



Universidade Federal do Maranhão
Agência de Inovação, Empreendedorismo, Pesquisa,
Pós-Graduação e Internacionalização
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto
Mestrado Acadêmico



**EFEITO DO ÓLEO DE *Caryocar brasiliense* Cambess
(PEQUI) EM CEPAS CLÍNICAS DE *CANDIDA* SPP.**

CAROLINA BORGES CORDEIRO

**São Luís
2021**

CAROLINA BORGES CORDEIRO

**EFEITO DO ÓLEO DE *Caryocar brasiliense* Cambess
(Pequi) EM CEPAS CLÍNICAS DE *CANDIDA* spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

Área de Concentração: Processos biológicos em saúde

Linha de Pesquisa: Doenças crônicas e doenças infecciosas e parasitárias/Infectologia no adulto

Orientador: Marcelo Souza de Andrade

Coorientador (a): Geusa Felipa de Barros Bezerra

Coordenador (a): Maria do Desterro Soares Brandão

SÃO LUÍS
2021

Borges Cordeiro, Carolina.

EFEITO DO ÓLEO DE Caryocar brasiliense Cambess PEQUI EM
CEPAS CLÍNICAS DE CANDIDA SPP / Carolina Borges Cordeiro.

- 2021.

114 p.

Coorientador(a): Geusa Felipa de Barros Bezerra.

Orientador(a): Marcelo Souza de Andrade.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2021.

1. Antifúngico. 2. Candida. 3. Óleo de pequi. 4.
Patogenicidade. I. de Barros Bezerra, Geusa Felipa. II.
Souza de Andrade, Marcelo. III. Título.

CAROLINA BORGES CORDEIRO
EFEITO DO ÓLEO DE *Caryocar brasiliense* Cambess (Pequi) EM
CEPAS CLÍNICAS DE *Candida* spp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

A Banca Examinadora da Defesa de Mestrado, apresentada em sessão pública, considerou o candidato aprovado em: 30/06/2021.

Prof. Dr. Marcelo Souza Andrade (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a. Geusa Felipa de Barros Bezerra (Coorientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a. Emygdia Rosa do Rêgo Barros Pires Leal (Examinador Externo)
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a Maria do Socorro de Sousa Cartagenes (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. José Eduardo Batista (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

*Aos meus pais por serem meu porto seguro e sempre
me incentivarem em todas as jornadas.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo amor incondicional, dedicação, apoio emocional e por serem meu porto seguro ao longo de todas as jornadas.

Ao orientador, Marcelo Souza de Andrade, por aceitar conduzir esse trabalho, pelas valiosas contribuições e incentivo dado durante todo o processo.

A coorientadora, Geusa Felipa de Barros Bezerra por sempre me receber prontamente e pela confiança no êxito dessa pesquisa.

A Katia Borges por me auxiliar com a proposta e execução desse projeto.

Aos integrantes do Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada (NIBA), Rita de Nazaré, Lila Texeira, Laís Wolf, Marrieth, Cristina, Alysson Silva e Fernanda por todo suporte para realização dessa pesquisa e por compartilharem seus aprendizados.

Aos amigos, Vanessa Cardoso, Lara Chagas, Klecia Marques, Rivadal Silva, que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade e apoio demonstrados ao longo de todo o período de tempo em que me dediquei a este trabalho.

A Alice Marques por me auxiliar na finalização desse trabalho.

A FAPEMA pelo financiamento do estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto pela oportunidade da realização dessa pesquisa.

A todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

“A persistência é o menor caminho para o êxito”.

(Charles Chaplin)

RESUMO

Introdução: O pequi é um fruto típico do Cerrado brasileiro e utilizado na medicina popular contra diversas enfermidades. Acredita-se que muitos dos seus efeitos sejam em decorrência de suas propriedades antioxidantes. A incidência de infecções fúngicas vem aumentando significativamente nos últimos anos sendo as leveduras do gênero *Candida* responsáveis pela maioria destas infecções. Estas leveduras que habitam de forma comensal na microbiota de indivíduos saudáveis, em determinadas circunstâncias podem expressar fatores de virulência como a produção de enzimas e formação de biofilmes, o que lhes confere caráter patogênico e resistência a tratamentos convencionais. Com isso, a utilização de compostos naturais como o óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess) contra microrganismos patogênicos demonstrou-se uma alternativa de tratamento. **Objetivo:** determinar o efeito do óleo de pequi sobre mecanismos de virulência das cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida orthopsilosis* provenientes de diferentes sítios anatômicos. **Metodologia:** cinco cepas do gênero *Candida* da Coleção de Fungos da Universidade Federal do Maranhão do NIBA/DEPAT/CCBS foram utilizadas nesse estudo. A indução da formação de biofilme, produção de enzimas e hifas foi realizada *in vitro* por meio da inoculação das amostras nos meios correspondentes para cada teste. As cepas foram identificadas pelo sistema automatizado Vitek® bioMérieux e confirmadas por biologia molecular, pela reação em cadeia da polimerase. A concentração inibitória mínima (MIC) do óleo e do biofilme (BIC) foram realizadas por microdiluição e determinadas através de leitura em espectrofotômetro. A porcentagem de inibição foi calculada levando-se em consideração a leitura realizada em 600 nm. **Resultados:** estruturas morfológicas e capacidade de produção de biofilme foram visualizadas através de microscopia. Todas as cepas foram produtoras de enzimas (amilase, proteinase, lipase e fosfolipase), mas a maior atividade enzimática foi encontrada em lipase e a menor em amilase. A espécie com maior produção enzimática foi *C. albicans* sendo a amostra de urina a de maior destaque para todos os meios enzimáticos. O óleo de pequi possui propriedade antifúngica nas concentrações a partir de 7,8 µg/ml com resultado positivo também em 62,5 µg/ml e teve seu melhor efeito observado com 500 µg/ml, além de inibir a produção de fatores de virulência (enzima, biofilme e hifas) na maioria das amostras utilizadas para esse estudo com exceção de *Candida albicans* (urina) que em contato com óleo produziu quantidade maior de enzima (proteinase) e apresentou-se em forma filamentosa sendo identificada macroscopicamente. **Conclusão:** Foi observado o potencial do óleo e conseqüentemente sua aplicação como um possível bioproduto para tratamento de doenças infecciosas de origem fúngica do gênero *Candida*.

Palavras-chave: *Candida*; patogenicidade; antifúngico; óleo de pequi

ABSTRACT

Introduction: pequi is a typical fruit from the Brazilian Cerrado and used in folk medicine against various diseases. Many of its effects are believed to be due to its antioxidant properties. The incidence of fungal infections has increased significantly in recent years and yeasts of the *Candida* genus are responsible for most of these infections. These yeasts, which live as a commensal in the microbiota of healthy individuals, under certain circumstances can express virulence factors such as enzyme production and biofilm formation, which gives them a pathogenic character and resistance to conventional treatments. Thus, the use of natural compounds such as pequi oil (*Caryocar brasiliense* Cambess) against pathogenic microorganisms proved to be an alternative treatment. **Objective:** to determine the effect of pequi oil on virulence mechanisms of clinical strains of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* and *Candida orthopsilosis* from different anatomical sites. **Methodology:** five strains of the *Candida* genus from the Fungi Collection of the Federal University of Maranhão, NIBA/DEPAT/CCBS were used in this study. The induction of biofilm formation, enzyme and hyphae production was performed in vitro by inoculating the samples in the corresponding media for each test. The strains were identified by the automated Vitek® bioMérieux system and confirmed by molecular biology, using the polymerase chain reaction. The minimum inhibitory concentration (MIC) of oil were performed by microdilution and determined by reading in a spectrophotometer. The percentage of inhibition was calculated taking into account the reading performed at 600 nm. **Results:** morphological structures and biofilm production capacity were visualized through microscopy. All strains were enzyme producers (amylase, proteinase, lipase and phospholipase), but the highest enzyme activity was found in lipase and the lowest in amylase. The species with the highest enzyme production was *C. albicans*, with the urine sample being the most prominent for all enzymes. Pequi oil has antifungal property at concentrations from 7.8 µg/ml with a positive result also at 62.5 µg/ml and had its best effect observed at 500 µg/ml, in addition to inhibiting the production of virulence factors (enzyme, biofilm and hyphae) in most samples used for this study, with the exception of *Candida albicans* (urine) which, in contact with oil, produced a greater amount of enzyme (proteinase) and presented a filamentous form and was identified macroscopically. **Conclusion:** The potential of the oil and consequently its application as a possible bioproduct for the treatment of infectious diseases of fungal origin of the *Candida* genus was observed.

Keywords: *Candida*; pathogenicity; antifungal; pequi oil.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Mecanismos de patogenicidade de algumas espécies do gênero <i>Candida</i> spp.	32
Quadro 2 - Principais substâncias administradas em tratamentos antifúngicos convencionais e o mecanismo de resistência das espécies patogênicas.	43
Quadro 3 - Regimes de terapia antifúngica combinatória apresentam melhor eficácia em combinação do que drogas independentes.	47
Quadro 4 - Atividades biológicas comprovadas do gênero <i>Caryocar</i>	53
Quadro 5 - Espécies clínicas do gênero <i>Candida</i> spp da coleção de fungos do LBMICO/NIBA/UFMA.	56
Quadro 6 - Interpretação de Teste Chromagar.	58
Quadro 7 - Resultado de identificação pelo sistema automatizado Vitek® bioMérieux.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de primers espécie-específico e pares de base.	60
Tabela 2 - Descrição dos ciclos de PCR realizados para espécies de Candida spp.	60
Tabela 3 - Interpretação dos resultados dos testes para determinação da atividade de proteinase e fosfolipase.	64
Tabela 4 - Perfil enzimático qualitativo das espécies de Candida spp.	76
Tabela 5 - Valores do índice enzimático de lipase das cepas de Candida spp.	77
Tabela 6 - Resultados do índice enzimático (IE) para teste enzimático de amilase.	78
Tabela 7 - Resultados da atividade enzimática de proteinase das cepas clinicas de Candida spp.	80
Tabela 8 - Resultados da atividade enzimática de fosfolipase das cepas clinicas de Candida spp.	82

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Biodiversidade do Reino Fungi.	24
Figura 2 - Principais gêneros de microrganismos patogênicos.	25
Figura 3 - Aparência microscópica de <i>Candida albicans</i>	29
Figura 4 - Quatro estágios de mudança morfológica na formação de hifas de <i>C. tropicalis</i>	31
Figura 5 - Levedura de <i>C. glabrata</i> ao microscópio eletrônico (1600x).	32
Figura 6 - Colônias de <i>Candida parapsilosis</i>	33
Figura 7 - Etapas do mecanismo inicial de infecções relacionadas aos fatores de virulência das espécies de <i>Candida spp.</i>	38
Figura 8 - Esquemas comparativos dos três estágios de formação de biofilme por <i>Candida albicans</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida tropicalis</i> e <i>Candida parapsilosis</i>	40
Figura 9 - Mecanismos de ação dos agentes antifúngicos tradicionais sobre alvos celulares.	43
Figura 10 - Classificação científica do pequizeiro (<i>Caryocar brasiliense</i> Cambess).	48
Figura 11 - Aspectos morfológicos do fruto do pequizeiro.	49
Figura 12 - Representação dos principais componentes do pequizeiro e seus produtos.	49
Figura 13 - Preparação do meio Ágar Sabouraud.	57
Figura 14 - Preparação de meio cromogênico para identificação das espécies clínicas de <i>Candida spp.</i>	58
Figura 15 - Armazenamento dos meios para serem utilizados nos testes enzimáticos e inoculação das cepas para visualização da produção de enzimas.	65
Figura 16 - Esquema representativo da metodologia utilizada para determinação de concentração inibitória mínima (MIC) do óleo de pequi.	66
Figura 17 - Resultado do processo manual de semeadura, de quatro espécies (<i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida glabrata</i> e <i>Candida tropicalis</i>), com meios nutrientes Ágar Sabouraud.	68
Figura 18 - Cepas de <i>Candida spp</i> semeadas em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud demonstrando crescimento após incubação em estufa por 24 horas a 37° C.	69

Figura 19 - Espécies <i>Candida albicans</i> ; <i>Candida glabrata</i> ; <i>Candida tropicalis</i> ; <i>Candida parapsilosis</i> observadas após 72 horas no meio CHROMagar®.	72
Figura 20 - Gel de eletroforese visualizado em transluminador demonstrando a amplificação das amostras selecionadas.	74
Figura 21 - Resultados dos testes enzimáticos (lipase, proteinase e amilase).	75
Figura 22 - Resposta de viabilidade celular das cepas clinicas após exposição ao óleo Caryocar brasilienses Cambess.	83
Figura 23 - Cepas coradas com cristal violetas 0,4% visualizadas em microscópio invertido (40 x).....	89
Figura 24 - Cepas coradas com cristal violetas 0,4% visualizadas em microscópio invertido (40 x).....	90

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS = síndrome da imunodeficiência adquirida

AmB = anfotericina B

AST = testes para susceptibilidade a antifúngicos

ATCC = *American Type Culture Collection* (Coleção de Cultura Americana)

C. albicans = *Candida albicans*

CaCl₂ = cloreto de cálcio em *Candida* spp.)

CaLB = *Candida albicans* (lavado brônquico)

CaU = *Candida albicans* (urina)

CaST = *Candida albicans* (secreção traqueal)

CaSV = *Candida albicans* (secreção vaginal)

C. brasiliense camb. = *Caryocar brasiliense* Cambess

CDR - *candida drug resistance* (gene de resistência à droga)

C. glabrata = *Candida glabrata*

CgU = *Candida glabrata* (urina)

CLSI = *Clinical and Laboratory Standards Institute Guidelines* (Diretrizes do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais)

C. orthopsilosis = *Candida orthopsilosis*

CoS = *Candida orthopsilosis* (sangue)

CO₂ = dióxido de carbono

C. parapsilosis = *Candida parapsilosis*

CpF = *Candida parapsilosis* (fezes)

CpP = *Candida parapsilosis* (pele)

CpS = *Candida parapsilosis* (sangue)

CpUn = *Candida parapsilosis* (unha)

C. tropicalis = *Candida tropicalis*

CtLB = *Candida tropicalis* (lavado brônquico)

CtU = *Candida tropicalis* (urina)

dATP - deoxi-adenosina trifosfato

dCTP - deoxi-citosina trifosfato

dGTP - deoxi-guanidina trifosfato

DMSO = dimetilsulfóxido

DNA = ácido desoxiribunocléico

DNAr = ácido desoxiribunocléico ribossomal

dNTP = deoxinucleotídeos trifosfatados (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)

ECM = matriz extracelular

ERG = *ergosterol biosynthetic enzymes* ou enzimas biossintéticas do ergosterol

FDA = *Food and Drug Administration* (Administração de Alimentos e Medicamentos)

FKS = *glucan synthase genes* ou genes da sintase glucano

FLS = *fungal lysis solution* ou solução de lise fúngica

g= gramas

H₂O = água

HIV = vírus da imunodeficiência humana

IE = índice enzimático

ITS = *internal transcribed spacer* (região de transcrição interna)

MDR= *multidrug resistance* (gene de resistência à multidrogas)

MgCl₂ = cloreto de magnésio

MIC = concentração inibitória mínima

ml = mililitro

NaCl = cloreto de sódio

nm = nanômetro

PBS = *phosphate buffered saline* (tampão fosfato-salino)

PCR = reação em cadeia da polimerase

pH= potencial Hidrogeniônico

PZ= zona de precipitação

RNA = ácido ribonucleico

RNAr = ácido ribonucleico ribossômico

RPM = rotações por minuto

Spp = espécies

Taq = *Thermus aquaticus*

TBE = Tris/Borato/EDTA

UTI = unidade de terapia intensiva

YPD= yeast extract peptona dextrose ou meio extrato de levedura, peptona dextrose

β = beta

μl = microlitro

μg = micrograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO	23
2.1	Classificação geral dos fungos	23
2.2	Patogenicidade dos fungos.....	25
2.3	Gênero <i>Candida</i>	26
2.3.1	<i>Candida albicans</i>	27
2.3.2	<i>Candida tropicalis</i>	30
2.3.3	<i>Candida glabrata</i>	31
2.3.4	<i>Candida parapsilosis</i>	32
2.3.5	<i>Candida orthopsilosis</i>	33
2.4	Métodos de identificação de cepas clínicas de <i>Candida spp.</i>	34
2.5	Mecanismos de patogenicidade do gênero <i>Candida spp.</i>	36
2.5.1	Aderência	38
2.5.2	Formação de biofilme	39
2.5.3	Morfogênese ou <i>Switching</i>	40
2.5.4	Enzimas hidrolíticas	41
2.6	Métodos de tratamento convencionais, mecanismo de ação e resistência antifúngica.....	42
2.6.1	Azóis.....	44
2.6.2	Equinocandinas	45
2.6.3	Polienos.....	46
2.7	Gênero <i>Caryocar spp</i>	47
2.7.1	Importância econômica das principais espécies do gênero <i>Caryocar</i>	50
2.7.1.1	<i>C. brasiliense</i>	50
2.7.1.2	<i>C. coriaceum</i>	50

2.7.1.3 <i>C. villosum</i>	51
2.7.1.4 <i>C. dentatum</i>	51
2.7.2 Atividade biológica e composição bioquímica do fruto do pequi	51
3 OBJETIVOS	55
3.1 Geral.....	55
3.2 Específicos	55
4 METODOLOGIA.....	56
4.1 Tipo de estudo.....	56
4.2 Tipo de amostras: cepas clínicas de <i>Candida</i> spp	56
4.3 Preparação de meios de cultura.....	57
4.3.1 Ágar Sabouraud	57
4.3.2 Meio cromogênico - CHROMagar <i>Candida</i> ®	57
4.4 Identificação molecular.....	59
4.4.1 Extração de DNA.....	59
4.4.2 Desenho de primers	59
4.4.3 Reação da cadeia em polimerase (PCR)	60
4.5 Testes enzimáticos.....	61
4.5.1 Tampão citrato-fosfato.....	61
4.5.2 Lipase.....	61
4.5.3 Amilase.....	62
4.5.4 Proteinase	63
4.5.5 Fosfolipase	63
4.6 Atividade Antifúngica, Biofilme e Antibiofilme	65
4.6.1 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC).....	65
4.6.2 Atividade antibiofilme do óleo de pequi	66
4.6.3 Avaliação da interferência do óleo no biofilme	66
4.6.4 Análise estatística.....	67

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	68
5.1 Resposta ao isolamento microbiológico em Ágar Sabouraud	68
5.2 Confirmação da identificação de cepas <i>Candida spp</i> por método automatizado Vitek® bioMérieux	69
5.3 CHROMagar® <i>Candida</i>	71
5.4 Ensaio molecular das amostras clínicas <i>Candida spp</i>	73
5.5 Perfil enzimático das cepas clínicas de <i>Candida spp</i>	75
5.5.1 Produção de Lipase	77
5.5.2 Produção de Amilase	78
5.5.3 Produção de Proteinase	80
5.5.4 Produção de Fosfolipase.....	81
5.6 Atividade antifúngica do óleo de <i>Caryocar brasilienses Cambess</i> (pequi) sobre os fatores de virulência de cepas clínicas <i>Candida spp</i>	82
5.7 Efeito da MIC no biofilme	87
5.8 Óleo de <i>Caryocar brasiliense cambes</i> como antifúngico.....	92
6 CONCLUSÃO.....	95
REFERÊNCIAS.....	96
ANEXO.....	114

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* spp é um dos mais relevantes grupos de leveduras estudados. Inclui cerca de 200 espécies e está presente no organismo de animais e na microbiota de indivíduos saudáveis habitando locais como pele, mucosas e trato gastrointestinal. Contudo, o gênero também tem se destacado devido à presença de algumas espécies que atuam como agentes patogênicos sendo, portanto, associados à diversas enfermidades (SAVASTANO *et al*, 2016; ANDRADE *et al*, 2018).

A principal patologia ligada às leveduras é representada pelas candidemias que normalmente ocorrem quando o sistema imunológico do indivíduo se torna comprometido, sob condições clínicas debilitantes, procedimentos cirúrgicos, pessoas acometidas com síndromes metabólicas (obesidade, hipertensão arterial, diabetes *mellitus* tipo 2), portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), entre outros fatores (BADIEEL *et al*, 2017; VARANO *et al*, 2019).

Os microrganismos passam de um estado comensal para um oportunista ou saprófito, expressando sua virulência com a utilização de vários mecanismos, principalmente com a modificação de sua conformação estrutural, formação de biofilmes, produção de enzimas e superexpressão de genes (NETO *et al*, 2018; MONTES *et al*, 2019).

Para identificação das espécies de leveduras são utilizados métodos da taxonomia clássica e mais recentemente a biologia molecular. Na taxonomia clássica, o objeto de investigação são as características morfológicas macroscópicas (aspectos das colônias, textura), microscópicas (presença ou ausência de hifa, septos, tipo e arranjo de esporos, tubo germinativo), velocidade de crescimento, resistência ou sensibilidade a agentes antifúngicos. Aliados a esses métodos, diagnósticos moleculares tem se demonstrado formas modernas, rápidas e específicas de identificação de espécies (WICKES & WIEDERHOLD, 2018; MATEO *et al* 2020; POTE *et al* 2020).

Candida albicans é a espécie mais estudada clinicamente devido ao seu alto nível de resistência aos diversos tratamentos antifúngicos existentes. Entretanto, outras espécies classificadas como *não-albicans*, por exemplo, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*,

Candida pseudotropicalis, *Candida lusitaniae* manifestaram um aumento de patogenicidade e por consequência na resistência aos tratamentos convencionais (MILHOMENS *et al.*, 2014; REINHARDT *et al.*, 2018).

O tratamento antifúngico convencional é baseado em três classes principais de compostos: azóis, polienos e equinocandinas, prescritas levando-se em consideração a intensidade da infecção. Cada um desses componentes age de forma que ocorra retardo ou total inibição do crescimento do patógeno através da indução de apoptose por perdas estruturais, o que gera diminuição da permeabilidade da membrana e da síntese enzimática (ALBURQUENQUE *et al.*, 2011; BASETTI *et al.*, 2016; ARENDRUP & PATTERSON, 2017).

Os compostos de origem natural, sintéticas ou semissintéticas tem sido explorados por seus efeitos antivirais, antitumorais, e mais recentemente por ações antifúngicas na tentativa de produzir fármacos mais eficientes. Existem práticas que envolvem extratos de plantas com efeitos biológicos ainda desconhecidos, desse modo, é necessário que mais pesquisas sejam realizadas com o intuito de se conhecer os benefícios da utilização de medicamentos naturais (GOMES *et al.*, 2016).

O óleo de pequi (*Caryocar brasiliense Cambess*) tem sido alvo de diversas pesquisas para identificação de suas propriedades contra enfermidades. Dentre os benefícios da administração do óleo destacam-se: diminuição de estresse oxidativo nas células, aumento da saúde digestiva, efeito anti-inflamatório, fonte de vitaminas (A e E) e mais recente foram constatadas suas propriedades antifúngicas para os representantes dos gêneros *Aspergillus spp*, *Cryptococcus spp* e *Candida spp* (MELO *et al.*, 2012; ASCENÇÃO & MOUCHREK FILHO, 2013; CARMO *et al.*, 2013).

Cepas de *Candida* ATCC (*American Type Culture Collection*) são padrões importantes para avaliação de moléculas, devido à garantia de pureza do microrganismo, de modo que, é possível determinar a concentração inibitória mínima (MIC) para tratamentos antifúngicos com bastante segurança. Todavia, para uma possível utilização de compostos como fármacos, torna-se necessário a avaliação em cepas clínicas, oriundas de locais onde possa ocorrer a infecção fúngica como esfregaço vaginal, urina, mucosa oral, entre outros (GUNASEGAR & HIMRATUL-AZNITA, 2018).

Diante disso, é importante a realização de pesquisas com o intuito de se obter princípios ativos que atuem melhor contra a resistência antifúngica do que os agentes comumente utilizados. Portanto, o presente estudo tem como objetivo estudar o efeito

do óleo de *Caryocar brasilienses* Cambess (pequi) sobre fatores de virulência de cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida orthopsilosis* e *Candida glabrata*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Classificação geral dos fungos

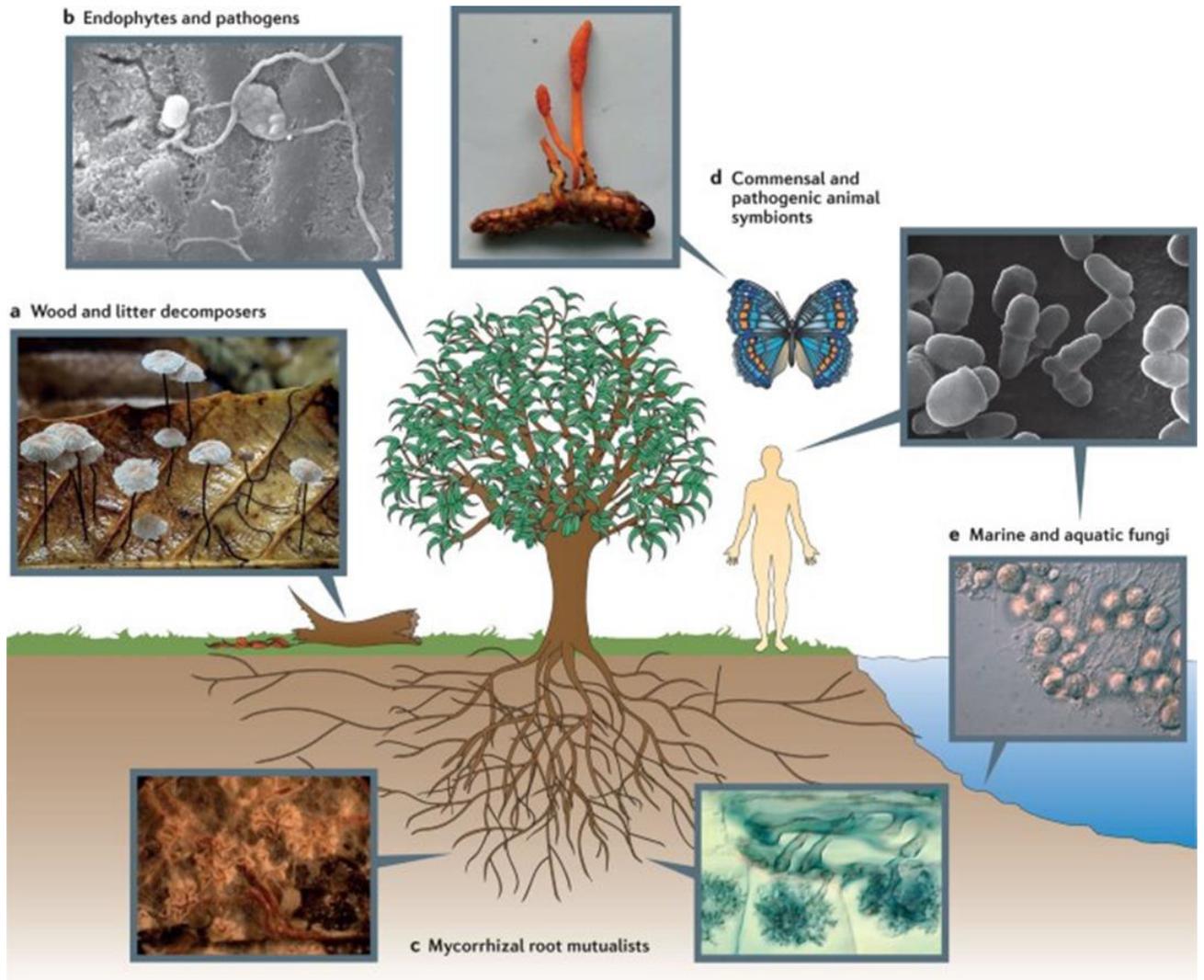
O Reino Fungi é considerado um dos grupos de seres com maior diversidade da Terra, logo, podem ser encontrados dispersos em muitos ambientes através do solo, água, ar, sementes, presentes ainda em insetos, animais e seres humanos. A biodiversidade fúngica é vista através de suas propriedades biológicas, características morfológicas, produção de metabólitos, utilização na indústria, entre outros (NUCCI *et al.*, 2013; TAKAHASHI, *et al.*, 2017).

Esse Reino é composto por dois organismos principais: leveduras e fungos filamentosos. As leveduras são organismos unicelulares que podem ser encontrados em formas ovais, cilíndricas ou esféricas. Já os fungos filamentosos são seres mais complexos, multicelulares, macroscópicos, que apresentam longos filamentos em sua estrutura e são conhecidos tradicionalmente como cogumelos e bolores (HUSSIAN *et al.*, 2015).

Dentre as características desse grupo, vale destacar em sua morfologia uma parede celular composta por quitina, glucanas, celulose e outros carboidratos. Podem ser uni ou multinucleados, homo ou heterocarióticos, haploides ou diploides. A reprodução pode ser sexual (meiose), parassexual (cariogamia seguida de aneuploidia) ou assexual (divisão nuclear mitótica) (LI & NIELSEN, 2017).

Fungos são seres sésseis encontrados em diferentes habitats incluindo ambientes extremófilos em diversas regiões do mundo (Figura 1). Sua principal forma de alimentação é através da liberação de exoenzimas que digerem substâncias orgânicas presentes no ambiente e por isso são denominados de heterotróficos. Existem ainda espécies que se alimentam de organismos mortos ou em decomposição e por isso são considerados saprófitos (HALICI *et al.*, 2020).

