notadamente em relação à ação anticancerígena (GOU et al., 2016).

Também demonstraram eficácia contra diversas linhagens de células cancerígenas, incluindo adenocarcinoma de mama, hepatocarcinoma e câncer cervical. Estudos científicos apontam que esses derivados desempenharam um papel crucial na indução da apoptose celular, interrompendo o ciclo celular na fase G2 e, como resultado, causando danos irreparáveis ao material genético (DNA) (WANG et al., 2017).

Adicionalmente, em um estudo conduzido por Neves em 2019, foi realizada uma avaliação da atividade das moléculas derivadas do tiofeno em relação a leveduras, incluindo espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans*. Os resultados revelaram que as espécies de *Candida* demonstraram susceptibilidade, com concentrações inibitórias mínimas variando de 1024 a 128 ug/mL. Por outro lado, os isolados de *Cryptococcus neoformans* foram inibidos em concentrações que variaram de 1024 a 16 ug/mL.

Em outro estudo conduzido por Li e colaboradores em 2021, foi realizada uma avaliação da eficácia da tiossemicarbazona NSC319726 em relação a 22 cepas de *Candida auris*. Essa avaliação comparou a atividade da NSC319726 com as de várias drogas antifúngicas, incluindo fluconazol, voriconazol, anfotericina B e

micafungina. Os resultados revelaram que a NSC319726 demonstrou ação eficaz contra todas as cepas de *C. auris* testadas, incluindo aquelas que foram previamente identificadas como resistentes aos antifúngicos tradicionais mencionados.

A concentração inibitória mínima variou de 0,125 a 0,25 g/mL. Os autores destacaram que, em um cenário de infecção não tratada, a capacidade antifúngica dessa substância foi excelente. No entanto, é importante notar que sua atividade foi mantida como fungistática, ou seja, impedindo o crescimento dos fungos, mas não levando à sua completa erradicação.

Além disso, a pesquisa relacionada ao combate de biofilmes causados por leveduras está em estágio inicial, demandando uma investigação mais aprofundada para a avaliação desses compostos no tratamento desse importante elemento de virulência.

4 METODOLOGIA

4.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS CLÍNICAS

Foram obtidos 12 isolados clínicos de *Candida spp.* pertencentes ao projeto PPSUS – FACEPE 06/2020 do grupo de pesquisa “Fungos de Interesse Médico e Leveduras de Interesse Biotecnológico”.

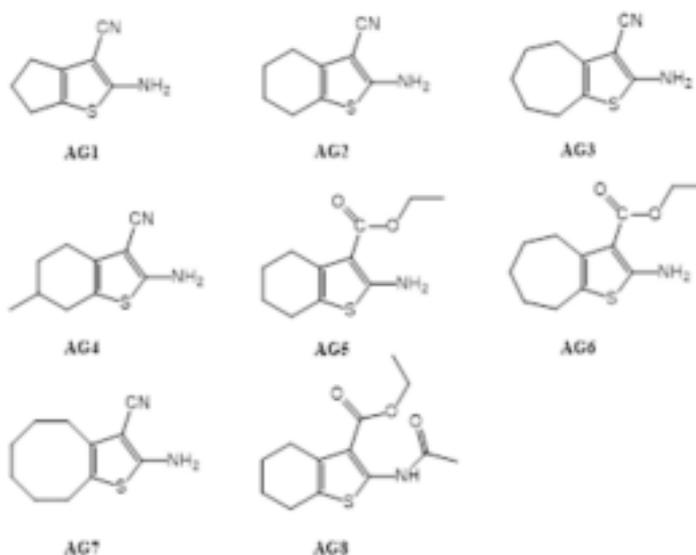
Quadro 1. Isolados de leveduras clínicas do gênero *Candida* do banco de leveduras do grupo de pesquisa “Fungos de Interesse Médico e Leveduras de Interesse Biotecnológico” da Universidade Federal de Pernambuco.

