



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

IANE LARA DA FONSECA GONÇALVES

**EFEITO SINÉRGICO E ANTIBIOFILME DE TERPENOS
ASSOCIADOS A ANTIFÚNGICOS CONVENCIONAIS SOBRE CEPAS
DE *Candida glabrata***

Recife

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

IANE LARA DA FONSECA GONÇALVES

**EFEITO SINÉRGICO E ANTIBIOFILME DE TERPENOS
ASSOCIADOS A ANTIFÚNGICOS CONVENCIONAIS SOBRE CEPAS
DE *Candida glabrata***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Patologia.

Linha de Pesquisa: Aspectos Biotecnológicos E Microbiológicos Aplicados A Patologia
Projeto de Pesquisa: Métodos Aplicados Ao Estudo De Novas Drogas Sobre Fatores De Virulência Microbianos

Orientador: Prof^ª. Dra. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes
Departamento de Antibióticos, CCB/UFPE.

Recife, 2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

G635e Gonçalves, Iane Lara da Fonseca.
 Efeito sinérgico e antibiofilme de terpenos associados a antifúngicos
 convencionais sobre cepas de *Candida glabrata* / Iane Lara da Fonseca
 Gonçalves. – 2017.
 79 f.: il.; tab.; 30 cm.

 Orientadora: Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
 CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Recife, 2017.
 Inclui referências.

 1. *Candida glabrata*. 2. Sinergismo. 3. Biofilmes. I. Ximenes, Eulália
 Pessoa de Azevedo (Orientadora). II. Título.

616.07

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2017-334)

IANE LARA DA FONSECA GONÇALVES

**EFEITO SINÉRGICO E ANTIBIOFILME DE TERPENOS
ASSOCIADOS A ANTIFÚNGICOS CONVENCIONAIS SOBRE CEPAS
DE *Candida glabrata***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Patologia.

Aprovada em: 01/09/2017.

Banca examinadora:

Profª Drª Rejane Pereira Neves
Examinadora Interna

Prof Drº Reginaldo Gonçalves de Lima Neto
Examinador Interno

Profª Drª Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque
Examinadora Externa (Deptº Medicina Tropical – UFPE)

Aos meus amados pais,
dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus sobre todas as coisas, que com o Seu amor, cuidado e misericórdia, tirou-me do fundo de uma depressão e me deu a oportunidade de aprender, crescer, amadurecer, e de ter mais fé, sabedoria e paciência.

Aos meus pais, que com o seu amor, cuidado e paciência, suportaram-me por todos esses anos; por serem a minha base, por sempre incentivar a nunca desistir; e por me auxiliarem na múltipla jornada. Sem vocês, com total certeza, nunca teria conseguido.

À minha professora e orientadora Eulália Ximenes, que me recebeu de braços abertos, pelos seus ensinamentos, paciência, longas conversas, e por ter acreditado que apesar de toda a minha limitação de tempo, eu conseguiria completar esta longa e prazerosa jornada.

Aos professores e ao programa de Pós-Graduação em Patologia da UFPE pela oportunidade de aprender mais.

Às meninas do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos, em especial a Liliane e a Luanne, pela paciência; por terem me ensinado os primeiros passos; pelas longas tardes e noites de conversas, autoclavação e descontaminação; e pelos longos finais de semanas juntas, trabalhando arduamente.

Às minhas coordenadoras (Guilene, Danyelle, e Ducilene) pelo incentivo e apoio, sem a compreensão de vocês seria impossível conciliar o trabalho com o mestrado.

Aos técnicos do Departamento de Antibióticos, em especial a Sr Luiz, pelas inúmeras autoclavações e descontaminações de materiais.

Ao meu namorado por compreender minha escassa falta de tempo, e por sempre me apoiar e incentivar.

A todos, meu muito obrigada!

"Sou grato a todos aqueles que disseram 'não' para mim. Por causa deles, eu mesmo fiz."

(Albert Einstein)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A- Microfotografia apresentando leveduras globosas e brotantes, Gram positivas de <i>Candida glabrata</i> . (aumento de 1000x); B- Microfotografia de <i>C. albicans</i> , mostrando leveduras globosas, e a formação de pseudo-hifas e micélio (aumento de 200x).	18
Figura 2: Estrutura da Parede da Célula Fúngica.	18
Figura 3: Coloração de Gram de leveduras de <i>Candida glabrata</i> LFBM 686.	24
Figura 4: Colônias de <i>Candida glabrata</i> LFBM 902 em Ágar Sabouraud Dextrose (Cultura de 48 horas a 35°C).	25
Figura 5: Diferentes fenótipos de <i>Candida glabrata</i> cultivada por 5 dias a 25° C, na presença de sulfato de cobre (CuSO ₄), mostrando, respectivamente, colônias lisas-branca, marrom claro, marrom escuro e marrom muito escuro; e branca rugosa.	25
Figura 6: Diagrama das etapas de formação do biofilme. a- Adesão; b-Formação das microcolônias; c- Maturação do biofilme; d- Biofilme maduro.	29
Figura 7: Alvos celulares dos Agentes Antifúngicos.	33
Figura 8: Estruturas Moleculares de Antifúngicos Poliênicos. A) Anfotericina B; B) Nistatina.	34
Figura 9: : Estruturas Moleculares de Antifúngicos Azólicos: A- imidazólico (Cetoconazol); B- triazólico de primeira geração (Fluconazol).	36
Figura 10: Estruturas Moleculares das Equinocandinas: A- caspofungina; B- micafungina; C- anidulafungina.	37
Figura 11: Esquema de três mecanismos de resistência encontrados em células fúngicas: efluxo das drogas (1); alteração nos sítios de ligação do fármaco (2); e utilização de vias compensatórias (3).	40
Figura 12: Estrutura química do Limoneno.	45
Figura 13: Estrutura química do Eucaliptol	46
Figura 14: Estrutura química do Citral.	46
Figura 15: Estruturas químicas: A) Geranial; B) Neral.	47
Figura 16: Crescimento de Colônias de leveduras de coloração lilás, incubadas no meio CHROMagar durante 48h a 35°C, presuntivo de <i>Candida glabrata</i> .	55
Figura 17: Microfotografia apresentando células de leveduras, hialinas e unibrotantes após cultivo de três horas de incubação a 37°C crescidas em “pool” de soro humano (aumento 1000x).	56
Figura 18: Testes bioquímicos presuntivo de <i>C. glabrata</i>	56
Figura 19: Determinação da Atividade Antifúngica da Associação Citral/Fluconazol frente à <i>Candida glabrata</i> . A- Ensaio Checkerboard ATCC 90030; B- Isobograma ATCC 90030; C- Ensaio Checkerboard LFBM CG 686; D- Isobograma LFBM CG 686.	61
Figura 20: Atividade do citral sobre o biofilme de <i>Candida glabrata</i> . A- Cultura de <i>C. glabrata</i> ATCC 90030 incubada por 48h; B- Cultura de <i>C. glabrata</i> ATCC 90030 incubada por 48 h com citral (10 µg/mL); C- Cultura de <i>C. glabrata</i> LFBM CG 686 incubada por 72h;; D- Cultura de 48h de <i>C. glabrata</i> LFBM CG 686 tratada durante 24h com citral (10 µg/mL).	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela 1: Estudos epidemiológicos de infecções por <i>Candida</i> no período de 2004 a 2017.	21
Tabela 2: Atividade de antifúngios convencionais e terpenos frente a cepas de <i>Candida glabrata</i> .	58
Tabela 3: Avaliação <i>in vitro</i> das interações entre antifúngicos/terpenos frente à <i>Candida glabrata</i> .	60
Tabela 4: Atividade do citral sobre o biofilme de <i>Candida glabrata</i> .	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Aed1p	<i>Adherence to Endothelial cells</i>
ANF B	Anfotericina B
AOX	<i>Alternative Oxidase (Oxidase Alternativa)</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
BrSCOPE	<i>Brazilian Surveillance and Control os Pathogens of Epidemiologic Importance</i>
CDR	<i>Candida drug resistance</i>
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CG	<i>Candida glabrata</i>
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIT	Citral
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CV	Cristal Violeta
DMAPP	Difosfato de Dimetilalilo
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)</i>
EPA	<i>Epithelial Adhesion</i>
ERG	<i>Ergosterol Synthesis-Associated</i>
EUC	Eucaliptol
FLZ	Fluconazol
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
H⁺	Íons Hidrogênio
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionária
IL- 1β	<i>Interleukin 1 beta</i>
IPP	Isopentenil

LFBM	Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos
LIM	Limoneno
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
MEP	Matriz Extracelular Polimérica
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MICF	Micafungina
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
NaOH	Hidróxido de Sódio
PBS	Tampão Salino Fosfato
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia de Polimerase)
Pwp7p	<i>PA14 domain containing Wall Protein</i>
QS	<i>Quorum Sensing</i>
QSM	Moléculas de <i>Quorum Sensing</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies Reativas de Oxigênio)
RPMI	Meio de cultivo <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
Ser	Serina
Slf2	<i>Mitogen-activated serine/threonine</i>
Thr	<i>Treonine</i>
TNF - α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
UFC	Unidade Formadoras de Colônias
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
v/v	Concentração volume/volume
YPG	Meio de cultivo com Levedura-Peptona-Glicose

RESUMO

Candida glabrata é um fungo comensal presente na cavidade oral, na vagina e no trato gastrointestinal de humanos, podendo causar micoses oportunistas em pacientes imunocomprometidos. Esta levedura é intrinsecamente resistente ao fluconazol e rapidamente adquire resistência aos azólicos durante o tratamento. Devido a essa resistência de *C. glabrata*, a pesquisa por novos medicamentos e terapias antifúngicas são objeto de estudo de inúmeros cientistas. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica de três terpenos (limoneno, eucaliptol e citral) e de três antifúngicos convencionais (anfotericina B, fluconazol e micafungina), determinar o potencial sinérgico da interação do terpeno mais eficaz com o antifúngico que apresentou menor atividade e analisar a atividade antibiofilme, frente a cepas de *C. glabrata*. Inicialmente foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos terpenos e antifúngicos sobre cepas de *C. glabrata* (n=9), sendo uma ATCC 90030. O estudo das associações entre os terpenos e os antifúngicos foi realizado através do método de *checkerboard* frente a cinco cepas de *C. glabrata*, usando como critério de avaliação a determinação do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FIC Index). A atividade do terpeno mais eficaz sobre o biofilme de *C. glabrata* foi determinada a partir da inibição na formação do biofilme e do tratamento do biofilme formado. Todas as cepas de *C. glabrata* revelaram um perfil de resistência ao fluconazol, e sensível a micafungina. A anfotericina B mostrou-se eficaz sobre sete cepas. O citral foi o terpeno mais eficaz. As associações fluconazol/limoneno e fluconazol/eucaliptol mostraram-se ineficazes. Concentrações sub-inibitórias do citral ($\leq 0,5 \times \text{CIM}$) aumentaram a atividade do fluconazol apresentando uma redução da CIM $\geq 87,5\%$ e valores do Índice Concentração Inibitória Fracionada que variaram entre 0,19 – 0,37. Foi observado que o citral é eficaz sobre o biofilme de *C. glabrata*. Assim, os resultados obtidos indicaram que o citral pode contribuir para os novos caminhos para a terapêutica alternativa das infecções por *C. glabrata*.

Palavras-chave: *Candida glabrata*. Sinergismo. Biofilmes.

ABSTRACT

Candida glabrata is a commensal fungus that is present in the oral cavity, vagina and gastrointestinal tract of humans and may cause opportunistic mycosis in immunocompromised patients. This yeast is intrinsically resistant to fluconazole and rapidly acquires resistance to azoles during treatment. Due to this resistance of *C. glabrata*, the research for new drugs and antifungal therapies are the object of study of countless scientists. The aim of this study was to evaluate the antifungal activity of three terpenes (limonene, eucalyptol and citral) and three conventional antifungals (amphotericin B, fluconazole and micafungin), to determine the synergistic potential of the most effective terpene interaction with the antifungal presented lower activity and analyzed the antibiofilm activity, compared to strains of *C. glabrata*. The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of the terpenes and antifungals on strains of *C. glabrata* (n = 9) was determined, being an ATCC 90030. The study of the associations between the terpenes and the antifungals was done through the method of checkerboard against five strains of *C. glabrata*, using as an evaluation criterion the Index of Fibular Inhibitory Concentration (FIC Index). The most effective terpene activity on the biofilm of *C. glabrata* was determined from the inhibition in the formation of the biofilm and the treatment of the formed biofilm. All strains of *C. glabrata* showed a fluconazole resistance profile, sensitive to micafungin. Amphotericin B was effective on seven strains. Citral was the most effective terpene. The fluconazole / limonene and fluconazole / eucalyptol associations were found to be ineffective. Sub-inhibitory concentrations of citral ($\leq 0.5 \times \text{MIC}$) increased the activity of fluconazole with MIC reduction $\geq 87.5\%$ and Fractional Inhibitory Concentration Index values ranging from 0.19-0.37. It was observed that citral is effective on the biofilm of *C. glabrata*. Thus, the results indicated that citral may contribute to the new pathways for alternative therapy of *C. glabrata* infections.

Keywords: *Candida glabrata*. Synergism. Biofilms.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	Gênero <i>Candida</i>	17
2.1.1	Epidemiologia	21
2.2	<i>Candida glabrata</i>	23
2.2.1	Fatores de Virulência de <i>Candida glabrata</i>	26
2.3	Tratamento	32
2.3.1	Antifúngicos Poliênicos	33
2.3.2	Antifúngicos Azólicos	35
2.3.3	Equinocandinas	36
2.4	Resistência Antifúngica	38
2.4.1	Indução de Bombas de Efluxo de Drogas	40
2.4.2	Alteração dos Ligantes	40
2.4.3	Vias Alternativas Catabólicas e Compensatórias	41
2.4.4	Biofilme	42
2.5	Terapias Alternativas	42
2.5.1	Terpenos	44
3	OBJETIVOS	48
3.1	Objetivo geral	48
3.2	Objetivos específicos	48
4	MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1	Microrganismos	49
4.2	Cultura, manutenção e preparação de inóculo	49

4.3	Cultivo em CHROMagar Candida	50
4.4	Prova do Tubo Germinativo	50
4.5	Testes Bioquímicos	50
4.6	Antifúngicos e Monoterpenos	50
4.7	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	51
4.8	Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	52
4.9	Determinação da Atividade Antifúngica da Associação Monoterpenos/Antifúngicos - Ensaio <i>Checkerboard</i>	52
4.10	Formação de Biofilme	53
4.11	Tratamento do biofilme formado	53
4.12	Atividade antiformação do biofilme	54
4.13	Análise Estatística	54
5	RESULTADOS	55
5.1	Identificação das Leveduras	55
5.1.1	Crescimento em meio CHROMagar Candida	55
5.1.2	Prova do tubo germinativo	55
5.1.3	Testes Bioquímicos	56
5.2	Atividade Antifúngica	56
5.3	Ensaio <i>Checkerboard</i>	59
5.4	Biofilme	62
6	DISCUSSÃO	65
7	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas nosocomiais tem se tornado cada vez mais frequente, sobretudo por fungos emergentes como *Candida glabrata*, um agente etiológico oportunista, com elevada distribuição epidemiológica, capaz de causar infecções sistêmicas, contribuindo para os altos índices de morbidade/mortalidade. Essa crescente incidência, pode ser atribuída ao aumento do número de pacientes imunocomprometidos, a população idosa, de melhores abordagens diagnósticas, assim como dificuldade na terapêutica (Roy e Thompson, 2015; Bouklas et al, 2017).

A condição de patógeno oportunista faz *C. glabrata* necessitar de evadir-se do sistema imunológico, sobreviver, e reproduzir-se no ambiente do hospedeiro. Para tanto, apresentam uma série de fatores, que auxiliem o estabelecimento da infecção, como capacidade de adesão, formação de biofilme, produção de enzimas, e resistência ao estresse oxidativo (Silva et al, 2012; Rodrigues et al, 2014). Particularmente, os biofilmes são comunidades tridimensionais de microrganismos incorporadas em uma matriz extracelular, que se desenvolvem em superfícies bióticas ou abióticas. Eles são formados por um processo bem organizado, que progride através de estágios coordenados, tornando as colônias de *Candida* mais resistente às defesas do hospedeiro e o tratamento antifúngico (Martinez e Fries, 2010; Taff et al, 2013; d'Enfert e Janbon, 2016).

No tratamento das infecções ocasionadas por *C. glabrata*, há limitação à três classes de antifúngicos (poliênicos, azoles e equinocandinas). O sucesso da terapêutica depende da implementação do tratamento antifúngico adequado, que conduz a cura do paciente, diminuição dos custos e das taxas de morbidade/mortalidade (Roemer e Krysan, 2014; Bassetti et al, 2016).

Em decorrência das diversas estratégias de resistência desenvolvidas pelos fungos, e das limitadas opções terapêuticas para esse tipo de infecção, existe, atualmente, uma incessante busca científica por novas opções terapêuticas mais eficazes e menos tóxicas (Spampinato e Leonardi, 2013; Butts et al, 2017).

Assim, terpenos são metabólitos secundários de produtos naturais de maior interesse farmacológico, apresentam ação diversificada, e são encontrados em quase todas as formas de vida. Possuem estrutura típica formada por unidades de isopreno (C_5H_8), e podem desempenhar atividade antifúngica através da granulação citoplasmática, ruptura da

membrana, e inativação e/ou inibição da síntese de enzimas intra e extracelulares (Marei et al, 2012; Oldfield e Lin, 2012; Viriato, 2014; Singh e Sharma, 2015).