Figura 1 - Biodiversidade do Reino Fungi.



Nature Reviews | Microbiology

(A) decompositores de matéria orgânica; (B) endófitos e patogênicos; (C) micorrizas mutualistas; (D) comensais e patogênicos; (E) aquáticos. Fonte: NILSSON *et al.*, 2019.

Contudo, existem ainda os que vivem em simbiose com outros organismos onde há troca de nutrientes como é o caso dos fungos endófitos que se associam às plantas em seus tecidos internos ou micorrizas que interagem com as raízes. Alguns representantes também podem ser encontrados no tubo digestório de animais herbívoros, logo, auxiliam em processos digestórios (LIMA *et al.*, 2020).

Leveduras são organismos eucariotas, heterotróficos e unicelulares pertencentes ao reino Fungi. Trabalhos pioneiros de identificação desses microrganismos os associaram a plantas e com isso, em 1709 o botânico Pier Antoni Micheli publicou o livro *Nova Plantarum Genera*, um trabalho ilustrado que detalhava aproximadamente 1900 espécies de plantas e, destas, em torno de 900 exemplares eram fungos e fungos liquenizados. Por volta dos anos de 1900, o cientista norte

americano Whittaker descobriu que esses organismos não eram semelhantes às plantas e propôs a separação onde foram incluídos nos grupos aos quais pertencem atualmente (NUNES *et al.*, 2011; NILSSON *et al.*, 2019).

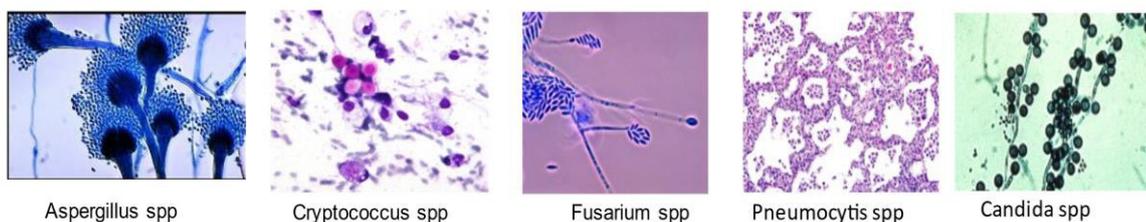
Outras leveduras têm papéis importantes na elaboração de alimentos fermentados, como *Yarrowia lipolytica* que desempenha um papel na fermentação de açúcares, possui enzimas proteolíticas, urease lipolíticas e reduz a quantidade de gordura nos produtos. Contudo, leveduras também estão associadas à diversas enfermidades e o controle dessas patogenias tem se demonstrado um grande desafio para a comunidade científica (ATHENAKI *et al.*, 2017;).

Algumas espécies têm sido registradas como parasitas de plantas, animais e seres humanos. Nessa interação com outros organismos, ao invadir células para busca de nutrientes, abrigo ou transporte, estabelecem uma relação de parasitismo ou patogenicidade. (NETO *et al.*, 2019).

2.2 Patogenicidade dos fungos

Os microrganismos patogênicos podem ser encontrados nos gêneros: *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* spp., *Fusarium* spp., *Pneumocytis* spp e *Candida* spp. Relatos afirmam que cerca de 1,5 milhões de mortes por fungos invasivos ocorrem globalmente todos os anos por espécies desses gêneros (Figura 2). (TEDILA *et al.*, 2019; PATHAKUMARI *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2020).

Figura 2 - Principais gêneros de microrganismos patogênicos.



Fonte: Adaptado de JIANG *et al.*, 2018.

Dentre as infecções fúngicas de maior relevância clínica e epidemiológica podem ser destacadas: micoses superficiais (dermatite atópica, pitíriase versicolor, candidíase oral) infecções ocasionadas por microrganismos de microbiota (toxinfecção alimentar, enterite necrótica, gangrena gasosa, candidíase vulvovaginal) ou adquiridas através do meio ambiente, ocasionando desde infecções leves até

agudas ou crônicas, com resposta inflamatória mínima ou ausente (HAY *et al.*, 2017, GINTER-HANSELMAYER & NENOFF, 2019, HAY, 2020).

As infecções fúngicas iniciam-se principalmente devido a falhas das defesas imunológicas, desequilíbrio da microbiota ou evasão de patógeno por meio de mecanismos intra e extracelulares, logo, ocorre o aumento das ações dos principais fatores de virulência: formação de biofilmes, aderência ao tecido do hospedeiro, secreção de toxinas, produção de exoenzimas hidrolíticas e variabilidade fenotípica (GUPTA *et al*, 2018; LEUNG *et al*,2020).

Os mecanismos de adesão dos microrganismos patogênicos às células hospedeiras são mediados por proteínas específicas, as adesinas, localizadas na parede celular dos fungos o que os confere a capacidade de se aderir a proteínas, fibrinogênio, fibronectina e açúcares presentes na superfície celular do hospedeiro, bem como por fatores ainda não totalmente elucidados como: propriedades físico-químicas, hidrofobicidade e forças eletrostáticas favorecendo, desse modo, o processo infeccioso (DEORUKHKAR & SAINI, 2016; LIONAKIS *et al*, 2020).

Posteriormente ao início do processo de infecção, ocorre a proliferação de células leveduriformes e a formação de tubos germinativos resulta no desenvolvimento de estruturas filamentosas (hifas e pseudo-hifas) favorecendo a formação de biofilmes. Com a maturação dessas estruturas há um acúmulo na matriz extracelular da célula, o que torna a célula fúngica mais resistente (GOMES *et al*, 2016; SULE *et al*, 2019).

Algumas espécies de *Candida* spp apresentam capacidade pleomórfica de alternância reversível entre a forma leveduriforme e filamentosa. Essa capacidade de dimorfismo morfológico confere maior resistência à fagocitose e facilita novos processos de invasão e adesão de células hospedeiras (RASTI *et al*, 2014; HASSAN *et al*, 2019).

2.3 Gênero Candida

O gênero *Candida* pertence à classe *Saccharomycetes* sendo um dos grupos de leveduras com maior número de espécies e caracteriza-se pela presença de microrganismos diploides, de crescimento polimórfico, com células ovoides, hifas, pseudo-hifas, túbulos germinativos, entre outras características. Em condições normais, colonizam a pele, mucosas do aparelho bucal, urinário e vaginal, aproximadamente 80% do trato digestivo da população adulta saudável, logo, são

encontrados em seu estado comensal no organismo tanto de animais quanto de seres humanos (ABI-CHACRA *et al*, 2013; ENDOH *et al*, 2021).

Contudo, existem inúmeros fatores responsáveis por desencadear um desequilíbrio nessa relação comensal em diversos sítios anatômicos que por consequência facilita o desenvolvimento de candidemias. Entre os mais importantes estão a utilização prévia de antibióticos de amplo espectro, períodos longos de internação hospitalar, neutropenia, nutrição parental, sonda vesical, ventilação mecânica e cateter venoso central. Além desses fatores, outros merecem destaque: idade, imunossupressão, insuficiência renal, diabetes *mellitus*, quimioterapia, radioterapia, lesão de mucosas, hemodiálise, entre outros (SHIGEMURA *et al*. 2014; GULATI & NOBILE, 2016).

Acredita-se que 80% a 95% das infecções hospitalares em UTI intensiva são ocasionadas por espécies de *Candida* spp o que representa um desafio multidisciplinar devido às dificuldades de identificação correta das espécies, e por consequência, diagnosticar e encontrar mecanismos terapêuticos eficientes para diminuir ou erradicar os efeitos desses patógenos (CLANCY & NGUYEN, 2018; SZERENCSEÉS *et al*, 2020).

As leveduras do gênero *Candida* spp tem sido alvo de muitos estudos devido sua potencialidade de infecção e colonização de hospedeiros. Entre as espécies de maior destaque temos *Candida albicans* observada pela primeira vez em 1830 pelo cientista Langenbeck em um paciente com aftas bucais e erroneamente classificou a levedura como o agente etiológico da febre tifóide (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010).

Em 1842, David Gruby definiu o surgimento dessas aftas como candidíase oral mas sugeriu que a espécie deveria ser incluída no gênero *Sporotricum* spp. Já em 1923, Berkhout transferiu a espécie para o gênero *Candida* spp e definiu a espécie *C. albicans* (LÓPEZ *et al*, 2014).

Após essa descoberta, mais de 111 denominações foram descritas no livro *The Yeast* publicado em 1984 e os achados clínicos foram atribuídos de forma crescente a esta levedura ao longo da história. No decorrer dos anos novas espécies foram encontradas, suas características estudadas e constantes pesquisas foram realizadas na tentativa de se obter mais informações sobre as leveduras pertencentes ao gênero *Candida* spp (TOZZO & GRAZZIOTIN, 2012).

2.3.1 *Candida albicans*

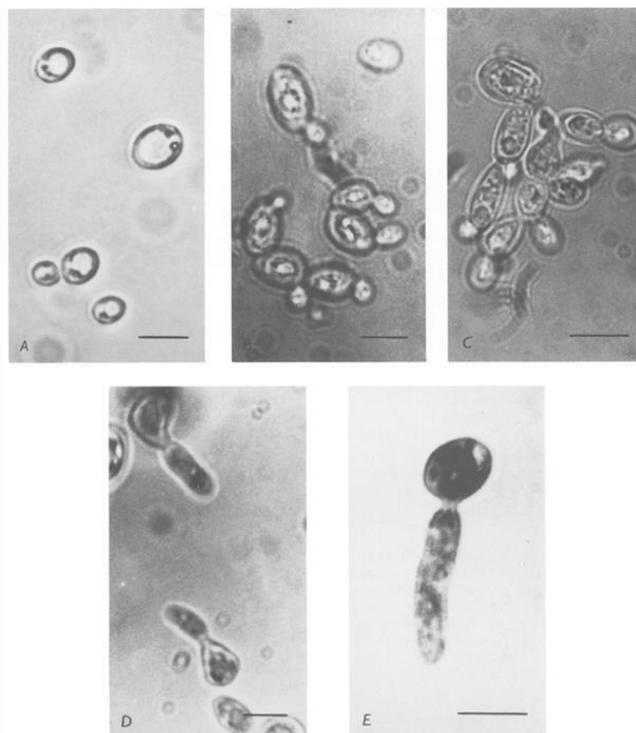
É a espécie mais estudada do gênero devido ao seu alto potencial patogênico, mas também pode ser encontrada em seu estado comensal no organismo (Figura 3). É o principal agente causador de infecções superficiais e invasivas que podem surgir em diferentes locais do corpo (mucosas e epitélios) de forma simultânea (BONGOMIN *et al.*, 2017).

Essa capacidade se dá por suas características morfológicas, uma vez que é uma levedura do tipo diploide, logo, apresenta uma grande diversidade morfológica que varia de acordo com as condições do qual esse microrganismo é submetido, por exemplo, disponibilidade de CO₂, pH e temperatura podem induzir a mudança na morfologia da fase leveduriforme para filamentosa (BOHM *et al.*, 2017; NETO *et al.*, 2020).

C. albicans inicia seu processo de virulência com adesão às células dos hospedeiros, cuja ação é fundamental para a sobrevivência de leveduras. Essa aderência pode ser mediada por proteínas dos genes *agglutinin-like sequence* (ALS) que podem codificar até oito destas proteínas (de ROSSI *et al.*, 2011).

Apesar de ser encontrada de forma mais abundante no organismo tanto de animais selvagens e domésticos quanto em seres humanos, já existem relatos dessa levedura sobrevivendo a longos períodos na água sem nenhum contato com hospedeiros e também em amostras de coliformes fecais, o que sugere uma tendência das leveduras de se adaptar à ambientes desfavoráveis para sua sobrevivência (Figura 3) (GOW *et al.*, 2012; BORAL *et al.*, 2018).

Figura 3 - Aparência microscópica de *Candida albicans*.



(A) Células em fase estacionária de crescimento (cultura de 96 h). (B, C) Morfogênese semelhante à levedura em 2 e 4 h. (D). Tubos germinativos jovens. (E) tubo germinativo totalmente desenvolvido. O marcador de barra representa 5 µm. Fonte: HRNOVA & DROBNICA, 1981.

O dimorfismo é uma característica importante dessa espécie uma vez que resulta na formação de estruturas filamentosas que auxiliam na produção de enzimas como hemolisinas, proteinases e fosfolipases. Na fase unicelular leveduriforme pode apresentar brotos e formar hifas verdadeiras. Nas extremidades de sua estrutura podem ser encontrados brotamentos e ainda formas de leveduras alongadas (pseudo-hifas) (PIERCE *et al* 2017; PAIS *et al*, 2019).

Esses mecanismos fenotípicos e moleculares juntamente com a vulnerabilidade do hospedeiro como um sistema imunológico comprometido, infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), utilização de medicamentos (corticosteroide e antibiótico), quimioterapia e terapias de antirrejeição durante transplante de órgãos podem aumentar ou contribuir para o surgimento de fatores de virulência. Logo, compreender os mecanismos de mudanças na conformação estrutural e a patogenicidade de *C. albicans* é fundamental para auxiliar no desenvolvimento de novas terapias (MOTAUNG *et al*, 2017).

Contudo, algumas espécies classificadas como *não-albicans* tem se destacado por um aumento no nível de toxicidade, resistência aos tratamentos

antifúngicos convencionais, logo, tem sido associadas com diversas patogenias (TONG & TANG, 2017).

Destas podemos destacar: *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, *Candida glabrata* que juntamente com a *C. albicans*, representam quase 95% das causas de candidemias invasivas (YAPAR *et al*, 2014; TONG & TANG, 2017).

2.3.2 *Candida tropicalis*

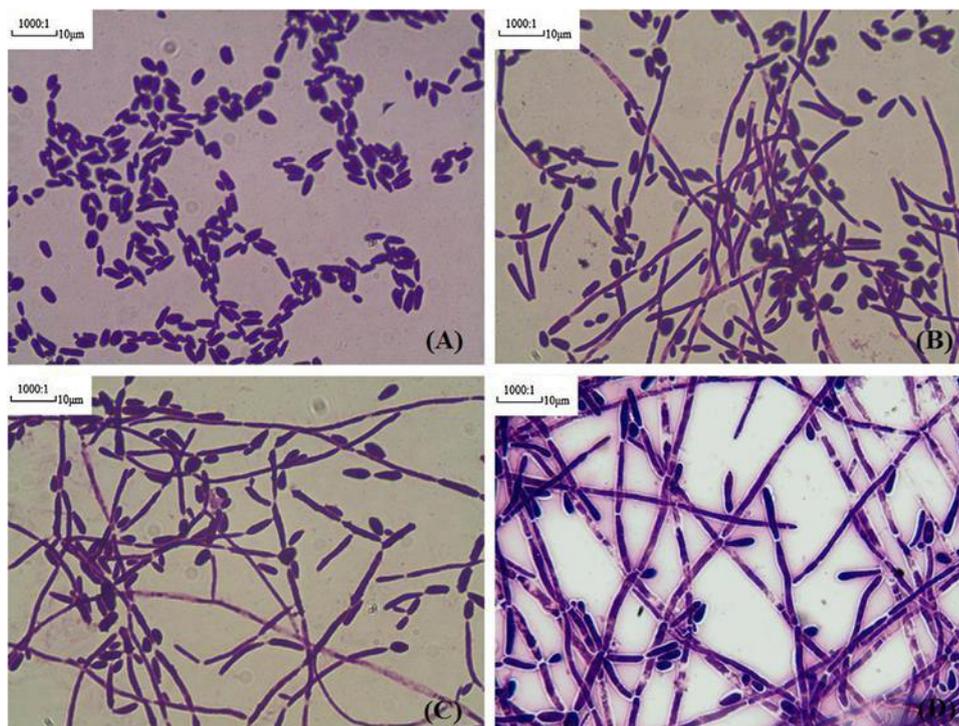
É uma levedura pertencente ao filo Ascomycota isolada pela primeira vez em 1910 oriunda de um paciente com bronquite e teve como primeira identificação *Oidium tropicale*. (CASTELLANI *et al*, 1912).

Sua morfologia compreende células esféricas ou ovoides, blastoconídios que podem ser agrupados ou sozinhos, pseudo-hifas em cadeias ramificadas e até mesmo hifas verdadeiras. Com relação às características bioquímicas podem ser capazes de fermentar enzimas como galactose, sacarose, maltose além de assimilar outros carboidratos através da via oxidativa (DEORUKHKAR *et al.*, 2014).

C. tropicalis tem sido considerada a segunda espécie com maior capacidade de infecção, perdendo apenas para *C. albicans* e se apresenta como agente oportunista quando ocorre uma supressão da flora bacteriana do hospedeiro devido à utilização de medicamentos como antibióticos de amplo espectro e quando surgem lesões nas mucosas. Normalmente, se manifesta de forma mais patogênica em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1 e 2, linfoma, câncer, doenças hematológicas e infecções disseminadas o que resultam em altos índices de letalidade (Figura 4) (KUMAR *et al.*, 2016).

Dentre seus mecanismos de infecção da *C. tropicalis* podem ser destacados a grande capacidade de formação de biofilmes, adesão às células tanto epiteliais quanto endoteliais bucais, secreção de enzimas líticas, como proteinases, fosfolipases e hemolisinas, morfogênese e superexpressão de genes das famílias ergosterol (ERG) e sintase glucano (FSK) (TERÇAS *et al.*, 2017).

Figura 4 - Quatro estágios de mudança morfológica na formação de hifas de *C. tropicalis*.



$.5 \times 10^6$ células de *C. tropicalis* (20 μ l) foram inoculadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37 °C por 12 h. As células foram coradas por Gram e observadas por microscopia de luz com aumento de 100 \times . A – D representou a Classe I – IV, respectivamente.

Fonte: JIANG *et al.*, 2016.

Os isolados clínicos demonstram que são espécies sensíveis aos antifúngicos anfotericina B e aos triazólicos mas sua resistência aos azólicos tem demonstrado um aumento devido ao seu principal mecanismo de infecção celular que se dá através do aumento da expressão do gene ergosterol (ERG11) (SOLL *et al.*, 2014; CHAABANE *et al.*, 2019).

2.3.3 *Candida glabrata*

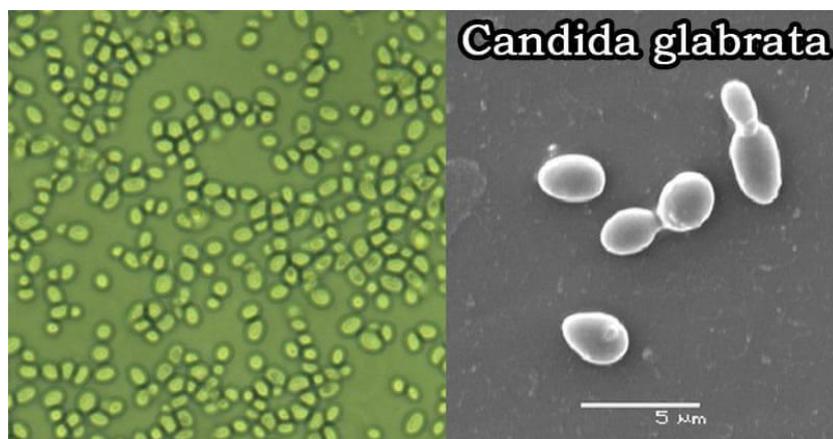
É uma levedura patogênica oportunista responsável por aproximadamente 29% das infecções totais da corrente sanguínea. Sua prevalência varia de acordo com a área geográfica, mas dados recentes demonstram que essa espécie é a terceira mais patogênica do gênero, perdendo apenas para *C. albicans* e *C. tropicalis* (LÓPEZ-FUENTES *et al.*, 2018).

As infecções dessa espécie são comumente encontradas em indivíduos idosos, receptores de transplante de órgãos, pacientes diabéticos e também é um agente causador de infecções vaginais e do trato urinário. Historicamente, *C. glabrata* (Figura 5) foi nomeada *Cryptococcus glabrata*, e este nome foi alterado pela primeira vez para *Torulopsis glabrata* e posteriormente para *Candida glabrata*. Por não ser

constatada a formação de pseudo-hifas nessa espécie, ela foi transferida definitivamente para o gênero atual (ENKLER *et al.*, 2016).

Essa espécie não apresenta mudança na sua conformação estrutural, ou seja, apresenta-se apenas na forma leveduriforme, mas possui grande capacidade de se aderir à diversos substratos. Expressam uma quantidade significativa de genes que codificam adesinas, moléculas envolvidas nos primeiros estágios de infecção (Figura 5). (TIMMERMANS *et al.*, 2018).

Figura 5 - Levedura de *C. glabrata* ao microscópio eletrônico (1600x).



Duas células individuais e dois pares mãe-filha durante o processo de brotamento. Fonte: AHMAD, *online*, 2020.

2.3.4 *Candida parapsilosis*

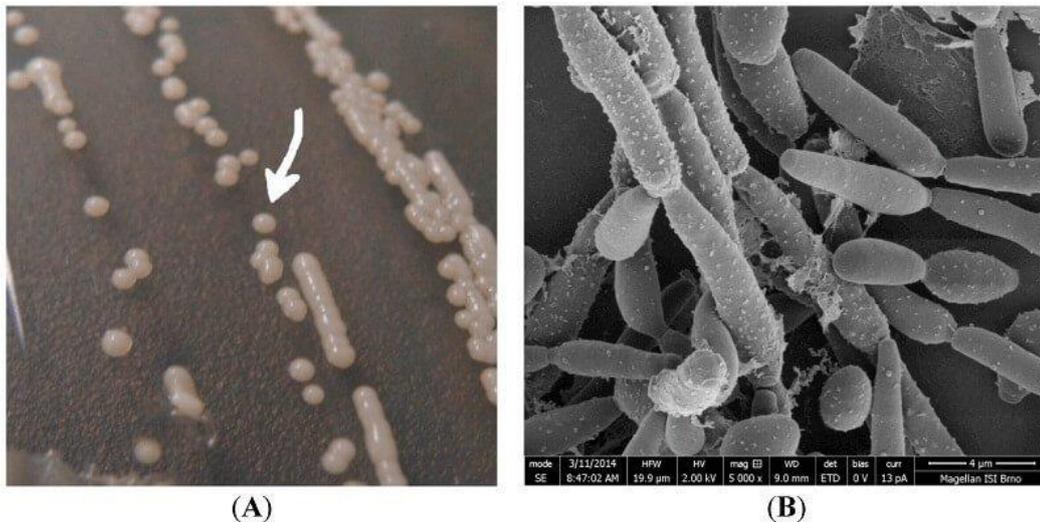
C. parapsilosis é uma das espécies encontrada apenas em seu aspecto leveduriforme. Em sua morfologia apresenta células ovoides ou arredondadas e a presença de pseudo-hifas que podem se associar à aminoácidos o que faz com que a interação patógeno-hospedeiro se inicie de forma mais rápida (Figura 6) (FANG *et al.*, 2019).

Está comumente relacionada com a contaminação de instrumentos hospitalares, o que causa a infecção principalmente de pacientes submetidos a cirurgias gastrointestinais, diabéticos e imunodeprimidos. Possui baixa capacidade de adesão celular, logo, sua contaminação é feita de forma exógena e corresponde à 10% das causas de infecções mundialmente (SUN *et al.*, 2019).

Essa espécie cresce rapidamente na administração de nutrição parental em pacientes de UTI neonatal e está associada a casos de desnutrição e baixo peso de recém nascidos. Embora infecções por *C. parapsilosis*, geralmente resultem em taxas

de mortalidade mais baixas do que infecções por *C. albicans*, vários isolados clínicos desta espécie foram relatados como menos suscetíveis a equinocandinas, e em algumas regiões, resistência ao tratamento com compostos azólicos também foi observada, o que dificulta a escolha da terapia com drogas antifúngicas (SHAO *et al.*, 2019).

Figura 6 - Colônias de *Candida parapsilosis*.



(A) Imagem de colônias de *C. parapsilosis* cultivadas em ágar por 48 h. O tamanho da colônia é de cerca de 2 mm; (B) Imagem SEM (microscopia eletrônica de varredura) de *C. parapsilosis* (cultivo por 48 h em um substrato de vidro), a imagem detalhada foi obtida usando a preparação combinada das duas técnicas - fixação química e liofilização (usando microsistemas ACE600 Leica). Fonte: SAMEK *et al.*, 2014.

2.3.5 *Candida orthopsilosis*

Candida orthopsilosis é uma espécie emergente e constituinte do complexo “*psilosis*” da espécie *C. parapsilosis* que atualmente encontra-se dividida em três grandes grupos. A distinção entre espécies baseia-se em diversos fatores incluindo análise da amplificação randômica de DNA polimórfica (RAPD), eletroforese de cariótipos, eletroforese de isoenzimas, sequenciamento da região de transcrição interna (ITS) do ácido desoxiribunocléico (DNA) ribossomal, morfotipagem e diferença na produção de biofilmes (LOMBARDI *et al.*, 2019).

A incidência de infecções fúngicas devido a *C. parapsilosis* e espécies intimamente relacionadas (complexo *-psilosis*) aumentou nos últimos anos sendo a quinta espécie mais patogênica, mas as diferenças na virulência entre essas espécies ainda não foram amplamente estudadas e elucidadas (GAGO *et al.*, 2014).

Os fatores de virulência que foram encontrados nessa espécie remetem aos mecanismos de virulência do grupo *Candida*, entre eles, formação de pseudo-hifas, produção de enzimas e biofilme. Os grupos em que prevalecem as infecções são indivíduos imunossuprimidos e recém-nascidos prematuros (RICCOMBENI *et al.*, 2012; ARASTEHFAR *et al.*, 2019).

Acredita-se ainda que *C. orthopsilosis* seja resultado da hibridação de organismos parentais não patogênicos ou que essas linhagens parentais foram superadas por organismos patogênicos que se adaptaram e formaram descendentes híbridos (PRYSZCZ *et al.*, 2015, HOVHANNISYAN *et al.*, 2020).

2.4 Métodos de identificação de cepas clínicas de *Candida* spp.

Em meados de 1980, com o aumento de casos de candidíase e candidemias ao redor do mundo, houve a necessidade de aprimoramento dos métodos de diagnósticos laboratoriais (WANG *et al.*, 2019).

Ao se levar em consideração a gravidade das infecções sistêmicas fúngicas e seu elevado custo econômico é fundamental que os diagnósticos sejam realizados de forma rápida e precisa no intuito de se prescrever o tratamento mais adequado na tentativa de minimizar as elevadas taxas de mortalidade causadas por esses microrganismos. O diagnóstico clínico baseado apenas em sintomas apresentados pelos pacientes não pode ser a única via de investigação pois os mesmos são inespecíficos e semelhantes aos encontrados por infecções bacterianas ou virais (LAMOTH & KONTOYIANNIS, 2018).

As análises laboratoriais das candidemias geralmente eram realizadas apenas por meio da técnica de hemocultura, mas devido à sua baixa sensibilidade, o diagnóstico era tardio, o que aumentava as chances de complicações. Nos anos de 1990 surgiram meios de cultura cromogênicos que diferenciam colônias de leveduras patogênicas de acordo com a cor que é produzida, o que facilita a detecção de culturas mistas. A necessidade de rapidez na identificação e a dificuldade em detectar culturas mistas no Ágar Sabouraud tradicional levaram ao desenvolvimento de meios cromogênicos (HILINSKI *et al.*, 2017; JAFARI *et al.*, 2017).

CHROMagar Candida® é o meio cromogênico seletivo e diferencial mais utilizados para rápida purificação e diferenciação de espécies de *Candida* spp isoladas de amostras clínicas. Este meio contém substratos enzimáticos que estão ligados aos compostos cromogênicos. Quando enzimas específicas realizam a clivagem desses

substratos ocorre a produção de cor e cada espécie irá se manifestar de forma diferente. A incorporação de substratos foi um grande avanço na identificação laboratorial de leveduras, pois eles permitem observar se a amostra possui mais de uma levedura o que pode auxiliar em uma identificação preventiva e direcionar a escolha do tratamento antifúngico a ser estabelecido (MATHAVI *et al* 2016; SCHARMANN *et al*, 2020).

Sistemas automatizados ou semi automatizados de identificação também tem sido utilizados para maior eficiência de diagnóstico. Como exemplo, temos o VITEK® que contém uma série de galerias plásticas com carboidratos ou substratos químicos que funcionam como base para o crescimento de microrganismos e também poços de controle de crescimento (KATHURIA *et al*, 2015)

Seu período de incubação varia entre 48 a 72 horas. Este e os demais sistemas possuem banco de dados que permitem a identificação de mais de 350 espécies de bactérias e leveduras clinicamente relevantes. Apesar de fornecerem um diagnóstico rápido e prático esses métodos ainda são pouco utilizados em laboratórios de rotina em razão de seu alto custo (KAUR *et al*, 2016; AMBARAGHASSI *et al*, 2019).

Métodos de biologia molecular têm sido empregados na identificação de microrganismos devido à alta sensibilidade e especificidade, onde o genoma é analisado independente do estado fisiológico da célula e permitem a distinção de espécies relacionadas (NEJAT *et al*, 2018).

