



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

WILMA RAIANNY VIEIRA DA ROCHA

**ATIVIDADE SINÉRGICA E CITOTÓXICA DA ASSOCIAÇÃO LINALOL
ANTIFÚNGICOS E SEUS EFEITOS SOBRE FATORES DE VIRULÊNCIA DE
ESPÉCIES DE *Candida***

Recife – PE
2021

WILMA RAIANNY VIEIRA DA ROCHA

**ATIVIDADE SINÉRGICA E CITOTÓXICA DA ASSOCIAÇÃO LINALOL
ANTIFÚNGICOS E SEUS EFEITOS SOBRE FATORES DE VIRULÊNCIA DE
ESPÉCIES DE *Candida***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Fármacos e medicamentos

Orientadora: Prof^a Dr^a Mônica Camelo Pessôa de Azevedo Albuquerque (UFPE)

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Eulália Camelo Pessôa de Azevedo Ximenes (UFPE)

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

R672a	Rocha, Wilma Raianny Vieira da Atividade sinérgica e citotóxica da associação linalol antifúngicos e seus efeitos sobre fatores de virulência de espécies de <i>candida</i> / Wilma Raianny Vieira da Rocha . – 2021. 169 f. : il., tab. Orientadora: Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque . Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2021. Inclui referências e apêndices. 1. Candida. 2. Monoterpenos. 3. Sinergismo farmacológico . 4. Fatores de virulência. 5. Biofilmes. 6. Antifúngicos. I. Albuquerque, Mônica Camelo Pessoa de Azevedo (orientador). II. Título. 617.6 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2021 - 237)
-------	---

WILMA RAIANNY VIEIRA DA ROCHA

**ATIVIDADE SINÉRGICA E CITOTÓXICA DA ASSOCIAÇÃO LINALOL
ANTIFÚNGICOS E SEUS EFEITOS SOBRE FATORES DE VIRULÊNCIA DE
ESPÉCIES DE *Candida***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 17/09/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Maria Bernadete de Sousa Maia (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. André de Lima Aires (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Vânia Sousa Andrade (Examinadora Externa)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Kledoaldo Oliveira de Lima (Examinador Externo)
Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho

*A minha avó materna
Zélia Silva Vieira (in memoriam)*

*Aos meus pais
Vilma Silva Vieira e Ronaldo Paulino da Rocha
e a minha irmã
Valma Ravanny Vieira da Rocha*

*Ao meu companheiro de vida
Arthur Galvão Fonseca*

AGRADECIMENTOS

A Deus misericordioso, por permitir que eu esteja concluindo esta etapa da minha vida.

A minha família inteira, em especial minha mãe Vilma Silva Vieira que sempre batalhou para que eu e minha irmã tivéssemos uma boa educação, além de seu amor incondicional e exemplo de vida. A minha irmã Valma Ravanny e meu pai Ronaldo Paulino, pelo incentivo diário, aprendizado e amor. Essas três pessoas me fizeram mover montanhas, buscar meus sonhos e entender que meu lugar seria onde eu quisesse chegar.

A minha avó materna, Zélia Silva Vieira (*in memoriam*), que em vida foi minha maior incentivadora, que sempre acreditou em mim, não mediu esforços para que eu conseguisse ter uma educação de qualidade, para que eu pudesse atingir cada objetivo da minha vida e sempre comemorou cada conquista como se fosse sua.

Ao amor da minha vida, Arthur Galvão, pela paciência, amor, espiritualidade, parceria e apoio incondicionais, por estar comigo ao meu lado em cada decisão e acreditar em mim mais do que eu mesma.

Ao meu cunhado, Sonildo Nobrega, por ser como um irmão, pelo incentivo, parceria e ajuda diária em tantos momentos, em especial nas dúvidas de estatística.

A minha família da cidade do Recife, em especial Juliane Barbosa, Felipe Galvão, Aparecida Galvão, Iza Oliveira, Thiago Oliveira, Luciene Barbosa, Inácia Oliveira (Lala), Maria Luiza Oliveira, Iara Moraes, Leonardo Guedes, Paulo Pontes, Jorge e Relba, entre tantos, que me receberam com muito amor e me ajudaram a entender a dinâmica desta cidade.

A minhas orientadoras, professora Dr^a Eulália Ximenes, pela sua parceria e simpatia diária, além do acolhimento no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Micro-organismos, pela confiança no meu trabalho e pelos inúmeros aprendizados compartilhados nesses quatro anos que se passaram e a professora Dr^a Mônica Albuquerque, pelo acolhimento em um momento tão conturbado no decorrer do doutorado, agradeço pelo pensamento crítico diante da escrita científica.

As colegas de laboratório Marina Luizy e Luanne Eugenia pela parceria, pelos momentos engraçados, pelos momentos sofridos e conturbados que passamos, pela grande ajuda nos experimentos e compartilhamento dos conhecimentos no laboratório.

Aos colegas, Luanne Eugenia e Paulo César por me acolherem em seu lar no

primeiro ano do doutorado e compartilharem suas experiências de concluintes.

A minha amiga e companheira de casa em Recife, Bruna Pereira, pela sua leveza, sorriso largo, acolhedor, risada alta e pelas conversas sempre regadas por muito bom humor e que tornaram nossos três anos de convivência diária, leves e gratificantes.

A Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), em nome dos professores Nícia Soares, Alessandra Teixeira e Clênio Queiroga, por me conceder licença total das minhas atividades como técnica de microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas da instituição, para realização dos meus estudos do doutorado.

A professora Dr^a Raïssa Catão, por ser uma grande inspiração desde o começo e ao longo da minha vida profissional, pelas inúmeras oportunidades e orientações dadas a mim, e por estar sempre na torcida por minhas conquistas.

Ao professor Dr. Harley Alves, por me dar a primeira oportunidade na iniciação científica, por acreditar no meu trabalho, por ter se tornado um parceiro de pesquisas científicas e um grande amigo.

Aos colegas da UEPB, Katharina Porto, Camila Menezes, Mayara Spencer, Niedja Eloi, Juliana Nunes, Danilo Batista, Josué e todos que compõem o time do Laboratório de Análises Clínicas (LAC – UEPB), vocês fazem parte de cada conquista minha.

A Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Departamento de Antibióticos (DANTI), Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos, por conceder a estrutura física para realização da pesquisa relacionada ao meu doutorado. A todos os colaboradores do DANTI, em especial a Luiz Carlos, Allana Gouveia, Sandra, Ivana, Jean e Emerson por estarem sempre dispostos a ajudar no que fosse preciso.

A Prof^a Dra. Jaciana Aguiar e a Dra. Erwelly de Oliveira por abrir espaço e disponibilizarem tempo para realização de experimentos que foram extremamente importantes para a conclusão deste trabalho.

A todos os professores que compõem o corpo docente do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco.

Aos colaboradores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial aos amigos Nerilin e Rilvan, que sempre estão disponíveis para ajudar todos os alunos, sendo sempre calma nos momentos conturbados.

A Patrícia Campelo pela disponibilização das cepas fúngicas utilizadas neste trabalho.

Aos colegas que compõem o Laboratório de Enzimologia (LABENZ) do Departamento de Bioquímica da UFPE, em especial a Caio e Amanda, por toda a disponibilidade a ajudar em determinados experimentos.

Aos colegas e amigos que fiz no doutorado e na UFPE, Katharina Porto, Victor Hugo Santos, Iranildo Cruz Filho, Rayane Siqueira, Jéssica Andrade, Elizabeth Borba pelo acolhimento, em especial aos meus amigos Diego Marques e Camila Alves pelas inúmeras ajudas ao longo dos experimentos.

Aos meus amigos de caminhada acadêmica, que fiz ao longo destes anos, e que foram sempre grande inspiração, em especial a Dr. Tales Alexandre Costa e Silva, Dr^a Alessandra Apolinário, Dr. João Paulo dos Anjos, Dr^a Talita Camila, Lívia Geovanne, entre tantos que me ajudaram a chegar neste momento.

As minhas grandes amigas, Andressa Vieira, Jéssica Ohanna e Dalila Rodrigues, que foram essenciais no início da minha caminhada no curso de Farmácia, que se tornaram família e que me ajudam a enfrentar os meus medos e a confiar em mim mesma.

A banca examinadora pela disponibilidade e sugestões.

Gratidão a todos que contribuíram para a realização deste trabalho!

*“A minha jangada, foi pro mar
Pra minha jogada arriscar
Eu não vou sucumbir”*

(SOARES, 2019)

RESUMO

Infecções invasivas causadas por espécies de *Candida* estão associadas a altas taxas de mortalidade, nas duas últimas décadas, esses micro-organismos passaram a apresentar resistência aos antifúngicos. Nesse contexto, existe o interesse em encontrar novos compostos que sejam capazes de reverter a sensibilidade desses micro-organismos e tenham efeito sobre fatores de virulência. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica dos monoterpenos: linalol, limoneno e eucaliptol, selecionar o monoterpeno ativo diante de *Candida albicans* e *Candida não-albicans*, determinar o efeito das associações de linalol-antifúngicos e atividade destas associações sobre fatores de virulência, bem como determinar a citotoxicidade destas associações. A atividade antifúngica dos monoterpenos foi avaliada pelo teste de microdiluição em caldo RPMI 1640, determinando a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) diante de 21 cepas *Candida*. A CIM dos antifúngicos fluconazol, cetoconazol, itraconazol, terconazol, micafungina e anfotericina B foi determinada e utilizada para verificar o perfil de susceptibilidade. Após selecionar o monoterpeno pela menor CIM, foi determinado o efeito das associações com antifúngicos pelo método *checkerboard*, sendo considerado sinérgico, aditivo ou antagonista pela determinação da concentração inibitória fracionada índice (CIFI). A ação do linalol na parede celular das espécies de *Candida* foi avaliada pelo método do sorbitol. As associações linalol com fluconazol, micafungina e anfotericina B foram avaliadas quanto a ação diante da formação de tubo germinativo (TG) de *C. albicans*, utilizando meio de indução com soro fetal bovino 25 %, sendo avaliada também quanto a atividade antibiofilme, quantificação da biomassa, com cristal violeta 0,4 %. A citotoxicidade do linalol e destas associações diante de células Vero e L929 pelo método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). O linalol apresentou atividade diante de todas as cepas de *Candida* com CIM variando de 512 a 1024 µg/mL. O limoneno e o eucaliptol apresentaram CIM > 1024 µg/mL para a maioria das cepas. As associações linalol-antifúngicos apresentaram em maior parte efeito sinérgico, com CIFI variando de 0,06 a 0,5. Verificou-se que o linalol não age na parede celular de *Candida*. As associações apresentaram potencial de evitar a formação de TG de *C. albicans* em até 85 %, bem como foram capazes de reduzir a formação de biofilme e tiveram ação sobre biofilme formado com destaque para *C. albicans* e *C.*

parapsilosis, apresentando baixa citotoxicidade diante de células Vero e L929. O linalol isolado e suas associações com antifúngicos mostraram ser capazes de reverter a resistência a todos os azólicos e micafungina mostrando efeito sinérgico com todos os antifúngicos testados, foi capaz de evitar a formação de TG de *C. albicans* e de biofilme das cepas testadas, além de combater o biofilme pré-formado. O estudo apresentou resultados promissores e estudos mais aprofundados de tecnologia farmacêutica, bem como estudos pré-clínicos e clínicos são necessários para aplicação futura como tratamento antifúngico de infecções por *Candida*.

Palavras-chave: candidas; monoterpeno; sinergismo farmacológico; fatores de virulência; biofilme; antifúngicos

ABSTRACT

Invasive infections caused by *Candida* species are associated with high mortality rates, over the last two decades, these microorganisms began to show resistance to antifungal agents. In this context, there is an interest in finding new compounds with activity that are capable of reversing the sensitivity of these microorganisms and that have an effect on virulence factors. The objective of this work was to evaluate the antifungal activity of the monoterpenes: linalool, limonene and eucalyptol, to select the active monoterpene against *Candida albicans* and *Candida non-albicans*, to determine the effect of linalool-antifungal associations and the activity of these associations on virulence factors, as well as determining the cytotoxicity of these associations. The antifungal activity of the monoterpenes was evaluated by the microdilution test in RPMI 1640 broth, by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) against 21 strains of *C. albicans* and *C. non-albicans*. The MIC of the antifungal agents fluconazole, ketoconazole, itraconazole, terconazole, micafungin and amphotericin B was determined and used to verify the susceptibility profile. The monoterpene with the lowest MIC values was selected for further study. After selecting the active compound, the effect of the associations was determined by the checkerboard method, with the selected antifungal agents being considered synergistic, additive or antagonistic by determining the fractional inhibitory concentration index (FICI). The action of linalool on the cell wall of *Candida* species was evaluated using the sorbitol method. The associations of linalool with fluconazole, micafungin and amphotericin B were evaluated for action on the formation of germ tube (TG) of *C. albicans*, using induction medium with 25% fetal bovine serum, and also evaluated for activity on biofilm formation and biofilms formed, by the biomass quantification method, with 0.4% crystal violet. The cytotoxicity of linalool and these associations against Vero and L929 cells was also evaluated by the method of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Linalool showed activity against all *Candida* strains with MIC ranging from 512 to 1024 µg/mL. Limonene and eucalyptol had MIC > 1024 µg/mL for most strains. The linalool-antifungal combinations had mostly a synergistic effect, with FICI ranging from 0.06 to 0.5. It was found that linalool does not act on the *Candida* cell wall. The associations had the potential to prevent the formation of TG of *C. albicans* by up to 85%, as well as were able to reduce the

formation of biofilm and had action on the formed biofilm, with emphasis on *C. albicans* and *C. parapsilosis*, presenting low cytotoxicity towards of Vero and L929 cells. The isolated linalool and its associations with antifungal agents showed to be able to reverse the resistance to all azoles and micafungin showing a synergistic effect with all tested antifungal agents, it was able to prevent the formation of TG of *C. albicans* and biofilm of the strains tested, in addition to combat the preformed biofilm. The study showed promising results and further studies of pharmaceutical technology as well as preclinical and clinical studies are needed for future application as an antifungal treatment of *Candida* infections.

Keywords: candidas; monoterpen; drug synergism; virulence factors; biofilm; antifungals

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pág.
Figura 1 - Estrutura esquemática da célula de leveduras do gênero <i>Candida</i>	26
Figura 2 - Esfregaço de colônias de <i>Candida albicans</i> isoladas em Agar Sabourand corado pela coloração de Gram.....	26
Figura 3 - Aspecto de colônias de <i>Candida</i> em meio Agar Batata Dextrose.....	28
Figura 4 - Aspecto e coloração de colônias de diferentes espécies do gênero <i>Candida</i> em meio Chromagar <i>Candida</i> ®.....	29
Figura 5 - Fatores de virulência de espécies de <i>Candida</i>	31
Figura 6 - Patogênese da candidíase invasiva.....	36
Figura 7 - Esquema da rota da síntese biológica de ergosterol em leveduras.....	38
Figura 8 - Fórmula estrutural dos antifúngicos triazólicos.....	39
Figura 9 - Fórmula estrutural do antifúngico imidazólico cetoconazol.....	39
Figura 10 - Esquema de rota da síntese biológica do ergosterol especificando o caminho inibido pelos antifúngicos azólicos.....	40
Figura 11 - Fórmula estrutural do antifúngico terbinafina.....	42
Figura 12 - Fórmula estrutural dos antifúngicos polienos.....	43
Figura 13 - Esquema da formação de poros transmembrana pela interação da Nistatina com o ergosterol da membrana fúngica.....	44
Figura 14 - Fórmula estrutural dos antifúngicos da classe das equinocandinas.....	46
Figura 15 - Fórmula estrutural de (A) Citosina, (B) Flucitosina e (C) 5-Fluorouracil.....	48
Figura 16 - Mecanismos de ação das principais classes de antifúngicos.....	50
Figura 17 - Representação esquemática da resistência do gênero <i>Candida</i> às drogas antifúngicas.....	54

Figura 18 -	Esquema de rota de biossíntese de terpenos pela via clássica do ácido mevalônico.....	56
Figura 19 -	Estrutura química dos enantiômeros do linalol.....	58
Figura 20 -	Esquema proposto do mecanismo de ação do linalol sobre espécies de <i>Candida</i>	60
Quadro 1 -	Identificação das espécies das cepas de <i>Candida</i>	61
Figura 21 -	Padronização de inóculo de <i>Candida</i> segundo documento M27 (2017a) do <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>	63
Figura 22 -	Esquema de diluição seriada para determinação da concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima.....	66
Figura 23 -	Esquema de determinação de concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima.....	67
Figura 24 -	Perfil dos isobogramas com os possíveis efeitos das associações.....	70
Figura 25 -	Aspecto de tubo germinativo formado por <i>Candida albicans</i> LFBM AM14.....	73
Figura 26 -	Isobogramas revelando o efeito sinérgico da associação entre: (A) Linalol e Fluconazol; (B) Linalol e Cetoconazol; (C) Linalol e Terconazol e (D) Linalol e Itraconazol sobre <i>Candida albicans</i> LFBM AM14.....	91
Figura 27 -	Isobogramas revelando o efeito sinérgico da associação entre: (A) Linalol e Fluconazol; (B) Linalol e Cetoconazol; (C) Linalol e Terconazol e (D) Linalol e Itraconazol sobre <i>Candida glabrata</i> ATCC 90030.....	92
Figura 28 -	Isobogramas revelando o efeito sinérgico da associação entre linalol e micafungina sobre: (A) <i>Candida albicans</i> LFBM AM14; (B) <i>Candida tropicalis</i> LFBM 3769.....	93
Figura 29 -	Isobogramas revelando o efeito sinérgico da associação entre linalol e anfotericina B sobre: (A) <i>Candida albicans</i> LFBM AM14; (B) <i>Candida glabrata</i> ATCC 90030.....	95
Figura 30 -	Inibição do tubo germinativo de <i>Candida albicans</i> pela ação do linalol e sua associação com fluconazol.....	98
Figura 31 -	Inibição do tubo germinativo de <i>Candida albicans</i> pela ação do linalol e sua associação com micafungina.....	100

Figura 32 -	Inibição do tubo germinativo de <i>Candida albicans</i> pela ação do linalol e sua associação com anfotericina B.....	102
Figura 33 -	Inibição de tubo germinativo entre as associações de linalol com fluconazol, micafungina e anfotericina B.....	103
Figura 34 -	Formação de biofilmes das espécies de <i>Candida</i> expressa pelos valores médios e desvio padrão da leitura da absorbância em 585 nm do cristal violeta.....	104
Figura 35 -	Inibição de formação de biofilme pelo linalol sobre espécies de <i>Candida</i>	105
Figura 36 -	Percentual de Inibição na formação do biofilme de espécies de <i>Candida</i> após exposição a associação linalol-fluconazol.....	107
Figura 37 -	Percentual de Inibição na formação do biofilme de espécies de <i>Candida</i> após exposição a associação linalol-micafungina.....	109
Figura 38 -	Percentual de Inibição na formação do biofilme de espécies de <i>Candida</i> após exposição a associação linalol-anfotericina B.....	111
Figura 39 -	Inibição de formação de biofilme entre as associações de linalol com fluconazol, micafungina e anfotericina B.....	112
Figura 40 -	Atividade sobre o biofilme formado do linalol sobre espécies de <i>Candida</i>	113
Figura 41 -	Atividade da associação linalol-fluconazol sobre o biofilme formado de espécies de <i>Candida</i>	115
Figura 42 -	Atividade da associação linalol-micafungina sobre o biofilme formado de espécies de <i>Candida</i>	116
Figura 43 -	Atividade da associação linalol-anfotericina B sobre o biofilme formado de espécies de <i>Candida</i>	118
Figura 44 -	Atividade das associações do linalol-anfúngicos sobre o biofilme formado espécies de <i>Candida</i>	119
Figura 45 -	Atividade citotóxica das associações de linalol-antifúngicos sobre as linhagens celulares: (A) células Vero e (B) células L929.....	121
Figura 46 -	Citotoxicidade do linalol: (A) células Vero e (B) células L929.....	123

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 - Concentração dos antifúngicos para classificação da suscetibilidade das espécies de <i>Candida</i> - ponto de corte “breakpoint” para o método de difusão em Agar <i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>	64
Tabela 2 - Concentração dos antifúngicos (µg/mL) para classificação da suscetibilidade das espécies de <i>Candida</i> - ponto de corte “breakpoint” para o método de microdiluição <i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>	68
Tabela 3 - Linalol, antifúngicos e suas concentrações utilizadas na avaliação da inibição do tubo germinativo de <i>Candida albicans</i>	72
Tabela 4 - <i>Candida</i> , linalol, antifúngicos e concentrações das amostras avaliadas na avaliação da atividade antibiofilme.....	75
Tabela 5 - Concentrações das amostras testadas de linalol e antifúngicos na avaliação da citotoxicidade.....	80
Tabela 6 - Atividade anti- <i>Candida</i> de linalol, limoneno e eucaliptol	81
Tabela 7 - Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima de antifúngicos sobre espécies de <i>Candida</i>	83
Tabela 8 - Associação linalol-antifúngicos sobre espécies de <i>Candida</i>	85
Tabela 9 - Valores da concentração inibitória mínima do linalol na ausência e na presença de sorbitol.....	96

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

°C	Celsius
%	Porcentagem
g/mol	Gramas por mol
mg/m ³	Miligramma por milímetro cúbico
mg/kg/dia	Miligramma por quilo de peso administrado por dia
ABC	<i>ATP-Binding Cassete</i>
ABD	Agar Batata Dextrose
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
AMH	Agar Mueller Hinton
ANF	Anfotericina B
ATCC	American Type Culture Collection
CBD	Caldo Batata Dextrose
CET	Cetoconazol
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CS	Caldo Sabourand
CIF	Concentração inibitória fracionada
FLU	Fluconazol
H	Horas
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
ITZ	Itraconazol
MICA	Micafungina
LFBM	Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos
MFS	<i>Major facilitator superfamily</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TER	Terconazol
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia por mililitro
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFPE	Universidade Federal da Paraíba

Abreviações e siglas que não se encontrem nesta lista foram descritas no texto.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	24
2.1	OBJETIVO GERAL	24
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1	GÊNERO <i>CANDIDA</i>	25
3.1.1	Considerações gerais	25
3.1.2	Fatores de virulência	29
3.1.3	Epidemiologia	32
3.2	CANDIDÍASE	33
3.3	TERAPIAS ANTIFÚNGICAS	36
3.3.1	Inibidores da biossíntese do ergosterol fúngico e fármacos que interagem com o ergosterol	36
3.3.1.1	Antifúngicos Azólicos	38
3.3.1.2	Antifúngicos Alilaminas	41
3.3.1.3	Antifúngicos Polienos	42
3.3.2	Equinocandinas – Inibidores da parede celular	45
3.3.3	Análogos da pirimidina	47
3.4	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DO GÊNERO <i>CANDIDA</i> AOS ANTIFÚNGICOS	51
3.4.1	Resistência aos azólicos	51
3.4.2	Resistência as equinocandinas	52
3.4.3	Resistência aos polienos	52
3.5	TERPENOS	55
3.5.1	Considerações gerais sobre terpenos	55
3.5.2	Linalol	57
3.5.2.1	Mecanismo antifúngico do Linalol	59
4	MATERIAIS E MÉTODOS	61
4.1	<i>CANDIDA</i> , MEIOS DE CULTURA, PRESERVAÇÃO DAS CEPAS E PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO	61
4.1.1	Cultivo das espécies de <i>Candida</i> em caldo Sabouraud e CHROMagar <i>Candida</i> TM (BD TM)	62

4.1.2	Preparação das culturas de <i>Candida</i> e sua preservação	62
4.1.3	Padronização do inoculo	63
4.1.4	Avaliação da susceptibilidade das cepas de <i>Candida</i> aos antifúngicos – Método de difusão em meio sólido	64
4.2	MONOTERPENOS E AGENTES ANTIFÚNGICOS	65
4.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-CANDIDA DE MONOTERPENOS E ANTIFÚNGICOS	65
4.3.1	Determinação da concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima	65
4.3.2	Avaliação da atividade anti-<i>Candida</i> da associação da Linalol-antifúngicos - Método Checkerboard	68
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO LINALOL NA PAREDE CELULAR DE ESPÉCIES DE <i>CANDIDA</i> - Ensaio do sorbitol	70
4.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO LINALOL E DE SUAS ASSOCIAÇÕES COM ANTIFÚNGICOS SOBRE FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>CANDIDA</i>	71
4.5.1	Avaliação da inibição da formação de tubo germinativo de <i>Candida albicans</i>	71
4.5.2	Avaliação atividade antibiofilme do linalol e suas associações com antifúngicos	74
4.5.2.1	Formação e quantificação do biofilme	76
4.5.2.2	Avaliação da atividade do linalol de suas associações com antifúngicos sobre a formação de biofilme de espécies de <i>Candida</i>	77
4.5.2.3	Avaliação da atividade do linalol e de suas associações com antifúngicos sobre o biofilme formado de espécies de <i>Candida</i>	78
4.6	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO LINALOL E SUAS ASSOCIAÇÕES COM ANTIFÚNGICOS	79
4.6.1	Atividade citotóxica sobre células Vero e L929	80
5	RESULTADOS	81
5.1	ATIVIDADE ANTI-CANDIDA DE LINALOL, LIMONENO E EUCALIPTOL	81
5.2	EFEITO DAS ASSOCIAÇÕES DO LINALOL COM ANTIFÚNGICOS SOBRE ESPÉCIES DE <i>CANDIDA</i>	84
5.3	EFEITO DO LINALOL SOBRE A PAREDE CELULAR DE ESPÉCIES DE <i>CANDIDA</i>	96

5.4	INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE TUBO GERMINATIVO DE CEPAS DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> PELA AÇÃO DO LINALOL E SUAS ASSOCIAÇÕES COM ANTIFÚNGICOS	97
5.5	FORMAÇÃO DE BIOFILME DE ESPÉCIES DE <i>CANDIDA</i>	104
5.6	INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE ESPÉCIES DE <i>CANDIDA</i> PELA AÇÃO DO LINALOL E SUAS ASSOCIAÇÕES COM ANTIFÚNGICOS	105
5.7	ATIVIDADE DO LINALOL E DE SUAS COM ANTIFÚNGICOS SOBRE BIOFILME FORMADO DE ESPECIES DE <i>CANDIDA</i>	113
5.8	EFEITO CITOTÓXICO DO LINALOL E DE SUAS ASSOCIAÇÕES COM ANTIFÚNGICOS	120
6	DISCUSSÃO	124
7	CONCLUSÃO	132
	REFERÊNCIAS	134
	APÊNCICE A – PRODUÇÃO CIENTÍFICA	148
	APÊNDICE B – ISOBOLOGRAMAS DAS ASSOCIAÇÕES DE LINALOL COM ANTIFÚNGICOS SOBRE <i>Candida albicans</i>	151
	APÊNDICE C – ISOBOLOGRAMAS DAS ASSOCIAÇÕES DE LINALOL COM ANTIFÚNGICOS SOBRE <i>Candida não-albicans</i>	158
	APÊNDICE D – PATENTE DEPOSITADA NO INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL	165
	APÊNDICE E – ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS	168

1 INTRODUÇÃO

Candida é um gênero de fungos leveduriformes, micro-organismos eucariotos, que são encontrados na mucosa reprodutiva e gastrointestinal de cerca de 50-70 % dos indivíduos saudáveis (PAPPAS et. al, 2018). Diante de fatores determinados, como sistema imunológico deprimido, como em pacientes acometidos de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), em tratamento com antibióticos de largo espectro, em uso de corticóides e terapias hormonais, essas leveduras podem se tornar agentes causadores de infecção, denominada de Candidíase (HANI, et. al, 2015; PAPPAS et. al, 2018).

A espécie *C. albicans* foi descrita como a mais prevalente nas infecções causadas por este gênero, porém é crescente o número de relatos de infecções causadas por espécies de *C. não-albicans* (PFALLER et. al, 2010; RODRIGUES et. al, 2017). Entre as espécies de *C. não-albicans*, a espécie *C. glabrata* vem sendo relatada como um dos principais problemas relacionados às infecções causadas por este gênero, uma vez que passaram a apresentar resistência ou sensibilidade diminuída aos azólicos e podem apresentar também resistência as equinocandinas, o que se torna preocupante as infecções causadas por esta espécie, uma vez que apresenta alta incidência em adultos, além de serem responsáveis pelas maiores taxas de mortalidade atribuídas ao gênero *Candida* (RODRIGUES et. al, 2017).

Os antifúngicos azólicos são indicados para infecções causadas por estas leveduras que são sensíveis e que causam principalmente candidíase muco cutânea oral, vaginal, de pele, esofágica e nas unhas, mas também são indicados para candidíase invasiva (HANI, et. al, 2015). A classe das equinocandinas é geralmente indicada para o tratamento de candidíase esofágica e candidíase invasiva, inclusive no tratamento de candidemia (DENNING, 2003; AKINS, 2005; PERLIN, 2011). Enquanto que a classe dos polienos, a anfotericina B é mais utilizada para tratamento de infecções sistêmicas, a nistatina é indicada para tratamentos de infecções tópicas, uma vez que apresenta problemas de absorção e alta toxicidade (HANI et al. 2015; PRASAD, SHAH & RAWAL, 2016).

O desenvolvimento da resistência das espécies de *Candida* aos antifúngicos, com destaque para a resistência a classe dos antifúngicos azólicos (ARENDRUP & PATTERSON, 2017), o aparecimento de cepas resistentes a mais de uma classe de antifúngicos (multidroga resistentes), aliado ao pequeno número de classes de

agentes antifúngicos disponíveis, torna necessário o descobrimento de novos tratamentos, neste contexto os produtos de origem natural são um grande atrativo na busca do tratamento dessas infecções (SINGULANI, 2018).

Os monoterpenos são compostos de origem natural que apresentam uma grande diversidade molecular, e são citados por suas diversas atividades biológicas, como antiviral, antibacteriana, antifúngica, antioxidante (BHATTI et al., 2014). Os monoterpenos linalol, limoneno e eucaliptol vêm sendo citados pela atividade anti-*Candida*, efeito inibitório sobre a formação de tubo germinativo de *C. albicans*, efeito de diminuição da secreção de enzimas hidrolíticas, atividade antibiofilme e estudos de associação *in vitro* com antifúngicos (ZORE, et. al, 2011; RAUT et. al, 2013; KHAN, et. al, 2014; MANOHARAN et. al, 2017; THAKRE, et al., 2017; ALVES, et al., 2019).

Existe, portanto um interesse crescente nos estudos destes compostos a fim de determinar sua atividade diante de cepas de *Candida* resistentes a antifúngicos, sua ação diante de mecanismos de resistência, ação potencial sobre fatores de virulência desses micro-organismos, além de entender como funciona o mecanismo com de ação destes compostos por métodos simplificados, como a ação na parede celular, pelo método sorbitol.

Estudos relatam a utilização de monoterpenos associados aos agentes antifúngicos diante de espécies de *Candida*, com foco principalmente na espécie *C. albicans* (ZORE et. al, 2011; CARDOSO et. al, 2016), porém os estudos não relatam a ação destas associações em fatores de virulência e mecanismos de resistência das cepas de *Candida*, bem como não indicam a provável reversão da sensibilidade das cepas aos antifúngicos.

A resistência de diferentes espécies de *Candida* aos antifúngicos de uso clínico, em especial aos antifúngicos da classe dos azólicos, dificulta o tratamento de infecções causadas por este gênero. A dificuldade ou ausência de tratamentos eficazes levam a um maior período de internação dos pacientes acometidos com tais infecções, bem como maior chance da infecção evoluir para casos de morte. Dessa forma, a busca por novos compostos com atividade antifúngica e que atuem nos mecanismos de resistência e nos principais fatores de virulência de *Candida*, podendo promover melhora na eficácia do tratamento.

Dessa forma, este estudo se propõe a avaliar a atividade antifúngica de três monoterpenos (linalol, limoneno e eucaliptol) diante de espécies de *Candida*,

buscando o monoterpeno ativo dentre estes. Além disso, descreve o efeito da associação do linalol-antifúngicos das três principais classes (azólicos, equinocandinas e polienos) e demonstra o efeito dessas associações no biofilme formado e na formação de biofilme, atividade sobre a parede celular, promovendo um estudo comparativo entre cepas de *C. albicans* e *C. não-albicans*, além de evidenciar a ação do linalol e das associações sobre do tubo germinativo de *C. albicans*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antifúngica dos monoterpenos linalol, limoneno e eucaliptol e da associação linalol-antifúngicos, bem como avaliar a ação destas associações sobre fatores de virulência de espécies de *Candida* e seus efeitos citotóxicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM), a concentração fungicida mínima (CFM) dos monoterpenos linalol, limoneno e eucaliptol, e selecionar dentre os monoterpenos aquele mais ativo;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) do fluconazol, cetoconazol, itraconazol, terconazol, micafungina e anfotericina B;
- Determinar a susceptibilidade das espécies de *Candida* a fluconazol, cetoconazol, itraconazol, anfotericina B, micafungina e nistatina;
- Determinar o efeito das associações linalol-fluconazol, linalol-cetoconazol, linalol-itraconazol, linalol-terconazol, linalol-micafungina e linalol-anfotericina B;
- Determinar a ação do linalol sobre a parede celular de espécies de *Candida* – ensaio do sorbitol;
- Determinar a atividade do linalol e de suas associações com fluconazol, micafungina e anfotericina B sobre a inibição do tubo germinativo de *C. albicans*;
- Determinar a atividade antibiofilme linalol e das suas associações linalol-fluconazol, linalol-micafungina e linalol-anfotericina B;
- Determinar o efeito citotóxico do linalol e de suas associações com fluconazol, micafungina e anfotericina B sobre as linhagens celulares Vero e L929.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 GÊNERO *CANDIDA*

3.1.1 Considerações gerais

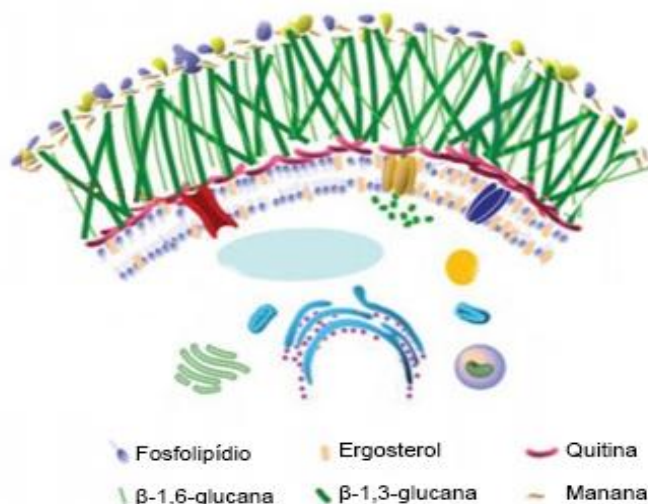
Os fungos são seres vivos que possuem estrutura nuclear organizada e delimitada por uma membrana e, por essa característica, são considerados seres eucarióticos. Eles possuem uma parede celular externa composta principalmente por quitina, uma membrana citoplasmática composta por uma parte lipídica essencialmente de ergosterol, citoplasma constituído de inúmeras organelas desempenhando diversas funções, como mitocôndrias e ribossomos, núcleo contendo o material genético organizado e protegido. Podem se apresentar como seres pluricelulares, a exemplo dos fungos filamentosos (Gêneros como: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*) ou como seres unicelulares, a exemplo dos fungos leveduriformes (Gêneros como: *Candida*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*) (SIDRIM & ROCHA, 2012).

Dos fungos leveduriformes responsáveis por causar doenças em humanos e, portanto aqueles que possuem importância clínica destacam-se as espécies pertencentes ao gênero *Candida*. Apesar de serem descritas cerca de 150 espécies pertencentes a este gênero, uma pequena minoria é conhecida por causar infecções em humanos (SILVA et al., 2012).

O gênero *Candida* é enquadrado taxonomicamente ao Reino *Fungi*, Divisão *Eumycota*, Subdivisão *Deuteromycotina*, Classe *Hemiascomycetes*, Ordem *Saccharomycetales*, Família *Saccharomycetaceae* (HOOG et al., 2019).

Este gênero apresenta estrutura celular microscópica característica dos seres vivos do Reino *Fungi*, incluindo a parede celular de quitina e a membrana citoplasmática fosfolipídica constituída por proteínas que agem como enzimas e ergosterol que funciona como estrutura para a membrana desempenhar suas funções (SIDRIM & ROCHA, 2012; SILVA et al., 2012; LV, YAN & JIANG, 2017) (Figura 1).

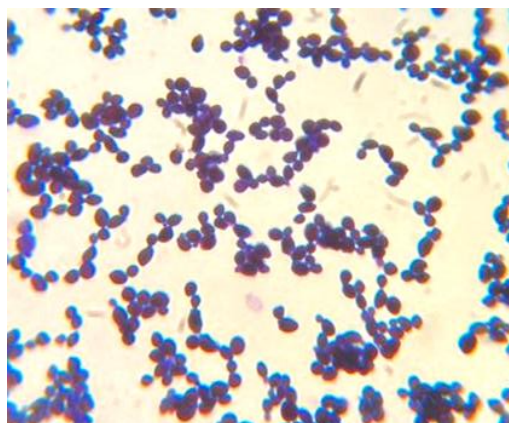
Figura 1 – Estrutura esquemática da célula de leveduras do gênero *Candida*



Fonte: Adaptado de LV, Q., YAN, L., JIANG, Y. The synthesis, regulation, and functions of sterols in *Candida albicans*: Well-known but still lots to learn. **Virulence**, v. 7, n. 6, p. 649-659, 2016.

Em condições ótimas de crescimento, com nutrientes específicos e temperatura ideal, crescem de forma exponencial em forma de blastoconídios (células que brotam). Após coloração pela técnica de Gram (Figura 2), as células de espécies do gênero *Candida* se apresentam coradas em violeta escuro demonstrando os blastoconídios, com brotamentos ou não, podem demonstrar o crescimento filamentoso (hifas/pseudo-hifas) (MODRZEWSKA & KURNATOWSKI, 2013).

Figura 2 – Esfregaço de colônias de *Candida albicans* isoladas em Agar Sabourand corado pela coloração de Gram



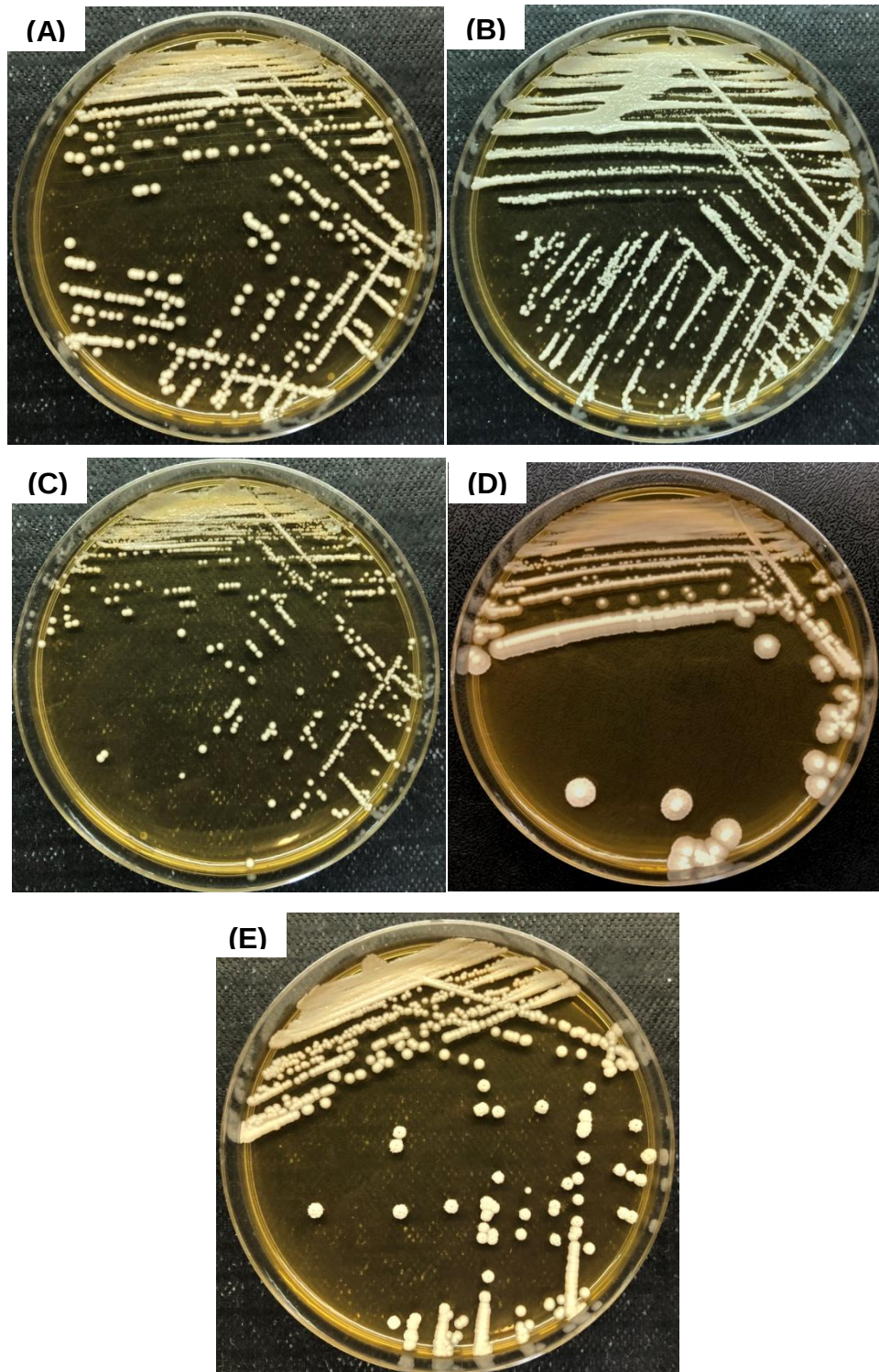
Nota: Imagens obtidas através de microscópio óptico binocular (aumento de 100x em óleo de imersão) no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos, da Universidade Federal de Pernambuco (LFBM - UFPE), cepas do gênero *Candida* mantidas no LFBM e utilizadas neste estudo.
Fonte: A autora (2021).

As espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis* são consideradas polimórficas por apresentarem transição de blastoconídio em hifas/pseudo-hifas. Na identificação laboratorial elas são separadas das demais espécies pela presença de tubo germinativo, um estágio inicial da formação das hifas. Já a *C. glabrata* é não polimórfica, uma vez que não produz hifas/pseudo-hifas crescendo apenas sob a forma de blastoconídios (SILVA et al., 2012; MODRZEWSKA & KURNATOWSKI, 2013).

Microscopicamente as espécies de *Candida* apresentam tamanho de blastoconídio variando de 1–8 µm de tamanho, destacando que as células de *C. glabrata* são visivelmente menores, com tamanho entre 1 a 4 µm, quando comparado aos blastoconídios de *C. albicans* que têm tamanho entre 4 a 6 µm, a *C. tropicalis* (4 a 8 µm) e a *C. parapsilosis* (2,5 a 4 µm) (SILVA et al., 2012; MODRZEWSKA & KURNATOWSKI, 2013).

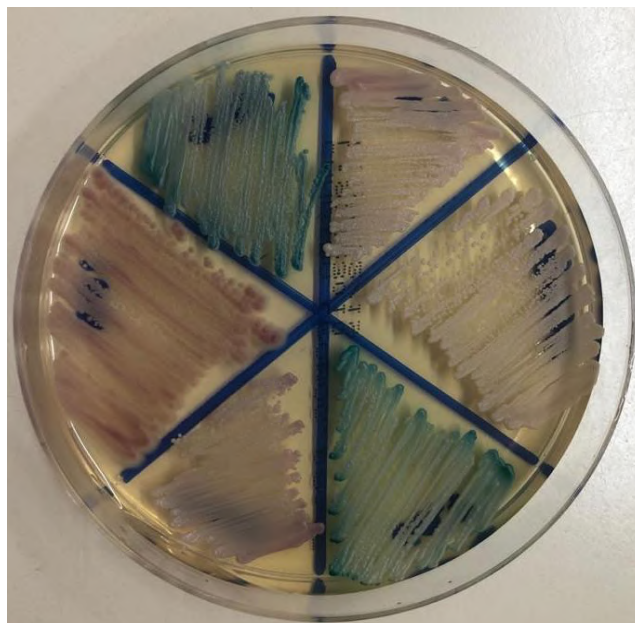
As diferentes espécies de *Candida*, quando semeadas em meios de cultura como o Agar Batata Dextrose, apresentam-se em forma de colônias de coloração creme ou amarela (Figura 3A - 3E) e podem apresentar diferentes texturas dependendo da espécie. Quando semeadas em meio diferencial Chromagar *Candida*® é possível observar modificação da coloração das colônias, através da atividade de enzimas específicas, sendo possível identificação presuntiva de certas espécies (Figura 4).

Figura 3 – Aspecto de colônias de *Candida* em meio Agar Batata Dextrose. **(A)** *Candida albicans*; **(B)** *Candida glabrata*; **(C)** *Candida parapsilosis*; **(D)** *Candida krusei* e **(E)** *Candida tropicalis*



Nota: Imagens obtidas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos, da Universidade Federal de Pernambuco (LFBM - UFPE), cepas do gênero *Candida* mantidas no LFBM e utilizadas para obtenção dos resultados deste estudo. **Fonte:** A autora (2021).

Figura 4 – Aspecto e coloração de colônias de diferentes espécies do gênero *Candida* em meio Chromagar *Candida*®



Legenda: Nota: Imagens obtidas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos, da Universidade Federal de Pernambuco (LFBM - UFPE), cepas do gênero *Candida* mantidas no LFBM e utilizadas para obtenção dos resultados deste estudo **Fonte:** A autora (2021).

3.1.2 Fatores de virulência do gênero *Candida*

As espécies do gênero *Candida* não são micro-organismos virulentos, apenas em condições favoráveis do hospedeiro permitem que esses fungos passem de comensais a patogênicos (MONOD & BORG-VON ZEPELIN, 2002). Para que consigam colonizar e infectar, causando doenças, esses micro-organismos se deparam com determinadas características de defesa do hospedeiro, tais como barreiras mecânicas (como o tecido epitelial), bioquímicas, físico-químicas (como pH extremos e produção de muco), presença de outros micro-organismos e seus metabólitos, além a imunidade inata e adquirida (POLKE, HUBEX & JACOBSEN, 2015). Dessa forma, esses micro-organismos desenvolveram mecanismos de sobrevivência bem como estratégias de invasão no hospedeiro, como forma de ultrapassar tais barreiras, as quais são denominadas de fatores de virulência de um micro-organismo (POULAIN, 2015).

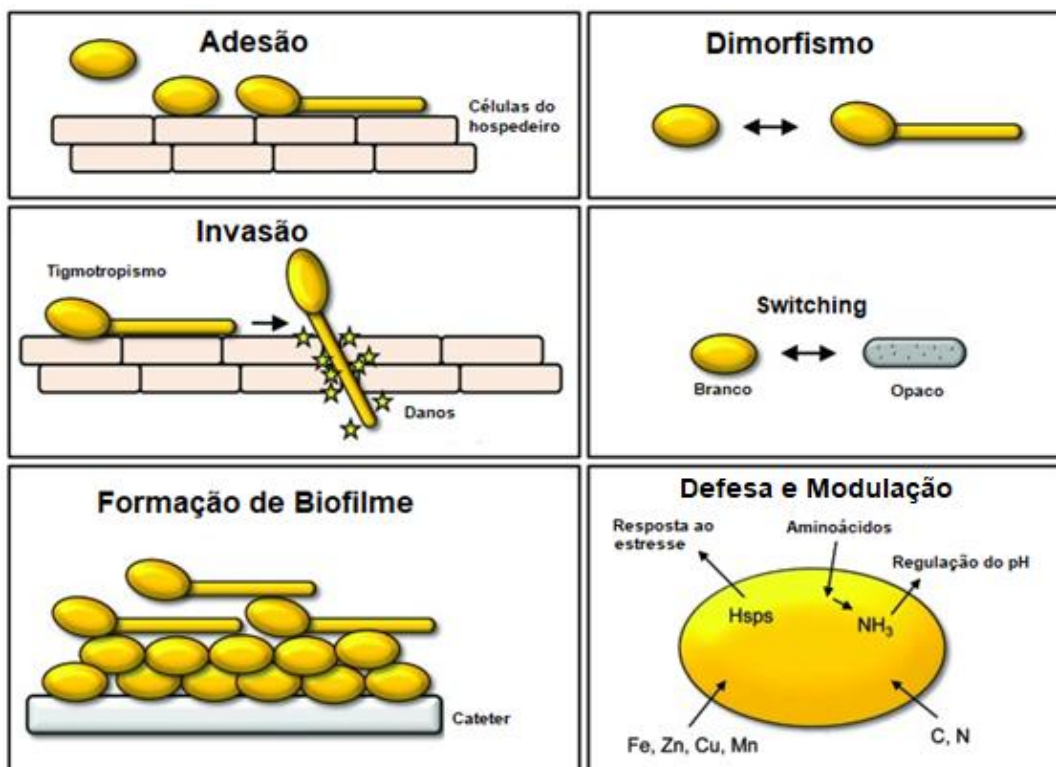
A espécie *C. albicans* desenvolveu a capacidade de se adaptar a diferentes sítios humanos, sendo esse um dos principais motivos para que esta espécie seja a mais frequentemente isolada em infecções pelo gênero, devido principalmente aos

seus fatores de virulência. Nesses sítios as características são bem diferentes, como pH, microbiota normal do sítio de infecção e a imunidade do sítio do hospedeiro, convivendo de forma comensal ou causando infecção (CALDERONE & CLANCY, 2011; POLKE, HUBEX & JACOBSEN, 2015; STANISZEWSKA, 2020).

Os principais fatores de virulência relatados para as espécies de *Candida* incluem: secreção de enzimas hidrolíticas, expressão de adesinas e invasinas envolvidas na adesão e invasão tecidual do hospedeiro, tigmotropismo (capacidade de identificar locais infectáveis), aquisição de nutrientes como aminoácidos e compostos de carbono e nitrogênio, minerais como ferro, zinco, cobre e manganês, biossíntese de proteínas implicadas no efluxo de múltiplas drogas, formação de biofilme e morfologia celular (THOMPSON, CARLISLE & KADOSH, 2011; SILVA, et al., 2012; MAYER, WILSON & HUBE, 2013; POLKE, HUBEX & JACOBSEN, 2015; LONE & AHMAD, 2019; STANISZEWSKA, 2020) (Figura 4).

A morfologia celular das espécies de *Candida* é citada com um dos principais fatores de virulência do gênero, uma vez que as diferentes formas de apresentação celular estão envolvidas em etapas do processo infeccioso, principalmente na etapa de invasão das células do hospedeiro. *C. albicans* é uma espécie polimórfica, ela se apresenta como células leveduriformes (blastocónídeos) e/ou crescimento filamentoso na forma de hifas verdadeiras e pseudo-hifas. Essa capacidade de formar hifas e pseudo-hifas está extremamente relacionada a sua capacidade de invasão do tecido hospedeiro, enquanto que a forma de levedura está mais associado a adesão a célula do hospedeiro (SUDBERY, 2011; THOMPSON, CARLISLE & KADOSH, 2011; MAYER, WILSON & HUBE, 2013; STANISZEWSKA, 2020) (Figura 5).

Figura 5 – Fatores de virulência de espécies de *Candida*



Fonte: Adaptado de MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

Além dessas formas, existe a modificação da morfologia de formas leveduriformes “brancas” para formas alongadas “opacas”, onde as células em forma de leveduras modificam sua forma pelo fenômeno denominado *switching* (Figura 4), que ocorre quando as células estão em divisão por brotamento ou na formação de biofilmes. Além disso, as formas alongadas foram relatadas pela baixa ativação de células imunes do hospedeiro, sendo melhores colonizadoras que a forma leveduriforme (POLKE, HUBEX & JACOBSEN, 2015; STANISZEWSKA, 2020).

A secreção de enzimas hidrolíticas, como as fosfolipases e lipases extra- e intracelulares, envolvidas na invasão do epitélio e penetração celular. Dentre as enzimas hidrolíticas biossintetizadas por *Candida* se destacam as proteases aspárticas segregadas (SAPs), que são bem estudadas como fatores de virulência do gênero, mais especificamente em quatro espécies a *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis*. Essas enzimas estão envolvidas em processos que destroem, alteram ou danificam a integridade da membrana das células infectadas levando à sua disfunção (SCHALLER, et al., 2005; CAUCHIE, DESMET & LAGROU, 2017; STANISZEWSKA, 2020).

3.1.3 Epidemiologia

O gênero *Candida* spp. é relatado como a terceira causa das septicemias em geral no mundo (PAPPAS et. al, 2018). *Candida albicans* continua sendo ao longo dos anos a espécie mais comumente encontrada nas infecções causadas pelas espécies do gênero *Candida* spp., correspondendo a 65,3% das infecções por este gênero ao redor do mundo (PFALLER et. al, 2010; RODRIGUES et. al, 2017), além dessa espécie, as espécies de *Candida* não-*albicans* passaram a ser bastante relatadas nos diagnósticos de candidíase.

O ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study correspondeu a um estudo que analisou a sensibilidade ao fluconazol e voriconazol, bem como a ocorrência das espécies causadoras de infecções por *Candida* spp. obtidas de diversos sítios de infecção de 41 países dos cinco continentes, entre os anos de 1997 a 2007. Segundo este estudo, foi possível identificar 31 espécies de *Candida* spp. diferentes, sendo que as espécies mais comumente relatadas de *Candida* não-*albicans* foram a *C. glabrata* (variando de 10,2 % a 11,7 % ao longo dos anos), *C. tropicalis* (variando de 5,4 % a 8,0 %) e *C. parapsilosis* (variando de 4,8 % a 5,6 %) ao redor do mundo (PFALLER et. al, 2010).

Ainda segundo este mesmo estudo, as cinco espécies mais comuns de *Candida*, que mais se destacaram nos cinco continentes nos 10 anos de estudo, foram a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* que juntas representaram 92 % de todos os isolados clínicos. Na América Latina a *C. albicans* correspondeu a 51,8 % dos isolados, seguida da *C. tropicalis* que atingiu 13,2 %, *C. parapsilosis* com 10,3 %, *C. glabrata* com 7,2 % e *C. krusei* com 1,4 % de ocorrência. Apesar da *C. albicans* ter sido a mais frequentemente isolada ao longo dos dez anos de estudo, apenas 2,1 e 1,7 % dos isolados na América Latina foi resistente ao fluconazol e voriconazol respectivamente. Das espécies de *Candida* não-*albicans* se destacaram as cepas de *C. glabrata* sendo 15,1 % resistentes ao fluconazol e 11,3 % resistentes ao voriconazol e as cepas de *C. krusei* apresentaram resistência de 66,8 % ao fluconazol e 14,0 % ao voriconazol (PFALLER et. al, 2010).