Considerando a importância epidemiológica, a patogenicidade da *C. glabrata* e a limitação da utilização da terapia convencional, o presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade antifúngica de três terpenos (limoneno, eucaliptol e citral) e de três antifúngicos convencionais (anfotericina B, fluconazol e micafungina), determinar o potencial sinérgico da interação do terpeno mais eficaz com o antifúngico que apresentou menor atividade e analisar a atividade antibiofilme deste terpeno, frente a cepas de *C. glabrata*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Gênero *Candida*

O aumento na expectativa de vida, o aprimoramento na terapia das doenças infecto-contagiosas e neoplásicas, as intervenções cirúrgicas, os transplantes de órgãos, e os longos períodos de internação; induziram um aumento dos índices de infecções por patógenos oportunistas, e os fungos são um dos principais. Dentro deste contexto as leveduras do gênero *Candida* são um dos mais prevalentes agentes etiológicos de infecções relacionadas com a assistência à saúde (IRAS) (Yapar, 2014).

As infecções nosocomiais são aquelas adquiridas após a admissão do paciente no hospital, que acontece geralmente após 48 a 72 horas de internação, ou mesmo após a alta, quando esta estiver correlacionada à hospitalização. Este tipo de infecção é um dos mais importantes e frequentes complicador da internação, podendo essa ser localizada ou sistêmica. As infecções fúngicas nosocomiais podem ter como sítios a corrente sanguínea (fungemia), o trato urinário, a ferida cirúrgica, os abscessos subcutâneos relacionados e o músculo cardíaco (Da Silva et al, 2014).

As espécies de *Candida* são consideradas patógenos importantes por sua versatilidade e habilidade de sobreviver em vários sítios anatômicos. São taxonomicamente classificadas como pertencente ao reino Fungi, grupo Eumycota, filo Deuteromycota, classe Blastomycetes, Família Cryptococcacea. E apresentam-se como um grupo heterogêneo com cerca de 150 espécies conhecidas, com aproximadamente 15 sendo isoladas e associadas à infecções, a saber: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. pelliculosa*, *C. rugosa*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. norvegensis*, *C. lipolytica* e *C. inconspicua* (Dalazen et al, 2011; Sardi et al, 2013; Yapar, 2014).

Aproximadamente 90% dos casos das infecções tem como responsáveis *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. Estas espécies possuem diferenças na sua distribuição geográfica, e *C. albicans* faz parte da microbiota autóctone desse modo (Guinea, 2014).

As características das leveduras variam entre espécies, podendo as que representam o gênero *Candida* ter células globosas, ovaladas ou alongadas, que podem ou não formar

micélio, hifas e pseudo-hifas (Figura 1). Este gênero assemelha-se aos demais eucariotos, apresentando as duas particularidades comuns a outros fungos, possuindo uma membrana rica em ergosterol e uma parede celular composta por quitina, β -glucano e mananoproteínas (Figura 2) (Cheng et al, 2012; Da Silva et al, 2014).

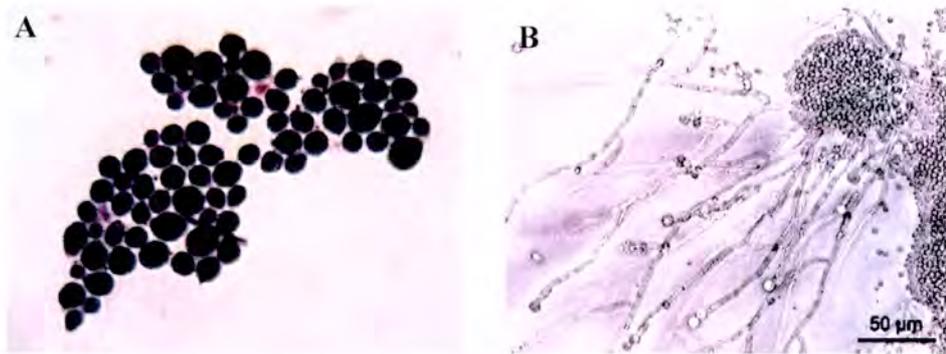


Figura 1: A- Microfotografia apresentando leveduras globosas e brotantes, Gram positivas de *Candida glabrata*. (aumento de 1000x); B- Microfotografia de *C. albicans*, mostrando leveduras globosas, e a formação de pseudo-hifas e micélio (aumento de 200x).

Fontes: a)Foto da autora; b) <http://nutritiongang.com/digestive-issues-causes-solutions/>

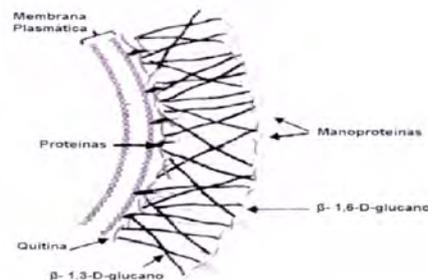


Figura 2: Estrutura da parede da célula fúngica.

Fonte:<http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%205/AQM5quitosan.html>

Algumas espécies de *Candida* são consideradas como fungos oportunistas e integram a microbiota normal da pele, das mucosas da cavidade oral, do trato gastrointestinal e do canal vaginal. Este gênero é responsável por várias manifestações clínicas, desde o comprometimento mucocutâneo até infecções sistêmicas. As infecções na pele e mucosas ocorrem comumente em pacientes imunocompetentes, devido a pequenas alterações locais da resposta do hospedeiro no sítio de infecção. As candidemias, por sua vez, envolvem desde episódios isolados da presença do fungo na corrente sanguínea, até a disseminação para órgãos e tecidos do hospedeiro (Colombo e Guimarães, 2003; Sardi et al, 2013; Da Silva et al, 2014).

O desequilíbrio entre as leveduras e outros microrganismos da microbiota da qual faz parte, propicia o estabelecimento da candidíase. O imunocomprometimento do hospedeiro era considerado como único mecanismo responsável pelo estabelecimento da infecção oportunista. Contudo, a fisiopatologia da doença, e a participação do microrganismo com seus fatores de virulência, são importantes para o estabelecimento da infecção. Os principais fatores de virulência incluem: aderência; dimorfismo; *switching* ou variabilidade fenotípica, que são alterações morfológicas das colônias, das propriedades de superfície celular e da susceptibilidade aos antifúngicos; produção de toxinas e enzimas extracelulares, como proteinases e fosfolipases; assim como a formação de biofilmes (Sardi et al, 2013; Da Silva et al, 2014).

As candidíases mucocutâneas podem ser divididas: infecções não genital, principalmente na orofaringe; e genitourinária, caracterizada por vulvovaginite, balanite e balanopostite e candidúria - presença de leveduras no exame direto de urina. Essas infecções são comuns em indivíduos imunocompetentes e em imunocomprometidos, entretanto a candidúria é prevalente entre os neonatos e imunossuprimidos. Essas infecções urinárias caracterizam-se por serem ascendentes, podendo formar múltiplos micro abscessos ao longo do córtex renal, e desencadear um quadro de fungemia (Achkar e Fries, 2010; Da Silva et al, 2014).

Espécies do gênero *Candida* por serem comensais da cavidade oral estão presentes em cerca de 30 a 35% da população adulta sem causar infecção. Todavia, em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), com doenças imunossupressoras, usuários de próteses dentárias ou aparelhos ortodônticos; podem causar infecções com formas clínicas variadas. Essas formas de candidíase podem ser pseudomembranosa, eritematosa, hiperplásica e mucocutânea (Dalazen et al, 2011).

A candidíase vulvovaginal caracteriza-se pela presença de lesões na vulva e vagina, com prurido, ardência e corrimento esbranquiçado. Ocorre em mulheres na fase reprodutiva, principalmente entre grávidas, diabéticas, sob antibioticoterapia prolongada, ou as que utilizam contraceptivos orais. A estimativa era que ao menos 75% das mulheres iriam apresentar um quadro de vulvovaginite fúngica durante a sua vida, com taxas de recidivas entre 40 e 50% (Dalazen et al, 2011).

Os pacientes portadores de candidemia, podem apresentar episódios de fungemia transitório e autolimitado, ou quadros de candidíase hematogênica disseminada com invasão tecidual e sepse. A maioria das candidemias são decorrentes de uma via endógena, decorrente da translocação do patógeno do trato gastrointestinal, que é o principal sítio de colonização.

Assim, qualquer evento que cause o desequilíbrio da microbiota ou lesão da mucosa gastrointestinal, pode ser um facilitador da translocação até os capilares mesentéricos. As candidemias adquiridas são por via exógena, através do contato direto de profissionais de saúde ou de instrumentos médico-hospitalares contaminados (Colombo e Guimarães, 2003; Savastano et al, 2016).

A frequência das IRAS por *Candida* tem aumentado no mundo todo, e tem sido acompanhada de uma relação entre morbidade e mortalidade altas, principalmente em pacientes imunocomprometidos e/ou hospitalizados portadores de doenças graves. Em alguns países, as hemoculturas positivas para a presença de espécies de *Candida* ocupam a quarta posição em relação às infecções sanguíneas nosocomiais, tendo *C. albicans* como a espécie mais frequente, muito embora nos últimos anos tenha ocorrido um aumento das espécies de *Candida* não-*albicans*, principalmente de *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata* (Sardi et al, 2013; Guinea, 2014; Savastano et al, 2016).

Dependendo do tipo de população estudada, da região demográfica e do sítio anatômico analisado, a ordem da incidência entre as diferentes espécies de *Candida* é modificada. Devido a esta variabilidade, foi necessário o desenvolvimento de métodos rápidos para a classificação taxonômica. As técnicas convencionais para a identificação de *Candida* são baseadas em métodos bioquímicos (fermentação e assimilação de carboidratos), habilidade de formar tubos germinativos a 37°C em soro humano ou de coelho, produzir clamidoconídios após crescimento em ágar farinha de milho com Tween 80, e a utilização de meios cromogênicos, como o CHROMagar *Candida* (Araujo et al, 2005; Furlaneto-Maia et al, 2007).

O CHROMagar *Candida* é um meio seletivo e diferencial, que altera a coloração das colônias por meio de indicadores de pH e fermentação de compostos específicos. A variação de coloração das colônias das diversas espécies de *Candida* facilita a detecção, fornecendo resultados presuntivos: verde - *C. albicans*; azul - *C. tropicalis*; rosa com aspecto rugoso - *C. krusei*; lilás - *C. glabrata*; rosa com aspecto liso - *C. parapsilosis*. Ainda outras identificações utilizam meios mais elaborados, como o MALDI-TOF, baseado na espectrometria de massas para análise proteômica dos microrganismos; e métodos moleculares, baseados na detecção de sequências espécies-específicas, pela utilização da reação de amplificação em cadeia pela polimerase (PCR). Ademais, todas essas características contribuem para o melhor conhecimento epidemiológico (Araujo et al, 2005; Furlaneto-Maia et al, 2007; Hrabak et al, 2013).

2.1.1 Epidemiologia

Na distribuição das infecções por *Candida* existe variações geográficas significativas, as quais foram documentadas em estudos realizados em diferentes países. Alguns destes foram compilados e documentados na Tabela 1 abaixo, a fim de observar a localização geográfica, a origem das amostras e as espécies mais incidentes.

Tabela 1: Estudos epidemiológicos de infecções por *Candida* no período de 2004 a 2017.

Referências	Região/País	Origem das amostras	Incidência das espécies de <i>Candida</i>	Observações
Crocco et al (2004)	Brasil (São Paulo)	Unhas Pele	<i>C. albicans</i> (76%) <i>C. krusei</i> (19%)	
Furlaneto-Maia et al (2007)	Brasil (Paraná)	Secreção vaginal Escarro Pele e de unha	<i>C. albicans</i> (89% secreção vaginal, 75% escarro, 28% raspado de pele, 11% raspados de unha) <i>C. glabrata</i> (29% raspados de unha, 14% raspados de pele, 1,7% secreção vaginal) <i>C. tropicalis</i> (25% amostras de escarro, 11% raspados de unhas, 1,7% secreção vaginal) <i>C. krusei</i> (28% raspados de pele, 23% raspados de unha, 5,1% secreção vaginal)	
Dalazen et al	Brasil	Secreções das	Nas amostras da	Os isolados eram de

(2011)	(Região Sul)	mucosas oral e vaginal	<p>Cavidade oral: <i>C. albicans</i> (47%) <i>C. tropicalis</i> (30%) <i>C. krusei</i> (20%) <i>C. glabrata</i>; (3,3%)</p> <p>Secreção vaginal: <i>C. albicans</i> (57%) <i>C. krusei</i> (20%) <i>C. tropicalis</i> (13%) <i>C. glabrata</i> (10%)</p>	recidivas, e os agentes etiológicos demonstraram-se resistentes a anfotericina B (97% - 100%), fluconazol (93%-100%) e miconazol (73% - 93).
Nucci et al (2013)	América Latina (Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Equador, Honduras e Venezuela)	Sangue	<i>C. albicans</i> (37,6%) <i>C. parapsilosis</i> (26,5%) <i>C. tropicalis</i> (17,6%) <i>C. guilliermondii</i> (6,5%) <i>C. glabrata</i> (6,3%)	O índice mais alto de <i>C. glabrata</i> foi observado no Brasil.
Yang et al (2014)	Shanghai	Sangue	<i>C. albicans</i> (37,2%) <i>C. parapsilosis</i> (19,8%) <i>C. tropicalis</i> (14,9%) <i>C. glabrata</i> (7,4%)	
Neves-Junior et al (2015)	Brasil (Minas Gerais)	Urina Sangue Cateter Secreção traqueal	<i>C. albicans</i> (44,1%) <i>C. tropicalis</i> (26,28%) <i>C. glabrata</i> (15,1%) <i>C. parapsilosis</i> (7,5%)	
Doi et al (2016)	Brasil	Sangue	<i>C. albicans</i> (34,3%) <i>C. parapsilosis</i> (24,1%) <i>C. tropicalis</i> (15,3%) <i>C. glabrata</i> (10,2%)	As amostras foram provenientes dos hospitais pertencente BrSCOPE (Brazilian Surveillance and Control os Pathogens of Epidemiologic). A taxa de mortalidade observada foi de 72%, sendo considerada 50%

				maior que em outros estudos.
Fathi et al (2016)	Irã	Sangue	<i>C. parapsilosis</i> (45,6%) <i>C. albicans</i> (31,8%) <i>C. glabrata</i> (22,7%)	
Savastano et al (2016)	Brasil	Superfície Hospitalares Mãos e jalecos de profissionais de saúde	<i>C. glabrata</i> (37,62%) <i>C. parapsilosis</i> (25,74%) <i>C. tropicalis</i> (16,83%) <i>C. albicans</i> (9,9%) <i>C. krusei</i> (6,93%)	
Barchiesi et al (2017)	Itália	Sangue	<i>C. albicans</i> (53%) <i>C. parapsilosis</i> (23%) <i>C. tropicalis</i> (11%) <i>C. glabrata</i> (9%)	Taxa de mortalidade de 39%.
Mnge et al (2017)	África do Sul	Urina Secreção vaginal	<i>C. albicans</i> (45,5%) <i>C. glabrata</i> (31,1%) <i>C. tropicalis</i> (12,6%) <i>C. dublinensis</i> (11%)	<i>C. glabrata</i> foi resistente a todos antifúngicos.

As peculiaridades epidemiológicas observadas entre as diferentes espécies de *Candida* evidenciam a necessidade da identificação correta de qual o agente etiológico causador da infecção; e a frequência com que eles ocorrem em determinada região, auxiliam na identificação precoce de possíveis surtos de infecções por *Candida* (Colombo e Guimarães, 2003).

2.2. *Candida glabrata*

Nas infecções fúngicas causadas pelo gênero *Candida*, *C. glabrata* é um dos agentes etiológicos mais frequentes. Esse agente está presente entre as cinco primeiras espécies de

Candida com alta distribuição epidemiológica, nos diversos quadros clínicos ou infecciosos e em várias regiões demográficas (Colombo e Guimarães, 2003; Gasparetto et al, 2005; Furlaneto-Maia et al, 2007; Achkar e Fries, 2010; Nucci et al, 2013). Essa espécie contribui para os altos índices de morbidade e mortalidade das infecções fúngicas nosocomiais ocasionadas por leveduras, sendo a quarta espécie de *Candida* implicada nestas infecções no Brasil (Rodrigues et al, 2014; Bouklas et al, 2017).

A *C. glabrata* é uma espécie emergente, a cada ano vem aumentando os índices de infecções ocasionadas por esta levedura. De todas as infecções sanguíneas relacionadas ao isolamento de *Candida*, 15% é causada por *C. glabrata*. A incidência crescente de infecções por *C. glabrata* pode ser atribuída a um maior número de pacientes imunocomprometidos, a uma população mais idosa, melhores abordagens diagnósticas, dificuldades na terapia antifúngica devido a elevada resistência, e a ampla profilaxia antifúngica empírica, que promove a colonização com espécimes resistentes (Silva et al, 2012; Rodrigues et al, 2014; Roy e Thompson, 2015).

Em relação às características morfológicas, *C. glabrata* é a única espécie que não forma pseudo-hifas a 37 °C, sendo representadas por pequenos blastoconídios de 1 a 4µm (Figura 3). Formam colônias brilhantes, de topografia lisa e de coloração creme (Figura 4), que são indistinguíveis das outras espécies de *Candida*. Ainda foram observada sique em condições específicas de cultivo, presença de sulfato de cobre no meio, ocorria a formação de uma ampla variabilidade fenotípica (*switching*), com colônias apresentando quatro fenótipos distintos (colônias brancas, marrons claros, marrons escuros e marrons muito escuros), e com aspectos liso ou rugoso (Figura 5). Em culturas com mais de 5 dias de cultivo, em condições de baixo teor de nitrogênio, foram visualizados a formação de pseudo-hifas e de tubos semelhantes aos germinativos, que variavam a sua posição entre apical e entre-células (Fidel et al, 1999; Lachke et al, 2002; Silva et al, 2012).

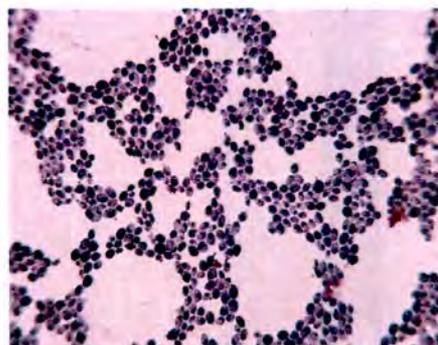


Figura 3: Coloração de Gram de leveduras de *Candida glabrata* LFBM 686.
Fonte: Foto da autora.