A identificação rápida e precisa de candidemias auxilia no direcionamento das terapias uma vez que a maioria dos antifúngicos são potencialmente tóxicos não só aos agentes patogênicos, mas também às células do hospedeiro, o que ocasiona reações adversas como tonturas, dores de cabeça, erupções cutâneas, fotossensibilidade, hepatotoxicidade, entre outros (LAMOTH *et al*, 2018).

Os principais métodos moleculares consistem em extração de DNA, reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento de amostras. Os genes-alvo para essas análises tem sido os que codificam o citocromo 450, DNAríbossomal (DNAr), RNAríbossomal (RNAr), espaçadores de transcrição interna (ITS1, ITS2 e ITS4). Essas moléculas encontram-se em grande quantidade nas células leveduriformes sendo possível realizar sua amplificação e comparar os achados obtidos com os disponíveis em bancos de dados para efetivar a caracterização do microrganismo a ser estudado ou diagnosticado (GINN *et al*, 2017).

Entre os métodos de identificação, a PCR é uma das mais diversas e consiste na amplificação de um alvo de ácido nucleico ou uma proteína como componente básico para análise. É uma tecnologia de baixo custo e produz resultados rápidos. A natureza específica de uma reação de PCR permite que seja usada diretamente em amostras clínicas contendo pequenas quantidades de ácido nucleico do hospedeiro sem a obtenção de fungos puros de culturas *in vitro* (WICKES & WIEDERHOLD, 2018).

A primeira utilização de PCR em diagnóstico clínico de *Candida* spp foi publicado em 1990. Os autores identificaram e amplificaram a sequência do gene ERG11 e constataram que esse gene possui mecanismo de codificar a enzima lanosterol-14- α -desmetilase do citocromo 450 presente em *C. albicans*. Após esse estudo, métodos moleculares têm sido utilizados diretamente em material biológico (sangue, secreções, fragmentos de tecido, urina) com resultados promissores quanto ao nível de especificidade e identificação precisa de espécies patogênicas (GINN *et al.*, 2017).

Protocolos de PCR em tempo real tem sido aliados nas quantificações de DNA principalmente para monitorar pacientes em tratamento. Por ser um procedimento automatizado, requer menos manipulação das amostras clínicas, logo, diminui a possibilidade de contaminação e resultados falso-positivos (LEENA *et al.*, 2019).

O sequenciamento de amostras clínicas tem sido considerado outro método fundamental para fins de diagnóstico principalmente quando se quer caracterizar organismos à nível de espécie. É também um método aliado aos estudos de sensibilidade antifúngica. Os dados obtidos podem ser comparados aos disponíveis em banco de dados que possuem informações de mais de 500 espécies. Embora o sequenciamento de DNA seja utilizado em muitas investigações ainda não é um recurso amplamente comercializado devido ao investimento necessário para executar esse sistema (ARGAL *et al.*, 2011; WATT *et al.*, 2015).

Essa junção de metodologias tornou-se necessária devido à similaridade das formas macroscópicas entre as espécies do gênero, uma vez que a maioria dos achados clínicos apresenta as mesmas características fenotípicas não sendo possível uma diferenciação correta apenas com a visualização das cepas (OTHMAN *et al.*, 2018).

2.5 Mecanismos de patogenicidade do gênero *Candida* spp

Os mecanismos de patogenicidade envolvem respostas celulares, moleculares ou bioquímicas e que podem ocorrer de forma isolada ou simultânea. No mecanismo celular, espécimes sensíveis se modificam e tornam-se espécimes endógenas resistentes devido a alteração genética, expressão genética transitória e alteração no tipo celular (STEPHEN *et al.*, 2017).

No caso do mecanismo bioquímico, ocorrem alterações fenotípicas nos fungos e leveduras, o que resulta em uma absorção mais lenta do fármaco e alteração do sítio alvo aumentando a excreção da droga através de bombas de efluxo. Do ponto de vista molecular, ocorre ampliação gênica, mutações e outras alterações nos genes envolvidos na defesa contra o antifúngico. Outra alternativa molecular de resistência é a capacidade de formação de biofilmes (LAGREE *et al.*, 2020).

Os principais fatores para o aumento da virulência ainda não foram totalmente elucidados, mas existem alguns mecanismos relatados como formação de biofilmes, secreção de enzimas hidrolíticas e superexpressão gênica que justificam esse aumento (Quadro 1). Estudos mais recentes também encontraram nessas leveduras a capacidade de liberar vesículas extracelulares envolvidas em diversos processos biológicos cujo principal mecanismo é uma maior interação patógeno-hospedeiro durante a infecção (KARKOWSKA-KULETA *et al.*, 2020).

Quadro 1 - Mecanismos de patogenicidade de algumas espécies do gênero *Candida* spp.

Espécie	Mecanismo de patogenicidade	Referências
<i>Candida albicans</i>	Genes que codificam lanosterol 14- α -desmetilase (ERG11); superexpressão de bombas de efluxo de drogas: MDR1, CDR1 CDR2; formação de biofilmes; produção de enzimas	BOHM <i>et al.</i> , 2017; WHALEY <i>et al.</i> , 2017; ARASTEHFAR <i>et al.</i> 2019; LIU <i>et al.</i> , 2019.
<i>Candida glabrata</i>	Mutações no fator de transcrição do agrupamento de zinco PDR1; produção de enzima; formação de biofilme	SUN <i>et al.</i> , 2019; PATHAKUMARI <i>et al.</i> , 2020.
<i>Candida parapsilosis</i>	Formação de biofilmes; expressão de bombas de efluxo CDR1; superexpressão do gene ERG11; produção de enzima	LEE <i>et al.</i> , 2014; WHALEY <i>et al.</i> , 2017; LOMBARDI <i>et al.</i> , 2019

<i>Candida tropicalis</i>	Produção de enzima; mutação em reguladores de transcrição (MDR1 e CDR1); Superexpressão dos genes ERG 3; ERG11;	LEE, <i>et al</i> , 2014; ARASTEHFAR <i>et al</i> , 2019; ARIAS <i>et al</i> , 2019;
<i>Candida orthopsilosis</i>	Formação de biofilme; produção de enzima; mudança na conformação estrutural (produção de pseudo-hifas)	ARASTEHFAR, 2019; LOMBARDI <i>et al</i> 2019

Fonte: Próprio autor, 2021.

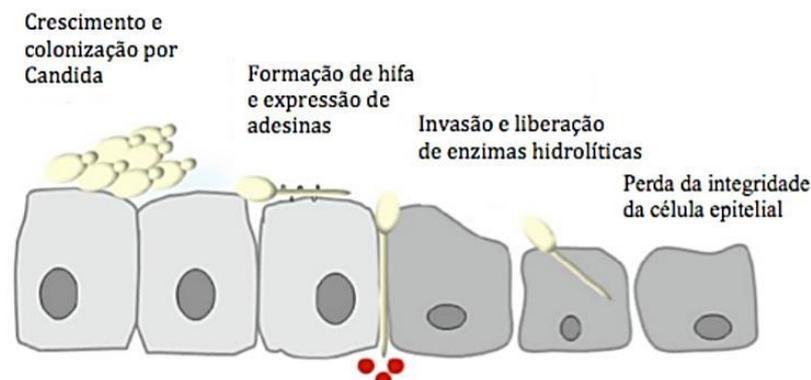
2.5.1 Aderência

A capacidade de aderir em diferentes superfícies, incluindo células do hospedeiro e superfícies abióticas (cateteres intravascular e vesical, válvulas cardíacas e próteses dentárias) é uma característica importante detectada em algumas espécies de *Candida* spp (DE GROOT *et al.*, 2013).

A etapa de adesão é caracterizada como a principal forma de sobrevivência dos microrganismos em hospedeiros humanos, o que contribui para sua disseminação nos casos de infecções fúngicas sistêmicas (MODRZEWSKA & KURNATOWSKI, 2015).

Em doenças como a candidíase esse mecanismo de adesão ocorre durante o processo de patogênese e desencadeia endocitose e infiltração ativa das leveduras nas células do hospedeiro, o que resulta em agressão tecidual e maior capacidade de disseminação da infecção (Figura 7) (MCCALL *et al*, 2019).

Figura 7 - Etapas do mecanismo inicial de infecções relacionadas aos fatores de virulência das espécies de *Candida* spp.



Fonte: HOSF *et al.*, 2016.

2.5.2 Formação de biofilme

Biofilmes são comunidades microbianas unicelulares que apresentam organização complexa dentro de uma matriz extracelular de substâncias poliméricas com capacidade de aderir a um substrato. Essa aglomeração celular proporciona proteção às células para suportar condições ambientais adversas além de atuar como reservatório para fontes de infecções sistêmicas e recorrentes (SARDI *et al.*, 2014; TAVARES *et al.*; 2015).

A formação de biofilme por microrganismos patogênicos é um mecanismo de proteção para seu desenvolvimento onde são observadas relações de simbiose e maior capacidade de sobrevivência em ambientes mais hostis. A associação de células de *Candida* spp formando biofilme é uma das principais contribuições para patogenicidade destas leveduras, pelo fato de favorecer uma evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro e maior resistência aos tratamentos antifúngicos (ZORE *et al.*, 2011; MAYER *et al.* 2013; MAHBOOB *et al.*, 2020).

O processo é caracterizado pela ocorrência de eventos sequenciais que começa com a aderência do microrganismo a um substrato, resultando em uma camada de células que se dividem e produzem hifas ou pseudo-hifas, que se projetam para uma porção superior do substrato (fase inicial). As fases finais da formação de biofilme são caracterizadas pela síntese de uma matriz extracelular (etapa de maturação) e dispersão de leveduras em torno do substrato (etapa de dispersão) (TELLAPRAGADA *et al.*, 2014).

Estudos de avaliação *in vitro* da propriedade de aderência das espécies de *Candida* spp contribuem para a compreensão do comportamento destes organismos em um processo de infecção específico ou sistêmico e a inibição dessa etapa contribui significativamente para a prevenção de infecções. (ALANGADEN *et al.*, 2011; NUCCI *et al.*, 2013).

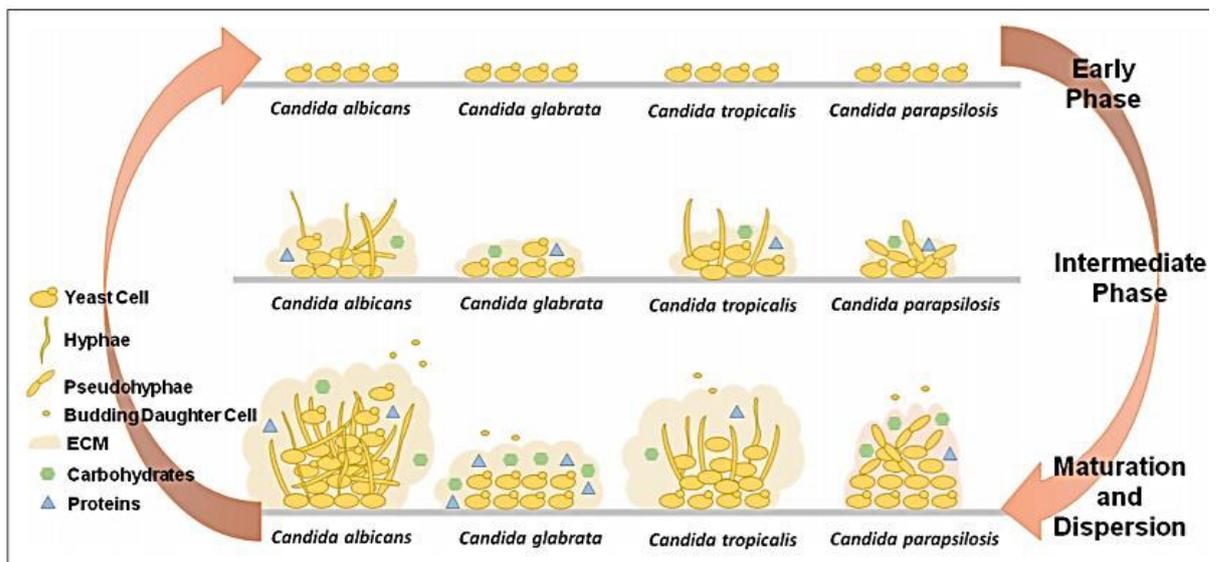
Após a aderência na célula do hospedeiro, ocorre a formação de biofilmes tanto nas células que foram aderidas quanto em dispositivos médicos. A natureza físico-química do biomaterial como a proteína da parede celular do patógeno desempenha um papel determinante nesse processo (GRANGER *et al.*, 2012; SHAFREEN *et al.*, 2014).

O processo de adesão é controlado e induzido por várias sinalizações celulares. A fixação inicial de células é mediada por fatores não totalmente elucidados

(hidrofobicidade e forças eletrostáticas) e promovido por fatores específicos como adesinas, proteínas presentes na superfície da parede celular fúngica que reconhecem ligantes presentes nas células do hospedeiro, como fibrinogênio e fibronectina (YANG *et al.*, 2014).

Um dos grupos de proteínas mais amplamente estudados envolvidos nesse processo pertence à família Als (sequência semelhante à aglutinina). Apesar de sua importância amplamente reconhecida como fatores de virulência em *C. albicans*, informações detalhadas sobre o papel biológico das proteínas Als em outras espécies de *Candida* spp são incipientes (GACSER *et al.*, 2016).

Figura 8 - Esquemas comparativos dos três estágios de formação de biofilme por *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*.



Destaque para as diferentes capacidades de produção de matriz extracelular (ECM), os diversos componentes presentes na ECM e a capacidade de exibir diferentes células morfológicas. Fonte:

CAVALHEIRO & TEXEIRA, 2018.

2.5.3 Morfogênese ou *Switching*

Microrganismos desenvolveram além do mecanismo de aderência e formação de biofilme, outros mecanismos de resistência como a capacidade de transições morfológicas que podem ser reversíveis ou não. O fenômeno de morfogênese é descrito como a de células unicelulares (leveduriformes) de crescimento isotrópico para formas filamentosas como hifas e/ou pseudo-hifas (crescimento apical). Este mecanismo de sobrevivência está intimamente ligado aos processos de adaptação a ambientes hostis e invasão ao hospedeiro (GOW *et al.*, 2011; SILVA *et al.* 2012).

O desenvolvimento da hifa envolve importantes modificações celulares e expressão de genes específicos do surgimento de hifas sendo a transformação morfológica geralmente associada a alterações na estrutura da parede celular. Esse mecanismo é encontrado principalmente em espécies do gênero, por exemplo, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* (; LI *et al.*, 2017; GARCIA-RUBIO *et al.*, 2020).

Durante a transição de crescimento de levedura em filamento, proteínas e adesinas de superfície celular específicas são expressas e essas proteínas com capacidade de adesão favorecem para que as hifas apresentem maior capacidade de aderência a mucosas, epitélios e endotélios (SILVA *et al.*, 2012; KOZIK *et al.*, 2015).

2.5.4 Enzimas hidrolíticas

As enzimas hidrolíticas extracelulares, como proteinase e fosfolipase, são consideradas importantes fatores de virulência das espécies de *Candida* spp. Entretanto, essas enzimas que fazem parte do metabolismo da levedura só podem ser consideradas fatores de patogenicidade quando esta é capaz de manifestar essa propriedade bioquímica durante um processo infeccioso (ZUZA-ALVES *et al.*, 2017).

A enzima proteinase atua na instalação e sobrevivência da levedura, e na capacidade de driblar o sistema imunológico do hospedeiro, quebrando várias proteínas importantes como imunoglobulinas e citocinas. A proteinase confere à levedura, não só a capacidade de degradar queratina, colágeno, albumina, fibronectina, hemoglobina, proteínas da matriz extracelular e cadeia pesada de imunoglobulinas, como ainda a capacidade de aderir e destruir as células do hospedeiro (D'EÇA JUNIOR *et al.*, 2011; BRANCO *et al.*, 2012; SARDI *et al.*, 2013).

A enzima fosfolipase tem a capacidade de hidrolisar o éster ligado aos glicerofosfolípidios. São conhecidos quatro tipos de fosfolipases, denominadas A, B, C, D, que diferem entre si quanto ao tipo da ligação éster que hidrolisam na molécula de fosfolípido. A enzima em questão causa danos teciduais nas células hospedeiras e promove a liberação de lipídios através da lise de membranas celulares (D'EÇA JUNIOR *et al.*, 2011; SARDI *et al.*, 2013; SHIGEMURA *et al.*, 2014).

A atividade elevada de fosfolipase está diretamente ligada ao alto grau de virulência das cepas, o que aumenta sua capacidade de adesão às células do hospedeiro e elevada porcentagem de mortalidade dos modelos de estudo *in vivo* já estudados (SPAMPINATO, *et al.* 2013).

2.6 Métodos de tratamento convencionais, mecanismo de ação e resistência antifúngica

Os protocolos de tratamento convencionais para contaminação por *Candida* spp, já são definidos por diversos autores, conforme apresentado (Quadro 2). Os agentes antifúngicos utilizados em tratamentos convencionais encontram-se em três classes principais e estão divididos de acordo com seu mecanismo de ação: os azóis inibem a biossíntese do ergosterol; as equinocandinas inibem a síntese da parede celular e os polienos modificam a integridade da membrana plasmática das células fúngicas. (ANDES *et al.* 2016).

Entre as desvantagens significativas da utilização desses antifúngicos está no fato de que os azóis geralmente são fungistáticos e seu uso prolongado contribui para o desenvolvimento de resistência. Os polienos apresentam baixos índices de resistência, porém são muito tóxicos para as células do hospedeiro. Anfotericina B (formulações lipídicas), anfotericina B convencional, e as equinocandinas, apresentam custo muito elevado de produção, assim, a descoberta de novas drogas antifúngicas e novas estratégias terapêuticas tornam-se cada vez mais necessárias (GOMEZ-LOPES *et al.*, 2020).

Quadro 2 - Principais substâncias administradas em tratamentos antifúngicos convencionais e o mecanismo de resistência das espécies patogênicas.

TRATAMENTO CONVENCIONAL			
Espécie	Substância/ Composto	Resistência antifúngica	Referências
<i>Candida albicans</i>	Fluconazol (triazólicos); anfotericina B; nistatina	Triazólicos; anfotericina B; caspofungina	NETT&ANDES, 2016, VIEIRA & SANTOS, 2016; OTHMAN <i>et al.</i> 2018.
<i>Candida glabrata</i>	Equinocandinas; fluconazol (triazólicos)	Triazólicos(voriconazol, posaconazol e itraconazol)	NUNES <i>et al.</i> 2011; LAMOTH <i>et al</i> 2018.
<i>Candida parapsilosis</i>	Fluconazol; anfotericina B; caspofungina	Triazólicos; azóis; equinocandinas	Pierce <i>et al.</i> , 2017; WHALEY <i>et al</i> 2017.

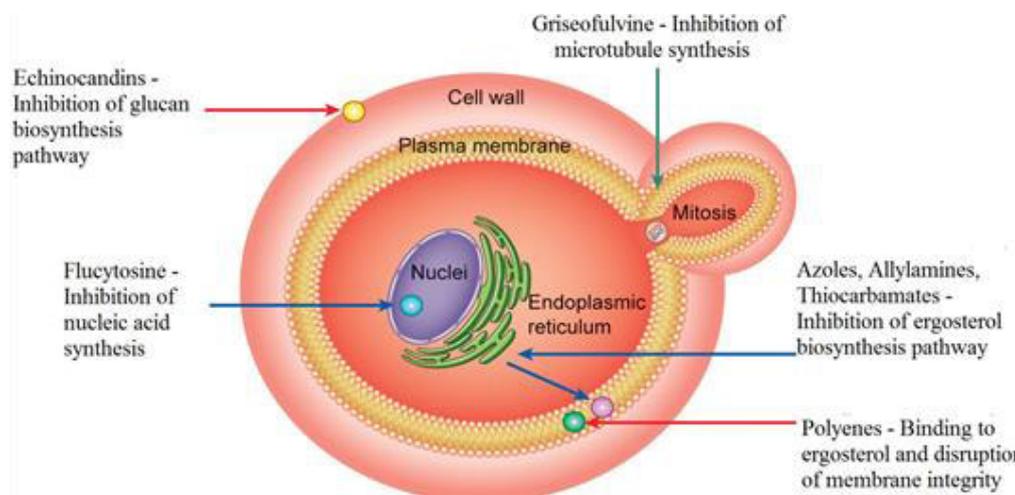
<i>Candida tropicalis</i>	Fluconazol; anfotericina B	Triazólicos; itraconazol;	FAN <i>et al</i> , 2017; ARASTEHFAR, 2019.
<i>Candida orthopsilosis</i>	Fluconazol, voriconazol, anfotericina B, caspofungina	Fluconazol; equinocandinas.	ARASTEHFAR <i>et al</i> , 2019; LOMBARDI <i>et al</i> 2019.

Fonte: Próprio autor, 2021.

A resistência aos antifúngicos, tem representado um grande desafio clínico, frente às dificuldades observadas no tratamento das candidemias. Os principais motivos para este aumento podem ser decorrentes das terapias medicamentosas com doses inadequadas ou a crescente utilização na profilaxia de infecções fúngicas além do direcionamento errôneo do tratamento para determinado agente patogênico (DEVARAJAN *et al*, 2020).

O mecanismo de ação dos medicamentos antifúngicos de forma geral, está dividido por classes, onde os azóis inibem a síntese de ergosterol no retículo endoplasmático da célula fúngica. Atuam interferindo na enzima lanosterol 14- α -desmetilase, envolvida na transformação do lanosterol em ergosterol. Os polienos atuam na membrana fúngica ligando-se ao ergosterol e causando o rompimento da estrutura da membrana, promovendo o extravasamento dos constituintes intracelulares e, conseqüentemente, a morte celular (de OLIVEIRA SANTOS *et al*, 2018) (Figura 9).

Figura 9 - Mecanismos de ação dos agentes antifúngicos tradicionais sobre alvos celulares.



Fonte: de OLIVEIRA SANTOS *et al*, 2018.

A flucitosina inibe a enzima timidilato-sintetase que interfere no DNA. As equinocandinas inibem a (1,3) β -D-glucano sintase, impedindo a síntese de glucano, que está presente na membrana celular dos fungos. As alilaminas e os tiocarbamatos inibem a enzima esqualeno-epoxidase, que participa da síntese do ergosterol. A griseofulvina atua interrompendo a produção do fuso e dos microtúbulos citoplasmáticos, inibindo assim a mitose fúngica (de OLIVEIRA SANTOS *et al.*, 2018).

2.6.1 Azóis

Os azóis ou azólicos são uma classe de agentes fungistáticos sintéticos, com um amplo espectro de atividade antifúngica e podem ser encontrados em duas categorias principais: imidazóis e triazóis. A diferenciação dessas categorias está na quantidade de átomos de nitrogênio presentes no anel azólico (2 e 3, respectivamente). Entre os compostos azólicos mais utilizados em tratamentos antifúngicos estão: cetoconazol, miconazol, que se baseiam no núcleo imidazol; e itraconazol, voriconazol e fluconazol que são derivados triazóis (LIU *et al.*, 2016; BRADFORD *et al*, 2017).

Durante muitos anos, as candidemias foram tratadas unicamente por substâncias azólicas, maior classe de medicamentos antifúngicos. Contudo, o aumento da resistência aos azóis tem sido constatado tanto em diagnósticos clínicos quanto em testes *in vitro* (TANG *et al*, 2015).

O mecanismo de ação dos compostos azólicos está relacionado à interferência da ativação da enzima lanosterol-14- α -desmetilase. Essa enzima é responsável pela biossíntese do ergosterol, um dos principais componentes da parede celular fúngica. Logo, quando não ocorre ativação enzimática há também a inibição do crescimento dos fungos e alteração na estrutura da membrana celular (LEE *et al*, 2018).

As substâncias azólicas não interferem na célula do hospedeiro, uma vez que tem como alvo principal componentes da célula fúngica como quitina e glucano que estão ausentes no corpo humano. Contudo, tem sido constatadas três maneiras principais pelas quais as espécies de *Candida* spp podem tornar-se resistentes aos azóis (SAKAGAMI *et al*, 2013).

O primeiro mecanismo ocorre quando há administração de multi fármacos pelo indivíduo, o que diminui a inibição enzimática e alteração da parede celular fúngica. Por consequência, há uma mutação dos genes CDR1, CDR2 e MDR1 que ativam bombas de efluxo principalmente em *C. glabrata*, o que aumenta a resistência antifúngica. O segundo mecanismo que pode levar à resistência azólica é a alteração da enzima que codifica os genes ergosterol (ERG11). Com a mutação desse gene, ocorre uma alteração no sítio de ligação da enzima, o que evita a ação do azol (BEYDA, *et al* 2014).

O mecanismo final é o desenvolvimento de vias de desvio como resultado de mutações gênicas para prevenir a alteração da membrana celular e acúmulo de substâncias tóxicas. Logo, quando não há presença da substância na célula, a mesma pode funcionar normalmente (PRISTOV *et al*, 2019).

2.6.2 Equinocandinas

As equinocandinas são a classe de agentes antifúngicos mais recentes e seu primeiro representante (caspofungina) só começou a ser utilizado contra infecções, a partir de 2001 pela aprovação da *Food and Drug Administration* (FDA). Atualmente são comercializados mais dois fármacos: micafungina e anidulafungina (FDA, 2001, 2006).

Esses compostos são lipopéptideos semissintéticos, obtidos a partir da fermentação de fungos filamentosos. O mecanismo de ação consiste na inibição da síntese de um importante polissacarídeo da parede celular fúngica, o β -1,3-D-glucano sintase. Quando o fármaco entra em contato com a célula, resulta na má formação da parede celular, logo, causa a apoptose (ZHAO *et al*, 2015; COSTE *et al*, 2020).

A resistência a esse antifúngico consiste na mutação de duas subunidades de β -1,3-D-glucano, FKS1 e FKS2, que modificam a estrutura dos aminoácidos tirosina, fenilalanina e prolina. Esse mecanismo resulta no desvio do fármaco, logo, sua ação (BHATTACHARYA *et al*, 2020).

Os efeitos adversos desse fármaco são reduzidos pelo fato de seu alvo ser apenas a parede celular fúngica e seus componentes. Os mais comuns são sintomas gastrointestinais como dor e distensão abdominal, náuseas, entre outros. Contudo, o uso prolongado de caspofungina gera hepatotoxicidade, edema facial, rubor e urticária sendo esses evitados quando há diminuição da velocidade de infusão (SEYEDMOUSAVI *et al*, 2017).

2.6.3 Polienos

Os polienos foram os primeiros antifúngicos utilizados na prática clínica e comparados aos outros compostos, possuem maior espectro de ação. Os principais fármacos dessa classe são: anfotericina B, nistatina e natamicina oriundos de isolados fúngicos de representantes do gênero *Streptomyces*. Normalmente são utilizados para a maioria das infecções sistêmicas, entre elas, aspergilose, criptococose e candidíase invasiva (CAMPOY& ADRIO, 2017; GÓMEZ-LÓPEZ, 2020).

O mecanismo de ação se baseia na interação do fármaco com esteróis presentes na membrana fúngica, os ergosteróis. Logo, ocorre uma alteração na permeabilidade da membrana e perda de cátions, como potássio e outras moléculas menores. Consequentemente, ocorre a formação de poros responsáveis pela evasão do conteúdo citoplasmático, seguido de lise osmótica e por fim a apoptose da célula fúngica. (KRISTANC *et al.*, 2019 BRUNET& ROMMAERT, 2020).

Associações medicamentosas tem sido utilizadas na tentativa de melhorar a resposta de pacientes aos tratamentos existentes. Interações entre anfotericina B (AmB) e flucosina tem se demonstrado um tratamento promissor e mais eficaz contra candidíase refratária e meningite criptocócica. A indução da formação de poros pela AmB faz com que a flucosina entre mais facilmente na célula e iniba a produção de material genético (DNA e RNA). Dessa forma, estes dois mecanismos atuam em sinergia para debelar infecções fúngicas (BICANIC& HARRISON, 2014; CARMONA & LIMPER, 2017).

Além da alta afinidade dos fármacos com o ergosterol existe também certo grau de afinidade com células humanas, entre elas, o colesterol. Essa afinidade contribui para o surgimento de diversos efeitos tóxicos ao organismo, entre eles toxicidade hematológica, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e em casos mais graves, os pacientes vão à óbito. (FALCI& PASQUALOTTO, 2015; CAMPOY&ADRIO, 2017).

A resistência aos polienos tem sido associada a redução da produção do ergosterol que diminui a interação com o fármaco e a formação dos poros na membrana. Além disso, a utilização de compostos azólicos também é outro fator que gera diminuição da síntese do ergosterol, o que coopera para o desenvolvimento de resistência aos polienos. (PERLIN *et al*, 2017). No Quadro 3, podem ser encontrados alguns exemplos de combinações de antifúngicos e seus principais mecanismos de ação:

Quadro 3 - Regimes de terapia antifúngica combinatória apresentam melhor eficácia em combinação do que drogas independentes.