Um estudo mais recente publicou em 2016 os resultados do SENTRY Antifungal Surveillance Program, que analisou 1.846 espécies de fungos coletados no ano de 2013 como parte da vigilância global, sendo que dessas 1.470 cepas corresponderam a espécies de *Candida* spp. As espécies isoladas deste gênero

foram: *C. albicans* (712), seguida por *C. glabrata* (251), *C. parapsilosis* (215), *C. tropicalis* (155), *C. krusei* (49), *C. dubliniensis* (32), entre outras espécies este gênero. Quanto ao perfil de resistência dessas cepas se destacaram a *C. glabrata* onde 2,4 % foram resistentes a anidulafungina e 12,0 % foram resistentes ao fluconazol, bem como a *C. tropicalis* que apresentou 11,6 % de resistência ao fluconazol e 1,3 % a anidulafungina, sendo que as cepas de *C. albicans* não apresentaram resistência a anidulafungina e apresentaram 0,4 % de resistência ao fluconazol (CASTANHEIRA et al., 2016).

Neste contexto, existe uma crescente preocupação quanto as espécies de *Candida* não-*albicans*, que apesar de serem menos isoladas quando comparadas a *C. albicans*, apresentam importantes perfis de resistência aos antifúngicos disponíveis para tratamento. A *C. glabrata* vem sendo relatada como um dos principais problemas relacionados às infecções causadas por este gênero, uma vez que possui resistência aumentada ao fluconazol, tem alta incidência em adultos, além de apresentar maiores taxas de mortalidade associadas, quando comparada as demais espécies (RODRIGUES et. al, 2017). Um patógeno emergente, a *C. auris* tornou-se recentemente um problema, pela expressiva resistência aos agentes antifúngicos como a resistência ao fluconazol em 93 % dos pacientes; a anfotericina B em 35 % e em 7 % resistente as equinocandinas (PAPPAS et. al, 2018).

3.2 CANDIDÍASE

Os micro-organismos do gênero *Candida* são encontrados convivendo de forma comensal colonizando a microbiota regular das mucosas oral, trato gastrointestinal e geniturinário em cerca de 50-70 % indivíduos saudáveis (HANI et al. 2015; FIDEL et al., 1999; COLE et al.,1996). A colonização permite que ambos tenham certas vantagens. Dessa forma ao colonizar o ser humano as espécies de *Candida* conseguem seus nutrientes necessários para sobrevivência e em contrapartida limitam o crescimento de outros fungos oportunistas, equilibrando a microbiota e promovendo a resposta imunológica (PERLROTH J., CHOI B. e SPELLBERG B., 2007; MARTINS et al., 2014).

Em contrapartida esses micro-organismos podem se tornar patogênicos dependendo de alguns fatores relacionados principalmente ao estado imunológico dos indivíduos, levando a uma infecção oportunista. Dentre os fatores que

colaboram para as infecções causadas por *Candida* podem ser elencados (PERLROTH J., CHOI B. & SPELLBERG B., 2007; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, et al., 2013; MARTINS et al., 2014; HANI et al. 2015; PAPPAS et al. 2018; GONZALEZ-LARA e OSTROSKY-ZEICHNER, 2020):

- a. Indivíduos imunossuprimidos (pacientes acometidos por AIDS, pacientes em uso de imunossupressores; câncer e diabetes);
- b. Utilização de antibióticos de amplo espectro para tratamento e utilização preventiva, desequilibrando a microbiota;
- c. Procedimentos cirúrgicos invasivos, uso prolongado de cateteres e hospitalização prolongada;
- d. Cirurgias de transplantes;
- e. Velhice, gravidez e crianças de nascimento prematuro;
- f. Reposição hormonal e uso de hormônios esteróides.

De acordo com Knoke e Bernhardt (2006) a primeira vez que o gênero *Candida* foi reconhecido como patógeno humano foi em 1839 por Bernhard von Langenbeck, quando a espécie *C. albicans* foi isolada de uma infecção oral de um paciente acometido por tifo.

Comumente nestas condições, esses micro-organismos se tornam patógenos humanos e causam infecções que são denominadas de Candidíase. Candidíase é um termo usado amplamente para denominar infecções causadas por fungos do gênero *Candida* sejam elas mucocutâneas ou superficiais, bem como infecções invasivas de órgãos profundos ou sangue (candidemia) (RUPING et al., 2008; SILVA et al., 2012; HANI et al. 2015; PAPPAS et al. 2018; GONZALEZ-LARA e OSTROSKY-ZEICHNER, 2020). Porém segundo Martins e colaboradores (2014), nas últimas décadas vêm sendo identificados casos de candidíase em indivíduos saudáveis e que não estão enquadrados nestes fatores predisponentes.

A candidíase muco cutânea ou superficial acomete pele, cabelos, unhas e membranas mucosas. Em destaque estão: a candidíase oral, que pode ser intraoral, faríngea e perioral, pelo estágio aguda ou crônica e acometem indivíduos com AIDS, idosos com próteses dentárias e fumantes (VÁZQUEZ-GONZÁLEZ et al., 2013; HELLSTEIN e MAREK, 2019). A candidíase vulvovaginal recorrente, que acomete cerca de 50 % das mulheres e pode atingir bebês do sexo feminino neonatas; a

candidíase postular afeta usuários de drogas, mas que também pode ocorrer em pacientes hospitalizados e/ou imunossuprimidos, acometendo a pele e o couro cabeludo (VÁZQUEZ-GONZÁLEZ et al., 2013; LINES, VARDI-FLYNN e SEARLE, 2020). A onicomicose que atinge as unhas e pode ser provocado também por outros gêneros de fungos, acomete em geral pacientes com AIDS, diabéticos, ou provocado por traumas ocorridos em manicures (CAMBUIM et al., 2011; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ et al., 2013).

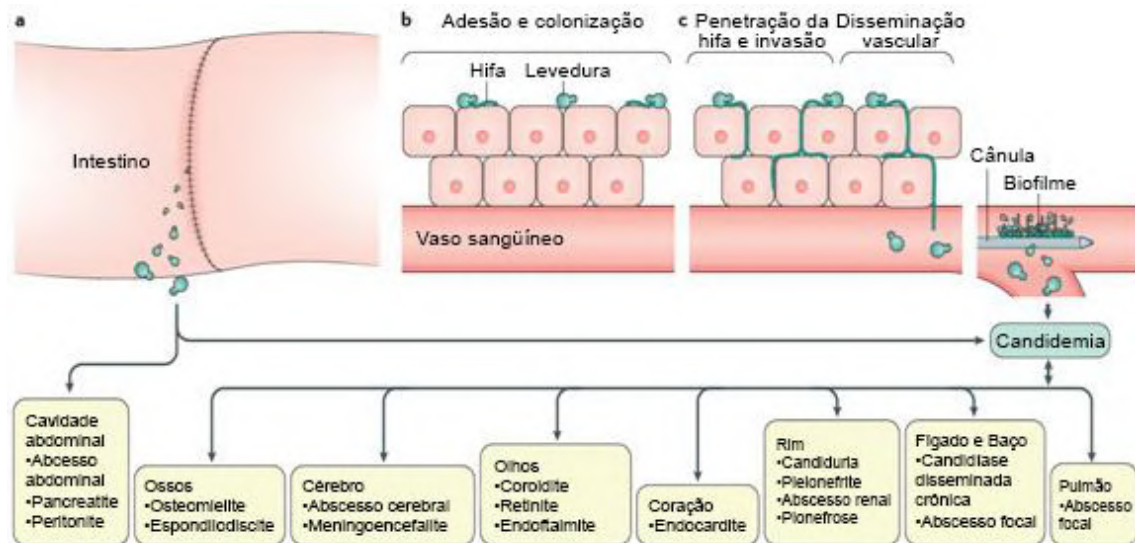
As infecções invasivas causadas por *Candida* se refere as infecções causadas por este gênero que podem atingir o sangue, sendo a infecção denominada de Candidemia, ou atingir outros órgãos e/ou tecidos profundos, como o estômago (peritonite, abscesso intra-abdominal), ossos (osteomielite), olhos, cérebro, coração, rim, fígado e pulmões (pneumonia). Essas infecções de órgãos profundos estão mais frequentemente associadas a candidemia, porém a exemplo da peritonite podem aparecer associados ou não a esta condição (KULLBERG e ARENDRUP, 2015; DERMAWAN et al., 2018; PAPPAS et al., 2018; GONZALEZ-LARA e OSTROSKY-ZEICHNER, 2020).

Relatos recentes indicam a associação do desenvolvimento de candidíase invasiva em pacientes acometidos pela COVID-19 (coronavirus disease), doença causada pelo vírus Sars-Cov-2 (AL-HATMI et al., 2021), sendo relatadas como agentes causadoras das candidemias em pacientes, as espécies *C. albicans* e *C. glabrata* (LANSBURY et al., 2020).

A figura 6 apresenta esquematicamente a patogênese da candidíase invasiva que acontece de forma endógena, onde o paciente adquire a infecção através da translocação de uma cepa presente na microbiota regular de um sítio anatômico próprio. Esse tipo de candidíase pode acontecer após uma laparotomia ou extravazamento do fluido anastomótico, causando peritonite e/ou candidemia.

As cepas colonizadoras podem invadir o tecido após adesão inicial também de forma endógena, dependendo das condições do paciente e das características da espécie, e disseminar-se pela corrente sanguínea. Na sua forma exógena, pode ser veiculada pela utilização de cateteres venosos desencadeando a formação de biofilme nestes instrumentos, levando também a candidemia (KULLBERG & ARENDRUP, 2015; PAPPAS et al., 2018; GONZALEZ-LARA e OSTROSKY-ZEICHNER, 2020).

Figura 6 – Patogênese da candidíase invasiva. **a.** Procedimento cirúrgico intestinal, causando translocação para a cavidade abdominal e/ou disseminação endovascular; **b.** Colonização no tecido seguida de **c.** Invasão do tecido e disseminação endovascular causando candidemia



Fonte: Adaptado de Pappas, P.G., Lionakis, M.S., Arendrup, M.C., Ostrosky-Zeichner, L., Kullberg, B.J. Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 4, p. 18026, 2018.

No Brasil, o gênero *Candida* foi relatado como o sétimo agente etiológico causador das infecções sanguíneas, sendo *C. albicans* (34,3 %) a espécie mais prevalente dessas infecções, seguida pela *C. parapsilosis* (24,1 %), *C. tropicalis* (15,3 %) e *C. glabrata* (10,2 %), com uma taxa de mortalidade de 72,2 % (DOI et al., 2016).

3.3 TERAPIAS ANTIFÚNGICAS

3.3.1 Inibidores da biossíntese do ergosterol fúngico e fármacos que interagem com o ergosterol

Os antifúngicos da classe dos azólicos, a classe das alilaminas e a classes das morfolinas possuem como mecanismo de ação geral a inibição da síntese de ergosterol, modificando apenas o receptor específico de ação de cada classe, porém para uma mesma finalidade. Na classe dos polienos estão contidos os fármacos que interagem com o ergosterol da membrana plasmática dos fungos de forma a modificar sua estrutura e causar o efeito antifúngico (PRASAD, SHAH & RAWAL,

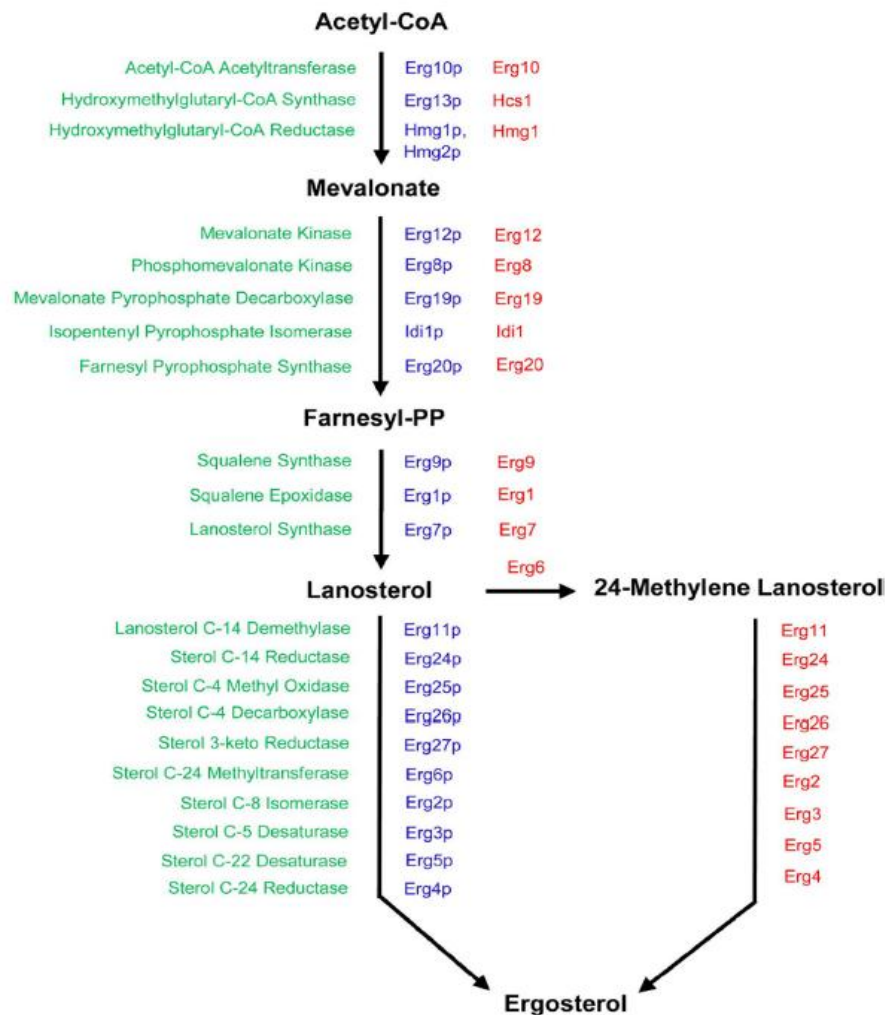
2016; RODRIGUES, 2018; NOCUA-BÁEZ et al., 2020).

A molécula do ergosterol desempenha o papel de estruturar a membrana plasmática dos fungos de maneira que a mesma desempenhe suas funções para a sobrevivência, como o equilíbrio osmótico e iônico, pressões oxidativas (LV, YAN & JIANG, 2016; RODRIGUES, 2018). Além disso, outras funções dos esteróis, como o ergosterol na membrana plasmática de fungos vêm sendo descritas, como o envolvimento no desempenho das funções das proteínas de membrana (WOLLAM & ANTEBI 2011), bem como sua ação na morte celular pró-inflamatória programada de macrófagos por cepas de *C. albicans* (WELLINGTON et al., 2014).

Além de manter a estrutura da membrana plasmática, o ergosterol age como um sinalizador, em pequenas quantidades esse esterol desperta a célula para dar início do ciclo celular (WHITE, MARR & BOWDEN, 1998).

A rota biológica da síntese do ergosterol em leveduras compreende 30 enzimas codificadas por diferentes genes específicos (LIU et al., 2019) (Figura 7). As etapas desta rota de biossíntese são utilizadas como alvo da ação de agentes antifúngicos, mas pela sua complexidade e o envolvimento de numerosas enzimas vem sendo interesse para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas (RODRIGUES, 2018).

Figura 7 – Esquema da rota da síntese biológica de ergosterol em leveduras



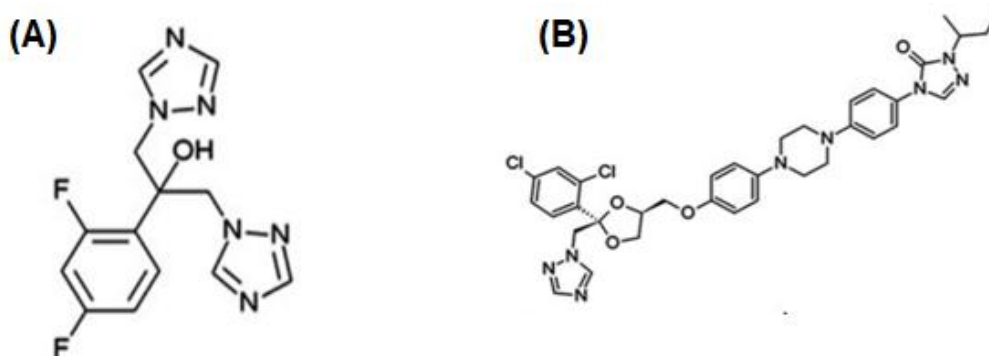
Fonte: Reprodução de LIU, J.F., XIA, J.J., NIE, K.L., WANG, F., DENG, L. Outline of the biosynthesis and regulation of ergosterol in yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 7, p. 98, 2019.

3.3.1.1 Antifúngicos Azólicos

A classe dos azólicos são os representantes de antifúngicos que possuem a maioria das moléculas disponíveis para tratamento de infecções fúngicas e dessa maneira são os mais utilizados nas terapias. Esta classe é composta de moléculas sintéticas que são caracterizadas por possuírem um anel heterocíclico pentagonal, constituído de carbono, hidrogênio e nitrogênio, denominado de anel azol. De acordo com o número de nitrogênios contidos neste anel eles são divididos em duas grandes subclasses: Triazólicos e Imidazólicos (PFALLER, MURRAY & ROSENTHAL, 2014; PRASAD, SHAH & RAWAL, 2016; NOCUA-BÁEZ et al., 2020).

Na figura 8 é possível observar a estrutura dos triazólicos que possuem três átomos de nitrogênio no anel azol, como os triazólicos de primeira geração, o fluconazol e o itraconazol, e os de segunda geração como o posaconazol e o voriconazol (Figura 7).

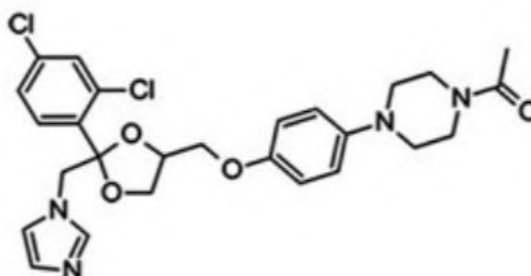
Figura 8 – Fórmula estrutural dos antifúngicos triazólicos. **(A)** Fluconazol e **(B)** Itraconazol



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

Os antifúngicos imidazólicos possuem apenas dois nitrogênios no anel azol, como no cetoconazol (Figura 9), miconazol e clotrimazol. Existe uma diferença farmacodinâmica importante entre as duas classes, os triazólicos sistêmicos são metabolizados mais lentamente e exercem menos efeitos sobre a síntese de esterol humano (BENNETT, 2011).

Figura 9 – Fórmula estrutural do antifúngico imidazólico cetoconazol



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

Os azólicos agem inibindo a enzima do citocromo P450 14 α -lanosterol desmetilase que participa de uma das etapas mais importantes da rota da biossíntese de ergosterol nas leveduras e fungos filamentosos (Figura 10). Nas

leveduriformes de *Candida* em hifas e/ou pseudo-hifas, que constituem uma dos principais fatores de virulência, sendo a forma invasiva e patogênica mais expressiva do gênero (NOCUA-BÁEZ et al., 2020).

Estes antifúngicos são utilizados tanto nas terapias sistêmicas, a exemplo dos triazólicos: Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol, Posaconazol e o imidazólico Cetoconazol, como nas terapias antifúngicas tópicas, a exemplo Terconazol, Butaconazol, Miconazol, Clotrimazol, Tioconazol, Sulconazol, Oxiconazol e Econazol (HANI et al. 2015).

Apesar de apresentarem pouca afinidade pela célula humana (HANI et al., 2015) alguns efeitos adversos podem ser causados pelos azólicos mais comuns são náusea, cefaleia, dor abdominal, prurido e tonturas. Menos comumente, o cetoconazol, que foi o primeiro antifúngico administrado por via oral, pode provocar toxicidade hepática fatal e inibição da síntese de esteroides, o que não acontece com a utilização do fluconazol (RANG et al., 2007; NOCUA-BÁEZ et al., 2020).

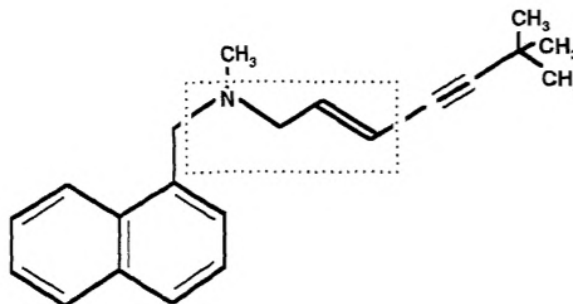
3.3.1.2 Antifúngicos Alilaminas

As alilaminas são particularmente úteis nas infecções tópicas causadas por fungos, especialmente os dermatófitos (RANG et al., 2007; EL-GOHARY et al., 2014). Essa classe de fármacos possui em sua estrutura um átomo de nitrogênio ligado a um carbono que apresenta uma ligação dupla vizinha (Figura 11), essa característica estrutural é denominada de função alilamina, daí deriva o nome desta classe de antifúngicos (BIRNBAUM, 1990).

Esses antifúngicos agem inibindo a biossíntese de ergosterol através da inibição da enzima escaleno epoxidase, codificada pelo gene ERG1 (Figura 10). A enzima escaleno epoxidase é responsável por converter escaleno em lanosterol, impedindo a biossíntese de ergosterol da membrana. A inibição da esqualeno epoxidase pela terbinafina resulta em o acúmulo de esqualeno dentro da célula e um declínio no conteúdo de ergosterol (BIRNBAUM, 1990; AKINS, 2005; SAGATOVA, 2021).

A inibição da escaleno epoxidase leva ao acúmulo de escaleno nas células e a deficiência de ergosterol, sendo esses eventos os responsáveis pelo bloqueio do crescimento fungico (BIRNBAUM, 1990; RANG et al., 2007; SAGATOVA, 2021).

Figura 11 – Fórmula estrutura do antifúngico terbinafina. Parte destacada representa a estrutura comum das alilaminas



Fonte: BIRNBAUM, J. E. Pharmacology of the allylamines. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 23, n. 4, p. 782-785, 1990.

Para as espécies de *Candida* em especial a *C. albicans* é relatado que a forma de hifas/pseudohifas é cerca de dez vezes mais suscetível a inibição por alilaminas, do que a forma de levedura (BIRNBAUM, 1990).

A resistência a esta classe de drogas vem sendo relatada, principalmente entre os fungos dermatófitos, pela mutação do gene *ERG1* em cepas de *Trichophyton interdigitale* e *T. rubrum* com altos valores de concentração inibitória mínima (CIM) para terbinafina (RUDRAMURTHY et al., 2018).

Os principais efeitos adversos associados ao uso de terbinafina são brandos e autolimitados, mas podem ocorrer distúrbios gastrintestinais, erupções cutâneas, prurido, cefaleia e tonturas (RANG et al., 2007).

3.3.1.3 Antifúngicos Polienos

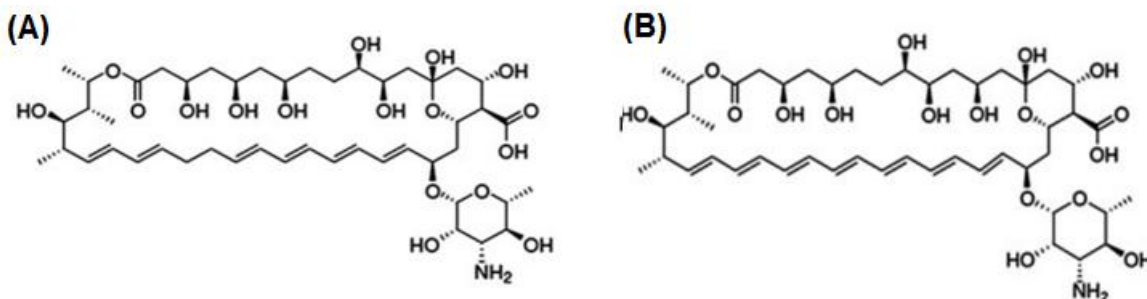
Os polienos são antifúngicos de origem natural, produzidos por bactérias filamentosas do gênero *Streptomyces* e são caracterizados por possuírem três estruturas básicas: Uma cadeia poliênica (de três a sete ligações duplas conjugadas) e uma cadeia polioliol, que juntas forma um anel macrolídeo, além de um anel substituinte micosamina. Dessa forma, as moléculas dos polienos são anfipáticas, pois possuem uma porção hidrofílica (cadeia polioliol) e outra hidrofóbica (cadeia poliênica) (RANG et al., 2007; KRISTANC et al. 2019; CAROLUS et al., 2020).

Os dois principais representantes desta classe são a anfotericina B e a nistatina, que são bem semelhantes estruturalmente e diferem entre si apenas pela posição dos grupos hidroxila na cadeia polioliol e na distribuição das duplas ligações

que compõem a cadeia poliênica (Figura 12).

Enquanto a anfotericina B é mais utilizada para tratamento de infecções sistêmicas, a nistatina é mais preferível para tratamentos de infecções tópicas (HANI et al. 2015; PRASAD, SHAH & RAWAL, 2016; CAROLUS et al., 2020).

Figura 12 – Fórmula estrutural dos antifúngicos polienos. **(A)** Nistatina e **(B)** Anfotericina B



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

O principal mecanismo de ação dos polienos está definido como a interação com o componente majoritário da membrana celular dos fungos, o ergosterol. Essa interação promove a formação de poros transmembrana, criando um canal iônico que conseqüentemente causa vazamento e perda de íons intracelulares (HAMMOUD, 1977; PRASAD, SHAH & RAWAL, 2016; KRISTANC et al. 2019; CAROLUS et al., 2020).

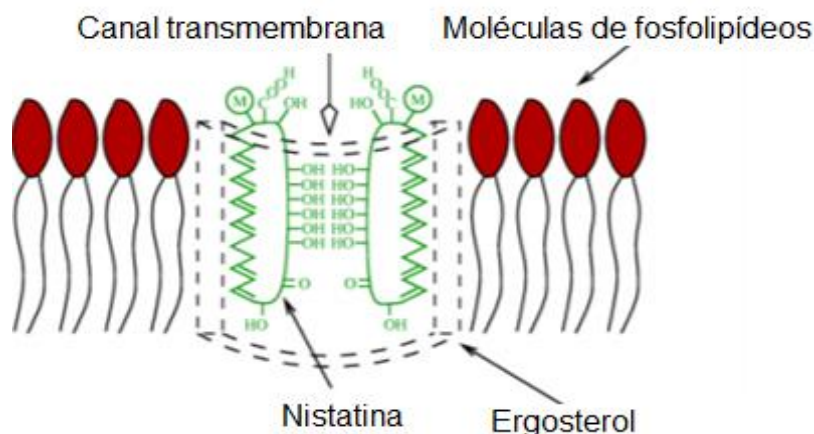
Os poros transmembranares são formados em decorrência da estrutura anfipática característica dos polienos: a cadeia poliênica que representa a parte hidrofóbica da molécula interage com as moléculas de esteroide da membrana, enquanto que a parte hidrofílica, representada pela cadeia poliol, fica no ambiente aquoso, formando um poro transmembranar, que causa extravazamento do conteúdo intracelular, em particular íons monovalentes como K^+ , Na^+ e Cl^- , resultando em um desequilíbrio eletroquímico (COHEN, 2010; SERHAN, et al., 2014).

A formação de poros nas membranas pela interação com o ergosterol dos fungos depende do potencial bipolar da membrana, da estabilidade dos complexos polieno-lipídicos e das propriedades físico-químicas dos domínios lipídicos ordenados (EFIMOVA, SCHAGINA & OSTROUMOVA, 2014).

A saída de moléculas depende apenas do tamanho dos poros formados pela

interação do ergosterol com o fármaco. Os poros formados pela anfotericina B tem tamanho suficiente para deixar extravasar moléculas como glicose, enquanto que os poros formados pela nistatina podem extravasar moléculas maiores como a sacarose (KRISTANC et al. 2019) (Figura 13).

Figura 13 – Esquema de formação de poros transmembrana pela interação da nistatina com o ergosterol da membrana



Fonte: Adaptado de KRISTANC, L.; BOŽIČ, B.; JOKHADAR, Š. Z.; DOLENC, M. S.; GOMIŠČEK, G. The pore-forming action of polyenes: From model membranes to living organisms. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1861, n. 2, p. 418-430, 2019.

A estrutura da molécula do ergosterol é bastante importante na interação com os polienos e pode estar associado ao fato de a anfotericina B ter afinidade pelo ergosterol da membrana de fungos e parasitas, e não ter afinidade com o colesterol das células de mamíferos (KRISTANC et al. 2019; CAROLUS et al., 2020).

De acordo com Kristanc e colaboradores (2019) existe uma linha de pesquisadores que acreditam que além da formação destes poros na membrana, os polienos podem estar incluídos também com a forte interação com ergosterol, causando um distúrbio no processo de endocitose, na regulação da função das proteínas da membrana e na sinalização dos feromônios.

A desvantagem da utilização desta classe de antifúngicos está na toxicidade elevada, atingindo principalmente rins, coração, fígado, células sanguíneas e a nefrotoxicidade. Os principais efeitos adversos relatados são comprometimento da filtração glomerular e da função hepática mesmo com a suspensão do tratamento, hipocalcemia, hipomagnesemia. Além disso, existe a desvantagem de haver baixa absorção gastrointestinal o que inviabiliza sua administração por via oral, o que torna

seu uso limitado mesmo que essa classe tenha um amplo espectro de ação e apresenta pouca ocorrência de resistência (RANG et al., 2007; PFALLER et al., 2012; CAROLUS et al., 2020).

3.3.2 Equinocandinas – Inibidores da parede celular fúngica

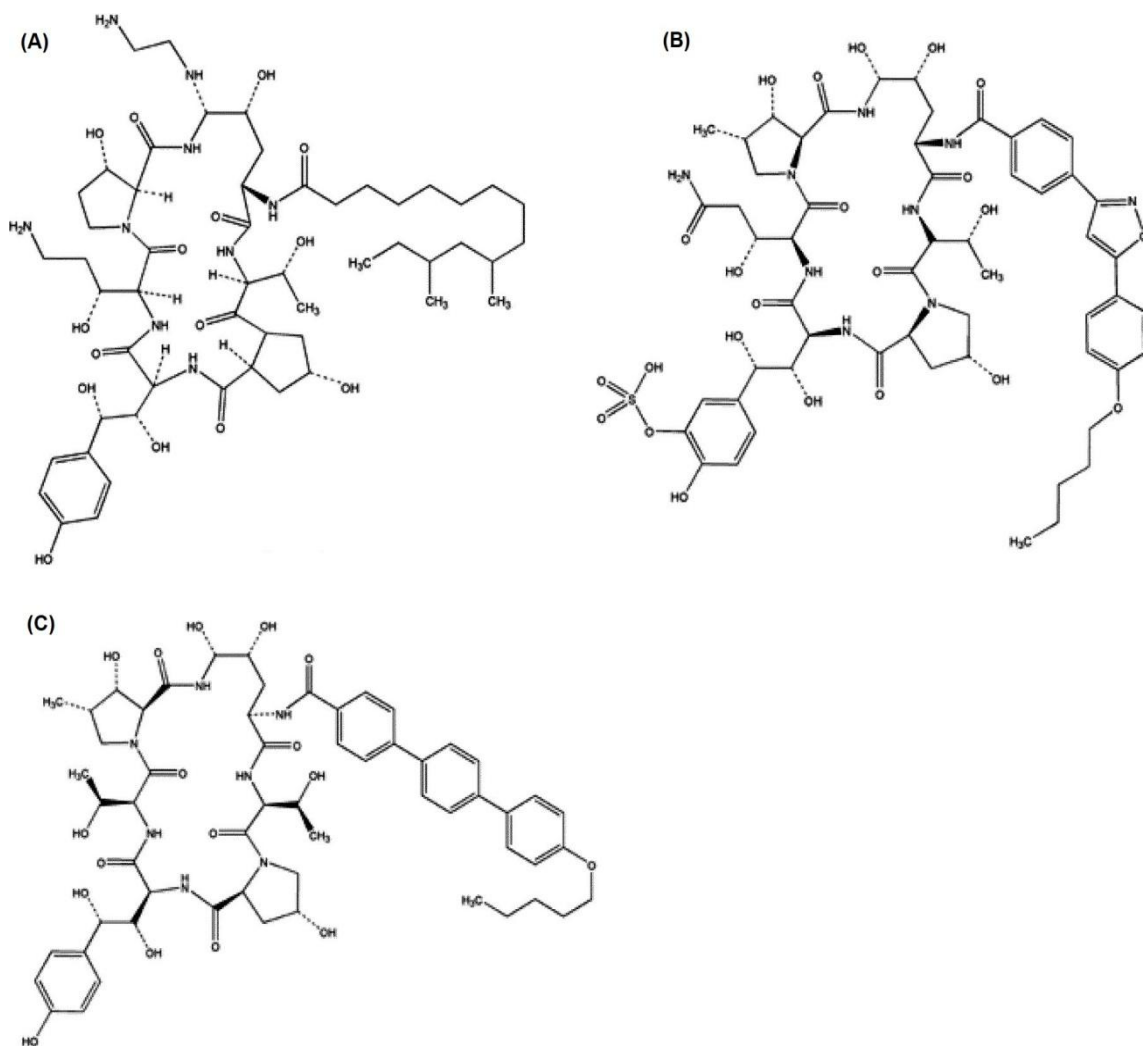
A primeira equinocandina foi descoberta nos anos 70, elas são lipopeptídeos de origem natural e biossintetizadas por fungos ascomicotas. Essas moléculas serviram de protótipos para o desenvolvimento de novas moléculas sintéticas (DENNING, 2003; EMRI et al., 2013).

As equinocandinas agem por um único mecanismo de ação, inibindo a síntese da parede celular de fungos, através da inibição não competitiva da enzima (1,3)- β -D-glucana sintase, essa enzima é responsável pela síntese do polímero (1,3)- β -D-glucana, constituinte importante da parede celular, que se ligam covalentemente ao outro polímero a (1,6)- β -D-glucana, e juntos com a quitina formam uma rede tridimensional complexa de microfibrilas. A inibição da enzima promove inibição de biossíntese da parede celular, causando lise e prejuízo a integridade celular (ONISHI et al., 2000; PERLIN, 2011; EMRI et al., 2013; PRASAD, SHAH & RAWAL, 2016).

Os primeiros representantes desta classe de antifúngicos usados na terapia e sintetizados a partir de equinocandinas naturais são as moléculas semissintéticas: caspofungina, micafungina e anidulafungina (Figura 14). Estruturalmente as equinocandinas são hexalipopeptídeos cíclicos ligados a uma cadeia lateral acila graxa e são diferenciados entre si principalmente pela cadeia alifática ligada (PERLIN, 2011).

Esta classe de antifúngicos é indicada para o tratamento de candidíase esofágica e candidíase invasiva, inclusive no tratamento de candidemia. As equinocandinas não apresentam atividade em concentrações clínicas diante de Zigomicetos, já que os fungos pertencentes a este filo não apresentam a enzima alvo das equinocandinas, a (1,3)- β -D-glucana sintase, bem como não apresentam atividade diante de *Cryptococcus neoformans*. Elas não têm receptores compartilhados com células de mamíferos (DENNING, 2003; AKINS, 2005; PERLIN, 2011).

Figura 14 – Fórmula estrutural dos antifúngicos da classe das equinocandinas. **(A)** Caspofungina; **(B)** Micafungina e **(C)** Anidulafungina



Fonte: Adaptado de AKINS, R. A. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 43, n. 4, p. 285-318, 2005.

Uma vantagem bem utilizada desta classe é sua eficácia em biofilmes formados por espécies de *Candida*. As equinocandinas são ativas tanto na prevenção da formação de biofilmes, como em biofilmes maduros formados em dispositivos médicos como cateteres e próteses. A ocorrência de resistência a esta classe é baixa principalmente em cepas que são resistentes a outras classes, já a desvantagem das equinocandinas é seu baixo espectro de ação, tendo uso limitado a espécies de *Candida* e *Aspergillus* (PERLIN, 2011; SWAMINATHAN, KAMAT e PINTO, 2018; NIVOIX, LEDOUX e HERBRECHT, 2020).

Patil e Majumdar (2017) relataram em um estudo de revisão que existe um efeito paradoxal na ação de equinocandinas bem relatado e demonstrado

principalmente, em espécies de *Candida*, em concentrações de CIM *in vitro* o crescimento fúngico se apresenta reduzido, já ao aumentar a concentração da droga é observado que as células fungicas continuam a crescer, até que as concentrações sejam mais elevadas o suficiente para inibir o crescimento novamente.

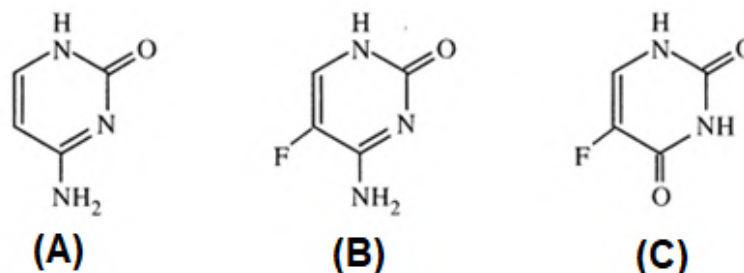
Os efeitos tóxicos associados ao uso de equinocandinas são raros de acontecer bem como raramente é necessário descontinuar o uso por conta de efeitos causados pelo tratamento com essas drogas, porém há relatos de cardiotoxicidade, reações mediadas por histamina, existem casos raros e isolados de efeitos colaterais hepáticos, como disfunção hepática, hepatite e insuficiência hepática, diarreia, pirexia, trombocitopenia, dor de cabeça. Em especial a anidulafungina exibiu além da toxicidade cardíaca, toxicidade ocular, distúrbios gastrintestinais, hipercalcemia, hipercalcemia, hipernatremia, amilase sanguínea, creatinina e lipase sanguínea (STOVER, KING & CLEARY, 2014; PATIL & MAJUMDAR, 2017).

3.3.3 Análogos da pirimidina

A 5-fluorocitocina (5-FC) ou flucitocina (Figura 15) é o representante desta classe conhecida por sua atividade antifúngica e antineoplásica, embora novos análogos da 5-FC estejam sendo obtidos (WANI, 2017). A 5-FC é um dos agentes antifúngicos mais antigos tendo sido sintetizado em 1957, porém com finalidade de aplicação como um agente antitumoral (BENNETT, 1977; VERMES, GUCHELAAR & DANKERT, 2000).

A molécula 5-FC é análoga da citosina e permeia na célula fúngica por meio da enzima citosina permease e ao entrar na célula é desaminada e convertida rapidamente em 5-fluorouracil (5-FU), pela ação da enzima citosina desaminase (Figura 14). A molécula 5-FC não possui atividade antifúngica intrínseca, a atividade de fato é desempenhada pela ação da molécula 5-FU, que só é obtida após a desaminação intracelular (POLAK & SCHOLER, 1975; BENNETT, 1977; VERMES, GUCHELAAR & DANKERT, 2000; PRASAD, SHAH & RAWAL, 2016).

Figura 15 – Fórmula estrutural de **(A)** Citosina, **(B)** Flucitosina e **(C)** 5-Fluorouracil



Fonte: Reprodução de VERMES, A.; GUCHELAAR, H.-J.; DANKERT, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 171-179, 2000.

Segundo Vermes, Guchelaar e Dankert (2000), o 5-FU age nas células fúngicas por duas vias: 1. Pela conversão de 5-FU em trifosfato de 5-fluorouridina que ao ser incorporado ao RNA do fungo causa modificações na sequência de aminoácidos e inibição da síntese de proteínas e/ou 2. Pela conversão de 5-FU em monofosfato de 5-fluorodeoxiuridina que inibe a enzima timidilato sintetase, impedindo a biossíntese de DNA. Dessa forma essa droga só funciona em espécies que possuem a enzima citosina desaminase, gerando o metabólito 5-FU responsável pela ação antifúngica, tanto que não apresenta tal ação nas células humanas, já que a enzima citosina desaminase não está presente (RANG et al., 2007).

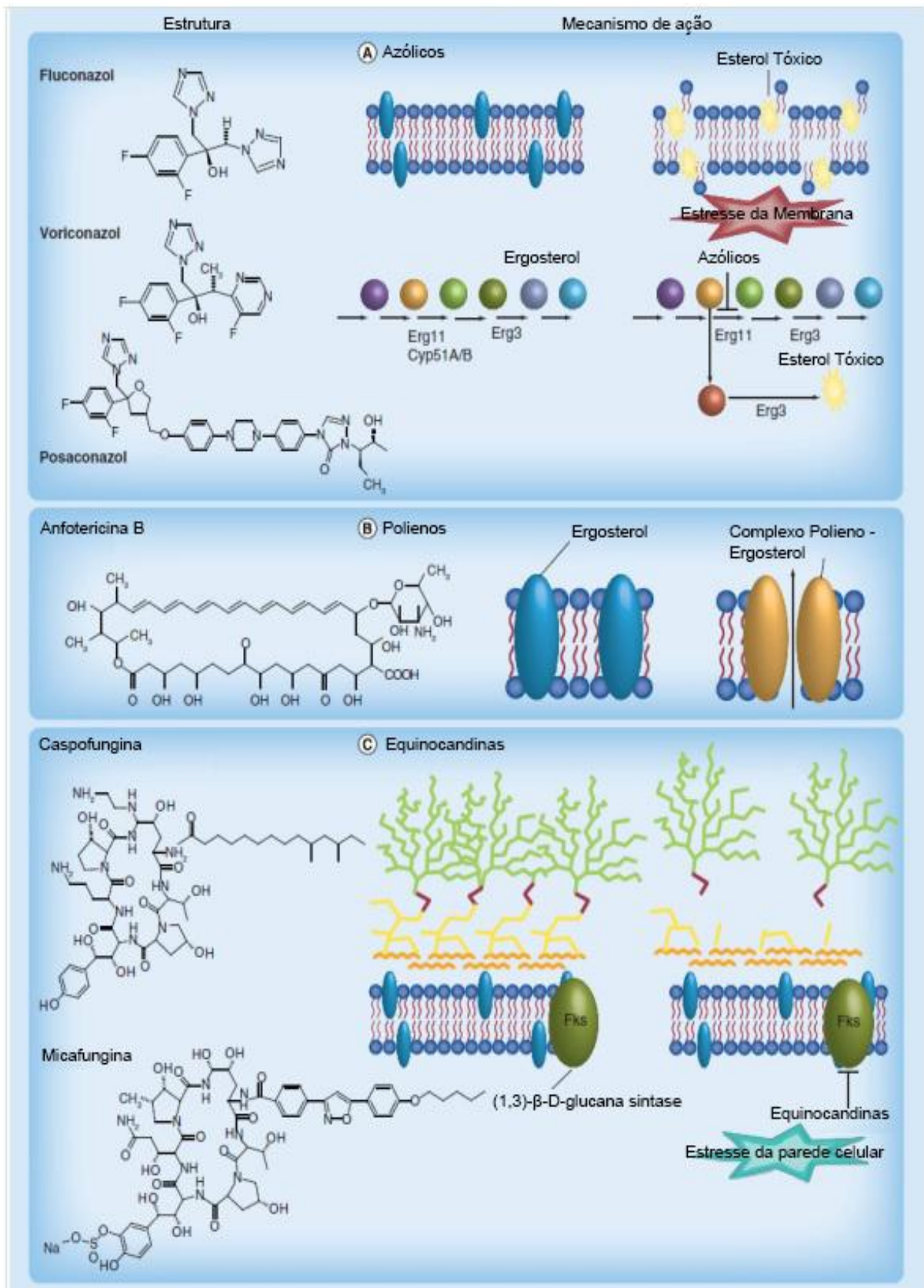
O metabólito 5-FU não é utilizado diretamente como agente antifúngico devido a sua ação tóxica em células de mamíferos, bem como essa molécula não é tão bem captada pelas células fúngicas quando comparado a molécula 5-FC. Porém é aplicada em terapias antineoplásicas a cerca de 50 anos (VERMES, GUCHELAAR & DANKERT, 2000; RANG et al., 2007; MAEHARA et al. 2016).

Apesar de possuir um amplo espectro de ação diante de fungos, como espécies de leveduras como *Candida* e *Cryptococcus*, fungos do gênero *Phialophora* e *Cladosporium*, além de filamentosos como espécies de *Aspergillus*, além disso, essa molécula tem ação diante de protozoários como *Leishmania*. O uso de 5-FC como monoterapia nas infecções por fungos não é indicado pelo rápido desenvolvimento de resistência secundária, porém sua utilização combinada com a anfotericina B apesar de ser mais eficaz causa mais efeitos adversos associados ao tratamento (BENNETT, 1977; SPELLER et. al, 1980; VIVIANI, 1995; VERMES, GUCHELAAR e DANKERT, 2000).

Como efeitos tóxicos da administração de 5-FC são bastante relatados a hepatotoxicidade, depressão de medula óssea (trombocitopenia, neutropenia, anemia), além de distúrbios gastrintestinais (VERMES, GUCHELAAR & DANKERT, 2000; RANG et al., 2007; KYRIAKIDIS, et al. 2017). Recentemente em estudo publicado por Fujii e colaboradores (2019) descreveram anomalias congênitas em fetos causadas pela administração de 5-FC em ratos fêmeas grávidas.

É possível verificar na figura 16 um resumo esquemático indicando os mecanismos de ação das principais classes de drogas antifúngicas.

Figura 16 – Mecanismos de ação das principais classes de antifúngicos



Fonte: Adaptado de XIE, J. L., POLVI, E. J., SHEKHAR-Guturja, T., COWEN, L. E. Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. *Future microbiology*, v. 9, n. 4, p. 523-542, 2014.

3.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DO GÊNERO *CANDIDA* AOS ANTIFÚNGICOS

3.4.1 Resistência aos azólicos

Os mecanismos atribuídos a resistência aos azólicos tanto em *C. albicans* como espécies *Candida* não-*albicans* estão bem definidos e estão associados principalmente a expressão aumentada da bomba de efluxo de drogas, a maior expressão e modificação na estrutura de sítios alvos, além da formação de biofilme. Esses mecanismos podem ocorrer isolados ou em conjunto, sendo que a expressão aumentada da bomba de efluxo de drogas é relatada como a causa primária da resistência aos azólicos em espécies de *Candida*. A expressão da bomba de efluxo resulta na baixa concentração do agente antifúngico no interior da célula fungica, conferindo resistência a essas drogas (SANGLARD et al., 1995; BULOTOVA & DARWISH, 2008; PERLIN, RAUTEMAA-RICHARDSON & ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017; BHATTACHARYA, SAE-TIA e FRIES, 2020; BERMAN e KRYSAN, 2020).

Para as espécies de *Candida* são relatadas duas grandes famílias de domínios proteicos transmembrana que funcionam como bombas de efluxo de drogas. Uma delas é a superfamília MFS – *Major facilitator superfamily*, porém a mais estudada é a superfamília dos transportadores ABC - *ATP-binding cassette transporters*, ambas utilizam diferentes fontes de energia para seu funcionamento efetivo no efluxo de drogas do meio intracelular para o meio extracelular de espécies de *Candida* e sua expressão garante resistência a determinadas drogas (CANNON et al., 2009).

Outro importante mecanismo de resistência a esta classe de drogas ocorre pela expressão aumentada do gene ERG11 que participa na regulação da síntese de ergosterol. O gene ERG11 codifica a enzima alvo dos antifúngicos azólicos, a lanosterol 14 α -desmetilase, ao entrar em contato com o antifúngico a depleção do ergosterol faz com que o micro-organismo regule de forma positiva o gene ERG11 aumentando a presença de sítios alvo (HENRY, NICKELS & EDLIND, 2000; KANAFANI & PERFECT, 2008; BHATTACHARYA, SAE-TIA e FRIES, 2020; BERMAN e KRYSAN, 2020). Henry e colaboradores (2000) relataram que esse fenômeno ocorreu após a exposição de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C.*

tropicalis ao tratamento com fluconazol, itraconazol, cetoconazol, miconazol e clotrimazol, ocorrendo uma regulação positiva do gene ERG11.

A modificação na estrutura da enzima alvo lanosterol 14 α -desmetilase também é citada como causa da resistência aos azólicos. As mutações garantiram modificações no sítio alvo a ponto de modificar a afinidade do antifúngico azólico a enzima e dessa forma não desempenha mais sua atividade diante de cepas de *C. albicans* (SANGLARD et al., 1998; MARICHAL et al., 1999; BHATTACHARYA, SAE-TIA e FRIES, 2020; BERMAN e KRYSAN, 2020).

A formação de biofilme pelas espécies de *Candida* também é citado como um importante mecanismo para a falta de ação dos antifúngicos azólicos, sendo um mecanismo de resistência comum também as demais classes de antifúngicos, eles representam um importante desafio para o tratamento de infecções crônicas sendo necessário a busca por novos alvos terapêuticos e estratégias de associação de drogas na busca de um mais tratamento efetivo (KOO et al., 2017).

Biofilmes maduros apresentam uma estrutura bem consolidada, com substâncias denominadas de exopolissacarídeos (EPS - *extracellular polymeric substance*) constituindo uma matriz extracelular forte que promove a ligação das células a uma superfície, ligação entre células e agregação arquitetada. Para as espécies de *Candida* essa matriz é constituída em geral de carboidratos, proteínas, hexosamina, fósforo e ácido urônico. Sejam esses biofilmes de um mesmo micro-organismo ou de dois ou mais desses, essa matriz é responsável por manter uma barreira mecânica estável e também proteger os micro-organismos de as drogas antimicrobianas e, portanto desempenham papel na resistência a essas drogas (AL-FATTANI & DOUGLAS, 2006; FLEMMING & WINGENDER, 2010; KOO et al., 2017; PERLIN, RAUTEMAA-RICHARDSON & ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017; PEREIRA et al., 2021).

3.4.2 Resistência as equinocandinas

A resistência aos antifúngicos da classe das Equinocandinas (ex. micafungina, caspofungina) ainda é bastante incomum entre as espécies de *Candida*. Essa resistência incomum parece estar envolvida com a mutação do gene FKS, através da substituição de aminoácidos em duas regiões *hot spot* de *Fks1* para todas as espécies de *Candida* e *Fks2* em *C. glabrata* (PARK et al. 2005; BALASHOV

et al. 2006; PERLIN, 2011; PERLIN, RAUTEMAA-RICHARDSON & ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017; KORDALEWSKA et al., 2018; PRISTOV & GHANNOUM, 2019; BHATTACHARYA, SAE-TIA e FRIES, 2020; BERMAN e KRYSAN, 2020). Essas mutações se manifestam pelo aumento das concentrações inibitórias mínimas das cepas de *Candida* e consequentemente na falha no tratamento.

O gene FKS codifica a enzima 1,3- β -glucana sintetase, que é o alvo de ação das equinocandinas e é responsável pela síntese de 1,3- β -glucana, um componente importante da parede celular das espécies de *Candida* (PERLIN, RAUTEMAA-RICHARDSON, ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

Essa mutação do gene *FKS* em espécies de *Candida* pode estar relacionada ao estresse provocado pela exposição prolongada, exposição repetidas vezes a drogas desta classe, ou o conjunto desses dois fatores. Porém estão também relacionadas ao polimorfismo natural de certas espécies de *Candida*, como é o caso da *C. parapsilosis* e da *C. guilliermondii*, caracterizada pelos valores de concentração inibitória mínima bem mais elevados quando comparado a cepas susceptíveis a esta classe (PFALLER et al., 2010; PERLIN, RAUTEMAA-RICHARDSON & ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

Segundo Niimi e colaboradores (2006), a expressão de genes codificadores de bomba de efluxo (CDR1, CDR2, MDR1 e MDR2), que garantem resistência aos azólicos, não parecem interferir na susceptibilidade das cepas de *Candida* as equinocandinas.

3.4.3 Resistência aos polienos

Os polienos (ex. Anfotericina B, Nistatina) agem pela interação com o ergosterol presente na membrana plasmática das células de *Candida* spp. formando poros que ligam o interior da célula com o meio externo e fazem o micro-organismo perder o seu equilíbrio osmótico e os nutrientes essenciais a sua sobrevivência. Mutações nos genes *ERG2*, *ERG3*, *ERG6* e *ERG11* parecem estar associados a resistência das espécies de *Candida* aos polienos, uma vez que ocorre uma diminuição da expressão do alvo de ação dessas drogas (VANDEPUTTE et al., 2007; VINCENT et al., 2013; EDDOUZI et al., 2013; PRASAD, SHAH & RAWAL, 2016; BHATTACHARYA, SAE-TIA e FRIES, 2020; BERMAN e KRYSAN, 2020).

Dessa forma, os isolados de *Candida* que apresentam um teor mais baixo de

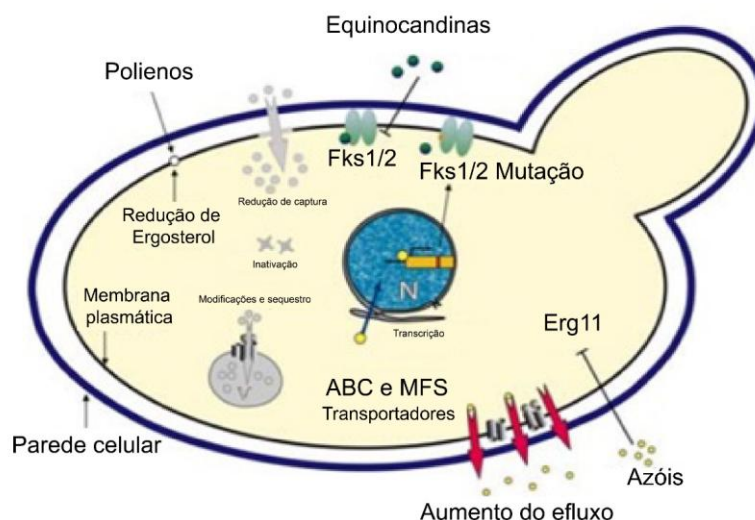
ergosterol tendem a ser resistentes ao polienos, quando comparado com o teor de ergosterol de cepas susceptíveis a estas drogas (DICK, MERZ & SARAL, 1980), essa característica pode estar associada a mutações dos genes reguladores da síntese de ergosterol, bem como ao tratamento prévio com antifúngicos inibidores da síntese de ergosterol, como é o caso dos agentes azólicos (VAZQUEZ, et al. 1998; XIE et al., 2014).

Existe uma correlação da resistência aos polienos com a resistência aos agentes azólicos, quando estes se relacionam com as modificações nos genes responsáveis pela síntese de ergosterol (em destaque o ERG3), decréscimo de ergosterol na membrana e acúmulo de ergosterol alternativo (KELLY et al., 1996; KELLY et al., 1997; EDDOUZI et al., 2013). Existe ainda uma correlação da resistência a anfotericina B em biofilmes pré-formados, bem como a falta da capacidade dessa droga de não impedir a produção de biofilme de *C. tropicalis* (FERNANDES, SILVA & HENRIQUES, 2015).