Figura 4: Colônias de *Candida glabrata* LFBM 902 em Ágar Sabouraud Dextrose (Cultura de 48 horas a 35°C). Fonte: Foto da autora.



Figura 5: Diferentes fenótipos de *Candida glabrata* cultivada por 5 dias a 25°C, na presença de sulfato de cobre (CuSO₄), mostrando, respectivamente, colônias lisas- branca, marrom claro, marrom escuro e marrom muito escuro; e branca rugosa. Fonte: Foto adaptada de Lachke et al (2002).

Quanto à bioquímica, *C. glabrata* fermenta e assimila apenas glicose e trealose, o que a diferencia das demais, que fermentam e/ou assimilam uma série de açúcares. Com efeito, esta característica é usada por vários laboratórios em seus kits comerciais disponíveis para identificação de leveduras. Em condições aeróbicas estas são eficientes produtoras de álcool (Fidel et al, 1999; Silva et al, 2012; Almshawit et al, 2014).

São capazes de realizar auxotrofia e de se adaptar a diferentes superfícies. Esses fatores podem estar relacionados à sua adaptação como comensal em células humanas (Rodrigues et al, 2014).

Candida glabrata apresenta um genoma haplóide, composto por 13 cromossomos, medindo 12.3Mb, 5807 sequências codificadoras e 493 códons, com características filogenéticas mais próxima de *Saccharomyces cerevisiae*, que de *C. albicans*, demonstrando assim que possuem um ancestral em comum. Rearranjos cromossômicos são observados frequentemente, implicando em constantes remodelamentos do genoma, os quais são regulados pelas condições ambientais nas quais estão expostos. Esta variação genética adaptativa demonstra uma conexão direta com o possível potencial de virulência que este

microrganismo possa apresentar. A presença do gene *Slt2*, e o aumento da expressão deste gene, pode facilitar a sobrevivência das células nos tecidos do hospedeiro, provavelmente por tornar a parede mais resistente a temperaturas elevadas e a condições ácidas (Miyazaki et al, 2010; Ahmad et al, 2014).

Inicialmente foram classificadas taxonomicamente no gênero *Torulopsis*, devido à não formação de pseudo-hifa. No entanto, em 1978, foi determinado que a capacidade de formar pseudo-hifas não era um fator preditivo para a separação das diferentes espécies do gênero *Candida*. Devido à associação como agente etiológico de infecções humanas, *T. glabrata* foi classificado no gênero *Candida* (Fidel et al, 1999).

Durante muitos anos, foi considerado um sapróbio presente na microbiota de indivíduos saudáveis e não associado a infecção grave. A natureza não patogênica em modelos animais, fazia sugerir que possuía poucos fatores de virulência. No entanto, esta ideia foi contrariada pela observação da alta taxa de mortalidade de pacientes com infecções por *C. glabrata*, a dificuldade de tratamento dessas infecções, e a rapidez da propagação da doença (Fidel et al, 1999; Silva et al, 2012).

Como patógeno oportunista, *C. glabrata* precisa evadir-se do sistema imunológico, sobreviver, e reproduzir-se no ambiente do hospedeiro; além de disseminar-se por novos tecidos e órgãos, em casos de infecção sistêmica. Para tanto, suas células devem apresentar uma série de fatores que auxiliem o estabelecimento da infecção (Silva et al, 2012).

2.2.1 Fatores de Virulência de *Candida glabrata*

A interação hospedeiro x *C. glabrata* exige numerosas funções como adesão ao tecido, invasão e formação de biofilmes, proteção contra mecanismos de defesa do hospedeiro, desencadeamento da resposta do sistema imunológico do hospedeiro e resistência a antifúngicos (Rodrigues et al, 2014; Roy e Thompson, 2015; Bouklas et al, 2017).

Adesão

A adesão dos microrganismos ao tecido hospedeiro é considerada um pré-requisito para a invasão e infecção. É iniciada, geralmente, por ligação de adesinas presentes na superfície da levedura, à ligantes específicos das células epiteliais (aminoácidos ou resíduos de açúcar), ou à ligantes presentes nas superfícies inertes abióticas. Em *C. glabrata*, observa-se que este mecanismo é mediado, em parte, por proteínas codificadas pelos genes EPA (subfamília I- formada por 18 famílias de genes), mas também por outras adesinas putativas (como Pwp7p e Aed1p) presentes em seu genoma e que são classificadas em sete subfamílias diferentes (I-VII), e que tem base na semelhança de sequência de domínio N-terminal (Desai et al, 2011; Almshawit et al, 2014).

Como são reconhecidas como os principais fatores de virulência, as adesinas fúngicas estão sendo amplamente estudadas na Biologia Molecular, a fim de definir a sua funcionalidade. Essas adesinas demonstraram ser uma importante molécula sinalizadora para o reconhecimento da levedura pelas células do sistema imunológico do hospedeiro, apesar de não estar envolvida com o processo de fagocitose. Ao analisar o grupo EPA, foi observado que é formado por lectinas pertencentes a uma grande família de proteínas de parede celular, as quais estão ligadas ao glicosilfosfatidilinositol – GPI; e que encontram-se dispostas em domínios funcionais, sendo eles: um N- terminal, contendo o domínio de ligação ao ligante; uma âncora GPI, essencial tanto para a reticulação na parede celular quanto para a aderência; e um domínio C- terminal Ser/Thr, funcional (Kuhn e Vyas, 2012).

Além do perfil de proteínas de parede celular, vários fatores têm sido implicados na influência da adesão, incluindo as propriedades físicoquímicas da superfície celular, como por exemplo, sua hidrofobicidade. Todos estes elementos contribuem para o contato inicial de *C. glabrata* com células e/ou dispositivos médicos, para posteriormente desencadear proliferação e desenvolvimento de biofilmes (Silva et al, 2012).

Biofilme

Os biofilmes são comunidades tridimensionais de microrganismos que se desenvolvem em superfícies bióticas ou abióticas, incorporadas em uma matriz extracelular

biossintetizada por esta comunidade e com propriedades biológicas distintas. Esta forma de crescimento é considerada como o modo predominante de vida microbiana, onde cerca de 80% de todos os microrganismos presentes no ambiente vivem de forma sésil. A organização estrutural dos biofilmes e a presença de canais nesses locais, permitem as trocas de nutrientes e de gases entre as células, e fornecem um nicho protegido contra predadores ambientais, células do sistema imunológico, forças de cisalhamento e antimicrobianos. Desta forma, o estabelecimento das infecções (cerca de 65%-80% das infecções humanas) estão associadas à formação de biofilmes (Martinez e Fries, 2010; d'Enfert e Janbon, 2016).

A formação do biofilme nos fungos é um processo organizado que progride através de estágios coordenados, e, provavelmente, regulado por forças externas e mensageiros intercelulares (Figura 6). Inicia com a ligação do microrganismo a uma superfície, que pode ser facilitada pela formação de substâncias orgânicas liberadas pelas células do hospedeiro, como soro, saliva ou secreções. A fase intermediária é caracterizada por uma agregação homogênea à superfície, de células flutuantes livres em um arranjo de microcolônia. A proximidade das células dentro da microcolônia pode apresentar um ambiente adequado para o estabelecimento de gradientes de nutrientes, troca genética e *quorum sensing*. Os biofilmes maduros, apresentam-se como um arranjo denso, plano ou em forma de cogumelo, de células mergulhadas em grandes quantidades de exopolímero; onde as células podem se separar ou dispersar lentamente como células únicas ou agregados de células no ambiente circundante (Martinez e Fries, 2010).

Na maior parte dos biofilmes, os microrganismos representam menos de 10% da massa seca, enquanto a matriz extracelular polimérica (MEP) pode chegar a mais de 90%. Essa matriz apresenta propriedades diversas, sendo responsáveis pela arquitetura tridimensional, pela adesão às superfícies e pela coesão do biofilme. A MEP imobiliza as células e as mantém em estreita proximidade, permitindo interações intensas, incluindo a comunicação célula-célula e a formação de microcolônias. Além disso, permite a retenção de enzimas extracelulares, gerando um sistema digestivo externo versátil, capaz de isolar os nutrientes dissolvidos e particulados da fase aquosa, e de permitir que estes sejam utilizados nutrientes. Ela também atua como um centro de reciclagem, mantendo todos os componentes das células lisadas disponíveis, para serem re-utilizados (Flemming e Wingender, 2010).

Os biofilmes das espécies de *Candida* tornaram as colônias mais resistente às defesas do hospedeiro e à terapêutica antifúngica, através de mecanismos multifatoriais que variam de acordo com as fases de formação do biofilme. Durante a fase inicial de formação, as bombas de efluxo representam o principal mecanismo de resistência, através do aumento

transitório da sua atividade durante os estágios de aderência e inicial da formação de biofilmes. À medida que o biofilme amadurece, o papel das bombas é minimizado, e mecanismos específicos desempenham um papel muito maior, como a diminuição do teor de ergosterol; produção de uma matriz rica em β -1,3-glucano, a qual participa da inativação de antifúngicos; presença de DNA extracelular, que também promove resistência; e desenvolvimento, na maioria das vezes, de células persistentes, que são variantes fenotípicas resistentes a antifúngicos, que podem servir como um inóculo de um novo biofilme após a exposição ao medicamento (Taff et al, 2013).

Os biofilmes de *C. glabrata* mostraram-se como rede espessa de células incorporadas em material extracelular, com altos níveis de proteínas e carboidratos; apresentando baixa atividade metabólica e ampla regulação gênica e proteômica. Diferentes adesinas participam deste biofilme, bem como enzimas de remodelação e de modificações da hidrofobicidade da parede celular. Esses biofilmes são resistentes aos antifúngicos azóis e polienos, e sensíveis a equinocandinas e a formulações lipídicas de anfotericina B. Em co-infecção com *C. albicans*, há formação de biofilmes mistos, e isso ocasiona modificações na patogenicidade da *C. glabrata*, induzindo fatores de virulência que facilitam a colonização e invasão do epitélio, tornando-se mais resistente ao tratamento. A formação desses biofilmes mistos, que é comum na natureza, provoca a criação de comunidades de microrganismos ainda mais complexas e que interagem cooperativamente (Silva et al, 2009; Martinez e Fries, 2010; d'Enfert e Janbon, 2016; Tati et al, 2016).

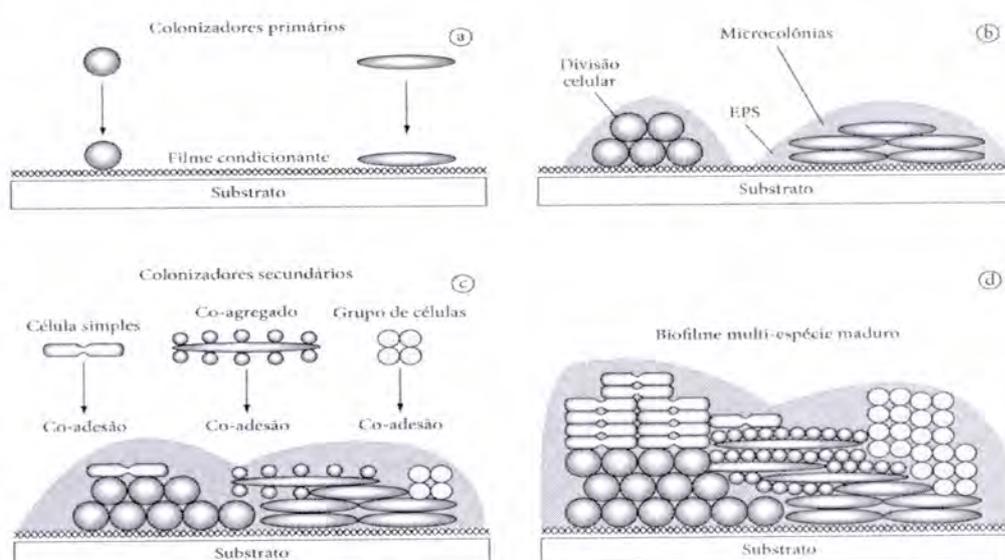


Figura 6: Diagrama das etapas de formação do biofilme. a- Adesão; b- Formação das microcolônias; c- Maturação do biofilme; d- Biofilme maduro.

Fonte: https://proext.ufba.br/sites/proext.ufba.br/files/formacao_de_biofilme_multiespecie._fonte_scielo.gif

Quorum sensing (QS)

É um fenômeno de comunicação microbiana e de regulação da expressão gênica, que promove uma sinalização célula-célula complexa e eficiente. Este mecanismo é mediado por pequenas moléculas produzidas pela população microbiana, as quais se acumulam ao longo do seu crescimento. Os microrganismos possuem receptores que detectam a concentração de moléculas do QS presentes no meio, e quando o sinal atinge uma concentração limiar, numerosos processos relacionados à densidade celular são iniciados. Entre os fungos, as moléculas reguladoras do *quorum sensing* (QSM) são: farnesol, tirosol, feniletanol e triptofol (Albuquerque e Casadevall, 2012; Barriuso, 2015).

Essa comunicação microbiana não se restringe a membros da mesma espécie ou reino, podendo ocorrer “comunicação cruzada” entre diferentes espécies de bactérias, bactérias e fungos, e mesmo entre bactérias ou fungos com seus hospedeiros. Além disso, alguns microrganismos desenvolveram estratégias para interromper a sinalização do QS de outros microrganismos, num fenômeno chamado *quenching quorum*, que geralmente leva à inativação/degradação do QSM. Esta estratégia impede a acumulação de QSM no ambiente de microrganismos, evitando o início de processos mediados por QS, como por exemplo, a formação de biofilme (Barriuso, 2015).

Alguns QSMs podem ser considerados fatores de virulência por si só, pois são tóxicos para células hospedeiras e/ou podem modular a imunidade do hospedeiro. Além disso, alguns autores propuseram que o QS é um mecanismo de evolução neodarwinista, com importante participação no surgimento dos primeiros organismos multicelulares (Albuquerque e Casadevall, 2012; Barriuso, 2015).

Produção de enzimas

A destruição dos tecidos do hospedeiro por *Candida* pode ser facilitada pela liberação de enzimas hidrolíticas no ambiente. Proteinases, fosfolipases e hemolisinas são as enzimas mais frequentemente envolvidas na patogenicidade das espécies desse gênero. As proteinases biossintetizadas por *C. glabrata* ainda não foram descritas na literatura. As fosfolipases por sua vez, são enzimas que hidrolizam os fosfolípidos em ácidos graxos, contribuindo para o dano

da membrana celular do hospedeiro, e para a exposição dos seus receptores, facilitando a aderência de *C. glabrata* na mucosa hospedeira, o que desencadeia a destruição e a efetiva invasão dos tecidos envolvidos. As hemolisinas lisam as hemácias, liberam a hemoglobina e facilitam que os microrganismos recuperem o ferro elementar das células hospedeiras, permitindo a sobrevivência e persistência destes no sangue (Silva et al, 2012; Rodrigues et al, 2014).

Tolerância ao estresse oxidativo

Neutrófilos, células dendríticas e macrófagos, constituem a resposta primária do sistema imunológico do hospedeiro para as infecções por *Candida*. Esses fagócitos reconhecem os ligantes microbianos por seus receptores, ativam uma série de sinalizações intracelulares, e reorganizam seu citoesqueleto de actina para que ocorra a realização da fagocitose. Os microrganismos são aprisionados em um vacúolo derivado da membrana plasmática, o fagossoma. Este compartimento prematuro não possui capacidade de degradar partículas ou de matar agentes patogênicos. No entanto, durante um processo de maturação, uma série de eventos de fusão com compartimentos da via endossomal, transforma-os em fagolisossomos, sendo estes mais ácidos e hidroliticamente ativos (Rodrigues et al, 2014; Kasper et al, 2015).

Candida glabrata apresenta uma alta tolerância ao estresse oxidativo, e resiste ao confronto com células do sistema imunológico do hospedeiro, permitindo a sua sobrevivência por longos períodos, especialmente em macrófagos. Após a fagocitose, a fim de promover um ambiente menos hostil, essa levedura modifica o fagossoma, pela aquisição de marcadores do estágio endossomal inicial e tardio, evitando assim a maturação completa do fagossoma e a sua acidificação. *C. glabrata* desenvolve uma reprogramação do seu metabolismo energético, quando no interior do fagossoma, utilizando diversos nutrientes necessários à sobrevivência, e desenvolvendo o processo de autofagia para manutenção da espécie (Rodrigues et al, 2014; Kasper et al, 2015; Roy e Thompson, 2015).

Esta espécie de levedura pode biossintetizar enzimas antioxidantes, catalase, redutase, superóxido dismutase, e peroxidases, para escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro, e neutralizar as espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio. Permanecem intracelularmente por cerca de 2 a 3 dias sem causar dano aos macrófagos. Após a maturação,

promovem a lise do macrófago e liberação das células fúngicas no meio (Rodrigues et al, 2014; Kasper et al, 2015).

C. glabrata utiliza uma via respiratória alternativa, não-fosforilante, sem citocromo, mediada por uma enzima, a oxidase alternativa (AOX), que reduz as ROS exógenas e endógenas, e aumentam a chance de sobrevivência durante a infecção. Essa via também pode ser ativada em resposta aos estresses ambientais, sempre com o mesmo objetivo, eliminar as ROS geradas durante a fagocitose, reduzir a produção de ATP, e promover a biossíntese de bombas de efluxo durante a terapia antifúngica, responsável pela resistência aos azóis, garantindo a viabilidade celular (Peng et al, 2012).