ISOLADO	ESPÉCIE
HAM06	<i>C. tropicalis</i>
HAM08	<i>C. lusitaniae</i>
HAM27	<i>C. krusei</i>
HAM28	<i>C. albicans</i>
HAM31	<i>C. tropicalis</i>
HAM32	<i>C. tropicalis</i>
HAM33	<i>C. tropicalis</i>
HAM34	<i>C. albicans</i>
HAM35	<i>C. albicans</i>
HAM36	<i>C. parapsilosis</i>
HAM37	<i>C. albicans</i>
HAM43	<i>C. tropicalis</i>

4.2 OBTENÇÃO DE NOVAS FORMULAÇÕES DE DERIVADOS TIOFÊNICOS

Os novos compostos de derivados tiofênicos foram obtidos por meio de parceria com o grupo de pesquisa “Síntese e Vetorização de Moléculas” da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

Figura 02 – Estrutura química dos derivados tiofênicos (AG1-8) obtidos do grupo de pesquisa “Síntese e Vetorização de Moléculas” da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).



4.3 SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

A metodologia empregada seguiu os procedimentos detalhados nos documentos M27-S4 e M60 (CLSI em 2008 e 2017, respectivamente). O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640, adquirido da Sigma-Aldrich nos Estados Unidos, e esterilizado por meio de membranas de 0,22 μm fornecidas pela Millipore, localizada em Darmstadt, Alemanha. O meio de cultura foi suplementado com L-glutamina, não contendo bicarbonato de sódio, e com um pH de $7,0 \pm 0,1$, ajustado utilizando Ácido Morfolino Propano Sulfônico (MOPS) em uma concentração de 0,165 mol/L, também fornecido pela Sigma-Aldrich. O agente antifúngico utilizado foi o fluconazol, fabricado pela

Pfizer, preparado em água deionizada, enquanto as novas formulações de derivados tiofênicos foram preparadas em DMSO. As espécies de leveduras foram mantidas em meio Sabouraud Dextrose Agar e incubadas a 35°C. As suspensões dos isolados foram preparadas em solução salina e a densidade foi ajustada para atingir uma transmitância de 90% na escala 0,5 de MacFarland, medida a uma absorvância de 530 nm utilizando um espectrofotômetro. O volume do inóculo foi ajustado para 5,0 mL de solução salina esterilizada e posteriormente diluído em RPMI 1640 para atingir uma concentração de 2 a 5×10^3 células/mL. Para os testes de sensibilidade, foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços fornecidas pela TPP, localizada em Trasadingen, Suíça. O inóculo foi adicionado aos poços contendo os antifúngicos e as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. E o CIM (Concentração Inibitória Mínima) foi determinado com base na inibição de 50% em relação ao poço controle para o fluconazol e 100% para as novas formulações.

4.4 INDUÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME

As células de levedura foram cultivadas no meio de ágar Sabouraud Dextrose durante um período de 24 horas a uma temperatura de 37°C. Posteriormente, as células foram suspensas em meio RPMI Medium 1640, que foi ajustado com tamponamento utilizando HEPES (Gibco®), até alcançar uma concentração de 106 células por mililitro. Em seguida, 100µL dessa suspensão foram introduzidos em cada um dos compartimentos de uma placa de poliestireno, contendo um total de 96 poços, e a placa foi mantida a uma temperatura de 37°C por um período de 48 horas. Após decorrido cada intervalo de tempo, os compartimentos da placa foram submetidos a três lavagens utilizando um tampão fosfato salino (PBS) com o objetivo de eliminar as células planctônicas presentes. O isolado de *Candida albicans* ATCC90028 desempenhou o papel de controle ao longo do experimento.

4.5 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 20 μ L, na proporção de 5 μ L para 1mL de tampão PBS, esterilizado por filtração em membrana (Millipore, poros de 0,22 μ m) 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 20 μ L de isopropanol (BERRIDGE; HERST; TAN; 2005; KROM et al., 2007). As placas foram deixadas em repouso por um intervalo de 15 minutos, após o qual, 100 μ L do conteúdo presente em cada poço foi transferido para uma nova placa de microtitulação, para possibilitar a leitura em um leitor de microplacas na extensão de 570nm de comprimento de onda (RAMAGE et al., 2002; KROM et al., 2006; PIERCE et al., 2008).