Sokol-Anderson, Brajtburg & Medoff (1986) relacionaram também o aumento da atividade da enzima catalase endógena mediando a resistência à anfotericina diminuindo a susceptibilidade de cepas de *C. albicans*.

A figura 17 representa esquema da célula do gênero *Candida* com os principais mecanismos de resistência as classes de drogas antifúngicas mais utilizadas na clínica para o tratamento de infecções causadas por estas cepas.

Figura 17 – Representação esquemática de resistência do gênero *Candida* às drogas antifúngicas



Fonte: Adaptado de TSCHERNER, M.; SCHWARZMÜLLER, T.; KUCHLER, K. Pathogenesis and antifungal drug resistance of the human fungal pathogen *Candida glabrata*. **Pharmaceuticals**, v. 4, n. 1, p. 169-186, 2011.

3.5 TERPENOS

3.5.1 Considerações gerais sobre terpenos

Os compostos terpenos, também chamados de compostos isoprenóides, podem ser biossintetizados por plantas, algas, fungos, bactérias, insetos, organismos marinhos, originando cerca de 30.000 diferentes estruturas, que como metabólitos secundários desempenham funções direcionadas e importantes para a sobrevivência destes organismos que os produzem (GERSHENZON & DUDAREVA, 2007; GONZALEZ-BURGOS & GOMEZ-SERRANILLOS, 2012; PEREIRA et al., 2018).

No tecido vegetal, a biossíntese de terpenos, pode ocorrer por duas vias metabólicas, que não são totalmente independentes entre si e produzem o precursor comum de todas as moléculas de terpenos pirofosfato de isopentil (IPP), também conhecido como isopreno (C_5) (BANERJEE & SHARKEY, 2014; APROTOSOAIIE et al., 2014; LIAO et al., 2016; PEREIRA et al., 2018):

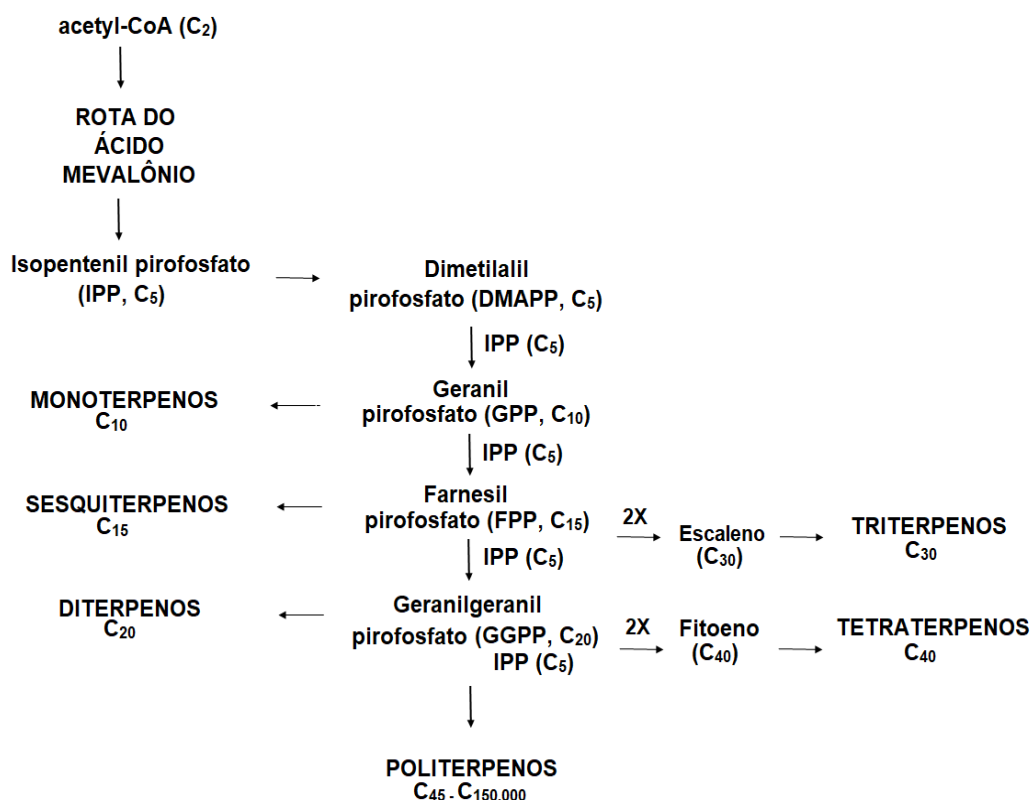
- a) Via clássica do ácido mevalônico (MVA), que ocorre nos citoplasma (Figura 18);
- b) Via alternativa do metileritritol fosfato (MPA), que ocorre nos cloroplastos.

Essas duas vias produzem intermediários que quando condensados formam os precursores dos terpenos, uma molécula de pirofosfato de dimetilalil (DMAPP) e uma ou mais moléculas de IPP, para dar difosfato de geranil (GPP), difosfato de farnesil (FPP) ou difosfato de geranilgeranil (GGPP). A quantidade de moléculas condensadas de IPP permite dividir os terpenos em subgrupos: hemiterpenos (uma unidade com C_5); monoterpenos (duas unidades com C_{10}); sesquiterpenos (três unidades com C_{15}); diterpenos (quatro unidades com C_{20}); triterpenos (seis unidades com C_{30}); tetraterpenos (oito unidades com C_{40}) e politerpenos (C_{5n} , onde $8 < n < 30.000$) (GERSHENZON & CROTEAU, 1993; GONZALEZ-BURGOS & GOMEZ-SERRANILLOS, 2012).

Novas estratégias para produção de terpenos vêm sendo desenvolvidas ao longo dos anos, pois a principal forma de obtenção dessas moléculas, a biossíntese por plantas, resulta em um pequeno rendimento, que muitas vezes não é suficiente

para atender a demanda farmacológica (MEWALAL, et al., 2017; BIAN, DENG & LIU, 2017; TETALI, 2019).

Figura 18 – Esquema de rota de biossíntese de terpenos pela via clássica do ácido mevalônico



Fonte: Adaptado de GERSHENZON, J., CROTEAU, R. Terpenoid biosynthesis: the basic pathway and formation of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes, In: (Vol. 333). CRC Press, Boca Raton, FL. (1993).

Entre as estratégias para aumento da produtividade está a produção biotecnológica de terpenos, já conhecidos ou de novos terpenos, pela expressão heteróloga de genes que codificam as enzimas terpeno sintases em bactérias, como espécies de gênero *Streptomyces*. Essa expressão dos genes em um sítio heterólogo de um micro-organismo permite uma produção maior, controlada e mais rápida uma vez que se multiplicam com facilidade e rapidez (YAMADA et al., 2015).

Dentre as atividades biológicas dos terpenos, como Carvacrol, Geraniol, Eugenol, Timol, Linalol, Eucaliptol, entre outros, podemos citar a potente atividade antioxidante, atividade neuroprotetora, cardioprotetora, hepatoprotetora, proteção contra diabetes, nefroprotetora, gastroprotetora, atividade anticancer, antimicrobiana (GONZALEZ-BURGOS & GOMEZ-SERRANILLOS, 2012; TETALI, 2019; DEHSHEIKH et. al, 2020).

Diante deste cenário, os terpenos possuem muitas aplicações em diversos segmentos, graças a sua diversidade molecular, são utilizados como biocombustíveis que podem substituir ou suplementar o petróleo, na indústria alimentícia, como flavorizantes e odorizantes, além de ser utilizados como suplementação alimentar, com as vitaminas A, E, K; na indústria cosmética, como odorizantes, agentes antioxidantes, proteção contra danos causados pela radiação UV e também impedindo melanogênese, além da utilização como repelente de insetos; na indústria farmacêutica, a exemplo do antimalárico artemisina e das terapias com aerossóis e aromaterapia (MEWALAL, et al., 2017; TETALI, 2019; DEHSHEIKH et. al, 2020).

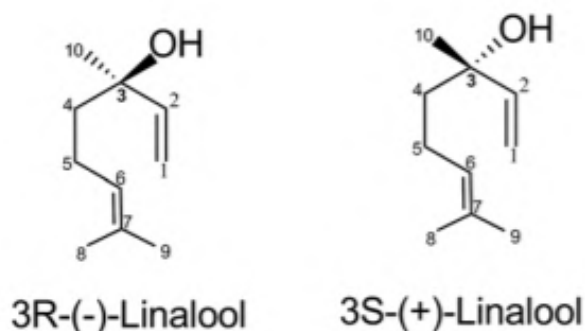
Portanto, os terpenos em geral representam moléculas de grande importância biológica, farmacológica e alto valor econômico ao redor do mundo, já que em 2017 estima-se que a indústria cosmética movimentou cerca de 500 bilhões de dólares e o mercado de flavorizantes e fragrâncias 30 bilhões de dólares, cujos terpenos são amplamente empregados (TETALI, 2019).

3.5.2 Linalol

O linalol (Nome IUPAC: 3,7-dimetil-octa-1,6-dien-3-ol; Fórmula molecular: $C_{10}H_{18}O$; Peso molecular: 154,25 g/mol) é um álcool terciário monoterpreno acíclico, formado a partir do octa-1,6-dieno substituído por grupos metil nas posições 3 e 7 e um grupo hidroxila na posição 3 (API et al., 2015; PEREIRA et al., 2018).

Devido a sua estrutura, pela presença do grupo hidroxila no carbono 3, o linalol apresenta propriedades quirais, dando origem a dois enantiômeros: (3S)-(+)-linalol, também chamado de coriandrol e (3R)-(-)-linalol, conhecido como licareol, sendo que o linalol é uma mistura racêmica dos dois enantiômeros (PEREIRA et al., 2018) (Figura 19).

Figura 19 – Estrutura química dos dois enantiômeros do linalol



Fonte: APROTOSOAIE, A. C.; HÂNCIANU, M.; COSTACHE, I. I.; MIRON, A. Linalol: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 29, n. 4, p. 193-219, 2014.

O linalol é encontrado nos óleos essenciais de cerca de 200 espécies de plantas, tanto monocotiledôneas com dicotiledôneas, em especial nas famílias *Lamiaceae*, *Lauraceae* e *Apiaceae*, principalmente nos gêneros *Lavandula*, *Cinnamomum* e *Coriandrum*, nas quais desempenham funções como atração de polinizadores naturais de plantas, proteção das plantas afastando herbívoros, repelindo mosquitos e protegendo contra formigas e leveduras (APROTOSOAIE et al., 2014; RAGUSO, 2016; PEREIRA et al., 2018).

As vias de biossíntese de terpenos (Via clássica do ácido mevalônico e a Via alternativa do metileritritol fosfato) geram dois intermediários comuns de onde partem a biossíntese de linalol, o pirofosfato de isopentenil (IPP) e seu isômero, o difosfato de dimetilalil (DMAPP), esses dois compostos são condensados gerando o precursor universal do linalol, o difosfato de geranil (GPP) que é o substrato para as enzimas linalol sintases (S-LIS e R-LIS) (APROTOSOAIE et al., 2014; BANERJEE e SHARKEY, 2014; LIAO et al., 2016; PEREIRA et al., 2018).

O linalol é encontrado em cerca de 90% dos produtos cosméticos e de higiene, além de ser adicionado a produtos domésticos como detergentes, produtos para móveis e ceras, e também é encontrado em alimentos processados e bebidas, como agente de aroma e sabor (APROTOSOAIE et al., 2014; PEREIRA et al., 2018). A Organização Mundial de Saúde recomenda o limite seguro de ingestão de 0–0,5 mg/kg quilo de peso/dia de linalol (APROTOSOAIE et al., 2014).

Estudos de toxicidade *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o linalol por si só não apresenta efeito alérgico ou de sensibilização da pele, porém ao entrar em

contato com a atmosfera o linalol oxida rapidamente formando óxidos de linalol que são os responsáveis por processos alérgicos e sensibilização da pele, além disso, estudos demonstram que aplicação de uma dose de 250 mg/kg/dia demonstrou uma penetração dérmica de 14,4 % e 100 % de absorção por inalação (APROTOSOAIE et al., 2014; API et al., 2015; PEREIRA et al., 2018).

Segundo Api e colaboradores (2015) o linalol não apresenta genotoxicidade ou fototoxicidade, bem como não apresenta toxicidade inalatória na dose mais elevada testada de 63 mg/m³, bem como não apresenta toxicidade reprodutiva quando utilizada em doses de até 500 mg/kg/dia. Porém, Singulani e colaboradores (2018) demonstraram em um estudo existem potenciais genotóxico e embriotóxico em zebrafish associados a altas doses de linalol.

No que diz respeito a toxicidade ambiental, existem riscos relatados de acumulação do linalol em água e em peixes, além de inibição de crescimento de algas (API et al., 2015; PEREIRA et al., 2018).

Entre as atividades farmacológicas citadas do linalol podem ser citadas atividade sedativa, atividade anti-inflamatória e analgésica, ação antihipercolesterolemia, atividade antimicrobiana, atividade ansiolítica, atividade neuroprotetora, atividade larvicida diante de *Aedes aegypti*, atividade antinociceptiva e anticonvulsivante, melhora no desenvolvimento cognitivo, potencial antitumorogênico e modulação do estresse oxidativo (CHO, et al., 2011; JANA et al., 2014; APROTOSOAIE et al., 2014; XU et al., 2017; SOUTO-MAIOR et al., 2017; FUJIWARA et al., 2017; PEREIRA et al., 2018).

3.5.2.1 Mecanismo antifúngico do Linalol

O linalol está envolvido na inibição da biossíntese de ácido mevalônico (CHO, et al., 2011). Na rota da biossíntese do ergosterol por leveduras existem três momentos importantes e que estão citados a seguir em ordem, que são: a biossíntese do ácido mevalônico, a biossíntese de pirofosfato de farnesil e por fim a biossíntese final da molécula do ergosterol (HE et al., 2017).

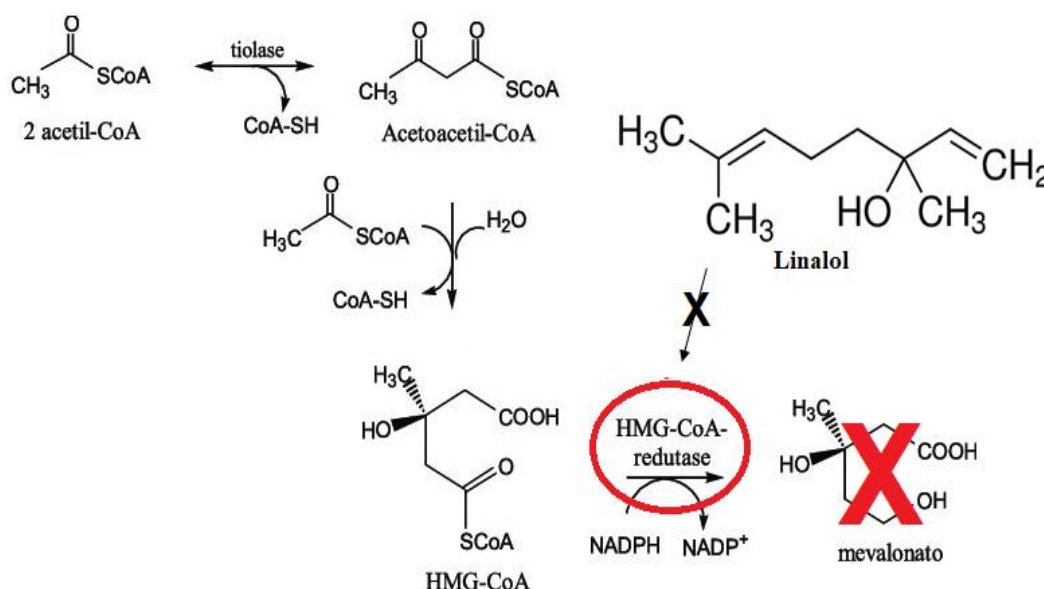
O ergosterol é um importante componente da membrana plasmática de espécies de *Candida* e leveduras de outros gêneros. Como a rota da biossíntese do ergosterol nas leveduras compreende o envolvimento de numerosas enzimas codificadas por diferentes genes, ela vem sendo utilizada como alvo nas terapias

antifúngicas, a exemplo dos fármacos azólicos, bem como vem sendo estudada como protótipo para desenvolvimento de novos fármacos (RODRIGUES, 2018).

Como a molécula do linalol age inibindo a biossíntese de ácido mevalônico consequentemente não ocorrerá a biossíntese de ergosterol para constituir a membrana plasmática das espécies de *Candida*, isso faz com que a levedura não consiga desenvolver uma membrana plasmática funcional para o micro-organismo sobreviver. A inibição da biossíntese do ácido mevalônico interfere no crescimento celular e causa modificações estruturais em proteínas (LIAO et al., 2016).

O linalol age diminuindo a expressão da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase, essa enzima é responsável por catalisar a conversão de HMG-CoA em ácido mevalônico, dessa forma existe um bloqueio da biossíntese de ergosterol (CHO, et al., 2011), que consequentemente promove a desestabilização da membrana plasmática da levedura (Figura 20).

Figura 20 – Esquema proposto do mecanismo de ação do linalol diante de espécies de *Candida*



Fonte: Adaptado de CAMPO, V.L., CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 425-430, 2007. De acordo com os achados no estudo de CHO, S.Y., JUN, H.J., LEE, J.H., JIA, Y., KIM, K.H., LEE, S.J., 2011. Linalol reduces the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase via sterol regulatory element binding protein-2-and ubiquitin-dependent mechanisms. **FEBS letters** 585, 3289-3296.

Além disso, inúmeros estudos demonstraram que o linalol promove parada do ciclo celular, indução de apoptose e estresse oxidativo nas células de *Candida* (ZORE et al., 2011; MÁTÉ et al., 2017; BLASKÓ, et. al, 2017).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 *Candida*, MEIOS DE CULTURA, PRESERVAÇÃO DAS CEPAS E PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

Para este estudo foram utilizadas cepas de diferentes espécies de *Candida* (Quadro 1) que foram previamente identificadas e estão preservadas no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos (LFBM), do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Um total de vinte e uma cepas de *Candida*, isoladas de amostras clínicas foram utilizadas, sendo oito da espécie *albicans*, sete *C. glabrata*, quatro *C. tropicalis*, uma *C. parapsilosis*, uma *C. krusei* e uma da *American Type Culture Collection* (ATCC), *Candida glabrata* ATCC 90030.

Quadro 1 – Identificação das espécies das cepas de *Candida*

Identificação	Espécie
LFBM C2	<i>Candida albicans</i>
LFBM C3	<i>Candida albicans</i>
LFBM C4	<i>Candida albicans</i>
LFBM 1004	<i>Candida albicans</i>
LFBM Ca	<i>Candida albicans</i>
LFBM AM14	<i>Candida albicans</i>
LFBM 08	<i>Candida albicans</i>
LFBM 04a	<i>Candida albicans</i>
LFBM 902	<i>Candida tropicalis</i>
LFBM 11530	<i>Candida tropicalis</i>
LFBM 3769	<i>Candida tropicalis</i>
LFBM AM07	<i>Candida tropicalis</i>
LFBM 10961	<i>Candida krusei</i>
LFBM CP*	<i>Candida parapsilosis</i>
LFBM C1	<i>Candida glabrata</i>
LFBM AM01	<i>Candida glabrata</i>
LFBM Si	<i>Candida glabrata</i>
LFBM AM15	<i>Candida glabrata</i>
LFBM AM06	<i>Candida glabrata</i>
LFBM 04b	<i>Candida glabrata</i>
ATCC 90030	<i>Candida glabrata</i>

Legenda: LFBM – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; ATCC – *American Type Culture Collection*. **Fonte:** A autora (2021).

4.1.1 Cultivo das espécies de *Candida* em caldo Sabouraud e CHROMagar *Candida*TM (BDTM)

As espécies de *Candida* escolhidas para este estudo foram inoculadas assepticamente em tubos contendo Caldo Sabouraud (CS) e incubados a 35 °C por 48 h. Após este período, cada cultura foi semeada em CHROMagar *Candida*TM (BDTM), a fim de obter colônias isoladas que permitissem a diferenciação entre as espécies de *Candida*.

O meio CHROMagar *Candida*TM apresenta em sua composição uma seleção de substratos artificiais (cromogênios), que através de sequências de reações enzimáticas específicas liberam compostos coloridos. Este meio é utilizado para diferenciação principalmente das espécies: *C. albicans* que aparecem com colônias verdes claras ou verde mais escuro; *C. tropicalis* que se apresentam com colônias azuis acinzentadas, azuis esverdeadas ou azuis metalizadas com ou sem halos violetas e *C. krusei* mostrando colônias planas de grande diâmetro cor-de-rosa a vermelho claro com bordas esbranquiçadas. As demais espécies de *Candida* spp., como *C. glabrata*, podem aparecer com a coloração creme ou aparecer cor-de-rosa a lilás variando dos tons mais claro ao escuro.

4.1.2 Preparação das culturas de *Candida* e sua preservação

A partir dos cultivos em CHROMagar *Candida*® colônias isoladas foram inoculadas em Caldo Batata Dextrose (CBD) e incubadas por 48 h a 35 °C. Em seguida, estas culturas foram semeadas em frascos de vidro contendo Agar Batata Dextrose inclinado e incubadas sob as mesmas condições.

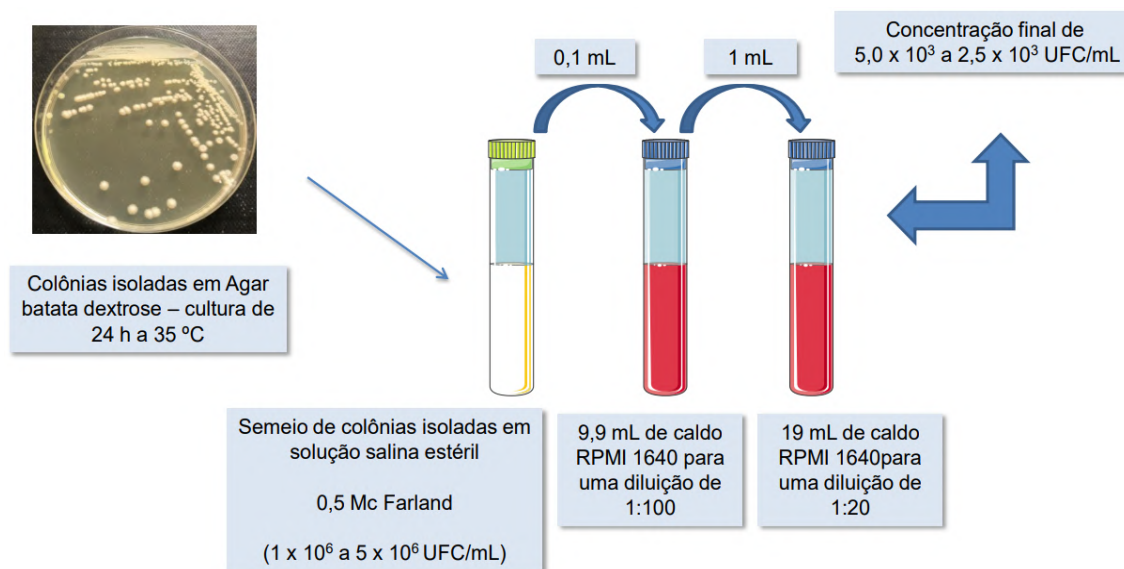
O crescimento das cepas de *Candida* foi verificado na superfície da inclinação do ABD e adicionado assepticamente, óleo mineral (Laborclin®) esterilizado a fim de cobrir toda a extensão do crescimento fúngico. Os frascos foram selados com lacre de alumínio e armazenados sob refrigeração a 4 °C em caixas plásticas.

4.1.3 Padronização do inóculo

Os inóculos de *Candida* foram preparados segundo o documento M27 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017a).

Partindo de uma cultura de 24 h em ABD, cinco colônias foram inoculadas em uma solução salina 0,85 % esterilizada, a fim de obter uma suspensão de turvação correspondente ao tubo 0,5 da escala Mc Farland, o equivalente a cerca de $1,0 \times 10^6$ a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL. Uma segunda suspensão foi preparada pela diluição da suspensão inicial em meio RPMI 1640 (sem bicarbonato de sódio e tamponado com 165 mM de ácido 4-morfolinopropanosulfônico - MOPS – até pH 7,0) (1:100), seguida de uma terceira suspensão, cuja diluição foi de 1:20. Dessa forma foi obtida suspensão padronizada em $1,0 \times 10^3$ a $5,0 \times 10^3$ UFC/mL. Na realização do teste de susceptibilidade aos antifúngicos essa suspensão foi diluída de 1:1, obtendo uma concentração final de $0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

Figura 21 – Padronização de inóculo de *Candida* segundo documento M27 (2017a) do *Clinical Laboratory Standards Institute*



Fonte: A autora (2021), baseado em CLSI, 2017a. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts - Fourth Edition. CLSI Standard M27. *Clinical Laboratory Standards Institute*, Wayne, Pennsylvania, USA.

4.1.4 Avaliação da susceptibilidade das cepas de *Candida* aos antifúngicos – Método de difusão em meio sólido

Para determinar a susceptibilidade das espécies de *Candida* aos antifúngicos, foi realizado o teste fenotípico qualitativo pelo método descrito por KIRBY e BAUER, 1989. Para tanto foi realizada a padronização do inóculo de acordo com a escala de 0,5 Mc Farland, (10^6 UFC/mL) conforme descrito no item 4.1.3. Este inóculo foi semeado sobre a superfície do Agar Mueller Hinton (AMH) adicionado de 2% de glicose, com auxílio de swab estéril, seguindo as recomendações do documento M44 do CLSI (2018). O semeio foi realizado, de modo que resultasse em um crescimento confluyente. Os discos de antifúngicos foram depositados na superfície do Agar semeado com auxílio de pinça esterilizada. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas.

Neste teste foram utilizados discos dos seguintes antifúngicos: Fluconazol (25 µg), Cetoconazol (50 µg), Anfotericina B (100 µg) e Nistatina (100 U.I.) todos provenientes do Laboratório Cecon®. Os halos de inibição do crescimento em torno dos discos foram medidos com ajuda de paquímetro digital (Starrett®) e expressos em milímetros. Para determinar o perfil de susceptibilidade foram utilizados os dados disponibilizados pelo documento CLSI-M44 (2018), classificando as cepas como sensíveis, dose dependentes ou resistentes de acordo com o diâmetro do halo de inibição do crescimento (Tabela 1). Os resultados foram expressos pelo perfil de susceptibilidade das cepas de *Candida* ao antifúngico, após medição dos halos e comparação com os pontos de corte definidos no documento M-44 do CLSI.

Tabela 1 – Concentração dos antifúngicos para classificação da suscetibilidade das espécies de *Candida* - ponto de corte “breakpoint” para o método de difusão em Agar *Clinical Laboratory Standard Institute*

Antifúngico/Concentração	Halos de inibição (mm)		
	Sensível	Dose-dependente	Resistente
Fluconazol (25 µg)	≥ 19	15 – 18	≤ 14
Cetoconazol (50 µg)	> 20	10 – 20	< 10
Anfotericina B (100 µg)	> 10	---	< 10
Nistatina (100 U.I.)	> 10	---	< 10

Legenda: U.I. – Unidades internacionais. **Fonte:** A autora (2021). Elaborada de acordo com os dados padronizados pelos documentos CLSI-M44 (2018).

4.2 MONOTERPENOS E AGENTES ANTIFÚNGICOS

Neste estudo foram utilizados os seguintes monoterpenos obtidos da Sigma-Aldrich™: Linalol (97 % - ref. W263508), (R)-(+)-Limoneno (93 % - ref. W263303) e Eucaliptol (99 % - ref. W246506). Foram utilizados os pós dos antifúngicos: Fluconazol, Cetoconazol, Itraconazol, Terconazol, Anfotericina B e Micafungina e também foram obtidos junto a Sigma-Aldrich™.

Todas as soluções-teste dos monoterpenos e antifúngicos foram preparadas na concentração inicial de 4.096 µg/mL. Inicialmente foi preparada uma solução-mãe de cada monoterpeno, onde uma alíquota de 1mL foi solubilizada em 1 mL de uma mistura de etanol/tween 80/água destilada (0,3/0,1/0,6 mL) e em seguida, diluídos em água destilada para obter as soluções-teste com concentração de 4.096 µg/mL, levando em consideração a densidade de cada monoterpeno

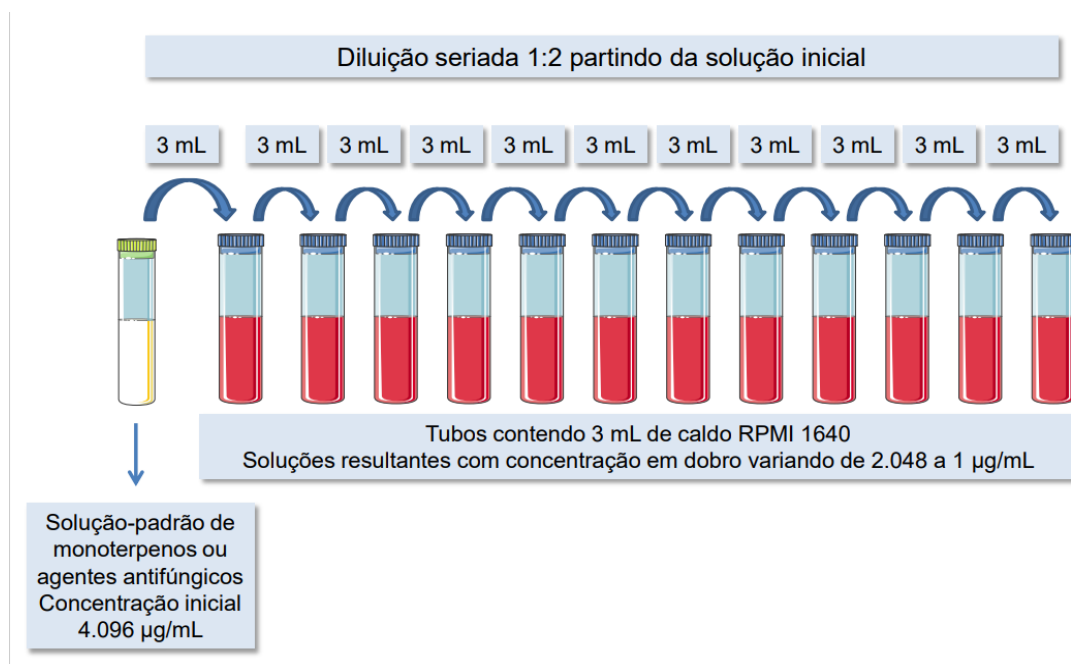
Os antifúngicos foram solubilizados inicialmente em dimetilsulfóxido (DMSO), com exceção do fluconazol, que foi solubilizado em água destilada, conforme o documento M44 do CLSI (2018), para a concentração inicial de 4.096 µg/mL. Todas as soluções foram esterilizadas por filtração, utilizando membrana Millipore® 0,22 µm (Figura 22).

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-CANDIDA DE MONOTERPENOS E ANTIFÚNGICOS

4.3.1 Determinação da concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) dos monoterpenos (linalol, limoneno e eucaliptol) e dos antifúngicos (fluconazol, cetoconazol, itraconazol, terconazol, anfotericina B e micafungina) foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, preconizado pelo documento M27 do CLSI (CLSI, 2017a). Para isso foram realizadas diluições seriadas dos monoterpenos e dos antifúngicos em meio RPMI 1640, a fim de obter concentrações finais que variaram de 1024 a 0,5 µg/mL para os monoterpenos, fluconazol, cetoconazol, itraconazol e terconazol e de 64 a 0,03 µg/mL para micafungina e anfotericina B.

Figura 22 – Esquema de diluição seriada para determinação da concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima



Fonte: A autora (2021).

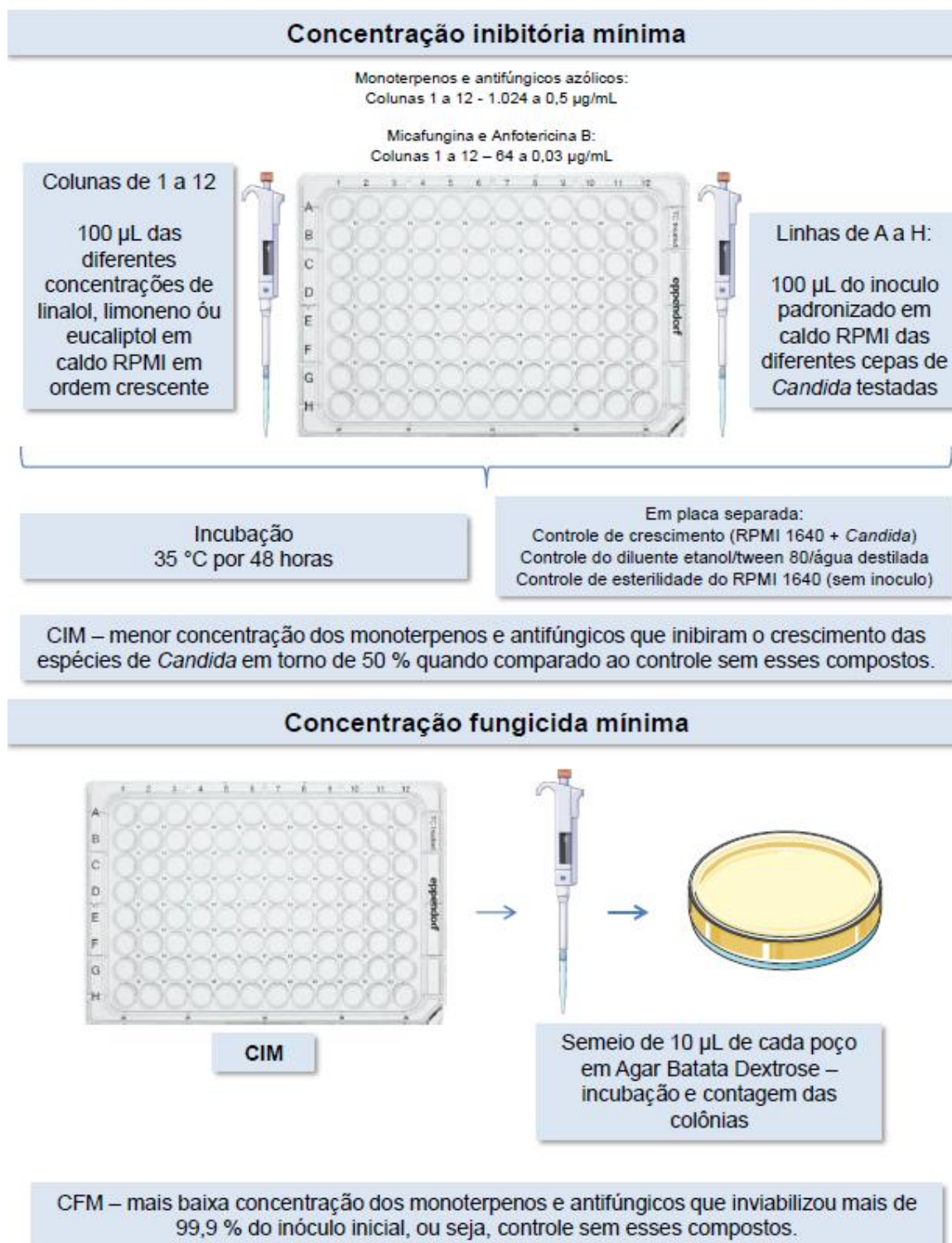
Após a etapa de preparação das diluições, 100 µL delas foram distribuídos nos poços de microplacas de 96 poços. Em seguida foram inoculados em cada poço 100 µL da suspensão fúngica padronizada em 1×10^3 a 5×10^3 a fim de obter concentração final de $0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/poço. Em uma placa separada, foram utilizados controle de crescimento (RPMI 1640 + micro-organismo) indicando crescimento total (100 %), controle do diluente etanol/tween 80/água destilada (3,0/1,0/6,0) e um controle de esterilidade do RPMI 1640. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 h, após período de incubação uma alíquota de 10 µL foi semeada em placas de ABD, com auxílio de uma pipeta automática e as placas incubadas sob as mesmas condições. A fim de proceder a contagem de células viáveis e determinar a CIM bem como a concentração fungicida mínima (CFM) (Figura 23).

A inibição do crescimento foi analisada conforme recomendações do documento M27 do CLSI (2017a), avaliando o crescimento em caldo comparado a um controle de crescimento positivo sem tratamento.

A CIM foi definida como a menor concentração dos monoterpenos e antifúngicos que inibiram o crescimento das espécies de *Candida* em torno de 50 % quando comparado ao controle sem esses compostos. A CFM foi definida como a

mais baixa concentração dos monoterpenos e antifúngicos que inviabilizou mais de 99,9 % do inóculo inicial, ou seja, controle sem esses compostos.

Figura 23 – Esquema de determinação de concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima



Fonte: A autora (2021).

Conforme os pontos de corte contidos no documento M60 do CLSI (CLSI, 2017b), os resultados da CIM dos antifúngicos selecionados foram interpretados e as cepas foram classificadas como: Sensíveis, Dose-dependentes, Intermediárias ou Resistentes (Tabela 2). Para os antifúngicos Cetoconazol e Anfotericina B foram utilizados os padrões de controle de qualidade encontrados no documento M60 do CLSI, dessa forma para estes antifúngicos as CIMs que apresentaram valor maior que o padrão definido de controle qualidade classificou as cepas como resistentes.

Os ensaios foram realizados em triplicata em experimentos independentes.

Tabela 2 – Concentração dos antifúngicos ($\mu\text{g/mL}$) para classificação da suscetibilidade das espécies de *Candida* - ponto de corte “breakpoint” para o método de microdiluição *Clinical Laboratory Standard Institute*

Antifúngico/Espécie	Pontos de corte ($\mu\text{g/mL}$)			
	Sensível	Intermediário	Dose-dependente	Resistente
Fluconazol (<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i>)	≤ 8	---	16 - 32	≥ 32
Fluconazol (<i>C. glabrata</i>)	---	---	≤ 32	≥ 6
Itraconazol	$\leq 0,125$	---	0,25-0,5	≥ 1
Micafungina (<i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i>)	$\leq 0,25$	0,5	---	≥ 1
Micafungina (<i>C. glabrata</i>)	$\leq 0,06$	0,12	---	$\geq 0,25$
Micafungina (<i>C. parapsilosis</i>)	≤ 2	4	---	≥ 8
Micafungina (<i>C. tropicalis</i>)	$\leq 0,12$	0,5	---	≥ 1

Fonte: Elaborada de acordo com os documentos CLSI-M60 (2017) e CLSI-M27 (2002). Nota: O antifúngico terconazol não apresenta pontos de cortes “breakpoint” definidos pelos documentos do CLSI.

4.3.2 Avaliação da atividade anti-*Candida* da associação da Linalol-antifúngicos - Método Checkerboard

Para a avaliação da atividade anti-*Candida* da associação da linalol-antifúngicos foram escolhidos o fluconazol, itraconazol, cetoconazol, terconazol, micafungina e anfotericina B.

Foram selecionadas cepas de *C. albicans*; *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, todas com perfil de resistência aos azólicos, bem como

algumas com perfil de resistência a micafungina, foram incluídas nesta etapa do estudo.

A atividade das associações linalol-antifúngicos foi realizada pelo método do tabuleiro de xadrez (*checkerboard*) (LORIAN, 1991), onde diluições do linalol e antifúngicos foram realizadas em caldo RPMI 1640, de modo a obter concentrações sub-inibitórias que variaram de 1/2 a 1/256 da CIM e de 1/2 a 1/512 da CIM para linalol e antifúngicos, respectivamente.

A partir destas diluições, 50 µL de cada concentração das drogas foram transferidos para os poços da microplaca. Os antifúngicos foram distribuídos no sentido da coluna 1 (mais concentrado) a coluna 12 (menos concentrado). O linalol foi distribuído no sentido da linha H (mais concentrada) a linha A (menos concentrada). Para cada poço foram pipetados 100 µL das suspensões fúngicas (10^3 UFC/poço). As placas foram incubadas por 48 h a 35 °C. A avaliação do crescimento foi realizada conforme descrito no item 4.3.1.

Os dados foram interpretados após o cálculo do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (CIFi), conforme a equação 1:

$$\text{CIFi} = \text{CIF A} + \text{CIF B}$$

Eq.1

Onde,

$$\text{CIF A} = \frac{\text{CIM do linalol em associação com antifúngico}}{\text{CIM do linalol}}$$

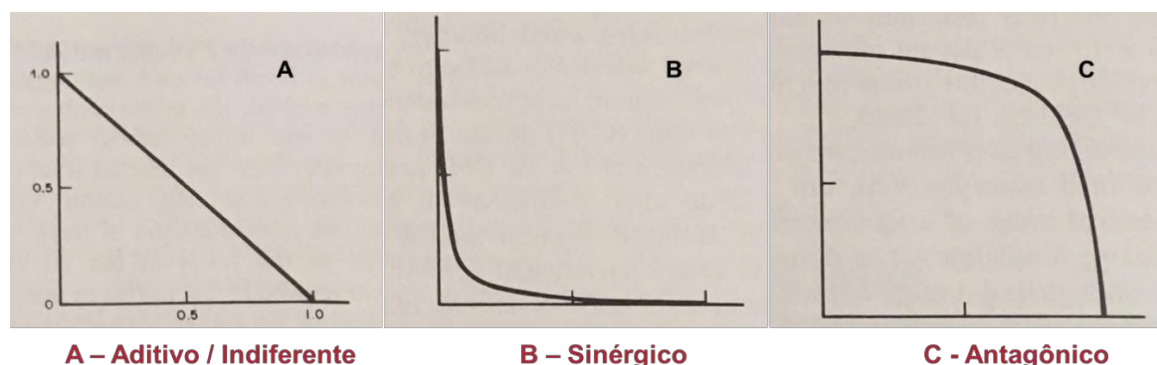
Eq. 2

$$\text{CIF B} = \frac{\text{CIM do antifúngico em associação com linalol}}{\text{CIM do antifúngico}}$$

Eq. 3

De acordo com os resultados, os efeitos obtidos com as associações foram classificados conforme o Índice da Concentração Inibitória Fracionada (CIFi) obtido, e considerado sinérgico quando $\text{CIFi} \leq 0,5$; aditivo quando $0,5 < \text{CIFi} \leq 1$; indiferente quando $1 < \text{CIFi} \leq 2$, antagonista quando a $\text{CIFi} \geq 2$. A partir destes dados foi possível obter isobogramas que representam o efeito da associação. A figura 24 apresenta o perfil dos isobogramas dependendo do efeito observado (LORIAN, 2005). Os ensaios foram realizados em duplicata de experimentos independentes.

Figura 24 – Perfil dos isobologramas com os possíveis efeitos das associações. A (Aditivo), B (Sinérgico) e C (Antagônico)



Fonte: LORIAN, V. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 5. ed. France: Lippincott Williams & Wilkins, 832 p., 2005.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO LINALOL SOBRE A PAREDE CELULAR DE ESPÉCIES DE *CANDIDA* - Ensaio do sorbitol

A atividade do linalol sobre a parede celular das espécies de *Candida* foi realizado pelo ensaio do sorbitol descrito por Lima e colaboradores (2013) que se baseia em adicionar o sorbitol ao meio de cultivo. Este composto serve como um protetor osmótico, protegendo a parede celular de moléculas que a desestruturam (LIMA et al., 2013).

Dessa forma, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do linalol foi determinada sobre as espécies de *Candida* (n=21) conforme descrito no item 4.3.1.

Para a determinação da CIM e concentração fungicida mínima (CFM), foram utilizadas concentrações de linalol que variaram de 8.192 a 256 µg/mL, meio RPMI 1640 suplementado com uma solução de 0,8 M de sorbitol (Dinâmica®), ambos esterilizados por filtração e o meio RPMI 1640 sem suplementação de sorbitol (controle negativo). O antifúngico micafungina, pertencente a classe da equinocandinas e conhecido por agir sobre a parede celular fúngica, foi utilizado como controle positivo da desestruturação da parede celular de espécies de *Candida*.

A leitura da CIM e CFM foi realizada após 48 horas de incubação a 35 °C. O aumento da CIM do linalol ou da micafungina na presença de 0,8 M sorbitol no meio RPMI 1640, comparada a CIM destes compostos na ausência de sorbitol no meio de cultivo, indica que o sorbitol agiu como protetor osmótico e que consequentemente a

molécula teste age promovendo ação na parede celular das cepas de *Candida*.

Os testes foram realizados em triplicata de experimentos independentes e os resultados obtidos foram expressos em µg/mL.

4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DO LINALOL E DE SUAS ASSOCIAÇÕES COM ANTIFÚNGICOS SOBRE FATORES DE VIRULÊNCIA DE *CANDIDA*

4.5.1 Avaliação da inibição da formação de tubo germinativo de *Candida albicans*

A fim de avaliar a atividade do linalol em inibir a formação de tubo germinativo foram selecionadas quatro cepas de *C. albicans* (LFBM C2, LFBM C3, LFBM Ca* e LFBM AM14), que apresentaram altas CIM dos antifúngicos azólicos.

Para este estudo foram utilizados o linalol, fluconazol, micafungina e anfotericina B em suas concentrações inibitórias mínimas (CIM) e nas concentrações inibitórias fracionadas (CIF), ou seja, suas concentrações sub-inibitórias quando em associação; CIF linalol quando associado ao fluconazol ou a micafungina ou a anfotericina B e CIF do fluconazol, micafungina ou anfotericina B quando associado ao linalol. As concentrações avaliadas destes compostos e de suas associações estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Linalol, antifúngicos e suas concentrações utilizadas na avaliação da inibição do tubo germinativo de *Candida albicans*

<i>Candida albicans</i>	Compostos	Concentração final (µg/mL)	<i>Candida albicans</i>	Compostos	Concentração final (µg/mL)
LFBM C2	Linalol - CIM	1024	LFBM C3	Linalol - CIM	1024
	Fluconazol - CIM	1024		Fluconazol - CIM	1024
	Fluconazol - CIF	2		Fluconazol - CIF	2
	Linalol – CIF	512		Linalol – CIF	256
	Micafungina - CIM	0,03		Micafungina - CIM	0,03
	Micafungina - CIF	0,004		Micafungina - CIF	0,004
	Linalol – CIF	32		Linalol – CIF	32
	Anfotericina B – CIM	0,25		Anfotericina B – CIM	0,25
	Anfotericina B - CIF	0,125		Anfotericina B - CIF	0,125
	Linalol – CIF	32		Linalol – CIF	32
LFBM Ca*	Linalol - CIM	1024	LFBM AM14	Linalol - CIM	1024
	Fluconazol - CIM	1024		Fluconazol - CIM	1024
	Fluconazol - CIF	2		Fluconazol - CIF	4
	Linalol – CIF	128		Linalol – CIF	512
	Micafungina - CIM	0,03		Micafungina - CIM	0,03
	Micafungina - CIF	0,004		Micafungina - CIF	0,004
	Linalol – CIF	32		Linalol – CIF	32
	Anfotericina B – CIM	0,25		Anfotericina B – CIM	0,5
	Anfotericina B - CIF	0,0625		Anfotericina B - CIF	0,125
	Linalol – CIF	32		Linalol – CIF	32
CONTROLE DO DILUENTE DAS AMOSTRAS			Concentração (mL)		
Etanol/Tween80/Água destilada			0,03/0,01/q.s.p 10 mL		

Legenda: LFBM – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; CIM – Concentração inibitória mínima; CIF – Concentração inibitória fracionada. **Fonte:** A autora (2021).

A avaliação da formação e inibição do tubo germinativo foi realizada de acordo com metodologia descrita por Zore e colaboradores (2011) com algumas modificações. Para indução da formação do tubo germinativo de *C. albicans* foi utilizado o meio composto por soro fetal bovino a 25 % em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0) que foi esterilizado sob membrana Millipore® de porosidade 0,22 µm.

Inicialmente foram preparadas as soluções dos compostos e de suas associações em meio de indução duas vezes mais concentrado, de forma a obter ao final, as concentrações descritas na tabela 3. Uma alíquota de 100 µL de cada solução desses compostos foi pipetada nos poços das placas de microdiluição de 96 poços, e em seguida foi adicionado 100 µL do inoculo padronizado em $1,0 \times 10^3$ a $5,0 \times 10^3$ UFC/mL.

Para a preparação deste inoculo, as cepas de *C. albicans* foram cultivadas por 24 h em caldo YPD (extrato de levedura, peptona e glicose). Desta cultura foram pipetados 50 µL e inoculados em 2,5 mL do meio de indução, a fim de obter uma turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala de Mc Farland, o correspondente a $1,0 \times 10^6$ a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL. Esta suspensão foi diluída 1:1000 obtendo assim, uma suspensão contendo $1,0 \times 10^3$ a $5,0 \times 10^3$ UFC/mL.

As placas foram incubadas a 37 °C por 90 minutos. Uma alíquota de 5 µL de cada tratamento foi adicionada em câmara de Neubauer e realizada a enumeração dos tubos germinativos formados (Figura 25) em microscópio óptico binocular no aumento de 400X. Um controle positivo do crescimento foi adicionado composto apenas pelo meio de indução e o inoculo foi inserido nessa avaliação.

Figura 25 – Aspecto de tubo germinativo formado por *Candida albicans* LFBM AM14



Fonte: A autora (2021).

A enumeração foi realizada nas células que apresentaram formação de tubo germinativo presente nos quatro quadrantes maiores da Câmara de Neubauer. Os experimentos foram realizados em triplicata de testes independentes e expressos pela média e desvio padrão da porcentagem de inibição do tubo germinativo calculados no software Excel. Os resultados foram submetidos a análise estatística, pela aplicação do teste t, fazendo análise de variância dos resultados e avaliando a diferença estatística entre os tratamentos, sendo considerada diferença estatística quando p valor foi menor que 0,05.

4.5.2 Avaliação da atividade antibiofilme do linalol e de suas associações com antifúngicos

A avaliação da atividade do linalol e de suas associações com antifúngicos sobre os biofilmes formados pelas cepas de *Candida* selecionadas para esta etapa do estudo foi realizada por duas metodologias com objetivos distintos. A primeira teve por objetivo verificar a inibição da formação dos biofilmes e a segunda verificar a atividade antibiofilme das espécies de *Candida*.

Para essa avaliação foram selecionadas 5 (cinco) espécies de *Candida*, bem como incluindo todas as espécies diferentes de *Candida* (*C. albicans* LFBM AM14, *C. glabrata* LFBM 04b, *C. tropicalis* LFBM 3769, *C. parapsilosis* LFBM CP*, *C. krusei* LFBM 10961) e *Candida glabrata* ATCC 90030.

O linalol e suas associações foram avaliados em concentrações sub-inibitórias (CIF) as quais apresentaram em associação, um sinergismo capaz de reverter a sensibilidade das espécies de *Candida* aos antifúngicos. As concentrações que foram avaliadas estão apresentadas na tabela 4.

Tabela 4 – *Candidas*, linalol, antifúngicos e concentrações das amostras avaliadas na avaliação da atividade antibiofilme

<i>Candida</i>	Compostos-testes	Concentração (µg/mL)	<i>Candida</i>	Compostos-testes	Concentração (µg/mL)	<i>Candida</i>	Compostos-testes	Concentração (µg/mL)
LFBM AM14 <i>Candida albicans</i>	Linalol - CIM	1024	LFBM 04B <i>Candida glabrata</i>	Linalol - CIM	512	LFBM 3769 <i>Candida tropicalis</i>	Linalol - CIM	1024
	Fluconazol - CIM	1024		Fluconazol - CIM	1024		Fluconazol - CIM	1024
	Fluconazol - CIF	4		Fluconazol - CIF	2		Fluconazol - CIF	2
	Linalol – CIF	512		Linalol – CIF	256		Linalol – CIF	512
	Micafungina - CIM	0,03		Micafungina - CIM	1		Micafungina - CIM	0,25
	Micafungina - CIF	0,004		Micafungina - CIF	0,25		Micafungina - CIF	0,03
	Linalol – CIF	32		Linalol – CIF	32		Linalol – CIF	32
	Anfotericina B – CIM	0,5		Anfotericina B – CIM	0,5		Anfotericina B – CIM	0,5
	Anfotericina B - CIF	0,125		Anfotericina B - CIF	0,0625		Anfotericina B - CIF	0,125
	Linalol – CIF	32		Linalol – CIF	32		Linalol – CIF	32
ATCC 90030 <i>Candida glabrata</i>	Linalol - CIM	512	LFBM 10961 <i>Candida krusei</i>	Linalol - CIM	1024	LFBM CP* <i>Candida parapsilosis</i>	Linalol - CIM	512
	Fluconazol - CIM	32		Fluconazol - CIM	1024		Fluconazol - CIM	1024
	Fluconazol - CIF	1		Fluconazol - CIF	2		Fluconazol - CIF	2
	Linalol – CIF	32		Linalol – CIF	256		Linalol – CIF	256
	Micafungina - CIM	0,03		Micafungina - CIM	0,03		Micafungina - CIM	1
	Micafungina - CIF	0,015		Micafungina - CIF	0,004		Micafungina - CIF	0,25
	Linalol – CIF	32		Linalol – CIF	32		Linalol – CIF	32
	Anfotericina B – CIM	0,25		Anfotericina B – CIM	0,5		Anfotericina B – CIM	0,25
	Anfotericina B - CIF	0,0625		Anfotericina B - CIF	0,25		Anfotericina B - CIF	0,0625
	Linalol – CIF	32		Linalol – CIF	512		Linalol – CIF	32
CONTROLE DO DILUENTE DAS AMOSTRAS						Concentração (mL)		
Etanol/Tween80/Água						0,03/0,01/q.s.p 10 mL		

Legenda: LFBM – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; CIM – Concentração inibitória mínima; CIF – Concentração inibitória fracionada. **Fonte:** A autora (2021).

4.5.2.1 Formação e quantificação do biofilme

Para avaliar a capacidade de formação do biofilme pelas espécies de *Candida*: *C. albicans* LFBM AM14, *C. glabrata* LFBM 04B, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. parapsilosis* LFBM CP*, *C. tropicalis* LFBM 3769 e *C. krusei* LFBM 10961, foi utilizada a metodologia descrita por Manusamy e colaboradores (2016), com modificações.

A partir de uma cultura de 24 horas das espécies de *Candida* em caldo YPD, uma alíquota de 50 µl desta cultura foi inoculada em caldo RPMI 1640 e incubada a 35 °C até atingir turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland. Desta cultura, 200 µL foram dispensados nos poços de placas de microdiluição (96 poços) e as placas incubadas a 35 ± 2 °C por 24 horas.