Diante das estratégias demonstradas por *C. glabrata* para evadir-se das defesas do hospedeiro e da própria fisiologia da levedura, que garantem a sobrevivência diante de situações de limitações nutricionais, resposta oxidativa, competição com outros microrganismos e mecanismos de proteção; pode-se deduzir que esta levedura apresenta alta tolerância ao estresse e grande adaptabilidade ao meio. Assim, em decorrência destes fatos, há necessidade da implementação de uma terapia antifúngica adequada para o controle das infecções ocasionadas por *C. glabrata* (Rodrigues et al, 2014).

2.3.Tratamento

Os antifúngicos são selecionados de acordo com a susceptibilidade do agente causal, da forma de administração, das interações medicamentosas e do custo de tratamento. Eles apresentam vias de administração e excreção que são tão importantes quanto o seu potencial de ação, pois delimitam sua biodisponibilidade e toxicidade (Martinez, 2006; Spampinato e Leonardi, 2013).

A terapia antifúngica pode tratar infecções superficiais ou sistêmicas, as primeiras têm a via de administração tópica como a preferencial, enquanto que para as últimas, são utilizadas as preparações orais ou intravenosas (Martinez, 2006; Spampinato e Leonardi, 2013).

Além dessas vias de tratamento, há uma nova forma de administração em desenvolvimento, com o objetivo de tratar os biofilmes formados no interior de cateteres que não podem ser removidos, e que apresentam células sésseis que necessitam de doses extremamente elevadas por via sistêmica para serem tratadas. Esta via alternativa é conhecida

como Terapia de Bloqueio Antimicrobiana, e baseia-se na instilação prolongada de solução contendo altas concentrações, de 100 a 1000 vezes, dos agentes antimicrobianos ou antissépticos no interior dos cateteres, cujo objetivo é remover os microrganismos presentes neste local. Esta terapia de bloqueio é utilizada em combinação com a terapia sistêmica (Walraven e Lee, 2013).

Os antifúngicos passaram a ter maior importância, nos últimos anos, devido ao aumento das infecções fúngicas em indivíduos imunocomprometidos. A ascensão observada destas infecções está correlacionada com o aumento do número de pacientes submetidos a tratamentos com imunossupressores (Roemer e Krysan, 2014).

O tratamento das infecções fúngicas é limitado a utilização de três classes de antifúngicos (poliênicos, azoles e equinocandinas), cujos mecanismos de ação são diferenciados (Figura 7) (Roemer e Krysan, 2014).

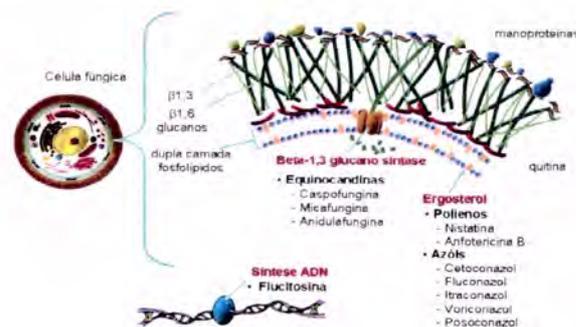


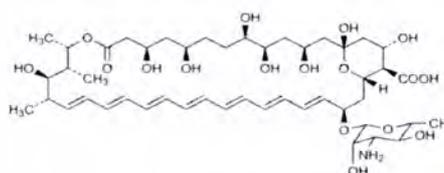
Figura 7: Alvos celulares dos Agentes Antifúngicos.

Fonte: <http://atlasmicologia.blogspot.com.br/p/fungi-among-us.html>

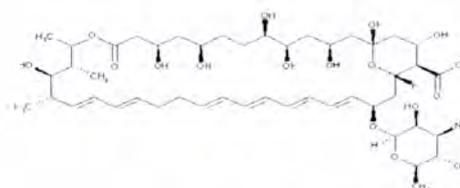
2.3.1. Antifúngicos Poliênicos

A anfotericina B (ANF B) conjuntamente à nistatina foram isolados de *Streptomyces* spp. Estes antifúngicos fazem parte da classe dos poliênicos, cuja estrutura macrocíclica é formada por átomos de carbono divalentes distribuídos em série. A ANF B é disponibilizada desde a década de 50, cujo espectro antifúngico e atividade fúngicida, permitiu sua categorização como droga de referência no controle das infecções fúngicas viscerais e sistêmicas até os dias atuais (Martinez, 2006; Spampinato e Leonardi, 2013; Roemer e Krysan, 2014).

O anel lactâmico presente nos antifúngicos poliênicos apresentam uma cadeia lipofílica com 3 a 7 ligações duplas, que conferem rigidez a molécula; e uma porção com várias hidroxilas, que garante flexibilidade e caráter hidrofílico. Estes fatores auxiliam na ligação dos polienos aos componentes da membrana fúngica (Figura 8) (Murray et al, 2014).



A) ANFOTERICINA B



B) NISTATINA

Figura 8: Estruturas Moleculares de Antifúngicos Poliênicos. A) Anfotericina B; B) Nistatina
Fontes: www.medicinescomplete.com; <https://pt.wikipedia.org/wiki/Nistatina>

Os antifúngicos poliênicos ligam-se ao ergosterol da membrana fúngica, formando poros hidrofílicos que alteram sua permeabilidade, promovendo a perda dos constituintes citoplasmáticos, as reações de oxidação e as alterações metabólicas nocivas à célula, levando-a à morte. Em menor proporção podem ligar-se ao colesterol das membranas celulares do hospedeiro, e desta forma ocasionar efeitos adversos (Martinez, 2006; Spampinato e Leonardi, 2013).

A anfotericina B apresenta um mecanismo de ação adicional através da geração de radicais livres, resultantes da oxidação da própria ANF B, ocasionando dano direto à membrana. Esta propriedade é responsável pela rápida atividade dessa molécula nas infecções, e aumento de sua toxicidade (Murray et al, 2014).

A anfotericina B tem atividade sobre o gênero *Candida*, apesar de algumas espécies de *Candida* não-albicans demonstrarem resistência. A sua utilização pode ocasionar diversos efeitos colaterais como febre, náuseas, nefrotoxicidade e anemia, devido à sua toxicidade celular e tecidual. Essas reações limitam sua utilização, sendo indicado apenas em casos de

infecções fúngicas invasivas, particularmente em pacientes imunossuprimidos (Martinez, 2006).

A formulação da suspensão de anfotericina B associada ao desoxicolato de sódio, facilita a sua solubilização em água e estabilidade. As três formulações lipídicas (a lipossomal, em dispersão coloidal e em complexo lipídico), que apesar de *in vitro* apresentarem menor atividade frente a fungos filamentosos e leveduriformes; *in vivo*, facilitam seu transporte e seu potencial de ação, garantindo maior segurança, quanto à toxicidade celular, no caso da administração prolongada (Martinez, 2006; Bassetti et al, 2016).

2.3.2. Antifúngicos Azólicos

Os azólicos são antifúngicos que tem atividade, majoritariamente fungistática, e são amplamente utilizados na clínica, devido a sua boa tolerância celular nas células do hospedeiro. Quimicamente eles apresentam um anel pentagonal que os divide em duas classes, a depender da composição: os imidazólicos, possuem três átomos de carbono e dois de nitrogênio; e os triazólicos, dois átomos de carbono e três de nitrogênio (Figura 9) (Martinez, 2006 ; Spampinato e Leonardi, 2013; Roemer e Krysan, 2014).

Os antifúngicos imidazólicos, miconazol e cetoconazol, foram inicialmente utilizados na década de 70, impactando a terapêutica antifúngica devido à amplitude do seu espectro de ação e facilidade da administração oral. Nos anos 90, foram adicionados os triazólicos, fluconazol e itraconazol, apresentando maiores biodisponibilidade e atividade antifúngica (Martinez, 2006).

O fluconazol é o antifúngico triazólico mais representativo de sua classe, apresenta excelente biodisponibilidade, e é de escolha para o tratamento de candidíases superficiais e invasivas. Todavia, foi observado quadros de infecções por *C. krusei* e *C. glabrata* em que não fora obtido sucesso terapêutico (Martinez, 2006; Pfaller et al, 2010; Larru e Zaoutis, 2013).

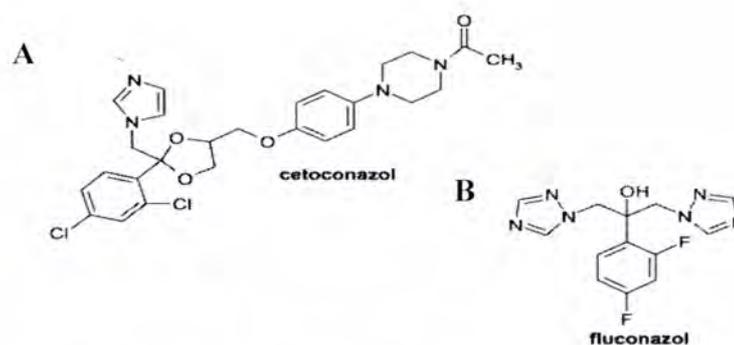


Figura 9: Estruturas Moleculares de Antifúngicos Azólicos: A- imidazólico (Cetoconazol); B- triazólico de primeira geração (Fluconazol).

Fonte: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s0100-40422007000100029&script=sci_arttext

Os azóis atuam sobre o citocromo P-450 presente nos fungos, desencadeando o bloqueio da demetilação do lanosterol, pela inibição da enzima lanosterol 14- α -demetilase, a qual é codificada pelo gene ERG11. Esta inibição bloqueia a síntese do ergosterol. Como o ergosterol está na membrana da célula fúngica, e é um análogo do colesterol, a sua inibição modifica a permeabilidade da membrana e conseqüentemente, a viabilidade celular (Martinez, 2006; Pfaller et al, 2010; Spampinato e Leonardi, 2013; Bassetti et al, 2016).

Os azólicos podem agir também modificando a síntese de lipídios e inibindo enzimas que fazem parte do processo oxidativo, causando danos ainda maiores à célula, pela produção de radicais livres. O uso é tópico ou sistêmico, e são utilizados tanto para tratamento quanto para profilaxia das infecções fúngicas. Os principais efeitos adversos advindos da administração dessas drogas são: gastrintestinais, hipersensibilidade, hepatotoxicidade e teratogenicidade (Martinez, 2006; Spampinato e Leonardi, 2013).

2.3.3. Equinocandinas

O grupo das equinocandinas é composto por três drogas, caspofungina, micafungina e anidulafungina (Figura 10), as quais apresentam atividade fungicida dose-dependente para as espécies de *Candida*. São quimicamente caracterizadas como lipopeptídios semi-sintéticos, que exibem hexapeptídeos cíclicos ligados a uma cadeia lateral de ácidos graxos. Quanto a atividade, são bastante seletivos. Elas apresentam como alvo a parede celular, e atuam através da inibição não-competitiva da enzima responsável pela síntese da β -1,3-D-glucana, um dos

seus principais componentes. Desta forma, promovem a fragilidade e lise celular (Martinez, 2006; Spampinato e Leonardi, 2013; Montagna et al, 2015).

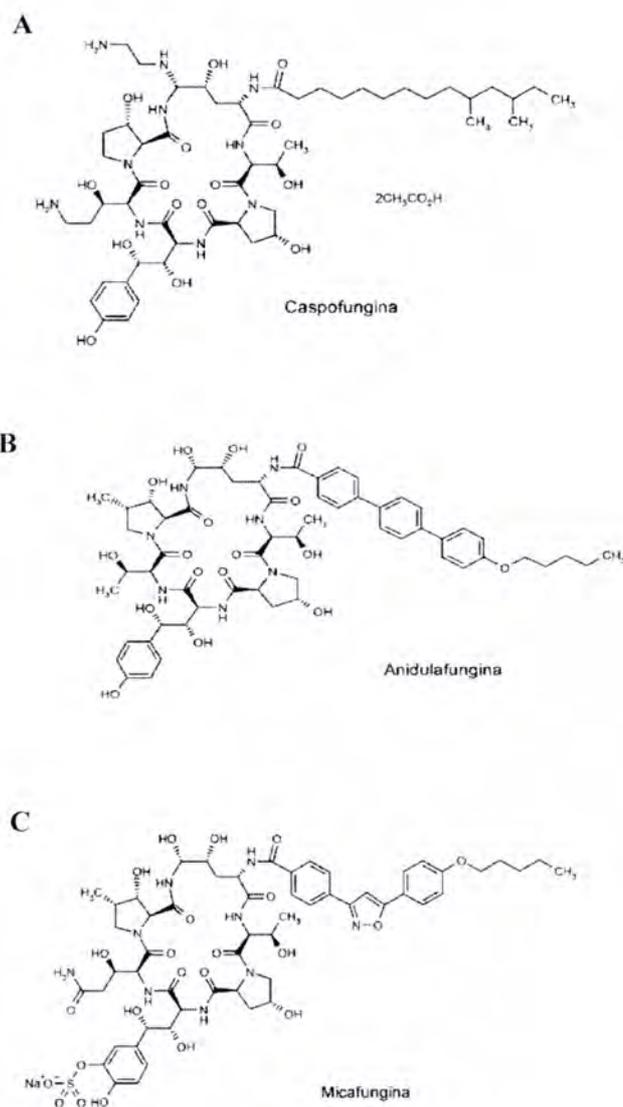


Figura 10: Estruturas Moleculares das Equinocandinas: A- caspofungina; B- micafungina; C- anidulafungina.

Fonte: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0716-10182004000200001

As equinocandinas são as mais recentes drogas antifúngicas adicionadas a farmacopeia, e introduzidas na clínica. Elas demonstraram menos efeitos adversos que a anfotericina B, pois atuam em uma molécula que não faz parte das membranas celulares dos hospedeiros, exibem forte tolerabilidade e segurança na administração (Martinez, 2006; Larru e Zaoutis, 2013; Bassetti et al, 2016; Roemer e Krysan, 2014).

Apresentam amplo e forte potencial antifúngico no tratamento de biofilmes; realizam baixa interação com outras drogas, em especial com azólicos; e raramente são observados casos de resistência. Apesar dos benefícios demonstrados, apresentam limitação de administração endovenosa, sendo utilizadas apenas em infecções graves ocasionadas por *Candida* e *Aspergillus*, ou em infecções por outros fungos com reduzida susceptibilidade aos azoles (Martinez, 2006; Larru e Zaoutis, 2013; Bassetti et al, 2016).

A implementação de uma terapêutica antifúngica padronizada para a candidíase é crucial para o sucesso do tratamento. Esta ação leva a cura do paciente, a diminuição dos custos e das taxas de morbidade/mortalidade. Desta forma a observação do tipo de patógeno e do local de infecção, são importantes para poder determinar o tempo de administração e o tipo de fármaco, diminuindo as recidivas e os casos de resistência (Bassetti et al, 2016).

Frequentemente, as equinocandinas e os azólicos são os escolhidos para as infecções fúngicas sistêmicas, e de forma secundária, esses são empregados para tratar quadros de intolerância ou resistência à anfotericina B. Nas infecções por leveduras sensíveis aos azólicos, o fluconazol é a droga de escolha, devido a eficácia conhecida e custo. Em quadros de resistência ou intolerância ao fluconazol e a anfotericina B, as equinocandinas são os antifúngicos escolhidos (Martinez, 2006).

Alguns desses antifúngicos são administrados de forma profilática em pacientes neutropênicos que realizam transplantes, imunossuprimidos, em septicemia, ou com diagnóstico de candidíase ainda em aberto, cujo objetivo é dirimir a incidência das candidíases invasivas. O fluconazol é o principal antifúngico utilizado nesse procedimento, todavia, esta recomendação deve ser cuidadosamente considerada, uma vez que foi observada que sua administração ocasionou aumento de espécies de *Candida não-albicans*, com baixa susceptibilidade ou resistência, devido a sua administração prévia (Bassetti et al, 2016).

Ressalta-se ainda, que em decorrência da ampla utilização de alguns destes agentes, tanto de forma profilática como durante tratamento, há desenvolvimento de resistência antifúngica, por diversos mecanismos (Spampinato e Leonardi, 2013).

2.4. Resistência Antifúngica

A resistência pode ser classificada sobre duas perspectivas: a microbiológica, e a clínica. Microbiologicamente ela é definida pela presença de um mecanismo de resistência

adquirido ou mutacional, e que depende diretamente do microrganismo. Essa resistência pode ser primária ou inata, quando os fungos são resistentes anteriormente à exposição da droga; e secundária ou adquirida, quando aparece em resposta a utilização prévia do fármaco (Alcazar-Fuoli e Mellado, 2014).

À clínica ou a falha no tratamento, refere-se à persistência da infecção fúngica, mesmo após a terapia adequada, e classifica o microrganismo em suscetível, tolerante ou resistente. As culturas suscetíveis estão associadas à alta probabilidade do sucesso terapêutico; as tolerantes, são consideradas como tratáveis, mas utilizam doses incertas e elevadas; e as resistentes, denotam crescimento ou falta de inibição, com persistência da infecção, mesmo utilizando a terapia indicada (Alcazar-Fuoli e Mellado, 2014; Sanguinetti et al, 2015).

A depender do perfil *in vitro* apresentado pelo microrganismo (sensível ou resistente) é realizada a escolha da terapêutica com maior probabilidade de sucesso, através da utilização da regra 90-60. Esta regra estabelece que os isolados sensíveis *in vitro*, apresentam 90% de chance de responder a terapia *in vivo*, enquanto que os resistentes *in vitro*, demonstram apenas 60% de possibilidade de sucesso para a terapêutica *in vivo* (Rex e Pfaller, 2002).

É importante ressaltar que a resistência clínica ainda apresenta outros fatores envolvidos além do microrganismo, que estão presentes no paciente, são eles: a função do sistema imune, a presença de comorbidades, a redução da biodisponibilidade da droga, e o aumento do metabolismo do fármaco (Alcazar-Fuoli e Mellado, 2014; Sanguinetti et al, 2015).

A resistência desencadeada pelos microrganismos difere entre os grupos de agentes antifúngicos, principalmente em decorrência do modo de ação de cada droga. Os principais mecanismos de resistência (Figura 11) incluem: o aumento do efluxo das drogas, a alteração fenotípica no sítio de ligação do fármaco, a utilização de vias compensatórias que minimizam a toxicidade do antifúngico, e a formação de biofilme (Sanglard et al, 2009; Srinivasan et al, 2014; Kucukates et al, 2016).