4.6 TRATAMENTO DO BIOFILME

Os biofilmes foram formados seguindo a metodologia descrita por Berridge, Herst & Tan (2005) e Krom et al. (2007) detalhada anteriormente. Após o período de 48 horas, os poços contendo os biofilmes foram preenchidos com 180 μ L 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 20 μ L, na proporção de 5 μ L a 1mL de tampão PBS, esterilizados por filtração por membrana (Kasvi®) 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 200 μ L de isopropanol. As placas foram deixadas em repouso por 15 minutos, em seguida, 100 μ L 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.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE LEVEDURAS CLÍNICAS

Pesquisas têm evidenciado que a correlação entre as variedades de *C. albicans* e outras *Candida* não pertencentes ao grupo *C. albicans*, no contexto das infecções fúngicas invasivas, sugere uma transformação ao longo das últimas décadas no que relaciona às proporções estimadas. Segundo CHAKRABARTI e colaboradores (2015), em um estudo conduzido na Índia, considerando exclusivamente os isolados obtidos de indivíduos internados em unidades de terapia intensiva (UTIs), foi constatado que 80% dos casos envolviam espécies de *Candida* distintas de *C. albicans*. Esse estudo implica que a distribuição global das diferentes variedades de *Candida* está sujeita a fatores geográficos e características clínicas que acompanham os pacientes. Ainda, pesquisas realizadas na região da América do Sul têm apresentado resultados que indicam *C. tropicalis* como a espécie predominante de *Candida* não -*C. albicans*, compreendendo aproximadamente 20% dos casos (NOREEN et al., 2015).

5.2 SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA IN VITRO DE ISOLADOS CLÍNICOS DE LEVEDURAS DO GÊNERO *CANDIDA* FRENTE A FLUCONAZOL E DERIVADOS TIOFÊNICOS

Dentre os 12 isolados de leveduras clínicas testados frente ao fluconazol, 2 foram resistentes ao azólico, com Concentração Inibitória Mínima (CIM) variando de 8 a 32 µg/mL. Quatro isolados foram sensíveis ao fluconazol, com CIM variando de 0,025 a 1,0 µg/mL e sete isolados apresentaram resistência (CIM = 8 a 32 µg/mL). Segundo os documentos M27-A3 (CLSI, 2008) e M60 (CLSI, 2018), os *breakpoints* interpretativos da CIM do fluconazol para determinação do perfil de susceptibilidade antifúngica são: CIM ≥ 8 µg/mL indica resistência à droga avaliada e CIM ≤ 2,0 aponta que o isolado testado é sensível a este fármaco. Uma CIM = 4 µg/mL indica sensibilidade dose dependente (SDD) (**Tabela 2**).

Os antifúngicos do grupo dos azólicos constituem uma extensa categoria de agentes fungistáticos, sendo dividido em dois subgrupos que apresentam uma semelhança no seu espectro de atividade antifúngica: os imidazólicos e os triazólicos (GOLAN et al., 2010). No contexto dos triazólicos, o fluconazol é como um representante de destaque, frequentemente empregado no tratamento de infecções fúngicas, devido à sua eficácia comprovada, perfil de segurança favorável e disponibilidade em formulações tanto oral como intravenosa (SOUZA et al., 2015). Apesar da ampla abrangência do fluconazol em relação às variedades de *Candida*, relatos têm indicado o surgimento de resistência a esse antimicrobiano, com uma incidência mais elevada observada nas espécies *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* (KHODAVAISSY et al., 2020; LAMBA et al., 2019; SRIPHANNAM et al., 2019).

Tabela 2. Susceptibilidade antifúngica de isolados de leveduras clínicas do gênero *Candida* frente Fluconazol e derivados 2-aminotiofenos.

ISOLADO	ESPÉCIE	FLU	AG1	AG2	AG3	AG4	AG5	AG6	AG7	AG8
HAM06	<i>C. tropicalis</i>	1,0	NT	>200	200	NT	200	200	50	200
HAM08	<i>C. lusitaniae</i>	NT	NT	200	>200	200	NT	NT	25	NT
HAM27	<i>C. krusei</i>	8,0	NT	>200	>200	100	25	200	25	100
HAM28	<i>C. albicans</i>	0,5	NT	NT	NT	200	100	NT	200	NT
HAM31	<i>C. tropicalis</i>	2,0	NT	>200	50	NT	50	200	NT	50
HAM32	<i>C. tropicalis</i>	0,025	NT	>200	NT	50	>200	NT	25	NT
HAM33	<i>C. tropicalis</i>	16,0	NT	>200	>200	200	50	NT	NT	200
HAM34	<i>C. albicans</i>	8,0	NT	NT	>200	200	>200	100	50	200
HAM35	<i>C. albicans</i>	8,0	NT	NT	200	NT	>200	NT	100	NT
HAM36	<i>C. parapsilosis</i>	8,0	NT	>200	NT	50	50	>200	200	>200
HAM38	<i>C. albicans</i>	4,0	NT	100	50	NT	200	NT	NT	NT
HAM43	<i>C. tropicalis</i>	32,0	NT	>200	NT	200	NT	>200	NT	200

FLU=fluconazol; NT=não testado.