A quantificação da biomassa do biofilme formado foi realizada conforme metodologia de Manusamy e colaboradores (2016), pelo método de coloração da biomassa pelo cristal violeta, com modificações. Após período de incubação, as placas foram lavadas três vezes com solução salina esterilizada (NaCl 0,85 %), a fim de retirar quaisquer células que não estivessem aderidas ao biofilme e foram colocadas em estufa de secagem a 40 °C por 20 minutos. Em seguida foram adicionados a todos os poços 200 µL de uma solução de cristal violeta a 0,4 % e as placas incubadas por 45 minutos. Após incubação as placas foram lavadas com água destilada esterilizada e foram secas em estufa a 40 °C por 20 min.

Após secagem dos poços, foram adicionados 200 µL de álcool etílico 96 % por 45 minutos, a fim de descorar o biofilme. Para realizar a leitura, 100 µL foram retirados e acondicionados em uma nova placa de 96 poços de fundo chato. A leitura foi realizada pela densidade ótica (DO), em leitor de microplacas (xMark™, Bio-Rad, EUA) em comprimento de onda de 585 nm.

Após a realização do experimento foi estabelecido um ponto de corte, obtido pela média dos valores de absorbância, baseado na absorbância da biomassa do biofilme formado pelas espécies de *Candida* (D.O.i), tomando por base a absorbância do controle negativo (D.O.c), que neste caso foram os poços tratados da mesma forma, porém sem o inóculo, conforme a equação 4:

$$D.O.c = \text{Média da D.O do controle negativo} + (3 \times \text{Desvio padrão da média})$$

Dessa forma, esta metodologia empregada com a determinação do ponto de corte, permitiu a classificação da formação do biofilme das cepas nas seguintes categorias, de acordo com Vital Júnior (2020) e Stepanovic e colaboradores (2007):

- Não-Produtor: $D.O.i < D.O.c$;
- Fraco Produtor: $D.O.c < D.O.i \leq (2X D.O.c)$;
- Moderado Produtor: $(2X D.O.c) < D.O.i \leq (4X D.O.c)$;
- Forte Produtor: $(4X D.O.c) < D.O.i$.

Onde:

D.O.i – Densidade ótica dos biofilmes das espécies de *Candida* isolados

D.O.c – Densidade ótica do controle negativo

4.5.2.2 Avaliação da atividade do linalol de suas associações com antifúngicos sobre a formação de biofilme de espécies de *Candida*

Para avaliar a atividade do linalol e suas associações com antifúngicos em concentrações subnibitórias sobre a formação dos biofilmes de espécies de *Candida*, foi utilizada metodologia descrita por Manoharan e colaboradores (2017), com algumas modificações.

Partindo das culturas de 24 horas das espécies de *Candida* em caldo YPD, uma alíquota de 50 µL foi inoculada em caldo RPMI 1640, sendo então incubado a 35 °C até atingir turvação equivalente a escala 0,5 Mc Farland ($1,0 \times 10^6$ a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL). Desta cultura, uma alíquota de 100 µL foi dispensada nos poços das placas de microdiluição. Em seguida, foram distribuídos 100 µL dos compostos e de suas associações em concentrações duas vezes mais concentradas como descrito na tabela 4. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 horas. Foi incluído um controle positivo da formação de biofilme, contendo 100 µL caldo RPMI 1640 e 100 µL do inóculo e um controle negativo composto de 200 µL caldo RPMI 1640.

A determinação da biomassa do biofilme formado após os tratamentos foi realizada conforme Manusamy e colaboradores (2016), com modificações, conforme foi descrita anteriormente no item acima.

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da formação de biofilme, comparado com o controle positivo, que representa 100 % da formação do

biofilme. A porcentagem de inibição foi calculada de acordo com a equação 5.

$$\% \text{ de inibição de biofilme} = \left(\frac{D.O. \text{ do biofilme} \times 100}{D.O. \text{ do controle positivo}} \right) - 100$$

Eq. 5

Onde,

D.O.: Densidade ótica dos poços corados com cristal violeta 0,4 %

Os experimentos foram realizados em triplicata de testes independentes e expressos pela média e desvio padrão da porcentagem de inibição do biofilme que foram calculados no software Office Excel 2019. Os resultados foram submetidos a análise estatística, pela aplicação do teste t, fazendo análise de variância dos resultados e avaliando a diferença estatística entre os tratamentos, sendo considerada diferença estatística quando p valor foi menor que 0,05.

4.5.2.3 Avaliação da atividade do linalol e de suas associações com antifúngicos sobre o biofilme formado de espécies de *Candida*

Para avaliar a atividade do linalol e de suas associações com antifúngicos em concentrações subinibitórias sobre os biofilmes formados das espécies de *Candida*, foi utilizada metodologia descrita por Pierce e colaboradores (2010) com modificações.

Partindo de uma cultura de 24 horas das cepas de *Candida* em caldo YPD, foi inoculada uma alíquota de 200 µL em 20 mL de caldo RPMI 1640 e incubado a 35 °C até atingir a turvação equivalente a escala de 0,5 de Mc Farland ($1,0 \times 10^6$ a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL). Desta cultura foram dispensados 200 µL em todos os 96 poços das placas de microdiluição e incubados por 35 ± 2 °C por 24 horas, a fim de formar o biofilme. Após o período de incubação, o meio de cultura foi retirado cuidadosamente com auxílio de uma pipeta multicanal. Os poços foram lavados assepticamente três vezes com solução salina esterilizada (NaCl) 0,85 %, a fim de retirar as células que não estavam aderidas nos poços. As placas foram colocadas em superfície plana por 20 min em temperatura ambiente (25 °C). Aos biofilmes secos foram colocados 200 µL dos compostos e de suas associações para secagem. As placas foram reincubadas a 35 ± 2 °C por 24 horas. Foi incluído um

controle positivo para a formação de biofilme, composto por 100 µL de caldo RPMI 1640 e 100 µL do inoculo, e um controle negativo, composto apenas 200 µL de caldo RPMI 1640.

Em seguida, o meio de cultura foi retirado e as placas lavadas três vezes com solução salina esterilizada (NaCl) 0,85 %, a fim de retirar quaisquer possíveis células não aderidas ao biofilme, as placas foram colocadas em estufa a 40 °C por 20 min para secagem. A determinação da biomassa do biofilme foi realizada conforme Manusamy e colaboradores (2016), com algumas modificações, conforme descrito no item acima.

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do biofilme formado, comparado com o controle positivo (100 % de formação de biofilme), indicando ação diante do biofilme formado das espécies de *Candida*.

$$\% \text{ de inibição de biofilme formado} = \left(\frac{D.O. \text{ do biofilme} \times 100}{D.O. \text{ do controle positivo}} \right) - 100$$

Eq. 6

Onde,

D.O.: Densidade ótica dos poços corados com cristal violeta 0,4 %.

Os testes foram realizados em triplicata de experimentos independentes e expressos com a média e o desvio padrão e calculados no programa Office Excel 2019, bem como foram submetidos a testes estatísticos de análise da variância, pela aplicação do teste t, tendo a diferença estatística entre os tratamentos definida quando o p valor foi igual a 0,05 %.

4.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO LINALOL E SUAS ASSOCIAÇÕES COM ANTIFÚNGICOS

Para avaliar a citotoxicidade do linalol e de suas associações com antifúngicos, foram selecionadas as concentrações sub-inibitórias que representaram a concentração inibitória fracionada (CIF) as quais apresentaram um efeito sinérgico sobre a inibição do crescimento das espécies de *Candida* e que estão apresentadas na tabela 5.

Tabela 5 – Concentrações das amostras testadas de linalol e antifúngicos na avaliação da citotoxicidade

Amostras	Produtos testes	Concentração (µg/mL)
1	Linalol	256
2	Linalol	128
3	Linalol	64
4	Linalol	32
5	Linalol + Fluconazol	256/4
6	Linalol + Itraconazol	256/0,031
7	Linalol + Cetoconazol	64/0,25
8	Linalol + Terconazol	128/0,125
9	Linalol + Micafungina	32/0,25
10	Linalol + Anfotericina B	32/0,25
CONTROLE DO DILUENTE DAS AMOSTRAS		Concentração (mL)
11	(Etanol/Tween80/Água)	(0,03/0,01/q.s.p. 10 mL)

Fonte: A autora (2021).

4.6.1 Atividade citotóxica sobre linhagens celulares Vero e L929

A atividade citotóxica foi realizada pelo método do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) descrito por Alley e colaboradores 1988 e Mosmann (1983). As linhagens celulares L929 (fibroblasto de camundongos) e Vero (células epiteliais renais de macaco-verde africano) foram mantidas em meio de cultura DMEM (Dulbecco modification of minimum essential media) suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativado e 1 % de solução de antibióticos (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37 °C, em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂ e 95 % de umidade. As células L929 e Vero (10⁵ células/mL) foram adicionadas em placas de 96 poços (190 µL/poço) e incubadas por 24 horas. Em seguida 10 µL das soluções foram adicionadas aos poços e a concentração final de cada substância diluída 20 vezes. O medicamento Paclitaxel (10 µg/mL) foi utilizado como controle positivo de inibição das células e a solução de diluição composta por Etanol/Tween80/Água (0,03/0,01/q.s.p. 10 mL) foi utilizada como controle negativo. Após 72 horas de reincubação foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg/mL) e depois de 3 horas de incubação, o meio de cultura com o MTT foi aspirado e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas (xMark™, Bio-Rad, EUA) no comprimento de onda de 560 nm. Os experimentos foram realizados em quadruplicata e a porcentagem de inibição foi calculada usando o programa GraphPad Prism 7.0.

5 RESULTADOS

5.1 ATIVIDADE ANTI-CANDIDA DE LINALOL, LIMONENO E EUCALIPTOL

Os dados de atividade anti-*Candida* dos monoterpenos linalol, limoneno e eucaliptol estão descritos na tabela 6.

Os resultados encontrados demonstraram que o linalol foi o monoterpeno que apresentou atividade sobre todas as espécies de *Candida* apresentando concentração inibitória mínima (CIM) que variaram de 512 a 1024 µg/mL e concentração fungicida mínima (CFM) de 1024 ou superior a 1024 µg/mL. Os menores valores da concentração inibitória mínima do linalol foram obtidos sobre *Candida glabrata* e *C. parapsilosis*, onde o linalol apresentou CIM igual a 512 µg/mL.

Tabela 6 – Atividade anti-*Candida* de linalol, limoneno e eucaliptol

Espécies de <i>Candida</i>		CIM/CFM (µg/mL)		
Cepas	Espécie	Linalol	Limoneno	Eucaliptol
LFBM C2	<i>C. albicans</i>	1024/1024	>1024/>1024	>1024/>1024
LFBM C3	<i>C. albicans</i>	1024/>1024	>1024/>1024	>1024/>1024
LFBM C4	<i>C. albicans</i>	1024/1024	>1024/>1024	>1024/>1024
LFBM 1004	<i>C. albicans</i>	1024/>1024	>1024/>1024	>1024/>1024
LFBM 08	<i>C. albicans</i>	1024/1024	>1024/>1024	>1024/>1024
LFBM AM14	<i>C. albicans</i>	1024/1024	>1024/>1024	>1024/>1024
LFBM CA*	<i>C. albicans</i>	1024/>1024	>1024/>1024	>1024/>1024
LFBM 04A	<i>C. albicans</i>	1024/>1024	>1024/>1024	>1024/>1024
LFBM C1	<i>C. glabrata</i>	1024/1024	>1024/>1024	>1024/>1024
LFBM AM01	<i>C. glabrata</i>	1024/>1024	>1024/>1024	>1024/>1024
LFBM 04B	<i>C. glabrata</i>	512/1024	>1024/>1024	>1024/>1024
LFBM C6	<i>C. glabrata</i>	1024/>1024	>1024/>1024	>1024/>1024
LFBM AM07	<i>C. tropicalis</i>	1024/1024	>1024/>1024	>1024/>1024
LFBM CASi	<i>C. glabrata</i>	512/1024	>1024/>1024	>1024/>1024
LFBM AM15	<i>C. glabrata</i>	512/1024	>1024/>1024	>1024/>1024
LFBM 902	<i>C. tropicalis</i>	1024/>1024	>1024/>1024	>1024/>1024
LFBM 3769	<i>C. tropicalis</i>	1024/1024	>1024/>1024	>1024/>1024
LFBM 11530	<i>C. tropicalis</i>	1024/1024	>1024/>1024	>1024/>1024
LFBM 10961	<i>C. krusei</i>	1024/1024	>1024/>1024	>1024/>1024
LFBM CP*	<i>C. parapsilosis</i>	512/1024	>1024/>1024	1024/>1024
LFBM 90030	<i>C. glabrata</i>	512/1024	>1024/>1024	>1024/>1024

Legenda: LFBM – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; CIM – Concentração inibitória mínima; CFM – Concentração fungicida mínima; > - maior que.

Os monoterpenos limoneno e o eucaliptol apresentaram altos valores de CIM diante das espécies de *Candida* testadas, evidenciado pelos valores maiores que 1.024 µg/mL. O eucaliptol apresentou CIM igual a 1.024 µg/mL apenas diante da cepa *C. parapsilosis* LFBM

CP*, sobre as demais espécies o eucaliptol apresentou CIM e CBM maior que 1.024 µg/mL, evidenciando que não houve atividade destes compostos nas concentrações testadas neste estudo. O linalol apresentou-se como o monoterpeno mais ativo sobre as espécies de *Candida* ensaiadas e dessa forma foi selecionado para as próximas etapas desse trabalho.

As espécies de *Candida* selecionadas para este estudo apresentaram perfil de resistência importante, evidenciado pela CIM dos antifúngicos que se encontram descritos na tabela 7. Todas as espécies de *Candida* apresentaram resistência aos antifúngicos azólicos testados, com evidência para o fluconazol e cetoconazol que resultaram nos maiores valores de CIM encontrados, variando de 32 a maior que 1.024 µg/mL. As cepas de *C. albicans* não apresentaram resistência a micafungina ou a anfotericina B. A maioria das cepas de *C. glabrata* e *C. tropicalis* apresentou resistência a micafungina com CIM variando de 0,25 a 1 µg/mL.

Tabela 7 – Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima de antifúngicos sobre espécies de *Candida*

Espécies de <i>Candida</i> Cepas	Espécie	CIM/CFM (µg/mL)						Resistência fenotípica ^a	Sensibilidade fenotípica ^a
		FLU	CET	TER	ITZ	ANF	MICA		
LFBM C2	<i>C. albicans</i>	>1024/>1024	256/256	128/128	0,5/2	0,25/0,5	0,03/0,06	FLU/ CET/ ITZ	ANF/ NIS/ MICA
LFBM C3	<i>C. albicans</i>	>1024/>1024	256/1024	128/256	0,5/0,5	0,25/0,5	0,03/0,06	FLU/ CET/ ITZ	ANF/ NIS/ MICA
LFBM C4	<i>C. albicans</i>	>1024/>1024	1024/>1024	128/128	0,5/2	0,5/0,5	0,03/0,03	FLU/ CET/ ITZ	ANF/ NIS/ MICA
LFBM 1004	<i>C. albicans</i>	>1024/>1024	256/>1024	128/128	2/4	0,125/0,5	0,03/0,03	FLU/ CET/ ITZ	ANF/ NIS/ MICA
LFBM 08	<i>C. albicans</i>	>1024/>1024	1024/1024	128/128	2/4	0,25/0,5	0,03/0,03	FLU/ CET/ ITZ	ANF/ NIS/ MICA
LFBM AM14	<i>C. albicans</i>	>1024/>1024	512/>1024	128/128	0,5/0,5	0,5/0,5	0,03/0,03	FLU/ CET/ ITZ	ANF/ NIS/ MICA
LFBM CA*	<i>C. albicans</i>	>1024/>1024	512/>1024	64/128	2/4	0,25/0,5	0,03/0,06	FLU/ CET/ ITZ	ANF/ NIS/ MICA
LFBM 04A	<i>C. albicans</i>	1024/1024	256/>1024	64/128	0,5/2	0,125/0,25	0,03/0,03	FLU/ CET/ ITZ	ANF/ NIS/ MICA
LFBM C1	<i>C. glabrata</i>	>1024/>1024	512/512	128/128	0,25/0,5	0,25/0,5	1/2	FLU/ CET/ ITZ/ MICA	ANF/ NIS
LFBM AM01	<i>C. glabrata</i>	>1024/>1024	>1024/>1024	128/256	0,5/0,5	0,25/0,5	1/2	FLU/ CET/ ITZ/ MICA	ANF/ NIS
LFBM 04B	<i>C. glabrata</i>	>1024/>1024	1024/1024	128/128	0,5/1	0,5/0,5	1/2	FLU/ CET/ ITZ/ MICA	ANF/ NIS
LFBM C6	<i>C. glabrata</i>	>1024/>1024	1024/1024	128/128	0,5/1	0,125/0,25	1/2	FLU/ CET/ ITZ/ MICA	ANF/ NIS
LFBM AM07	<i>C. tropicalis</i>	>1024/>1024	128/128	128/128	1/2	0,5/0,5	1/2	FLU/ CET/ ITZ/ MICA	ANF/ NIS
LFBM CASi	<i>C. glabrata</i>	1024/1024	256/512	128/128	0,5/1	0,25/0,5	0,5/1	FLU/ CET/ ITZ/ MICA	ANF/ NIS
LFBM AM15	<i>C. glabrata</i>	>1024/>1024	256/512	64/128	0,5/0,5	0,25/1	0,015/0,03	FLU/ CET/ ITZ	ANF/ NIS/ MICA
LFBM 902	<i>C. tropicalis</i>	64/512	1024/>1024	64/128	2/4	0,25/0,5	0,25/0,5	FLU/ CET/ ITZ/ MICA	ANF/ NIS
LFBM 3769	<i>C. tropicalis</i>	>1024/>1024	512/1024	64/64	2/4	0,5/0,5	0,25/0,5	FLU/ CET/ ITZ/ MICA	ANF/ NIS
LFBM 11530	<i>C. tropicalis</i>	1024/>1024	512/1024	128/128	0,5/1	0,125/0,25	0,125/0,25	FLU/ CET/ ITZ	ANF/ NIS/ MICA
LFBM 10961	<i>C. krusei</i>	>1024/>1024	256/512	64/128	1/2	0,5/1	0,03/0,06	FLU/ CET/ ITZ	ANF/ NIS/ MICA
LFBM CP*	<i>C. parapsilosis</i>	1024/1024	1024/>1024	128/256	0,5/0,5	0,25/0,5	1/2	FLU/ CET/ ITZ	ANF/ NIS/ MICA
LFBM 90030	<i>C. glabrata</i>	32/128	512/1024	128/256	0,5/0,5	0,25/0,5	<0,03/<0,03	Cepa controle	Cepa controle

Legenda: LFBM – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; CIM – Concentração inibitória mínima; CFM – Concentração fungicida mínima; > - maior que; < - menor que; FLU – Fluconazol; CET – Cetoconazol; ITZ – Itraconazol; TER – Terconazol; ANF – Anfotericina B; MICA – Micafungina; NIS – Nistatina; ^a – perfil de suscetibilidade das espécies de *Candida* realizada pelo método de difusão em meio sólido e pela determinação da CIM. **Fonte:** A autora (2021).

5.2 EFEITO DAS ASSOCIAÇÕES DO LINALOL COM ANTIFÚNGICOS SOBRE ESPÉCIES DE *CANDIDA*

Os valores relacionados aos ensaios da associação *in vitro*, pelo método *checkerboard*, do linalol com fluconazol, cetoconazol, terconazol, itraconazol, micafungina e anfotericina B estão apresentados na Tabela 8.

Um efeito sinérgico das associações do linalol ($\leq \frac{1}{2}$ CIM) com os antifúngicos azólicos foi observado sobre o crescimento de espécies de *Candida* e determinado pelos valores de CIFI que variaram de 0,06 a 0,5 e pela redução dos valores das CIM dos azólicos, os quais variaram de 93,8 % a 99,9 %.

Foram observados percentuais de redução da CIM do linalol quando associados aos azólicos variando de 50,0 a 93,8 %. Assim, tanto o linalol apresentou potencial para reduzir a CIM do fluconazol, cetoconazol, itraconazol e terconazol, como também estes antifúngicos apresentaram potencial de reduzir a CIM do linalol.

A maioria das cepas ensaiadas apresentou reversão da resistência ao fluconazol, cetoconazol e itraconazol pela associação com o linalol em concentrações sub-inibitórias, com destaque para a associação do linalol-fluconazol, uma vez que todas as cepas ensaiadas apresentaram reversão a sensibilidade a este antifúngico quando em associação com o linalol. Tanto as cepas de *C. albicans* como as cepas de *C. não-albicans* apresentaram perfil de resistência aos azólicos testados, tendo perfil modificado para dose-dependente ou sensíveis a esses antifúngicos diante da presença de concentrações sub-inibitórias do linalol.

Tabela 8 – Associação linalol-antifúngicos sobre espécies de *Candida*

Espécies de <i>Candida</i>	Associação	CIM individual (µg/mL)	CIM na associação (µg/mL)	CIF Individual	CIFi	Interpretação do efeito	% Redução de CIM
<i>C. albicans</i> LFBM C2	Linalol/FLU	1024/1024	512/2	0,5/0,002	0,50*	Sinérgico	50,0/99,8
	Linalol/CET	1024/512	64/0,25	0,0625/0,0005	0,06*	Sinérgico	93,8/99,9
	Linalol/TER	1024/128	128/0,5	0,125/0,005	0,13	Sinérgico	87,5/99,6
	Linalol/ITZ	1024/0,5	256/0,031	0,25/0,0625	0,31*	Sinérgico	75,0/93,8
	Linalol/MICA	1024/0,03	32/0,0038	0,0313/0,133	0,16	Sinérgico	96,9/87,3
	Linalol/ANFB	1024/0,25	32/0,125	0,0313/0,5	0,53	Aditivo	96,9/50,0
<i>C. albicans</i> LFBM C3	Linalol/FLU	1024/1024	256/2	0,25/0,002	0,25*	Sinérgico	75,0/99,8
	Linalol/CET	1024/256	64/0,25	0,0625/0,001	0,06*	Sinérgico	93,8/99,9
	Linalol/TER	1024/128	256/0,125	0,25/0,001	0,25	Sinérgico	75,0/99,9
	Linalol/ITZ	1024/0,5	256/0,031	0,25/0,0625	0,31*	Sinérgico	75,0/93,8
	Linalol/MICA	1024/0,03	32/0,0038	0,03125/0,127	0,16	Sinérgico	96,9/87,3
	Linalol/ANFB	1024/0,25	32/0,125	0,03125/0,5	0,53	Aditivo	96,9/50,0
<i>C. albicans</i> LFBM C4	Linalol/FLU	1024/1024	64/2	0,0625/0,002	0,06*	Sinérgico	93,8/99,8
	Linalol/CET	1024/1024	64/0,5	0,0625/0,0005	0,06	Sinérgico	93,8/99,9
	Linalol/TER	1024/128	256/0,125	0,25/0,001	0,25	Sinérgico	75,0/99,9
	Linalol/ITZ	1024/2	256/0,031	0,25/0,0156	0,27*	Sinérgico	75,0/98,5
	Linalol/MICA	1024/0,03	32/0,0075	0,03125/0,25	0,28	Sinérgico	96,9/75,0
	Linalol/ANFB	1024/0,5	32/0,125	0,03125/0,25	0,28	Sinérgico	96,9/75,0

C. albicans LFBM 1004	Linalol/FLU	1024/1024	64/2	0,0625/0,002	0,06*	Sinérgico	93,8/99,8
	Linalol/CET	1024/256	256/1	0,25/0,004	0,25	Sinérgico	75,0/99,6
	Linalol/TER	1024/128	256/0,125	0,25/0,001	0,25	Sinérgico	75,0/99,9
	Linalol/ITZ	1024/2	256/0,031	0,25/0,0156	0,27*	Sinérgico	75,0/98,5
	Linalol/MICA	1024/0,03	32/0,002	0,03125/0,0666	0,10	Sinérgico	96,9/93,3
	Linalol/ANFB	1024/0,125	512/0,0625	0,5/0,5	1,00	Aditivo	50,0/50,0
C. albicans LFBM C8	Linalol/FLU	1024/1024	512/1	0,5/0,001	0,50*	Sinérgico	50,0/99,9
	Linalol/CET	1024/1024	128/0,25	0,125/0,0002	0,13*	Sinérgico	87,5/99,9
	Linalol/TER	1024/128	128/0,125	0,125/0,001	0,13	Sinérgico	87,5/99,9
	Linalol/ITZ	1024/0,5	256/0,031	0,25/0,0625	0,31*	Sinérgico	75,0/93,8
	Linalol/MICA	1024/0,03	32/0,0038	0,03125/0,1266	0,16	Sinérgico	96,9/87,3
	Linalol/ANFB	1024/0,25	32/0,0625	0,03125/0,25	0,28	Sinérgico	96,9/75,0
C. albicans LFBM AM14	Linalol/FLU	1024/1024	512/4	0,5/0,004	0,50*	Sinérgico	50,0/99,6
	Linalol/CET	1024/512	512/0,25	0,5/0,0005	0,50*	Sinérgico	50,0/99,9
	Linalol/TER	1024/128	128/0,125	0,125/0,001	0,13	Sinérgico	87,5/99,9
	Linalol/ITZ	1024/2	256/0,031	0,25/0,0156	0,27*	Sinérgico	75,0/98,5
	Linalol/MICA	1024/0,03	32/0,0038	0,03125/0,1266	0,16	Sinérgico	96,9/87,3
	Linalol/ANFB	1024/0,5	32/0,125	0,03125/0,25	0,28	Sinérgico	96,9/75,0
C. albicans LFBM Ca*	Linalol/FLU	1024/1024	128/2	0,125/0,002	0,13*	Sinérgico	87,5/99,8
	Linalol/CET	1024/512	256/16	0,25/0,0313	0,28	Sinérgico	75,0/96,9
	Linalol/TER	1024/64	128/0,125	0,125/0,002	0,13	Sinérgico	87,5/99,8
	Linalol/ITZ	1024/0,5	256/0,031	0,25/0,0625	0,31*	Sinérgico	75,0/93,8
	Linalol/MICA	1024/0,03	32/0,002	0,03125/0,0666	0,10	Sinérgico	96,9/93,3
	Linalol/ANFB	1024/0,125	16/0,0625	0,0156/0,5	0,51	Aditivo	98,4/50,0

C. albicans LFBM 04a	Linalol/FLU	1024/1024	512/1	0,5/0,001	0,50*	Sinérgico	50,0/99,9
	Linalol/CET	1024/256	64/0,25	0,0625/0,001	0,06*	Sinérgico	93,8/99,9
	Linalol/TER	1024/64	128/0,125	0,125/0,002	0,13	Sinérgico	87,5/99,8
	Linalol/ITZ	1024/0,5	256/0,031	0,25/0,0625	0,31*	Sinérgico	75,0/93,8
	Linalol/MICA	1024/0,03	32/0,0038	0,03125/0,1266	0,16	Sinérgico	96,9/87,3
	Linalol/ANFB	1024/0,125	256/0,031	0,25/0,248	0,49	Sinérgico	75,0/75,2
C. glabrata LFBM AM01	Linalol/FLU	1024/1024	256/4	0,25/0,004	0,25*	Sinérgico	75,0/99,6
	Linalol/CET	1024/1024	128/0,5	0,125/0,0005	0,13	Sinérgico	87,5/99,9
	Linalol/TER	1024/128	256/0,125	0,25/0,001	0,25	Sinérgico	75,0/99,9
	Linalol/ITZ	1024/0,5	256/0,031	0,25/0,0625	0,31*	Sinérgico	75,0/93,8
	Linalol/MICA	1024/1	512/0,5	0,5/0,5	1,00*	Aditivo	50,0/50,0
	Linalol/ANFB	1024/0,25	32/0,0625	0,03125/0,25	0,28	Sinérgico	96,9/75,0
C. glabrata LFBM 04b	Linalol/FLU	512/1024	256/2	0,5/0,002	0,50*	Sinérgico	50,0/99,8
	Linalol/CET	512/1024	64/0,25	0,125/0,0002	0,13*	Sinérgico	87,5/99,9
	Linalol/TER	512/128	128/0,125	0,125/0,001	0,13	Sinérgico	75,0/99,9
	Linalol/ITZ	512/0,5	128/0,031	0,25/0,0625	0,31*	Sinérgico	75,0/93,8
	Linalol/MICA	512/1	32/0,25	0,0625/0,25	0,31*	Sinérgico	93,7/75,0
	Linalol/ANFB	512/0,5	32/0,0625	0,0625/0,125	0,19	Sinérgico	93,7/87,5
C. glabrata LFBM C6	Linalol/FLU	1024/1024	256/2	0,25/0,002	0,25*	Sinérgico	75,0/99,8
	Linalol/CET	1024/1024	64/0,25	0,0625/0,0002	0,06*	Sinérgico	93,8/99,9
	Linalol/TER	1024/128	128/0,125	0,125/0,001	0,13	Sinérgico	87,5/99,9
	Linalol/ITZ	1024/0,5	256/0,031	0,25/0,0625	0,31*	Sinérgico	75,0/93,8
	Linalol/MICA	1024/1	32/0,25	0,03125/0,25	0,28*	Sinérgico	96,9/75,0
	Linalol/ANFB	1024/0,125	32/0,031	0,03125/0,248	0,28	Sinérgico	96,9/75,2

C. tropicalis LFBM 3769	Linalol/FLU	1024/1024	512/2	0,5/0,002	0,50*	Sinérgico	50,0/99,8
	Linalol/CET	1024/512	64/0,25	0,0625/0,0005	0,06*	Sinérgico	93,8/99,9
	Linalol/TER	1024/64	128/0,125	0,125/0,002	0,13	Sinérgico	87,5/99,8
	Linalol/ITZ	1024/2	256/0,031	0,25/0,0156	0,27*	Sinérgico	75,0/98,5
	Linalol/MICA	1024/0,25	256/0,0038	0,25/0,0152	0,27*	Sinérgico	75,0/98,5
	Linalol/ANFB	1024/0,5	32/0,125	0,03125/0,25	0,28	Sinérgico	96,9/75,0
C. tropicalis LFBM 11530	Linalol/FLU	1024/1024	256/1	0,25/0,001	0,25*	Sinérgico	75,0/99,9
	Linalol/CET	1024/512	64/0,25	0,0625/0,0005	0,06*	Sinérgico	93,8/99,9
	Linalol/TER	1024/128	64/0,125	0,0625/0,001	0,06	Sinérgico	93,8/99,9
	Linalol/ITZ	1024/0,5	256/0,031	0,25/0,0625	0,31*	Sinérgico	75,0/93,8
	Linalol/MICA	1024/0,125	32/0,0156	0,03125/0,1248	0,16	Sinérgico	96,9/87,5
	Linalol/ANFB	1024/0,125	32/0,0156	0,03125/0,1248	0,16	Sinérgico	96,9/87,5
C. parapsilosis LFBM CP*	Linalol/FLU	512/1024	256/1	0,5/0,001	0,50*	Sinérgico	50,0/99,9
	Linalol/CET	512/1024	64/0,25	0,125/0,0002	0,13*	Sinérgico	87,5/99,9
	Linalol/TER	512/128	128/0,125	0,125/0,001	0,13	Sinérgico	75,0/99,9
	Linalol/ITZ	512/0,5	128/0,0156	0,25/0,0313	0,28*	Sinérgico	75,0/96,9
	Linalol/MICA	512/1	32/0,25	0,0625/0,25	0,31	Sinérgico	93,7/75,0
	Linalol/ANFB	512/0,25	32/0,0625	0,0625/0,25	0,31	Sinérgico	93,7/75,0
C. krusei LFBM 10961	Linalol/FLU	1024/1024	256/2	0,25/0,002	0,25*	Sinérgico	75,0/99,8
	Linalol/CET	1024/256	64/2	0,0625/0,008	0,07*	Sinérgico	93,8/99,2
	Linalol/TER	1024/64	128/0,25	0,125/0,004	0,13	Sinérgico	87,5/99,6
	Linalol/ITZ	1024/1	32/0,002	0,03125/0,002	0,03*	Sinérgico	96,9/99,8
	Linalol/MICA	1024/0,03	32/0,0038	0,03125/0,126	0,16	Sinérgico	96,9/87,3
	Linalol/ANFB	1024/0,5	512/0,25	0,5/0,5	1,00	Aditivo	50,0/50,0

<i>C. glabrata</i> ATCC 90300	Linalol/FLU	512/32	32/1	0,0625/0,001	0,06	Sinérgico	93,8/96,9
	Linalol/CET	512/512	32/0,5	0,0625/0,005	0,06	Sinérgico	93,8/99,9
	Linalol/TER	512/128	256/0,125	0,25/0,001	0,25	Sinérgico	50,0/99,9
	Linalol/ITZ	512/0,5	128/0,0156	0,25/0,0313	0,28	Sinérgico	75,0/96,9
	Linalol/MICA	512/0,03	32/0,015	0,0625/0,5	0,56	Aditivo	96,9/50,0
	Linalol/ANFB	512/0,25	32/0,0625	0,0625/0,25	0,31	Sinérgico	96,9/75,0

Legenda: LFBM – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; CIM – Concentração inibitória mínima; CFM – Concentração fungicida mínima; FLU – Fluconazol; CET – Cetoconazol; ITZ – Itraconazol; TER – Terconazol; MICA – Micafungina; ANFB – Anfotericina B; CIF – Concentração inibitória fracionada; % - percentual; * - a associação reverteu perfil de resistência para sensibilidade ao antifúngico. **Fonte:** A autora (2021).

Dentre as cepas de *C. albicans*, pode ser destacado um forte sinergismo da associação linalol/fluconazol sobre cepa LFBM AM14. Essa associação apresentou inicialmente uma CIM para o fluconazol de 1.024 µg/mL e em associação com linalol reduziu a CIM para 4 µg/mL, modificando o perfil de uma cepa resistente para uma cepa sensível ao fluconazol (Figura 27A).

As associações linalol-cetoconazol, linalol-terconazol e linalol-itraconazol (Figura 27B, 27C e 27D) também se apresentaram expressivas demonstrando que houve redução da CIM destes antifúngicos, a ponto de reverter a sensibilidade da *C. albicans* LFBM AM14 ao cetoconazol e ao itraconazol.

As cepas de *C. albicans* LFBM C4, LFBM C1004 e LFBM Ca* foram as únicas cepas que não apresentaram reversão da sensibilidade ao cetoconazol, apesar da associação linalol-cetoconazol ser sinérgica. Entretanto, essas cepas de *C. albicans* apresentaram reversão de suas sensibilidades ao fluconazol e ao itraconazol quando esses antifúngicos foram associados ao linalol.

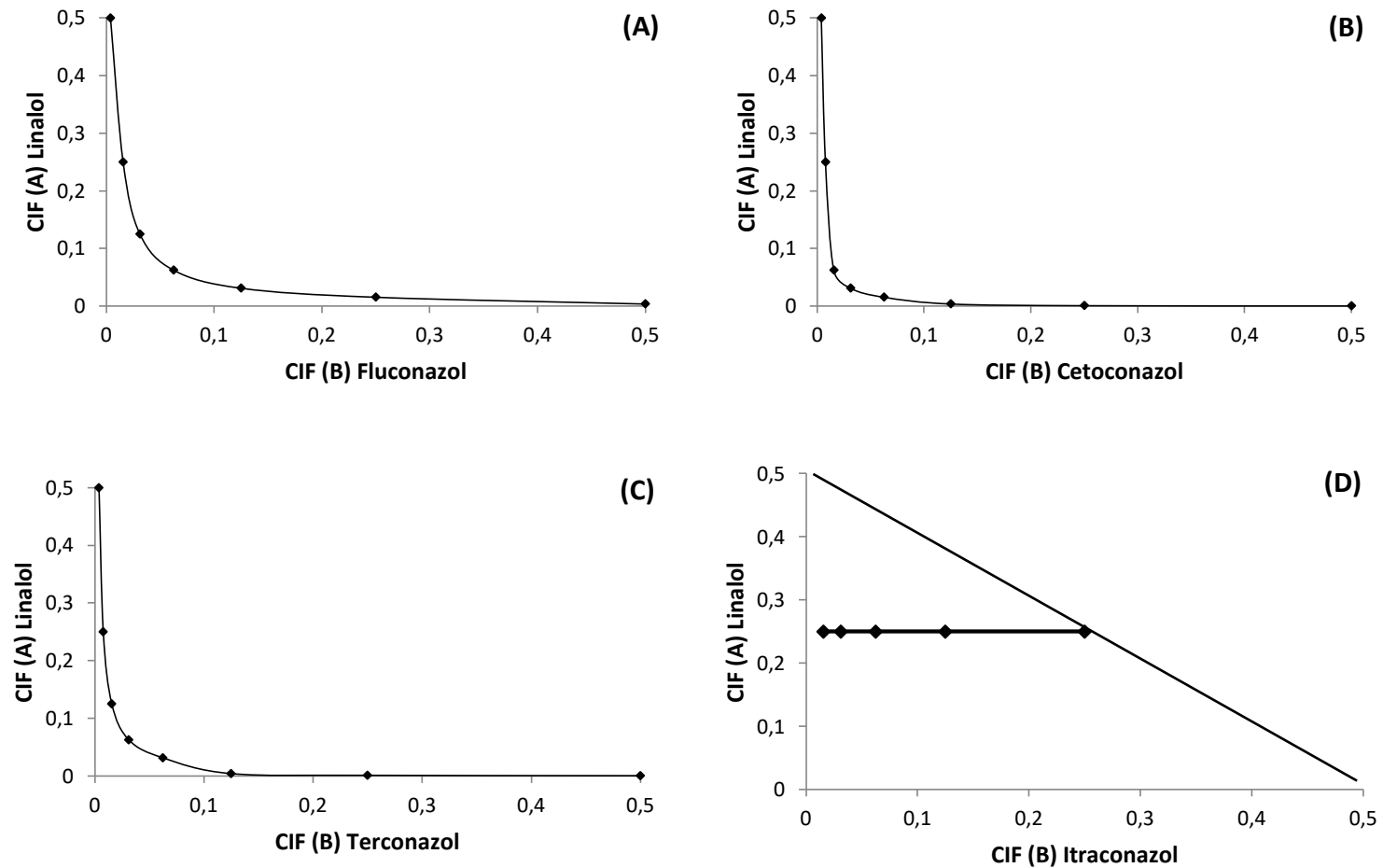
As cepas de *C. glabrata*, apresentaram uma redução nos valores da CIM dos azólicos quando em associação com o linalol. Esta associação foi capaz de reverter sensibilidade destas cepas ao fluconazol, cetoconazol e itraconazol.

A cepa *C. glabrata* ATCC 90030 apresentou redução de CIM dos azólicos 96,9 a 99,9% quando este foi associado ao linalol (Figura 28 A-D). Vale salientar que esta redução foi também observada na CIM do linalol.

Para das espécies de *Candida krusei*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* também foram observadas importantes reduções da CIM dos azólicos, com destaque para o cetoconazol. Todas estas espécies apresentaram reversão do perfil de resistência para sensibilidade, diferentemente das cepas de *C. albicans*, onde em algumas cepas não foi observada reversão da resistência a estes azólicos.

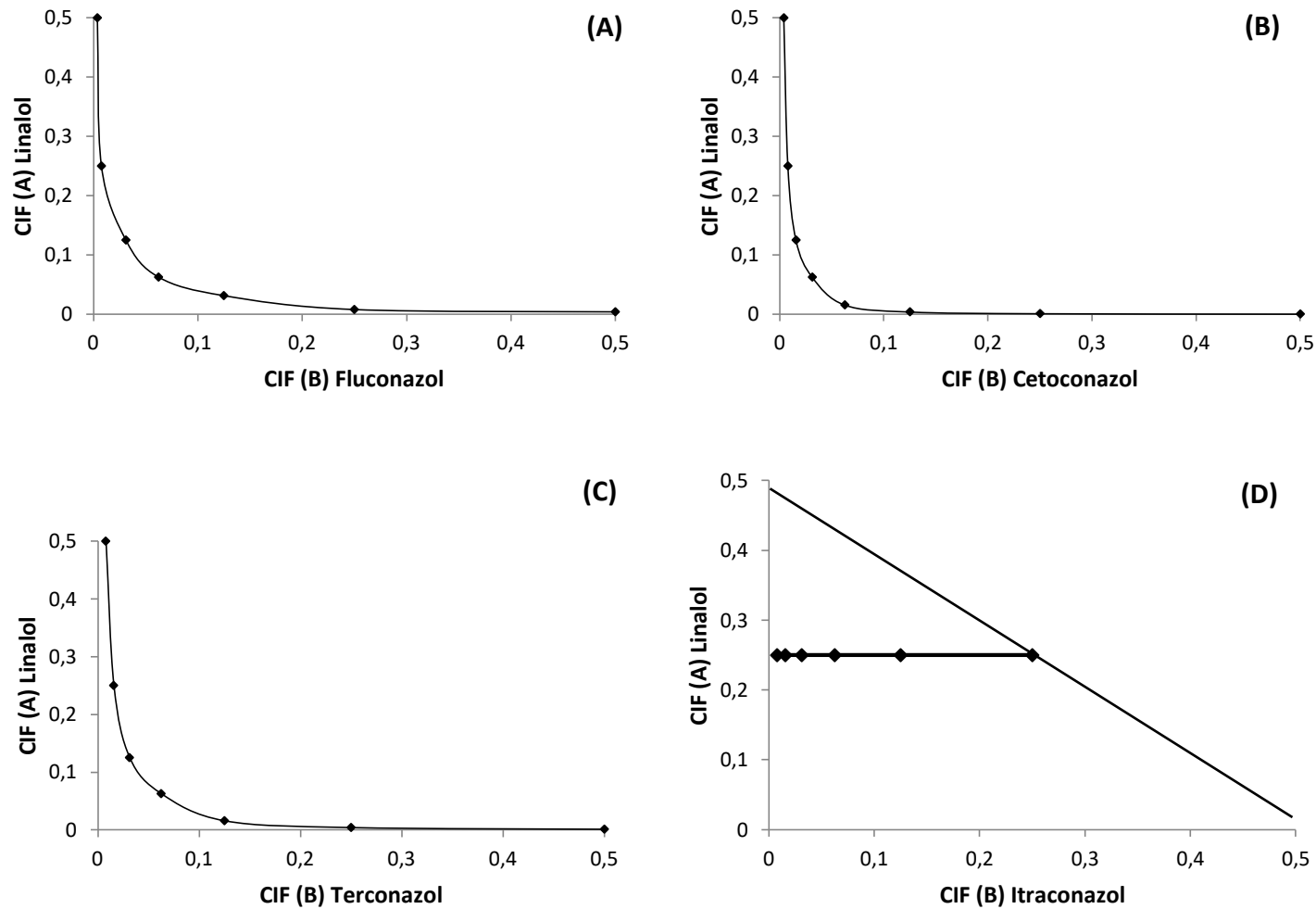
Não foi possível confirmar a reversão da sensibilidade das espécies de *Candida* ao terconazol, uma vez que não existem padrões de comparação nos documentos oficiais como o do CLSI. No entanto foi observada uma redução da CIM inicial do terconazol em associação com linalol de 93,8 a 98,5 % e CIFI que variaram de 0,2656 a 0,3125 indicando sinergismo.

Figura 26 – Isobologramas revelando o efeito sinérgico da associação entre: (A) Linalol e Fluconazol; (B) Linalol e Cetoconazol; (C) Linalol e Terconazol e (D) Linalol e Itraconazol sobre *Candida albicans* LFBM AM14



Legenda: LFBM – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; CIF – Concentração Inibitória Fracionada. Isobologramas plotados utilizando o software Microsoft Excel 2019. **Fonte:** A autora (2021).

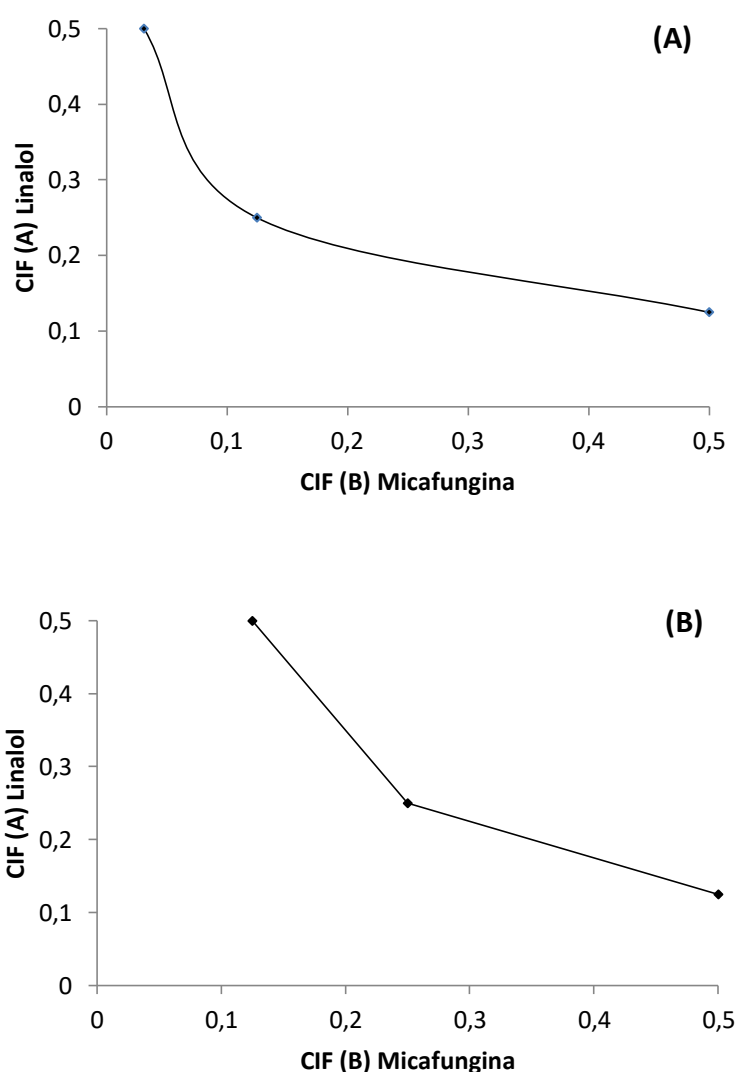
Figura 27 – Isobologramas revelando o efeito sinérgico da associação entre: (A) Linalol e Fluconazol; (B) Linalol e Cetoconazol; (C) Linalol e Terconazol e (D) Linalol e Itraconazol sobre *Candida glabrata* ATCC 90030



Legenda: LFBM – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos. CIF – Concentração Inibitória Fracionada. Isobologramas plotados utilizando o software Microsoft Excel 2019. **Fonte:** A autora (2021).

A associação linalol-micafungina, apresentou resultados promissores. Em concentrações sub-inibitórias esta associação apresentou efeito sinérgico para a grande maioria das espécies de *Candida* avaliadas, com destaque para *Candida albicans* LFBM AM14 (Figura 29 A) e *Candida tropicalis* LFBM 3769 (Figura 29 B). Esta última modificou o perfil de resistência intermediária para sensibilidade.

Figura 28 – Isobologramas revelando o efeito sinérgico da associação entre linalol e micafungina sobre: (A) *Candida albicans* LFBM AM14; (B) *Candida tropicalis* LFBM 3769



Legenda: LFBM – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos. CIF – Concentração Inibitória Fracionada. Isobologramas plotados utilizando o software Microsoft Excel 2019. **Fonte:** A autora (2021).

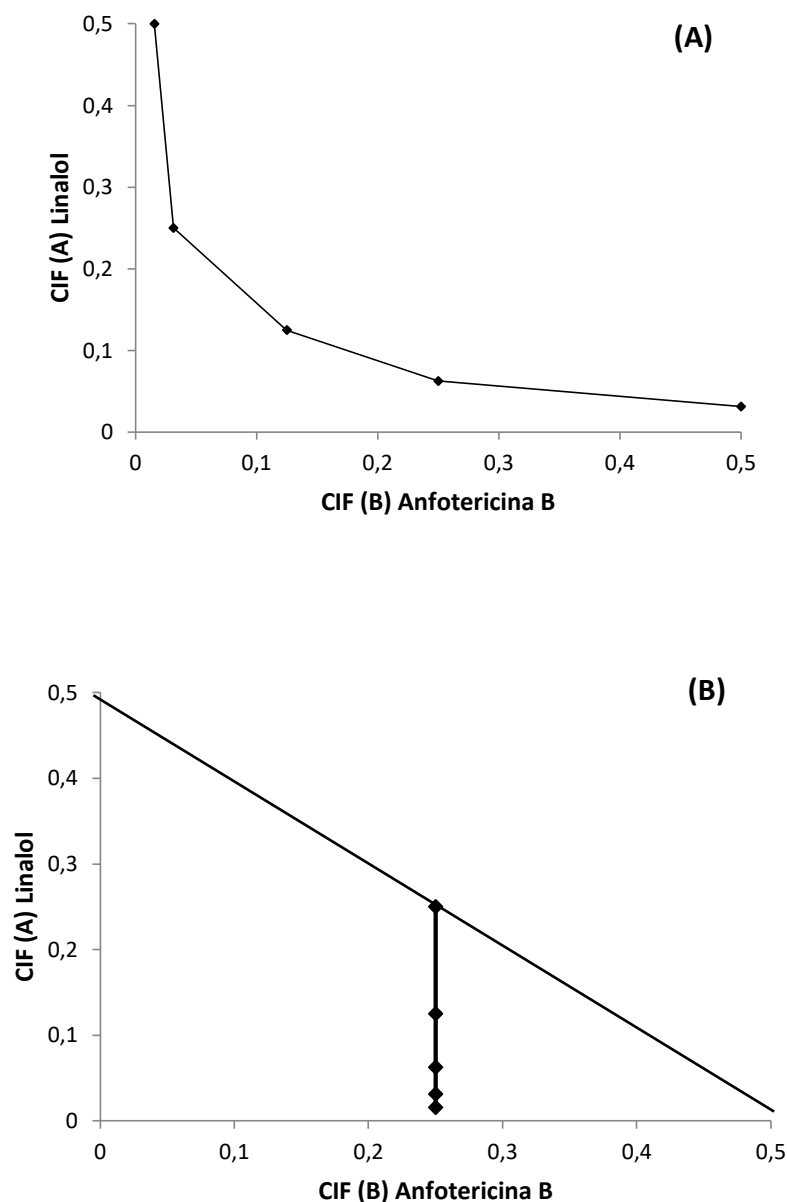
Para as cepas de *C. albicans*, a associação linalol-micafungina se apresentou sinérgica para todas as cepas ensaiadas e foi capaz de reduzir a CIM da micafungina em até 93,3 %. Um efeito aditivo foi observado para as cepas de *C. glabrata* LFBM AM01 e ATCC 90030, mas não foi observada a reversão para a sensibilidade a micafungina da cepa LFBM AM01.

Após exposição à associação linalol-micafungina, as espécies *C. glabrata* LFBM 04b e LFBM C6 e *C. tropicalis* LFBM 3769, as quais se apresentaram resistentes ou com resistência intermediária a micafungina tiveram seu perfil modificado para sensível a este antifúngico quando em associação. Para as espécies *C. glabrata* ATCC 90030, *C. krusei* LFBM 10961, *C. tropicalis* LFBM 11530 e *C. parapsilosis* LFBM Cp*, a associação linalol-micafungina foi capaz de reduzir a CIM da micafungina em 50 a 87,5 % e de 93,7 a 96,9% da CIM do linalol.

A associação linalol-anfotericina B mostrou um efeito aditivo frente a cepas *C. albicans* LFBM C2, *C. albicans* LFBM C3, *C. albicans* LFBM 1004, *C. albicans* LFBM Ca* e *C. krusei* LFBM 10961. Quando comparada as demais associações foi a que apresentou um maior número de espécies de *Candida* ensaiadas neste estudo, com este tipo de efeito.

As cepas de *C. albicans* tiveram redução de CIM da anfotericina de 50,0 a 75,2 % quando combinada ao linalol. Metade das cepas desta espécie apresentou efeito sinérgico, enquanto que a outra metade apresentou efeito aditivo. A cepa *C. albicans* LFBM AM14 se destaca dentre as demais cepas, por sua sensibilidade a esta associação, foi observada uma redução da CIM anfotericina B, bem como do linalol, 96,9 e 75 % respectivamente (Figura 30 A).

Figura 29 – Isobologramas revelando o efeito sinérgico da associação entre linalol e anfotericina B sobre: (A) *Candida albicans* LFBM AM14; (B) *Candida glabrata* ATCC 90030



Legenda: LFBM – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; CIF – Concentração Inibitória Fracionada. Isobologramas plotados utilizando o software Microsoft Excel 2019. **Fonte:** A autora (2021).

Assim como as cepas de *Candida albicans*, todas as outras espécies de *Candida* se mostraram sensíveis para a associação linalol-anfotericina B exibindo um efeito sinérgico para a maioria das cepas. Os CIFs para esta associação variaram de 0,16 a 0,31, com redução importante tanto para a CIM da anfotericina B como linalol, destacando *C. glabrata* ATCC 90030 (Figura 30 B). Essa associação mostrou um efeito aditivo sobre a cepa de *Candida krusei* LFPM 10961.

5.3 EFEITO DO LINALOL SOBRE A PAREDE CELULAR DE ESPÉCIES DE *CANDIDA*

A tabela 9 apresenta os resultados expressos em valores de concentração inibitória mínima (CIM) do linalol na presença ou na ausência do sorbitol.

Tabela 9 – Valores da concentração inibitória mínima do linalol na ausência e na presença de sorbitol

<i>Candida</i>	CIM Linalol (µg/mL)	CIM Linalol Sorbitol (µg/mL)	CIM Micafungina (µg/mL)	CIM Micafungina Sorbitol (µg/mL)
<i>C. albicans</i> LFBM C2	1024	1024	0,03	0,06
<i>C. albicans</i> LFBM C3	1024	1024	0,03	0,06
<i>C. albicans</i> LFBM C4	1024	1024	0,03	>0,24
<i>C. albicans</i> LFBM 1004	1024	1024	0,03	0,06
<i>C. albicans</i> LFBM 08	1024	1024	0,03	0,06
<i>C. albicans</i> LFBM AM14	1024	1024	0,03	0,06
<i>C. albicans</i> LFBM Ca*	1024	1024	0,03	0,06
<i>C. albicans</i> LFBM 04A	1024	1024	0,03	0,06
<i>C. glabrata</i> LFBM C1	1024	1024	1	2
<i>C. glabrata</i> LFBM AM01	1024	1024	1	2
<i>C. glabrata</i> LFBM 04B	512	512	1	2
<i>C. glabrata</i> LFBM CA06	1024	1024	1	2
<i>C. tropicalis</i> LFBM AM07	1024	1024	1	2
<i>C. glabrata</i> LFBM CASi	512	512	0,5	1
<i>C. glabrata</i> LFBM AM15	512	512	0,015	>0,24
<i>C. tropicalis</i> LFBM 902	1024	1024	0,25	0,5
<i>C. tropicalis</i> LFBM 3769	1024	1024	0,25	4
<i>C. tropicalis</i> LFBM 11530	1024	1024	0,125	4
<i>C. krusei</i> LFBM 10961	1024	1024	0,03	0,12
<i>C. parapsilosis</i> LFBM Cp*	512	512	1	2
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	512	512	<0,03	>0,24

Legenda: LFBM – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; CIM – Concentração Inibitória Mínima. **Fonte:** A autora (2021).