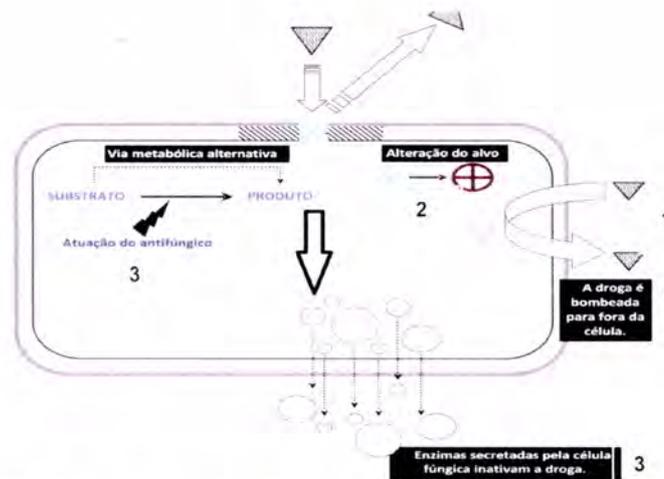


Figura 11: Esquema de três mecanismos de resistência encontrados em células fúngicas: efluxo das drogas (1); alteração nos sítios de ligação do fármaco (2); e utilização de vias compensatórias (3). Fonte adaptada: <http://www.microbiologia.vet.br/Antifungicos2.jpg>

2.4.1. Indução de Bombas de Efluxo de Drogas

A indução na biossíntese de bombas de efluxo multidrogas resultam na diminuição intracelular da concentração de fármacos. Nas espécies de *Candida*, esse transporte é mediado por duas famílias de bombas de efluxo: os transportadores ligados ao ATP (ATP-binding cassette), expressos pelos genes CDR1 e CDR2, que apresentam dois domínios transmembranas e dois citoplasmáticos, e que são o principal meio de resistência aos azoles; e os "principais facilitadores" (Major Facilitator Superfamily - MFS), que são codificados pelo gene MDR e estão envolvidos nos transportes celulares de vários substratos, e que são usualmente seletivos para o fluconazol (Sanglard et al, 2009; Alcazar-Fuoli e Mellado, 2014; Sanguinetti et al, 2015; Kucukates et al, 2016).

2.4.2. Alteração dos Ligantes

A presença de mutações pontuais ou alterações em genes que atuam em determinadas vias de regulação podem desencadear resistência, principalmente a duas classes de

antifúngicos, os azólicos e as equinocandinas (Sanglard et al, 2009; Alcazar-Fuoli e Mellado, 2014).

A diminuição da afinidade ou a incapacidade da ligação dos azólicos ao seu sítio-alvo, pode ser ocasionada por mutações pontuais no gene *ERG11*, que codifica a enzima lanosterol 14- α -demetilase, ou, em decorrência da alteração na regulação desse gene (Alcazar-Fuoli e Mellado, 2014; Sanguinetti et al, 2015).

Mutações pontuais e intrínsecas em regiões específicas dos genes que codificam a subunidade FKS da β -1,3-D-glucana sintetase, e alterações na regulação desses, ocasionam resistência às equinocandinas (Sanglard et al, 2009; Sanguinetti et al, 2015).

Além da resistência a esses grupos, tem sido descrito também que mutações ocorridas nos genes *ERG3* e/ou *ERG6*, provocam alterações qualitativas e quantitativas de lipídios na membrana, alterando a quantidade de ergosterol, podendo levar a resistência de leveduras quando tratadas com anfotericina B (Sanglard et al, 2009; Alcazar-Fuoli e Mellado, 2014).

2.4.3. Vias Alternativas Catabólicas e Compensatórias

Em determinadas situações, decorrente da exposição aos antifúngicos, as leveduras conseguem modificar sua via metabólica, biossintetizando metabólitos menos tóxicos, diminuindo assim, o potencial de ação dessas drogas. Um exemplo desse caso ocorre quando há mutações do gene *ERG3*, que desencadeia à diminuição de metabólitos tóxicos, pela conversão de 14- α -metil-3,6-diol em produtos menos agressivos, como o 14- α -metilfecosterol. Essa alteração promove a formação de membranas celulares menos susceptíveis às lises ocasionadas pela administração dos azoles (Sanglard et al, 2009; Sanguinetti et al, 2015).

Nos constituintes da parede fúngica outras vias alternativas são observadas, devido à presença de alta dinâmica e grande habilidade em aumentar a produção de um ou mais componentes quando algum destes é inibido. Assim, foi observado que o aumento da síntese de quitina em *Candida* é induzida pela inibição da β -1,3-D-glucana sintetase, levando a resistência às equinocandinas (Sanguinetti et al, 2015).

2.4.4. Biofilme

Geralmente a resistência exibida nas células presentes em complexos multicelulares denominada biofilme, é devida a condições multifatoriais, como: presença da matriz extracelular, que inibe a penetração dos antifúngicos; variação no número e das camadas de células no biofilme, que dificulta a penetração do fármaco em toda à sua extensão; heterogeneidade celular, com células apresentando diferentes status metabólico e fisiológico, que levam a diferenças na expressão de genes relacionados a resistência; presença de células persistentes, que são mais tolerantes às drogas; diferença na composição de esteróis e na resposta ao estresse (Sanglard et al, 2009; Srinivasan et al, 2014; Kucukates et al, 2016).

Em decorrência das diversas estratégias de resistência desenvolvidas pelos fungos, e das limitadas opções terapêuticas para esse tipo de infecção, existe, atualmente, uma incessante busca científica por novas drogas ou associações terapêuticas mais eficazes e menos tóxicas. Esta procura é evidenciada pelos acordos bilaterais firmados entre a indústria farmacêutica e os laboratórios acadêmicos (Spampinato e Leonardi, 2013; Butts et al, 2017; Roemer e Krysan, 2014).

2.5. Terapias Alternativas

A similaridade existente entre as células humanas e fúngicas, provoca uma escassez de alvos fúngicos específicos, mas que são devidamente explorados para o desenvolvimento de novas drogas. As novas moléculas são avaliadas quanto ao seu mecanismo de ação, efetividade, toxicidade em relação ao hospedeiro, e custo financeiro (Srinivasan et al, 2014; Roemer e Krysan, 2014).

Esses compostos podem ser de origem natural (extratos de plantas, moléculas produzidas por seres de vida marinha, fungos ou outros microrganismos), pequenas moléculas sintéticas, materiais poliméricos, ou fármacos utilizados na clínica para tratar outras patologias. Estas moléculas podem ser utilizados também de forma associativa aos antifúngicos existentes, visando o aumento da efetividade (Spampinato e Leonardi, 2013; Srinivasan et al, 2014; Roemer e Krysan, 2014).

A ligação das moléculas às células fúngicas, e o poder em atravessar a membrana celular, são pontos que são pesquisados para a introdução de antimicrobianos. Os testes comumente utilizados para analisar o potencial antimicrobiano de uma molécula, são os métodos de macrodiluição ou microdiluição, que avaliam a inibição do crescimento microbiano, através da mensuração da densidade óptica das culturas (Scorzoni et al, 2016; Roemer e Krysan, 2014).

Devido à limitação observada para alguns microrganismos, difíceis de calibrar por densidade óptica, esse método foi atualizado utilizando substâncias que podem ser metabolizadas exclusivamente pelas células viáveis, diferenciando assim, as culturas mortas das que apresentam crescimento, pela utilização de indicadores que alteram a cor, devido as reações de oxidação (Scorzoni et al, 2016; Roemer e Krysan, 2014).

Além desses métodos, técnicas moleculares estão sendo utilizadas para avaliar o modo de ação das novas substâncias, através do estudo das vias metabólicas. O desenvolvimento de novas metodologias e técnicas para determinar, de forma mais rápida e rigorosa, o mecanismo de ação das futuras drogas antifúngicas, são objeto de estudo em todo mundo (Roemer e Krysan, 2014).

Embora haja várias estratégias e metodologias para sintetizar e descobrir novos fármacos, a química de produtos naturais representa uma das alternativas de maior sucesso. Muitos metabólitos se notabilizam como valiosa matéria-prima para a produção de inúmeros fármacos. Na tentativa de obter novas drogas, estudos de bioprospecção de substâncias naturais bioativas, seguida da obtenção de seus análogos estruturais, e avaliação de atividades farmacológicas, toxicológicas e seu mecanismo de ação, são cotidianamente desenvolvidos (Viriato, 2014).

Os extratos de plantas, particularmente os das aromáticas, são ricos em derivados de fenilpropanóides ou de terpenóides, que apresentam grande quantidade de moléculas com atividade antifúngica ou que diminuem a resistência aos antifúngicos. Estes podem agir em sinergia com antifúngicos convencionais utilizados na clínica, através: da diminuição das respostas ao estresse da célula fúngica, requerida para a sobrevivência celular na presença dos antifúngicos; do aumento da concentração intracelular da droga, pelo aumento da permeabilidade celular ou pela diminuição do efluxo; e da inibição ou destruição dos biofilmes fúngicos formados (Butts et al, 2017; Roemer e Krysan, 2014).

2.5.1. Terpenos

Os terpenos ou isoprenóides é a classe de metabólitos secundários oriundos de produtos naturais, mais diversificada e de maior interesse farmacológico, sendo encontrado em quase todas as formas de vida. São essencialmente originados da geração de unidades C₅, como difosfato isopentenil (IPP) ou difosfato de dimetilalilo (DMAPP), e formados tipicamente por condensação, e biossintetizados a partir da via do mevalonato (Oldfield e Lin, 2012; Viriato, 2014; Singh e Sharma, 2015).

Possuem estrutura típica e podem ser classificados de acordo com o número de unidades de isopreno (C₅H₈): hemiterpeno (5C), monoterpenos (10 C), sesquiterpenos (15 C), diterpenos (20 C), sesterpenos (25 C), triterpenos (30 C), tetraterpenos (40 C) e acima, os polímeros. Apresentam atividades farmacológicas como: antiparasitária, hipotensora, anti-inflamatória, relaxante muscular, anticariogênica, antibacteriana e antifúngica (Viriato, 2014; Singh e Sharma, 2015).

Vários são os mecanismos de ação dos monoterpenos, propostos pelos pesquisadores, para desempenhar a atividade antifúngica, como granulação citoplasmática, ruptura da membrana, e inativação e/ou inibição da síntese de enzimas intra e extracelulares. Esse potencial depende diretamente da concentração do terpeno e da espécie do fungo (Marei et al, 2012).

Quando alteram a permeabilidade celular, os terpenos penetram entre as cadeias de ácidos graxos presente na membrana citoplasmática, destroem a barreira lipídica, modificam a fluidez da membrana, e causam o extravasamento do conteúdo citoplasmático, levando à morte. Este fenômeno também promove alteração na superfície e modificação morfológica, que reduz a capacidade de adesão das leveduras. Podem induzir inibições da germinação dos esporos, da proliferação da célula fúngica e da respiração celular (Dalleau et al, 2008; Kumar et al, 2012).

A hidrofobicidade dos terpenos fenólicos facilita sua ação sobre as membranas celulares, mas apenas isso não confere toxicidade. A presença de grupos hidroxilas na estrutura do terpeno, auxilia no potencial antifúngico, uma vez que podem facilitar a dissociação do H⁺, e desse modo, permitir a passagem dos prótons H⁺ e de cátions monovalentes através da membrana, diminuindo o pH e alterando o gradiente de cátions. Isso altera a permeabilidade celular, através da abertura de canais, levando a uma rápida desestabilização membranar (Rao et al, 2010).

Os terpenos apresentam diversas funções químicas, tais como: álcoois, aldeídos, cetonas, éteres e ácidos. E esses são classificados em dois grandes grupos: monoterpenos hidrocarbonados e monoterpenos oxigenados (Marei et al, 2012).

O monoterpeno mais abundante da natureza é o limoneno (Figura 12), pertence à classe dos hidrocarbonados, é um composto monocíclico, e está presente em mais de 300 espécies de plantas. Quimicamente é descrito como 4-isoprenil-1-metil-ciclo-hexano, possui dois enantiômeros, com função, nas plantas, de prevenir a desidratação e inibir o crescimento microbiano. É encontrado na natureza como um líquido incolor e volátil em temperatura ambiente, com um forte odor de laranja. O S-(-)-limoneno é principalmente encontrado em plantas e ervas, como a *Mentha* spp; enquanto o R-(+)-limoneno é mais prevalente nos óleos das cascas de frutas cítricas, como limão e laranja (Maróstica Júnior et al, 2007; Chee et al, 2009; Bezerra et al, 2013).

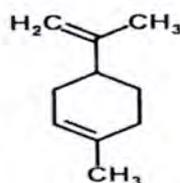


Figura 12: Estrutura química do Limoneno.

Fonte: <http://www.oleos essenciais.org/oleo-essencial-de-limao>. Acesso em 20/09/16.

O limoneno apresenta diversas aplicações na indústria, como por exemplo: solvente para resinas; matéria-prima para síntese de outros compostos químicos, como o mentol; aplicações em borracha, tintas, e agente dispersantes para óleo. Como apresenta toxicidade baixa, é utilizado como aromatizante de alimentos; na terapêutica de cálculos biliares, devido a sua capacidade de solubilizar o colesterol; no controle de azias, por apresentar potencial de neutralização de ácido gástrico e apoio a peristalse; e como quimioprotetor de muitos tipos de cânceres (Maróstica Júnior et al, 2007; Sun, 2007).

O monoterpeno oxigenado, abundante em várias espécies de eucaliptos, é o eucaliptol (1-8 cineol), (Figura 13). Em temperatura ambiente apresenta-se como um líquido límpido, hidrofóbico, e com odor canforáceo (Biodinâmica, 2011).

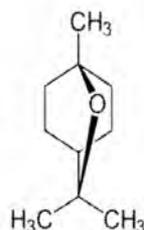


Figura 13: Estrutura química do Eucaliptol

Fonte: <http://www.alunosonline.com.br/quimica/hidrocarbonetos-nao-metânicos.html>. Acesso em 20/09/16.

O eucaliptol foi descoberto por Cloez em 1970 e desde então é amplamente pesquisado farmacologicamente, pois apresenta atividade antinociceptiva, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antioxidante, antimicrobiano, além de regular os níveis de colesterol. Este terpeno bloqueia a via da ciclooxygenase, inibindo o $\text{TNF-}\alpha$ e o $\text{IL-1}\beta$, e controlando a secreção de muco nas vias aéreas; daí a sua utilização em formulações farmacêuticas (como descongestionante nasal, antitussígenos e aromoterapia) para o tratamento de asma, sinusite e doenças pulmonares obstrutivas crônicas (Juergens et al, 2003; Mulyaningsiha et al, 2010; Greiner et al, 2013; Lima et al, 2013; Souto et al, 2016).

Um outro monoterpene amplamente estudado, é o citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal) (Figura 14). Trata-se de uma mistura de dois isômeros geométricos acíclicos insaturados, o neral (isômero cis) e o geranial (isômero trans) (Figura 15). O citral está presente em muitos óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas. O aroma cítrico é conferido pelo geranial, enquanto que o sabor de limão, pelo neral. Devido a estas características é utilizado em produtos farmacêuticos, alimentícios e cosméticos (Leite et al, 2014; Miron et al, 2014).

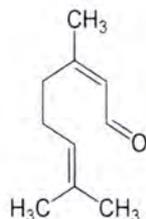


Figura 14: Estrutura química do Citral.

Fonte: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/ef/Neral_Citral_B.svg. Acesso em 20/09/16.

O citral apresenta atividade antitumoral, broncodilatadora, antiprotozoária e antimicrobiana. Foi observado que possui melhor atividade em pH alcalino e pode ser

utilizado em combinação com outros agentes, apresentando ação sinérgica (Ferreira et al, 2009; Sousa et al, 2016).

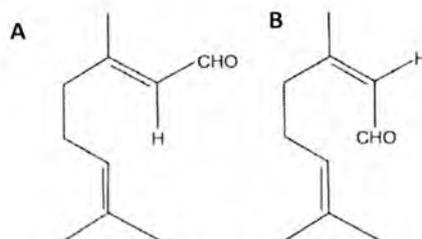


Figura 15: Estruturas químicas: A) Geranial; B) Neral.

Fonte: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762010000800012. Acesso em 20/09/16.

O citral tem capacidade de danificar diretamente a parede e a membrana dos esporos, em fungos filamentosos, causando diminuição do volume celular; aumentando a concentração e agregação de macromoléculas, que levam a desordens metabólicas; afetando o sistema de oxidação e o ciclo do ácido tricarboxílico; modificando a forma, o número e as funções das mitocôndrias; e causando dano ao DNA (Ferreira et al, 2009; Sousa et al, 2016).

O mecanismo de ação do citral na membrana celular não é através da associação com o ergosterol, mas através do complexo de transferência de cargas com o triptófano da célula, inibindo a biossíntese de ergosterol, assim como os azoles, mas com poder fungicida (Leite et al, 2014; Sousa et al, 2016).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica de monoterpenos e antifúngicos convencionais sobre cepas de *Candida glabrata*.

3.2 Objetivos específicos

- Confirmar a taxonomia das cepas de *Candida glabrata* através da utilização de meio seletivo cromogênio, de testes bioquímicos e da formação do tubo germinativo;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do limoneno, eucaliptol e citral, bem como dos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e micafungina;
- Avaliar a interação do monoterpeno mais eficaz com os antifúngicos de menor atividade, através da determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF);
- Avaliar o potencial do monoterpeno mais eficaz em inibir a formação de biofilmes por *Candida glabrata*;
- Avaliar a atividade do monoterpeno mais eficaz, em biofilmes pré-formados de *Candida glabrata*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Microrganismos

No estudo foram utilizadas oito cepas de *Candida glabrata* e uma cepa de referência ATCC 90030 mantidas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos, do Departamento de Antibióticos UFPE. Os microrganismos foram isolados de sangue, urina e secreção da mucosa oral de pacientes hospitalizados, sendo estes catalogados como: LFBM CG 04, LFBM CG 09, LFBM CG 10, LFBM CG 569, LFBM CG 683, LFBM CG 686, LFBM CG 901, LFBM CG 902.