Os derivados tiofênicos AG-4, AG-5, AG-7 e AG-8 foram eficazes frente aos isolados testados, com concentrações variando de 25 µg/mL a 200. Ainda, o derivado AG-7 apresentou resultados satisfatórios para os isolados HAM08 *C. lusitaniae* e HAM27 *C. krusei*, com concentração de 25 µg/mL, e para o isolado HAM06 *C. tropicalis*, com concentração de 50 µg/mL. Assim como nos trabalhos de Araújo Neto e colaboradores (2017), onde uma série de derivados tiofênicos apresentaram atividade antifúngica contra cepas do gênero *Candida*.

Além disso, o estudo conduzido ainda por Araújo Neto e colaboradores (2017) destacou a importância da ligação de um grupamento NH ligado ao anel aromático da molécula como um requisito fundamental para a manifestação da atividade antifúngica. Ainda, a introdução do nitrogênio no anel de piridina confere maior eletronegatividade, gerando uma diferença eletrônica que aprimora a interação do composto com o seu alvo biológico. Além dessas constatações, foi declarado que os derivados tiofênicos têm sido alvo de investigações significativas, graças à atividade antifúngica que apresentam, acompanhada de uma citotoxicidade moderada.

5.3 INDUÇÃO E FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ESPÉCIES DE *Candida*

Todos os isolados foram capazes de formar biofilme. De acordo com Oliveira e colaboradores (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* teve alta formação de biofilme, quando comparado a *C. albicans* que não produziu biofilme. Os autores relataram alta patogenicidade das cepas, incluindo resistência a vários antifúngicos.

Soldini e colaboradores, (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 comparados aos isolados de baixa intensidade.

31

A formação do biofilme, em associação com sua intensidade e biomassa, influencia diretamente as taxas de letalidade em indivíduos acometidos por candidemia, representando um elemento de virulência que demanda uma intervenção terapêutica apropriada para garantir a sobrevivência do paciente (SOLDINI et al., 2017).

5.4 TRATAMENTO DO BIOFILME DE ESPÉCIES DE *Candida*

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. Foi observado que em todos os isolados, os derivados tiofênicos apresentaram uma boa resposta ao tratamento dos biofilmes.

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

Sun e colaboradores, (2017), estudaram um composto de Tiossemicarbonas, chamado NSC319726, e observaram uma atividade antifúngica significativa frente a *Candida*. Foi observado que a droga isolada foi capaz de inibir o crescimento de isolados de *C. albicans* e isolados de *C. krusei* resistentes ao fluconazol, concordando com nosso estudo. Ainda, relatam um bom sinergismo das drogas combinadas. Portanto, os estudos com derivados tiofênicos devem continuar para que possam se tornar uma possível alternativa terapêutica, diante de tantas dificuldades de estabelecimentos de terapias antifúngicas eficientes e eficazes. Portanto, são necessárias mais pesquisas.

6 CONCLUSÃO

Diante destes achados, torna-se patente a disparidade nas concentrações inibitórias mínimas evidenciadas nos isolados de *Candida* perante o fluconazol, com notáveis casos de resistência. A maioria dos compostos derivados do tiofeno empregados na análise ostentou atividade antifúngica contra células planctônicas provenientes de diferentes cepas clínicas de *Candida*, com variações significativas tanto entre cepas da mesma espécie quanto entre distintas espécies.

É de notar que os derivados tiofênicos AG3 e AG7 apresentaram capacidade antifúngica diante de biofilmes formados por diferentes espécies de *Candida*. Este fenômeno, presumivelmente, é induzido pela arquitetura molecular que proporciona ao composto tiofênico sua notória eficácia antifúngica.