Combinação de antifúngicos	Alvo	Referências
AMP B+ Posaconazol	Biofilme	BINK <i>et al.</i> , 2011;
AMP B + Caspofungina	Infecção	RODRIGUES <i>et al.</i> , 2014.
Micafungina+ Fluconazol	Infecção	SERENA <i>et al.</i> , 2005; ESPINEL-INGROFF, 2009.
Micafungina + AMP B	Infecção	SERENA <i>et al.</i> , 2005; ESPINEL-INGROFF, 2009.
Flucitosina + Voriconazol	Infecção	BINK <i>et al.</i> , 2011
Minociclina + Fluconazol	Biofilme de <i>Candida albicans</i>	BINK <i>et al.</i> , 2011
Posaconazol + Caspofungina	Infecção	CHATURVEDI <i>et al.</i> , 2011; Chen <i>et al.</i> , 2013
Terbinafina + Azol	Desenvolvimento da cepa	BARCHIESI <i>et al.</i> , 1997; PEREA <i>et al.</i> , 2002 ^a
Equinocandina + Azol	Candidemias invasivas	CUI <i>et al.</i> , 2015
AMP B + Flucitosina	Candidemias invasivas	PAPPAS <i>et al.</i> , 2016

Fonte: Adaptado de OLIVEIRA, SANTOS, 2018.

2.7 Gênero *Caryocar* spp

O gênero *Caryocar* compreende 25 espécies de plantas endêmicas dos países tropicais da América onde 12 destas podem ser encontradas em território nacional. O pequizeiro também conhecido popularmente como pequi, piqui, piquiá e pequiá tem sua origem da palavra “pyqui” em Tupi, no qual “py” significa casca e “qui” espinho.

Sua distribuição pode ser vista por todo cerrado neotropical, principalmente no centro-oeste brasileiro. A diversidade de espécies do gênero no Brasil pode ser o ponto central de sua dispersão. Contudo, mudanças climáticas têm sido responsáveis pela retração de sua distribuição geográfica (PALMEIRA *et al.*, 2016).

O pequizeiro apresenta características de uma planta heliófita, semidecídua e seu tamanho pode variar entre 8 a 12 metros de altura. É uma planta perene e sua florescência ocorre nos meses de agosto a novembro, com a maturação dos frutos em meados de novembro (Figura 10). Toda extensão da árvore apresenta alguma propriedade que pode ser explorada comercialmente, o que gera uma diversidade de produtos (PAZ *et al*, 2014).

Figura 10 - Classificação científica do pequizeiro (*Caryocar brasilienses Cambess*).

Classificação científica	
Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Malpighiales
Família	Caryocaraceae
Gênero	Caryocar
Espécie	C. brasiliense

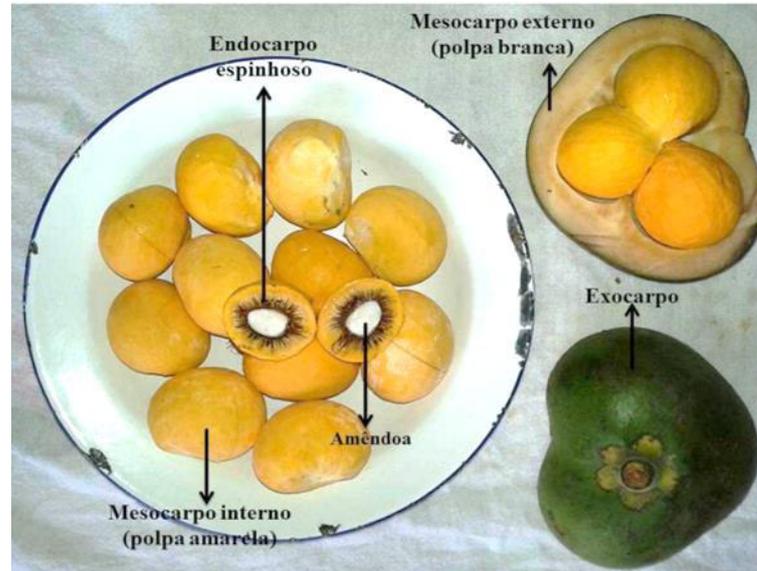


Fonte: Adaptado de www.viveiro.com.br, acessado *online*, 2020.

O fruto é drupóide e apresenta pericarpo (casca) coriáceo-carnoso acinzentado, verde ou amarelado, mesocarpo (polpa) amarelo-claro, carnoso, aromático e rico em tanino, endocarpo (envoltório do caroço), recoberto por uma camada de espinhos finos e rígidos. As sementes (amêndoas) são reniformes, de cor branca, na quantidade de duas a três por fruto (Figura 11) (LEÃO *et al*, 2017).

A polpa se destaca por altas concentrações de carotenoides, lipídeos e fibras, além da presença de compostos fenólicos, principalmente, ácido gálico e elágico. Essa alta concentração de nutrientes e compostos bioativos tem chamado a atenção de pesquisadores para o uso do fruto na prevenção de doenças crônicas, redução do risco de câncer, doenças cardiovasculares, neurodegeneração e infecções fúngicas. (NASCIMENTO-SILVA *et al*, 2020).

Figura 11 - Aspectos morfológicos do fruto do pequizeiro.



Fonte: RODRIGUES, 2016.

Na medicina popular, além da polpa, folhas e casca dos frutos são muito utilizadas no combate a resfriados, gripes, doenças respiratórias em geral, infusões antifebris, no tratamento de úlceras gástricas, queimaduras, reumatismo e dores musculares (Figura 12).

Figura 12 - Representação dos principais componentes do pequi e seus produtos.



Raiz

Tóxica;
Produce uma substância letal para peixes.



Caule

Resistente e de boa durabilidade;
Usada na construção naval, construção civil e obras de arte;
Confeção de sabões caseiros também são produzidos a partir de suas cinzas.



Fruto

Produce um óleo utilizado no preparo de alimentos;
Produção de biodiesel;



Casca

Fornecer tinta castanha, que é usada pelos artesãos para tingir lã e algodão.



Semente

Possuem propriedades aromáticas, sendo usadas na produção de óleo (manteiga de pequi) e no preparo de licóres.

Fonte: Adaptado de Embrapa, *online*, 2019.

Além disso, o óleo extraído principalmente da polpa do fruto apresenta atividade antifúngica, ação quimioterápica, propriedades antitumorais e efeito redutor dos processos inflamatórios e redução da pressão arterial (PINHEIRO *et al*, 2018).

Na composição do óleo é verificada a presença de diversos ácidos graxos como palmítico, oléico, palmitoléico, esteárico, linoléico e linolênico, alto teor de vitaminas B1 e B2 e ainda β -caroteno, licopeno, caroteno, criptoflavina, β -criptoxantina e anteraxantina (SILVA *et al* 2016).

A este grupo de compostos é atribuída a propriedade antioxidante que está relacionada com a intensificação do sistema imunológico e a redução do risco de doenças degenerativas como o câncer. Em estudos realizados com administração do óleo foi demonstrado efeitos antioxidativos e anticlastogênicos. Quando administrado em atletas, o óleo de pequi reduziu os danos no DNA e injúria nos tecidos, diminuiu o colesterol total e o LDL no sangue e também apresentou atividade anti-inflamatória (RAMOS *et al*, 2011).

2.7.1 Importância econômica das principais espécies do gênero *Caryocar*

2.7.1.1 *C. brasiliense*

Considerada uma espécie endêmica do bioma Cerrado, o pequizeiro (*Caryocar brasiliense*) apresenta grandes contribuições sociais e econômicas devido a utilização e comercialização do seu fruto, o pequi. Caracterizada como uma planta oleaginosa, o pequizeiro pode ser encontrado em áreas de dos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Bahia, Tocantins, Goiás, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Piauí e do Distrito Federal (ALMEIDA *et al.*, 2018).

Frutos da espécie *C. brasiliense* são utilizados de diversas maneiras por comunidades locais na região do Cerrado. A principal delas é a forma *in natura* ou na forma de produtos como cremes, geleias, óleos, entre outros. Na medicina popular, as folhas são utilizadas para tratamentos respiratórios, problemas gastrointestinais, gripes, problemas renais, pneumonia, queimadura e outras comorbidades ou na produção de cosméticos (PINTO *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2017).

2.7.1.2 *C. coriaceum*

Com ocorrência exclusiva no Nordeste brasileiro, é utilizada tanto na medicina popular, quanto na culinária e subsistência familiar. A atividade tradicional de extração

do óleo de pequi na região do Araripe, Ceará, é importante para economia e cultura local. Os frutos do pequi são coletados na Floresta Nacional do Araripe-Apodi e a produção do óleo é realizada em acampamentos ao redor dessa Floresta (SARAIVA *et al.*, 2011; SOUSA-JÚNIOR *et al.*, 2013).

A venda do óleo é realizada por moradores em rodovias e cidades vizinhas. É responsável também pela movimentação do Festival do Rancho com apresentação de pratos típicos nas margens das rodovias e em cidades circunvizinhas. E culminando todo esse ciclo de extração do pequi, existe a festa do Racho, com pratos típicos feitos a partir do pequi (CAVALCANTI *et al.*, 2015; MACIEL *et al.*, 2018).

Populações do sul do Estado do Ceará utilizam o óleo extraído das sementes e da polpa do fruto em contusões, dores reumáticas, musculares, no combate a úlceras, inflamação na pele, no processo de cicatrização de ferimentos, tratamento de bronquite, gripe e pneumonia (RIBEIRO *et al.*, 2014; SARAIVA *et al.* 2015; LEMOS *et al.*, 2016).

2.7.1.3 *C. villosum*

É uma espécie Neotropical, distribuída nos países: Bolívia, Equador, Guianas, Venezuela e Brasil. No Brasil a espécie apresenta ampla distribuição na região Norte (Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia e Roraima), e na região Nordeste foi registrada apenas para o estado do Maranhão (NUNES & GIL, 2016).

Os compostos identificados e isolados dessa espécie são responsáveis por algumas propriedades biológicas comprovadas, tais como a atividade antioxidante (ALMEIDA *et al.*, 2012), genotóxica (ALMEIDA *et al.*, 2013), inibidora da α -glicosidase (SOUZA *et al.*, 2011), larvicida, citotóxica e atividade lipolítica in vivo (ASCARI, TAKAHASHI e BOAVENTURA, 2013).

2.7.1.4 *C. dentatum*

Os índios da comunidade Chacobó (Bolívia) utilizam *C. dentatum* para alimentação animal, como planta ornamental e para tratamentos veterinários (ZAMBRANA *et al.*, 2017).

2.7.2 Atividade biológica e composição bioquímica do fruto do pequi

O fruto do pequi é o principal responsável pela movimentação da chamada cultura do pequi. Normalmente todos os componentes do fruto são utilizados para alguma finalidade devido sua composição bioquímica.

A casca do fruto, composta pelo exo e mesocarpo externo é considerado um subproduto, mas normalmente é utilizado por pequenos artesãos para tingir tecidos de lã e algodão. Além disso, é rico em fibras e outros compostos bioativos (SIQUEIRA *et al.*, 2013). No entanto, possui alto teor de compostos bioativos, é rica em fibras alimentares e apresenta alto potencial de inibição da peroxidação lipídica. Seu potencial antioxidante tem sido relacionado devido a sua composição fenólica principalmente pela presença de ácido gálico, quínico, quercetina e também possui atividade antimicrobiana comprovada. (ROCHA *et al.*, 2015; MOREIRA *et al.*, 2019).

Além da confecção de tinturas, a casca do fruto também pode ser encontrada comercialmente na forma de farinha que promovem capacidades antioxidantes maiores que o fruto. Esse subproduto, por ter seu teor de água reduzido ao ser transformado em alimento, inibe reações microbiológicas e químicas, o que garante maior segurança do produto como fonte alimentar e aumenta concentração de componentes nutricionais, como cálcio, magnésio, carboidratos. (SOQUETTA *et al.*, 2016; BREDA *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2017).

As capacidades antioxidantes das farinhas do subproduto do pequi foram consideradas maiores do que os de frutas e subprodutos de frutas relatados na literatura. Assim, a farinha feita da casca do pequi mostrou ser promissora como fonte potencial de fibra alimentar, antioxidantes naturais, carboidratos, magnésio, cálcio e baixos teores de sódio (BEMFEITO *et al.*, 2020; SOARES JÚNIOR *et al.*, 2010).

Extratos etanólicos do exo e mesocarpo externo também tem demonstrado possível atividade terapêutica em doenças como cardiotoxicidade crônica e relacionadas ao estresse oxidativo (MENDES *et al.*, 2015; MOURA *et al.*, 2017).

O fruto é popularmente utilizado na culinária na preparação de alimentos (arroz, feijão, frango, doces e sorvete) e bebidas (sucos, licores) em pratos tradicionais em todo o Brasil (MACHADO *et al.*, 2013). A polpa é rica em compostos fenólicos, logo, possui alta capacidade antioxidante. Contém aproximadamente 30% de óleo que pode ser utilizado para consumo humano, 10% de fibra alimentar e 3% de proteína. No entanto, ao passar pelo processo de secagem, o teor de óleo extraído torna-se

maior e o rendimento pode ser de até 59% (LOPES *et al.*, 2012; DO NASCIMENTO *et al.*, 2017).

O óleo da polpa de pequi pode ser utilizado em formulações cosméticas na forma de emulsão, uma vez que se mostrou livre de toxicidade. Além disso, o creme enriquecido com o óleo apresentou alta concentração de compostos fenólicos, propriedades antioxidantes e fotoprotetoras. Os óleos essenciais presentes na polpa do pequi conferem o forte sabor e odor característico, e a sua composição pode variar de acordo com os fatores geográficos ou genéticos (GEOCZE *et al.*, 2013; PEGORIN *et al.*, 2020).

A amêndoa do pequi possui alto teor lipídico (55,76 %), com a presença de ácidos graxos insaturados (52,63 %) e saturados (41,34 %), e 29,24 % de proteínas. Os principais ácidos graxos que compõem esse óleo são o ácido oleico, palmítico e ácido linoleico. Também possui potássio, magnésio, zinco e ferro. Pode ser torrada para a produção de óleo ou pode ser consumida fresca e usada como ingrediente culinário para a preparação de bolos e condimentos (Quadro 4)(TORRES *et al.*, 2016b; ARAÚJO *et al.*, 2018; LIMA *et al.*, 2020).

Quadro 4 - Atividades biológicas comprovadas do gênero *Caryocar*.

Espécie	Parte da planta	Extrato	Atividade biológica	Referências
<i>C. brasiliense</i>	Folha	Extrato hidroalcoólico	Antileishmania, antimicrobiana, antioxidante	PINTO <i>et al.</i> , 2016; RIBEIRO <i>et al.</i> , 2017.
<i>C. brasiliense</i>	Casca	Extrato hidroalcoólico	Antioxidante	TORRES <i>et al.</i> , 2016.
<i>C. brasiliense</i>	Fruto	Óleo comercial	Atividade cicatrizante	TRAESEL <i>et al.</i> , 2017.
<i>C. brasiliense</i>	Fruto	Óleo +etanol	Atividade hepatoprotetora e antioxidante	TRAESEL <i>et al.</i> , 2016.
<i>C. brasiliense</i>	Semente	Óleo comercial	Antifúngica	LOPES <i>et al.</i> , 2011.
<i>C. brasiliense</i>	Amêndoa	Óleo comercial	Antifúngica	TORRES <i>et al.</i> , 2016b; ARAÚJO <i>et al.</i> , 2018; LIMA <i>et al.</i> , 2020
<i>C. coriaceum</i>	Casca	Óleo comercial	Tripanocida	SOUSA-JÚNIOR <i>et al.</i> , 2013

<i>C. coriaceum</i>	Fruto	Óleo da fração hexânica	Antiinflamatória	RIBEIRO <i>et al.</i> , 2014; SARAIVA <i>et al.</i> 2015; LEMOS <i>et al.</i> , 2016
<i>C. coriaceum</i>	Fruto	Óleo por decocção	Antiinflamatória	FIGUEIREDO <i>et al.</i> , 2016.

Fonte: próprio autor, 2021.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar o efeito do óleo *Caryocar brasilienses Cambess* (Pequi) sobre os fatores de virulência (formação de biofilme e produção de enzimas) de cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida orthopsilosis* e *Candida glabrata*.

3.2 Específicos

- Analisar a resposta ao isolamento microbiológico de cepas de *Candida spp*;
- Identificar as cepas clínicas por meio cromogênico;
- Identificar as cepas clínicas pelo sistema automatizado Vitek® bioMérieux;
- Realizar identificação molecular das cepas pela reação em cadeia da polimerase;
- Conhecer o perfil enzimático das cepas clínicas de *Candida spp*;
- Analisar a atividade antifúngica do óleo de pequi frente as cepas clínicas de *Candida spp*;
- Investigar o efeito da concentração inibitória mínima (MIC) do óleo na transição morfológica das leveduras, antibiofilme (pré-formado e maduro) das cinco espécies de *Candida spp*.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

Foi utilizada a abordagem experimental e descritiva para alcance dos objetivos propostos na investigação. Essa pesquisa possui aprovação CEP/Plataforma Brasil de Nº 30994120.1.0000.5087.

4.2 Tipo de amostras: cepas clínicas de *Candida spp*

Os ensaios foram realizados com 12 cepas oriundas de amostras clínicas (urina, secreção vaginal, secreção traqueal, lavado brônquico, unha, fezes, sangue e pele) que fazem parte da coleção de fungos do Laboratório de Micologia do Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Maranhão – LABMICO/NIBA/UFMA. As cepas foram identificadas por códigos para facilitar entendimento. Enquanto, que o óleo de pequi utilizado nesse estudo foi obtido em casa de produtos naturais em São Luís-Maranhão.

Os ensaios foram realizados com 12 cepas oriundas de amostras clínicas (urina, secreção vaginal, secreção traqueal, lavado brônquico, unha, fezes, sangue e pele) que fazem parte da coleção de fungos do Laboratório de Micologia do Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Maranhão – LABMICO/NIBA/UFMA. As cepas foram identificadas por códigos para facilitar entendimento (Quadro 5). Enquanto, que o óleo de pequi utilizado nesse estudo foi obtido em casa de produtos naturais em São Luís-Maranhão.

Quadro 5 - Espécies clínicas do gênero *Candida spp* da coleção de fungos do LBMICO/NIBA/UFMA.

CEPAS CLINICAS	SÍTIOS	CÓDIGO
<i>Candida albicans</i>	Urina	CaU
<i>Candida albicans</i>	Lavado brônquico	CaLB
<i>Candida albicans</i>	Secreção vaginal	CaSV
<i>Candida albicans</i>	Secreção traqueal	CaST
<i>Candida parapsilosis</i>	Unha	CpUn
<i>Candida parapsilosis</i>	Fezes	CpF
<i>Candida parapsilosis</i>	Pele	CpP
<i>Candida parapsilosis</i>	Sangue	CpS
<i>Candida glabrata</i>	Urina	CgU

<i>Candida tropicalis</i>	Lavado brônquico	CtLB
<i>Candida tropicalis</i>	Urina	CtU
<i>Candida orthopsilosis</i>	Sangue	CoS

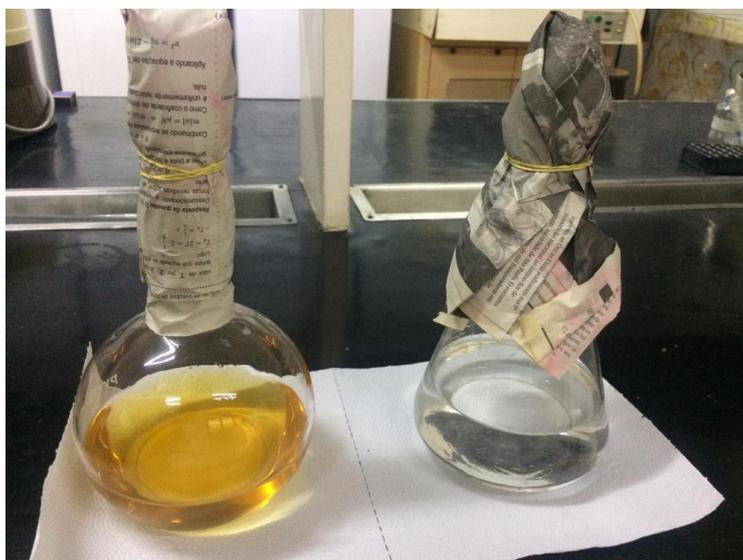
Fonte: Próprio autor, 2021.

4.3 Preparação de meios de cultura

4.3.1 Ágar Sabouraud

Para crescimento e armazenamento das leveduras foram pesados em torno de 12 gramas de Ágar Sabouraud e misturados à 200 mL de água destilada. A mistura foi pré-aquecida em manta aquecedora para total dissolução do meio. Após o resfriamento parcial do líquido houve sua transferência para tubos de 6 mL que foram autoclavados por 15 minutos a 121° C. Posteriormente, os tubos foram colocados para resfriar à temperatura ambiente até que ocorresse total solidificação do meio de cultura. As cepas foram repicadas em seus respectivos tubos e colocadas em estufa para crescimento por 24 horas a 37°C (Figura 13).

Figura 13 - Preparação do meio Ágar Sabouraud.



Fonte: Próprio autor, 2021.

4.3.2 Meio cromogênico - CHROMagar Candida®

Foram pesados 12 gramas de Chromagar em 250 ml de H₂O destilada autoclavada. A solução foi homogeneizada. O meio foi aquecido sob agitação

frequente e fervido por 1 minuto até completa dissolução. Após resfriamento parcial foi distribuído em placas de Petri. Após solidificação do meio houve a semeadura das amostras (Figura 14).

As amostras passaram por um processo de diluição em solução salina (NaCl 0,85% e água destilada) seguindo a escala de *Mc Farland*. Com uma alça descartável foi retirada uma pequena porção da amostra e colocada na solução. Agitou-se até que houvesse turbidez. Novamente com a alça descartável, foi retirada uma gota da suspensão fúngica que foi repassada para as placas contendo o meio. As placas foram colocadas em estufa à 37° C e observadas nos intervalos de 24, 48 e 72 horas para detectar formação das cores de acordo com o fabricante (Quadro 6).

Figura 14 - Preparação de meio cromogênico para identificação das espécies clínicas de *Candida* spp.



Quadro 6 - Interpretação de Teste Chromagar.

Estirpes	BBL CHROMagar Candida Medium
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193	Crescimento bom a excelente; colónias verde-claro a verde médio
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Crescimento bom a excelente; colónias verde-claro a verde médio
<i>Candida krusei</i> ATCC 34135	Crescimento bom a excelente; colónias planas de grande dimensão, cor-de-rosa claro a vermelho claro com um rebordo esbranquiçado.
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 1369	Crescimento bom a excelente; colónias azuis acinzentadas a azuis esverdeadas ou azuis metalizadas com ou sem halos violetas no meio circundante
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 9968	Crescimento bom a excelente, colónias cinzentas-azuladas com ou sem halos violetas
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Inibição parcial a completa
Não inoculadas	Incolor a bege claro, transparente

Fonte: BBL CHROMagar Candida Medium, 2014.

4.4 Identificação molecular

4.4.1 Extração de DNA

As cepas foram colocadas em tubos de Falcon contendo esférulas de vidro e dissolvidas em *fungus lysis solution* (FLS) 1%. Foram agitadas em *vortex* por 5 minutos e colocadas em banho-maria a 65°C por uma hora. Foram adicionados 500 µl de tampão de lise e novamente agitadas em *vortex* por 40 segundos. As amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 13.000 rpm.

O sobrenadante foi transferido para microtubos de 2 ml com cuidado para não mexer no precipitado. Foram adicionados 275 µl de acetato de amônio (pH 7) e as amostras foram incubadas por 5 minutos em banho-maria a 65°C. Após esse procedimento, foram incubadas em gelo por 5 minutos. Foram adicionados 500 µl de fenol clorofórmio e as amostras centrifugadas por 3 minutos a 13.000 rpm. 600 µl do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo de 2mL e adicionou-se 1 ml de álcool isopropílico. Após agitação em *vortex* por 5 minutos o sobrenadante foi descartado.

Foram adicionados 400 µl de etanol 70% e posterior centrifugação por 5 min a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado por decantação sobre um papel de filtro. Após 24 horas as amostras foram dissolvidas em 50 µl de H₂O ultrapura e incubadas por 20 minutos a 37°C. As amostras foram armazenadas a -20°C.

Posteriormente, as amostras foram quantificadas. A pureza e a concentração do DNA foram determinadas por meio do espectrofotômetro NanoDrop 2000/2000c UV-Vis da *Thermo Scientific*TM. Quanto as relações entre as densidades ópticas, A260/A280, foi igual ou maior que 1.7, o material foi considerado puro.

4.4.2 Desenho de primers

Após determinação das espécies que seriam utilizadas nesse estudo, foram selecionados os arquivos das sequências em formato *fasta* das quatro linhagens (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*) através de busca no banco de dados de nucleotídeos *GenBank*.

Alguns parâmetros foram determinados para a escolha das sequências que amplificariam os genes: tamanho dos primers, temperatura, conteúdo GC e repetições, especificidade, entre outros (Tabela 1). O software utilizado para o desenho dos primers foi o *Primer 3*.

Tabela 1 - Sequência de primers espécie-específico e pares de base.

Primers	Sequência	Amplicon
CALB	F: 5'- GGGGACTCATGGAGAACAGA -3' R: 5'- TGTCGCTATGAACGCTTGAC-3'	195 pb
CGL	F:5'- GATGAAGAACGCAGCGAAATG -3' R:5'- CGAGCAGCAGATTAATAGAGAAGC -3'	244 pb
CPAR	F:5'- GATGAAGAACGCAGCGAAAT -3' R:5'- TTCAAGCAAACCCAGCGTAT -3'	175 pb
CTR	F:5'-GTAACAAGGTTTCCGTAGGTG -3' R:5'-ATGCGAGAACCAAGAGATCC -3'	213 pb

F= forward; R=reverse; CALB= *C.albicans*; CGL= *C.glabrata*; CPAR= *C.parapsilosis*; CTR= *C.tropicalis*; pb= pares de base.

4.4.3 Reação da cadeia em polimerase (PCR)

As ampliações tiveram um volume final de 25 µl contendo DNA, dNTPs (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), tampão 1x, cada primers (*forward e reverse*), MgCl₂ e enzima Taq polimerase. As reações foram conduzidas em termociclador PCR 2720 Applied Biosystems Para análise molecular serão utilizados primers da região do espaçador interno transcrito (ITS). Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese para verificar se houve amplificação (Tabela 2).

Tabela 2 - Descrição dos ciclos de PCR realizados para espécies de *Candida* spp.

Desnaturação	Ciclos	Extensão
94 °C/5min	36 x (94 °C 60s / 60°C 60s / 72°C 30s)	72°C / 5 min

Após a PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese mediante seguinte protocolo: foi pesado 1g de agarose. Em uma proveta foram medidos 40 mL de TBE 1X. A agarose foi então dissolvida em TBE 1X no *Erlenmeyer* que teve sua saída coberta com filmeto. Essa solução foi levada ao micro-ondas por 1 minuto e 30 segundos. Ao término do tempo o Erlenmeyer foi mexido vagarosamente até que a agarose seja completamente dissolvida.

A solução foi aquecida novamente por 20 segundos. Ao ser retirada do micro-ondas, a solução foi mexida mais uma vez. Foi acrescentado 3 μl de brometo de etídio à solução de agarose. O *Erlenmeyer* foi mantido em repouso até que esfrie à uma temperatura suportável a pele humana. Na parte superior da cuba de eletroforese foi colocado o pente denteado e o pente liso foi colocado na parte inferior. Foi despejado na cuba todo o volume da solução de agarose. Essa solução foi deixada polimerizando por 12 minutos.

Após essas etapas, foram misturados 5 μl de cada produto de PCR e 3,5 μl do corante *BlueJuice™ Gel Loading Buffer (10X)* (*Thermo Fisher Scientific*). Em seguida, foram pipetados 8 μl dos volumes de cada uma das amostras nos poços do gel e 3 μl de marcador *Ladder* separadamente. As amostras serão então submetidas à eletroforese em gel agarose a 2% a 90 V por 40 minutos em TBE 1X. Os produtos foram avaliados em transluminador quanto a sua quantidade e qualidade.

4.5 Testes enzimáticos

4.5.1 Tampão citrato-fosfato

Seguindo metodologia de Porto *et al*, 1996. Foram preparadas duas soluções separadamente:

Solução A: 3,84 gramas de ácido cítrico acrescentados em 1 litro de água destilada.

Solução B: 82 gramas de fosfato de sódio dibásico para diluição em 500 ml de água destilada.

Após completa dissolução, as soluções foram misturadas aos poucos até que se atingisse pH= 5.

4.5.2 Lipase

Para avaliar da expressão dessa enzima foi utilizada a metodologia de Hankin & Anagnostakis (1975):

- 2,5 gramas de peptona bacteriológica
- 1,2 gramas de cloreto de sódio (NaCl)
- 0,25 gramas de cloreto de cálcio (CaCl₂)
- 5 gramas de ágar batata

- 2,5 ml de *tween* 20

Os materiais foram misturados juntamente à água destilada até completa dissolução, exceto o *tween* 20. O meio foi autoclavado por 15 minutos a 121°C. O *tween* 20 foi esterilizado separadamente por 20 minutos. Após esses procedimentos foram adicionados ao meio 2,5 ml de *tween* 20. O meio foi passado para placas de Petri após resfriamento. Quando se constatou a total solidificação, as placas foram colocadas em estufa por 24 horas a 37° C.