A confirmação taxonômica foi realizada através do semeio no meio seletivo cromogênio CHROMagar *Candida*, pelo teste da formação do tubo germinativo, e pela utilização do Kit Fungifast (Khan et al, 2012).

4.2. Cultura, manutenção e preparação de inóculo

Culturas de *C. glabrata* foram mantidas em ágar Sabouraud Dextrose (Oxoid) sob óleo mineral. Estas culturas foram reativadas, através da transferência para tubos contendo caldo Sabouraud Dextrose (Oxoid) e incubadas a 35 °C por 24h. Após a incubação, foi realizada uma diluição ao décimo em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute/Sigma-Aldrich, EUA) contendo L-glutamina. O RPMI foi tamponado com ácido morfolino propano sulfônico (MOPS) a 0,165 mol/L (Sigma-Aldrich, EUA), de modo a obter um pH $7,0 \pm 0,1$.

Após crescimento no meio RPMI, as culturas foram diluídas seriadamente, e estas diluições foram semeadas em ágar Sabouraud Dextrose, de forma a obter um inóculo padronizado em 10^6 UFC/mL.

4.3. Cultivo em CHROMagar *Candida*

Culturas de *C. glabrata* com crescimento de 48 horas a 35°C em ágar Sabouraud Dextrose, foram semeadas em CHROMagar *Candida* (Laborclin) e incubados a 35°C durante 48 horas. Após a incubação, as leveduras foram identificadas de acordo com a morfologia e pigmentação (Araujo et al, 2005).

4.4. Prova do Tubo Germinativo

A partir de uma cultura de 24h em meio Saubouraud Dextrose, foi retirado 1mL, e depositado em tubo de vidro esterelizado contendo 1mL de “pool” de soro humano, incubado-o por 3 horas, em banho-maria a 37°C. Em seguida uma gota desta suspensão foi retirada e analisada em microscópio óptico com objetivas de 40x e 100x (imersão), a fim de observar a formação de tubos germinativos (Winn et al, 2008).

4.5. Testes Bioquímicos

As provas bioquímicas foram realizadas utilizando painéis de identificação rápida para leveduras, Kit Fungifast (ELITech MICROBIO). Este é constituído por 20 poços, distribuídos da seguinte forma: dois com controles positivos, nove com substratos (Ureia, Lactose, Rafinose, Celobiose, Prolina, Glucosaminidase, Fenoloxidasas, Trealose, Maltose) e nove com antifúngicos em diferentes concentrações (ANF B, FLZ, Flucitosina, Itraconazol, Voriconazol). A metodologia utilizada e a interpretação dos resultados foram realizados de acordo com o preconizado pelo Kit.

4.6. Antifúngicos e Monoterpenos

Foram solubilizados em água destilada anfotericina B (ANF B, Cristália, Brasil), a micafungina (Mycamine, Astellas Farma, Brasil) e o fluconazol (FLZ, Fresenius Kabi,

Brasil), de forma a obter soluções de estoque com concentrações iguais a 1024 µg/mL para a anfotericina B e a micafungina, e 2048 µg/mL para o fluconazol. O critério de resistência para estes antifúngicos foi definido conforme preconizado CLSI (2012): anfotericina B (CIM ≥ 2 µg/mL), micafungina (CIM ≥ 0,25 µg/mL) e fluconazol (CIM ≥ 8 µg/mL).

Os monoterpenos: Limoneno (≥ 97%), Eucaliptol (≥ 99%) e Citral (≥ 95%), foram adquiridos da Sigma Aldrich (São Paulo, Brasil). As soluções estoque destes monoterpenos, com concentrações iguais a 2560 µg/mL, foram obtidas pelo cálculo da massa molecular pela densidade, seguida pela solubilização de 1mL desses terpenos no sistema de etanol/tween 80/água (0,75/0,25/8 mL).

O sistema etanol/tween 80/água foi incluído como controle negativo, para assegurar a não atividade desse sistema sobre a viabilidade das cepas de *C. glabrata*.

Todas as soluções foram esterilizadas por filtração em membrana Millipore, com porosidade de 0,22µm.

4.7. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para determinação da CIM foi utilizado o método de microdiluição em caldo utilizando placa de 96 poços (Global Plast) preconizado pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008), com algumas modificações. Para isso, 200µL da solução estoque do agente antifúngico ou do terpeno a ser avaliado foram dispensados nos poços da linha A. Nos demais poços foram dispensados 100 µL RPMI 1640. Posteriormente, 100 µL do conteúdo de cada poço da linha A foi transferido para linha B e o procedimento foi repetido até a linha H, de modo a obter concentrações que variaram de 0,07 - 256 µg/mL para a anfotericina B e fluconazol, e de 10 a 1280 µg/mL para os terpenos. Em seguida, um volume de 10µL (10^5 UFC/mL), das culturas padronizadas de *C. glabrata* foi inoculado em todos os poços, de forma a obter uma concentração de 10^3 UFC/poço. As placas foram incubadas a 35° C por 48 horas. Os experimentos foram realizados em duplicata e em dias diferentes.

A inibição do crescimento foi indicada pela adição de 20 µL de uma solução aquosa de resazurina a 0,02% a cada um dos poços da placa de microdiluição e incubação por três horas a 35°C. A presença de uma coloração rosa nos poços foi interpretada como prova negativa do efeito inibitório, enquanto a presença de coloração azul foi considerada como prova positiva da atividade antimicrobiana.

A Concentração Inibitória Mínima foi definida como a menor concentração das drogas (antifúngico ou terpeno) expresso em micrograma/mililitro capaz de inibir o crescimento das cepas de *C. glabrata*.

4.8. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM), foi realizada pelo método descrito por Lorian, 1996. Após a determinação da CIM, dos poços onde não foram visualizado crescimento foram pipetados 0,01 mL e semeados em placa de Petri contendo o ágar Sabourand Dextrose. As placas foram incubadas a 35° C por 48 horas. A CFM foi definida como a menor concentração do antimicrobiano capaz de inviabilizar 99,9 % do inóculo.

O(s) antifúngico (s) de menor (es) eficácia (s) foram selecionados para a avaliação da interação com os monoterpenos frente às cepas de *C. glabrata*. E o monoterpeno mais eficaz foi avaliado quanto suas atividades antifunção e tratamento do biofilme de *C. glabrata*.

4.9. Determinação da Atividade Antifúngica da Associação Monoterpeno/Antifúngicos - Ensaio *Checkerboard*

A atividade antifúngica dos monoterpenos em associação com o (s) antifúngico (s) de menor (es) eficácia (s), foi determinada pelo método descrito por *Checkerboard* (Wei et al, 2011).

A partir dos valores da CIM, foram preparadas soluções em meio RPMI 1640 dos agentes antifúngicos e dos monoterpenos. As soluções obtidas apresentaram concentrações subinibitórias que variaram entre $\frac{1}{2}$ – $\frac{1}{64}$ da CIM para os terpenos; $\frac{1}{2}$ – $\frac{1}{512}$ da CIM para os antifúngicos.

Em microplacas de 96 orifícios foram adicionadas na orientação vertical 50µL das diluições dos antifúngicos, e na orientação horizontal 50µL dos monoterpenos. Em seguida, todos os orifícios receberam 100µL da cultura padronizada em 10^6 UFC/mL.

As placas foram incubadas durante 24h a 35°C. Em cada orifício foi adicionado 20µL da solução aquosa de resazurina a 0,02%, e reincubadas por mais três horas a 35°C. O experimento foi realizado em duplicata.

Para avaliar a atividade antifúngica das combinações, o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) foi calculado pela seguinte fórmula: CIM do antifúngico associado ao monoterpeno/CIM do antifúngico + CIM do monoterpeno associado ao antifúngico/CIM do monoterpeno.

A associação foi considerada sinérgica quando o valor do ICIF foi inferior a 0,5; aditiva, entre 0,5 e 1,0; indiferente de 1,0 a 4,0 ; e antagônico quando maior que 4,0 (de Castro et al, 2015).

4.10. Formação de Biofilme

As cepas de *C. glabrata* foram cultivadas previamente em ágar Sabouraud Dextose e incubadas a 35°C por 48h. A partir destas culturas, colônias foram transferidas, através de alças descartáveis calibradas de 10µL, para 10mL de caldo YPG (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose) e incubadas durante 18h a 35°C. Em seguida, estas culturas foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com Tampão Salino Fosfato (PBS) pH 7,0. Este precipitado foi ressuspenso em caldo YPG, padronizado em 10⁷ UFC/mL, e 200µL adicionados aos orifícios de microplacas, que foram incubadas a 35°C por 48h para formação do biofilme (Alnuaimi et al, 2013).

4.11. Tratamento do biofilme formado

Os biofilmes de *C. glabrata* formados conforme protocolo descrito acima foram tratados com o monoterpeno mais eficaz, em concentrações subinibitórias, equivalente a 1/8 ou 1/16 da CIM , incubadas por 24h a 35°C. Para este tratamento foi utilizada a metodologia descrita por Dalleau et al (2008), com adaptações.

Das culturas em microplacas foram retirados 100µL e adicionados 100µL desse monoterpeno. Após o tratamento do biofilme, o meio de crescimento foi removido, e

realizado a lavagem com 200µL de PBS. Em seguida, o biofilme foi fixado com 200µL de metanol durante 15 minutos. O sobrenadante foi removido e as placas ficaram secando ao ar livre, durante, aproximadamente, 30 minutos. Na sequência, foram adicionados 200µL da solução Cristal Violeta (CV) 0,1%, incubando-as durante 20 minutos, a temperatura ambiente. O excesso de CV foi removido, e as placas foram gentilmente lavadas com PBS, e adicionados 200µL de ácido acético 33%. Posteriormente, 100µL foram transferidos para uma nova placa de 96 poços, a fim de se determinar a absorbância, utilizando para tanto, um leitor de microplacas com o filtro de 590nm (Alnuaimi et al, 2013).

4.12. Atividade antiformação do biofilme

Para determinar o potencial da associação mais ativa e dos componentes desta na formação do biofilme de *C. glabrata*, foi utilizada a metodologia descrita por Wei et al (2011).

Nos orifícios das microplacas foram depositados 100µL do monoterpeneo mais eficaz, em concentrações subinibitórias, equivalente a 1/8 ou 1/16 da CIM, seguido de 100µL da cultura padronizada de *C. glabrata* (10^7 UFC/mL).

As placas foram incubadas a 35°C por 48h e processadas utilizando a metodologia descrita por Alnuaimi et al (2013), com adaptações, de semelhante modo ao realizado no tratamento dos biofilmes.

4.13. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software “Graph Pad, Prism” versão 5.0 para Windows, através da análise da variância (ANOVA), com $p < 0,05$ e intervalo de confiança de 95%.

5. RESULTADOS

5.1. Identificação das Leveduras

5.1.1 Crescimento em meio CHROMagar *Candida*

A leitura das placas com o meio CHROMagar *Candida*, mostrou um crescimento de colônias cremosas e de coloração lilás (Figura 16). Estas características são presuntivas de *Candida glabrata*.

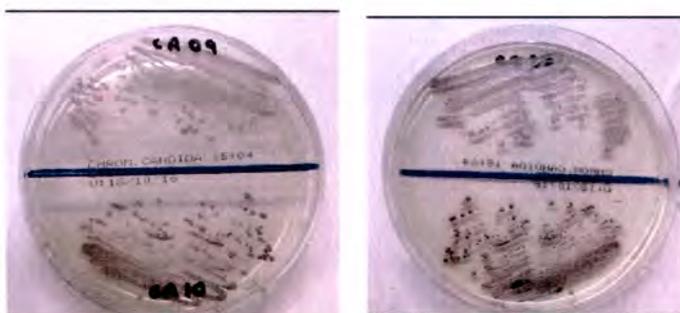


Figura 16: Crescimento de Colônias de leveduras de coloração lilás, incubadas no meio CHROMagar durante 48h a 35°C, presuntivo de *Candida glabrata*.

Fonte: Foto da autora

5.1.2. Prova do tubo germinativo

Para esta prova não foram visualizados tubos germinativos nas amostras avaliadas (Figura 17).

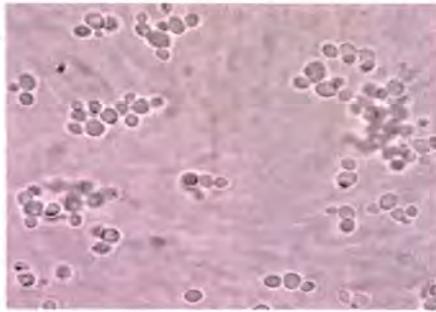


Figura 17: Microfotografia apresentando células de leveduras, hialinas e unibrotantes após cultivo de três horas de incubação a 37°C crescidas em “pool” de soro humano (aumento 1000x). Fonte: Foto da autora.

5.1.3. Testes Bioquímicos

Na identificação bioquímica, todos os isolados apresentaram o perfil descrito pelo Kit Fungifast como sugestivo de *Candida glabrata*, fermentando ou assimilando entre os açúcares testados apenas a Trealose, e sendo negativo para todos os demais açúcares avaliados (Figura18).



Figura 18: Testes bioquímicos presuntivo de *C. glabrata*.
Fonte: Foto da autora

5.2. Atividade Antifúngica

A Tabela 2 mostra os valores das Concentrações Inibitória Mínima e Fungicida Mínima (CIM/CFM) dos agentes antifúngicos e dos terpenos frente à *Candida glabrata*.

As cepas de *Candida glabrata* revelaram um perfil de sensibilidade frente à micafungina e a anfotericina B, com exceção das cepas LFBM CG 10 e LFBM CG 686 que

foram resistentes a esta última. Todas as cepas mostraram-se resistentes ao fluconazol, tendo como base os valores da CIM descritos pelo CLSI (2012).

Dos monoterpenos, o citral mostrou ser o mais ativo quando comparados ao eucaliptol e limoneno.

Não foi possível precisar os valores de CIM/CFM para fluconazol e limoneno. Para estas drogas, as cepas de *C. glabrata* apresentaram valores superiores a 1024 $\mu\text{g/mL}$ e 1280 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Para todas as cepas as Concentrações Inibitória Mínima e Fungicida Mínima foram iguais, indicando que estas drogas apresentavam uma ação fungicida.

Diferenças de susceptibilidade entre as cepas de *C. glabrata* foram observadas, entretanto, estas não estão diretamente relacionadas aos locais de onde as amostras foram isoladas.

Foram escolhidas, de modo aleatório, cinco cepas para o estudo da interação entre os antifúngicos e os terpenos.

Tabela 2: Atividade de antifúngicos convencionais e terpenos frente a cepas de *Candida glabrata*.

<i>Candida glabrata</i>										
Cepas	Origem	ANF B	FLZ	MICF	CIT	EUC	LIM	CIM/CFM (µg/mL)		
LFBM CG 04	Secreção da mucosa oral	0.5/0.5	> 512/ > 512	0.125/0.125	160/160	160/160	> 1280/ > 1280			
LFBM CG 09	Secreção da mucosa oral	1/1	> 512/ > 512	0.0625/0.0625	80/80	160/160	> 1280/ > 1280			
LFBM CG 10	Secreção da mucosa oral	4/4	> 512/ > 512	0.125/0.125	80/80	160/160	> 1280/ > 1280			
LFBM CG 569	Urocultura	0.25/0.25	> 512/ > 512	0.125/0.125	80/80	320/320	> 1280/ > 1280			
LFBM CG 683	Urocultura	0.25/0.25	> 512/ > 512	0.0625/0.0625	160/160	160/160	> 1280/ > 1280			
LFBM CG 686	Hemocultura	4/4	> 512/ > 512	0.125/0.125	160/160	160/160	> 1280/ > 1280			
LFBM CG 901	Hemocultura	0.5/0.5	> 512/ > 512	0.125/0.125	160/160	320/320	> 1280/ > 1280			
LFBM CG 902	Hemocultura	0.25/0.25	> 512/ > 512	0.125/0.125	80/80	320/320	> 1280/ > 1280			
ATCC 90030	Sangue	1/1	> 512/ > 512	0.125/0.125	160/160	160/160	> 1280/ > 1280			

CIM- Concentração Inibitória Mínima; CFM- Concentração Fungicida Mínima; LFBM CG- Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microorganismos *Candida glabrata*;

ATCC- American Type Culture Collection; AMB -Anfotericina B; FLZ- Fluconazol; MICF- Micalfungina; CIT- citral; EUC- Eucaliptol; LIM- limoneno.

5.3. Ensaio *Checkerboard*

Os valores para a Concentrações Inibitória Mínima e o Índice da Concentração Inibitória Fracionada (CIF) da associação FLZ/CIT frente às cepas de *Candida glabrata* (LFBM CG 04, LFBM CG 09, LFBM CG 686, LFBM CG 902, ATCC 90030) estão apresentadas na Tabela 3.

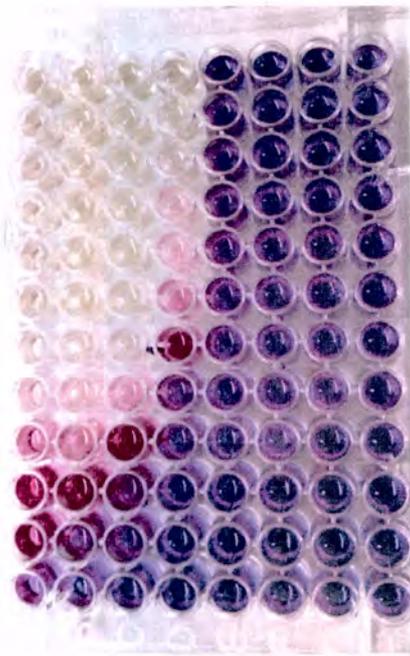
As associações Fluconazol/Eucaliptol e Fluconazol/Limoneno não demonstraram atividade antifúngica, pois apresentaram placas com crescimento em todos poços, para as cepas de *C. glabrata* avaliadas.