REFERÊNCIAS

A LEE, R., ZURKO, J. C., CAMINS, B. C., GRIFFIN, R. L., RODRIGUEZ, L. M. MCCARTY, T. P., MAGADIA, J., PAPPAS, P. G. 2018. Impact of Infectious Disease Consultation on Clinical Management and Mortality in Patients With Candidemia. **Clinical Infectious Diseases** , 68(9), 1585-1587.

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-012020CANDIDAAURIS07.12.20202.pdf>

ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I.E.; CONSOLARO, M. E. L., Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Revista J Bras Patol Med Lab** , Maringá, v. 43, n.5, p.319-327, outubro 2007.

ARAÚJO NETO, D. N. L. et al. Chemico-Biological Interactions Synthesis cytotoxicity and antifungal activity of 5-nitro-thiophene-thiosemicarbazones derivatives. **Chemico-Biological Interactions journal** , v. 272, p. 172-181, 2017.

ASADZADEH, M. et al. Rapid molecular differentiation and genotypic heterogeneity among *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis* strains isolated from clinical specimens in Kuwait. **Journal of Medical Microbiol.** v. 58, n.1, p. 745-752, 2009.

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.

BLOIS, M. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature** , v. 181, n. 4617, p. 1199-1200.

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.

CASTANHEIRA, M., MESSER, S. A., RHOMBERG, P. R., & PFALLER, M. A. Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates: results of the Sentry Antifungal Surveillance Program **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** , v.85, p. 200-204, 2016.

CHAI ANN, YI LOUIS, DENNING W, DAVID W, WARN, PETER. *Candida tropicalis* in human disease. **Crit Rev Microbiol** . v. 36, p.282–298, 2010.

CHAKRABARTI, SHARMA M. A. Candidiasis and Other Emerging Yeasts. **Curr Fungal Infect Rep.** v.17, p.15-24, 2023.

CHANG, M. R. et al. *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Inst Med Trop** , v. 50, p. 265-8, 2008.

CIUREA, C. N.; KOSOVSKI, I.-B.; MARE, A. D.; TOMA, F.; PINTEA-SIMON, I. A.; MAN, A. *Candida* and Candidiasis-Opportunism Versus Pathogenicity: A Review of the Virulence Traits. **Microorganisms** , v. 8, n. 6, 6 jun. 2020.

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

CLANCY, CORNELIUS J.; NGUYEN, M. HONG. Diagnosing invasive candidiasis. **Journal of clinical microbiology** , v. 56, n. 5, p. e01909-17, 2018.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard, 3rd ed. **CLSI document M27-A3** . CLSI, Wayne, PA, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; **CLSI document M27-S4** . CLSI, Wayne, PA, 2012.

DA ROCHA, WILMA RAIANNY VIEIRA et al. Gênero *Candida* -Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. **Research, Society and Development** , v. 10, n. 4, p. e43910414283-e43910414283, 2021.

DE MELO CC, DE SOUSA BR, DA COSTA GL, OLIVEIRA MME, DE LIMA-NETO RG. Colonized patients by *Candida auris* : Third and largest outbreak in Brazil and impact of biofilm formation. **Front Cell Infect Microbiol** . v. 23, n.13, 2023.

Diverse Biological and Pharmacological Attributes in Medicinal Chemistry, Eu. diverse medicinal importance. **J. Pharm** . Res, v.5, p. 560-566, 2012. e0139521, 2021.

FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal Biofilms. **PLoS Pathogens** , v. 8, n. 4, p. e1002585, 5 abr. 2012.

FAUVART, M. Role of persisters cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persisters therapies. **Journal of Medical Microbiology**. v.60, p.699-709, 2011.

FERREIRA, A. W. ; ÁVILA, S. L. M. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009 FISHER, F.; COOK, N. B. **Micologia Fundamentos e Diagnóstico** . Livraria e Editora REVINTER Ltda. Rio de Janeiro: Tijuca, 2001.

FREYDIÈRE, A.M., Guinet, R. and Boiron, P. Yeast identification in the clinical microbiology laboratory, phenotypical methods. **Med Mycol** v.39, p. 9–33, 2001.

GHANNOUM, M. et al. The role of echinocandins in *Candida* biofilm-related vascular catheter infections: in vitro and in vivo model systems. *Clinical Infectious Diseases*. v.61, S6, p.618-621, 2015.