Para determinação de reação enzimática positiva foi realizada a visualização da formação de cristais de sal de cálcio do ácido láurico liberado pela enzima ou formação de zonas claras em volta da colônia em razão da completa degradação do sal de ácido gorduroso. As zonas que precipitaram foram reveladas com a utilização de lugol.

Para determinar o índice enzimático (IE) foi utilizada a seguinte fórmula, seguindo metodologia de Hankin & Anagnostakis, 1975:

$$IE = \frac{\text{diâmetro do halo}}{\text{diâmetro da colônia}}$$

4.5.3 Amilase

Foi utilizada a metodologia de Hankin & Anagnostakis (1975):

- 9 gramas de ágar puro
- 18 gramas de amido de milho
- 2,5 ml de *tween* 20
- 500 ml de tampão citrato-fosfato

O ágar e o amido de milho foram dissolvidos no tampão citrato-fosfato. A solução foi então colocada em manta aquecedora para completa dissolução. O *tween* 20 foi esterilizado separadamente por 20 minutos. Após sua esterilização foi adicionado ao meio. Após resfriamento, a solução foi repassada para placas de Petri e armazenado em estufa por 24 horas a 37°C.

Para determinação do índice enzimático foi utilizada a mesma metodologia do teste enzimático de lipase. A interpretação de dados é feita de forma diretamente proporcional, ou seja, quanto maior o valor de IE, maior será a atividade enzimática.

4.5.4 Proteinase

Foi utilizada a metodologia de Price *et al.* (1982). O meio consistiu em:

- 5 gramas de Ágar-Ágar
- 5 gramas de gelatina em pó
- 5 gramas de leite desnatado
- 150 ml de tampão citrato-fosfato

O Ágar-Ágar foi adicionado em 150 ml de tampão citrato-fosfato, homogeneizado com bastão de vidro e esterilizado a 121°C durante 15 minutos. Para o preparo da solução de gelatina foram adicionados 5 gramas de gelatina pura em 50 ml de tampão citrato-fosfato e deixada em repouso durante 3 minutos. Após esse tempo, a solução foi aquecida em banho-maria para dissolução completa e posteriormente esterilizada a 120°C por 15 minutos.

A solução de leite desnatado foi dissolvida em 50 ml de água destilada. A solução foi esterilizada sob vapor fluente (autoclave com válvulas abertas), durante 30 minutos. As soluções foram misturadas vagarosamente até obter-se uma mistura homogênea. Após resfriamento, o meio foi repassado para placas de Petri. O meio foi armazenado em estufa por 24 horas a 37°C.

A reação enzimática de proteinase foi detectada pela modificação química no meio de cultura sólido. A reação positiva foi visualizada com a formação de halo translúcido, não sendo necessária a adição de solução reveladora na superfície do meio.

4.5.5 Fosfolipase

Para a preparação desse meio foi utilizada a metodologia da gema de ovo de Price *et al* (1928):

- 10 gramas de peptona bacteriológica
- 57,3 gramas de cloreto de sódio (NaCl)
- 0,55 gramas de cloreto de cálcio (CaCl₂)

- 30 gramas de glicose
- 20 gramas de Ágar Sabouraud
- 2 ovos de galinha caipira
- 1.000 ml de água destilada

Os ovos caipiras foram esterilizados em álcool 70 por 1 hora. Após esterilização, foram quebrados em uma tigela estéril onde foi separado a gema e clara com cuidado para não haver a ruptura da membrana da gema. Com o auxílio de uma seringa, a clara foi aspirada para que houvesse separação da clara e da gema. A água destilada foi autoclavada por 15 minutos a 121 °C. A gema foi diluída na proporção 50 ml de gema para 100 ml de água destilada. Houve a dissolução vagarosa da gema para evitar a formação de bolhas. A gema foi filtrada em gaze estéril. Após esfriamento parcial do restante do meio, a gema foi misturada e o meio repassado para as placas de Petri.

A atividade enzimática foi evidenciada pela formação de um halo opaco ao redor da colônia (precipitação de complexos de cálcio) e a zona de precipitação calculada de acordo com metodologia já descrita acima na tabela.

Os ensaios foram feitos em triplicatas e o valor da zona de precipitação (Pz) foi dado como a média dos diâmetros avaliados (colônia / halo + colônia):

$$PZ = \frac{COLÔNIA}{HALO + COLÔNIA}$$

A produção das enzimas proteinase e fosfolipase foram classificadas de acordo com Price *et al.* (1982) de acordo com os valores dispostos na tabela 3:

Tabela 3 - Interpretação dos resultados dos testes para determinação da atividade de proteinase e fosfolipase.

Zona de precipitação (Pz)	Resultado
≤0,69	Muito forte ++++
0,70-0,79	Forte +++
0,80-0,89	Média ++
0,90-0,99	Fraca +

Fonte: Adaptado de BRANCO *et al*, 2012; MANE *et al*, 2012.

Para todos os testes enzimáticos foram adicionados ao meio 20 μ l da suspensão salina fúngica inoculadas em triplicata. As placas foram devidamente identificadas com os respectivos meios e espécies. Foram observadas por 24 e 48 horas (Figura 15).

Figura 15 - Armazenamento dos meios para serem utilizados nos testes enzimáticos e inoculação das cepas para visualização da produção de enzimas.



Fonte: Próprio autor, 2021.

4.6 Atividade Antifúngica, Biofilme e Antibiofilme

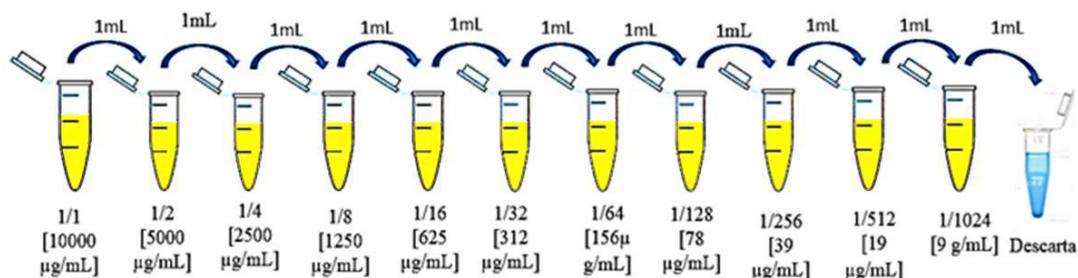
O preparo das amostras e dos ensaios foram realizados de acordo com a metodologia de (NITHYANAND *et al.*, 2015; BANU *et al.*, 2018). Todas as amostras foram cultivadas previamente em Ágar Sabouraud para seu crescimento. As amostras foram cultivadas em caldo *Yest Peptone Dextrose* (YPD) por 24h a 37°C. Após a incubação foram transferidas para tubos contendo 3ml de caldo YPD para atingir a fase de crescimento exponencial (10^7 células/ml) para todos os ensaios.

4.6.1 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

Foi utilizada microplaca de 96 poços conforme o protocolo *Clinical and Laboratory Standards Institute Guidelines* (CLSI) (2006). As espécies de *Candida* spp foram cultivadas em YPD suplementado com várias concentrações de óleo de Pequi (1; 2; 4; 7,8; 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250; 500 μ g/ml) as quais foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) 1% e incubadas a 37°C por 24h (Figura 16). Anfotericina B foi utilizada como controle positivo e YPD com 100 μ l das amostras foi usado como

controle negativo. YPD com DMSO 1% foi usado como controle de esterilização e o meio puro para o branco. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Figura 16 - Esquema representativo da metodologia utilizada para determinação de concentração inibitória mínima (MIC) do óleo de pequi.



4.6.2 Atividade antibiofilme do óleo de pequi

Três concentrações (7,8 62,5 e 500 µg/ml) do óleo de pequi foram utilizadas para o teste de inibição de biofilme. Antes do ensaio as cepas clínicas foram cultivadas por 24 h em caldo YPD. Posteriormente, as concentrações foram diluídas em caldo YPD e 1ml de cada diluição foi adicionado em placa de 24 poços em triplicata. Em cada poço foram adicionados 100µl da suspensão fúngica em caldo YPD.

As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 24h. Após esse período as placas foram lavadas e colocadas para secar em estufa. Posteriormente foram fixadas com álcool etílico PA e coradas com cristal violeta a 0.4%. Para o controle 1mL do caldo YPD sem o óleo foi distribuído nos poços com adição de 100µl da suspensão fúngica (NITHYANAND *et al.*, 2015). As placas foram avaliadas microscopia utilizando um microscópio invertido Opticam com câmara na objetiva 40x.

4.6.3 Avaliação da interferência do óleo no biofilme

O biofilme pré-formado foi realizado conforme item anterior. Após 24 h o biofilme foi mensurado no Espectramax a 600nm. Após a leitura da absorbância as placas foram lavadas com PBS 1X e adicionados meio suplementado com as concentrações de óleo de Pequi e incubado novamente a 37°C por 24h. Após esse período o biofilme foi novamente mensurado no Espectramax a 600nm. O percentual de inibição do biofilme foi dado pela fórmula:

$$PI = \frac{\sum [OD_{\text{Controle a 600nm}} - OD_{\text{Teste 600nm}}] \times 100}{OD_{\text{Controle a 600nm}}}$$

Posteriormente as placas foram lavadas e coradas com cristal violeta 0,4% e observadas em microscópio invertido.

4.6.4 Análise estatística

Os resultados enzimáticos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e as médias dos dados foram comparadas pelo pós-teste de Tukey. O nível de significância para se rejeitar a hipótese de nulidade foi de 5% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Bioestat 5.3 (Ayres et al. 2007).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

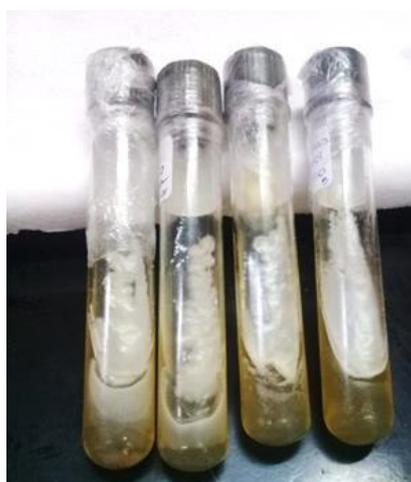
Os experimentos dessa pesquisa passaram por etapas específicas de procedimentos que envolveram métodos manuais, semiautomatizados e automatizados. A alteração do equilíbrio biológico, pode favorecer o aumento da proliferação e invasão de *Candida spp* nos mais diversos ambientes. Logo, a expressão de determinados fatores de virulência, tais como enzimas e a formação de biofilmes microbianos aumentam a patogenicidade destas leveduras. Além disso, utilizando metodologia de biologia molecular obteve-se identificação molecular das cepas pela reação em cadeia da polimerase.

Neste trabalho verificou-se que a concentração inibitória mínima de óleo *Caryocar brasilienses Cambess* (pequi) na concentração de 500µg/mL, foi o MIC com potencial inibitório em 100% das espécies clínicas estudadas. Apesar disso, foi verificado que existem variações de acordo com a espécie clínica e a concentração da diluição para potencial ação contra fatores de virulência nas amostras de *Candida spp* pesquisadas.

5.1 Resposta ao isolamento microbiológico em Ágar Sabouraud

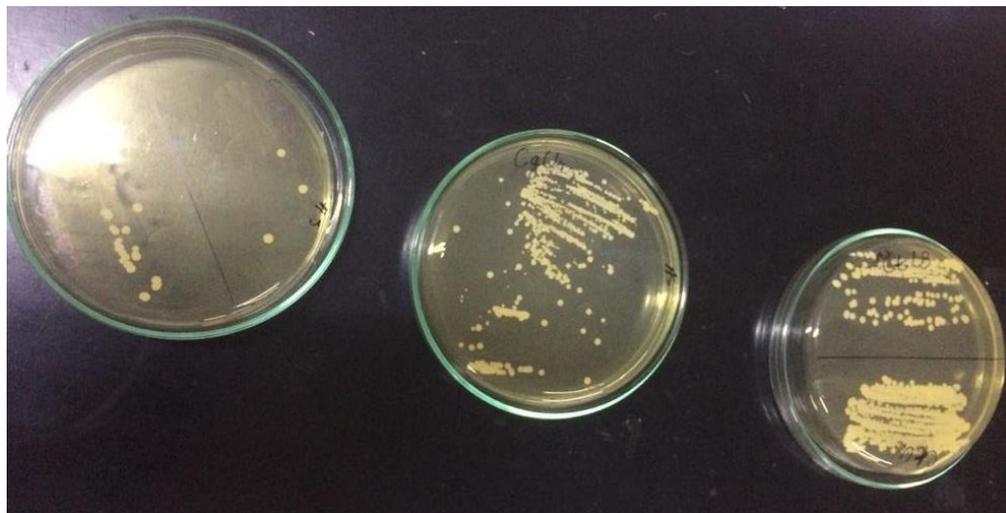
Após confirmação automatizada, as amostras foram semeadas em Ágar Sabouraud, para favorecer seu crescimento. Foi possível observar após semeadura, características macroscópicas do gênero *Candida spp*, tais como cor esbranquiçada, superfície e textura cremosa (Figuras 17 e 18).

Figura 17 - Resultado do processo manual de semeadura, de quatro espécies (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida. Tropicalis*), com meios nutrientes Ágar Sabouraud.



Cepas de *Candida spp* apresentando características macroscópicas: cor esbranquiçada, superfície e textura cremosa, compatíveis com *Candida spp*. Confirmação via Vitek® bioMérieux das cepas clínicas utilizadas na pesquisa experimental.

Figura 18 - Cepas de *Candida* spp semeadas em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud demonstrando crescimento após incubação em estufa por 24 horas a 37° C.



Segundo GOW *et al.*, (2011), a função do meio com nutrientes é o cultivo e crescimento qualitativo de microrganismos como bactérias fungos filamentosos e leveduras. O Ágar Sabouraud é um método extremamente seletivo, pois seu pH, levemente ácido, favorece o crescimento de microrganismos. As espécies de *Candida* spp dessa pesquisa apresentaram características macroscópicas, tais como: coloração branca a creme, superfície e textura cremosa, compatíveis com gênero *Candida* spp.

As infecções por *Candida* spp tem sido frequentemente associadas às altas taxas de morbidade e mortalidade que vem aumentando nas últimas duas décadas. Candidemias atingem principalmente pacientes imunocomprometidos, idosos, pessoas com síndromes metabólicas, pacientes expostos a procedimentos cirúrgicos invasivos, utilização excessiva de medicamentos como antibióticos de amplo espectro, entre outros fatores já elucidados (WEBB *et al*, 2018).

Além disso, a alta incidência de infecções oportunistas por leveduras tem sido evidenciada sob manifestações clínicas e fatores de risco relacionados com diabetes *mellitus*, tuberculose, AIDS, uso de drogas imunossupressoras (LOPES *et al*, 2018)

5.2 Confirmação da identificação de cepas *Candida* spp por método automatizado Vitek® bioMérieux

As cepas clínicas dispostas no banco de dados do LABMICO/NIBA/UFMA passaram por análise pelo sistema automatizado Vitek® bioMérieux. Para os dados

dessa pesquisa, todas as espécies e sítios obtiveram percentual de mais de 90% de confiabilidade, confirmando a classificação das diferentes espécies de *Candida* spp (Quadro 7).

Quadro 7 - Resultado de identificação pelo sistema automatizado Vitek® bioMérieux.

CEPAS CLINICAS	SÍTIOS	PROBABILIDADE	CÓDIGO
<i>Candida albicans</i>	Urina	94%	CaU
<i>Candida albicans</i>	Lavado brônquico	99%	CaLB
<i>Candida albicans</i>	Secreção vaginal	95%	CaSV
<i>Candida albicans</i>	Secreção traqueal	99%	CaST
<i>Candida parapsilosis</i>	Unha	99%	CpUn
<i>Candida parapsilosis</i>	Fezes	98%	CpF
<i>Candida parapsilosis</i>	Pele	95%	CpP
<i>Candida parapsilosis</i>	Sangue	96%	CpS
<i>Candida glabrata</i>	Urina	97%	CgU
<i>Candida tropicalis</i>	Lavado brônquico	99%	CtLB
<i>Candida tropicalis</i>	Urina	99%	CtU
<i>Candida orthopsilosis</i>	Sangue	99%	CoS

Os métodos de identificação convencional apesar de serem uma ferramenta ainda utilizada na maioria dos laboratórios é considerada demorada e muitas das vezes não há confiabilidade desses métodos como a única forma de identificação de microrganismos. Métodos automatizados de identificação de microrganismos tem sido uma ferramenta essencial para auxiliar na identificação correta de espécies de diferentes gêneros (LEUNG *et al*, 2020).

Em revisão de literatura foi constatado que o sistema de VITEK® 2 bioMérieux possui confiabilidade de mais de 70% para identificação da maioria das espécies do gênero *Candida* spp com exceção de *Candida auris* e *Candida haemulonii* e outras

espécies que não foram utilizadas nesse estudo (KATHURIA *et al.*, 2015; PHE *et al.*, 2017; CINO, 2018).

Esse sistema que utiliza cartões contendo informações de microrganismos provenientes de bancos de dados permite a identificação de espécies por comparação do perfil bioquímico. Além disso, o sistema também possui cartões de testes para susceptibilidade a antifúngicos (AST) (ZHANG *et al.* 2015). Portanto, identificação rápida e o conhecimento do perfil de susceptibilidade a antifúngicos permite a otimização das terapias e redução da necessidade de mais estudos diagnósticos, auxiliando na prescrição de tratamentos adequados (SARDI *et al.*, 2013).

5.3 CHROMagar® Candida

O resultado foi visualizado a cada 24 horas, porém a melhor resposta microbiológica ocorreu após 72 horas.

Esse meio foi descoberto em um estudo sobre meningite bacteriana e mais tarde foram constatados resultados positivos para amostras fúngicas. Atualmente é possível encontrar vários meios específicos para estudos que necessitem identificar cepas de *Candida* spp (SANKARI *et al.*, 2020).

A inoculação de cepas nesse meio garante pureza das colônias principalmente de amostras clínicas e possui uma fonte de proteínas e carboidratos que proporcionam o desenvolvimento e crescimento de microrganismos. Além disso, níveis adequados de cálcio e magnésio evitam falsos resultados quando submetidos a análise de sensibilidade ou resistência (MAHBOOB *et al.*, 2020).

A interpretação clínica do teste de CHROMagar® Candida, é realizada por características macroscópicas, que incluem produção de cor, formato e textura de colônias, formações de bordas, entre outras. A ausência de protocolos mais específicos entre os laboratórios torna ainda mais divergente a caracterização de espécies por apenas um método, logo, é recomendada a realização de mais de uma forma de identificação (VECCHIONE *et al.*, 2017; DAEF *et al.*, 2014; SCHARMANN *et al.*, 2020). Os resultados obtidos (Figura 19), após 72 horas no meio CHORMagar®, foram:

Figura 19 - Espécies *Candida albicans*; *Candida glabrata*; *Candida tropicalis*; *Candida parapsilosis* observadas após 72 horas no meio CHROMagar®.



Candida albicans: verde claro; *Candida glabrata*: malva escuro; malva com bordas brancas; *Candida parapsilosis*: branco; *Candida tropicalis*: cinzentas azuladas.

Os resultados supracitados, confirmam que essa forma de semeadura de cepas fúngicas ainda é considerada uma forma rápida e inicial de detecção da ausência ou presença de cepas mistas (TAP *et al.*, 2018; DAEF *et al.*, 2014; SCHARMANN *et al.*, 2020).

Messier *et al.* (2012) confirmam que a utilização de substratos cromogênicos são úteis na composição de meios de cultura para diferenciação de microrganismos. Apesar de já existirem outros meios que por sua vez possibilitam a diminuição no tempo de análise microbiológica, o substrato cromogênico continua sendo explorado com capacidade diagnóstica para a detecção de microrganismos.

O resultado desse ensaio demonstrou que as amostras contidas no banco de dados do LABMICO/UFMA não possuíam cepas mistas, ou seja, estavam isoladas adequadamente, o que reafirmou a identificação do sistema automatizado Vitek® bioMérieux. Além disso, a semeadura das cepas nesse meio estava de acordo com o indicado pelo fabricante. Com isso, houve confiabilidade para seguimento das demais análises propostas para esse estudo.

Ozcan *et al.* (2010) utilizou amostras ATCC das mesmas espécies utilizadas nessa pesquisa com a inclusão de *C. krusei* que não estava disponível em nosso

banco de dados. Apesar de obterem a confirmação da classificação das espécies e a constatação de cepas puras também utilizaram identificação molecular em sua pesquisa, o que demonstra a necessidade que foi proposta nesse e em outros estudos de se utilizar de mais de um método de identificação para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos.

Bayona *et al* (2020) compararam os resultados de dois meios cromogênicos CHROMagar™ Candida Plus e CHROMagar™ Candida em isolados clínicos de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. auris* e *C. lusitaniae*. O período de incubação das cepas variou entre 24 e 48 horas. O resultado demonstrou que não houve semelhança na coloração das espécies semeadas nos dois meios. Por exemplo, em *C. albicans* a coloração variou entre verde claro e azul escuro. Outro meio de identificação (MALDI-TOF) também foi utilizado para confirmar a identificação das espécies.

Portanto, foi possível a constatação em revisão de literatura que apesar dos meios cromogênicos serem formas rápidas de identificação de microrganismos e os resultados dessa pesquisa demonstrarem semelhança dos resultados com outros descritos que utilizaram o mesmo meio cromogênico foi perceptível que todos utilizaram mais de uma forma de identificação automatizada, semi automatizada ou molecular, o que corrobora para a afirmação da necessidade de investigações mais completas para se obter resultados mais conclusivos.

5.4 Ensaio molecular das amostras clínicas *Candida spp*

O protocolo de extração de DNA seguiu o protocolo de Valenzuela-Lopez *et al.* 2017 com adaptações e possibilitou a obtenção do DNA genômico das 12 cepas de *Candida*. Após extração de DNA, as amostras foram quantificadas em Nanodrop e a concentração de DNA variou entre 42 e 169,3 ng/μL.

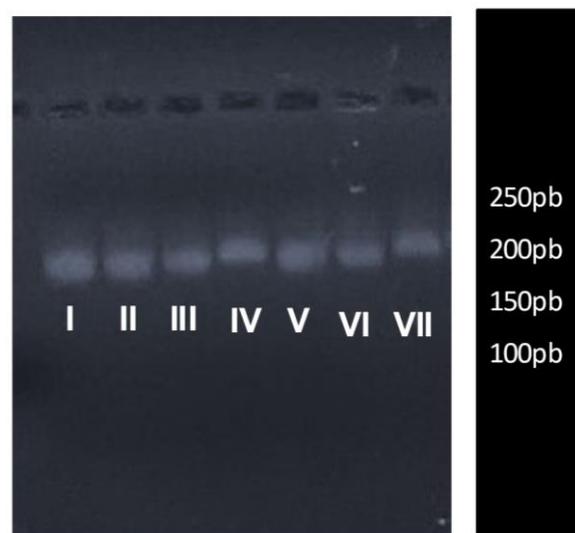
As amostras também foram avaliadas quanto aos valores de comprimento de onda A 260 nm/280 nm que indicam o nível de pureza das amostras. Valores entre 1,4 e 2,0 nm foram considerados puros e com a quantidade de DNA adequada e valores abaixo de 1,4 foram descartados (NAJAT *et al*, 2017).

Cinco amostras *C. albicans*-secreção vaginal (CASV), *C. albicans*-urina (CAURI), *C. albicans*-lavado brônquico (CALB), *C. parapsilosis*-fezes (CPFEZ), *C. tropicalis* – lavado brônquico (CTLB), *C. tropicalis* -urina (CTURI), *C. glabrata*-urina

(CGURI) obtiveram bons resultados e passaram por amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

Após o término dos ciclos as amostras foram submetidas a eletroforese. A figura demonstra que após corrida em gel de agarose por 40 minutos foi possível realizar a visualização das bandas de DNA (Figura 20):

Figura 20 - Gel de eletroforese visualizado em transluminador demonstrando a amplificação das amostras selecionadas.



I-CGURI= *C. glabrata* (urina); **II-CTLB** *C. tropicalis* (lavado brônquico); **III-CTURI=** *C. tropicalis* (urina); **IV-CASV=** *C. albicans* (secreção vaginal); **V-CPFEZ=** *C. parapsilosis* (fezes); **VI-CAURI =** *C. albicans* (urina); **VII- CALB=** *C. albicans* (lavado brônquico).

Desde a década de 1990, diversas técnicas de biologia molecular têm sido desenvolvidas e aperfeiçoadas para detecção de sequências genômicas de microrganismos patogênicos, incluindo espécies do gênero *Candida*. Dentre estas, a técnica de PCR tem sido amplamente utilizada por sua praticidade, rapidez e confiabilidade dos resultados (SANDHYARANI *et al*, 2019).

Nas reações de amplificação de leveduras os alvos são os mais diversos sendo a região ITS do DNA ribossômico considerada universal para esse grupo, logo, a mais utilizada. Contudo, outros produtos gênicos como sequências do gene ERG11, RNA e proteínas também são utilizadas para essa finalidade (SPETELL *et al*, 2018).

Diversos estudos tem sido realizados quanto ao emprego da técnica de PCR para a identificação das espécies de *Candida*. Para tanto, foram realizadas

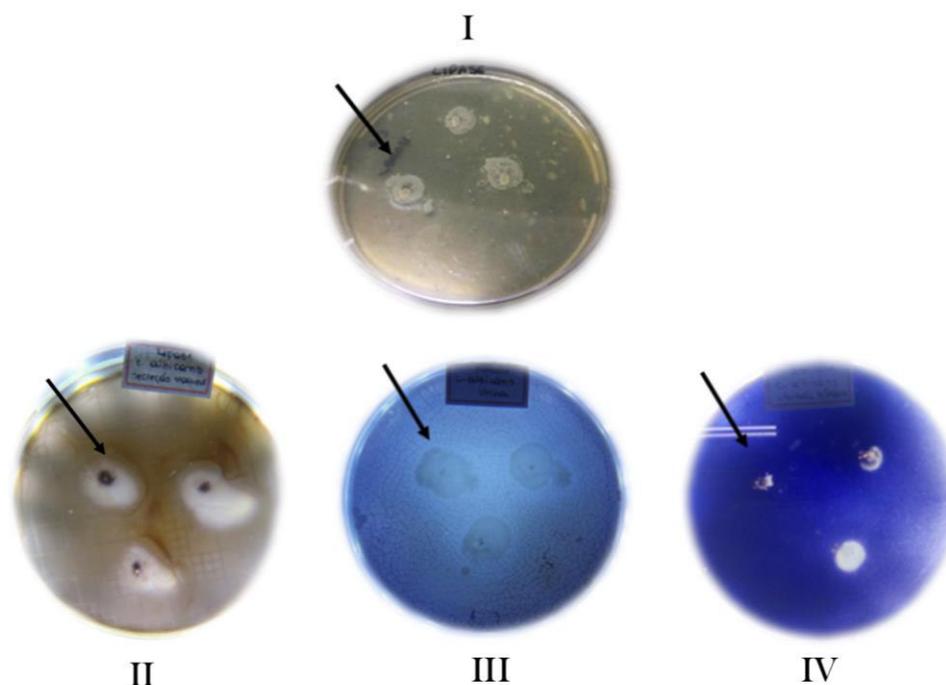
principalmente de materiais oriundos de pacientes, como hemoculturas, urina, secreções, entre outros (DUDIUK *et al*, 2015; FLOWERS *et al*, 2015).

Nesse estudo foram utilizadas cepas clínicas oriundas de secreções (traqueal, lavado brônquico e vaginal), urina, fezes, pele e sangue. Por serem amostras contidas em banco de dados não houve acesso ao perfil dos pacientes como idade, sexo, presença, presença ou ausência de comorbidades.

5.5 Perfil enzimático das cepas clínicas de *Candida spp*

A visualização dos resultados foi melhor avaliada após período de 48 horas do inoculo em triplicata da suspensão fúngica em cada meio correspondente para os testes. Na figura 21, é possível visualizar a formação de cristais e halos translúcidos nos meios enzimáticos testados.

Figura 21 -Resultados dos testes enzimáticos (lipase, proteinase e amilase).



As setas indicam a visualização da formação de cristais e halos translúcidos nos meios enzimáticos. **I** = formação de cristais no meio enzimático de lipase; **II**= halo translúcido em meio enzimático de lipase produzido pela cepa de *C. albicans* (secreção traqueal); **III** = halo translúcido em meio enzimático de proteinase produzido pela cepa de *C. albicans* (urina); **IV**= halo translúcido em meio enzimático de amilase produzido pela cepa *C. albicans* (lavado brônquico).

Os meios positivos para produção de lipase e amilase foram revelados através da utilização de lugol e cristal violeta 0,4 %, respectivamente. Nos meios de proteinase e fosfolipase não houve a necessidade da utilização de solução reveladora porque

após as 48 horas foi possível visualizar tanto os precipitados salinos quanto os halos translúcidos.

Na tabela 4 constam os resultados qualitativos do perfil enzimático das 12 cepas clínicas. Os dados foram separados em positivo e negativo levando em consideração a formação de halos e precipitados salinos em volta do inóculo.

Tabela 4 - Perfil enzimático qualitativo das espécies de *Candida* spp.