As concentrações sub-inibitórias do citral (inferiores ou iguais a 0,5 x CIM) aumentaram a atividade antifúngica do fluconazol (Figura 19). A atividade sinérgica dessa associação foi observada pela redução percentual dos valores da CIM do fluconazol e do citral, respectivamente, iguais ou superiores a 87,5% e 75%, com valores do Índice de Concentração Inibitória Fracionada variando entre 0,19 – 0,37.

Tabela 3: Avaliação *in vitro* das interações entre antifúngicos/terpenos frente à *Candida glabrata*.

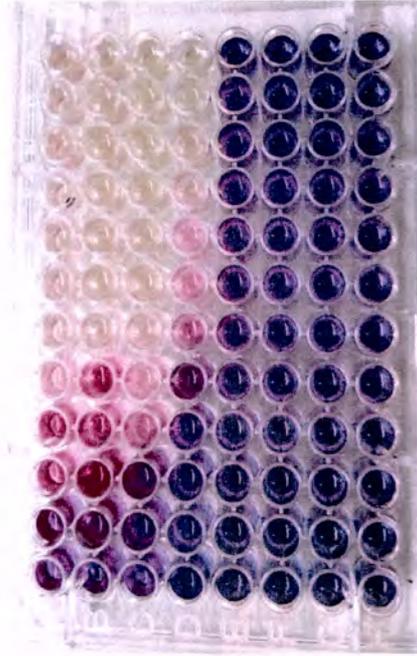
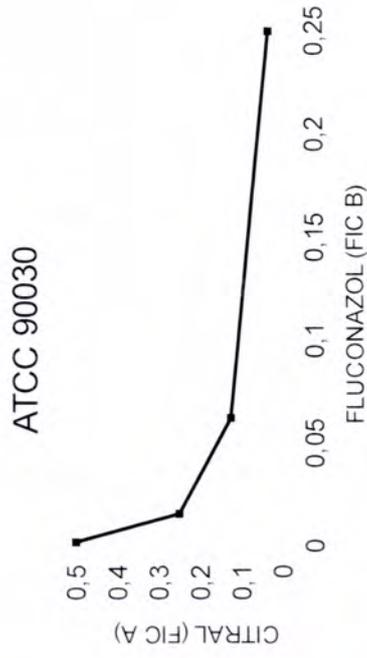
<i>Candida glabrata</i>	Associação	CIM Individual ($\mu\text{g/mL}$)	CIM Associação ($\mu\text{g/mL}$)	FIC Individual	FIC Index	% Red CIM
LFBM CG 04	FLZ/CIT	1024/160	64/40	0.06/0.25	0.31	93.7/75
LFBM CG 09	FLZ/CIT	1024/80	32/20	0.03/0.25	0.28	96.9/75
LFBM CG 686	FLZ/CIT	1024/160	128/10	0.12/0.06	0.19	87.5/93.7
LFBM CG 902	FLZ/CIT	1024/80	128/20	0.12/0.25	0.37	87.5/75
ATCC 90030	FLZ/CIT	1024/160	64/20	0.06/0.12	0.19	93.7/87.5

CIM- Concentração Inibitória Mínima; FIC- Concentração Inibitória Fracionada; % Red CIM- (CIM Individual – CIM associação) x 100/ CIM Individual; LFBM CG- Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microorganismos *Candida glabrata*; ATCC- American Type Culture Collection; FLZ- Fluconazol; CIT- citral.



A

B



C

D

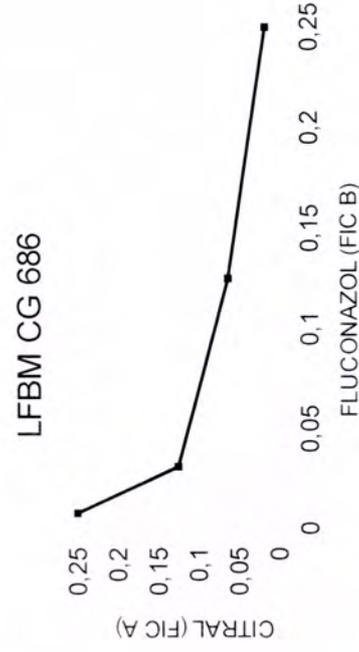


Figura 19: Determinação da Atividade Antifúngica da Associação Citral/Fluconazol frente à *Candida glabrata*. A- Ensaio Checkerboard ATCC 90030; B- Isobolograma ATCC 90030; C- Ensaio Checkerboard LFBM CG 686; D- Isobolograma LFBM CG 686.

Fonte: Foto da autora

5.4. Biofilme

Os resultados da atividade antifúngica do citral sobre o biofilme em formação ou formado por cinco cepas de *Candida glabrata*, estão apresentados na Tabela 4 e Figura 20.

Esta atividade foi avaliada após ou durante a exposição desta droga em concentração subinibitória de 10 µg/mL, equivalentes à 1/8 ou 1/16 da MIC, dependendo da cepa avaliada.

Para todas as cepas foi observado que o citral é eficaz sobre o biofilme em formação. Esta atividade não difere estatisticamente entre as cepas de *C. glabrata* testadas, $p < 0,05$.

De todas as cepas de *C. glabrata*, a LFBM CG 09 mostrou ser a mais sensível a ação do citral, cujo percentual de redução do biofilme foi da ordem de $78,7 \pm 0,34$.

Os biofilmes formados foram inibidos pelo citral, com percentuais que variaram de $23,5 \pm 1,6$ a $32,6 \pm 8,6$. Quando os percentuais da atividade do citral sobre o biofilme formado por cada uma das cepas de *Candida glabrata* foram comparados entre si, não foram observadas diferenças estatísticas, $p < 0,05$.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, a atividade do citral é maior durante a formação do biofilme do que quando este já está formado e essa atividade é estatisticamente diferente, $p < 0,05$.

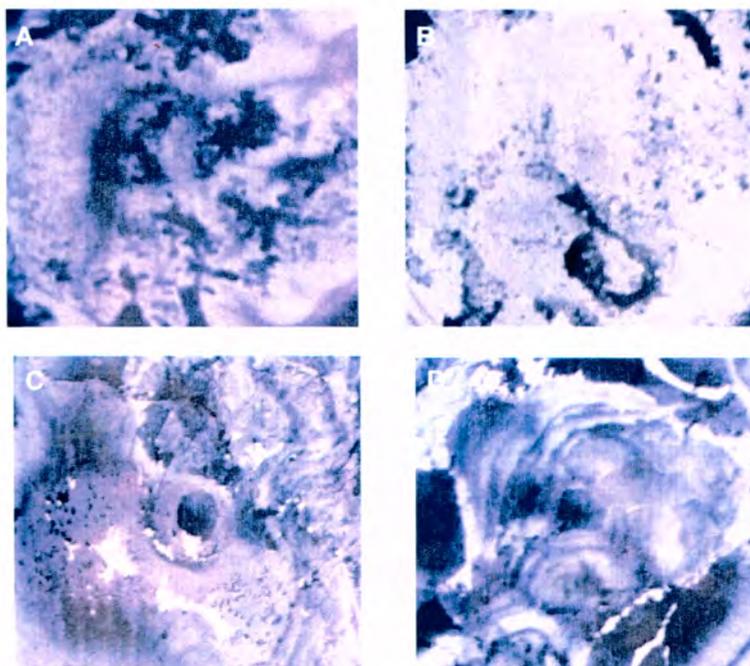


Figura 20: Atividade do citral sobre o biofilme de *Candida glabrata*. **A-** Cultura de *C. glabrata* ATCC 90030 incubada por 48h; **B-** Cultura de *C. glabrata* ATCC 90030 incubada por 48 h com citral (10 µg/mL); **C-** Cultura de *C. glabrata* LFBM CG 686 incubada por 72h **D-** Cultura de 48h de *C. glabrata* LFBM CG 686 tratada durante 24h com citral (10 µg/mL).

Fonte: Fotos da autora realizadas antes da ressuspensão do cristal violeta presente no biofilme.

Tabela 4: Atividade do citral sobre o biofilme de *Candida glabrata*.

<i>Candida glabrata</i>	Monoterpeno	Concentração Subinibitória (µg/mL)	% Redução do biofilme formado	% Redução da formação do biofilme
LFBM CG 04	CIT	10.0	31.3 ± 2.4	67.9 ± 1.7
LFBM CG 09	CIT	10.0	32,6 ± 8.64	78.7 ± 0.34
LFBM CG 686	CIT	10.0	23.5 ± 1.6	72.7 ± 2.28
ATCC 90030	CIT	10.0	29.3 ± 15.1	68.5 ± 5.7

LFBM CG- Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microorganismos *Candida glabrata*; ATCC- American Type Culture Collection; CIT- citral.

6. DISCUSSÃO

É perceptível que *Candida glabrata* ocupa posições de destaque epidemiológico nas diversas localidades, ocasionando quadros de infecções que apresentam um maior grau de dificuldade para serem tratados, devido ao seu potencial em formar biofilmes e ao seu perfil de resistência a alguns antifúngicos comumente utilizados.

Neste trabalho, foram avaliados oito espécimes de *C. glabrata*, que em cultivo, apresentaram-se: como colônias lilás no CHROMagar, em conformidade com o descrito por Araujo et al (2005); sem formação de tubo germinativo ou pseudo-hifas a 37°C, corroborando ao que apresentaram Silva et al (2012), que esta espécie não possui dimorfismo com a variação da temperatura, existindo apenas sob a forma de blastoconídeos.

Quanto aos antifúngicos testados, todas as cepas avaliadas apresentaram-se sensíveis a micafungina (CIM= 0,02 ou 0,04) e resistentes ao fluconazol (CIM \geq 1024 μ g/mL), e com perfis de sensibilidade a anfotericina B, com exceção das cepas (LFBM CG 10 e LFBM CG 686: CIM= 4), quando comparando estes índices aos valores recomendados pelo CLSI, 2012 (MICF: CIM \geq 0,25 μ g/mL; FLZ: CIM \geq 8 μ g/mL; ANF B: CIM \geq 2 μ g/mL).

A resistência ao fluconazol encontrada está em conformidade com o descrito na literatura, onde é comum observar cepas resistentes aos azólicos, devido, provavelmente, a ação das bombas de efluxo que promovem a saída do antifúngico utilizado (Faria-Ramos et al, 2014). Contudo, é possível encontrar estudos que apresentem: culturas com colônias que possuem perfis de heteroresistência a estes antimicrobianos, exibindo variação na resposta aos azólicos, e com provável expansão gradual da subpopulação não susceptível, levando ao desenvolvimento de culturas resistentes (Ben-Ami et al, 2016); e cepas com diferentes perfis de sensibilidade a estes antifúngicos, como o apresentado por Savastano et al (2016), quando avaliaram o perfil de susceptibilidade aos azólicos das cepas de *Candida* isoladas em um hospital terciário brasileiro, onde 50% dos isolados de *C. glabrata* eram resistentes ao fluconazol, 25% eram de susceptibilidade dose-dependente, e os outros 25% eram sensíveis.

A sensibilidade encontrada a micafungina corrobora com os achados de Pfaller et al (2012), onde observou que apenas 8% dos isolados de *Candida glabrata* apresentavam resistência a micafungina, indicando que as equinocandinas podem ser administradas como terapia de escolha para o tratamento de candidemias e infecções sistêmicas.

Apesar de ser comum encontrar na literatura, isolados de *Candida* sensíveis a ANF B, como observado por De Logu et al (2005); Rukayadi et al (2009); Savastano et al (2016) e Kucukates et al (2016), é possível também detectar alguns espécimes de *C. glabrata* que possuam resistência a esta droga. Hull et al (2012), observaram algumas estirpes de *C. glabrata* apresentando CIM variando entre 2 e 8 µg/ml, e tendo como provável evento causador a profilaxia com poliênicos, que promoveu a seleção das cepas mais resistentes, principalmente àquelas que possuíam a mutação no gene ERG2.

Esta resistência ao tratamento confere persistência da infecção fúngica, mesmo após a terapia adequada, tendo como possíveis dispositivos promulgadores: o aumento do efluxo das drogas; a alteração fenotípica no sítio de ligação do fármaco; a utilização de vias compensatórias que minimizam a toxicidade do antifúngico; e a formação de biofilme (Sanglard et al, 2009; Srinivasan et al, 2014; Kucukates et al, 2016).

Assim, considerando a importância da redução desta falta de susceptibilidade à terapêutica convencional e/ou a determinação de uma terapia alternativa, três terpenos foram testados quanto ao seu potencial antifúngico e sua capacidade associativa. Os valores, das CIM e CFM apresentaram-se entre 80 e 160 µg/mL para o citral, entre 160 – 320 µg/mL para o eucaliptol, e não podendo ser deferido para o limoneno (superior a 1280 µg/mL). O citral e o eucaliptol demonstraram uma alta atividade antimicrobiana, e o limoneno, provavelmente um baixo potencial, considerando a escala de Sartoratto et al (2004), que define que CIM: entre 50 – 500µg/ml, apresenta atividade antimicrobiana elevada; entre 60 – 1500 µg/ml, possui ação moderada; e valores acima de 1500 µg/ml, significa baixo potencial.

O poder antifúngico apresentado pelo citral foi semelhante ao observado por Miron et al (2014), quando avaliaram sua atividade frente a vários microrganismos, incluindo a *C. glabrata*, encontrando para tal patógeno a CIM variando entre 64 - 128 µg/mL. É sugido que o mecanismo de ação deste terpeno na membrana celular não é através da associação com o ergosterol, mas sim através do complexo de transferência de cargas com o triptófano da célula; podendo inibir a biossíntese do ergosterol, aumentando, ainda mais, a instabilidade da membrana (Leite et al, 2014; Sousa et al, 2016).

A literatura demonstra que o alvo do eucaliptol é a membrana plasmática, ocasionando dano na estabilidade estrutural da célula e aumentando a permeabilidade desta estrutura (Hendry et al, 2009). Como a Concentração Inibitória Mínima encontrada para o eucaliptol foi menor que as observadas em outras espécies de *Candida* (CIM > 3000 µg/ml) (Viriato, 2014),

sugere-se que *C. glabrata* possua uma maior susceptibilidade a este terpeno que as demais espécies já testadas.

Diante do potencial antimicrobiano apresentado pelos terpenos avaliados, e a fim de dirimir a falta de susceptibilidade apresentada pelo FLZ, foram realizados testes de interações através do método de *Checkerboard*, utilizando concentrações subinibitórias de ambos os componentes avaliados, a fim de se determinar os valores das Concentrações Inibitórias Fracionadas (CIFs) de cada um dos que compõem a combinação, e dos valores dos índices das CIFs (ICIF), para se determinar quais associação apresentavam características sinérgica, antagonica ou indiferente (de Castro et al, 2015).

O efeito sinérgico pode ser ocasionado quando as interações promovem: diminuição das respostas ao estresse fúngico; aumento da concentração intracelular da droga, seja ele pelo aumento da permeabilidade celular ou pela diminuição do efluxo; e inibição ou destruição dos biofilmes (Butts et al, 2017). E essa sinergia é importante na clínica pois poderá: aumentar a eficácia da terapêutica, ampliar o espectro de ação do antimicrobiano, e ainda, diminuir o tempo de duração da terapia, minimizando a possibilidade do desenvolvimento de resistência (Khan et al, 2012).

O limoneno, da mesma forma que não inibiu o crescimento fúngico, em todas as concentrações testadas, também não apresentou atividade nas concentrações analisadas, quando avaliado em associação com o fluconazol, não sendo possível determinar qualquer valor de CIF ou ICIF. O eucaliptol em associação com o fluconazol também não apresentou atividade, mostrando uma placa de 96 poços com crescimento em todas as combinações.

A combinação do citral com o fluconazol mostrou um aumento da atividade deste último. Os índices de reduções da CIM variaram entre 75-93,7% e 87,5-96,9% para o citral e fluconazol, respectivamente. Essa associação sinérgica é inédita sobre cepas de *C. glabrata*.

Esses resultados corroboraram com outros experimentos que utilizaram o citral em associação com este antifúngico, utilizando espécies de *Candida*. Khan et al (2012) demonstraram entre as várias combinações avaliadas frente a cepas de *C. albicans*, que a associação FLZ – Citral apresentou efeito sinérgico, cujos índices de CIFs obtidos foram inferiores a 0,5. Sousa et al (2016), encontraram resultados semelhantes, quando avaliou essa interação frente a espécimes de *C. tropicalis*.

O citral por apresentar melhores valores das CIMs e por demonstrar ação sinérgica quando associado ao fluconazol, foi utilizado para avaliar o potencial sobre o biofilme, uma

vez que a *C. glabrata* tem como um dos seus principais fatores de virulência a capacidade de formar esses complexos multicelulares, aumentando sua resistência à terapêutica utilizada (Taff et al, 2013).

Os biofilmes são comunidades tridimensionais de microrganismos que se desenvolvem em superfícies bióticas ou abióticas, incorporadas em uma matriz extracelular biossintetizada por esta comunidade e com propriedades biológicas distintas. Esta forma de crescimento apresenta uma organização estrutural e presença de canais que permitem as trocas de nutrientes e de gases entre as células, fornecendo um nicho protegido contra as células do sistema imunológico, as forças de cisalhamento e antimicrobianos (Martinez e Fries, 2010; d'Enfert e Janbon, 2016).

A atividade antifúngica do citral sobre o biofilme em formação ou formado, foi avaliada após a exposição deste monoterpeneo, na concentração subinibitória de 10 µg/mL. Em todas as cepas houve reduções dos biofilmes, contudo a atividade do citral foi maior durante a formação do biofilme do que quando este já está formado.