Os resultados sugerem que o linalol não tem ação sobre a parede celular das espécies de *Candida*, o que foi evidenciado pela ausência no aumento dos valores da CIM do linalol em presença sorbitol, dessa forma a CIM na ausência e na presença de sorbitol permaneceu com o mesmo valor. No controle positivo micafungina, que é conhecido por sua ação sobre parede celular dos fungos, apresentou aumento dos valores da CIM na presença de sorbitol.

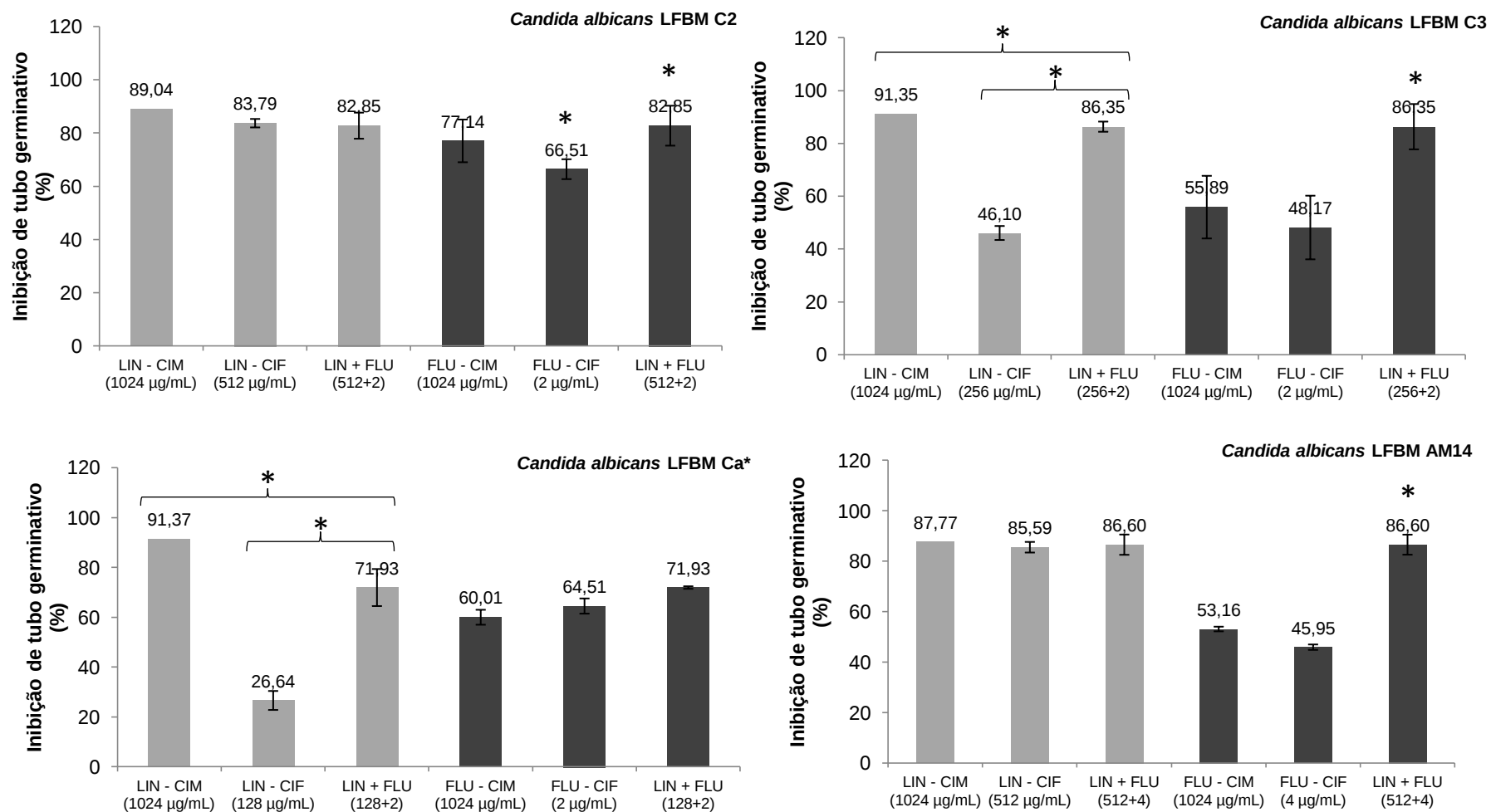
5.4 INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE TUBO GERMINATIVO DE CEPAS DE *CANDIDA ALBICANS* PELA AÇÃO DO LINALOL E SUAS ASSOCIAÇÕES COM ANTIFÚNGICOS

A atividade do linalol e de suas associações sobre a formação do tubo germinativo (TG) de *Candida albicans* estão apresentados nas figuras 31, 32 e 33.

O linalol na CIM foi capaz de inibir a formação de TG de todas as cepas de *C. albicans* cujo percentual de inibição foi de 89,0 a 98,5 %. Em concentrações sub-inibitórias e equivalentes a Concentração Inibitória Fracionada (CIF), o linalol foi também capaz de inibir a formação de TG e essa inibição variou de acordo com a cepa de *Candida albicans* avaliada (16,7 a 85,5 %).

Foi possível observar que quando a concentração de CIM e CIF do linalol eram próximas, como nas cepas LFBM C2 e LFBM AM14, onde a CIM foi de 1.024 µg/mL e a CIF de 512 µg/mL, na combinação de linalol e fluconazol (figura 31), não houve diferença estatística do efeito inibitório das duas concentrações utilizadas, demonstrando que a menor concentração (512 µg/mL) é capaz de reduzir a formação de TG igualmente a maior concentração (1.024 µg/mL). Quando as concentrações de CIM e CIF do linalol foram mais distantes entre si, houve diferença estatística indicando que as concentrações de 256, 128 e 32 µg/mL do linalol isolado, não foram tão eficiente na redução da formação de TG como na CIM (1.024 µg/mL), indicado pela diferença na porcentagem de inibição.

Figura 30 – Inibição do tubo germinativo de *Candida albicans* pela ação do linalol e sua associação com fluconazol



Legenda: LFBM – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; CIM – Concentração inibitória mínima; CIF – Concentração inibitória fracionada; FLU – Fluconazol; LIN – Linalol; (*) - existe diferença significativa (p valor < 0,05). **Fonte:** A autora (2021).

Ao comparar os resultados de inibição de TG pelo fluconazol tanto na CIM como na CIF, foi possível observar que não houve diferença entre as concentrações, mesmo a CIM (1.024 µg/mL) e a CIF (2 a 4 µg/mL), além disso, ao comparar a inibição provocada pelas concentrações do fluconazol com as concentrações de linalol na CIM, o linalol apresentou ser mais eficaz na inibição da formação de TG (Figura 31).

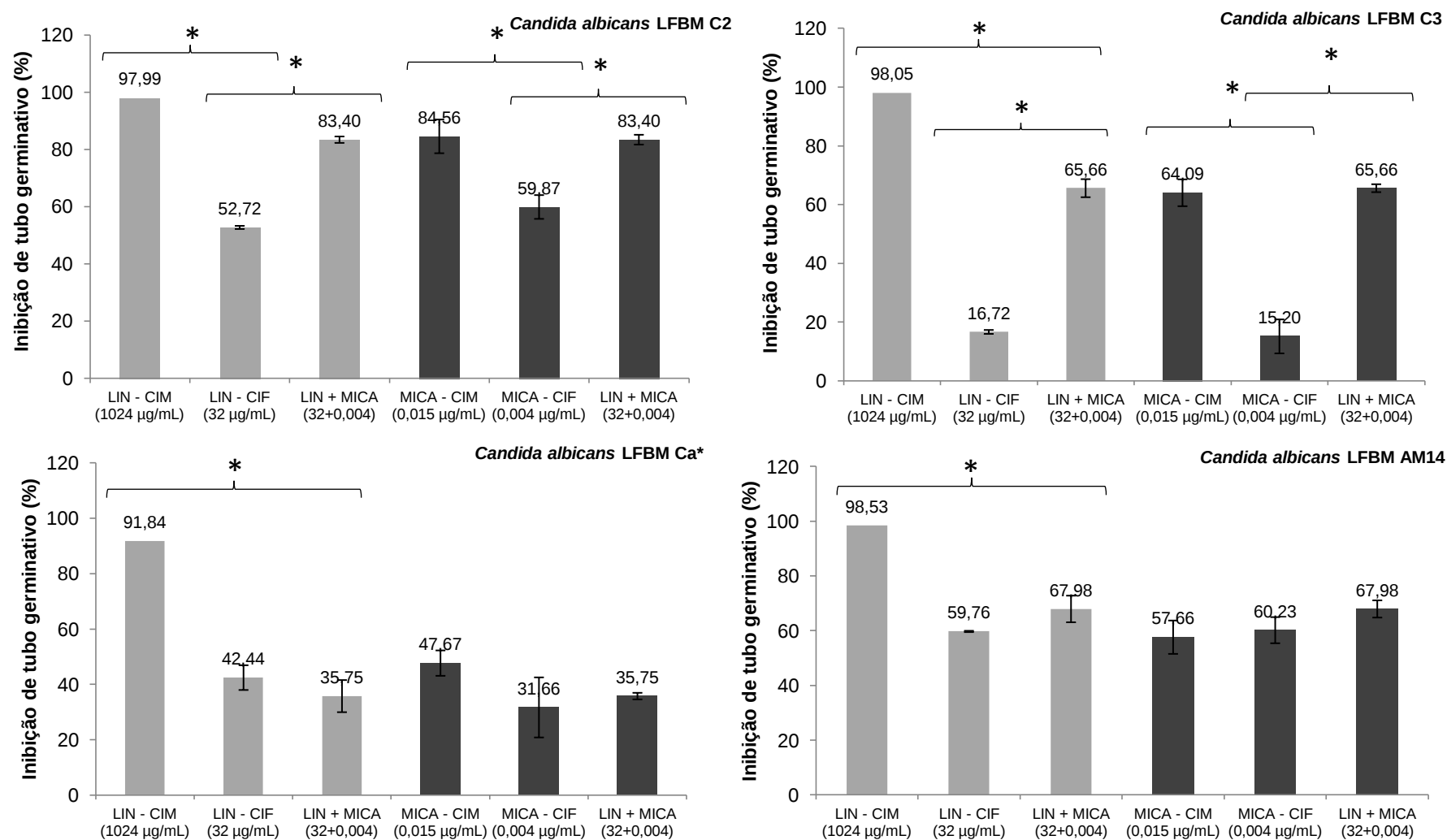
Para as cepas LFBM C2 e LFBM AM14, as associações de linalol-fluconazol, na CIF, não apresentaram diferença estatística quando comparada com a inibição da CIM do linalol, indicando que as associações em concentrações menores promovem o mesmo efeito do linalol numa concentração maior.

As cepas LFBM C3 e LFBM Ca* não tiveram este mesmo comportamento, porém apesar de apresentarem diferenças entre as porcentagens de inibição do linalol e do linalol em associação com o fluconazol, foi possível verificar que em concentrações sub-inibitórias a associação foi capaz de reduzir entre 71,9 a 86,3 % a formação de TG.

A inibição de TG de *C. albicans*, provocada pela ação do fluconazol na CIM e CIF, comparada com a inibição da associação de linalol e fluconazol em concentrações sub-inibitórias, indicam que para todas as cepas houve uma maior porcentagem de inibição promovida pela associação quando comparada com a inibição observada pela ação do fluconazol não associado. Os resultados são promissores uma vez que indicam que, a associação linalol e fluconazol é eficaz na redução da formação de TG de *C. albicans* em concentrações sub-inibitórias.

As associações de linalol-micafungina apresentaram inibição de TG variando de 35,7 a 83,4 % (Figura 32), sendo que diante da maioria das cepas a porcentagem de inibição das associações e do linalol apresentou diferença estatística entre os tratamentos, porém apesar das associações apresentarem menor porcentagem de inibição em comparação com o efeito causado pelo linalol (1.024 µg/mL), ainda assim a associação linalol e micafungina apresenta efeito de inibição de TG de *C. albicans* diante das cepas testadas.

Figura 31 – Inibição do tubo germinativo de *Candida albicans* pela ação do linalol e sua associação com micafungina



Legenda: LFBM – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; CIM – Concentração inibitória mínima; CIF – Concentração inibitória fracionada; MICA - Micafungina; LIN – Linalol; (*) - existe diferença significativa (p valor < 0,05). **Fonte:** A autora (2021).

O linalol em concentração menor (32 µg/mL) apresentou menor percentual de inibição de TG do que a associação de linalol e micafungina (32 µg/mL + 0,004 µg/mL) indicando que a micafungina potencializa a ação do linalol, bem como o linalol potencializa a ação de inibição da micafungina, para metade das cepas ensaiadas. Para as demais cepas não houve diferença estatística entre o efeito de inibição do linalol isolado na CIF com a inibição provocada pela associação.

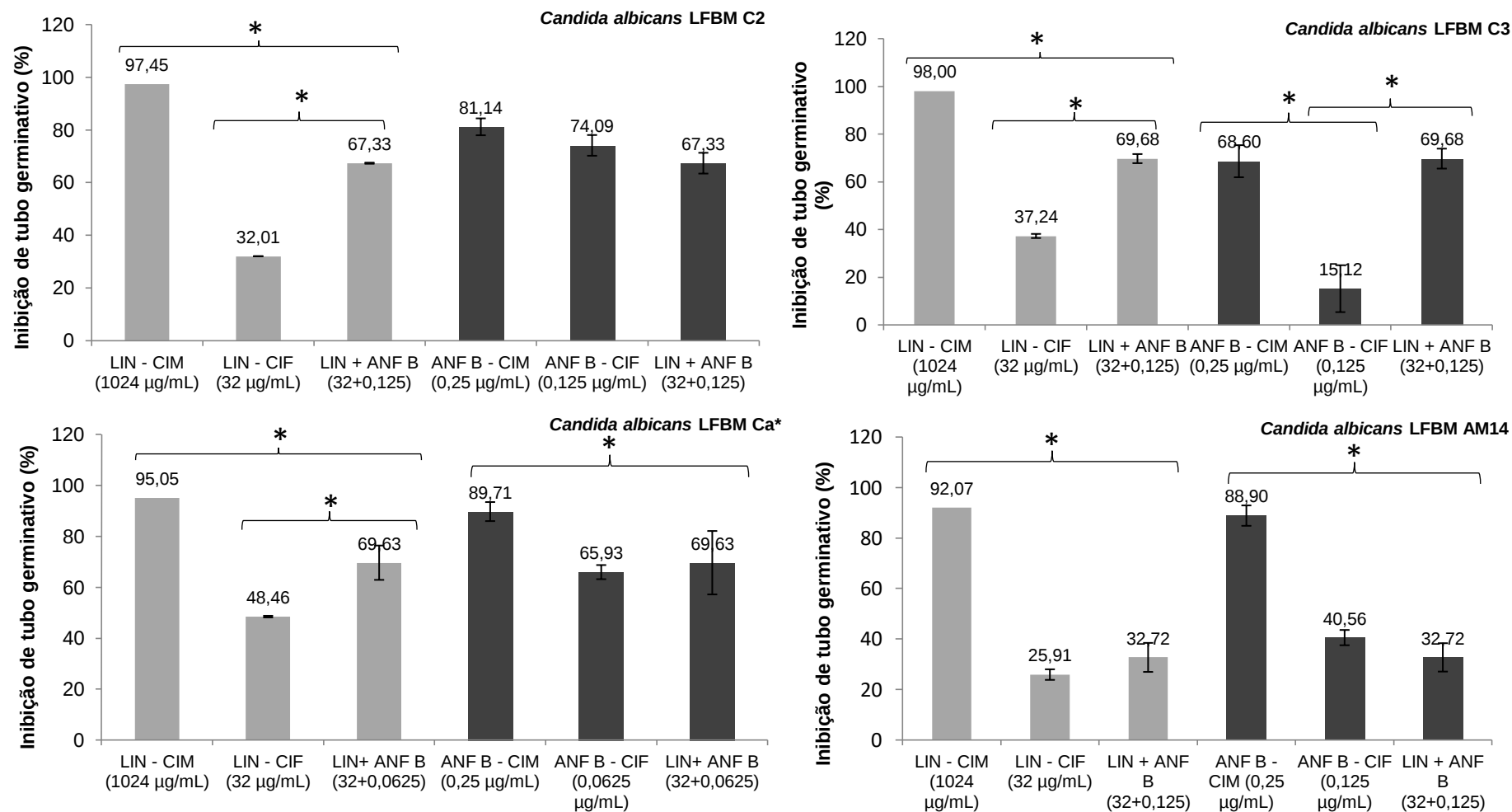
A micafungina na CIM (0,015 µg/mL) induziu a inibição do TG sobre todas as cepas de *Candida albicans* (percentual de inibição variando de 47,67 a 84,56 %) e quando este percentual foi comparado a associação linalol-micafungina, em concentrações sub-inibitórias, não foi observada diferença estatística ($p < 0,05$, Figura 32). Dessa forma, pode-se sugerir que a associação linalol-micafungina, em concentrações sub-inibitórias, promove efeito de inibição de TG comparável ao linalol e a micafungina avaliados isoladamente e em concentrações mais elevadas.

Comparando o efeito de inibição da micafungina na CIM (0,015 µg/mL) e na CIF (0,004 µg/mL), foi possível observar que para as cepas LFBM C2 e LFBM C3, a maior concentração (0,015 µg/mL) foi capaz de promover um maior efeito de inibição do TG, quando comparado com a menor concentração (0,004 µg/mL), este efeito não foi observado para as cepas LFBM AM14 e LFBM Ca*, já que o efeito destas concentrações não tiveram diferenças estatísticas entre si ($p > 0,05$), indicando que promovem o mesmo efeito de inibição de TG.

Para a associação linalol-anfotericina B, observou-se que para a metade das cepas ensaiadas, a anfotericina B na CIM apresenta o mesmo efeito de inibição que a associação com linalol em concentrações sub-inibitórias (Figura 33), sendo que o efeito da associação na inibição do TG de *C. albicans* variou de 32,7 a 69,6 %.

Observando o efeito do linalol na CIM (1.024 µg/mL) em comparação com a associação de linalol-anfotericina B em concentrações sub-inibitórias, verificou-se que diante de todas as cepas testadas, o linalol é capaz de inibir o TG em maior percentual do que a associação de linalol-anfotericina B, porém apesar de apresentar um menor percentual de inibição, a associação ainda demonstrou ser também eficaz na redução do TG.

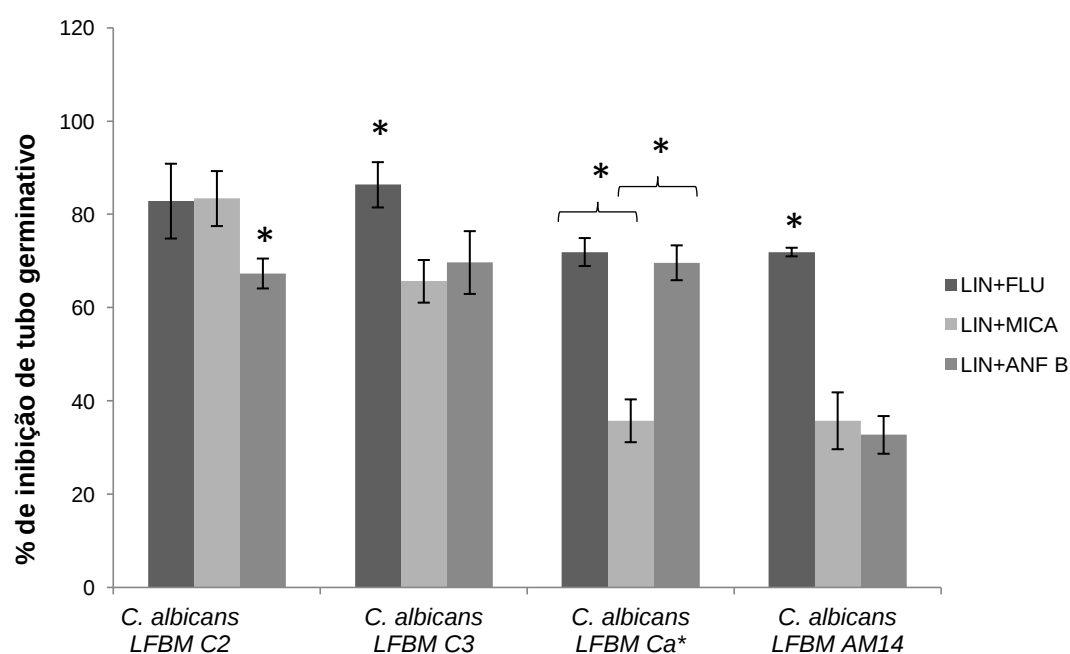
Figura 32 – Inibição do tubo germinativo de *Candida albicans* pela ação do linalol e sua associação com anfotericina B



Legenda: LFBM – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; CIM – Concentração inibitória mínima; CIF – Concentração inibitória fracionada; ANF B – Anfotericina B; LIN – Linalol; (*) - existe diferença significativa (p valor < 0,05). **Fonte:** A autora (2021).

A figura 34 apresenta os resultados de inibição do TG de *Candida albicans* após exposição as associações do linalol-fluconazol, linalol-micafungina e linalol-anfotericina B. Quando comparadas entre si, estas associações mostraram diferença significativa na inibição do TG, com destaque para as associações linalol-fluconazol, cujos percentuais de inibição foram acima de 70 %.

Figura 33 – Inibição de tubo germinativo entre as associações de linalol com fluconazol, micafungina e anfotericina B



Legenda: LFBM – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; FLU - Fluconazol; MICA – Micafungina; ANF B – Anfotericina B; LIN – Linalol; (*) - existe diferença significativa (p valor < 0,05). **Fonte:** A autora (2021).

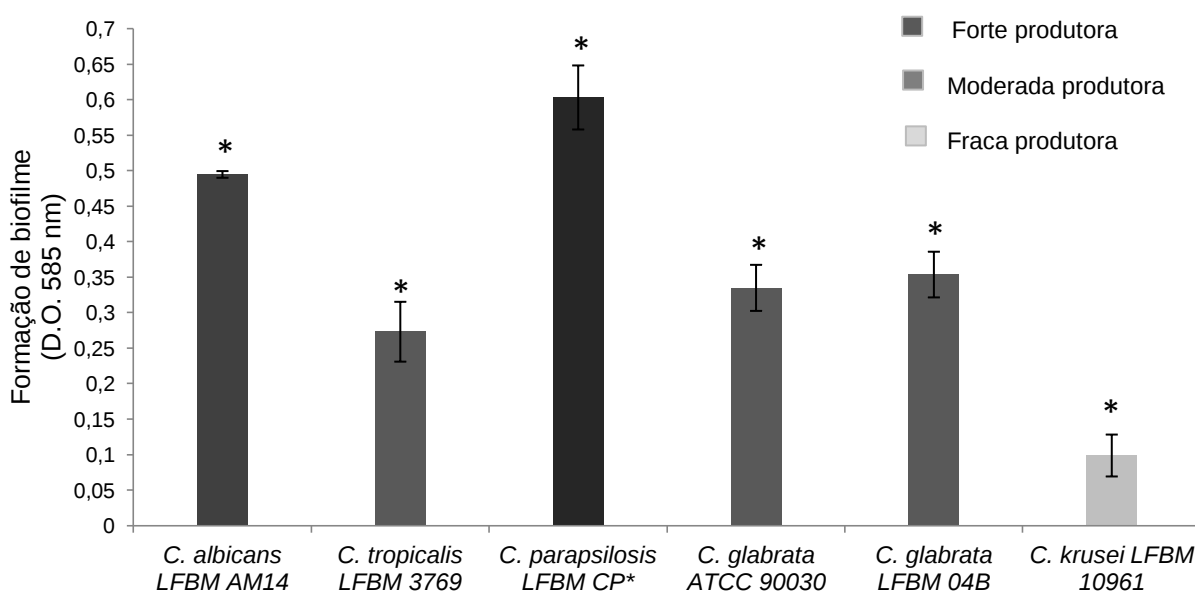
5.5 FORMAÇÃO DE BIOFILME DE ESPÉCIES DE *CANDIDA*

Todas as seis espécies de *Candida* testadas nesta etapa (*C. albicans* LFBM AM14, *C. tropicalis* LFBM 3769, *C. parapsilosis* LFBM CP*, *C. glabrata* LFBM 04B, *C. glabrata* ATCC 90030 e *C. krusei* LFBM 10961) foram hábeis em formar biofilmes, embora apresentem diferenças em sua classificação como produtoras, conforme demonstra a figura 35.

As espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis* e as duas cepas de *C. glabrata* se destacaram como fortes produtoras de biofilme. A *C. tropicalis* foi considerada moderada produtora e a *C. krusei* foi classificada como fraca produtora, apresentando os menores valores de D.O_{585nm}.

Quando os valores da D.O_{585nm}, referentes a biomassa dos biofilmes formados foram comparadas com a D.O_{585nm} dos poços sem a presença do inóculo foi observada diferença significativa (Figura 35).

Figura 34 – Formação de biofilmes das espécies de *Candida* expressa pelos valores médios e desvio padrão da leitura da absorbância em 585 nm do cristal violeta



Legenda: LFBM – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; ATCC – American Type Culture Collection; (*) - existe diferença significativa (p valor < 0,05). **Fonte:** A autora (2021).

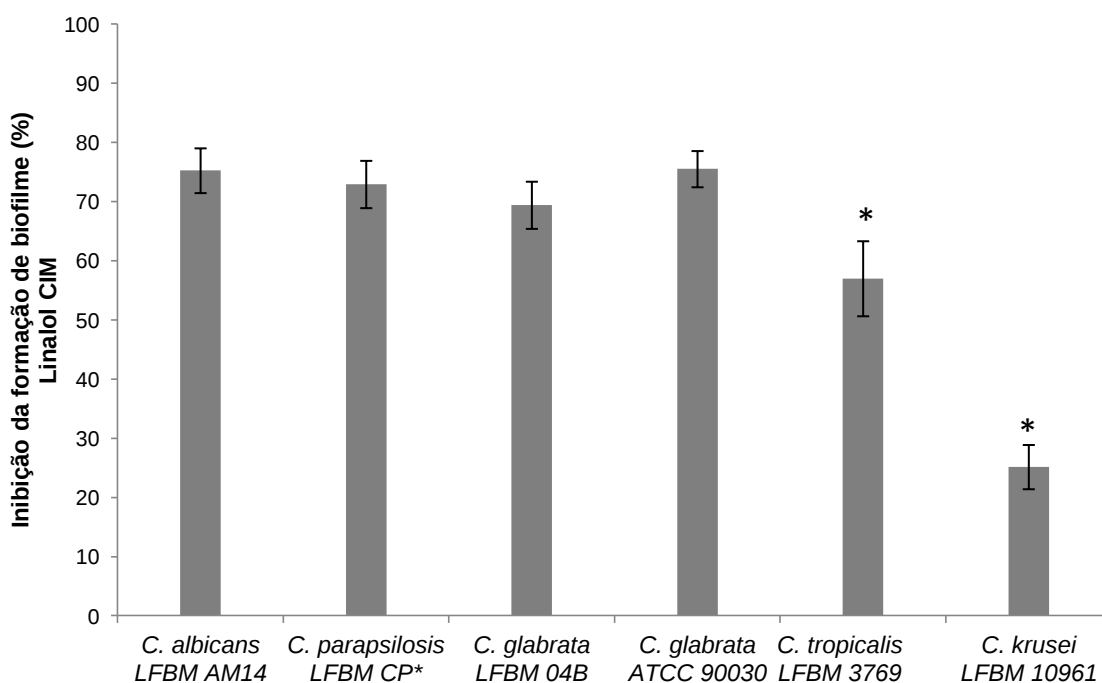
Comparando a D.O_{585nm} da formação de biofilme entre as cepas ensaiadas nesta etapa, observou-se diferença estatística significativa (p valor < 0,05) entre a

maioria das cepas, com exceção para a comparação entre as cepas de *C. glabrata* ATCC 90030 e LFBM 04B, que tiveram resultados estatisticamente iguais (p valor $> 0,05$).

5.6 INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME DE ESPÉCIES DE *CANDIDA* PELA AÇÃO DO LINALOL E SUAS ASSOCIAÇÕES COM ANTIFÚNGICOS

O percentual de inibição na formação dos biofilmes de espécies de *Candida* (*C. albicans* LFBM AM14, *C. parapsilosis* LFBM CP*, *C. glabrata* ATCC 90030 e LFBM 04B, *C. tropicalis* LFBM 3769 e *C. krusei* LFBM 10961) após exposição ao linalol em concentrações iguais a CIM estão apresentados na figura 36.

Figura 35 – Inibição da formação de biofilme pelo linalol sobre espécies de *Candida*



Legenda: LFBM – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; ATCC – American Type Culture Collection; (%) – porcentagem; (*) - existe diferença significativa (p valor $< 0,05$). **Fonte:** A autora (2021).

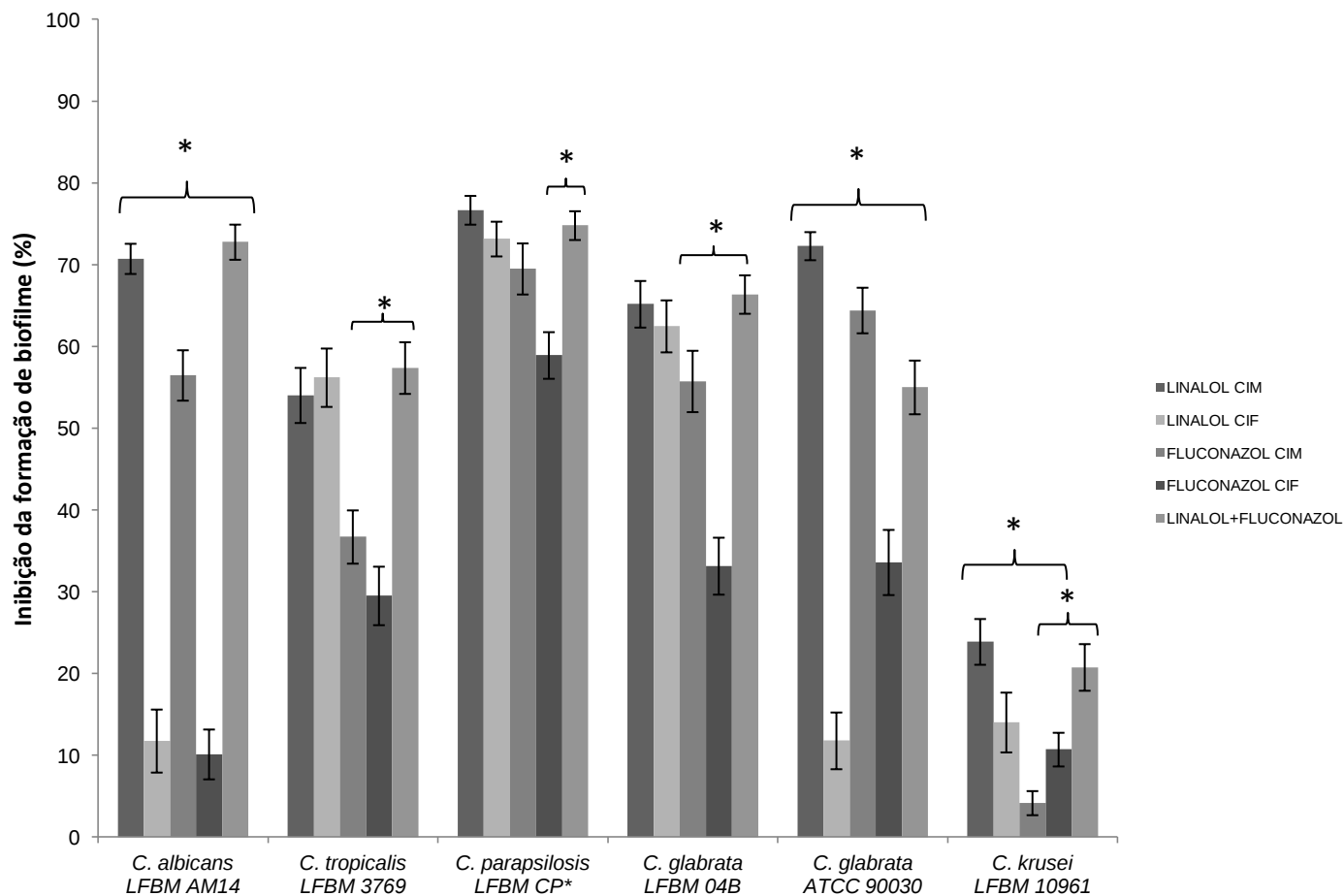
O linalol na CIM foi capaz de inibir a formação de biofilme das espécies de *Candida* ensaiadas entre 25 a 75 %. A inibição de formação de biofilme pela ação do linalol diante da cepa de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e das duas cepas de *C. glabrata* tiveram resultados estatisticamente semelhantes, indicando que o linalol na CIM age da mesma forma diante das cepas destas espécies, onde o linalol foi capaz

de inibir a formação de biofilme acima de 70 %. Diante das cepas *C. tropicalis* e *C. krusei*, os resultados de inibição foram diferentes estatisticamente entre si, bem como das demais cepas, indicando que o tratamento com linalol na CIM foi capaz de promover uma menor inibição da formação de biofilme, sendo a menor inibição encontrada para a cepa *C. krusei* que foi de cerca de 25 %.

A associação linalol-fluconazol em concentrações sub-inibitórias foi capaz de inibir a formação de biofilme em 21 a 73 % (figura 37). Esta associação foi mais eficaz na inibição da formação de biofilme de *Candida albicans* quando comparadas as demais espécies. De todas as espécies, o biofilme de *Candida krusei* mostrou ser o mais resistente a ação do linalol associado ao fluconazol.

Para a maioria das cepas de *Candida* ensaiadas, os resultados demonstraram que os tratamentos com o fluconazol isolado na concentração da CIM como da CIF não foram eficazes na inibição dos seus biofilmes quando estes foram comparados a sua associação com o linalol, apenas para a cepa *C. glabrata* ATCC 90030, que o fluconazol na CIM foi capaz de inibir em maior porcentagem a formação de biofilme quando comparado com a associação. Os biofilmes de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* LFBM 04B foram inibidos de forma semelhante pelo linalol na CIM ou por sua associação com o fluconazol. Entretanto, quando o linalol foi utilizado na CIF, esse composto foi eficaz na inibição da formação do biofilme para as espécies *C. tropicalis*, *C. glabrata* LFBM 04B e *C. parapsilosis* com percentuais acima de 60 % de inibição.

Figura 36 – Percentual de inibição na formação do biofilme de espécies de *Candida* após exposição a associação linalol-fluconazol



Legenda: LFBM – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; ATCC – American Type Culture Collection; CIM – Concentração inibitória mínima; CIF – Concentração inibitória fracionada; (%) – porcentagem; (*) - existe diferença significativa (p valor < 0,05). **Fonte:** A autora (2021).

A associação linalol-micafungina foi capaz de inibir a formação do biofilme das espécies de *Candida* cujos valores percentuais variaram de cerca de 23 a 71 % (Figura 38). A maior inibição do biofilme foi observada sobre a cepa *C. glabrata* ATCC 90030 e menores inibições sobre as espécies de *C. parapsilosis* e *C. krusei*.

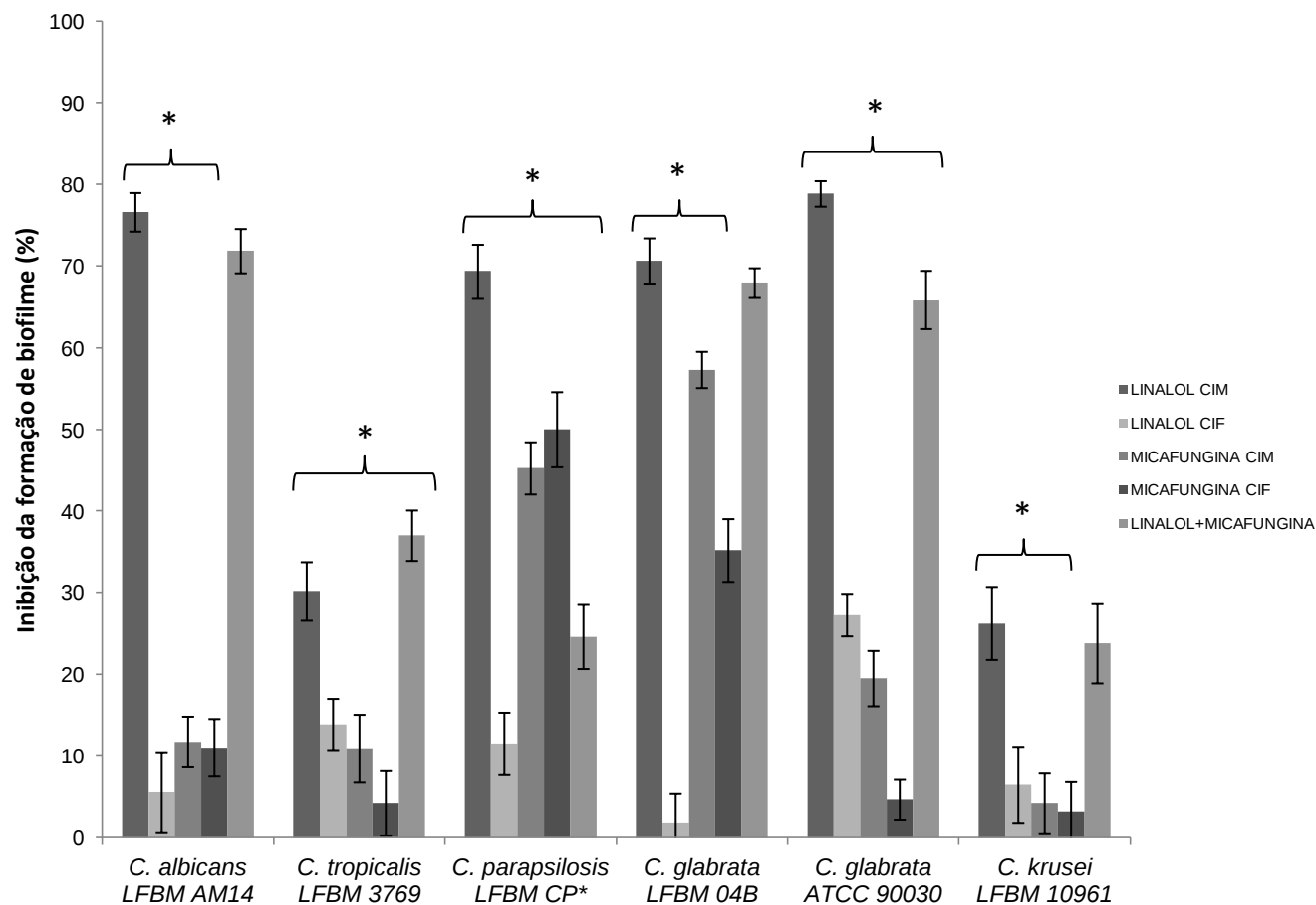
Os biofilmes de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* foram inibidos de forma semelhante pelo linalol na CIM e por sua associação com a micafungina, entretanto para a espécie *C. tropicalis*, a associação apresentou maior potencial de inibição e para a *C. parapsilosis*, o linalol na CIM apresentou maior inibição, quando comparado com a associação.

O linalol isolado na CIF apresentou menor potencial de inibição quando comparado com a associação. Além disso, para as espécies *C. albicans*, *C. glabrata* LBM 04B e *C. krusei*, o linalol na CIF não teve diferença estatística com os resultados de inibição do controle, indicando que nesta concentração, o linalol não foi eficaz na inibição da formação do biofilme, porém nesta concentração, quando com associação com a micafungina o potencial de inibição claramente é aumentado, com exceção da espécie *C. parapsilosis*.

Vale destacar que a micafungina na CIM apresentou menor potencial de inibição da formação de biofilme comparado com a inibição provocada pela associação com linalol para as espécies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Para as espécies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* a micafungina na CIF apresentou capacidade de inibição semelhante a micafungina na CIM.

Os resultados indicam que a associação linalol-micafungina apresenta ser mais eficaz na inibição da formação de biofilme das espécies de *Candida*, quando comparado com o linalol e micafungina isolados na CIF, evidenciado pela porcentagem de inibição (Figura 38), além disso, a associação apresenta efeito semelhante de inibição promovida pelo linalol na CIM, só que em concentrações sub-inibitórias.

Figura 37 – Percentual de Inibição na formação do biofilme de espécies de *Candida* após exposição a associação linalol-micafungina



Legenda: LFBM – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; ATCC – American Type Culture Collection; CIM – Concentração inibitória mínima; CIF – Concentração inibitória fracionada; (%) – porcentagem; (*) - existe diferença significativa (p valor < 0,05). **Fonte:** A autora (2021).

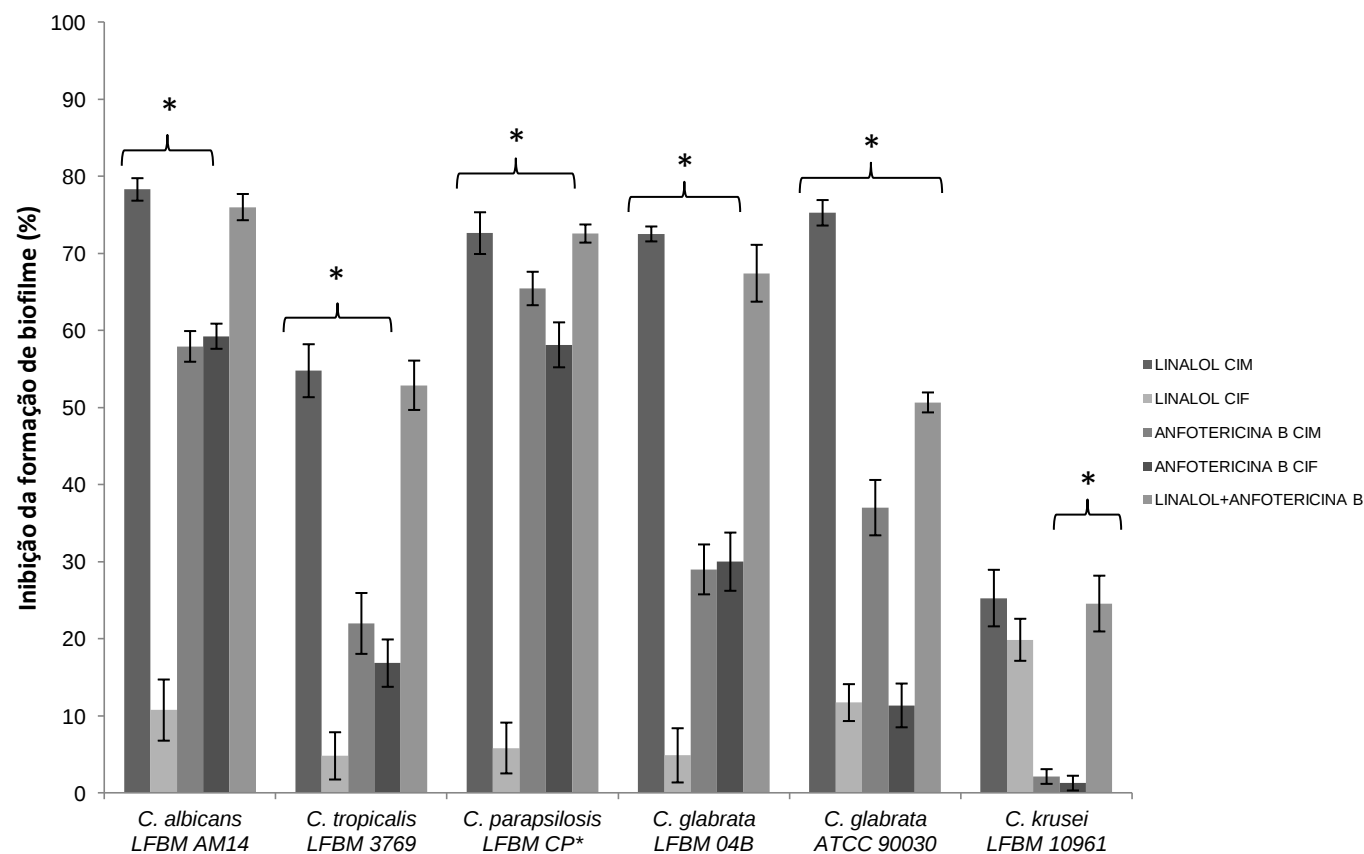
O efeito da associação linalol-anfotericina B (Figura 39) sobre a formação de biofilme de espécies de *Candida* foi evidenciado pela porcentagem de inibição que variou de 24 a 76 %, sendo a maior porcentagem de inibição observada para a espécie *C. albicans* e a menor inibição para a espécie *C. krusei*.

Para esta associação, o linalol na concentração da CIM foi mais eficaz na inibição da formação de biofilme quando comparado com o tratamento com o linalol na concentração da CIF para todas as espécies, com exceção da cepa *C. krusei*. Para os biofilmes das espécies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* LFBM 04B, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, o linalol na CIM teve o mesmo efeito de inibição quando comparado com a associação linalol-anfotericina B.

Para todas as cepas de *Candida* ensaiadas, tanto o linalol como a anfotericina B isolados, na CIF, mostraram resultados de porcentagem de inibição bem inferiores do que a associação, indicando que quando estão em associação, o linalol e anfotericina B apresentam maior potencial de inibição de formação de biofilme, do que quando estão isolados na CIF.

Diante dos biofilmes das espécies de *C. albicans*, *C. glabrata* LFBM 04B, *C. krusei* e *C. tropicalis*, o efeito da anfotericina B nas concentrações de CIM e CIF, foram semelhante entre si. Entretanto sobre as espécies *C. parapsilosis* e *C. glabrata* ATCC 90030, a concentração da CIM da anfotericina B teve maior porcentagem de inibição do que a CIF.

Figura 38 – Percentual de Inibição na formação do biofilme de espécies de *Candida* após exposição a associação linalol-anfotericina B

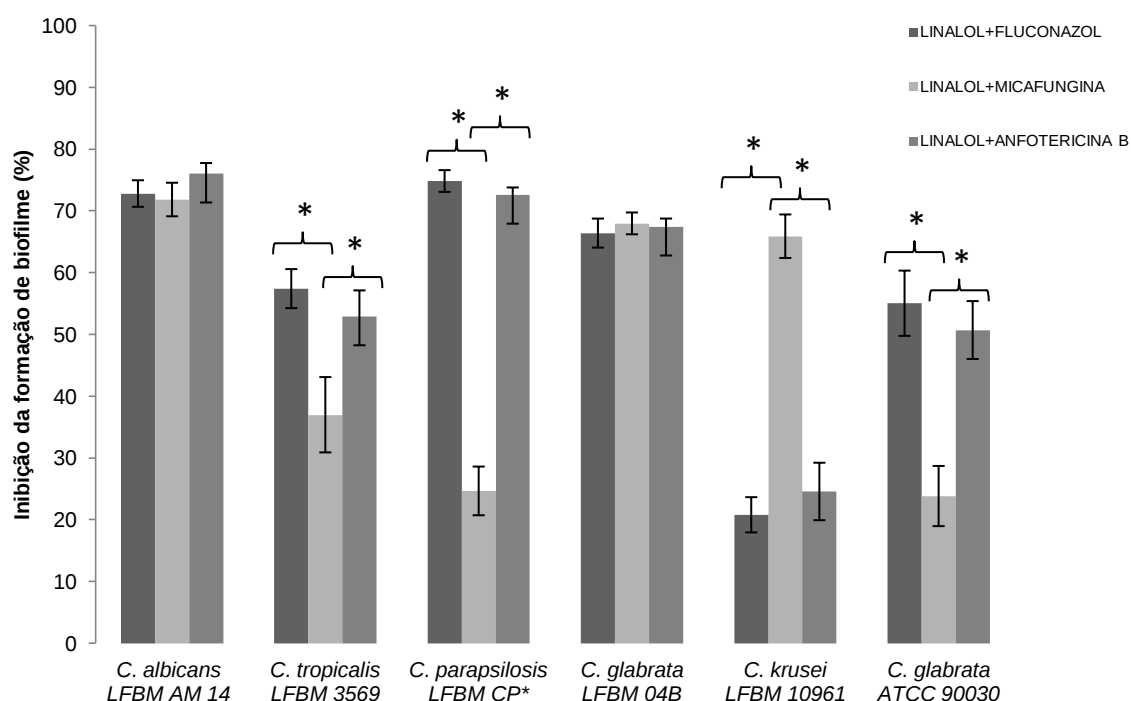


Legenda: LFBM – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; ATCC – American Type Culture Collection; CIM – Concentração inibitória mínima; CIF – Concentração inibitória fracionada; (%) – porcentagem; (*) - existe diferença significativa (p valor < 0,05). **Fonte:** A autora (2021).

Para a todas as associações, as maiores porcentagens de inibição da formação de biofilme foram observadas diante da espécie *C. albicans*, onde todas as associações tiveram efeito de inibição semelhante, cuja porcentagem de inibição foi superior a 70 % (Figura 40).

Diante das espécies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, e das duas cepas de *C. glabrata*, as associações de linalol-fluconazol e linalol-anfotericina B, apresentaram maior potencial de inibição da formação de biofilme, enquanto que para a cepa *C. krusei* a associação linalol-micafungina foi mais eficaz, evidenciado pela porcentagem de inibição.

Figura 39 – Inibição de formação de biofilme entre as associações de linalol com fluconazol, micafungina e anfotericina B



Legenda: LFBM – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; ATCC – American Type Culture Collection; (*) - existe diferença significativa (p valor < 0,05). **Fonte:** A autora (2021).

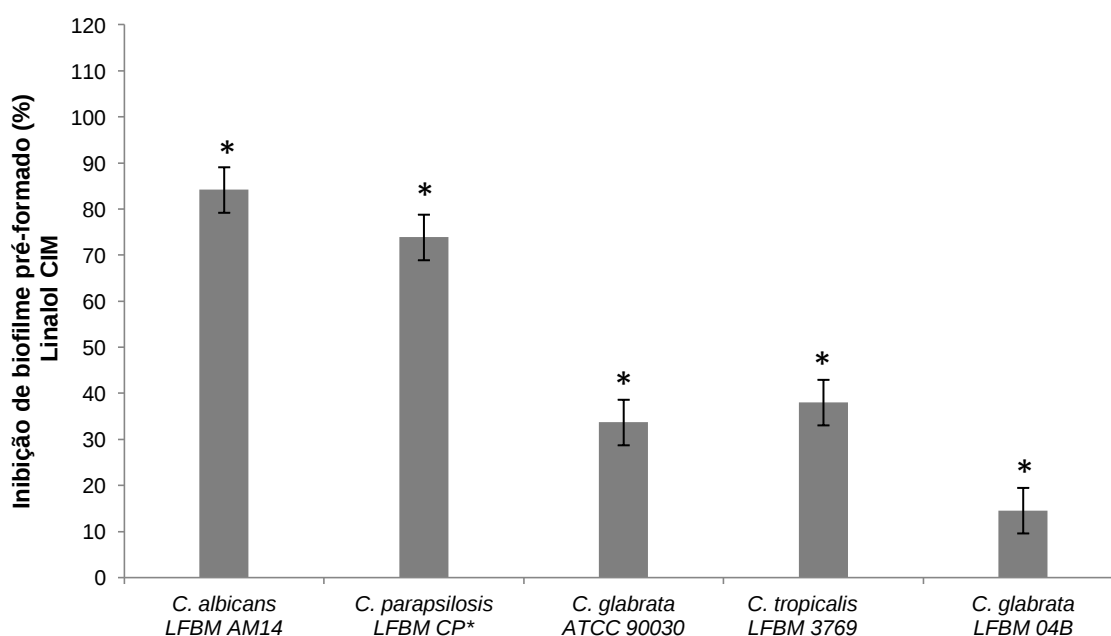
Quando comparadas as demais associações, a associação linalol-micafungina apresentou o menor potencial de inibição na formação do biofilme das espécies de *Candida*. Entretanto, esta associação foi a mais ativa sobre a inibição do biofilme de *C. krusei*, cujo percentual foi de 20%.

5.7 ATIVIDADE DO LINALOL E DE SUAS ASSOCIAÇÕES COM ANTIFÚNGICOS SOBRE BIOFILME FORMADO DE ESPÉCIES DE *CANDIDA*

O linalol, em concentração equivalente a CIM, foi capaz de reduzir entre 15 a 84 % a biomassa do biofilme formado das espécies de *Candida*. O efeito maior desta inibição foi sobre o biofilme de *C. albicans* e *C. parapsilosis* (Figura 41). Sobre espécies de *C. glabrata* ATCC 90030 e *C. tropicalis* LFBM 3769, o linalol apresentou menor percentual de redução de biofilme, mesmo assim, o potencial de inibição foi acima de 30 %.

Os resultados indicam que o linalol em CIM tem atividade antibiofilme sobre biofilmes formados de espécies de *Candida* ensaiadas, com destaque para as espécies *C. albicans* e *C. parapsilosis*, cuja inibição foi da ordem de acima de 70 a 85 %.

Figura 40 – Atividade do linalol sobre o biofilme formado sobre espécies de *Candida*



Legenda: LFBM – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; ATCC – American Type Culture Collection; (*) - existe diferença significativa (p valor < 0,05). **Fonte:** A autora (2021).