CÓDIGO	AMILASE	PROTEINASE	FOSFOLIPASE	LIPASE
CaU	+	+	+	+
CaLB	+	+	+	+
CaSV	+	+	-	+
CaST	+	+	-	+
CpUn	-	-	-	+
CpF	+	-	-	+
CpP	-	-	-	+
CpS	-	-	-	+
CgU	-	-	+	+
CtLB	-	-	-	+
CtU	-	-	-	+
CoS	-	-	-	+

+ = positivo; - = negativo. CaU - *Candida albicans* (urina); CaLB - *Candida albicans* (lavado brônquico); CaSV - *Candida albicans* (secreção vaginal); CaST - *Candida albicans* (secreção traqueal); CpUn - *Candida parapsilosis* (unha); CpF - *Candida parapsilosis* (fezes); CpP - *Candida parapsilosis* (pele); CpS - *Candida parapsilosis* (sangue); CgU - *Candida glabrata* (urina); CtLB - *Candida tropicalis* (lavado brônquico); CtU - *Candida tropicalis* (urina); CoS - *Candida orthopsilosis* (sangue).

As amostras que obtiveram resultado positivo tiveram seus halos medidos e os cálculos da zona de precipitação (Pz) e índice enzimático (IE) foram realizados.

5.5.1 Produção de Lipase

Os resultados da produção de enzimas hidrolíticas extracelulares estão dispostos nos tópicos e tabelas a seguir.

Para a atividade de lipase foi constatado que todas as cepas foram produtoras dessa enzima, totalizando 100% de produção. O maior valor encontrado para esse teste foi para *C. tropicalis* (urina) com valor de 0,80. Outras amostras também demonstraram valores elevados de índice enzimático. Entre espécies e sítios houve variação na quantidade de enzima produzida como pode ser observado em *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Apesar de ter sido enzima mais produzida, não houve diferença significativa entre as espécies ($p=0,8050$) (tabela 5).

Tabela 5 - Valores do índice enzimático de lipase das cepas de *Candida* spp.

CÓDIGO	VALOR (IE)	p
CaU	0,76	0,8050
CaLB	0,54	
CaSV	0,72	
CaST	0,26	
CpUn	0,70	
CpF	0,24	
CpP	0,64	
CpS	0,68	
CgU	0,73	
CtLB	0,64	
CtU	0,80	
CoS	0,22	

IE = índice enzimático; p = significância na diferença de produção enzimática entre as cepas; ($p<0,05$); CaU-*Candida albicans* (urina); CaLB - *Candida albicans* (lavado brônquico); CaSV - *Candida albicans* (secreção vaginal); CaST - *Candida albicans* (secreção traqueal); CpUn - *Candida parapsilosis* (unha); CpF - *Candida parapsilosis* (fezes); CpP - *Candida parapsilosis* (pele); CpS - *Candida parapsilosis* (sangue); CgU - *Candida glabrata* (urina); CtLB - *Candida tropicalis* (lavado brônquico); CtU – *Candida tropicalis* (urina); CoS - *Candida orthopsilosis* (sangue).

Jasim *et al*, 2016 realizou uma pesquisa envolvendo produção de lipase por *Candida* spp utilizando a mesma metodologia desse estudo e constatou que a maior espécie produtora dessa enzima foi *C. albicans* totalizando 64% das amostras enquanto espécies *não-albicans* totalizaram apenas 36,6%.

Todas as amostras de *C. albicans* desse estudo foram produtoras de lipase, o que indica um percentual de 100% de produção. Contudo, o tamanho amostral não é o mesmo de Jasim *et al*, 2016. Das 12 cepas provenientes do banco de dados do LABMICO/UFMA apenas 4 eram de *C. albicans* totalizando 33,3 % das espécies e as *não-albicans* totalizam 66,6%. Se calculadas separadamente a produção de lipase em *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. orthopsilosis* totalizou 100% de produção enzimática enquanto *C. tropicalis* totalizou 50%.

Outro estudo conduzido por Tsai *et al.*, 2013 constatou maior produção enzimática em *C. não-albicans* (87 %) enquanto para *C. albicans* foi de 51%.

A produção de enzimas por microrganismos não pode ser considerado um fator de virulência de forma isolada pois existem enzimas produzidas por espécies de *Candida* spp que possuem uma variedade de aplicações de uso industrial, na produção de alimentos e detergentes, no tratamento biológico de águas residuárias, em medicamentos e cosméticos. A escolha dessa enzima é devido à sua estabilidade, seletividade e ampla especificidade de substrato (COLLA *et al.* 2012; MAYER *et al.*, 2013).

A lipase pertence a um grupo de enzimas cuja função biológica principal é catalisar a hidrólise de triglicerídeos bem como reações de esterificação de lipídios. Como fator de virulência foi constatado que essa enzima possui como principal função auxiliar no processo de adesão e penetração nas células patogênicas no hospedeiro.

5.5.2 Produção de Amilase

A produção dessa enzima foi visualizada em todas as cepas de *C. albicans* e em *C. parapsilosis* (fezes) totalizando 41,6% da produção enzimática. O maior valor encontrado foi para a cepa de *C. albicans* secreção vaginal (0,80). Na análise estatística foi demonstrado que houve diferença significativa na produção enzimática entre os sítios ($p = 0,0002$) (tabela 6). Após revisão de literatura foi constatado que existem poucos trabalhos publicados a respeito da produção de amilase como fator de virulência principalmente para o gênero *Candida* spp.

Tabela 6 - Resultados do índice enzimático (IE) para teste enzimático de amilase.

CÓDIGO	VALOR (IE)	p
CaU	0,63	0,0002

CaLB	0,71
CaSV	0,80
CaST	0,76
CpF	076

IE = índice enzimático; p = significância na diferença de produção enzimática entre as cepas da espécie; (p<0,05); *C. albicans*. CaU-*Candida albicans* (urina); CaLB - *Candida albicans* (lavado brônquico); CaSV - *Candida albicans* (secreção vaginal); CaST - *Candida albicans* (secreção traqueal).

Alencar (2012) realizou testes enzimáticos com dois gêneros de leveduras (*Candida spp* e *Cryptococcus spp*) e constatou que não houve liberação de enzimas para degradar os substratos de amido. A maioria dos estudos recentes com produção de enzimas como fator de virulência não utiliza amilase como critério. Os achados durante revisão de literatura demonstraram, na verdade, que outras espécies não patogênicas do gênero *Candida spp* produzem amilase como um potencial redutor da produção de biofilme.

Contudo, *C. albicans* é uma espécie patogênica muito descrita na literatura e esse estudo demonstrou sua capacidade de produção de amilase, o que pode evidenciar que essa espécie possui vários mecanismos de patogenicidade, incluindo aqueles que são descritos como fatores benéficos para inibição de fatores de virulência.

As amilases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações α -1,4 glicosídicas de polissacarídeos ou de seus produtos de degradação. Em substratos contendo amido liberam diversos produtos como dextrinas, maltose e glicose. Podem ser divididas em três grupos principais: α -amilases capazes de romper ligações no interior de cadeias de células (endoamilases); as β -amilases que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras de substratos (exoamilases); e as glicoamilases, as quais liberam unidades de glicose quando em contato com algum substrato (SOUZA *et al*, 2010).

No setor industrial representam 25% das enzimas utilizadas e aplicadas em diversos processos industriais que consistem da necessidade de hidrólise parcial ou completa de amido. Durante muitas décadas a utilização de amilases, principalmente α -amilases tem sido predominante na indústria e o número de fontes

microbianas capazes de produzir essa enzima tem aumentado (SUNDARRAM *et al*, 2014).

A busca de novos microrganismos que possam ser utilizados para a produção de amilase é um processo contínuo. Recentemente, estudos têm apresentado bons resultados no desenvolvimento de técnicas de purificação dessa enzima, permitindo assim o seu emprego em setores farmacêuticos e clínicos (HUSSIAN *et al*, 2014).

Apesar de desafiador, esse estudo foi realizado na tentativa de se conhecer o perfil patogênico das cepas clínicas. Para o caso da produção de amilase mais investigações precisam ser realizadas na tentativa de elucidar a produção enzimática por cepas clínicas.

5.5.3 Produção de Proteinase

O parâmetro de zona de precipitação (Pz) está de acordo com Price *et al*. (1982) em que os valores são classificados como: muito forte ++++ (Pz \leq 0,69), forte +++ (Pz entre 0,70-0,79), média ++ (Pz entre 0,80-0,89) ou fraca + (Pz entre 0,90-0,99). Na tabela 7 estão dispostos os resultados encontrados para esse estudo:

Tabela 7 - Resultados da atividade enzimática de proteinase das cepas clínicas de *Candida* spp.

CÓDIGO	ZONA DE PRECIPITAÇÃO	CLASSIFICAÇÃO	p
CaU	0,44	++++	0,5713
CaLB	0,42	++++	
CaSV	0,42	++++	
CaST	0,42	++++	

++++ = muito forte; p = significância na diferença de produção enzimática entre as cepas; (p<0,05); CaU-*Candida albicans* (urina); CaLB - *Candida albicans* (lavado brônquico); CaSV - *Candida albicans* (secreção vaginal); CaST - *Candida albicans* (secreção traqueal);

Nesse teste apenas as cepas de *C. albicans* foram produtoras da enzima proteinase totalizando 33,3 % das amostras. Com relação ao valor de Pz todas as cepas apresentaram valor Pz \leq 0,69 que é classificado como muito forte. Não houve

diferença significativa da produção dessa enzima entre as cepas de *C. albicans* pois o valor de $p = 0,5713$.

Rocha *et al* (2017) em um estudo envolvendo produção enzimática por cepas clínicas de *C. tropicalis* encontrou um resultado de 42,9% para produção de proteinase em que o Pz apresentou valor entre 0,56-0,86. Até a finalização desse estudo, não houve produção por parte da espécie de *C. tropicalis* da produção de proteinase.

As espécies do gênero *Candida* spp, de forma geral, se destacam pela produção de proteinases que estão envolvidas em processos como a hidrólise de ligações peptídicas de proteínas que estão localizadas principalmente na mucosa e em células do sistema imunológico como imunoglobulina que alteram ou danificam a integridade da membrana celular do hospedeiro, o que resulta em disfunção ou apoptose celular. De acordo com Giolo *et al* 2010, D'êça *et al* 2011, Adreola *et al*, 2016, as espécies que mais se destacam para a produção dessa enzima são *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis* (GIOLO *et al*, 2010; D'ÊÇA *et al*, 2011; ADREOLA *et al*, 2016;).

Branco *et al* (2012) encontrou resultados semelhantes aos de Rocha *et al*. (2017). Nesse estudo, a produção da enzima proteinase por cepas clínicas foi de 76%. E todas as amostras de. Contudo, esse estudo utilizou dados amostrais apenas da mucosa oral de pacientes com HIV. Apesar dessa pesquisa não conter nenhuma amostra do mesmo sítio, os achados podem contribuir com a afirmativa de que a produção enzimática difere entre espécies e sítios anatômicos em que estão dispostas.

Contudo, mesmo após repetição desse enzimático, não houve produção de proteinase pelas outras espécies e sítios anatômicos.

Silva *et al*. (2019) também encontraram em sua pesquisa valores de Pz classificados como muito fortes em estudo feito com cepas oriundas de próteses bucais em idosos. Os resultados foram positivos para as espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*.

Nosso estudo, apesar de não conter amostras de mucosa oral, demonstrou que ocorreu alta produção enzimática de proteinase por *C. albicans* em sítios como urina, secreção traqueal, secreção vaginal e lavado brônquico. Esses achados podem sugerir que apesar de existir uma predominância pra produção de proteinase por amostras provenientes da mucosa oral, as cepas clínicas de *C. albicans* também são capazes de produzir grande quantidade dessa enzima em outros sítios anatômicos.

5.5.4 Produção de Fosfolipase

Os valores estão dispostos na tabela 8:

Tabela 8 - Resultados da atividade enzimática de fosfolipase das cepas clínicas de *Candida* spp.

CÓDIGO	ZONA DE PRECIPITAÇÃO	CLASSIFICAÇÃO	p
CaU	0,42	++++	0,2700
CaLB	0,43	++++	
CgU	0,45	++++	

++++ = muito forte; p = significância na diferença de produção enzimática entre as cepas; (p<0,05); CaU-*Candida albicans* (urina); CaLB - *Candida albicans* (lavado brônquico); CaSV - *Candida albicans* (secreção vaginal); CgU - *Candida glabrata* (urina);.

Para essa enzima, 25% das amostras foram positivas. Na espécie *C. albicans* não houve produção enzimática pelas cepas de secreção traqueal e vaginal. Estatisticamente, não houve diferença significativa na produção enzimática (p=0,2700). Nenhuma cepa das espécies *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. orthopsilosis* apresentou formação dessa enzima.

Branco *et al* (2012) em sua pesquisa constatou que houve produção de fosfolipase em 52% de suas amostras. Todas as espécies utilizadas em seu estudo *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* produziram essa enzima tendo prevalência em *C. albicans* que produziu 93,1%. Outros estudos anteriores observaram um percentual 30 a 100% da produção de fosfolipase por cepas clínicas de *Candida* spp em pacientes com infecções invasivas fúngicas (SACHIN *et al*, 2012; JASMIN *et al*, 2016).

Apesar desse estudo não obter resultados semelhantes com a quantidade de espécies produtoras de fosfolipase com os estudos anteriormente citados, o que se obteve em resultados em comum foi que para espécies como *C. albicans* e *C. glabrata* o valor de $Pz \leq 0,69$, ou seja, produção muito elevada dessas enzimas (ROCHA *et al*, 2017).

A enzima fosfolipase digere moléculas de fosfolípido da membrana plasmática da célula hospedeira causando lise celular e mudanças nas características da superfície que aumentam a aderência e conseqüente infecção. Portanto, a produção de fosfolipase pode ser usada como um dos parâmetros para distinguir

cepas invasivas virulentas de colonizadores não invasivos (SILVA *et al.* 2011; DEEPA *et al.*, 2015).

5.6 Atividade antifúngica do óleo de *Caryocar brasilienses Cambess* (pequi) sobre os fatores de virulência de cepas clínicas *Candida spp.*

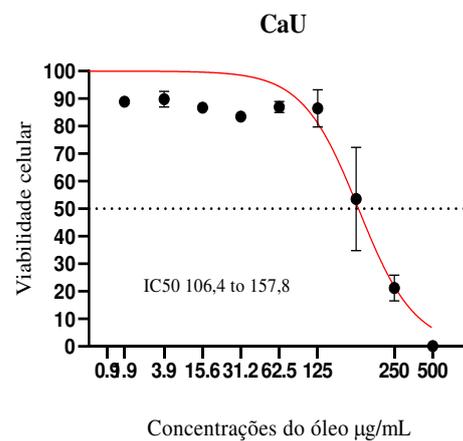
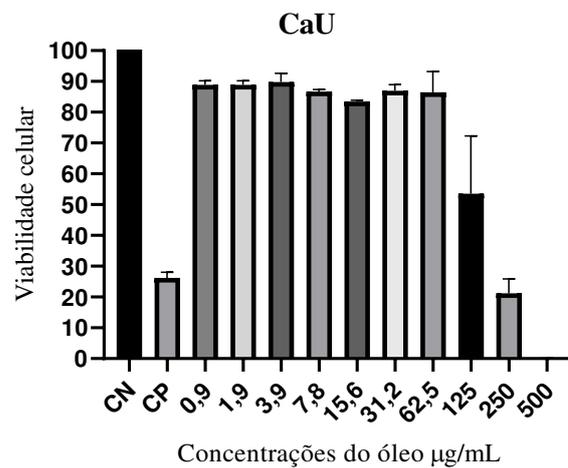
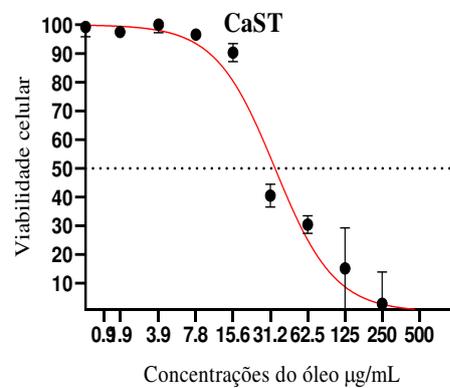
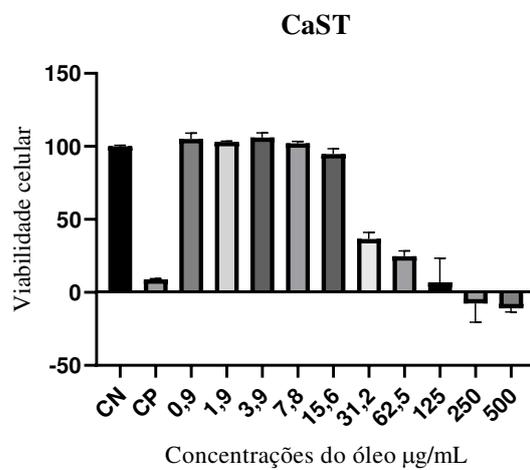
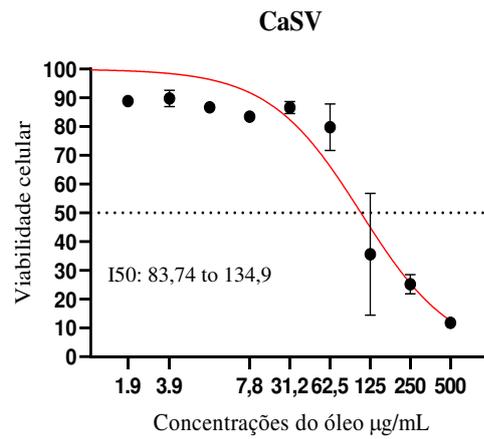
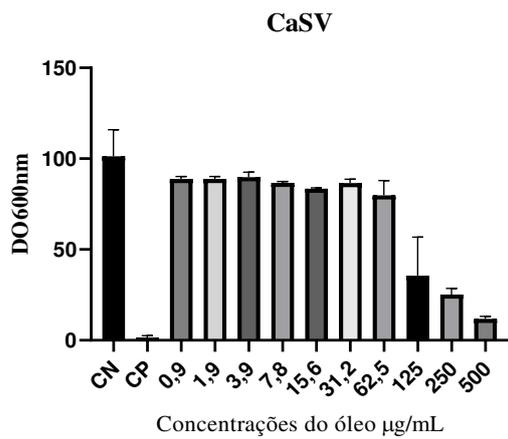
A resposta de viabilidade celular às diferentes concentrações de MIC do óleo *Caryocar brasilienses Cambess* (Pequi) estão descritas a seguir. Os gráficos representam uma análise da microdiluição comparando o crescimento de células entre os controles positivo, negativo e as concentrações do óleo. Para melhor entendimento, as respostas às diferentes concentrações foram separadas por grupos de gráficos, respeitando as particularidades das espécies e seus sítios anatômicos.

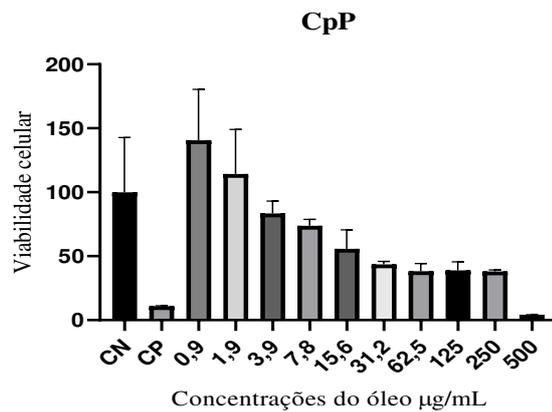
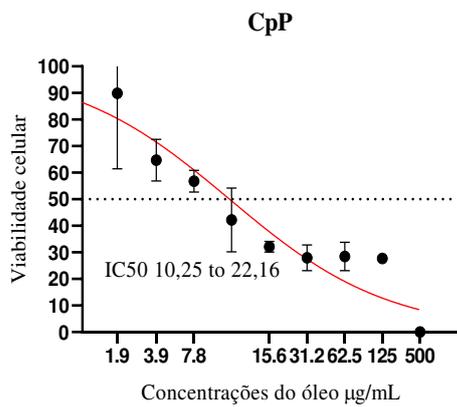
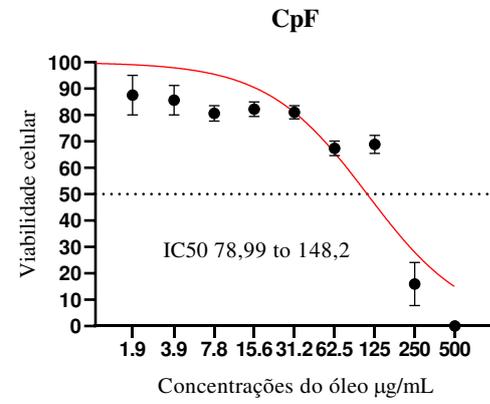
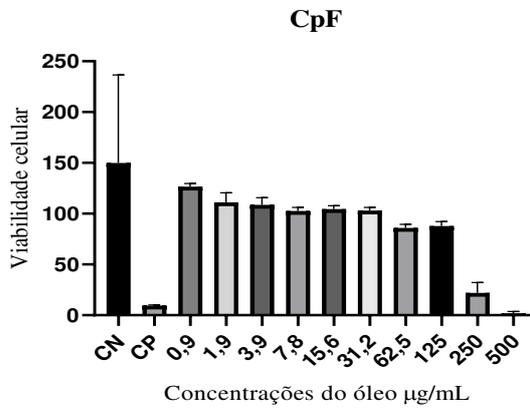
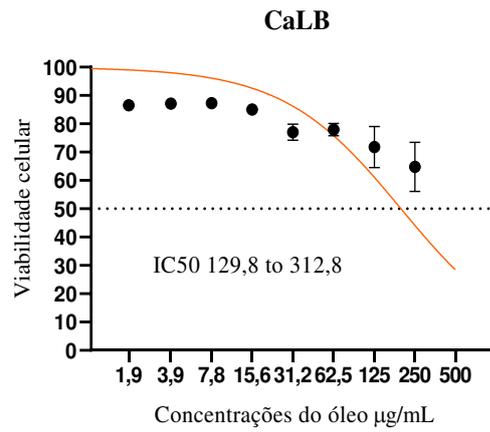
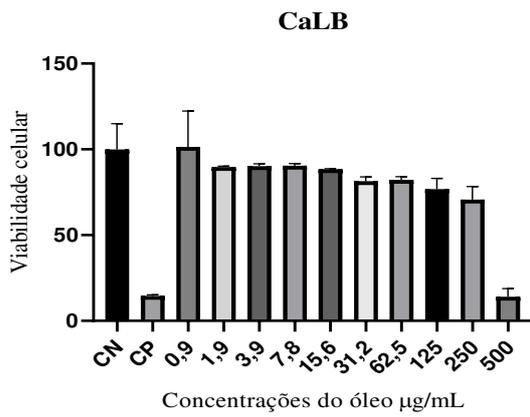
Anfotericina B foi utilizada como controle positivo e YPD com 100µl das amostras foi usado como controle negativo.

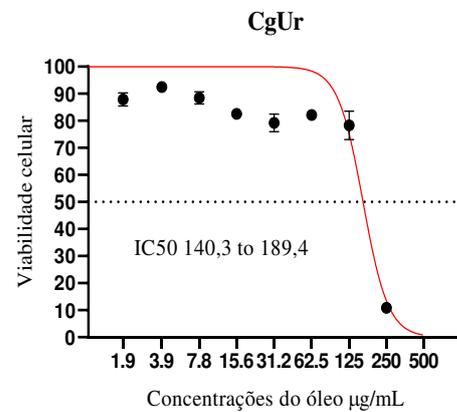
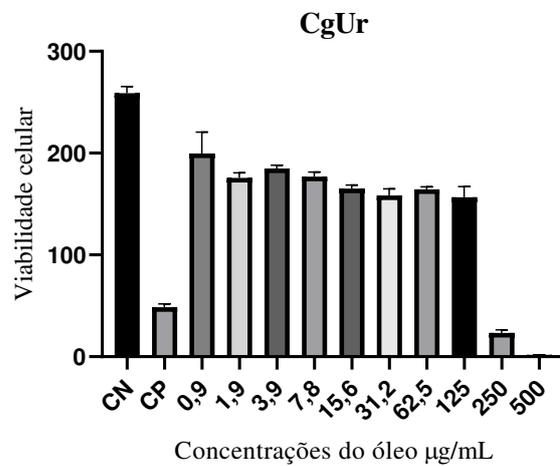
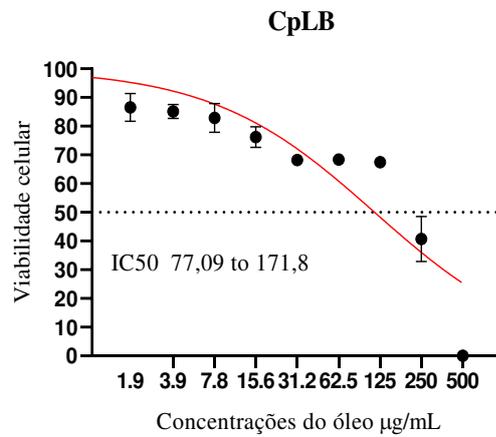
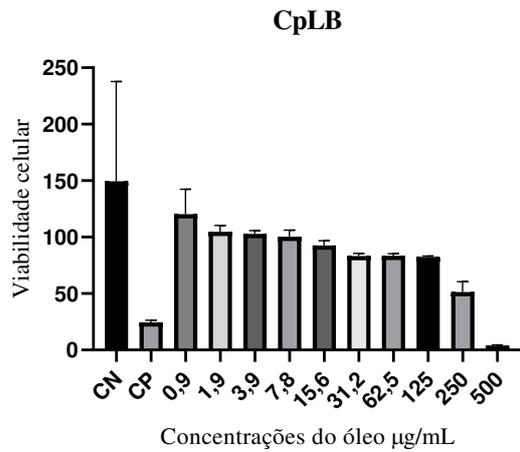
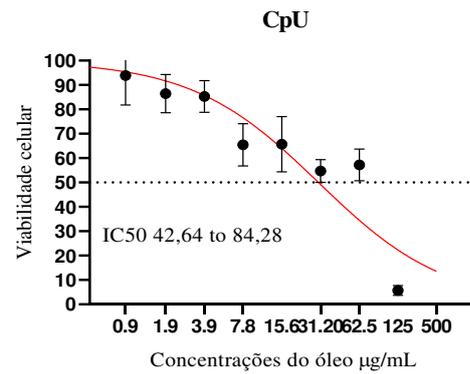
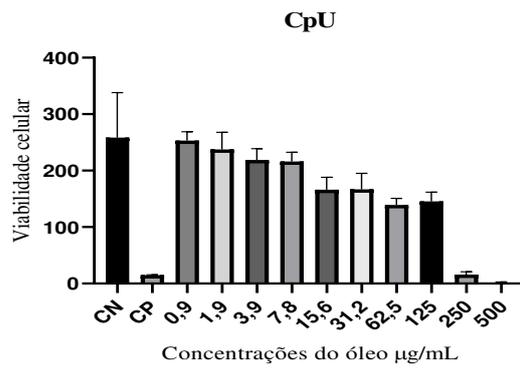
O surgimento de resistência aos medicamentos tradicionalmente utilizados como antifúngicos tornou necessária a busca por novos antifúngicos para tratar candidemias. Devido a descoberta de seus efeitos terapêuticos os óleos vegetais tem se demonstrado uma alternativa promissora para combater infecções associadas a produção de biofilmes (MANOHARAN *et al.*, 2017).