GHRENASSIA, E., MOKART, D., MAYAUX, J., DEMOULEM, A., REZINE, I., KERHUEL, L., CALVET, L., JONG, A., AZOULAY, E., DARMON, M. 2019. Candidemia in critically ill immunocompromised patients: report of a retrospective multicenter cohort study: report of a retrospective multicenter cohort study. **Annals Of Intensive Care** , 9(1), 1-10.

GIOLO, MURIEL PADOVANI; SVIDZINSKI, TEREZINHA INEZ ESTIVALET Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 46, n. 3, p. 225–234, 2010.

GOU, Y., WANG, J., CHEN, S., ZHANG, Z, et al. a- 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.

GOULART, LETÍCIA S. et al. Species distribution and antifungal susceptibility to vulvovaginal *Candida* spp. in southern Mato Grosso State, Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** , v. 52, p. 233-237, 2016.

GU, W.; XU, D.; SUN, S. In vitro models to study *Candida albicans* biofilms. *Journal of Pharmaceutics & Drug Development*. v.3, 2015. ISSN: 2348-9782

INÁCIO, C. P.; BESERRA, F. G.; SOARES, C. R. P.; ROMAGUERA, L. M. D.; ARAÚJO, P. S. R. de; BUONAFINA, M. D. S.; ARAÚJO NETO, L. N.; SANTOS, D. C. DOS; NEVES, R. P. 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, 2021.

JALAL, M.; ANSARI, M.A.; ALZOHAIRY, 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.

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

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, I., KANUGALA, S., SHAREEF, M. A., GANAPATHI, T., SHAIK, A. B.,

SHEKAR, K. C., KAMAL, A., KUMAR, C. G. 2019. Synthesis of new bis - pyrazole linked hydrazides and their in vitro evaluation as antimicrobial and anti - biofilm

37

agents: A mechanistic role on ergosterol biosynthesis inhibition in *Candida albicans* .
Chemical Biology & Drug Design , 94 (1)1339- 1351.

KOTEY FC, DAVIE NT, TETTEH-UARCOO PB, DONKOR ES. *Candida* Bloodstream Infections: Changes in Epidemiology and Increase in Drug Resistance. **Infect Dis (Auckl)** . v. 14, p. 117863372110269, 2021.

KRISHNASAMY, L.; RUBINI, D.; SENTHILGANESH, J.; SAIKUMAR, C.; KUMARAMANICKAVEL, G.; ARUNI, A.W.; NITHYANAD, P. Phylogenetic characterization of biofilm forming multidrug resistant *Candida albicans* and Non *albicans Candida* causing vulvovaginal candidiasis. **Gene Reports** , v. 19, n. February, p. 100644, 2020.

KSIEZOPOLSKA, E., GABALDÓN, T. 2018. Evolutionary Emergence of Drug Resistance in *Candida* Opportunistic Pathogens. **Genes** , 9 (9)1-10.

KURTZMAN, C.P, FELL, W.F, BOEKHOUT, T. and ROBERT V. Methods for isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts. In C.P. Kurtzman, J.W Fell, T. Boekhout. **The Yeasts. A taxonomic study** . v. 1, p. 87-107, 2011.

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.

LI, Y. L., LEAW, S. N., CHEN, J. H. et al. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases** , v. 22, p. 693, 2003.

LI, Y.; SUN, L.; LU, C.; GONG, Y.; LI, M.; SUN, S. Promising Antifungal Targets Against *Candida albicans* Based on Ion Homeostasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** , v. 8, p. 286, 2018.

MABKHOT Y. N., KAAL, N. A., ALTERARY, S. MUBARAK, M. S., ALSAYARI, A., MUHSINAH, A. B. 2019. New Thiophene Derivatives as Antimicrobial Agents. **Journal Of Heterocyclic Chemistry**, 56 (10) 2845-2953.

MAGEE BB, R PT. Recent advances in the genomic analysis of *Candida albicans* .
Rev Iberoam Micol . v. 22, p.187–193, 2005.

MCCARTY TP, WHITE CM, PAPPAS PG. Candidemia and Invasive Candidiasis. **Infect Dis Clin North Am** . v. 35, n. 2, p. 389-413, 2021.

MCCULLOUGH, M. J., ROSS, B. C., & READE, P. C. *Candida albicans* : a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery** , v. 25. p.136–144, 1996.