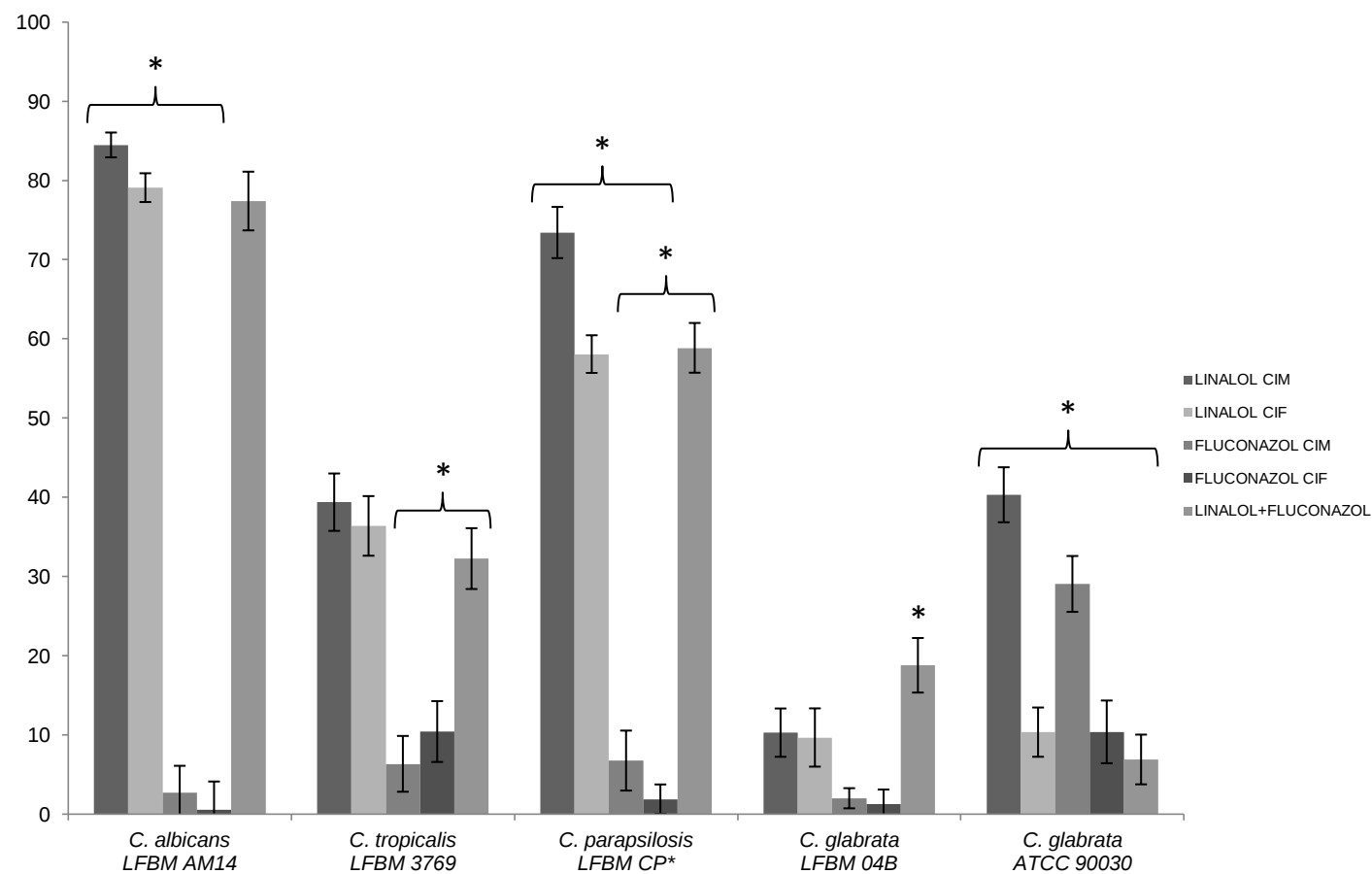
Os resultados de atividade sobre biofilmes formados da associação do linalol-fluconazol demonstraram que existe uma redução da biomassa do biofilme formado de todas as espécies de *Candida*, cujos percentuais variaram de 7 a 78 %. A maior inibição foi obtida após exposição dessa associação ao biofilme de *C. albicans* e a

menor inibição sobre *C. glabrata* ATCC 90030 (Figura 42). Para a maior parte das espécies de *Candida*, as associações mostraram sobre seus biofilmes, efeitos semelhantes àqueles obtidos com o linalol na CIM.

O linalol na CIF apresentou uma inibição do biofilme formado semelhante aquela induzida pelo linalol na CIM. Para a maioria das cepas, a associação linalol-fluconazol foi mais eficaz para a atividade diante de biofilmes formados, do que o linalol e o fluconazol em suas CIFs. Um efeito semelhante foi observado para a associação linalol-micafungina sobre *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* (Figura 43). Para as cepas de *Candida glabrata*, não foi observado um efeito superior da associação linalol-micafungina quando comparado aos compostos avaliados isoladamente.

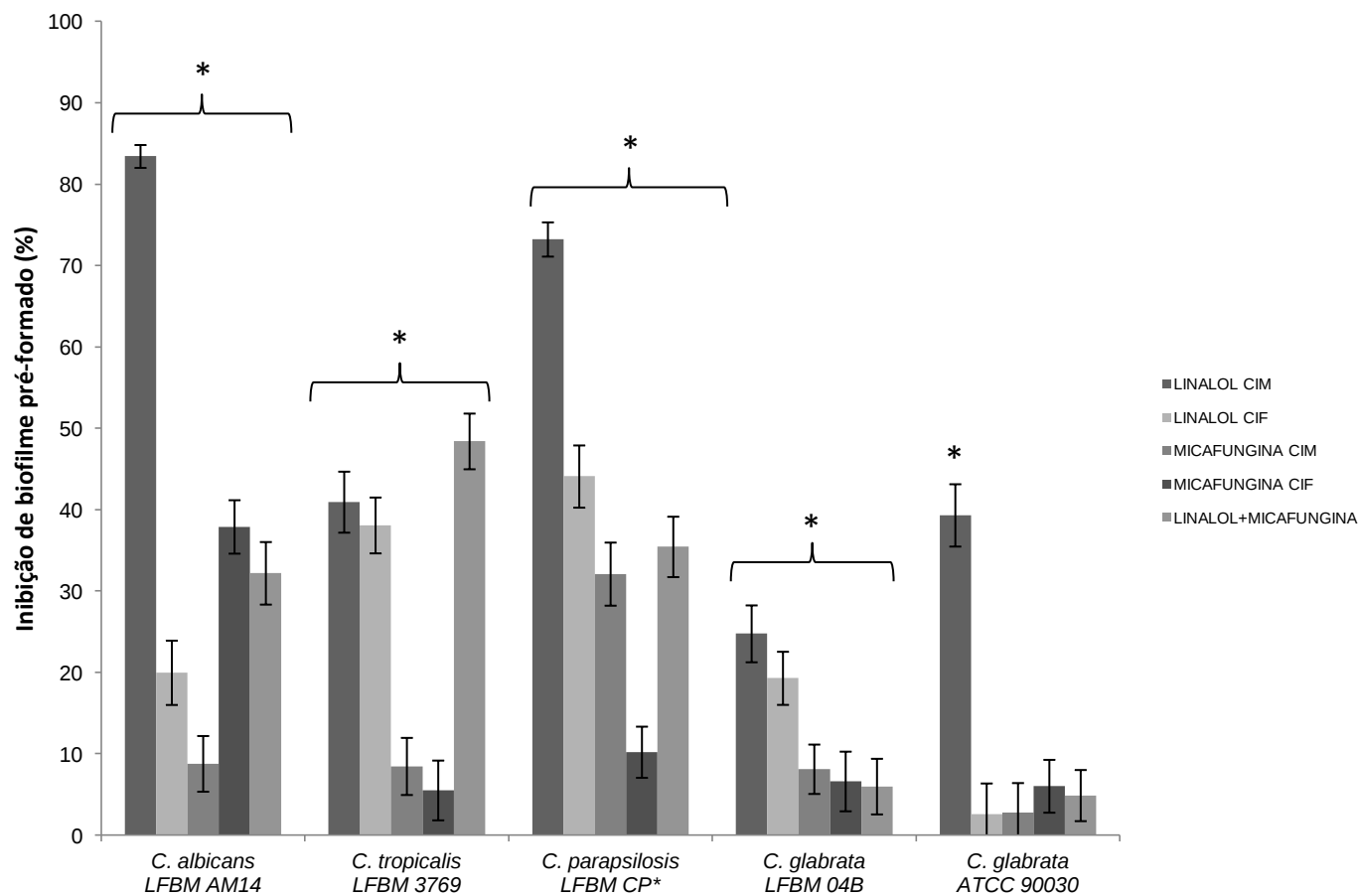
A associação linalol-micafungina apresentou atividade antibiofilme sobre *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* com percentuais de inibição acima de 30 % apresentando menor atividade diante do biofilme das duas cepas de *C. glabrata*.

Figura 41 – Atividade da associação linalol-fluconazol sobre o biofilme formado de espécies de *Candida*



Legenda: LFBM – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; ATCC – American Type Culture Collection; CIM – Concentração inibitória mínima; CIF – Concentração inibitória fracionada; (%) – porcentagem; (*) - existe diferença significativa (p valor < 0,05). **Fonte:** A autora (2021).

Figura 42 – Atividade da associação linalol-micafungina sobre o biofilme formado de espécies de *Candida*



Legenda: LFBM – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; ATCC – American Type Culture Collection; CIM – Concentração inibitória mínima; CIF – Concentração inibitória fracionada; (%) – porcentagem; (*) - existe diferença significativa (p valor < 0,05); (-) – existe diferença significativa (p valor > 0,05). **Fonte:** A autora (2021).

A atividade associação linalol-anfotericina B sobre o biofilme formado da está apresentada na figura 44. Assim como nas demais associações avaliadas, o linalol na CIM apresentou maior percentual de redução do biofilme formado das espécies de *Candida* quando comparado com a redução provocada pela associação.

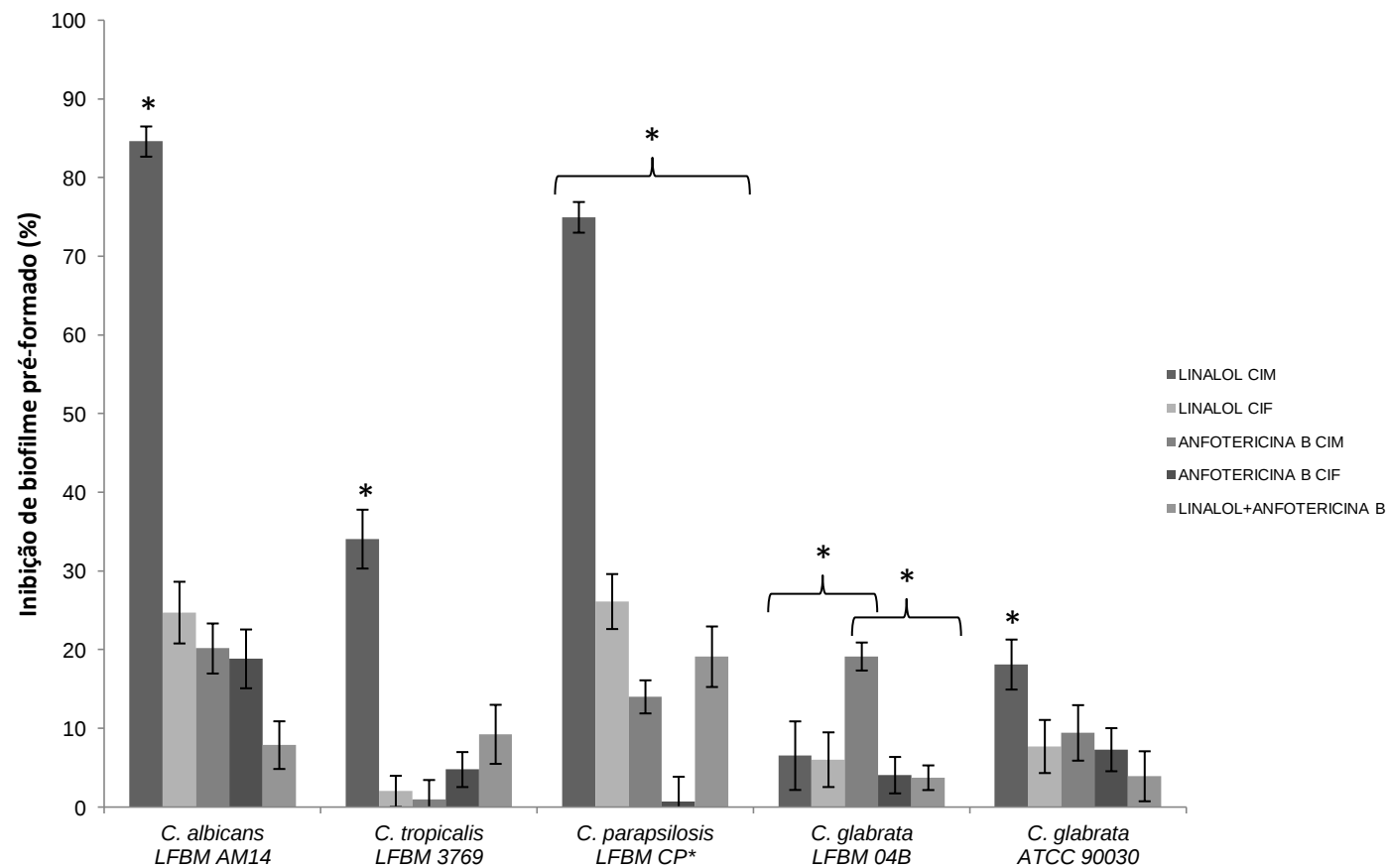
Para todas as espécies de *Candida*, o linalol e a anfotericina B na concentração da CIF, foram capazes de inibir biofilme formado em proporções iguais ou superiores àquelas obtidas para a sua associação. Esta associação efeitos distintos foram observados entre as espécies de *Candida* avaliadas quando estas foram comparadas ao efeito induzido pelo linalol na CIF e anfotericina B na CIM e na CIF.

Sobre a *C. albicans*, o linalol na CIF exibiu o mesmo efeito de redução do biofilme que a anfotericina B avaliada na CIM e na CIF e maior que a sua associação. Os tratamentos do biofilme formado de *C. tropicalis* com o linalol na CIF, anfotericina B nas duas concentrações e sua associação foram semelhantes quando comparadas entre si.

Somente para *C. parapsilosis*, a associação de linalol-anfotericina B apresentou um percentual de redução do biofilme superior quando comparado com a redução induzida pelo linalol na CIF e pela anfotericina B.

As cepas de *C. glabrata* apresentaram as menores reduções do biofilme após tratamento com linalol na CIM ou com a associação linalol-anfotericina B quando as demais espécies de *Candida*.

Figura 43 – Atividade da associação linalol-anfotericina B sobre o biofilme formado de espécies de *Candida*



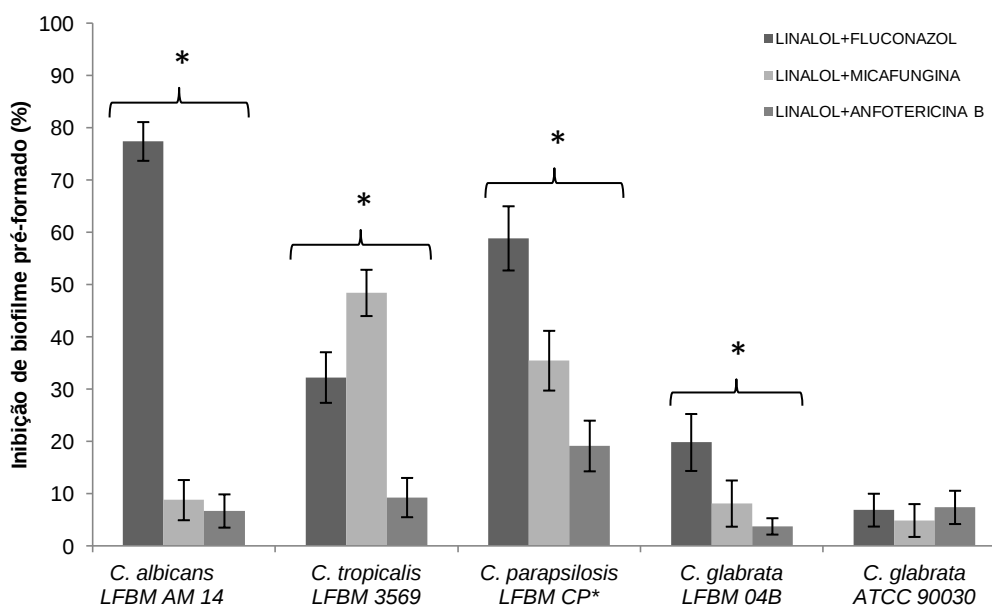
Legenda: LFBM – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; ATCC – American Type Culture Collection; CIM – Concentração inibitória mínima; CIF – Concentração inibitória fracionada; (%) – porcentagem; (*) - existe diferença significativa (p valor < 0,05). **Fonte:** A autora (2021).

Os efeitos das reduções do biofilme formado das espécies de *Candida* após exposição as associações de linalol-fluconazol, linalol-micafungina e linalol-anfotericina B estão apresentados na figura 45.

O resultado mais relevante foi observado com a associação linalol-fluconazol sobre *C. albicans*. Esta associação induziu uma redução na biomassa do biofilme formado de 77%.

Nas *C. parapsilosis* e *C. glabrata* LFBM 04B a associação linalol-fluconazol também foi capaz de reduzir de forma mais eficaz o biofilme, que a associação linalol-anfotericina B.

Figura 44 – Atividade das associações do linalol-anfúngicos sobre o biofilme formado espécies de *Candida*



Legenda: LFBM – Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos; ATCC – American Type Culture Collection; (*) - existe diferença significativa (p valor < 0,05). **Fonte:** A autora (2021).

A associação mais eficaz na redução da biomassa do biofilme de *C. tropicalis*, foi linalol-micafungina, seguida por linalol-fluconazol. Ao comparar os efeitos causados por estas associações sobre o biofilme de *C. glabrata* ATCC 90030 foi observado que não houve diferença entre elas. Os efeitos das associações de linalol-micafungina e linalol-anfotericina B sobre a redução do biofilme de *C. albicans*, *C. glabrata* LFBM 04B e *C. glabrata* ATCC 90030 não apresentaram diferença quando comparados entre si.

5.8 EFEITO CITOTÓXICO DO LINALOL E DE SUAS ASSOCIAÇÕES COM ANTIFÚNGICOS

A citotoxicidade do linalol e de suas associações com os antifúngicos fluconazol, cetoconazol, itraconazol, terconazol, micafungina e anfotericina B sobre linhagens de células Vero e células L929 estão apresentados na figura 46 (A e B, respectivamente).

As concentrações do linalol bem como de suas associações foram escolhidas com base nos resultados dos ensaios de combinação, pelo método checkerboard. Estas concentrações apresentaram efeito sinérgico para a maioria das espécies de *Candida*.

As associações não apresentaram citotoxicidade sobre células Vero e células L929. Quando estes resultados foram comparados ao controle positivo, Paclitaxel 10µg/mL, foi observada diferenças significativas.

As associações linalol-itraconazol, linalol-terconazol, apresentaram uma baixa citotoxicidade sobre as células Vero, cujo percentual de inibição variou de 12 a 14 %. Quando comparados entre si estes os resultados não foram diferentes entre si.

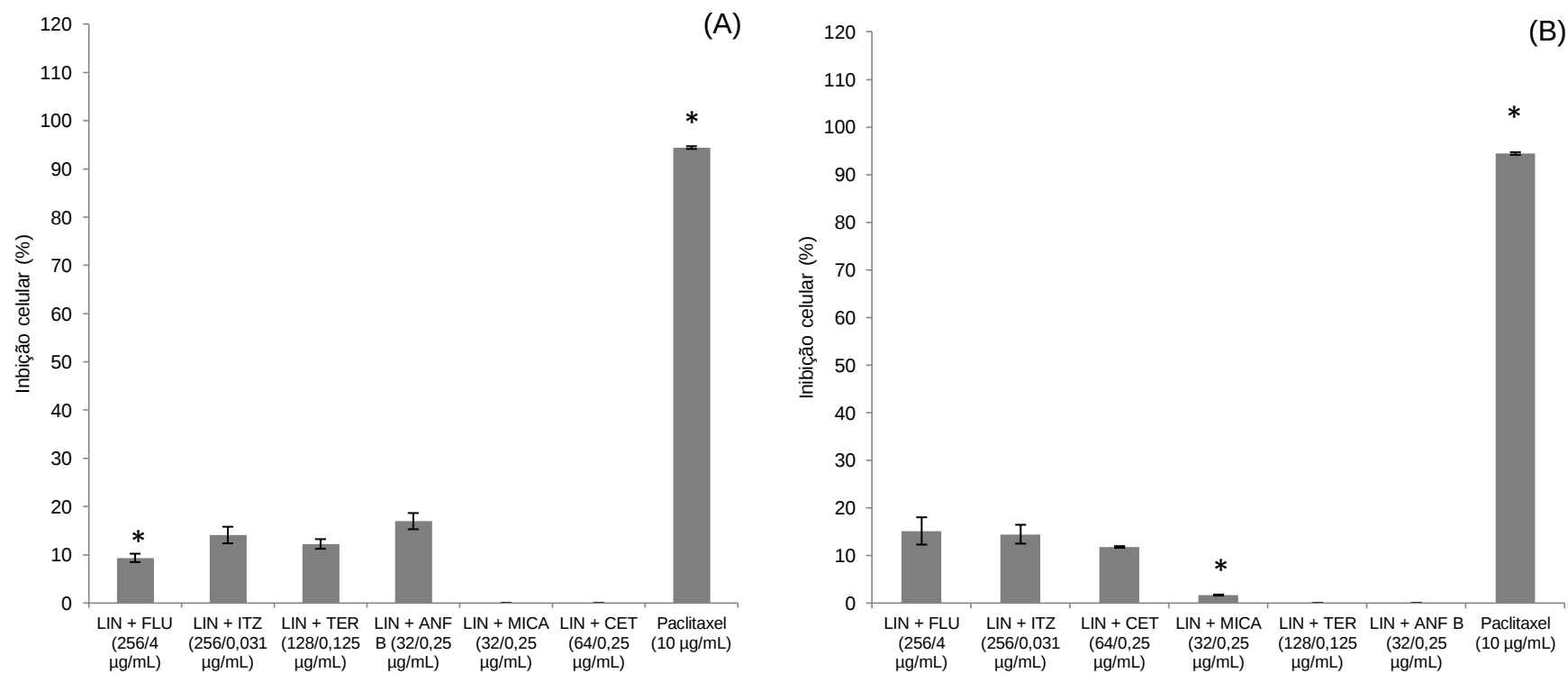
As associações linalol-micafungina e linalol-cetoconazol, não apresentaram efeito citotóxico sobre as células (Figura 46A).

A associação que apresentou maior inibição das células Vero foi linalol-anfotericina B, cujo percentual de inibição foi de 17 % o que é considerado como sendo uma associação de baixa citotoxicidade.

As associações de linalol-terconazol e linalol-anfotericina B não foram tóxicas sobre as células L929. As associações linalol-fluconazol, linalol-itraconazol e linalol-cetoconazol apresentaram efeitos semelhantes sobre as células L929 com inibição celular variando de 12 a 15%.

Todas as associações apresentaram baixo efeito citotóxico sobre as duas linhagens celulares quando comparada ao efeito tóxico provocado pelo controle positivo. As associações linalol-cetoconazol, linalol-terconazol, linalol-micafungina e linalol-anfotericina B, não apresentaram citotoxicidade sobre as linhagens celulares avaliadas.

Figura 45 – Atividade citotóxica das associações de linalol-antifúngicos sobre as linhagens celulares: (A) células Vero e (B) células L929



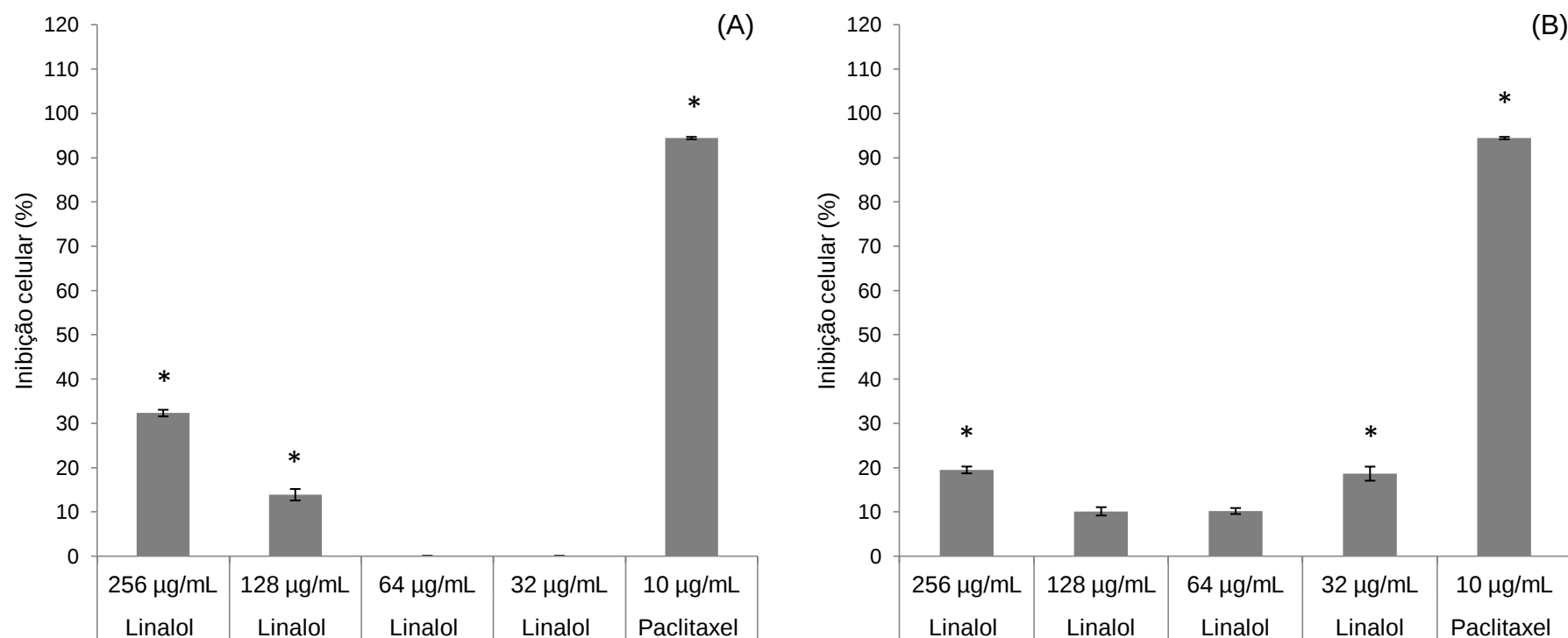
Legenda: % - Porcentagem; Vero – células epiteliais renais de macaco-verde africano; L929 - fibroblastos de camundongos; LIN – Linalol; ANF B – Anfotericina B; FLU – Fluconazol; CET – Cetoconazol; ITZ – Itraconazol; TER – Terconazol; MICA – Micafungina; (*) - existe diferença significativa (p valor < 0,05). **Fonte:** A autora (2021).

O linalol, em concentrações sub-inibitórias, apresentou maior porcentagem de inibição das células Vero e células L929 na concentração de 256 µg/mL. Apesar de apresentar a maior porcentagem de inibição nesta concentração (32,31 % e 19,47 %, respectivamente), ao ser comparado com a inibição promovida pelo controle paclitaxel (10 µg/mL), pode-se inferir que o linalol (256 µg/mL) ainda apresenta baixa citotoxicidade diante destas células. As concentrações mais baixas de linalol (128 e 64 µg/mL) apresentaram baixa ou nenhuma inibição das linhagens celulares testadas (Figura 47).

O linalol e as suas associações com os antifúngicos avaliadas em concentrações sub-inibitórias, apresentaram pouca toxicidade sobre as células Vero e L929 quando comparado com a inibição provocada pelo controle positivo utilizado.

Vale ainda destacar que, ao comparar os resultados da citotoxicidade do linalol na concentração de 256 µg/mL e do linalol em associação com fluconazol e itraconazol diante de células Vero, foi possível observar que, apesar de o linalol estar na concentração de 256 µg/mL nestas associações, a porcentagem de inibição foi menor quando comparada com o linalol isolado. Este mesmo efeito foi observado diante das células L929, com o linalol isolado em 32 µg/mL e as associações de linalol com micafungina e anfotericina B, além do linalol isolado em 128 µg/mL e a associação de linalol e terconazol, onde o linalol isolado apresentou maior inibição da linhagem L929, quando comparada a inibição das associações, mesmo estando na mesma concentração.

Figura 46 – Citotoxicidade do linalol sobre as linhagens celulares: (A) células Vero e (B) células L929



Legenda: % - Porcentagem; Vero – células epiteliais renais de macaco-verde africano; L929 - fibroblastos de camundongos; (*) - existe diferença significativa (p valor > 0,05). **Fonte:** A autora (2021).

6 DISCUSSÃO

A presença de atividade de compostos sobre do gênero *Candida* é bastante relevante uma vez que este gênero é relatado como a terceira causa das infecções sanguíneas que requerem cuidados de saúde (PAPPAS et. al, 2018). A *C. albicans* continua sendo a espécie mais comumente encontrada nas infecções causadas pelo gênero *Candida*, o que corresponde a 65,3 %, ao redor do mundo, sendo relatada resistência ao fluconazol de 1,4 % dessas cepas (PFALLER et. al, 2010; RODRIGUES et. al, 2017). Espécies de *Candida* não-*albicans* também passaram a ser isoladas e relatadas em diagnósticos, resultados de outro estudo indicaram que as espécies de *C. não-albicans* mais relatadas por causarem candidíase foram a *C. glabrata* (10,2 % a 11,7 %), *C. tropicalis* (5,4 % a 8,0 %) e *C. parapsilosis* (4,8 % a 5,6 %), havendo um aumento de 68,7 % nos índices de candidíase causada por *C. glabrata* com susceptibilidade diminuída ao fluconazol (PFALLER et. al, 2010; GUINEA, 2014).

Diante da importância clínica das infecções causadas pelo gênero *Candida*, além do aumento do isolamento de espécies resistentes aos antifúngicos, principalmente a classe dos azólicos, atrelado a existência de poucas opções terapêuticas para o tratamento das infecções, existe interesse na busca de moléculas que apresentam, além da atividade diante desses micro-organismos possam também reverter a resistência aos agentes antifúngicos de administração clínica, resultando em esquemas terapêuticos mais eficientes.

Os monoterpenos limoneno e eucaliptol apresentaram CIM maior que 1.024 µg/mL, diante da maioria das cepas de espécies de *Candida* ensaiadas neste estudo. Estudos anteriores demonstraram atividade destes monoterpenos sobre cepas de *Candida*, obtidas de coleções de micro-organismos, bem como de amostras de clínicas. Um destes estudos foi o realizado por Thakre e colaboradores (2018), no qual o limoneno foi capaz de inibir *in vitro*, o crescimento de cepas de *C. albicans* sensíveis ao fluconazol, bem como apresentou atividade diante do biofilme e sinergismo com fluconazol diante destas cepas.

Munõz e colaboradores (2020), também relataram atividade do limoneno sobre de cepas de *C. albicans* isoladas de secreção vaginal e sobre diferentes espécies de *Candida* sensíveis ao fluconazol. Esses autores observaram a atividade *in vivo* do limoneno pela redução da carga fúngica em camundongos induzidos com

candidíase vaginal.

O eucaliptol também apresentou atividade sobre diferentes espécies de *Candida* sensíveis ao cetoconazol, apresentando altos valores de CIM que variaram de 4 a 46 mg/mL, com relatos também da ação antibiofilme e na formação de tubo germinativo de *C. albicans* (IVANOV et. al, 2021).

Dessa forma, o perfil de sensibilidade dos micro-organismos e a concentração do composto foi um fator determinante na avaliação da atividade dos monoterpenos limoneno e eucaliptol, de acordo com os dados de literatura. Ao passo que, sobre espécies de *Candida* sensíveis aos antifúngicos convencionais estes compostos apresentaram atividade anti-*Candida*, diferentemente deste estudo, onde as cepas ensaiadas foram resistentes a todos os azólicos e estes compostos apresentaram valores de CIM acima de 1.024 µg/mL.

Neste estudo, o linalol foi selecionado como o monoterpeno mais ativo sobre todas as espécies de *Candida* de importância clínica e que apresentam importante perfil de resistência aos antifúngicos azólicos, sendo algumas espécies resistentes também a micafungina.

Os óleos essenciais de diferentes espécies de plantas, contendo o linalol como componente majoritário e o próprio o composto isolado, vêm sendo relatados ao longo dos anos por apresentarem atividades biológicas comprovadas. O óleo essencial de lavanda é um desses óleos, conhecido por apresentar altas concentrações de linalol em sua composição, cujos efeitos estão consolidados no controle da ansiedade e depressão (DONELLI et. al, 2019). Outras atividades biológicas de óleos essenciais, contendo linalol vêm sendo relatadas como a atividade antimicrobiana, anticancer, antiproliferativa, antinociceptiva, analgésica, anti-inflamatória e antihiperlipêmica (PEREIRA et. al, 2018).

A atividade antimicrobiana do linalol tem amplo espectro de ação sobre espécies de bactérias (GUO et. al, 2021; LIU et. al, 2020), fungos filamentosos, com destaque para os dermatófitos (PONTE et. al, 2020; SILVA et. al, 2017; LIMA et al., 2017) espécies de *Candida*, especialmente sobre *C. albicans* (ZORE et al., 2011; HSU et. al, 2013; CARDOSO et al., 2016; DIAS et. al, 2018).

O linalol tem ação antifúngica através da inibição da produção do ácido mevalônico, que é um fator essencial da biossíntese de ergosterol, pela expressão de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) redutase que catalisa a conversão de HMG-CoA neste ácido, promovendo a desestabilização da membrana

plasmática pela falta do ergosterol (CHO, et al., 2011). Esta ação promove redução da biossíntese de ergosterol, parada do ciclo celular, indução de apoptose, estresse oxidativo nas células de *Candida* e danos na função da membrana citoplasmática (KHANE et. al, 2010; ZORE et al., 2011; CARDOSO et. al, 2016; BLASKÓ, et. al, 2017; MÁTÉ et al., 2017).

A ação do linalol sobre a integridade da parede celular de *Candida* foi avaliada neste estudo pelo método do sorbitol (protetor osmótico). De acordo com Escarlata e colaboradores (2011), na ausência de um protetor osmótico, quando um composto age sobre a parede celular do fungo ocorre morte, porém quando existe a presença de um protetor osmótico ocorre proteção da parede celular do fungo.

Um estudo anterior demonstrou que o linalol não age pela desestabilização da parede celular de *C. albicans* e *C. tropicalis* (SILVA, 2018), dessa forma com os resultados do presente estudo, esta evidência pode ser estendida para as espécies *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata* nas quais o linalol não desestabilizou a parede celular, evidenciando que a ação do linalol está diretamente ligada desestabilização da membrana celular destes micro-organismos, ao afetar a formação de ergosterol ali presente (KHANE et. al, 2010; CHO, et al., 2011; ZORE et al., 2011; CARDOSO et. al, 2016).

Ao verificar a atividade anti-*Candida* do linalol sobre diferentes espécies de *Candida*, obtidas de isolados clínicos as quais se mostraram resistentes aos antifúngicos azólicos e algumas também resistentes a micafungina, este estudo se direcionou para buscar da reversão da resistência dessas espécies aos azólicos, diminuindo a CIM desses antifúngicos, bem como do linalol utilizando associações em concentrações sub-inibitórias.

No presente estudo, o efeito do linalol sobre a inibição do crescimento das espécies de *Candida* foi observado nas suas associações sinérgicas com os azólicos fluconazol, itraconazol, cetoconazol e terconazol. Esse efeito inibitório, em baixas concentrações, foi capaz de reverter a sensibilidade da maior parte das espécies de *Candida*.

Este sinergismo foi destaque sobre as cepas de *C. glabrata* que apresentaram reversão da sensibilidade ao fluconazol, cetoconazol e itraconazol, uma vez que essas cepas são conhecidas por apresentar susceptibilidade diminuída ao fluconazol (ARENDRUP e PATTERSON, 2017).

A atividade da associação linalol-fluconazol ou deste azólico com óleos

essenciais, contendo linalol como componente majoritário, está de acordo com este com este estudo (ÂMBER et al., 2010; ZORE et. al, 2011; CARDOSO et al., 2016; MANOHARAN et. al, 2017). Estas pesquisas relataram associações sinérgicas de linalol-fluconazol em sua maioria sobre de espécies de *Candida*, especialmente para *C. albicans*.

O efeito sinérgico obtido entre antifúngicos azólicos e linalol pode ser explicada pelo aumento do influxo do antifúngico promovido pela fluidificação da membrana causada pela ação do linalol (ZORE et. al, 2011; BLASKÓ, et. al, 2017). O aumento do influxo do azólico, promovido pelo linalol, na célula fúngica permite que o azólico desempenhe seu mecanismo de ação, cujo alvo é a enzima esterol do citocromo P-450 14 α - desmetilase, que converte lanosterol em ergosterol, impedindo a completa formação da membrana celular (HANI, et. al, 2015; PAPPAS et. al, 2016; PERLIN, RAUTEMAA- RICHARDSON, ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2018).

A associação linalol-anfotericina B, apresentou um efeito sinérgico que pode ser explicado pela junção de mecanismos de ação tendo como alvo a membrana citoplasmática das espécies de *Candida*. O linalol age fluidificando a membrana pela inibição na produção de ergosterol e a anfotericina B pela complexação com as moléculas de ergosterol presentes na membrana, provocando instabilidade e perda de conteúdo intracelular (PRASAD, SHAH & RAWAL, 2016; KRISTANC et al. 2019).

A falta de ergosterol na membrana é considerada um importante fator de resistência das espécies de *Candida* a anfotericina B (DICK, MERZ e SARAL, 1980; QUILES-MELERO e GARCÍA-RODRÍGUEZ, 2021), o efeito do linalol na inibição da biossíntese de ergosterol parece não ter prejudicado a ação da anfotericina B na complexação com este componente de membrana celular, indicado pelo efeito sinérgico observado com essa associação.

Ao combinar mecanismos de ação diferentes, na associação linalol-micafungina, também foi possível verificar um efeito sinérgico para a maioria das espécies de *Candida* e uma reversão da sensibilidade à micafungina, nas espécies resistentes a esta equinocandina. A ação da micafungina acontece pela inibição da enzima (1,3)- β -D-glucana sintase, responsável pela síntese do polímero (1,3)- β -D-glucana, causando inibição da biossíntese da parede celular e consequentemente lise e prejuízo à integridade celular (ONISHI et al., 2000; PERLIN, 2011; EMRI et al., 2013; PRASAD, SHAH & RAWAL, 2016).

Não foram encontrados estudos que demonstraram sinergismo com

consequente reversão de resistência em cepas de *C. albicans* ou *C. não-albicans* aos azólicos: cetoconazol, itraconazol e terconazol, bem como a equinocandina micafungina e ao polieno anfotericina B, quando em associação nas concentrações sub-inibitórias com o linalol, sendo este um dos principais achados deste estudo, em concentrações inferiores a CIM os antifúngicos e o linalol foram capazes de reversão da sensibilidade das espécies de *Candida*.

Com estes resultados promissores surgiu o interesse de investigar o efeito dessas associações sobre a formação do tubo germinativo, principal fator de virulência de *C. albicans*, bem como o efeito sobre os biofilmes das diversas espécies de *Candida*, que representam um importante mecanismo de resistência deste gênero.

O efeito do linalol na inibição da formação do tubo germinativo de *C. albicans*, já foi relatado anteriormente em outros estudos (MÁTÉ et.al, 2017; RAUT et. al, 2013; MANOHARAN et. al, 2017), bem como a inibição da formação de tubo germinativo provocada pela ação de concentrações sub-inibitórias de fluconazol e anfotericina B, (ELLEPOLA e SAMARANAYAKE, 1998; VAN'T WOUT et. al, 1990). Entretanto, não foram encontrados estudos que relatassem a atividade de associações entre o linalol-fluconazol, linalol-micafungina ou linalol-anfotericina B sobre a formação do tubo germinativo de cepas *C. albicans* resistentes aos azólicos.

Este estudo mostrou que as associações utilizadas em concentrações sub-inibitórias apresentaram atividade sobre na inibição de tubo germinativo de cepas de *C. albicans*. Segundo Staniszewska (2020), a formação de tubo germinativo é um fator de virulência essencial que garante a espécie *C. albicans* capacidade de adesão, com consequente colonização nas mucosas, permitindo assim, seu crescimento invasivo e o desenvolvimento de infecções. Além disso, a formação de tubo germinativo é reportada como responsável pelas células de *C. albicans* conseguirem escapar da ação de macrófagos durante o processo infeccioso (STANLEY e HURLEY, 1969; PETERSON e CALDERONE, 1977; STANISZEWSKA, 2020).

Outra importante atividade atribuída a estas associações foi sua atividade sobre os biofilmes das espécies de *Candida*, evidenciada por sua ação na formação de biofilme, bem como sobre os biofilme formados. A atividade anti-biofilme foi observada principalmente sobre *C.albicans* e em menor intensidade sobre *C. glabrata*.

A atividade do linalol sobre a formação do biofilme de espécies de *Candida* foi relatada anteriormente por estudos anteriores (HSU et al. 2013; CARDOSO et al. 2016; SOUZA et al., 2016), bem como sobre sua ação sobre o biofilme formado (HSU et al. 2013; SOUZA et al., 2016; MANOHARAN et al. 2017).

Souza e colaboradores (2016) relataram que o linalol, na concentração de 1.000 µg/mL, foi capaz de inibir em 50 % a formação de biofilme de *C. tropicalis* e que atividade sobre o biofilme formado foi em torno de 50 %. Estes resultados corroboram aos encontrados neste estudo sobre a mesma espécie e utilizando concentração do linalol muito próxima.

Os dados encontrados neste estudo estão de acordo com os resultados publicados anteriormente cuja atividade do linalol diante da formação do biofilme de *C. albicans* foi relatada na concentração de 0,05 % com inibição de cerca de 80 % da formação de biofilme, bem como também foi definida esta mesma ação pela combinação de linalol e fluconazol, diante de cepa sensível a fluconazol (MANOHARAN et al. 2017).

A inibição na formação de biofilmes está diretamente relacionada com a transição da forma de blastoconídeo para hifas (KAVANAUGH et al. 2014). Esta afirmativa corrobora com os resultados do presente estudo, os quais demonstraram que o linalol ou suas associações com antifúngicos são capazes de inibir a formação de tubo germinativo de *C. albicans*, como também inibição da formação de biofilme ou do biofilme já formado em diversas espécies de *Candida*.

De acordo com Koo e colaboradores (2017), a formação de biofilme por cepas de *Candida* é relatada como uma das principais causas de resistência a uma ou mais classes de antifúngicos e essa resistência representa um importante desafio para o tratamento dessas infecções. Esse relato corrobora aos resultados encontrados nesse estudo, uma vez que as espécies de *Candida* se mostraram resistentes aos azólicos e algumas espécies a micafungina, e em sua grande maioria produziram biofilmes.

Até o presente, não se tem conhecimento de publicações a cerca da atividade das associações do linalol com antifúngicos, em concentrações sub-inibitórias, sobre a inibição na formação de biofilmes e sobre o biofilme formado de espécies de *Candida* resistentes aos azólicos.

A atividade das associações do linalol com antifúngicos sobre células planctônicas bem como sobre os biofilmes, contribuem para abrir uma nova

perspectiva para novos tratamentos buscando redução da toxicidade. Esse pensamento anterior que indicou a necessidade de estudos de combinação *in vitro*, com o objetivo de reduzir a concentração de linalol e dos antifúngicos, mantendo a atividade anti-*Candida*, porém buscando redução da toxicidade (SINGULANI et. al, 2018).

Neste estudo, não foi observada citotoxicidade do linalol e de suas associações com fluconazol, itraconazol, cetoconazol, terconazol, micafungina e anfotericina B frente as células Vero (células renais de macaco-verde africano) e L929 (fibroblasto de camundongos), com destaque para as combinações de linalol com cetoconazol, micafungina e anfotericina B. Estes resultados corroboram aos estudos realizados por Souza et al. (2016); Singulani et. al (2018) e Cardoso et. al (2016), que relataram não encontrar efeito citotóxico diante das linhagens celulares GM07492A (fibroblastos de pulmão humano), V79 (fibroblastos de pulmão de hamster) e RAW 264.7 (macrófagos de ratos), respectivamente, em concentrações de 32 a 64 µg/mL. Além disso, Singulani et al. (2018) ainda relataram não encontrar genotoxicidade pelo protocolo de formação de micronúcleos e embriotoxicidade do linalol diante de zebrafish em concentrações de 32 a 64 µg/mL.

A citotoxicidade dos agentes antifúngicos sobre as células renais de macaco-verde africano (células Vero) foi relatada anteriormente por Correa e colaboradores (2018), que apresentaram alta toxicidade do fluconazol com 85 % de inibição de células Vero na concentração de 1306 µM.

Kagan e colaboradores (2012) relataram alta toxicidade da anfotericina B sobre células Vero, onde cerca de 4 µg/mL de anfotericina B foi capaz de inibir cerca de 30 a 35 % dessas células. Os resultados encontrados neste estudo demonstraram que a anfotericina B na concentração de 0,25 µg/mL, associada ao linalol (32 µg/mL) apresentou baixa citotoxicidade diante de células Vero com inibição de 17 % desta linhagem celular.

A redução da citotoxicidade da anfotericina B é um dado importante quando analisamos a nefrotoxicidade deste antifúngico, que segundo Cavassin e colaboradores (2021) é um fator limitante do uso deste antifúngico em concentrações terapêuticas. Além disso, as concentrações sub-inibitórias em associação foram capazes de inibir das espécies de *Candida*, a formação do tubo germinativo e o biofilme, provando que o estudo de associações com antifúngicos convencionais são importantes na busca da redução da concentração terapêutica

eficaz e da toxicidade destes agentes.

A atividade das associações linalol-antifúngicos avaliadas em concentrações sub-inibitórias representam um achado importante deste estudo, uma vez que ficou evidente que estas associações são capazes de reverter a sensibilidade da maioria das cepas de *Candida*, inibir da formação de tubo germinativo de *C. albicans*, inibir a formação de biofilme, além de desestruturar os biofilmes formados pelas espécies de *Candida*, apresentando baixa citotoxicidade diante de linhagens celulares Vero e L929.

7 CONCLUSÃO

- As cepas das espécies de *Candida* ensaiadas neste estudo apresentaram resistência aos azólicos e sensibilidade a classe dos polienos (anfotericina B e nistatina) pelo método de disco difusão em meio sólido.
- O linalol demonstrou melhor atividade diante de cepas de *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans* ensaiadas neste estudo, quando comparado com os monoterpenos eucaliptol e limoneno;
- O monoterpeno linalol apresentou atividade anti-*Candida in vitro* obtidas de amostras clínicas e resistentes a antifúngicos azólicos;
- As associações de linalol com fluconazol, cetoconazol, itraconazol, terconazol, micafungina e anfotericina B apresentam em sua maioria com efeito sinérgico sobre espécies de *Candida*, sendo que nenhuma das associações apresentou efeito antagônico;
- O linalol não tem como alvo de ação a parede celular das espécies de *Candida*;
- O linalol na concentração da CIM e as associações *in vitro* de linalol com fluconazol, micafungina e anfotericina B atuam na inibição da formação de tubo germinativo de cepas de *Candida albicans* resistentes aos antifúngicos azólicos;
- O linalol avaliado na CIM, em concentrações sub-inibitórias e as associações *in vitro* de linalol com fluconazol, micafungina e anfotericina B tem potencial de redução da formação de biofilme e atividade diante de biofilmes formados de espécies de *Candida*, especialmente para *C. albicans* e *C. parapsilosis*;
- O linalol na concentração da CIM, bem como em concentrações sub-

inibitórias, isolado e em combinação com os antifúngicos azólicos, micafungina e anfotericina B não apresentou citotoxicidade diante das linhagens celulares Vero e L929;

- Este estudo apresenta resultados preliminares de atividade do linalol diante de cepas de diferentes espécies de *Candida* resistentes aos azólicos, dessa forma são necessários estudos de tecnologia farmacêutica, estudos de formulações e vias de administração, além de ensaios clínicos mais aprofundados para que os produtos testados sejam aplicados como tratamento de infecções causadas por cepas de *Candida*.

REFERÊNCIAS

- AKINS, R. A. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 43, n. 4, p. 285-318, 2005.
- AL-HATMI, A. M. S.; MOHSIN, J.; AL-HURAIZI, A.; KHAMIS, F. COVID-19 associated invasive candidiasis. **Journal of Infection**, v. 82, n. 2, p. e45-e46, 2021.
- ALLEY, M. C.; SCUDIERO, D. A.; MONKS, A.; Hursey, M. L.; Czerwinski, M. J.; Fine, D. L.; Abbott, B. J.; Mayo, J. G.; Shoemaker, R. H.; Boyd M. R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, v. 48, p. 589- 601, 1988.
- AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 999-1008, 2006.
- ALVES, M.; GONÇALVES, M. J.; ZUZARTE, M.; ALVES-SILVA, J. M; CAVALEIRO C.; CRUZ, M. T.; SALGUEIRO, L. Unveiling the antifungal potential of two Iberian thyme essential oils: effect on *C. albicans* germ tube and preformed biofilms. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. 446, p. 1-11, 2019.
- ÂMBAR, K.; AIJAZ, U. M.; IMMACULATA X.; LUQMAN K. A.; NIKHAT M. Anti-*Candidal* effect of *Ocimum sanctum* essential oil and its synergy with fluconazole and ketoconazole. **Phytomedicine**, v. 17, p. 921-925, 2010.
- API, A.M.; BELSITO, D.; BHATIA, S.; BRUZE, H.; CALOW, P.; DAGLI, M.L.; DEKANT, W.; FRYER, A.D.; KROMIDAS, G.; LA CAVA, S.; LALKO, J.F.; LAPCZYNSKI, U.M.; LIEBLER, C.D.; MIYACHI, Y.; POLITANO, V.T.; RITACCO, G.; SALVITO, D.; SHEN, J.; SCHULTZ, T.W.; SIPES, I.G.; PAREDE, B.; WILCOX, D.K. RIFM fragrance ingredient safety assessment, Linalol, CAS registry number 78-70-6. **Food Chemistry Toxicology**, v. 82, p. S29-S38, 2015.
- APROTOSOAIE, A. C.; HÂNCIANU, M.; COSTACHE, I. I.; MIRON, A. Linalol: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 29, n. 4, p. 193-219, 2014.
- ARENDRUP, M. C.; PATTERSON, T. F. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms and treatment. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, p. S445-S451, 2017.
- BANERJEE, A.; SHARKEY, T. D. Methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway metabolic regulation. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 8, p. 1043-1055, 2014.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. **Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica**/Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Brasília: Anvisa, 2013. 46p.
- BALASHOV, S. V.; PARK, S.; PERLIN, D.S. Assessing resistance to the echinocandin antifungal drug caspofungin in *Candida albicans* by profiling mutations in *FKS1*. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, v. 50, p. 2058–2063, 2006.

BHATTACHARYA, S.; SAE-TIA, S.; FRIES, B. C. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 312, 2020.

BENNETT, J. E. Flucitosina. **Annals of Internal Medicine**, v. 86, n. 3, p. 319-322, 1977.

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

BHATTI, H. N.; KHAN, S. S.; KHAN, A.; RANI, M.; AHMAD, V. U.; CHOUDHARY, M. I. Biotransformation of monoterpenoids and their antimicrobial activities. **Phytomedicine**, v. 21, p. 1597-1626, 2014.

BIAN, G.; DENG, Z.; LIU, T. Strategies for terpenoid overproduction and new terpenoid discovery. **Current Opinion in Biotechnology**, n. 48, p. 234-241, 2017.

BIRNBAUM, J. E. Pharmacology of the allylamines. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 23, n. 4, p. 782-785, 1990.

BLASKO, Á.; GAZDAG, Z.; GRÓF, P.; MÁTÉ, L.; SÁROSI, S.; KRISCH, J.; VÁGVÖLGYI, C.; MAKSZIN, G.; PESTI, H. Effects of clary sage oil and its main components, linalol and linalyl acetate, on the plasma membrane of *Candida albicans*: an in vivo EPR study. **Apoptosis**, v. 22, p. 175-187, 2017.

BULATOVA, N. R.; DARWISH, R. M. Effect of chemosensitizers on minimum inhibitory concentrations of fluconazole in *Candida albicans*. **Medical Principles and Practice**, v. 17, n. 2, p. 117-121, 2008.

CALDERONE, R. A.; CLANCY, C. J. (Ed.). **Candida and candidiasis**. American Society for Microbiology Press, 2011.

CALABRESE, D.; BILLE, J.; SANGULARD, D. A novel multidrug efflux transporter gene of the major facilitator superfamily from *Candida albicans* (*FLU1*) conferring resistance to fluconazole. **Microbiology**, v. 146, p. 2743-2754, 2000.

CAMBUIM, I. I.; MACÊDO, D. P.; DELGADO, M.; LIMA, K. M.; MENDES, G. P.; SOUZA-MOTTA, C. M.; LIMA, D. M.; FERNANDES, M. J.; MAGALHÃES, O. M.; QUEIROZ, L. A.; NEVES, R. P. Clinical and mycological evaluation of onychomycosis among Brazilian HIV/AIDS patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 40-42, 2011.

CAMPO, V. L.; CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 425-430, 2007.

CARDOSO, N. N.; ALVIANO, C. S.; BLANK, A. F.; ROMANOS, M. T.; FONSECA, B. B.; ROZENTAL, S.; RODRIGUES, I. A.; ALVIANO, D. S. Synergism effect of the essential oil from *Ocimum basilicum* var. Maria Bonita and its major components with fluconazole and its influence on ergosterol biosynthesis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1-12, 2016.

CAROLUS, H.; PIERSON, S.; LAGROU, K.; DIJCK, P. V. Amphotericin B and Other Polyenes—Discovery, Clinical Use, Mode of Action and Drug Resistance. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 321, 2020.