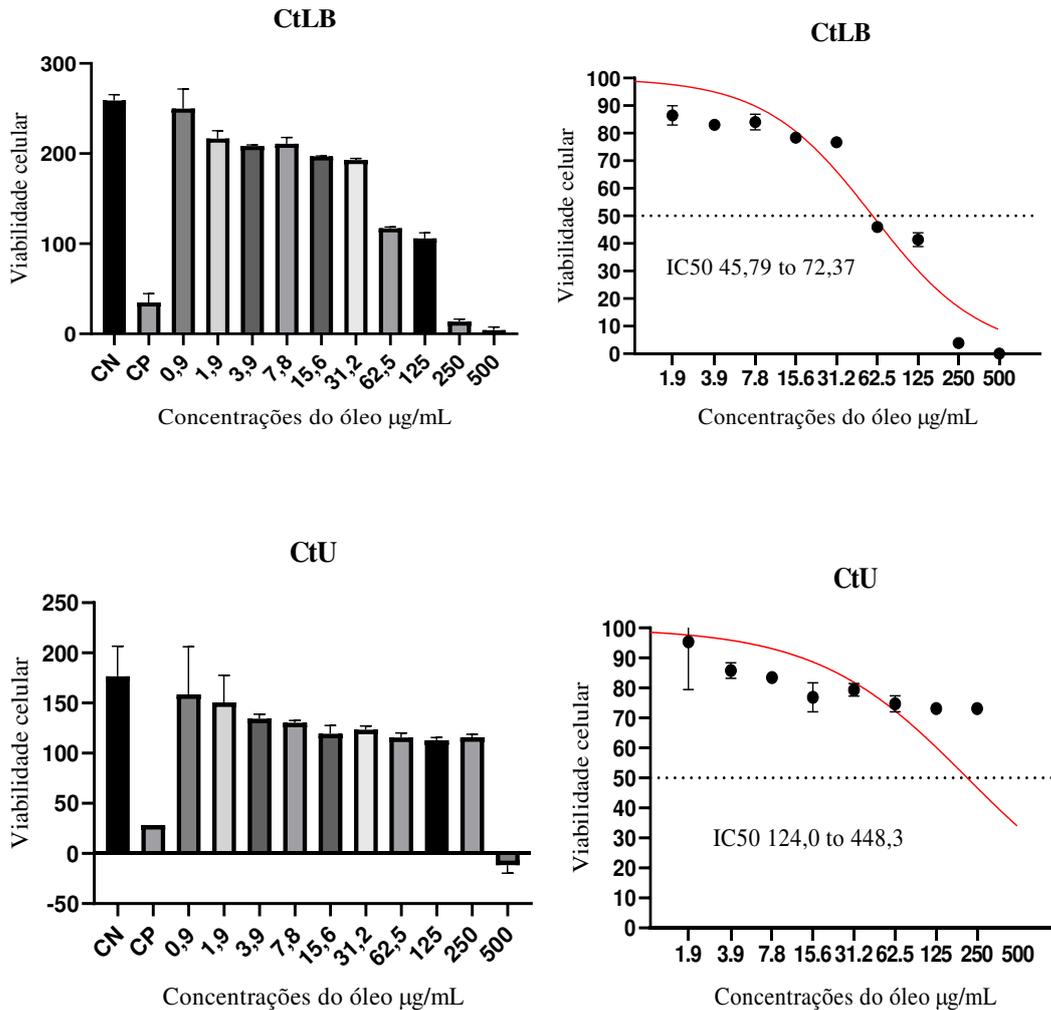
No presente estudo, foi possível constatar que o óleo de pequi foi eficiente para inibição da produção de biofilme em todas as cepas clínicas. Houve também a constatação da diferenciação da quantidade de células entre espécies e sítios anatômicos. Na maioria das cepas dessa pesquisa, a inibição celular (IC50) pode ser observada a partir de 7,8 µg/ml. Sendo o melhor desempenho demonstrado pela concentração de 500 µg/ml (Figura 22).

Figura 22 - Resposta de viabilidade celular das cepas clínicas após exposição ao óleo *Caryocar brasilienses Cambess*.









Banu *et al* (2018) em um estudo utilizando óleo essencial, obtiveram um resultado de MIC satisfatório variando entre espécies de 1 a 10 µg/ml. Contudo, os óleos utilizados nesse estudo só foram capazes de inibir 60% da produção do biofilme. De acordo com os gráficos desse estudo é possível perceber que o óleo de pequi reduziu a produção de biofilme de tal forma que houve total inviabilidade celular.

Outro estudo, envolvendo o efeito do óleo de pequi sobre cepas clínicas de *C. albicans* encontrou resultados opostos à essa pesquisa. Martins *et al.* (2015) comparou o efeito do fluconazol e do óleo de pequi sobre cepas clínicas de *C. albicans* e constatou que, na verdade, o óleo utilizado aumentou a proliferação celular das cepas. Nossos dados demonstraram declínio na curva de crescimento de todas as cepas, incluindo *C. albicans* e seus diferentes sítios.

A anfotericina B utilizada nesse estudo também foi responsável pela redução da viabilidade celular, mas obteve resultados tão satisfatórios quanto o óleo de pequi. O principal mecanismo de ação dos polienos é a interação com o ergosterol, um

componente majoritário da membrana celular fúngica. Essa interação promove a formação de poros na membrana, o que ocasiona na criação de canais iônicos responsáveis pelo extravasamento de íons intracelulares. (FAUSTINO *et al*, 2020).

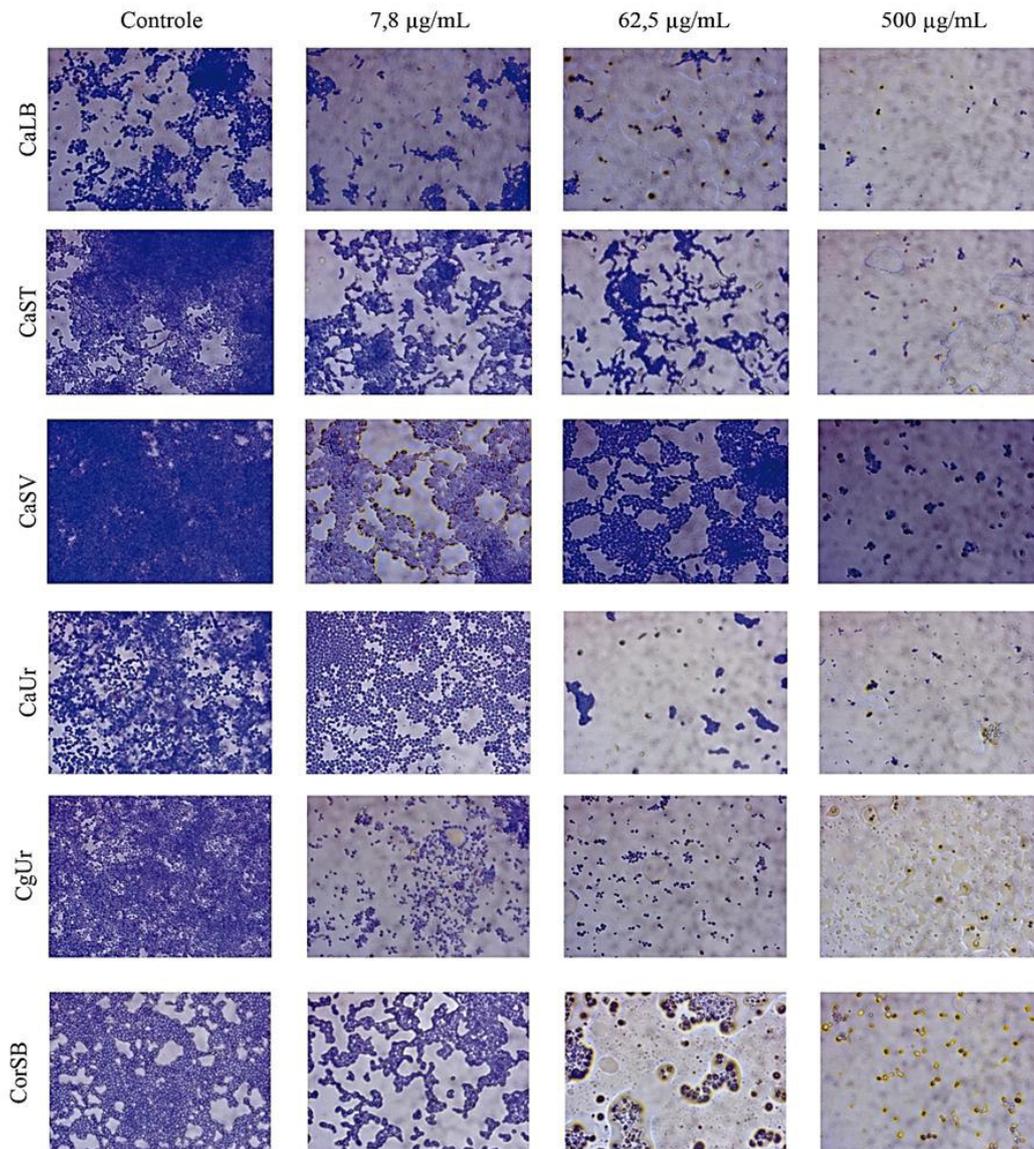
5.7 Efeito da MIC no biofilme

As figuras 23 e 24, demonstraram os resultados obtidos onde pode ser visualizado a diferença da interação do óleo de pequi com as cepas e os sítios anatômicos. Em cepas de *C. albicans* (secreção traqueal e secreção vaginal), *C. tropicalis* (lavado brônquico), *C. tropicalis* (urina) não foi possível observar uma mudança significativa entre as concentrações de 7,8 µg/ml e 62, 5 µg/ml.

Além disso, foi possível observar que apesar de todas as amostras demonstraram capacidade de produção de biofilme, o mesmo difere entre as espécies e sítios anatômicos. Outro fator encontrado foi que na concentração de 7,8 µg/ml é perceptível uma redução inicial da biomassa do biofilme, mas apenas na concentração de 500 µg/ml é que se nota a total inibição desse fator de patogenicidade.

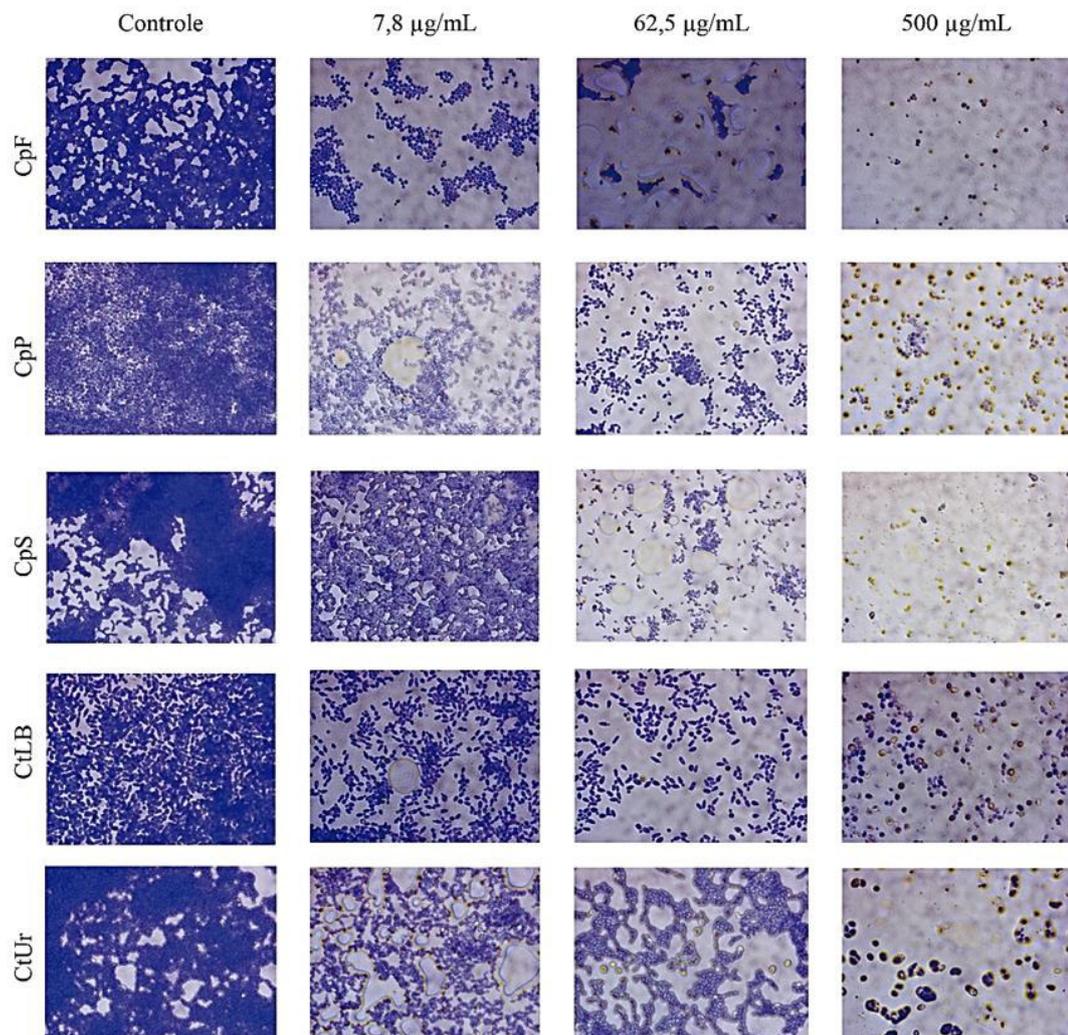
O mecanismo de inibição do óleo de pequi necessita de mais investigações pois até a finalização desse estudo foram constatadas duas formas de interação entre o óleo e as células fúngicas: o primeiro ocorreu de forma que o óleo formou um envoltório externo nas células separadamente ou em pequenos grupos celulares. O segundo consistiu da capacidade do óleo em adentrar as células e envolver todo conteúdo citoplasmático (Figura 23) .

Figura 23 - Cepas coradas com cristal violetas 0,4% visualizadas em microscópio invertido (40 x).



Controle = amostras inoculadas em meio YPD. As demais concentrações (7,8 62,5 e 500 $\mu\text{g/ml}$) foram utilizadas para visualização da inibição da formação de biofilme. Legenda: CALB = *Candida albicans* (lavado brônquico); CAST = *Candida albicans* (secreção traqueal); CASV = *Candida albicans* (secreção vaginal); CAUR = *Candida albicans* (urina); CGUR = *Candida glabrata* (urina); CORS = *Candida orthopsilosis* (sangue).

Figura 24 - Cepas coradas com cristal violetas 0,4% visualizadas em microscópio invertido (40 x).



Controle = amostras inoculadas em meio YPD. As demais concentrações (7,8 62,5 e 500 $\mu\text{g/ml}$) foram utilizadas para visualização da inibição da formação de biofilme. Legenda: CPF = *Candida parapsilosis* (fezes); CPP = *Candida parapsilosis* (pele); CPS = *Candida parapsilosis* (sangue); CTLB = *Candida tropicalis* (lavado brônquico); CTUR = *Candida tropicalis* (urina).

Várias metodologias vêm sendo desenvolvidas para o estudo da formação de biofilmes de espécies de *Candida* spp. Inicialmente, a maioria dos métodos foram adaptados de estudos desenvolvidos para biofilmes de bactérias. Contudo, o aprimoramento das técnicas tem sido feito com o intuito de se compreender melhor a interação do hospedeiro com o biofilme, como a capacidade de quantificar a viabilidade celular do biofilme (ZENG *et al*, 2017).

Entre os diferentes modelos *in vitro* estão os classificados como fechados ou estáticos. Esses modelos permitem quantificar de forma rápida e direta a massa de biofilme formada ou células viáveis. O método de microplacas (6, 12 e 24 poços) para formação de biofilmes é bastante utilizado por ser considerado rápido, eficiente, confiável e reprodutível, com alto potencial de transferência. Este método permite a

análise quantitativa do crescimento do biofilme pré-formado e maduro através do uso de corantes, sendo o mais comum o cristal violeta (RAMAGE *et al.*, 2013; TAFF *et al.*, 2013).

O método de coloração por cristal violeta permite quantificar o biofilme avaliando a capacidade de absorção da solução pelas células. Ensaios colorimétricos de viabilidade celular tem se demonstrado importantes para estudos envolvendo atividade de células eucarióticas. (GULATI *et al.*, 2017).

Nessa pesquisa, os ensaios envolvendo microplacas (12 e 24 poços) demonstraram resultado satisfatório, o que viabilizou a realização de todos os protocolos estabelecidos. Com a utilização do cristal violeta foi possível visualizar a produção do biofilme e sua diferenciação nas cepas e sítios além da redução da biomassa do biofilme em contato com as concentrações do óleo de pequi.

A formação de biofilmes por espécies de *Candida in vitro* tem sido descrita em três fases distintas: precoce (0-11 horas), intermediária (12-30 horas) e de maturação (38-72 horas). Na fase prematura ocorre a aderência e desenvolvimento de blastoconídios em microcolônias distintas (CEPAS *et al.*, 2019).

O período de 18 a 24 horas é caracterizado pela bicamada celular compreendendo uma mistura de blastoconídios, pseudo-hifas e hifas jovens, além de produção da matriz caracterizando a fase intermediária. Por fim, na fase de maturação uma espessa matriz abriga um denso emaranhado de células em todos os estágios de desenvolvimento da levedura (CANELA *et al.*, 2018).

A visualização das placas foi realizada após período de 24 horas onde foi possível observar a fase de maturação das células fúngicas. Os dados dessa pesquisa corroboram com os achados de Banu *et al.* (2016) que encontraram redução da biomassa nos biofilmes maduros formados por *C. albicans* e *C. glabrata* com utilização de óleos essenciais.

Outros estudos utilizando óleos essenciais também obtiveram resultados satisfatórios com relação à inibição de fatores de virulência, como o biofilme, sobre cepas clínicas ou ATCC do gênero *Candida* spp. Os maiores relatos na literatura envolvem óleos das espécies *Citrus limonum*, *Mentha piperita*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Lippia sidoides* com ação antifúngica contra *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. albicans*, *C. krusei*, e *C. tropicalis*.

Até a finalização dessa pesquisa, foram encontrados poucos dados envolvendo a utilização do óleo de pequi como antifúngico, para inibição da formação

de biofilme, principalmente em cepas clínicas do gênero *Candida* spp sendo os estudos encontrados mais voltados para a espécie *C. albicans* e redução de outras comorbidades como de outros fatores não foram encontrados dados na literatura que obtivessem resultados promissores quanto a utilização do óleo de pequi como agente antifúngico. O maior percentual de estudos envolvendo utilização de óleo de pequi (GOMES *et al* 2019)

As espécies de *Candida* e outros fungos patogênicos tem desenvolvido mecanismos que lhes conferem capacidade de sobrevivência, entre eles, aumento de patogenicidade e manutenção do quadro infeccioso no hospedeiro. Além disso, têm apresentado mecanismos de resistência à maioria dos antifúngicos empregados frequentemente na terapia convencional (ALVES *et al*, 2016).

De acordo com Figueira *et al.* (2017) os biofilmes fúngicos estão, predominantemente, relacionados à ocorrência de infecções crônicas associadas a utilização de biomateriais, como próteses e cateteres. Nesses locais, o biofilme é composto por um aglomerado de microrganismos, permitindo troca de informações genéticas, genes de resistência, o que auxilia na diminuição das respostas imunológicas do hospedeiro.

Além disso, os biofilmes podem se formar em uma grande variedade de superfícies bióticas e abióticas, incluindo tecidos vivos, dispositivos médicos, sistema de tubulação de água potável, ambientes industriais, sistemas aquáticos naturais, entre outros (BERTINI *et al*, 2013; BRAGA *et al.*, 2015).

5.8 Óleo de *Caryocar brasiliense* cambes como antifúngico.

Tendo em vista o perfil de resistência aos antifúngicos, o grande desafio para controlar de forma eficiente as infecções fúngicas é diversificar as pesquisas farmacológicas em busca de novos compostos que sejam potenciais para o uso terapêutico, aumentando o arsenal de fármacos com ação antifúngica disponível (MOURA *et al*, 2017; ZHENG *et al.*, 2017).

Apesar do aumento na quantidade de antifúngicos para tratamento de candidemias especialmente as sistêmicas causadas por leveduras multirresistentes, o número de compostos eficientes tem se tornado cada vez mais reduzido devido ao surgimento de novas espécies patogênicas e dos mecanismos de resistência desses microrganismos. (BARBOSA *et al*, 2019).

Neste contexto, os estudos com produtos naturais têm se demonstrado promissores como alternativas para driblar a resistência antifúngica e diminuir a

toxicidade dos tratamentos para o hospedeiro. Um potencial gênero botânico para investigações mais aprofundadas, no que diz respeito aos seus efeitos biológicos e constituição química é o gênero *Caryocar* (MIRANDA *et al*, 2013).

Estudos envolvendo esse gênero tem obtido resultados promissores, quanto a utilização do óleo de *Caryocar brasiliense* Cambess como fármaco devido sua constituição química que apresenta substâncias importantes para funções biológicas como a presença de carotenóides, heterosídeos flavônicos, saponínicos, antraquinônicos, taninos, lectina, cumarinos, triterpenos, esteróides, entre outros (BATISTA *et al* 2014; MOURA *et al*, 2018).

Com relação a sua ação antimicrobiana estudos com extrato bruto de *C. brasiliense camb* obtido a partir de folhas foi capaz de inibir o crescimento de colônias bacterianas: *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* nas concentrações iguais e superiores a 5 mg.mL⁻¹ como também contra *Escherichia coli* (AMARAL *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2018), e *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Citrobacter freundii* e *Salmonella thyphimurium* com a concentração inibitória mínima destes últimos sendo detectada em 512 µg.mL⁻¹ de extrato etanólico obtido dos frutos (ASCARI *et al.*, 2010).

Nesse estudo, a MIC com melhor resultado foi inferior aos estudos anteriormente citados sendo o resultado mais promissor de 500 µg/mL para inibição dos fatores de virulência como produção enzimática e formação de biofilme.

Apesar da maioria dos trabalhos demonstrarem resultados positivos com a utilização do óleo de pequi como antimicrobiano, antiparasitário, entre outros, alguns estudos envolvendo extratos vegetais aquosos e hidroalcolicos obtidos a partir da folha do pequizeiro encontraram um aumento na viabilidade celular por células de *C. albicans* quando comparados aos resultados do contato das cepas com fluconazol, o que pode sugerir que a eficiência dessa planta como fármaco se dê apenas a partir da utilização do óleo ou que sua efetividade depende da quantidade de material utilizado para confecção dos extratos (BATISTA, 2011; MARTINS *et al*, 2015).

Outra investigação encontrou efeito adverso de *C. brasiliense Camb.*, detectado por meio de ensaio *in vitro*, em que as sementes de pequi induziram um efeito alérgico no intestino, devido as proteínas presentes nas sementes que se ligam a receptores no intestino e desencadeia esta resposta mediada por imunoglobulina E (SILVESTRINI *et al.*, 2017).

Com relação a toxicidade os testes com *C. brasiliense camb.* não indicaram efeitos adversos em ratos e a dose considerada letal para esse estudo foi de 2.000 mg.kg⁻¹, caracterizando-o como seguro para uso (ROESLER *et al.*, 2010; TRAESEL *et al.*, 2016; TRASEL *et al.*, 2017). Da mesma forma que o óleo, o extrato de *C. brasiliense* não indicou efeitos citotóxicos, avaliado de acordo com o ensaio de viabilidade celular, pelo método colorimétrico a base de tetrazólio (AMARAL *et al.*, 2014).

Durante a elaboração e confecção desse estudo, houve algumas limitações em sua execução. As amostras que estavam sendo manuseadas apresentaram contaminação durante seu armazenamento, logo, surgiu a necessidade de refazer alguns procedimentos desde sua fase inicial. Alguns reagentes utilizados nas etapas do estudo molecular chegaram sem refrigeração, o que comprometeu e atrasou a análise. Outro fator limitante desse estudo foi a pandemia, resultando em atrasos dos experimentos laboratoriais para a conclusão desse projeto.

6 CONCLUSÃO

As cepas apresentaram crescimento satisfatório em um período de 24 horas quando inoculadas em meio Ágar Sabouraud.

A utilização do sistema automatizado Vitek® bioMérieux reafirmou a identificação das 12 cepas clínicas utilizadas nesse estudo.

Quanto em contato com meio cromogênico, as cepas demonstram-se puras, e não foi possível identificar a presença de cepas mistas.

As espécies clínicas do gênero *Candida* foram identificadas por biologia molecular por PCR e eletroforese.

Os meios de cultura utilizados para os testes enzimáticos desse estudo também obtiveram resultado satisfatório.

As cepas clínicas do gênero *Candida* apresentaram fatores de virulência como produção de exoenzimas hidrolíticas e formação de biofilmes.

A maior atividade enzimática foi encontrada em lipase e a menor em amilase.

A espécie com maior produção enzimática foi *C. albicans* sendo a amostra de urina a mais positiva para todos os meios enzimáticos.

O óleo de pequi apresentou atividade antifúngica capaz de atenuar ou inibir totalmente os fatores de virulência estudados.

A concentração de 500 µg/ml do óleo apresentou os melhores resultados para a maioria das cepas com exceção da amostra de *Candida albicans* (urina) que em contato com o óleo apresentou maior atividade enzimática em proteinase.

REFERÊNCIAS

- ABI-CHACRA, et al. Phenotypical properties associated with virulence from clinical isolates belonging to the *Candida parapsilosis* complex, *FEMS Yeast Research*, v.13, n. 8, pages 831–848, Dec 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12092>.
- ANDREOLA P, DEMATHÉ A, GALAFASSI D, ELSEMANN EB, ELSEMANN RB, GAZZONI AF. Estudo comparativo entre a produção de fosfolipases extracelulares e proteinases do gênero *Candida* isoladas a partir de infecções de cavidade oral. *Rev Odontol UNESP.*, v.45, n.6, p. 219-226, Aug 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/1807-2577.26115>.
- ALANGADEN G et al 2011. J Nosocomial Fungal Infections: epidemiology, infection control, and prevention. **Infect Dis Clin N A**, v.25, p.201-225, 2011.
- ALBURQUENQUE, O. C. et al. Susceptibilidad in vitro a anidulafungina en 100 cepas de especies de *Candida* a isla das previo à la introducción de esta equinocandina en Chile. **Rev. Chil. infectol.**, Santiago, v. 28, n. 5, p.399-403, 2011.
- ALENCAR Andréia da Silva. Produção extracelular de enzimas hidrolíticas por leveduras de solos Roraimenses. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais. Universidade Federal de Roraima, 98f, 2012.
- ALVES, C.F.S. et al. Antimicrobial, antitrypanosomal and antibiofilm activity of *Equisetum hyemale*. *Microbial pathogenesis*, v. 101, p. 119-125, 2016.
- AMARAL-LOPES, S.; MOURA, A. Neonatal fungal sepsis by *Candida krusei*: A report of three cases and a literature review. *Medical mycology*, v.1, p. 24-26, 2012.
- AMBARAGHASSI G, et al. Identification of *Candida auris* by use of the updated Vitek 2 yeast identification system, version 8.01: a multilaboratory evaluation study. **J Clin Microbiol.**, 2019.DOI:<https://doi.org/10.1128/JCM.00884-19>.
- AGARWAL S, MANCHANDA V, VERMA N, BHALLA P. Yeast identification in routine clinical microbiology laboratory and its clinical relevance. **Indian J Med Microbiol.**, v. 29172-177,2011.
- ARASTEHFAR A, et al. Molecular Identification, genotypic diversity, antifungal susceptibility, and clinical outcomes of infections caused by clinically underrated yeasts, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis*: an iranian multicenter study (2014–2019). *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, v., 9, n. 264, 2019. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00264.
- ASCENÇÃO, V. L.; MOUCHREK FILHO, V. E. Extração, caracterização química e atividade antifúngica de óleo essencial *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia). **Cadernos de Pesquisa**, v.20, n. especial p. 137-144, São Luís, Jul 2013.
- ANDES D R, SAFDAR N, BADDLEY J W et al. The epidemiology and outcomes of invasive *Candida* infections among organ transplant recipients in the United States: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). **Transpl Infect Dis.**, v. 18, p. 921-931,2016.

ANDRADE, J T, *et al.* Design, synthesis, biological activity and structure-activity relationship studies of chalcone derivatives as potential anti-Candida agents. **J Antibiot**, v.71, p. 702–71, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41429-018-0048-9>.

ARENDRUP M C, PATTERSON T F. Multidrug-Resistant Candida: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. **J Infect Dis**. v.15, n.216, p. 445-451, Aug ,2017. PMID: 28911043.DOI: 10.1093/infdis/jix131.

ATHENAKI M., GARDELI, C. P. DIAMANTOPOULOU, TCHAKOUTEU S.S., SARRIS D., PHILIPPOUSSIS A., and PAPANIKOLAOU S. Lipids from yeasts and fungi: physiology, production and analytical considerations. **Journal of Applied Microbiology**, v.124, n. 2, p. 336-367, 2017. DOI: 10.1111/jam.13633.

AYRES, M., AYRES JÚNIOR, M., AYRES, D.L. & SANTOS, A.A. BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Ong Mamiraua. Belém, PA, 2007.

BADIEEL P, *et al.* Antifungal susceptibility patterns of colonized Candida species isolates from immunocompromised pediatric patients in five university hospitals. **J. Microbiol. Iran.**, v. 9, n.6, p. 363-371, 2017.

BANU F *et al.* Effects of patchouli and cinnamon essential oils on biofilm and hyphae formation by Candida species. *Journal de Mycologie Medicale*, v. 28. p. 332-339, 2018.

BARBEDO L.S & SGARBI D. B. G. Candidiasis. **DST - J bras Doenças Sex Transm** v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

BASSETTI M., PEGHIN M., TIMSIT J.F., The current treatment landscape: candidiasis, *J Antimicrob Chemother*, v. 71, n. p. 13-22, Nov 2016. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkw392>.

BAYONA M., SALVADOR GARCÍA, C., TORMO PALOP, N., & GIMENO CARDONA, C.). Evaluation of a novel chromogenic medium for Candida spp. identification and comparison with CHROMagar™ Candida for the detection of *Candida auris* in surveillance samples. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 98, n. 4, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115168>.

BEYDA ND *et al.* FKS mutant *Candida glabrata*: risk factors and outcomes in patients with candidemia. *Clin Infect Dis.*, 2014.

BHATTACHARYA, S.; SAE-TIA, S.; FRIES, BC *Candidiasis* and Mechanisms of Antifungal Resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 312, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060312>.

BICANIC, Ti A.; HARRISON, T S. Systemic fungal infections. **Medicine**, v.42, n.1, p.26-30, 2014.

BOHM L, TORSIN S, TINT SH, ECKSTEIN MT, LUDWIG T, PEREZ JC (2017) The yeast form of the fungus *Candida albicans* promotes persistence in the gut of

gnotobiotic mice. **PLoS Pathog**, v.13, n.10, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006699>.

BONGOMIN F, GAGO S, OLADELE RO, DENNING DW. Global and multi-national prevalence of fungal diseases— estimate precision. **J Fungi**. v.3, n.,5 2017.