Este fato corrobora com o estudo realizado por Dalleau et al (2008) com *C. albicans*, os quais observaram o poder de inibição do citral e de outros terpenos na formação dos biofilmes. Foi encontrando percentuais de inibição do biofilme próximos a 50%, com a administração do citral em concentração de 0,06% (v/v), demonstrando que os monoterpeneos alteram a superfície e modificam a morfologia da célula fúngica, reduzindo sua capacidade de aderência e comprometendo a formação do biofilme. Provavelmente, este é o mecanismo do citral sobre o biofilme de *C. glabrata*.

7. CONCLUSÕES

Ao determinar as concentrações inibitória e fungicida mínimas (CIM/CFM) dos terpenos, foi observado que o citral e o eucaliptol foram ativos sobre o crescimento de *Candida glabrata*, e que em concentrações de 80 a 320µg/mL foram capazes de inviabilizar as células fúngicas. Entretanto, o limoneno não apresentou atividade antifúngica.

As cepas de *C. glabrata* foram sensíveis a micafungina e a anfotericina B, exceto LFBM CG 10 e LFBM CG 686. E todas as cepas mostraram-se resistentes ao fluconazol.

A associação fluconazol/citral apresentou um efeito sinérgico sobre todas as cepas avaliadas. E as associações fluconazol/eucaliptol e fluconazol/limoneno apresentaram-se antagônicas frente às cepas de *C. glabrata*.

O citral reduziu a formação do biofilme e o biofilme formado, por todas as cepas de *C. glabrata* avaliadas.

Estes resultados podem contribuir para novos esquemas terapêuticos frente a infecções causadas por *C. glabrata*.

REFERÊNCIAS

ACHKAR, Jacqueline M.; FRIES, Bettina C. *Candida* infections of the genitourinary tract. *Clinical microbiology reviews*, v. 23, n. 2, p. 253-273, 2010.

AHMAD, Khadija M. et. al. Genome structure and dynamics of the yeast pathogen *Candida glabrata*. *FEMS yeast research*, v. 14, p. 529-535, 2014.

ALBUQUERQUE, Patrícia; CASADEVALL, Arturo. Quorum sensing in fungi—a review. *Medical mycology*, v. 50, n. 4, p. 337-345, 2012.

ALCAZAR-FUOLI, Laura; MELLADO, Emilia. Current status of antifungal resistance and its impact on clinical practice. *British journal of haematology*, v. 166, n. 4, p. 471-484, 2014.

ALMSHAWIT, Hala; POUNIOTIS, Dodie; MACREADIE, Ian. Cell density impacts on *Candida glabrata* survival in hypo-osmotic stress. *FEMS yeast research*, v. 14, n. 3, p. 508-516, 2014.

ALNUAIMI, Ali D. et al. Clinical isolates and laboratory reference *Candida* species and strains have varying abilities to form biofilms. *FEMS yeast research*, v. 13, n. 7, p. 689-699, 2013.

ARAÚJO, Crystiane Rodrigues de et al. Identificação das leveduras do gênero *Candida* por métodos manuais convencionais e pelo método cromógeno CHROMagar *Candida*. 2005.

BARCHIESI, Francesco et al. Candidemia in the elderly: What does it change?. *PloS one*, v. 12, n. 5, p. e0176576, 2017.

BARRIUSO, Jorge. Quorum sensing mechanisms in fungi. *AIMS Microbiol*, v. 1, n. 1, p. 37-47, 2015.

BEN-AMI, Ronen et al. Heteroresistance to fluconazole is a continuously distributed phenotype among *Candida glabrata* clinical strains associated with in vivo persistence. *MBio*, v. 7, n. 4, p. e00655-16, 2016.

BASSETTI, Matteo; PEGHIN, Maddalena; TIMSIT, Jean-Francois. The current treatment landscape: candidiasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 71, n. suppl 2, p. ii13-ii22, 2016.

BEZERRA, Louise Morais Dornelas et al. Atividade antibacteriana in vitro de fitoconstituintes sobre micorganismos do biofilme dentário. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, v. 17, n. 1, p. 79-84, 2013.

BIODINÂMICA,2011: <http://www.biodinamica.com.br/biblioteca/files/eucaliptol/bula-eucaliptol.pdf>

BOUKLAS, Tejas et al. Generational distribution of a *Candida glabrata* population: Resilient old cells prevail, while younger cells dominate in the vulnerable host. *PLoS Pathogens*, v. 13, n. 5, p. e1006355, 2017.

BUTTS, Arielle; PALMER, Glen E.; ROGERS, P. David. Antifungal adjuvants: Preserving and extending the antifungal arsenal. *Virulence*, v. 8, n. 2, p. 198-210, 2017.

CHEE, H. Y. et al. *In vitro* antifungal activity of limonene against *Trichophyton rubrum*. *Microbiology*, v. 37, n. 3, p. 243- 246, 2009.

CHENG, S. C. et al. Interplay between *Candida albicans* and the Mammalian Innate Host Defense. *Infection and Immunity*, v. 80, n. 4, p. 1304–1313, 2012.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-third edition M27-A3. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard - third edition Informational Supplement M27-S4. CLSI, Wayne, PA, USA, 2012.

COLOMBO, Arnaldo Lopes; GUIMARÃES, Thaís. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2003.

CROCCO, Elisete I. et al. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica in vitro: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais Identification of *Candida* species and antifungal susceptibility in vitro: a study on 100 patients with. *An Bras Dermatol*, v. 79, n. 6, p. 689-697, 2004.

DA SILVA, Anne et al. Infecções urinárias nosocomiais causada por fungo do gênero *Candida*: uma revisão. Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-ALAGOAS, v. 2, n. 1, p. 45-57, 2014.

DALAZEN, Daniela et al. Comparação do perfil de susceptibilidade entre isolados clínicos de *Candida* spp. orais e vulvovaginais no Sul do Brasil. Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial. Vol. 47, n. 1,(jan./fev. 2011), p. 31-36, 2011.

DALLEAU, Stéphanie et al. *In vitro* activity of terpenes against *Candida* biofilms. International journal of antimicrobial agents, v. 31, n. 6, p. 572-576, 2008.

DE CASTRO, Ricardo Dias et al. Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an *in vitro* study. BMC complementary and alternative medicine, v. 15, n. 1, p. 417, 2015.

DE LOGU, Alessandro et al. In vitro activity of 2-cyclohexylidenhidrazo-4-phenyl-thiazole compared with those of amphotericin B and fluconazole against clinical isolates of *Candida* spp. and fluconazole-resistant *Candida albicans*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 55, n. 5, p. 692-698, 2005.

D'ENFERT, Christophe; JANBON, Guilhem. Biofilm formation in *Candida glabrata*: What have we learnt from functional genomics approaches?. FEMS yeast research, v. 16, n. 1, p. fov111, 2016.

DESAI, Chirayu; MAVRIANOS, John; CHAUHAN, Neeraj. *Candida glabrata* Pwp7p and Aed1p are required for adherence to human endothelial cells. FEMS yeast research, v. 11, n. 7, p. 595-601, 2011.

DOI, André Mario et al. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. PloS one, v. 11, n. 1, p. e0146909, 2016.

FARIA-RAMOS, Isabel et al. Environmental azole fungicide, prochloraz, can induce cross-resistance to medical triazoles in *Candida glabrata*. FEMS yeast research, v. 14, n. 7, p. 1119-1123, 2014.

FATHI, Naeimeh et al. Sequence-identification of *Candida* species isolated from candidemia. Advanced Biomedical Research, v. 5, 2016.

FERREIRA, Tatiane Morais et al. Atividade antifúngica do citral em leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes hospitalizados. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, v. 68, n. 1, p. 118-125, 2009.

FIDEL, Paul L.; VAZQUEZ, Jose A.; SOBEL, Jack D. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical microbiology reviews*, v. 12, n. 1, p. 80-96, 1999.

FLEMMING, Hans-Curt; WINGENDER, Jost. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010.

FURLANETO-MAIA, Luciana et al. Estudo da incidência de amostras clínicas do gênero *Candida* isoladas de diversos sítios anatômicos. *Acta Scientiarum. Health Sciences*, v. 29, n. 1, 2007.

GASPARETTO, André et al. Produção de biofilme por leveduras isoladas de cavidade bucal de usuários de prótese dentária. *Acta Scientiarum. Health Sciences*, v. 27, n. 1, 2005.

GREINER, Johannes F.-W. et al. 1, 8-Cineol inhibits nuclear translocation of NF- κ B p65 and NF- κ B-dependent transcriptional activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, v. 1833, n. 12, p. 2866-2878, 2013.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 20, n. s6, p. 5-10, 2014.

HENDRY, E. R. et al. Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1, 8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 64, n. 6, p. 1219-1225, 2009.

HRABÁK, Jaroslav; CHUDÁČKOVÁ, Eva; WALKOVÁ, Radka. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clinical microbiology reviews*, v. 26, n. 1, p. 103-114, 2013.

HULL, Claire M. et al. Two clinical isolates of *Candida glabrata* exhibiting reduced sensitivity to amphotericin B both harbor mutations in ERG2. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 56, n. 12, p. 6417-6421, 2012.

JUERGENS, U. R. et al. Anti-inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. *Respiratory medicine*, v. 97, n. 3, p. 250-256, 2003.

KHAN, Mohd Sajjad Ahmad; MALIK, Abida; AHMAD, Iqbal. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. *Medical Mycology*, v. 50, n. 1, p. 33-42, 2012.

KASPER, L. et al. Intracellular survival of *Candida glabrata* in macrophages: immune evasion and persistence. *FEMS Yeast Research*, n. 15, 12 pages, 2015.

KUCUKATES, Emine et al. Identification of *Candida* species and susceptibility testing with Sensititre YeastOne microdilution panel to 9 antifungal agents. *Saudi Medical Journal*, v. 37, n. 7, p. 750, 2016.

KUHN, Duncan M.; VYAS, Valmik K. The *Candida glabrata* adhesin Epa1p causes adhesion, phagocytosis, and cytokine secretion by innate immune cells. *FEMS yeast research*, v. 12, n. 4, p. 398-414, 2012.

KUMAR, Amit et al. Antifungal activity of some natural essential oils against *Candida* species isolated from blood stream infection. *J Krishna Inst Med Sci Univ*, v. 1, p. 61-6, 2012.

LACHKE, S. A. et al. Phenotypic switching and filamentation in *Candida glabrata*. *Microbiology*, v. 148, p. 2661-2674, 2002.

LARRU, Beatriz; ZAOUTIS, Theoklis E. Newer antifungal agents. *Current opinion in pediatrics*, v. 25, n. 1, p. 110-115, 2013.

LEITE, Maria Clerya Alvino et al. Evaluation of antifungal activity and mechanism of action of citral against *Candida albicans*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2014, 2014.

LIMA, Patricia Rodrigues et al. 1, 8-cineole (eucalyptol) ameliorates cerulein-induced acute pancreatitis via modulation of cytokines, oxidative stress and NF- κ B activity in mice. *Life sciences*, v. 92, n. 24, p. 1195-1201, 2013.

LORIAN, V. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Editora Williams & Wilkins, 1996.

MAREI, G. L. et al. Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v.103, p. 56-61, 2012.

MARTINEZ, Roberto. Atualização no uso de agentes antifúngicos. *J Bras Pneumol*, v. 32, n. 5, p. 449-60, 2006.

MARTINEZ, Luis R.; FRIES, Bettina C. Fungal biofilms: relevance in the setting of human disease. *Current fungal infection reports*, v. 4, n. 4, p. 266-275, 2010.

MARÓSTICA JÚNIOR, Mário Roberto et al. Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. *Química Nova*, v.30, n.2, 2007.

MIRON, Diogo et al. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 24, n. 6, p. 660-667, 2014.

MIYAZAKI, Taiga et al. Role of the Slt2 mitogen-activated protein kinase pathway in cell wall integrity and virulence in *Candida glabrata*. *FEMS yeast research*, v. 10, n. 3, p. 343-352, 2010.

MNGE, P. et al. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* isolates from a public tertiary teaching hospital in the Eastern Cape Province, South Africa. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 50, n. 6, 2017.

MONTAGNA, M. T. et al. Susceptibility to echinocandins of *Candida* spp. strains isolated in Italy assessed by European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing and Clinical Laboratory Standards Institute broth microdilution methods. *BMC Microbiology*, v. 15, n.106, p.1-6, 2015.

MULYANINGSIHA, S. et al. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8-cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. *Phytomedicine*, v. 17, p. 1061-1066, 2010.

MURRAY, P. R.; PFALLER, M. A.; ROSENTHAL, K. S. *Microbiologia Médica*. Editora Elsevier, 2014.

NEVES-JUNIOR, Athayde et al. Prevalence and fluconazole susceptibility profile of *Candida* spp. clinical isolates in a Brazilian tertiary hospital in Minas Gerais, Brazil. *Anais*

da Academia Brasileira de Ciências, v. 87, n. 2, p. 1349-1359, 2015.

NUCCI, Marcio et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. *PloS one*, v. 8, n. 3, p. e59373, 2013.

OLDFIELD, E.; LIN, F. Terpene Biosynthesis: Modularity Rules. *Angew Chem Int Ed Engl*, v. 51, n. 5, p. 1124–1137, 2012.

PENG, Yibing et al. Relationship between respiration deficiency and azole resistance in clinical *Candida glabrata*. *FEMS yeast research*, v. 12, n. 6, p. 719-727, 2012.

PFALLER, M. A. et al. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resistance Updates*, v. 13, n. 6, p. 180-195, 2010.

PFALLER, M. A. et al. Frequency of Decreased Susceptibility and Resistance to Echinocandins among Fluconazole-Resistant Bloodstream Isolates of *Candida glabrata*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 4, p. 1199–1203, 2012.

RAO, Anjana et al. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 54, n. 12, p. 5062-5069, 2010.

REX, J. H.; PFALLER, M. A. Has antifungal susceptibility testing come of age? *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 35, p. 982–989, 2002.

RODRIGUES, Célia F.; SILVA, S.; HENRIQUES, Mariana. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, v. 33, n. 5, p. 673-688, 2014.

ROEMER, Terry; KRYSAN, Damian J. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 4, n. 5, p. a019703, 2014.

ROY, S.; THOMPSON, D. Evolution of regulatory networks in *Candida glabrata*: learning to live with the human host. *FEMS Yeast Research*, v. 15, 2015.

RUKAYADI, Yaya et al. Synergistic anticandidal activity of xanthorrhizol in combination with ketoconazole or amphotericin B. FEMS yeast research, v. 9, n. 8, p. 1302-1311, 2009.

SANGLARD, Dominique; COSTE, Alix; FERRARI, Sélène. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. FEMS yeast research, v. 9, n. 7, p. 1029-1050, 2009.

SANGUINETTI, Maurizio; POSTERARO, Brunella; LASS-FLÖRL, Cornelia. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. Mycoses, v. 58, n. S2, p. 2-13, 2015.

SARDI, J. C. O. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. Journal of medical microbiology, v. 62, n. 1, p. 10-24, 2013.

SARTORATTO, Adilson et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SAVASTANO, Catarina et al. *Candida glabrata* among *Candida* spp. from environmental health practitioners of a Brazilian Hospital. Brazilian journal of microbiology, v. 47, n. 2, p. 367-372, 2016.

SCORZONI, Liliana et al. Searching new antifungals: The use of *in vitro* and *in vivo* methods for evaluation of natural compounds. Journal of microbiological methods, v. 123, p. 68-78, 2016.

SILVA, Sónia et al. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. Medical Mycology, v. 47, n. 7, p. 681-689, 2009.

SILVA, Sónia et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS microbiology reviews, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.

SINGH, B.; SHARMA, R. Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. Biotech, v.5, p. 129–151, 2015.

SOUSA, J. et al. Antifungal activity of citral by disruption of ergosterol biosynthesis in fluconazole resistant *Candida tropicalis*. Int J Trop Dis Health, v. 11, p. 1-11, 2016.

SOUTO, Ingrid Carneiro Cavalcante et al. Atividades farmacológicas do monoterpeneo 1, 8-cineol: um estudo in silico. Revista Brasileira de Educação e Saúde, v. 6, n. 3, p. 26-28, 2016.

SPAMPINATO, Claudia; LEONARDI, Darío. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. BioMed research international, v. 2013, 2013.

SRINIVASAN, Anand; LOPEZ-RIBOT, Jose L.; RAMASUBRAMANIAN, Anand K. Overcoming antifungal resistance. Drug Discovery Today: Technologies, v. 11, p. 65-71, 2014.

SUN, Jidong. D-Limonene: safety and clinical applications. Alternative Medicine Review, v. 12, n. 3, p. 259, 2007.

TAFF, Heather T. et al. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. Future microbiology, v. 8, n. 10, p. 1325-1337, 2013.

TATI, Swetha et al. *Candida glabrata* binding to *Candida albicans* hyphae enables its development in oropharyngeal Candidiasis. PLoS Pathog, v. 12, n. 3, p. e1005522, 2016.

VIRIATO, Airton. Terpenoides com atividade antifúngica para *Candida* Berkhout, causadoras de infecções hospitalares. O Mundo Da Saúde, v. 38, n. 1, p. 40-50, 2014.

WALRAVEN, Carla J.; LEE, Samuel A. Antifungal lock therapy. Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 57, n. 1, p. 1-8, 2013.

WEI, Guo-Xian; XU, Xin; WU, Christine D. In vitro synergism between berberine and miconazole against planktonic and biofilm *Candida* cultures. Archives of oral biology, v. 56, n. 6, p. 565-572, 2011.

WINN, W.C.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Koneman, E.W.; Procop. G.W.; Schreckenberger, P.C.; Woods, G.L. Koneman, diagnóstico microbiológico : texto e atlas colorido. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

YANG, Zhi-Tao et al. Epidemiology, species distribution and outcome of nosocomial *Candida* spp. bloodstream infection in Shanghai. BMC infectious diseases, v. 14, n. 1, p. 241, 2014.

YAPAR, Nur. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag*, v. 10, n. 95, p. 105, 2014.