- CASTANHEIRA, M.; MESSER, S. A.; RHOMBERG, P. R.; PFALLER, M.A. Antifungal susceptibility patterns of a global collection of fungal isolates: results of the SENTRY Antifungal Surveillance Program (2013). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 85, p. 200-204, 2016.
- CAVASSIN, F. B.; BAÚ-CARNEIRO, J. L.; VILAS-BOAS, R. R.; QUEIROZ-TELLES, F. Sixty years of Amphotericin B: An Overview of the Main Antifungal Agent Used to Treat Invasive Fungal Infections. **Infectious Diseases and Therapy**, p. 1-33, 2021.
- CAUCHIE, M.; DESMET, S.; LAGROU, K. *Candida* and its dual lifestyle as a commensal and a pathogen. **Research in Microbiology**, v. 168, n. 9-10, p. 802-810, 2017.
- CHO, S. Y.; JUN, H. J.; LEE, J. H.; JIA, Y.; KIM, K. H.; LEE, S. J. Linalol reduces the expression of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase via sterol regulatory element binding protein-2-and ubiquitin-dependent mechanisms. **FEBS letters**, v. 585, p. 3289-3296, 2011.
- CLSI, 2017a. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts - Fourth Edition. CLSI Standard M27. Clinical and Laboratory Institute, Wayne, Pennsylvania, USA.
- CLSI, 2017b. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts - First Edition. CLSI Standard M60. Clinical and Laboratory Institute, Wayne, Pennsylvania, USA.
- COHEN, B. E. Amphotericin B membrane action: role for two types of ion channels in eliciting cell survival and lethal effects. **The Journal of Membrane Biology**, v. 238, n. 1-3, p. 1-20, 2010.
- COLE, G.T.; HALAWA, A.A.; ANAISSIE, E.J. The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside. **Clinical Infection Diseases**, v. 22, p. S73–S88, 1996, Suppl. 2.
- CORREA, R. M. S.; MOTA, T. C.; GUIMARÃES, A. C.; BONFIM, L. T.; BURBANO, R. R.; BAHIA, M. O. Cytotoxic and Genotoxic Effects of Fluconazole on African Green Monkey Kidney (Vero) Cell Line. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.
- DEHSHEIKH, A. B.; SOURESTANI, M. M.; DEHSHEIKH, P. B.; MOTTAGHIPISHEH, J.; VITALINI, S.; IRITI, M. Monoterpenes: Essential oil components with valuable features. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 20, n. 11, p. 958-974, 2020.
- DENNING, D. W. Echinocandin antifungal drugs. **Lancet**, v. 362, n. 9390, p. 1142-1151, 2003.
- DERMAWAN, J. K. T.; GHOSH, S.; KEATING, M. K.; GOPALAKRISHNA, K. V.; MUKHOPADHYAY, S. *Candida pneumonia* with severe clinical course, recovery with antifungal therapy and unusual pathologic findings: A case report. **Medicine**, v. 97, n.2, p. e9650, 2018.
- DIAS, I. J.; TRAJANO, E. R. I. S.; CASTRO, R. D.; FERREIRA, G. L. S.; MEDEIROS, H. C. M.; GOMES, D. Q. C. Antifungal activity of linalol in cases of *Candida* spp. isolated from individuals with oral candidiasis. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, p. 368-374, 2018.

DICK, J.D.; MERZ, W.G.; SARAL, R. Incidence of polyene-resistant yeasts recovered from clinical specimens. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 18, p. 158-63, 1980.

DOI, A.M.; PIGNATARI, A.C.; EDMOND, M.B.; MARRA, A.R.; CAMARGO, L.F.; SIQUEIRA, R.A.; MOTA, V.P.; COLOMBO, A.L. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0146909, 2016.

DONELLI, D.; ANTONELLI, M.; BELLINAZZI, C.; GENSINI, G. F.; FIRENZUOLI, F. Effects of lavender on anxiety: a systematic review and meta-analysis. **Phytomedicine**, v. 65, p. 153099, 2019.

EDDOUZI, J.; PARKER, J. E.; VALE-SILVA, L.A.; COSTE, U.M.; ISCHER, F.; KELLY, S.; MANAI, H.; SANGIARD, D. Molecular mechanisms of drug resistance in clinical *Candida* species isolated from Tunisian hospitals. . **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 3182–3193, 2013.

EFIMOVA, S. S.; SCHAGINA, L. V.; OSTROUMOVA, O. S. Investigation of channel-forming activity of polyene macrolide antibiotics in planar lipid bilayers in the presence of dipole modifiers. **Acta Naturae**, v. 6, n. 4 (23), 2014.

EMRI, T.; MAJOROS, L.; TÓTH, V.; PÓCSI, I. Echinocandins: production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 8, p. 3267-3284, 2013.

EL-GOHARY M.; VAN ZUUREN, E.J.; FEDOROWICZ, Z.; BURGESS, H.; DONEY, L.; STUART, B.; MOORE, M.; LITTLE, P. Topical antifungal treatments for *Tinea cruris* and *Tinea corporis*. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 4, n. 8, p. CD009992, 2014.

ELLEPOLA, A. N. B.; SAMARANAYAKE, L. P. The effect of limited exposure to antifungal agents on the germ tube formation of oral *Candida albicans*. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 27, n. 5, p. 213-219, 1998.

FERNANDES, T.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. *Candida tropicalis* biofilm's matrix— involvement on its resistance to amphotericin B. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 83, n. 2, p. 165-169, 2015.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 623–633, 2010.

FLING, M. E.; KOPF, J.; TAMARKIN, A.; GORMAN, J. A.; SMITH, H. A.; KOLTIN, Y. Analysis of a *Candida albicans* gene that encodes a novel mechanism for resistance to benomyl and methotrexate. **Molecular & General Genetics**, v. 227, p. 318–329, 1991.

FIDEL, P. L.; VAZQUEZ, J.A.; SOBEL, J. D. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 80–96, 1999.

FUJII, S.; YABE, K.; KARIWANO-KIMURA, Y.; FURUKAWA, M.; ITOH, K.; MATSUURA, M.; HORIMOTO, M. Developmental toxicity of flucytosine following administration to pregnant rats at a specific time point of organogenesis. **Congenital anomalies**, v. 59, n. 2, p. 39-42, 2019.

FUJIWARA, G. M.; ANNIES, V.; OLIVEIRA, C. F.; LARA, R. A.; GABRIEL, M. M.; BETIM, F. C.; NADAL, J. M.; FARAGO, P. V.; DIAS, J. F.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; MARQUES, F. A.; ZANIN, S. M. Evaluation of larvicidal activity and ecotoxicity of linalol, methyl cinnamate and methyl cinnamate/linalol in combination against *Aedes aegypti*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, p. 238-244, 2017.

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

GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 7, p. 408-414, 2007.

GERSHENZON, J., CROTEAU, R. Terpenoid biosynthesis: the basic pathway and formation of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes, In: (Vol. 333). CRC Press, Boca Raton, FL. (1993).

GINGLINGER, J. F.; BOACHON, B.; HÖFER, R.; PAETZ, C.; KÖLLNER, T. G.; MIESCH, L.; LUGAN, R.; BALTENWECK, R.; MUTTERER, J.; ULLMANN, P.; BERAN, F.; CLAUDEL, P.; VERSTAPPEN, F.; FISCHER, M. J.; KARST, F.; BOUWMEESTER, H.; MIESCH, M.; SCHNEIDER, B.; GERSHENZON, J.; EHLTING, J.; WERCK-REICHHART, D. Gene coexpression analysis reveals complex metabolism of the monoterpene alcohol linalol in *Arabidopsis* flowers. **The Plant Cell**, v. 25, n. 11, p. 4640-4657, 2013.

GONZALEZ-LARA, M. F.; OSTROSKY-ZEICHNER, L. Invasive candidiasis. In: **Seminars in respiratory and critical care medicine**. Thieme Medical Publishers, p. 3-12, 2020.

GUO, F.; LIANG, Q.; ZHANG, M.; CHEN, W.; CHEN, H.; YUN, Y.; ZHONG, Q.; CHEN, W. Antibacterial Activity and Mechanism of Linalool against *Shewanella putrefaciens*. **Molecules**, v. 26, n. 1, p. 245, 2021.

HAMMOND, SM i. Biological Activity of Polyene Antibiotics. In: Progress in medicinal chemistry. Elsevier, 1977. p. 105-179.

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

HELLSTEIN, J. W.; MAREK, C. L. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. **Head and Neck Pathology**, v. 13, n. 1, p. 25-32, 2019.

HENRY, K. W.; NICKELS, J. T.; EDLIND, T. D. Upregulation of ERG genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 10, p. 2693-2700, 2000.

HOOG, G. S., GUARRO, J., GENÉ, J., AHMED, S., AL-HATMI, A. M. S., FIGUERAS, M. J., & VITALE, R. G. (2019). **Atlas of Clinical Fungi**, 3rd e-edition. Utrecht / Reus.

Disponível em: <https://www.clinicalfungi.org/>

HSU, C.; LAI, W.; CHUANG, K.; LEE, M.; TSAI, Y. The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 51, n. 5, p. 473-482, 2013.

IVANOV, M.; KANNAN, A.; STOJKOVIĆ, D. S.; GLAMOČLIJA, J.; CALHELHA, R. C.; FERREIRA, I. C. F. R.; SANGULAR, D.; SOKOVIĆ, M. Camphor and eucalyptol—anti-*Candida* spectrum, antivirulence effect, efflux pumps interference and cytotoxicity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 483, 2021.

JANA, S.; PATRA, K.; SARKAR, S.; JANA, J.; MUKHERJEE, G.; BHATTACHARJEE, S.; MANDAL, D. P. Antitumorigenic potential of linalol is accompanied by modulation of oxidative stress: an in vivo study in sarcoma-180 solid tumor model. **Nutrition and Cancer**, v. 66, n. 5, p. 835-848, 2014.

KAGAN, S.; ICKOWICZ, D.; SHMUEL, M.; ALTSCHULER, Y.; SIONOV, E.; PITUSI, M.; WEISS, A.; FARBER, S.; DOMB, A. J.; POLACHEK, I. Toxicity mechanisms of amphotericin B and its neutralization by conjugation with arabinogalactan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 5603-5611, 2012.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 1, p. 120-128, 2008.

KAVANAUGH, N. L.; ZHANG, A. Q.; NOBILE, C. J.; JOHNSON, A. D.; RIBBECK, K. Mucins suppress virulence traits of *Candida albicans*. **MBio**, v. 5, n. 6, p. e01911-14, 2014.

KELLY, S. L.; LAMB, D. C.; KELLY, D. E.; LOEFFLER, J.; EINSELE, H. Resistance to fluconazole and amphotericin in *Candida albicans* from AIDS patients. **Lancet**, v. 348, n. 9040, p. 1523–1524, 1996.

KELLY, S. L.; LAMB, D. C.; KELLY, D. E.; MANNING, N. J.; LOEFFLER, J.; HEBART, H.; SCHUMACHER, U.; EINSELE, H. Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta-5,6-desaturation. **FEBS Letters**, v. 400, n. 1, p. 80–82, 1997.

KHAN, A.; AHMADA, A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 10, p. 816-823, 2010.

KHAN, A.; AHMAD, A.; XESS, I.; KHAN, L.A.; MANZOOR, N. *Ocimum sanctum* essential oil inhibits virulence attributes in *Candida albicans*. **Phytomedicine**, v. 21, p. 448-452, 2014.

KRISTANC, L.; BOŽIČ, B.; JOKHADAR, Š. Z.; DOLENC, M. S.; GOMIŠČEK, G. The pore-forming action of polyenes: From model membranes to living organisms. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1861, n. 2, p. 418-430, 2019.

KOO, H.; ALLAN, R. N.; HOWLIN, R. P.; STOODLEY, P.; HALL-STOODLEY, L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. **Nature**

Reviews Microbiology, v. 15, n. 12, p. 740, 2017.

KORDALEWSKA, M.; LEE, A.; PARK, S.; BERRIO, I.; CHOWDHARY, A.; ZHAO, Y.; PERLIN, D. S. Understanding echinocandin resistance in the emerging pathogen *Candida auris*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 6, p. e00238-18, 2018.

KNOKE, M.; BERNHARDT, H. The first description of an oesophageal candidosis by Bernhard von Langenbeck in 1839. **Mycoses**, v. 49, n. 4, p. 283–287, 2006.

KULLBERG, B. J., ARENDRUP, M. C. Invasive candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 15, p. 1445-1456, 2015.

KYRIAKIDIS, I.; TRAGIANNIDIS, A.; MUNCHEN, S.; GROLL, A. H. Clinical hepatotoxicity associated with antifungal agents. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 16, n. 2, p. 149-165, 2017.

LANSBURY L.; LIM B.; BASKARAN V.; LIM W.S. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Infection**, v. 81, n.2, p. 266–275, 2020.

LIAO, P.; HEMMERLIN, A.; BACH, T. J.; CHYE, M. L. The potential of the mevalonate pathway for enhanced isoprenoid production. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 697-713, 2016.

LIMA, I. O.; PEREIRA, F. O.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, E. O.; MENEZES, E. A.; CUNHA, F. A.; DINIZ, M. F. F. M. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. **Journal of Essential Oil Research**, v. 25, n. 2, p. 138-142, 2013.

LIMA, M. I. O. et al. Investigation of the antifungal potential of linalool against clinical isolates of fluconazole resistant *Trichophyton rubrum*. *Journal de mycologie medicale*, v. 27, n. 2, p. 195-202, 2017.

LINES, A.; VARDI-FLYNN, I.; SEARLE, C. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **bmj**, v. 369, 2020.

LIU, J. F.; XIA, J. J.; NIE, K. L.; WANG, F.; DENG, L. Outline of the biosynthesis and regulation of ergosterol in yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 7, p. 98, 2019.

LIU, X.; CAI, J.; CHEN, H.; ZHONG, Q.; HOU, Y.; CHEN, W.; CHEN, W. Antibacterial activity and mechanism of linalool against *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial pathogenesis**, v. 141, p. 103980, 2020.

LORIAN, V. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 5. ed. France: Lippincott Williams & Wilkins, 832 p., 2005.

LV, Q.; YAN, L.; JIANG, Y. The synthesis, regulation, and functions of sterols in *Candida albicans*: Well-known but still lots to learn. **Virulence**, v. 7, n. 6, p. 649-659, 2016.

MAEHARA, Y.; OKI, E.; SAEKI, H.; TOKUNAGA, E.; KITAO, H.; IIMORI, M.; NIIMI, S.; KATAOKA, Y.; EMI, Y.; KAKEJI, Y.; BABA, H.; SHIRASAKA, T. Evolving 5-

Fluorouracil Therapy to Achieve Enhanced Efficacy-Past and Current Efforts of Researchers. **Cancer & Chemotherapy**, v. 43, n. 7, p. 845-854, 2016.

MANOHARAN, R. K.; LEE, J. H.; KIM, Y. G.; KIM, S. I.; LEE, J. Inhibitory effects of the essential oils α -longipinene and linalol on biofilm formation and hyphal growth of *Candida albicans*. **Biofouling**, v. 33, p. 143-155, 2017.

MARICHAL, P. 1.; KOYMANS, L.; WILLEMSSENS, S.; BELLENS, D.; VERHASSELT, P.; LUYTEN, W.; BORBERS, M.; RAMAEKERS, F. C. S.; ODDS, F. C.; VANDEN BOSSCHE, H. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 α -demethylase (*Erg11p*, *Cyp51p*) to azole resistance in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 145, n. 10, p. 2701-2713, 1999.

MARTINS, N.; FERREIRA, I. C.; BARROS, L.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. Candidiasis: predisposing factors, prevention, diagnosis and alternative treatment. **Mycopathology**, v. 177, n. 5-6, p. 223-240, 2014.

MÁTÉ, G.; KOVÁCS, D.; GAZDAG, Z.; PESTI, M.; SZÁNTÓ, Á. Linalol-induced oxidative stress processes in the human pathogen *Candida albicans*. **Acta Biologica Hungarica**, v. 68, p. 220-231, 2017.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

MELO, A. S.; COLOMBO, A. L.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A. Paradoxical growth effect of caspofungin observed on biofilms and planktonic cells of five different *Candida* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3081-3088, 2007.

MEWALAL, R.; RAI, D. K.; KAINER, D.; CHEN, F.; KÜLHEIM, C.; PETER, G. F.; TUSKAN, G. A. Plant-derived terpenes: a feedstock for specialty biofuels. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n.3, p. 227-240, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MONOD, M.; BORG-VON ZEPELIN, M. Secreted aspartic proteases as virulence factors of *Candida* species. **Biological Chemistry**, v. 383, n. 7-8, p. 1087-1093, 2002.

MORSCHHAUSER, J.; BARKER, K.; LIU, T.; BLA, B.; HOMAYOUNI, R.; ROGERS, P. The transcription factor *Mrr1p* controls expression of the *MDR1* efflux pump and mediates multidrug resistance in *Candida albicans*. **PLoS Pathog**, v. 3, p. e164, 2007.

MODRZEWSKA, B.; KURNATOWSKI, P. Selected pathogenic characteristics of fungi from the genus *Candida*. **Annals Parasitology**, v. 59, n. 2, p. 57-66, 2013.

MUÑOZ, J.; ROSSI, D. C. P.; JABES, D. L.; BARBOSA, D. A.; CUNHA, F. F. M.; NUNES, L. R.; ARRUDA, D. C.; TABORDA, C. P. *In Vitro* and *In Vivo* Inhibitory Activity of Limonene against Different Isolates of *Candida* spp. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 183, 2020.

MUNUSAMY, K.; VADIVELU, J.; TAY, S. T. A study on *Candida* biofilm growth characteristics and its susceptibility to aureobasidin A. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 35, n. 2, p. 68-72, 2018.

NIIMI, K.; MAKI, K.; IKEDA, F.; HOLMES, A. R.; LAMPING, E.; NIIMI, M.; MONK, B. C.; CANNON, R. D. Overexpression of *Candida albicans* *CDR1*, *CDR2*, or *MDR1* does not produce significant changes in echinocandin susceptibility. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, p. 1148–1155, 2006.

NIVOIX, Y.; LEDOUX, M.; HERBRECHT, R. Antifungal therapy: new and evolving therapies. In: Seminars in respiratory and critical care medicine. **Thieme Medical Publishers**, p. 158-174, 2020.

NOCUA-BÁEZ, L. C.; URIBE-JEREZ, P.; TARAZONA-GUARANGA, L.; ROBLES, R. CORTÉS, J. A. Azoles of then and now: a review. **Revista chilena de infectología: organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectología**, v. 37, n. 3, p. 219-230, 2020.

ODDS, F.C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 52, p. 1, 2003.

ONISHI, J.; MEINZ, M.; THOMPSON, J.; CUROTTO, J.; DREIKORN, S.; ROSENBACH, M.; DOUGLAS, C.; ABRUZZO, G.; FLATTERY, A.; KONG, L.; CABELLO, A.; VICENTE, F.; PELAEZ, F.; DIEZ, M. T.; MARTIN, I.; BILLS, G.; GIACOBBE, R.; DOMBROWSKI, A.; SCHWARTZ, R.; MORRIS, S.; HARRIS, G.; TSIPOURAS, A.; WILSON, K.; KURTZ, M. B. Discovery of novel antifungal (1, 3)- β -D-glucan synthase inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 368-377, 2000.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D. R.; CLANCY, C. J.; MARR, K. A.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A. C.; SCHUSTER, M. G.; VAZQUEZ, J. A.; WALSH, T. J.; ZAOUTIS, T. E.; SOBEL, J. D. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, p. e1–50, 2016.

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

PARK, S.; KELLY, R.; KAHN, J. N.; ROBLES, J.; HSU, M. J.; REGISTER, E.; LI, W.; VYAS, V.; FAN, H.; ABRUZZO, G.; FLATTERY, A.; GILL, C.; CHREBET, G.; PARENT, S. A.; KURTZ, M.; TEPLER, H.; DOUGLAS, C. M.; PERLIN, D. S. Specific substitutions in the echinocandin target *Fks1p* account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 3264–3273, 2005.

PEREIRA, I.; SEVERINO, P.; SANTOS, A. C.; SILVA, A. M.; SOUTO, E. B. Linalool bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 171, p. 566-578, 2018.

PEREIRA, R.; SANTOS, R. O. F.; BRITO, E. H. S.; MORAIS, S. M. Biofilm of *Candida albicans*: Formation, regulation and resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 1, p. 11-22, 2021.

PERLIN D. S. Current perspectives on echinocandin class drugs. **Future Microbiology**, v. 6, p. 441–457, 2011.

PERLIN, D. S. Echinocandin resistance in *Candida*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, p. S612-S617, 2015, Suppl 6.

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

PERLROTH, J.; CHOI, B.; SPELLBERG, B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Medical Mycology**, n. 45, p. 321–346, 2007.

PETERSON, E. M.; CALDERONE, R. A. Growth inhibition of *Candida albicans* by rabbit alveolar macrophages. **Infection and Immunity**, n. 15, p. 910-915, 1977.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A.; ELLIS, D.; TULLIO, V.; RODLOFF, A.; FU, W.; LING, T. A. and the Global Antifungal Surveillance Group. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 48, p. 1366-1377, 2010.

PFALLER, M.; MURRAY, P.; ROSENTHAL, K. Microbiologia médica. 2014.

PIERCE, C. G.; UPPULURI, P.; TUMMALA, S.; LOPEZ-RIBOT, J. L. A 96 well microtiter plate-based method for monitoring formation and antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 44, p. 2287, 2010.

POLKE, M.; HUBE, B.; JACOBSEN, I. D. *Candida* survival strategies. **Advances in Applied Microbiology**, n. 91, p. 139-235, 2015.

POULAIN, D. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 208-217, 2015.

POURAKBARI, B.; TEYMURI, M.; MAHMOUDI, S.; K VALIAN, S.; MOVAHEDI, Z.; ESHAGHI, H.; MAMISHI, S. Expression of major efflux pumps in fluconazole-resistant *Candida albicans*. **Infectious Disorders-Drug Targets**, v. 17, n. 3, p. 178-184, 2017.

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

PRASAD, R., RAWAL, M.K. Efflux pump proteins in antifungal resistance. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, p. 202, 2014.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 792-798, 2019.

POLAK, A.; SCHOLER, H. J. Mode of action of 5-fluorocytosine and mechanisms of resistance. **Chemotherapy**, v. 21, p. 113–30, 1975.

QUILES-MELERO, I.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, J. Antifúngicos de uso sistémico. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 38, n. 2, p. 42-46, 2021.

RAGUSO, R. A. More lessons from linalool: insights gained from a ubiquitous floral volatile. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 32, p. 31-36, 2016.

RAUT, J. S.; SHINDE, R. B.; CHAUHAN, N. M.; KARUPPAYIL, S. M. Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by *Candida albicans*. **Biofouling**, v. 29, p. 87-96, 2013.

RANG, H. P. et al. Farmacologia. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guabanara, Koogan AS, 2007.

RODRIGUES, M. L. The multifunctional fungal ergosterol. **MBio**, v. 9, n. 5, p. e01755-18, 2018.

RODRIGUES, C.F., RODRIGUES, M.E., SILVA, S., HENRIQUES, M. *Candida glabrata* biofilms: how far have we come? **Journal of Fungi**, v. 3, p. e11, 2017.

RUDRAMURTHY, S. M.; SHANKARNARAYAN, S. A.; DOGRA, S.; SHAW, D.; MUSHTAQ, K.; PAUL, R. A.; NARANG, T.; CHAKRABARTI, A. Mutation in the squalene epoxidase gene of *Trichophyton interdigitale* and *Trichophyton rubrum* associated with allylamine resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 5, p. e02522-17, 2018.

RUPING, M. J.; VEHRESCHILD, J. J.; CORNELLY, O. A. Patients at high risk of invasive fungal infections: when and how to treat. **Drugs**, v. 68, p. 1941–1962, 2008.

SANGLARD, D.; KUHLER, K.; ISCHER, F.; PAGANI, J. L.; MONOD, H.; BILLE, J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 2378–2386, 1995.

SANGLARD, D.; ISCHER, F.; KOYMANS, L.; BILLE J. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14alpha-demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 2, p. 241-253, 1998.

SAGATOVA, A. A. Strategies to Better Target Fungal Squalene Monooxygenase. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 1, p. 49, 2021.

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

SERHAN, G; STACK, C. M.; PERRONE, G. G.; MORTON, C. O. The polyene antifungals, amphotericin B and nystatin, cause cell death in *Saccharomyces cerevisiae* by a distinct mechanism to amphibian-derived antimicrobial peptides. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 13, n. 1, p. 18, 2014.

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 2, p. 213-267, 2011.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Micologia médica à luz de autores

contemporâneos. Guanabara Koogan, 2012.

STANLEY, V. C.; HURLEY, R. The growth of *Candida* species in cultures of mouse peritoneal macrophages. **Journal of Pathology**, n. 97, p. 357-366, 1969.

STOVER, K. R.; KING, S. T.; CLEARY, J. D. Cardiac toxicity of the echinocandins: chance or cause and effect association? **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 39, n. 1, p. 1-3, 2014.

SINGULANI, J. L.; PEDROSO, R. S.; RIBEIRO, A. B.; NICOLELLA, H. D.; FREITAS, K. S.; DAMASCENO, J. L.; VIEIRA, T. M.; CROTTI, A. E.; TAVARES, D. C.; MARTINS, C. H.; MENDES-GIANNINI, M. J.; PIRES, R.H. Geraniol and linalol anti-*Candidal* activity, genotoxic potential and embryotoxic effect on zebrafish. **Future Microbiology**, v. 13, p. 1637-1646, 2018.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.

SILVA, K. V. S.; LIMA, M. I. O.; CARDOSO, G. N.; SANTOS, A. S.; SILVA, G. S.; PEREIRA, F. O. Inibitory effects of linalool on fungal pathogenicity of clinical isolates of *Microsporium canis* and *Microsporium gypseum*. **Mycoses**, v. 60, n. 6, p. 387-393, 2017.

SILVA, A. C. L. **Atividade antifúngica do linalol sobre linhagens de *Candida albicans* E *Candida tropicalis***. Tese (Doutorado em Produtos Naturais E Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, p. 90. 2018.

SOARES, Elza. **Libertação**. Rio de Janeiro: Deck, 2019. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=6XrCS1GI2ec>. Acesso em 14/12/2021.

SOUTO-MAIOR, F. N.; FONSÊCA, D. V. D.; SALGADO, P. R. R.; MONTE, L. D. O.; SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N. Antinociceptive and anticonvulsant effects of the monoterpene linalol oxide. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 63-67, 2017.

SOKOL-ANDERSON, M. L.; BRAJTBURG, J.; MEDOFF, G. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 1, p. 76-83, 1986.

SOUZA, C. M. C.; PEREIRA JUNIOR, S. A.; MORAES, T. S.; DAMASCENO, J. L.; MENDES, S. A.; DIAS JÚNIOR, H.; STEFANI, R.; TAVARES, D. C.; MARTINS, C. H. G.; CROTTI, A. E. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; PIRES, R. H. Antifungal activity of plant-derived essential oils on *Candida tropicalis* planktonic and biofilms cells. **Medical Mycology**, v. 54, n. 5, p. 515-523, 2016.

SPELLER, D. C. E. et al. **Antifungal chemotherapy**. John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, Sussex PO19 1UD, 1980.

SUDBERY, P. E. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 737-748, 2011.

SWAMINATHAN, S.; KAMAT, S.; PINTO, N. A. Echinocandins: their role in the

management of *Candida* biofilms. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 87, 2018.

STANISZEWSKA, M. Virulence factors in *Candida* species. **Current Protein and Peptide Science**, v. 21, n. 3, p. 313-323, 2020.

TETALI, S. D. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. **Planta**, v. 249, n. 1, p. 1-8, 2019.

THAKRE, A.; ZORE, G.; KODGIRE, S.; KAZI, R.; MULANGE, S.; PATIL, R.; SHELAR, A.; SANTHAKUMARI, B.; KULKARNI, M.; KHARAT, K.; KARUPPAYIL, S. M. Limonene inhibits *Candida albicans* growth by inducing apoptosis. **Medical Mycology**, v. 56, p. 565-578, 2017.

THOMPSON, D. S.; CARLISLE, P. L.; KADOSH, D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 9, p. 1173-1182, 2011.

TORTORA, Gerard J.; CASE, Christine L.; FUNKE, Berdell R. Microbiologia-12^a Edição. Artmed Editora, 2016.

VAN'T WOUT, J. W.; MEYNAAR, I.; LINDE, I.; POELL, R.; MATTIE, H.; VAN FURTH, R. Effect of amphotericin B, fluconazole and itraconazole on intracellular *Candida albicans* and germ tube development in macrophages. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 25, n. 5, p. 803-811, 1990.

VAZQUEZ, J. A.; ARGANOZA, M. T.; BOIKOV, D.; YOON, S.; SOBEL, J. D.; AKINS, R. A. Stable phenotypic resistance of *Candida* species to amphotericin B conferred by preexposure to subinhibitory levels of azoles. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 9, p. 2690-2695, 1998.

VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, Denisse et al. Opportunistic yeast infections: candidiasis, cryptococcosis, trichosporonosis and geotrichosis. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 11, n. 5, p. 381-394, 2013.

VANDEPUTTE P, TRONCHIN G, BERGES T, HENNEQUIN C, CHABASSE D, BOUCHARA JP. Reduced susceptibility to polyenes associated with a missense mutation in the *ERG6* gene in a clinical isolate of *Candida glabrata* with pseudohyphal growth. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 982-990, 2007.

VERMITSKY, J-P.; EARHART, K. D.; SMITH, W. L.; HOMAYOUNI, R.; EDLIND, T. D.; ROGERS, P. D. *Pdr1* regulates multidrug resistance in *Candida glabrata*: gene disruption and genome-wide expression studies. **Molecular Microbiology**, v. 61, p. 704-22, 2006.

VERMES, A.; GUCHELAAR, H.-J.; DANKERT, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 171-179, 2000.

VINCENT, B. M.; LANCASTER, A. K.; SCHERZ-SHOUVAL, R.; WHITESELL, L.; LINDQUIST S. Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to amphotericin B. **PLoS Biol.**, v. 11, n. 10, p. e1001692, 2013.

VITAL JÚNIOR, A. C. **Atividade antifúngica e antibiofilme da fração Ag2 do extrato de Agelas dispar frente espécies de *Candida***. 2020. Dissertação de Mestrado. Brasil.

VIVIANI, M. A. Flucytosine—what is its future? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 35, n. 2, p. 241-244, 1995.

WANI, M. Y.; AHMAD, A.; KUMAR, S.; SOBRAL, A. J. Flucytosine analogues obtained through Biginelli reaction as efficient combinative antifungal agents. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 57-62, 2017.

WOLLAM J, ANTEBI A. Sterol regulation of metabolism, homeostasis and development. **Annual Reviews Biochemistry**, v. 80, p. 885–916, 2011.

WELLINGTON, M., KOSELYNY, K., SUTTERWALA, F. S., & KRYSAN, D. J. *Candida albicans* triggers NLRP3-mediated pyroptosis in macrophages. **Eukaryotic Cell**, v. 13, n. 2, p. 329-340, 2014.

XIE, J. L.; POLVI, E. J.; SHEKHAR-GUTURJA, T.; COWEN, L. E. Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. **Future Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 523-542, 2014.

XU, P.; WANG, K.; LU, C.; DONG, L.; GAO, L.; YAN, M.; AIBAI, S.; YANG, Y.; LIU, X. Protective effects of linalol against amyloid beta-induced cognitive deficits and damages in mice. **Life Sciences**, v. 174, p. 21-27, 2017.

YAMADA, Yuuki, et al. Novel terpenes generated by heterologous expression of bacterial terpene synthase genes in an engineered *Streptomyces* host. **The Journal of Antibiotics**, v. 68, n. 6, p. 385-394, 2015.

ZORE, G. B.; THAKRE, A. D.; JADHAV, S.; KARUPPAYIL, S. M. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. **Phytomedicine**, v. 18, p. 1181-1190, 2011.

APÊNDICE A - PRODUÇÃO CIENTÍFICA

Abaixo se encontram as produções científicas publicadas em anais de eventos correspondentes aos trabalhos de pesquisa que tiveram a participação da doutoranda Wilma Raianny Vieira da Rocha no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos sob a orientação das Professoras titulares Doutora Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque e Doutora Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes, no período de março de 2018 a setembro de 2021.

- **Artigos publicados**

ROCHA, W. R. V.; NEVES, M. L. R.; NUNES, L. E.; XIMENES, E. C. P. A.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A. Gênero *Candida* - Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT, v. 10, p. e43910414283, 2021.

NEVES, M. L. R.; NUNES, L. E.; ROCHA, W. R. V.; XIMENES, E. C. P. A.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A. A influência do quórum sensing na formação do biofilme por *Pseudomonas aeruginosa*. RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT, v. 10, p. e33910212659, 2021.

- **Resumos publicados em anais de eventos**

Anais do 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia – Maceió (AL)

Resumo 1. Modalidade: Pôster

ROCHA, W.R.V.; NEVES, M.L.R.; NUNES, L.E.; CAMPELO, P.; XIMENES, E. A. IN VITRO SYNERGISM BETWEEN 2,2-DIBROMO-3-NITRYLOPROPIONAMIDE AND OXACILLIN AGAINST METHICILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus*. In: 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019, Maceió. 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Maceió: 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019.

Resumo 2. Modalidade: Pôster

NEVES, M.L.R.; **ROCHA, W.R.V.**; NUNES, L.E.; CAMPELO, P.; XIMENES, E.A.
INHIBITION OF *Pseudomonas aeruginosa* TWITCHING MOTILITY BY 2,2-DIBROMO-3-NITRILOPROPIONAMIDE. In: 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019, Maceió. 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Maceió: 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019.

Resumo 3. Modalidade: Pôster

NEVES, M.L.R.; **ROCHA, W.R.V.**; NUNES, L.E.; CAMPELO, P.; XIMENES, E.A.
2,2-DIBROMO-3-NITRILOPROPIONAMIDE AND MEROPENEM AGAINST MULTIDRUG-RESISTANT *Pseudomonas aeruginosa* STRAINS. In: 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019, Maceió. 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2019.

Anais do I Colóquio Regional em Morfotecnologia – UFPE - publicados na Revista BIOFARM – Recife (PE)

Resumo 4. Modalidade: Pôster

ROCHA, W.R.V.; NEVES, M.L.R.; QUEIROZ, H.; SANTOS, W.; XIMENES, E. A.
ATIVIDADE BACTERICIDA DA CULTURA DE *Lactobacillus reuteri* Biogaia®
SOBRE BACTÉRIAS MULTI-DROGA RESISTENTES

Resumo 5. Modalidade: Pôster

NEVES, M.L.R.; **ROCHA, W.R.V.**; SANTOS, W.; QUEIROZ, H.; XIMENES, E. A.
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA CULTURA DE *Saccharomyces boulardii*
FRENTE A BACTERIAS MULTI-DROGA RESISTENTES

- **Resumos expandidos publicados em anais de eventos**

Anais do 1st Brazil-France Symposium on Medicinal Chemistry publicados na Revista BIOFARM – Recife (PE)

Resumo 6. Modalidade: Apresentação oral

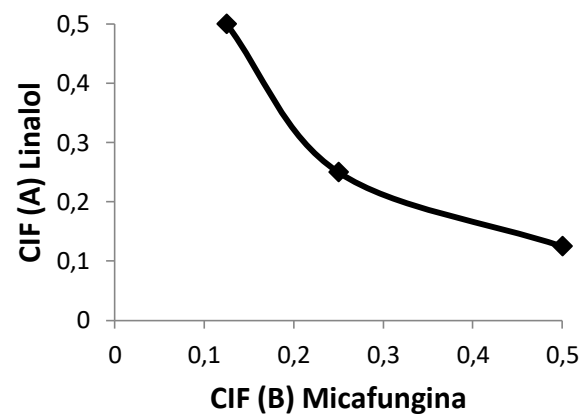
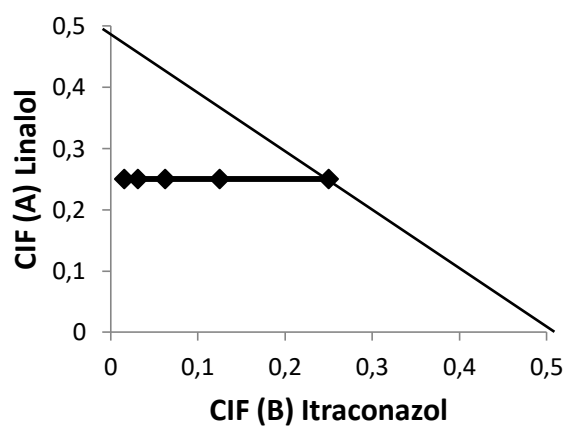
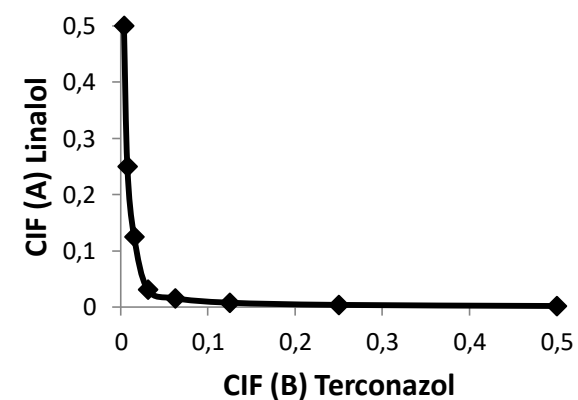
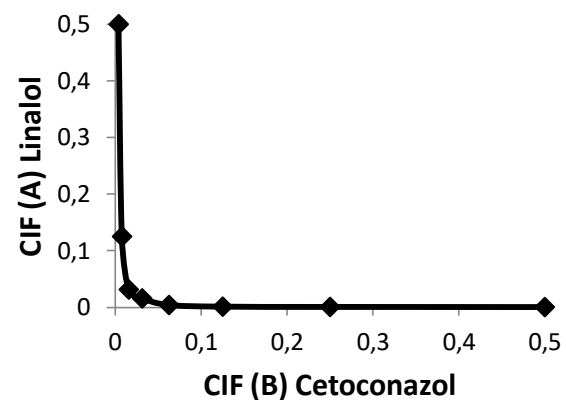
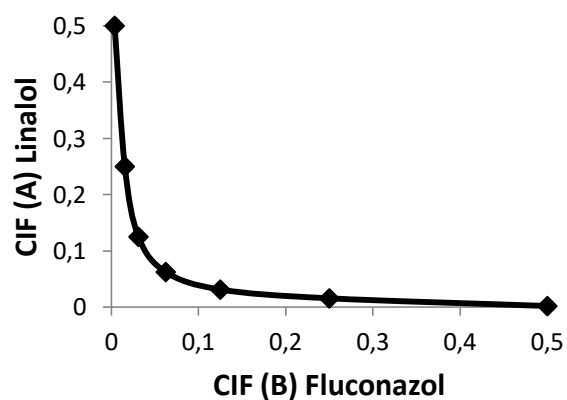
ROCHA, W.R.V.; NEVES, M.L.R.; CAMPELO, P.; XIMENES, E.A. 2,2-DIBROMO-3-NITRILOPROPIONAMIDE ACTIVITY IN SYNERGY WITH BETA-LACTAM AGAINST METHICILLIN RESISTANT *Staphylococcus aureus* STRAINS

Resumo 7. Modalidade: Poster

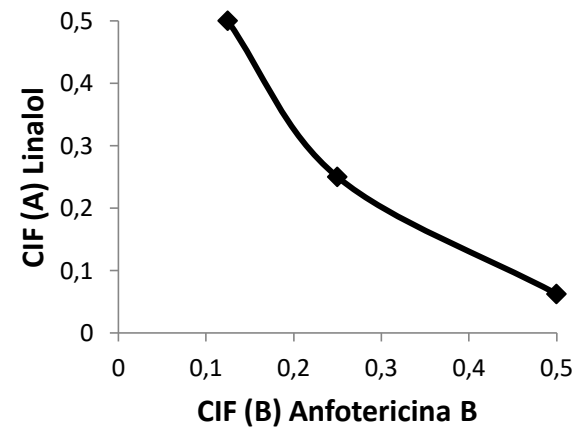
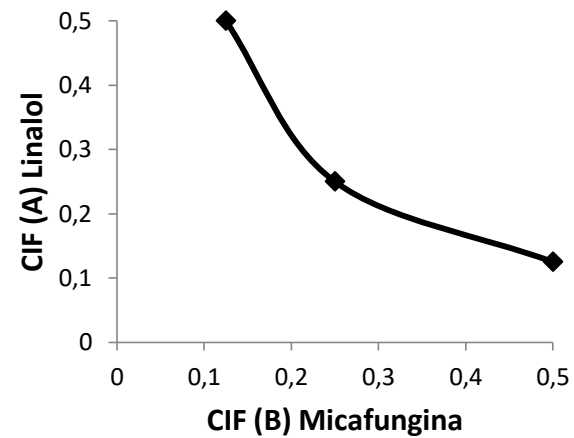
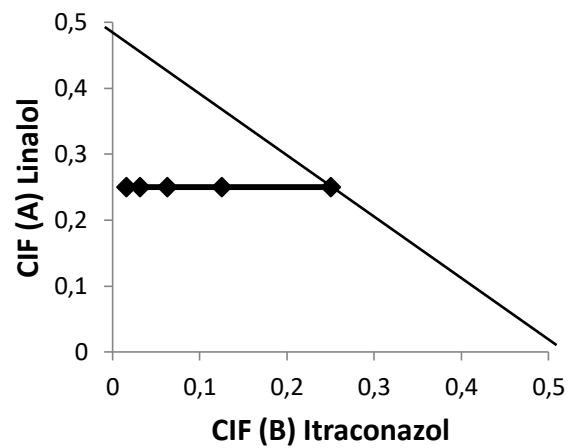
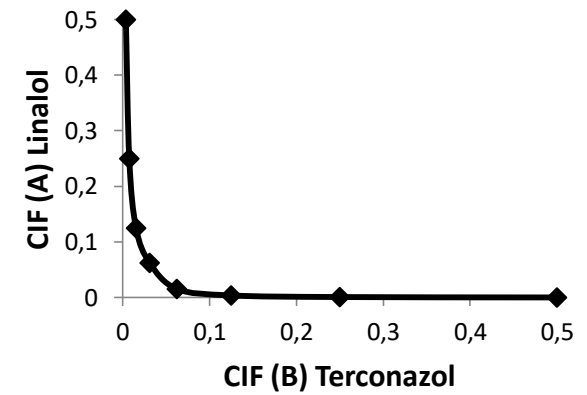
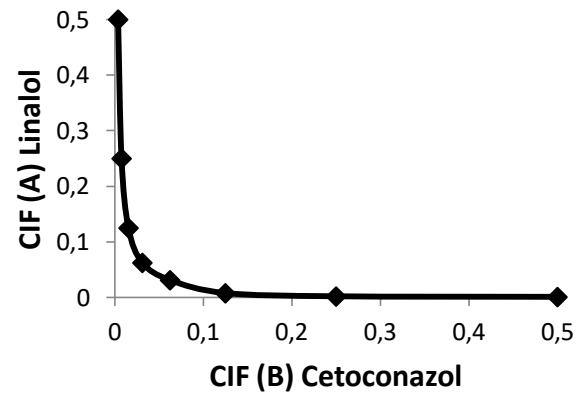
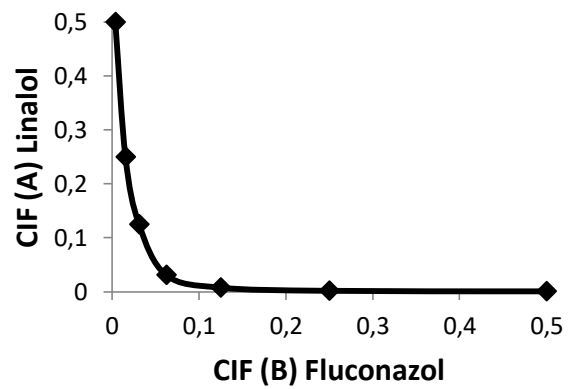
NEVES, M.L.R.; **ROCHA, W.R.V.;** CAMPELO, P.; XIMENES, E.A. 2,2-DIBROMO-3-NITRILOPROPIONAMIDE: SYNERGISTIC EFFECT WITH MEROPENEM AND INHIBITION OF TWITCHING MOTILITY ON MULTIDRUG-RESISTANT *Pseudomonas aeruginosa* STRAINS

APÊNDICE B – ISOBOLOGRAMAS DAS ASSOCIAÇÕES DE LINALOL COM ANTIFÚNGICOS SOBRE *Candida albicans*

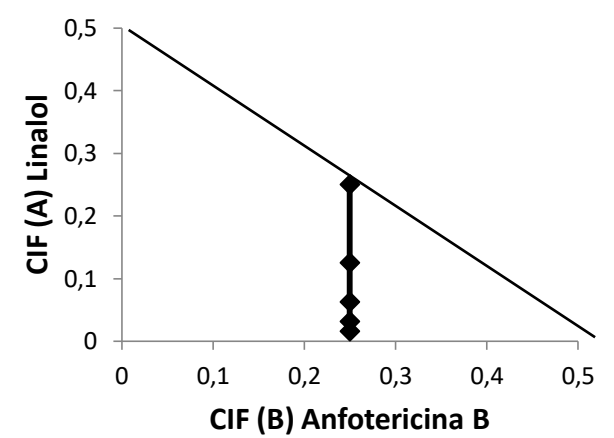
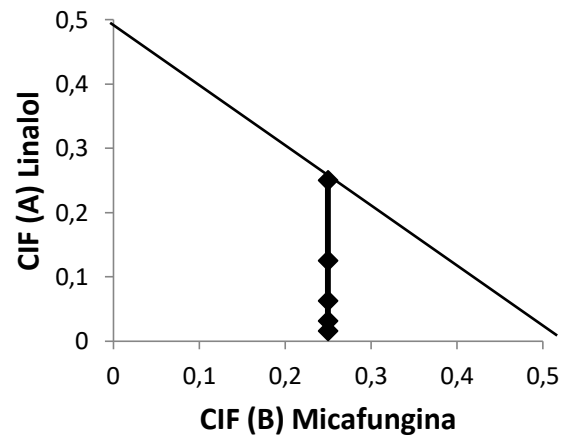
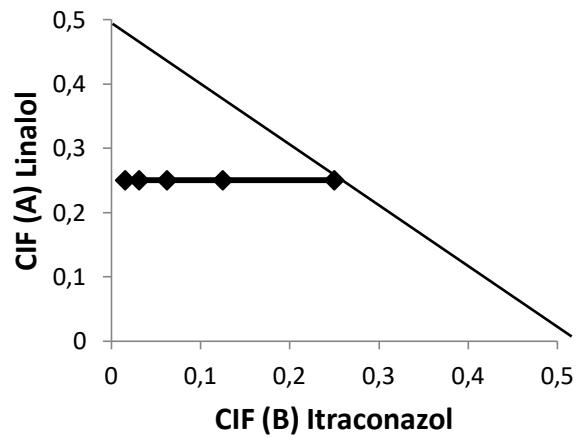
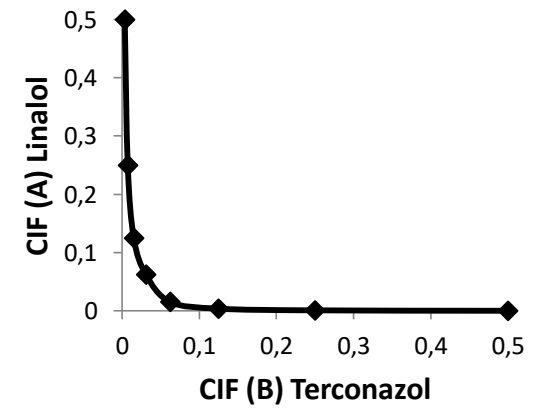
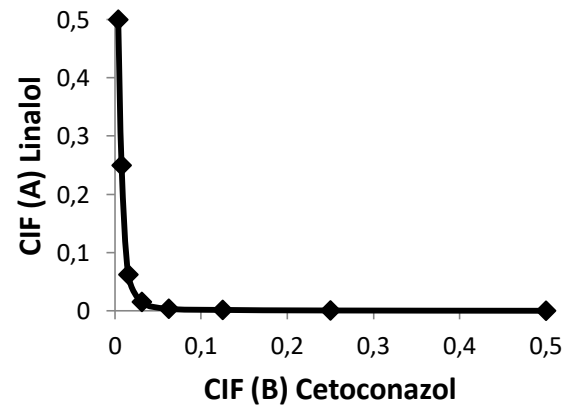
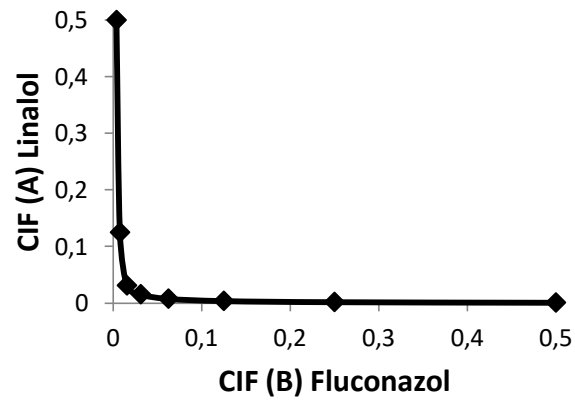
- *C. albicans* LFBM C2



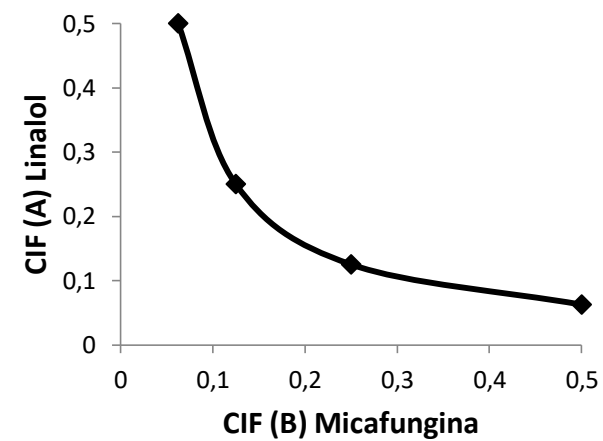
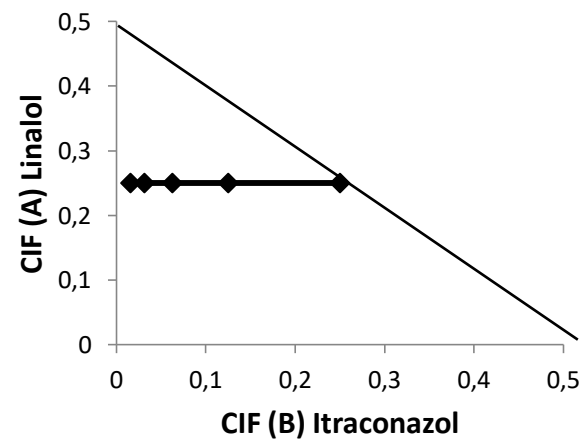
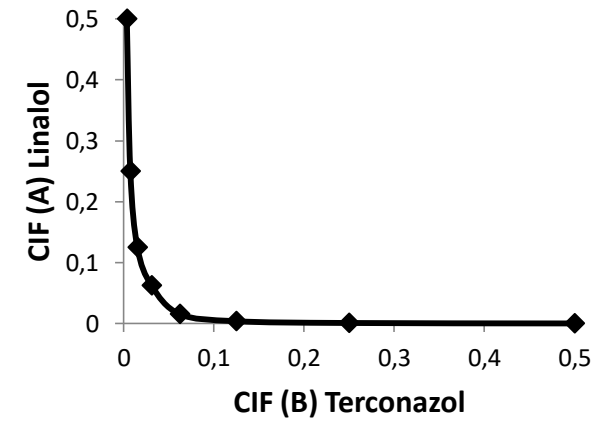
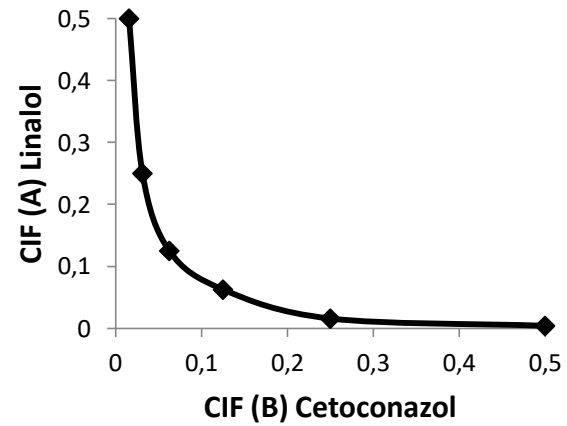
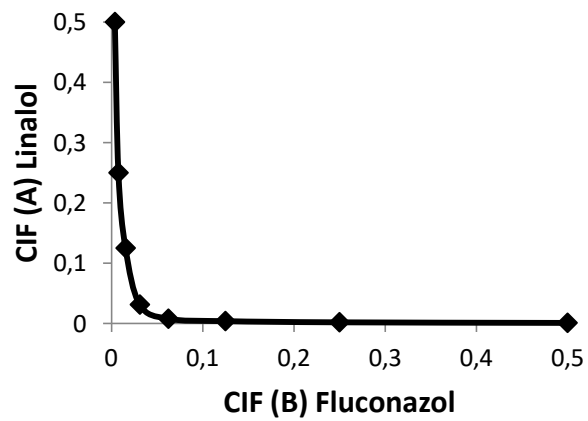
- *C. albicans* LFBM C3



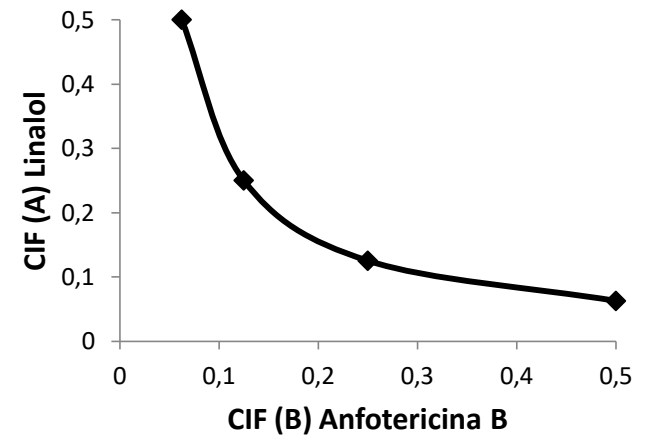
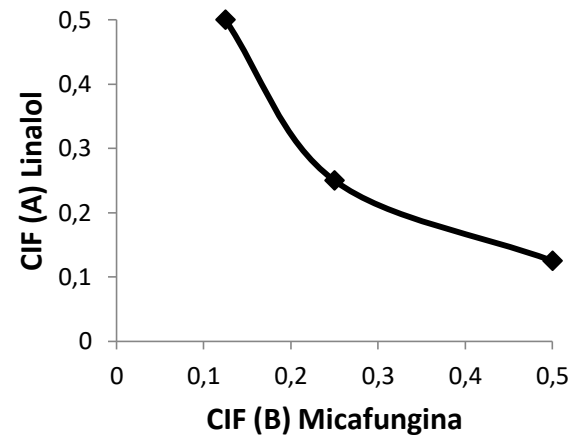
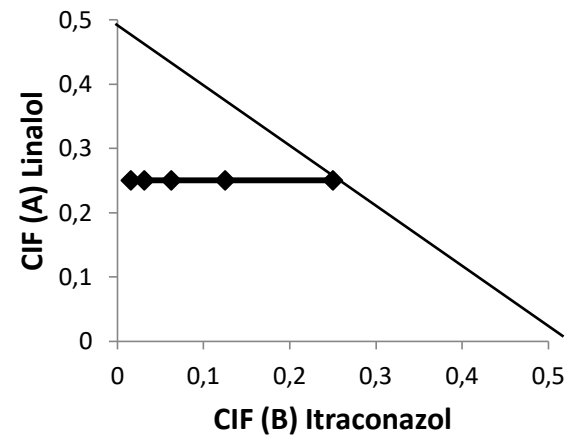
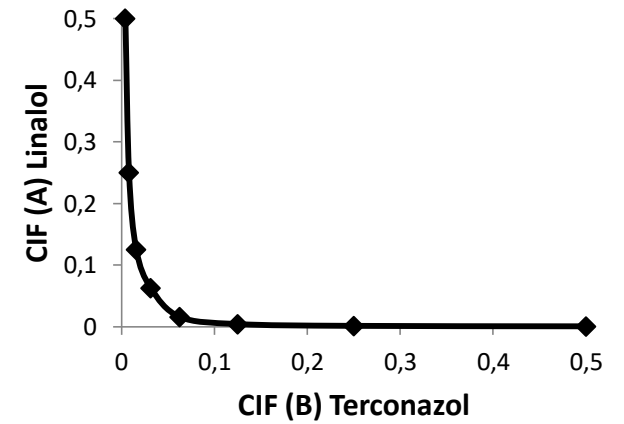
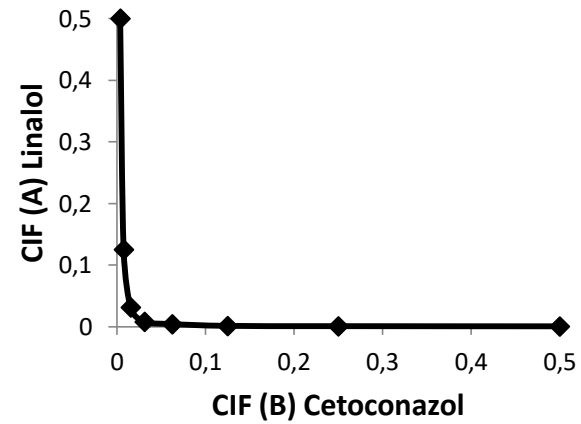
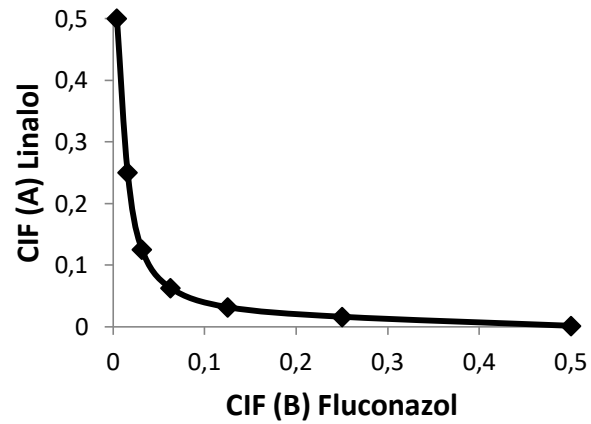
- *C. albicans* LFBM C4