MEDEIROS, M. A. P., MELO, A. P. V., BENTO, A. O., SOUZA, L. B. F. C., BEZERRA NETO, F. A., GARCIA, J. B., ZUZA-ALVES, D. L., FRANCISCO, E. C., MELO, A. S. A., CHAVES, G. M. 2019. Epidemiology and prognostic factors of nosocomial candidemia in Northeast Brazil: A sixyear retrospective study. **Plos One** , 14 (8), 1-15.

MONI M, SIDHARTHAN N, SUDHIR S, PRABHU B, NAMPOOTHIRI V, JAMES J, PHILIP JM, THOMAS J, ANTONY R, MOHAMED ZU, KUMAR A, PRASANNA P, EDATHADATHIL F, SINGH S, SATHYAPALAN D. A quality improvement initiative to improve the appropriateness of candidemia management by the implementation of a comprehensive candidemia care bundle at a tertiary care hospital in South India: Results of a quasi-experimental study. **Medicine (Baltimore)**. v. 101, (p).e- 28906, 2022.

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

NOBILE CJ, JOHNSON AD. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Annu Rev Microbiol** . v. 69, p. 71-92, 2015.

NUCCI, M., BARREIROS, G., GUIMARÃES, L. F., DERIGUEHEM, V. A. S., CASTIÑEIRAS, A. C., NOUÉR, S. A. 2020. Increased incidence of candidemia in a tertiary care hospital with the COVID - 19 pandemic. **Mycoses** , 64 (2),152-156.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology** , v. 11, n. 6, p. 272–279, jun. 2003.

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

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.e1-e50, 2016.

PAPPAS, P. G. et al. The NIAID Mycoses Study Group: a prospective observational study of candidemia, epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. **Clin Infect Dis**, v. 37, p. 634-43, 2003.

PAPPAS, PETER G.; LIONAKIS, MICHAEL S.; ARENDRUP, MAIKEN CAVLING; OSTROSKY-ZEICHNER, LUIS; KULLBERG, BART JAN. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers** . 2018.

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

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

S. SOLDINI, B. POSTERARO, A. VELLA, E. DE CAROLIS, E. BORGHI, M. FALLENI, A. R. LOSITO, G. MAIURO, E. M. TRECARICHI, M. SANGUINETTI, M. TUMBARELLO. Microbiologic and clinical characteristics of biofilm-forming *Candida parapsilosis* isolates associated with fungaemia and their impact on mortality, **Clinical Microbiology and Infection**. v. 24, n. 7, p. 771-777, 2018.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 261, 266.

SILVA, KASSIA GABRIELA VIEIRA et al. Morfologia, epidemiologia e virulência de espécies do gênero *Candida* . **Tópicos nas ciências da saúde** . v. 7, p. 42-58, 2021.

SÜLEYMANOĞLU, N., USTABAS, R., ÜNVER, Y., ALPASLAN, Y. B., DIREKEL, Ş., KARAMAN, Ü. 2019. 5- Phenyl thiophene aminophenol derivatives: synthesis,

spectroscopic characterization, computational study and antimicrobial activity. : Synthesis, spectroscopic characterization, computational study and antimicrobial activity. **Journal Of Molecular Structure** , (1182).

Sun N, Li D, ZHANG Y, KILLEEN K, GROUTAS W, CALDERONE R. 2017. Reaproveitando um inibidor da biogênese ribossômica com ampla atividade antifúngica . **Representante Científico** 7 : 17014.

TAKASHIMA M, SUGITA T. Taxonomy of Pathogenic Yeasts *Candida* , Cryptococcus, Malassezia, and Trichosporon. **Med Mycol J.** v. 63, n. 4, 2022.

TSCHERNER M, TOBIAS W. Giessen, LAURA Markey, CAROL A. KUNAMOTO, and PAMELA A. Silver. A Synthetic System That Senses *Candida albicans* and Inhibits Virulence Factors. **ACS Synthetic Biology** v. 8, n. 2, p. 434-444, 2019.

XU, J., RAMOS, A.R., VILGALYS, R., MITCHELL, T.G. Clonal and spontaneous origins of fluconazole resistance in *Candida albicans* . **J Clin Microbiol.** v. 38, p. 1214–1220, 2000.