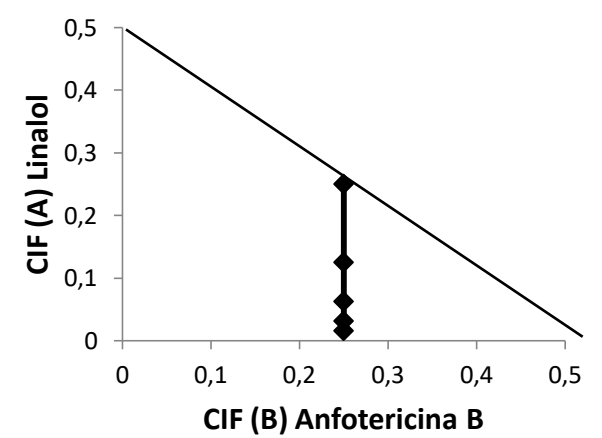
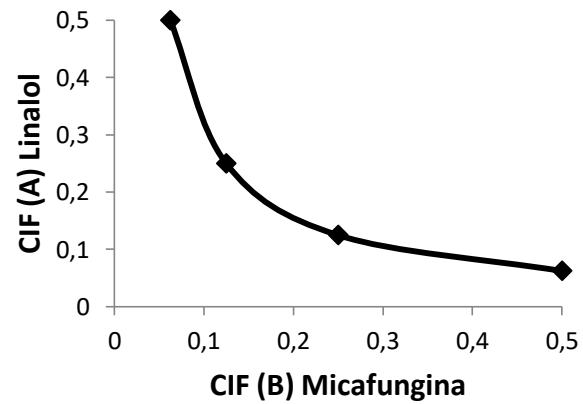
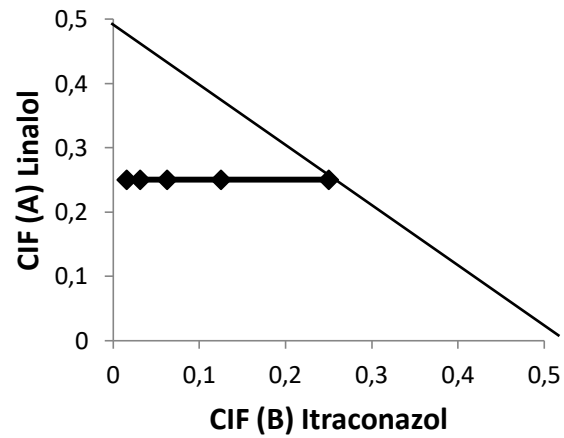
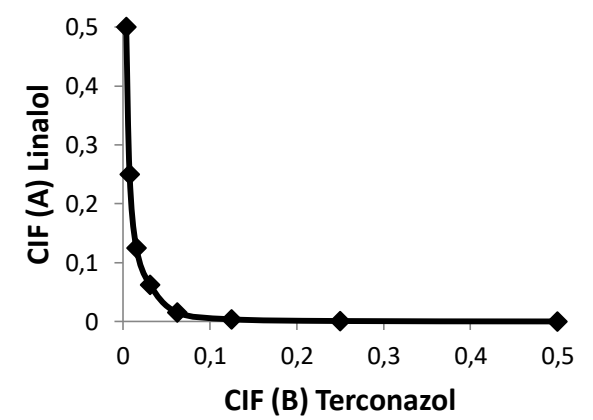
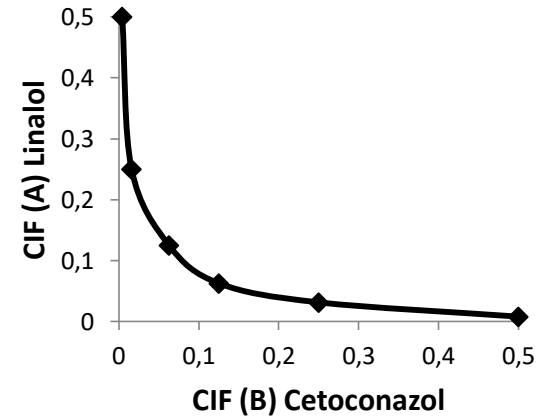
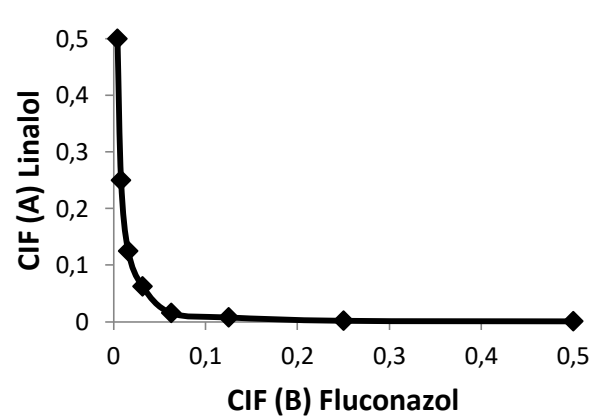
- *C. albicans* LFBM 1004



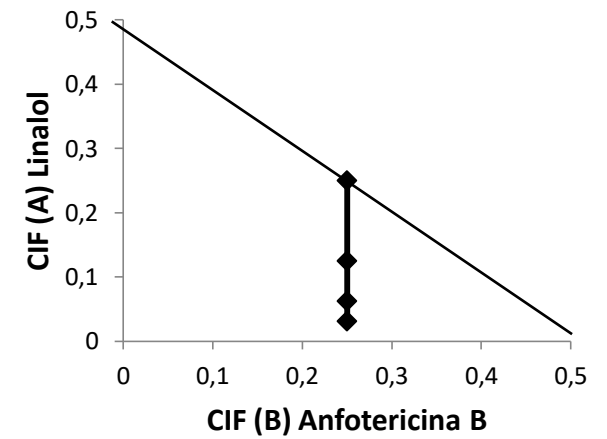
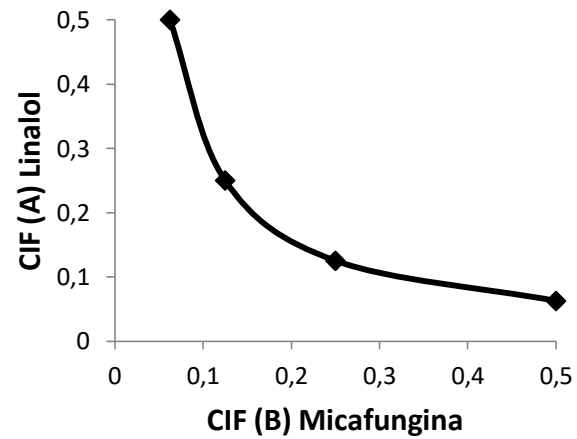
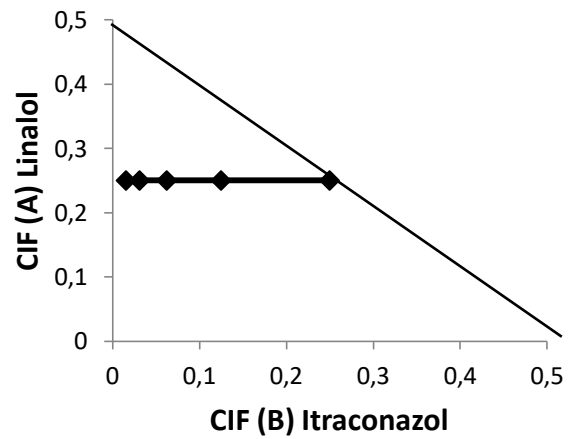
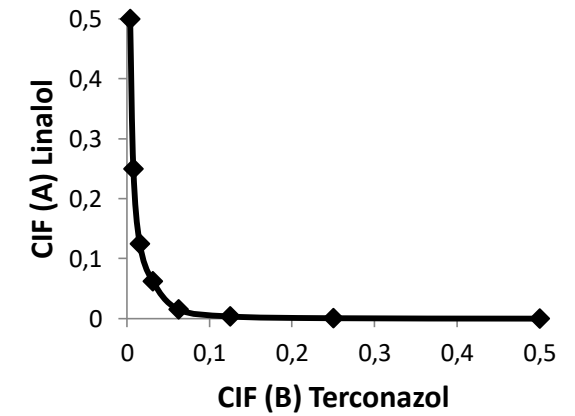
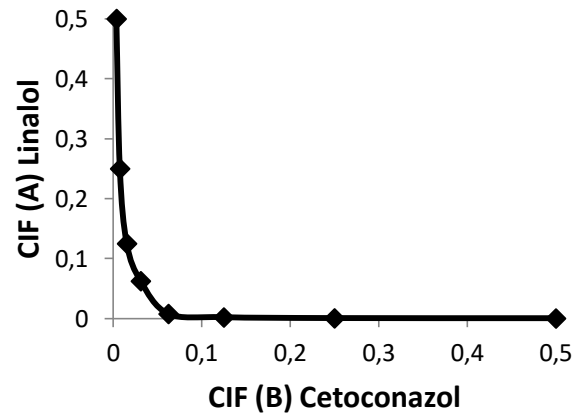
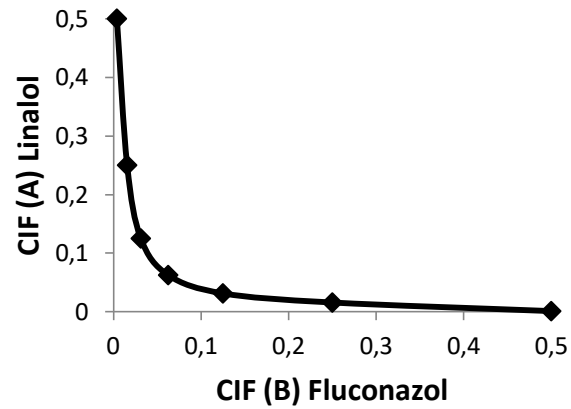
- *C. albicans* LFBM C8



- *C. albicans* LFBM Ca*

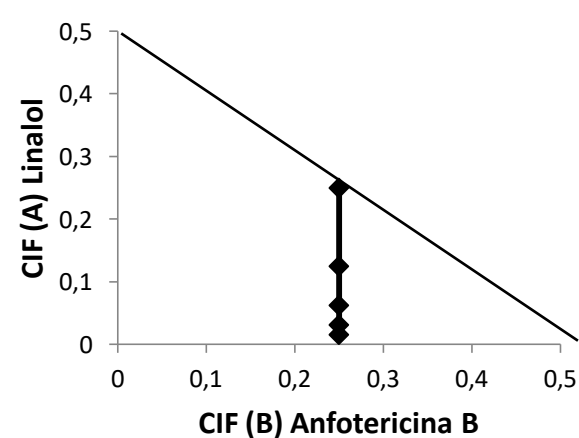
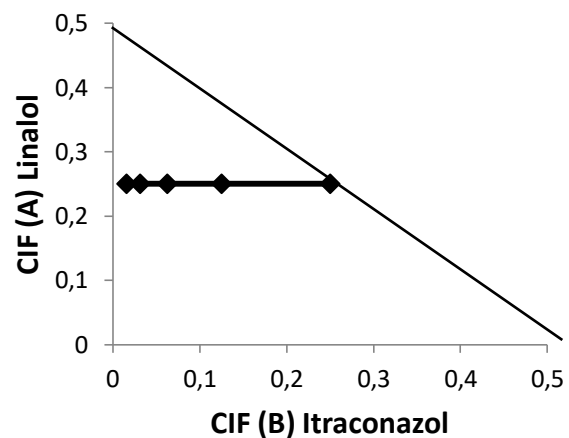
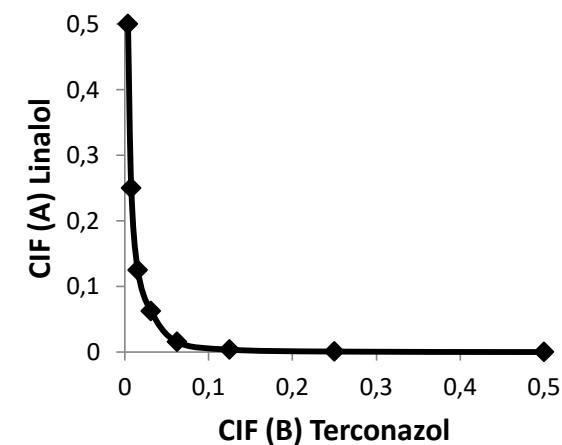
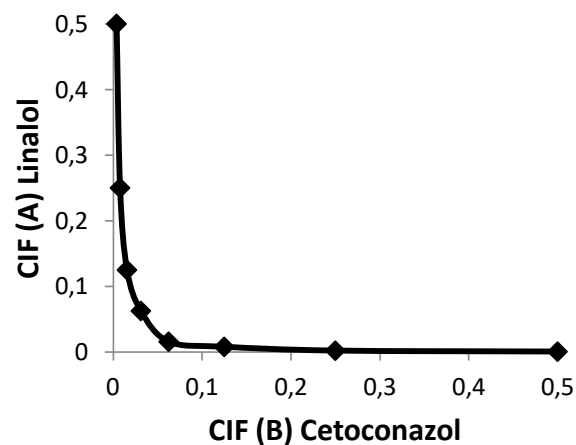
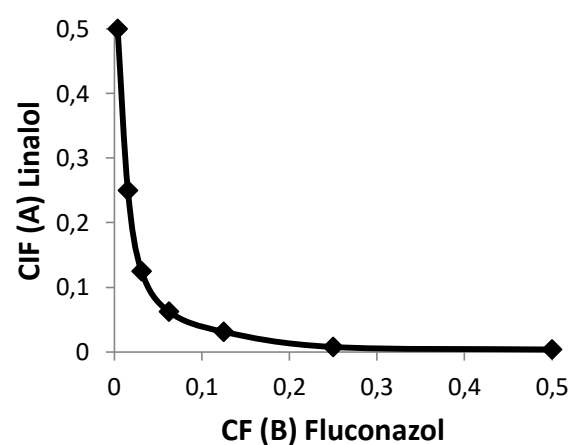


- *C. albicans* LFBM 04a

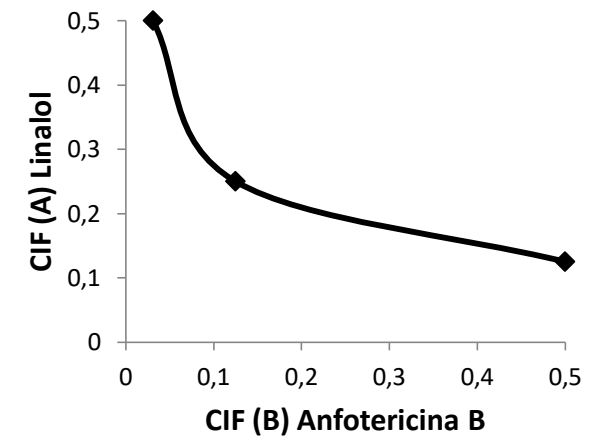
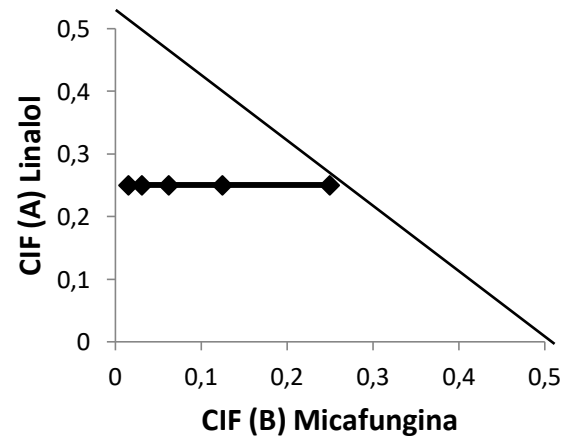
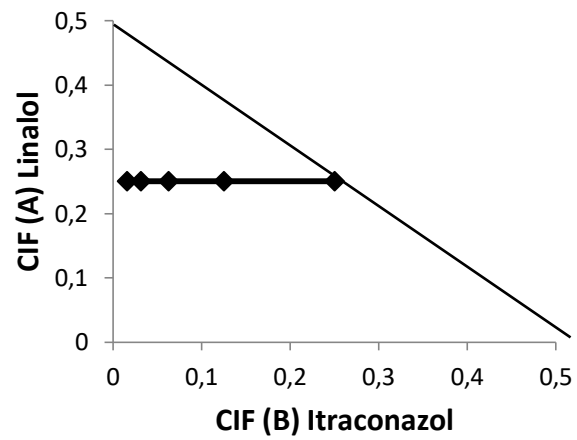
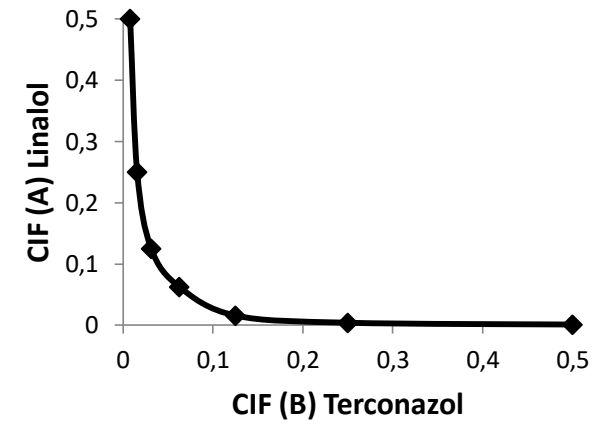
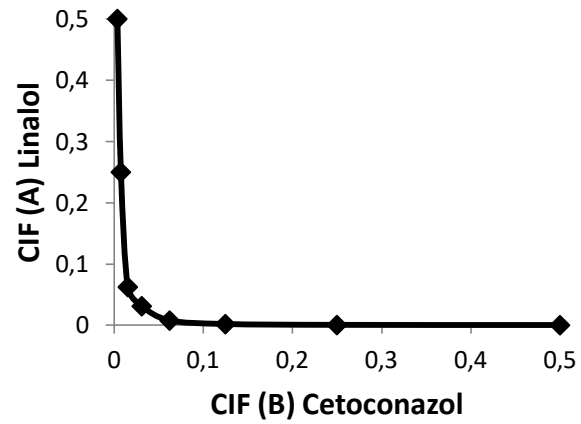
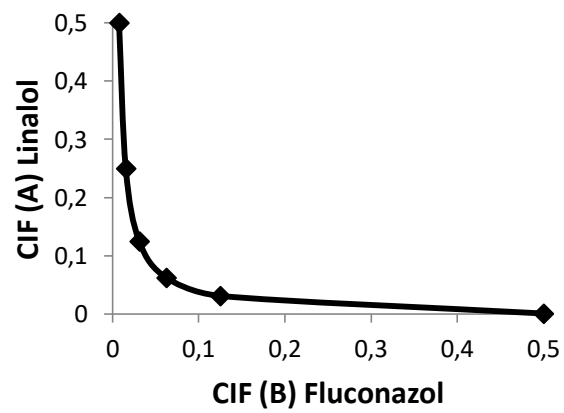


APÊNDICE C – ISOBOLOGRAMAS DAS ASSOCIAÇÕES DE LINALOL COM ANTIFÚNGICOS SOBRE *Candida não-albicans*

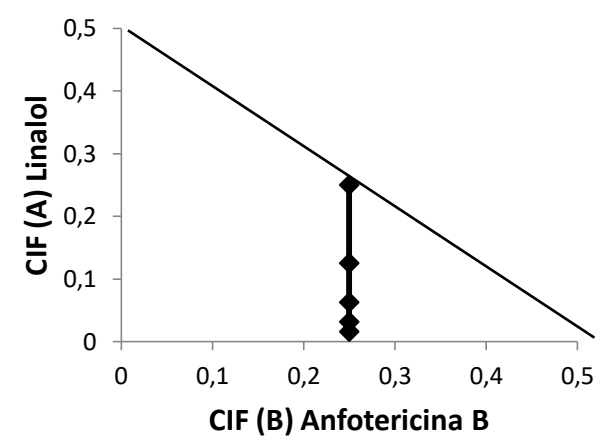
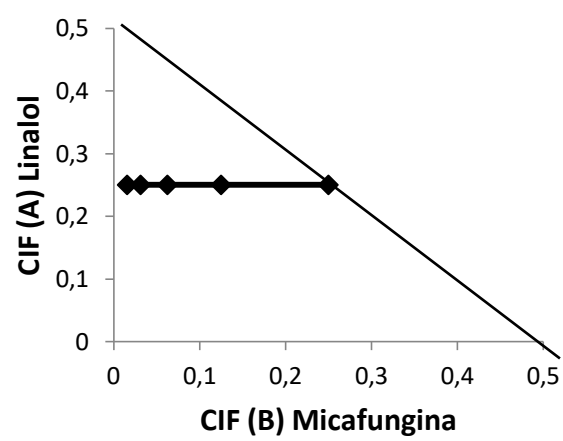
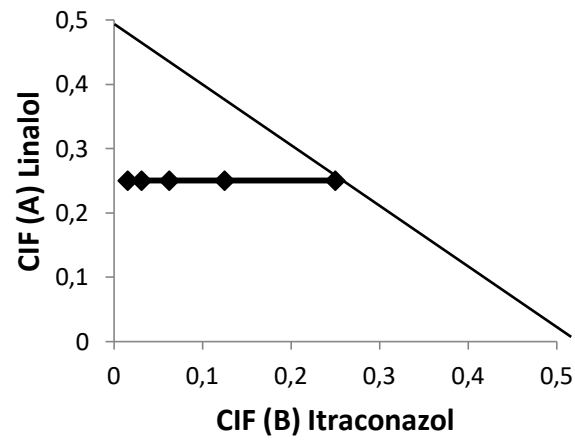
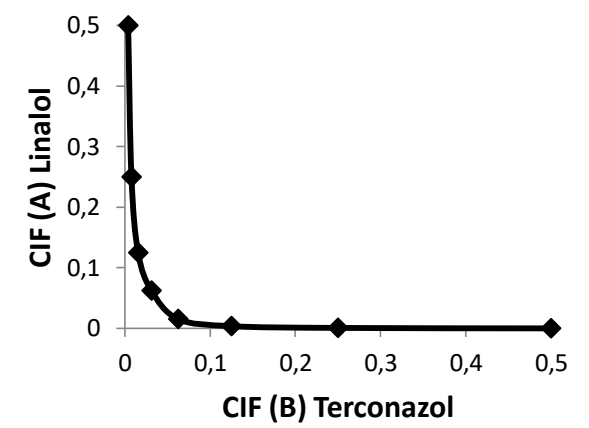
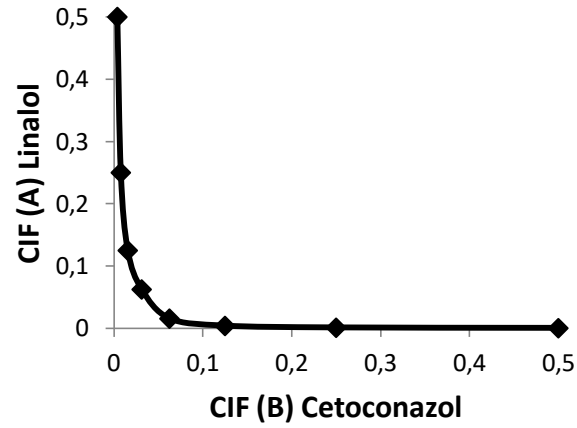
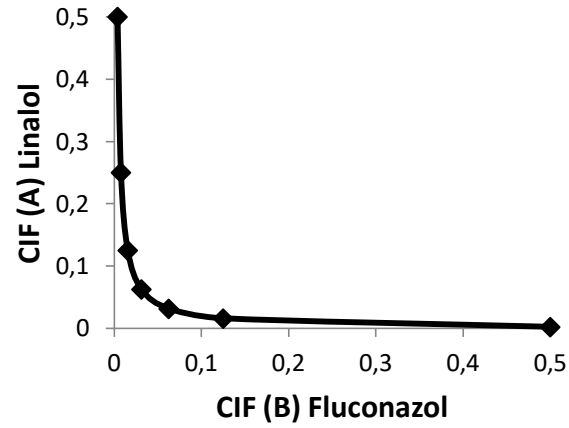
- *C. glabrata* LFBM AM01



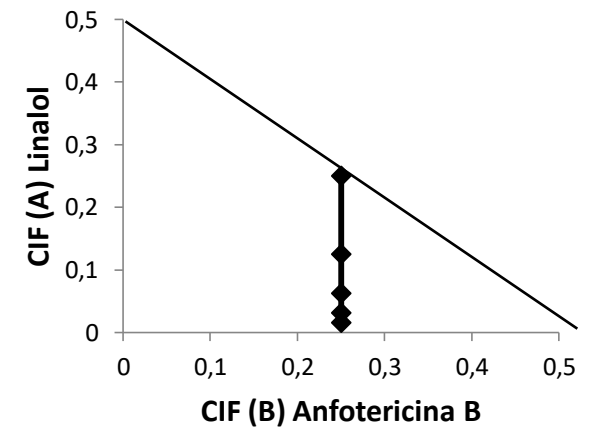
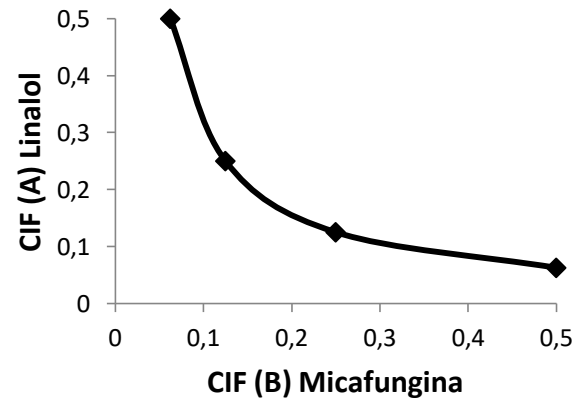
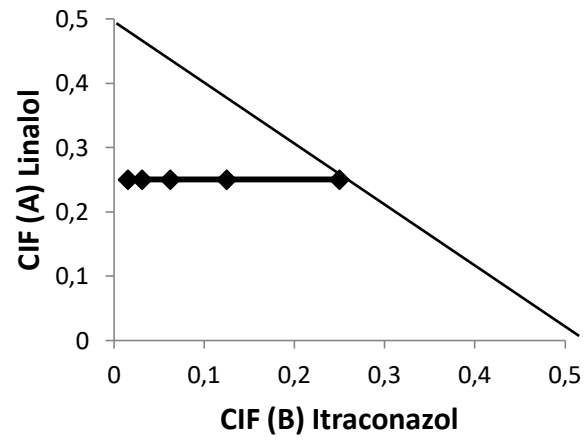
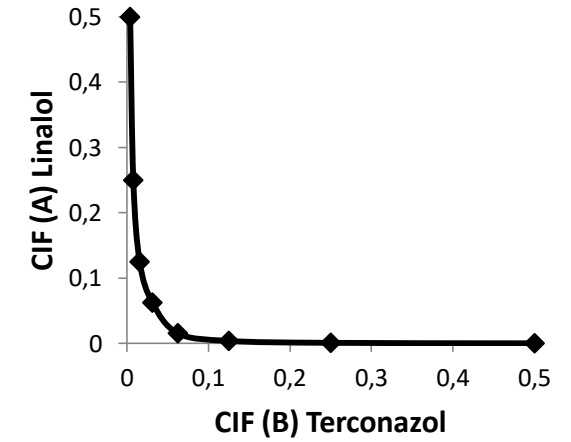
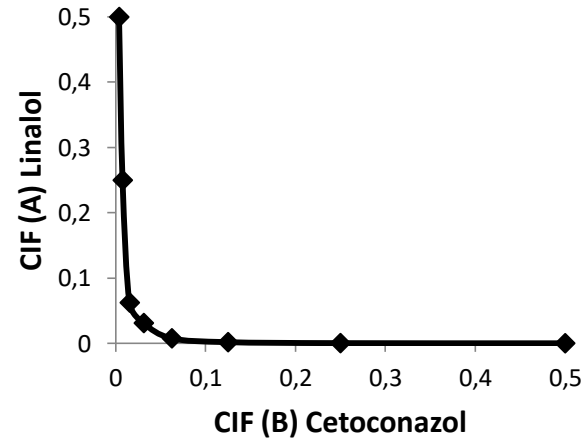
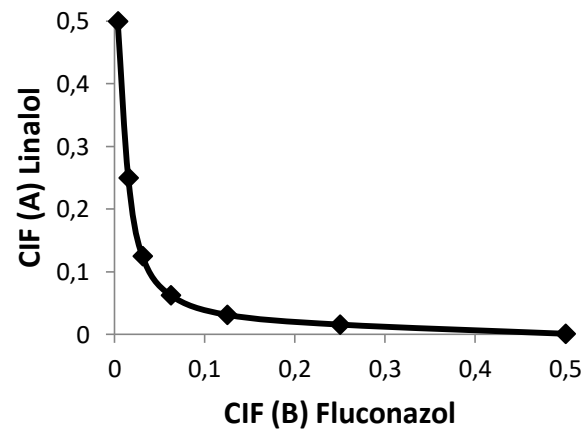
- *C. glabrata* LFBM 04B



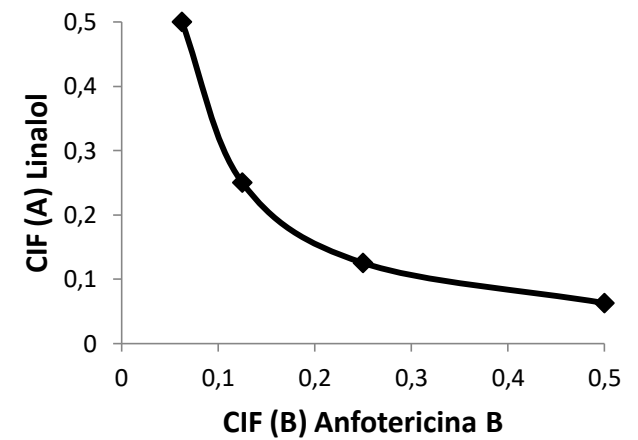
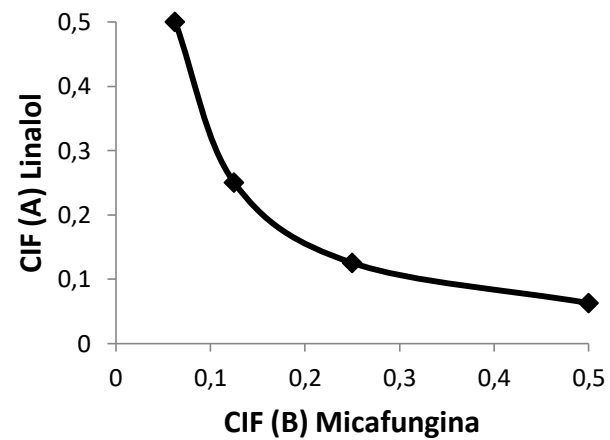
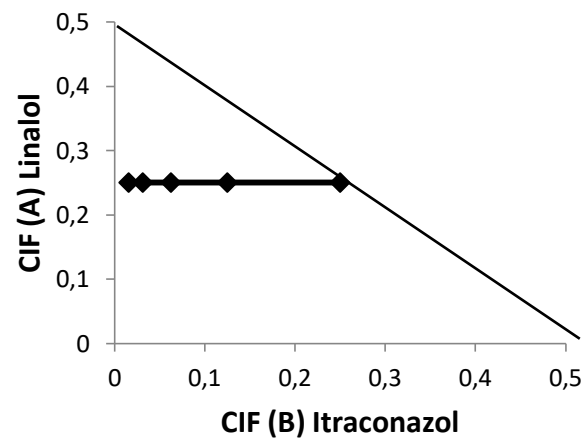
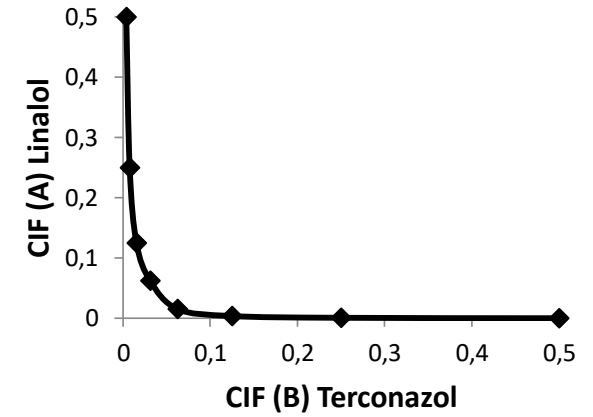
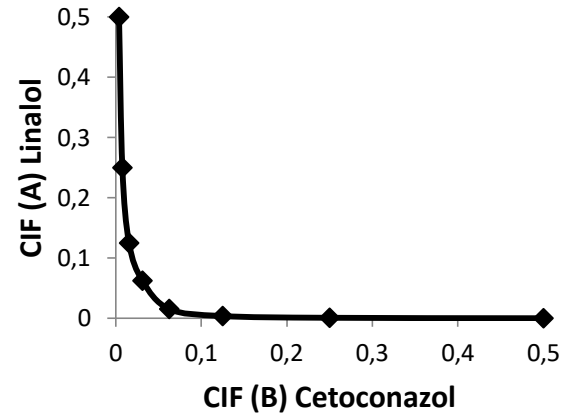
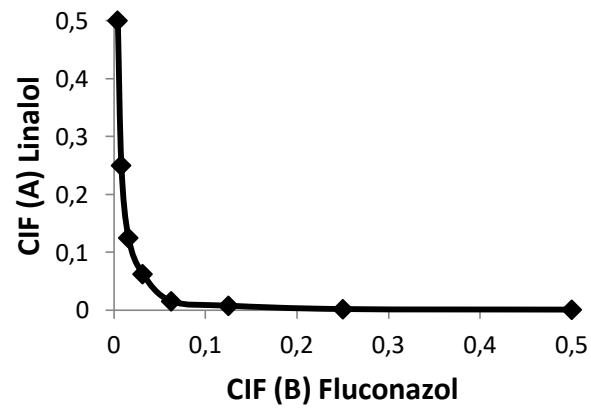
- *C. glabrata* LFBM C6



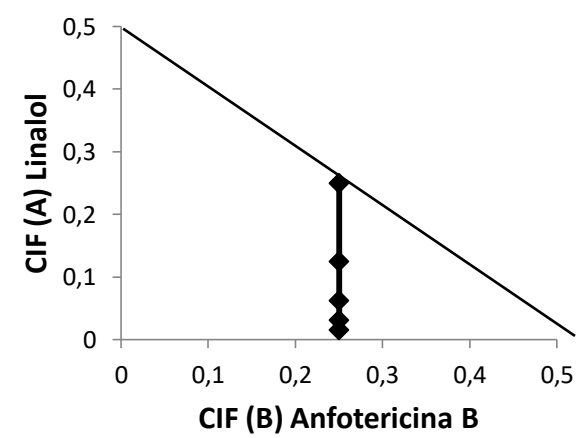
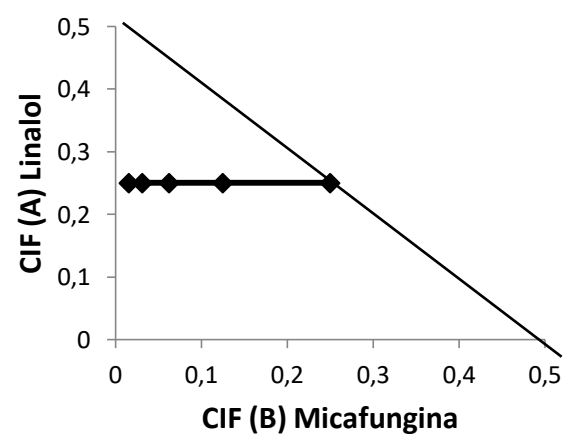
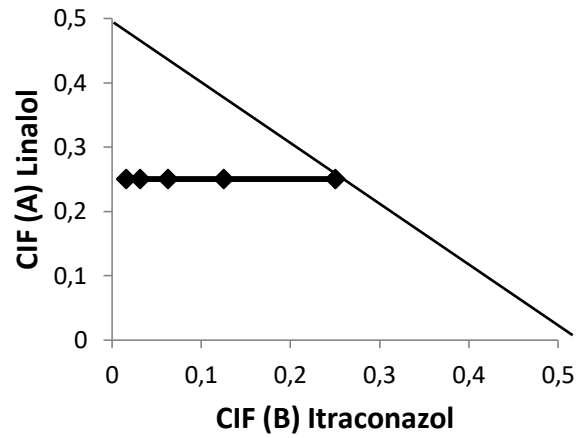
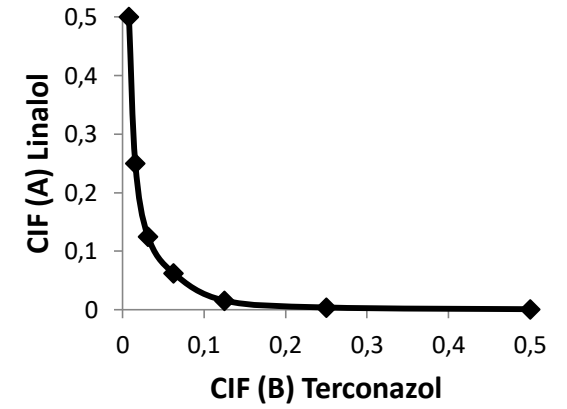
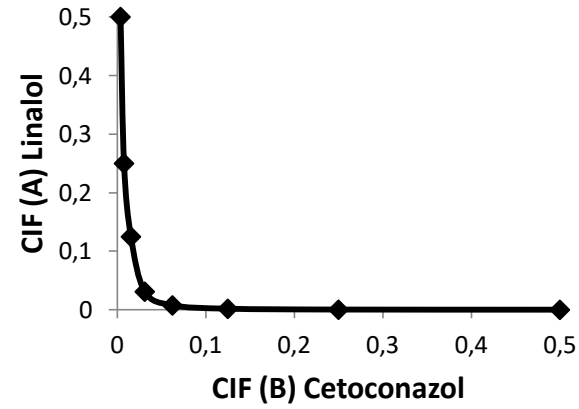
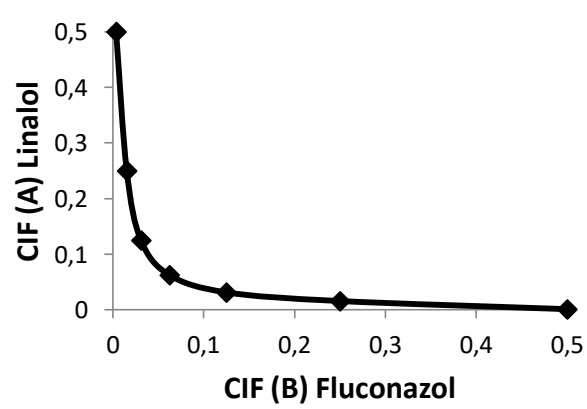
- *C. tropicalis* LFBM 3769



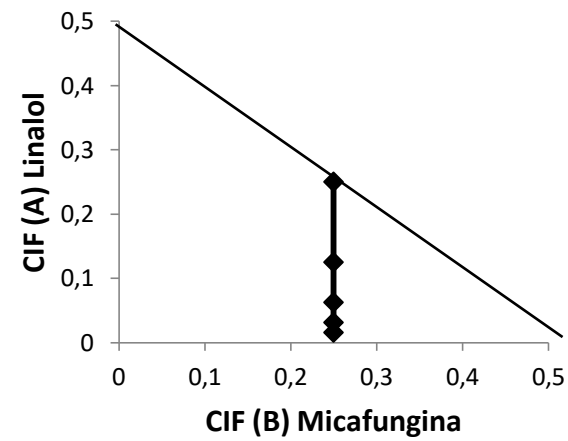
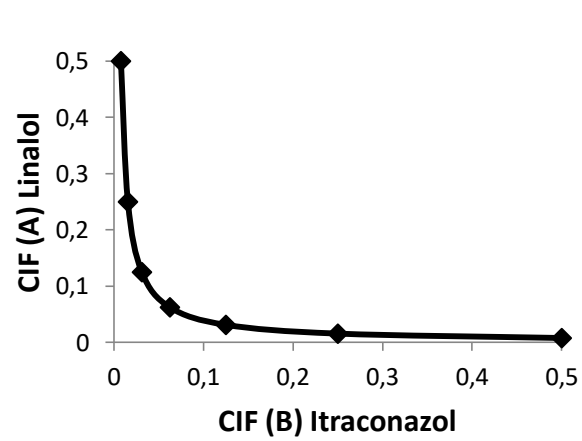
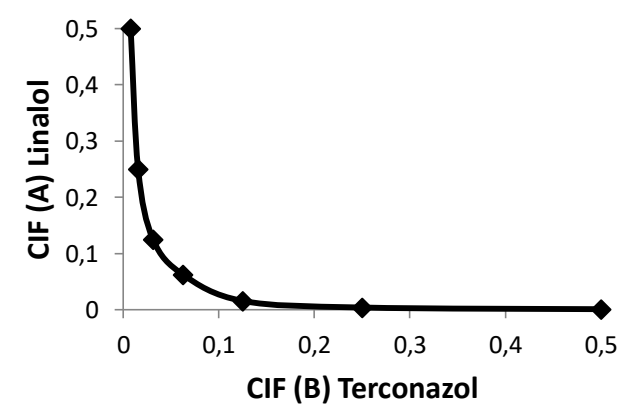
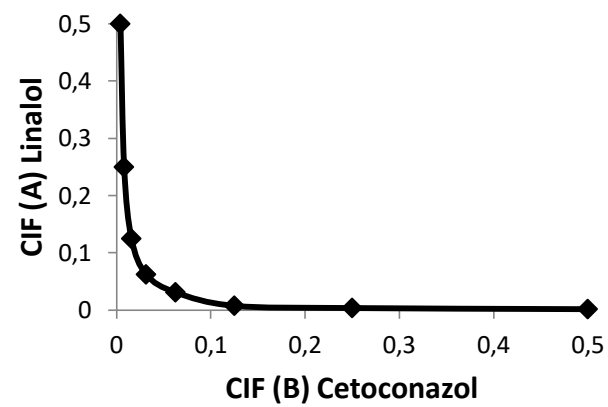
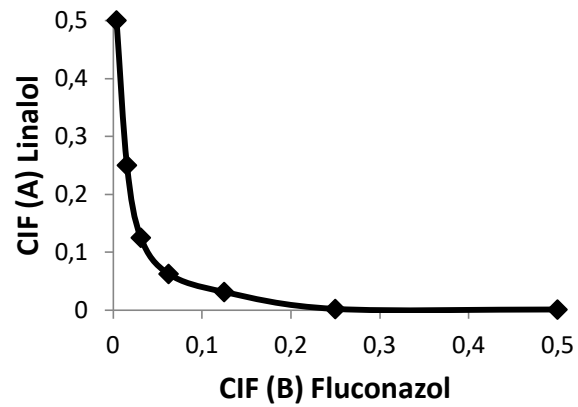
- *C. tropicalis* LFBM 11530



- *C. parapsilosis* LFBM CP*



- *C. krusei* LFBM 10961



**APÊNDICE D – PATENTE DEPOSITADA NO INSTITUTO NACIONAL DE
PROPRIEDADE INDUSTRIAL**



17/08/2021 870210075263
11:23
29409161939101530

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2021 016224 4

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: EULÁLIA CAMELO PESSOA DE AZEVEDO XIMENES

Tipo de Pessoa: Pessoa Física

CPF/CNPJ: 48726672472

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua de Apipucos 355 apt 202

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52071-000

País: Brasil

Telefone: 8132675090

Fax:

Email: eulaliaximenes@yahoo.com.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 17/08/2021 às
11:23, Petição 870210075263

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): COMPOSIÇÃO SINÉRGICA DO LINALOL E ANTIFÚNGICOS AZÓIS: REVERSÃO DA SENSIBILIDADE DE CANDIDA ALBICANS E NÃO ALBICANS

Resumo: A presente invenção compreende a utilização de uma composição com atividade antifúngica como alternativa ao tratamento de infecções por Candida albicans e não albicans resistentes aos azóis, cujos resultados revelaram-se sinérgicos quando o linalol foi associado ao fluconazol, cetoconazol, itraconazol ou terconazol. Essas associações apresentaram atividade antifúngica contra várias espécies de Candida resistentes e reverteram a sensibilidade dessas cepas a todos os azóis utilizados, reduzindo a concentração inibitória mínima (CIM) de 93,8 a 99,9% para os antifúngicos e de 50 a 93,8% para o linalol. Essa redução na concentração inibitória mínima induzirá também reduções nos custos e nos efeitos adversos. Esta composição poderá ser aplicada na área de saúde humana e veterinária. Principalmente em produtos farmacêuticos, odontológicos e afins.

Figura a publicar: 2

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 17/08/2021 às 11:23, Petição 870210075263

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 2

Nome: EULÁLIA CAMELO PESSÔA DE AZEVEDO XIMENES

CPF: 48726672472

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua de Apipucos 355/202

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52071-640

País: BRASIL

Telefone: (81) 999 046045

Fax:

Email: eulaliaximenes@yahoo.com.br

Inventor 2 de 2

Nome: WILMA RAIANNY VIEIRA DA ROCHA

CPF: 06976249435

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua Enfermeira Maria de Lourdes Silva N° 92

Cidade: Campina Grande

Estado: PB

CEP: 58416-040

País: BRASIL

Telefone: (83) 996 766848

Fax:

Email: wilmaraianny@gmail.com

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 17/08/2021 às 11:23, Petição 870210075263

APÊNDICE E – ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICO

Research, Society and Development, v. 10, n. 4, e43910414283, 2021
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i4.14283>

Gênero *Candida* - Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência

Candida genus - Virulence factors, Epidemiology, Candidiasis and Resistance mechanisms

Género *Candida* - Factores de virulencia, Epidemiología, Candidiasis Y Mecanismos de resistencia

Recebido: 25/03/2021 | Revisado: 03/04/2021 | Aceito: 08/04/2021 | Publicado: 17/04/2021

Wilma Raianny Vieira da Rocha
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8126-8153>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: wilmaraianny@gmail.com

Luanne Eugênia Nunes
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6524-0994>
Faculdade Nova Esperança de Mossoró, Brasil
E-mail: luanne_87@hotmail.com

Marina Luizy Rocha Neves
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7949-6605>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: marinaluizy@hotmail.com

Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4486-0374>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: eulaliaximenes@yahoo.com.br

Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2882-6563>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: monica.aalbuquerque@ufpe.br

Resumo

Gênero *Candida* é encontrado vivendo de forma simbiote na microbiota da mucosa reprodutiva e gastrointestinal de 50-70% dos indivíduos saudáveis, em determinadas condições esses micro-organismos podem se tornar patogênicos, a ponto de se tornar a terceira causa das septicemias ao redor do mundo. Podem causar infecções superficiais, atingindo mucosas e pele, bem como infecções invasivas, em órgãos e tecidos profundos como intestino, pulmão e sangue. A espécie mais isolada em infecções causadas pelo gênero é a *Candida albicans*, porém é cada vez mais recorrente o isolamento de espécies de *Candida* não-*albicans*, como: *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Além disso, *C. albicans* e espécies de *C. não-albicans* vêm sendo cada vez mais relatadas pelo aparecimento de resistência aos antifúngicos de uso clínico, dificultando o tratamento de infecções causadas por estas cepas. Este trabalho teve como objetivo reunir informações atualizadas sobre o gênero *Candida* sobre fatores de virulência, epidemiologia, candidíase, tratamentos e mecanismos de resistência.

Palavras-chave: *Candida albicans*; *C. não-albicans*; Candidíase; Fatores de virulência; Mecanismos de resistência.

Abstract

The genus *Candida* is found symbiotically living in the microbiota of the reproductive and gastrointestinal mucosa of 50-70% of healthy individuals, under certain conditions these microorganisms can become pathogenic, to the point of becoming the third cause of septicemia worldwide. They can cause superficial infections, affecting mucous membranes and skin, as well as invasive infections, in organs and deep tissues such as intestines, lungs and blood. The most isolated species in infections caused by the genus is *Candida albicans*, however the isolation of species of *Candida* non-*albicans*, such as *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* is increasingly recurrent. In addition, *C. albicans* and *C. non-albicans* species have been increasingly reported due to the emergence of resistance to antifungal agents for clinical use, making it difficult to treat infections caused by these strains. This work aimed to gather updated information about the genus *Candida* on virulence factors, epidemiology, candidiasis, treatments and resistance mechanisms.

Keywords: *Candida albicans*; *C. non-albicans*; Candidiasis; Virulence factors; Resistance mechanisms.

Resumen

El género *Candida* se encuentra viviendo simbioticamente en la microbiota de la mucosa reproductiva y gastrointestinal de 50-70% de individuos sanos, bajo ciertas condiciones estos microorganismos pueden volverse patógenos, hasta el punto de convertirse en la tercera causa de septicemia a nivel mundial. Pueden causar infecciones

A influência do *quorum sensing* na formação do biofilme por *Pseudomonas aeruginosa*

The influence of the *quorum sensing* on the formation of biofilm by *Pseudomonas aeruginosa*

La influencia de la percepción de quorum en la formación de biofilm por *Pseudomonas aeruginosa*

Recebido: 04/02/2021 | Revisado: 07/02/2021 | Aceito: 11/02/2021 | Publicado: 18/02/2021

Marina Luizy Rocha Neves

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7949-6605>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: marinaluizy@hotmail.com

Luanne Eugênia Nunes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6524-0994>

Faculdade Nova Esperança de Mossoró, Brasil

E-mail: luanne_87@hotmail.com

Wilma Raianny Vieira da Rocha

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8126-8153>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: wilmaraianny@gmail.com

Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4486-0374>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: eulaliaximenes@yahoo.com.br

Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2882-6563>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: monica.albuquerque@ufpe.br

Resumo

As bactérias se organizam de forma agregada numa matriz extracelular, chamada biofilme, estrutura que confere proteção a bactéria a ação dos antimicrobianos e a resposta imune do hospedeiro. Assim, *Pseudomonas aeruginosa*, é classificado como um micro-organismo oportunista, responsável por causar altos números de infecções hospitalares devido a resistência bacteriana desenvolvida por fatores de virulência como o biofilme, controlados por o sistema *quorum sensing*. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi descrever a comunicação das células bacteriana para formação do biofilme por *P. aeruginosa*, durante o processo de colonização e infecção no hospedeiro. Seguiu-se a metodologia de uma revisão narrativa, com base nos artigos publicados entre os anos de 2000 e 2020, indexados na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), utilizando para busca os descritores: "*quorum sensing*", "*Pseudomonas aeruginosa*", "*biofilm*", "*virulence factors*", "*Flagella*", "*pili*", "*bacterial adhesion*" "*polysaccharide*" "*adhesins*" e "*biofilm matrix*". Foram selecionados artigos publicados na íntegra, em inglês, entre os anos de 1990 e 2020. Foram excluídos artigos incompletos, duplicados e trabalhos acadêmicos como teses e dissertações. Evidenciou-se que a resistência bacteriana de *P. aeruginosa* aos antibióticos está relacionada a sua alta capacidade de adaptação a ambientes hostis e aos mecanismos de resistência desenvolvidos pela espécie, especialmente a formação do biofilme bacteriano pelo sistema *quorum sensing* a partir da biossíntese de moléculas autoindutoras como: N-3-oxo-dodecanoil homoserina lactona, N-butanil-homoserina lactona e 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona, responsáveis por mediar a produção dos fatores de virulência. Esta revisão abordou os aspectos gerais que envolve a patogenicidade oriunda da comunicação bacteriana durante o seu processo de colonização.

Palavras-chave: Fatores de virulência; Biofilme; Resistência bacteriana a antibióticos; Infecção hospitalar.

Abstract

The bacteria are organized in an aggregated form in an extracellular matrix, called biofilm, a structure that gives protection to the bacteria, the action of antimicrobials and the hosts immune response. Therefore, *Pseudomonas aeruginosa*, is classified as an opportunistic microorganism, responsible for causing high numbers of nosocomial infections due to bacterial resistance developed by virulence factors such as biofilm, controlled by the quorum sensing system. Thereby, the objective of this work was to describe the communication of bacterial cells for the formation of biofilm by *P. aeruginosa*, during the process of colonization and infection in the host. This was followed by the methodology of a narrative review, based on articles published between 1990 and 2020, indexed in the *Biblioteca Virtual em Saúde* (BVS), using the descriptors: "*quorum sensing*", "*Pseudomonas aeruginosa*", "*biofilm*", "*virulence factors*", "*Flagella*", "*pili*", "*bacterial adhesion*" "*polysaccharide*" "*adhesins*" and "*biofilm matrix*". Articles published in full, in English, between 2000 and 2020 were selected. Incomplete articles, duplicates and academic papers such as