BORAL, H. et al. Overview of selected virulence attributes in *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum*, and *Exophiala dermatitidis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 111, p. 92-107, 2018.

BRADFORD, L. L.; RAVEL, J. The vaginal mycobiome: a contemporary perspective on fungi in women's health and diseases. **Virulence**, v.8, n.3, p. 342-351, 2017.

BRANCO, P. V. G. C., ANJOS, D. C. V. DOS, NASCIMENTO, F. B. DO, VALE, I. N. F., AZEVEDO, C. M. P. E S. DE, MONTEIRO, S. G., FIGUEIREDO, P. DE M. S., & MONTEIRO, C. de A. Prevalência e produção de exoenzimas por espécies de candida provenientes da mucosa bucal de pacientes com aids e indivíduos hígidos. **Revista De Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology**, v.41, n. 4, 2012. DOI:<https://doi.org/10.5216/rpt.v41i4.21703>.

BRUNET, K.; RAMMAERT, B. Mucormycosis treatment: recommendations, latest advances, and perspectives. **Journal de Mycologie Médicale**, 2020.

CAMPOY, S; ADRIO, J L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v.133, p.86-96, 2017.

CARMO, E. S. et al. Treatment of pityriasis versicolor with topical application of essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf - therapeutic pilot study. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 3, p. 381-385, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20131800>.

CARMONA, Eva M.; LIMPER, Andrew H. Overview of Treatment Approaches for Fungal Infections. **Clinics in Chest Medicine**, v.38, n.3, p.393-402, 2017.

CASTELANI A. Observations on some intestinal bacteria found in man., **J. Zen Bak Par Infek H**. v.65, n.4-5, p. 262-269, 1912.

CAVALHEIRO M AND TEIXEIRA MC Candida Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. **Front. Med.**, v. 5, n. 28, 2018. DOI: 10.3389/fmed.2018.00028.

CHAABANE F, GRAF A, JEQUIER L and COSTE A T. Review on antifungal resistance mechanisms in the emerging pathogen *Candida auris*. **Front. Microbiol.**, v.10, n.2788, 2019. DOI:10.3389/fmicb.2019.02788.

CLANCY C.J. & NGUYENA M. H. Diagnosing invasive candidiasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n.5, 2018.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Third Edition: M27-A3. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.

- COLLA, L. M., RIZZARDI, J., PINTO, M. H., REINEHR, C. O., BERTOLIN, T. E., COSTA, J. A. V. Simultaneous production of lipases and biosurfactants by submerged and solid-state bioprocess. **Bioresource Technology**, v. 101, p.8308-8314, 2010.
- COSTE AT, ET AL; Fungal infection network of switzerland (funginos). Emerging echinocandin-resistant *Candida albicans* and *glabrata* in Switzerland. **Infection.**, v. 48, n. 5, p. 761-766, 2020.
- DAEF, E et al . Evaluation of chromogenic media and seminested PCR in the identification of *Candida* species. *Braz. J. Microbiol.*, São Paulo, v. 45, n. 1, p. 255-262, 2014.
- de ROSSI et al. Interactions Between *Candida albicans* and Host. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 32, n. 1, p. 15-28, jan./jun. 2011. DOI: 10.5433/1679-0367.2011v32n1p15.
- DEVARAJAN, P. V. et al Enhancing Safety and efficacy by altering the toxic aggregated state of amphotericin b in lipidic nanoformulations. *Mol. pharm.*, Washington, v. 17, n. 6, p. 2186-2195, 2020.
- D'Eça A Jr, Silva AF, Rosa FC, Monteiro SG, Maria Silva Figueiredo P, Andrade Monteiro C. In vitro differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44(3):334-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822011005000036>. PMID:21901875.
- D'EÇA JUNIOR, A. et al. In vitro differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of *Candida*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, vol.44,n.3,pp.334-338., 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037>.
- DE GROOT PW, BADER O, DE BOER AD, WEIG M, CHAUHAN N. Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. **Eukaryot Cell.**, v.12, p. 470-481, 2013.
- DEORUKHKAR, S. C., & SAINI, S. Why *Candida* species have emerged as important nosocomial pathogens. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.5, n.1, p.533-545, 2016.
- DEORUKHKAR, S.C., SAINI, S., MATHEW, S. Virulence factors contributing to pathogenicity of *Candida tropicalis* and its antifungal susceptibility profile. **Int. J. Microbiol**, v. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/456878>.
- DEEPA K, JEEVITHA T and MICHAEL. In vitro Evolution virulence factors *Candida* species isolated from oral cavity. **JMM.**, v. 7, n.3, p. 28-32, 2015.
- DUDIUK C, et al. Quick Detection of FKS1 Mutations Responsible for Clinical Echinocandin Resistance in *Candida albicans*. **J Clin Microbiol** . v, 53, n. 7, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00398-15> PMID: 25878347.

ENDO, R.; HORIYAMA, M.; OHKUMA, M. D-Fructose Assimilation and fermentation by yeasts belonging to *Saccharomycetes*: Rediscovery of Universal phenotypes and elucidation of fructophilic behaviors in *Ambrosiozyma platypodis* and *Cyberlindnera americana*. **Microorganisms**, v.9, n.758, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040758>.

ENKLER L, RICHER D, MARCHAND AL, FERRANDON D, JOSSINET F. Genome engineering in the yeast pathogen *Candida glabrata* using the CRISPR-Cas9 system. **Sci Rep.**, v. 21, n. 6, Oct 2016. PMID: 27767081; PMCID: PMC5073330. DOI: 10.1038/srep35766.

FALCI, D R.; PASQUALOTTO, A C. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clinical & Biomedical Research**, v.35, n.2, 2015.

FANG, et al. Recurrent arthritis caused by *Candida parapsilosis*: a case report and literature review. **BMC Infect Dis** v.19, n. 631, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4255-1>.

FAUSTINO, C.; PINHEIRO, L. Lipid Systems for the Delivery of Amphotericin B in Antifungal Therapy. *Pharmaceutics*. v.12, n. 29. 2020.

FERREIRA, S.L.J et al. Comparação da atividade antifúngica dos extratos etanólico e aquoso de *Rhaphiodon Echinus* (Lamiaceae) contra cepas de *Candida albicans*. *UNINGÁ*, v. 56, n. 3, p. 1-8, 2019.

FERREIRA, B. F. F.; RAGAZZINI, L. J.; ANDRADE, M. C. Investigação da Sensibilidade ao Fluconazol e Produção de Enzimas Hidrolíticas por *Candida* sp. Isoladas do Trato Respiratório de Pacientes Internados em um Hospital no Sul de Minas Gerais/Investigation of Fluconazole Sensibility and Hydrolytic Enzymes Pro. **Revista Ciências em Saúde**, v. 2, n. 1, p. 48-56, 2012.

FLOWERS SA, COLON B, WHALEY SG, SCHULER MA, ROGERS PD. Contribution of clinically derived mutations in ERG11 to azole resistance in *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother**. v, 59, n.1, p.450–460. DOI:<https://doi.org/10.1128/AAC.03470-14> PMID: 25385095.

GACSER, A. Adhesins in *Candida parapsilosis*: Understudied players in Virulence. **Virulence**, v. 7, n. 2, p. 65-67, 2016.

GADSBY, N. J., MCHUGH, M. P., RUSSELL, C. D., MARK, H., CONWAY MORRIS, A., LAURENSEN, I. F., et al. (2015). Development of two real-time multiplex PCR assays for the detection and quantification of eight key bacterial pathogens in lower respiratory tract infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 21, 788.e1–788.e13 doi: 10.1016/j.cmi.2015.05.004

GAGO S, GÁRCIA-HODAS R, CUESTA I, MELLADO E, and ALASTRUEY-IZQUIERDO A. *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida*

metapsilosis virulence in the non-conventional host *Galleria mellonella*. **Virulence** v., n. 2, p. 278–285; Feb. 2014.

GARCIA-RUBIO R, DE OLIVEIRA HC, RIVERA J AND TREVIJANO-CONTADOR N. The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. **Front. Microbiol.**, v.10, n. 299, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02993

GINTER-HANSELMAYER, G., & NENOFF, P. Clinically Relevant Mycoses Dermatomycoses. In **Clinically Relevant Mycoses**, p. 145-176, 2019. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-319-92300-0_10.

GINN, A. N., HALLIDAY, C. L., DOUGLAS, A. P., AND CHEN, S. C.. PCR-based tests for the early diagnosis of sepsis. Where do we stand? *Curr. Opin. Infect. Dis.* v.30,p.565–572, 2017. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000407.

GIOLO M. P.; SVIDZINSKI T. I. E. Physiopathogenesis, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia. **J Bras Patol Med Lab**, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GOMES H. S, VIEIRA, L. A. C, COSTA, P S, BATISTA A. C., COSTA L. R. Professional dental prophylaxis increases salivary cortisol in children with dental behavioural management problems: a longitudinal study. **BMC Oral Health**, v.16, n. 74, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12903-016-0273-1>.

GÓMEZ-LÓPEZ, A et al. Antifungal therapeutic drug monitoring: focus on drugs without a clear recommendation. *Clinical Microbiology and Infection*, 2020.

GOW N A R, van de VEERDONK F L, BROWN A J P, NETEA MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nat Rev Microbiol** v.10 p.112–22, 2012.

GRANGER, B. L. Insight into the antiadhesive effect of yeast wall protein of *Candida albicans*. **Eukaryot. Cell.**, v. 11, p. 795–805, 2012.

GULATI M, NOBILE C J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes Infect.**; v.18, n.5, p.310-321, May, 2016. PMID: 26806384; PMCID: PMC4860025. DOI: 10.1016/j.micinf.2016.01.002.

GUNASEGAR S. W., HIMRATUL. Nicotine enhances the thickness of biofilm and adherence of *Candida albicans* ATCC 14053 and *Candida parapsilosis* ATCC 22019, **FEMS Yeast Research**, v. 19, n. 2, March 2019, DOI: <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy123>.

GUPTA A., EVANS R. K, KOCH L. B., LITTLETON A. J., BIGGINS S. Purification of kinetochores from the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods Cell Biol.**; v. 144, p. 349–370, 2018. DOI: 10.1016/bs.mcb.2018.03.023.

HALICI M. G., OSMANOGLU M. O., KAHRAMN M. A new record of lichenized fungus species for Antarctica: *Peltigera castanea* Goward, Goffinet & Miądł. **Czech Polar Reports**, v. 10, n. 1, p. 50-58, 2020. DOI: 10.5817/CPR2020-1-5.

HASSAN M. A, TAMER, Tamer ASMAA M., A. RAGEH, ABOU-ZEID A. M., EMAN H. F, EL-ZAHER A., KENAWY E..Insight into multidrug-resistant microorganisms from microbial infected diabetic foot ulcers. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**,v. 13, n. 2, p. 1261-1270, 2019.DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2019.01.044>.

HAY, R. Superficial fungal infections. **Medicine**, v. 45, n. 11, p. 707-710, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.08.006>.

HAY, R. J. Subcutaneous Mycoses: General Principles. **Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases** ,p. 653-658, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-55512-8.00083-1>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323555128000831>. Acesso em: 23 Jan 2021.

HOVHANNISYAN H., SAUS E, KSIEZOPOLSKA E, GABALDÓNA O. The transcriptional aftermath in two independently formed hybrids of the opportunistic pathogen *Candida orthopsilosis*. DOI: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00282-20>.

HUSSIAN H. et al. Phytochemical investigation and antimicrobial activity of an endophytic fungus *Phoma* sp. **Journal of King Saud University – Science**,v. 27, n. 1, p. 92-95, Jan 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2014.08.001>.

HRNOVA M & DROBNICA L. Induction of mycelial type of development in *Candida albicans* by low glucose concentration. **Mycopathologia.**, v. 76, p. 83-96. DOI: 10.1007/BF00443755.

Institut national de santé de Québec, Comité sur les Infections Nosocomiales du Québec (CINQ). 2018. Mesures de prévention et de contrôle du *Candida auris* dans les milieux de soins. Gouvernement du Québec, Quebec, Canada. https://www.inspq.qc.ca/sites/default/files/publications/2377_prevention_control_candida_auris.pdf.

JAFARI Z, MOTAMEDI M, JALALIZAND N, SHOKOOHI GR, CHARSIZADEH A, MIRHENDI H. Comparison of CHROMagar, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, and polymerase chain reaction-fragment size for the identification of *Candida* species. **Curr Med Mycol.**, v.3, n. 3, p. 10-15, 2017.DOI: 10.29252/cmm.3.3.10.

JASIM S T, HASAN A A, FLAYYIH M T. Isolation and identification of *Candida* spp. from different clinical specimens and study the virulence factors., v.5, n. 7, 2016.

JIANG L, et al. Disruption of ergosterol and tryptophan biosynthesis, as well as cell wall integrity pathway and the intracellular pH homeostasis, lead to mono-(2-ethylhexyl) -phthalate toxicity in budding yeast. **Chemosphere**, v.206, p.643-654,2018.

KARKOWSKA-KULETA, et al. Characteristics of Extracellular Vesicles Released by the Pathogenic Yeast-Like Fungi *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*. **Cells.**, v. 9, n. 1722, 2020.

KATHURIA S, SINGH PK, SHARMA C, PRAKASH A, MASIH A, KUMAR A, MEIS JF, CHOWDHARY A. Multidrug-resistant *Candida auris* misidentified as *Candida haemulonii*: characterization by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry and DNA sequencing and its antifungal susceptibility profile variability by Vitek 2, CLSI broth microdilution, and Etest method. **J Clin Microbiol.**, v. 53, p.1823–1830, 2015.

KAUR, R et al. “Identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* Species: a comparison of Vitek-2 system with conventional and molecular methods. **Journal of global infectious diseases** vol. 8,n.4, p. 139-146,2016. DOI :139-146. doi:10.4103/0974-777X.192969.

KOZIK, A.; KARKOWSKA-KULETA, J.; ZAJAC, D.; BOCHENSKA, O.; KEDRACKAKROK, S.; JANKOWSKA, U.; RAPALA-KORIZ, M. Fibronectin-, vitronectin- and lamininbinding proteins at the cell walls of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* pathogenic yeasts. **BMC Microbiol.**, v. 15, p. 197, 2015.

KRISTANC, L et al. 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.

LAGREE K. Roles of *Candida albicans* Mig1 and Mig2 in glucose repression, pathogenicity traits, and *SNF1* essentiality. **PLOS Genetics.**, v.16, n.1, 2020.DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008582>.

LAMOTH F & KONTOYIANNIS D. P., The *Candida auris* alert: facts and perspectives. **JID**, v. 2018, n. 217, p. 517-520, 2018.

LAMOTH, F., LOCKHART, S. R., BERKOW, E. L., AND CALANDRA, T. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 73, n. 1, p. 4-13, 2018.DOI: 10.1093/jac/dkx444.

LAZZAROTTO, Eduarda Sampaio et al. Identificação de leveduras do gênero *Candida* isoladas de hemoculturas de pacientes oncológicos e pesquisa de biofilme. **REVISTA UNINGÁ**, [S.l.], v. 57, n. 3, p. 85-94, out. 2020.

LEÃO; D. P.; FRANCA; A. S.; OLIVEIRA; L. S.; BASTOS; R. & COIMBRA; M. A. Physicochemical characterization; antioxidant capacity; total phenolic and proanthocyanidin content of flours prepared from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) fruit by-products. **Food Chemistry**; v. 225; p. 146– 153, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.027>

LEE, P.Y.; GAM, L.H.; YONG, V.C.; ROSLI, R.; NG, K.P.; CHONG, P.P. Identification of immunogenic proteins of *Candida parapsilosis* by serological proteome analysis. **J. Appl. Microbiol.**, v. 116, p. 999-1009, 2014.

LEE, P.Y.; GAM, L.H.; YONG, V.C.; ROSLI, R.; NG, K.P.; CHONG, P.P. Immunoproteomic analysis of antibody response to cell wall-associated proteins of *Candida tropicalis*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 17, p. 854-865, 2014.

LEENA S S, MAHALAKSHMI K, NAVEEN K V. Chromogenic medium versus PCR-RFLP in the speciation of *Candida*: a comparative study. **BMC Res Notes.**, v. 22, n. 12, Oct 2019. PMID: 31640775; PMCID: PMC6805376. DOI: 10.1186/s13104-019-4710-5.

LEUNG, A. et al. Onychomycosis: An Updated Review. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v. 14, n. 1, p. 32-45, 2020. DOI:10.2174/1872213X13666191026090713. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7509699/>. Acesso em: 18 Maio 2021.

LI, D.; XIA, R.; ZHANG, Q.; BAI, C.; LI, Z.; ZHANG, P. Evaluation of candidemia in epidemiology and risk factors among cancer patients in a cancer center of China: an 8-year case-control study. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, p. 1, 2017.

LI Z., NIELSEN K. Morphology changes in human fungal pathogens upon interaction with the host. **J. Fungi**, v. 3, n. 66, dez 2017. DOI: 10.3390/jof304006.

LIMA R. L. F. Micorrizas arbusculares e absorção de fósforo em função da capacidade de fixação de fósforo do solo e da competição com a microbiota. **Rev. Bras. de Geogr. Fis.**, v. 13, n. 3, p. 1063-1079, 2020.

LIONAKIS, M. S., & HOHL, T. M. Call to Action: How to Tackle Emerging Nosocomial Fungal Infections. **Cell host & microbe**, v. 27, n.6, p. 859–862, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.04.011>.

LIU, Y.; OU, Y.; SUN, L.; LI, W.; YANG, J.; ZHANG, X.; HU, Y. Alcohol dehydrogenase of *Candida albicans* triggers differentiation of THP-1 cells into macrophages. **J. Adv. Res.**, v. 18, p. 137-145, 2019.

LOCKHART SR, JACKSON BR, VALLABHANENI S, OSTROSKY-ZEICHNER L, PAPPAS PG, CHILLER T. Thinking beyond the common *Candida* species: need for species level identification of *Candida* due to the emergence of multidrug-resistant *Candida auris*. **J Clin Microbiol** 55:3324 –3327. <https://doi.org/10.1128/JCM.01355-17>, 2017.

LOMBARDI L, ZOPPO M, RIZZATO C, BOTTAI D, HERNANDEZ AG, HOYER LL. Characterization of the *Candida orthopsilosis* agglutinin-like sequence (ALS) genes. **PLoS ONE.**, v. 14, n.14. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215912>.

LÓPEZ-FUENTES, E.; GUTIÉRREZ-ESCOBEDO, G.; TIMMERMANS, B.; Van DIJCK, P.; de LAS PEÑAS, A.; CASTAÑO, I. *Candida glabrata* genome plasticity confers a unique pattern of expressed cell wall proteins. **J. Fungi**. v.4, n.67, 2018.

LOPES JP, STYLIANOU M, BACKMAN E, HOLMBERG S, JASS J, CLAESSION R, URBAN CF. 2018. Evasion of immune surveillance in low oxygen environments enhances *Candida albicans* virulence. **mBio** 9:e02120-18, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.02120-18>.

- LV QZ, YAN L, JIANG YY. 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. DOI:10.1080/21505594.2016.1188236.
- MACHADO, M. T. C.; MELLO, B. C. B. S.; HUBINGER, M. D. Evaluation of pequi (*Caryocar Brasiliense Camb.*) aqueous extract quality processed by membranes. *Food and Bioproducts Processing*, v. 95, p. 304–312, 1 jul. 2017.
- MAHBOOB, N., IQBAL, H., AHMED, M., MAGNET, M. M., & MAMUN, K. Z. Disk diffusion Method in Enriched Mueller Hinton agar for determining susceptibility of *Candida* isolates from various clinical specimens. **Journal of Dhaka Medical College**, v. 28, n.1, p. 28-33, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3329/jdmc.v28i1.45753>.
- MANOHARAN RK, LEE JH, LEE J. Antibiofilm and antihyphal activities of cedar leaf essential oil, camphor, and fenchone derivatives against *Candida albicans*. **Front Microbiol.**; n.8, 2017.
- MARTINS P R and de CASTRO J J Effect of *Caryocar brasiliense* (Pequi) extract on fungus *Candida albicans*. **Revista Conexão Saúde**, ISSN 2359-3008, v. II, ano II, Ago 2015.
- MATEO, J.J.; GARCERÀ, P.; MAICAS, S. Unusual *non-Saccharomyces* yeasts isolated from unripened grapes without antifungal treatments. **Fermentation**, v. 6, n. 41, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation6020041>.
- MATHAVI SG, SASIKALA, A. KAVITHA, PRIYADARSI R .CHROMagar as a primary isolation medium for rapid identification of *Candida* and its role in mixed *Candida* infection in sputum samples. **Indian J Microbiol Res.**, v.3, n.2, p. 141-144,2016.
- MAYER FL, WILSON D, HUBE B 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence.**, v. 4, p.119-128, 2013.
- MCCALL, A. *et al.* *Candida albicans* biofilm development is governed by cooperative attachment and adhesion maintenance proteins. *npj Biofilms Microbiomes.*, v 5, n. 21, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0094-5>.
- MELO JR., A. F., CARVALHO de D, VIEIRA, F.A and OLIVEIRA D. A Spatial genetic structure in natural populations of *Caryocar brasiliense Camb.* (Caryocareceae) in the North of Minas Gerais, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 43, p. 205- 209, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2012.02.005>.
- MESSEIR I, ABRANTES PMDS, AFRICA CWJ. Strengths and limitations of different chromogenic media for the identification of *Candida* species. **J Microbiol Res.**, v. 12, n. 5, p. 133-140, 2012.

MOTAUNG T. E., ELLS R., POHL C. H., ALBERTYN J., TSILO T. J. Genome-wide functional analysis in *Candida albicans*. **Virulence**, v. 8, n. 8, p.1563–1579, 2017. DOI:<https://doi.org/10.1080/21505594.2017.129219>.

MONTES, K.; ORTIZ, B.; GALINDO, C.; FIGUERO, I.; BRAHAM, S.; FONTECHA, G. Identification of *Candida* Species from Clinical Samples in a Honduran Tertiary Hospital. **Pathogens**, v. 8, p.237, 2019. DOI:<https://doi.org/10.3390/pathogens8040237>.

MILHOMENS, P.M. et al. Prevalência dos agentes etiológicos das vulvovaginites através dos resultados de exames citopatológicos. **Rev. Investig.Bioméd**, v. 6, n.1, p. 92-102, São Luís, 2014.

MODRZEWSKA B, KURNATOWSKI P. Selected pathogenic characteristics of fungi from the genus *Candida*. **Ann Parasitol.**, v.59: 57-66, 2013.

NAJAT D Prevalence of Pre-Analytical Errors in Clinical Chemistry Diagnostic Labs in Sulaimani City of Iraqi Kurdistan. **PLoS ONE.**, v.12, n. 1, 2017. DOI:10.1371/journal.pone.0170211.

NASCIMENTO-SILVA, N.R.R., MENDES, N.S.R., & SILVA, F.A. Nutritional composition and total phenolic compounds content of pequi pulp (*Caryocar brasiliense* Cambess.), **Journal of Bioenergy and Food Science**, v. 7, n. 2, 2020. DOI: 10.18067/jbfs.v7i2.281.

NETO J. B. L.; LOPES L. D.; SOUZA F. A.P., PEREIRA I. S.; VANDESMET L. C.S, Incidência de fungos patogênicos nas fezes de pombos em áreas públicas de Quixadá, Ceará. **Mostra Científica de Biomedicina**, Quixadá, v. 4, n. 2, nov. 2019.

NETO M. P. A., de MARIA G. L., SANTOS L. M., TARGINO M. M. *Candida* spp. natural area and cultural isolated: resistance to fluconazole as an environmental biomarker. **Braz. Ap. Sci. Rev**, Curitiba, v. 4, n. 6, p. 3355-3366 nov./dez. 2020.

NETT, J. E.; ANDES, D. R. Antifungal agents. **Infectious disease clinics of north america**, v.30, n.1, p.51-83, 2016.

NILSSON, R. H et al. The unite database for molecular identification of fungi: handling dark taxa and parallel taxonomic classification. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D259–D264, 08 Jan 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gky1022>.

NUCCI M., QUEIROZ-T., TOBÓN F. A. M., RESTREPO A., ARNALDO L. C. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America, **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 5, p. 561-570, Sept 2010. DOI: <https://doi.org/10.1086/655683>.

NUCCI M, *et al*; Latin American Invasive Mycosis Network. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. **PLoS One** 8: e59373, 2013.

NUNES, E. B, MONTEIRO J. C. M., NUNES N. B., PAES. A. L. V. Perfil de sensibilidade do gênero *Candida* a antifúngicos em um hospital de referência da

Região Norte do Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 2, n. 4, Dez 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232011000400004>.

OLIVEIRA, R. da S., LUCAS, C. P., ANTONUCCI, G., and da SILVA, F. C. Natural bioactive compounds: promoting agents in the reduction of oxidative stress and inflammatory processes. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 5, n. 2, p. 258-273, 2018.

OTHAM K I, ABDULLAH, S M, ALI B, MAJID M. Isolation and identification *Candida spp* from urine and antifungal susceptibility test. **Iraqi Journal of Science**, v. 59, n, 4B, p. 1981-1988, 2018. DOI:10.24996/ij.s.2018.59.4B.3

OZCAN K, ILKIT M, ATES A, TURAC-BICER A, DEMIRHINDI H. Performance of chromogenic Candida agar and CHROMagar Candida in recovery and presumptive identification of monofungal and polyfungal vaginal isolates. **Med Mycol.**, v. 48, n.1, p. 29-34, 2010.

PAIS P, GALOCHA M, VIANA R, CAVALHEIRO M, PEREIRA D, TEIXEIRA MC. Microevolution of the pathogenic yeasts *Candida albicans* and *Candida glabrata* during antifungal therapy and host infection. **Microb Cell.**, v.8; n.3 p.142-159, Feb 2019. PMID: 30854392; PMCID: PMC6402363. DOI: 10.15698/mic2019.03.670.

PALMEIRA, S. M. et al, Chemopreventive effects of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) on preneoplastic lesions in a mouse model of hepatocarcinogenesis. *European journal of cancer prevention*, v. 25, n.4, 299-305, 2016.

PATHAKUMARI B, LIANG G, LIU W. Immune defence to invasive fungal infections: A comprehensive review. **Biomed Pharmacother**, v. 130, 2020. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110550.

PAZ; J. G.; PACHECO; P.; SILVA; C. O. & PASCOAL; G. B. Análise da composição nutricional e de parâmetros físico-químicos do pequi (*Caryocar brasiliense* camb) in natura. **Linkania**; v. 8, p 73– 86, 2014 <http://linkania.org/master/article/view/156/106>

PERLIN, D S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet Infectious Management Diseases**, v.17, n.12, p.383-392, 2017.

PIERCE, C.G.; VILA, T.; ROMO, J.A.; MONTELONGO-JAUREGUI, D.; WALL, G.; RAMASUBRAMANIAN, A.; LOPEZ-RIBOT, J.L. The *Candida albicans* biofilm matrix: composition, structure and function. **J. Fungi**, 2017.

PINHEIRO, F. A. Applicability of a voltammetric assay based on the electroreduction of oxygen to evaluate the antioxidant capacity of Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) Pulp. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.29, n. 8,p. 1653-1662, 2018.

POTE et al. Distribution of pathogenic yeasts in different clinical samples: their identification, antifungal susceptibility pattern, and cell invasion assays. **Infect Drug Resist**, v. 20, n. 13, p. 1133-1145, Apr, 2020. DOI: 10.2147/IDR.S238002. PMID: 32368104; PMCID: PMC7182453.

PRICE MF, WILKINSON ID, GENTRY IO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*, **Sabouraudia**, v.20, p.15-20, 1982.

PRISTOV K E, GHANNOUM M A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clin Microbiol Infect.**, v. 25, n. 7:p.792-798, 2019. DOI: 10.1016/j.cmi.2019.03.028.

PRYSZCZ LP, et al. Genomic aftermath of hybridization in the opportunistic pathogen *Candida metapsilosis*. **PLoS Genet.**,2015 DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005626>.

Public Health England. 2017. Guidance for the laboratory investigation, management and infection prevention and control for cases of *Candida auris*. Public Health England, London, United Kingdom. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/637685/Updated_Candida_auris_Guidance_v2.pdf.

QUAN-ZHEN Lv, YAN L. and. 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. DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1188236>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4991322/>. Acesso em: 02 Jun 2021.

RAMOS, K.M.C.; SOUSA, V.A.B..Características físicas e químico-nutricionais de frutos de pequizeiro (*Caryocar coriaceumWittm.*) em populações naturais da região meio-norte do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura.**, v. 33, n.2, p. 500-508, 2011.

RASTI S., ASADI M. A., TAGHIRI A., BEHRASHI M., MOUSAVIE G. Vaginal candidiasis complications on pregnant women. **Jundishapur J Microbiol.** v. 7, n. 2, Feb, 2014 DOI: 10.5812/jjm.10078.

REINHARDT, L. C, NASCENTE P. S, RIBEIRO. J. S., GUIMARÃES V. B. S., ETGES A. and LUND R. G. Sensitivity to antifungals by *Candida* spp samples isolated from cases of chronic atrophic candidiasis (CAC) **Braz. J. Biol.**, vol. 80, n. 2 pp.266-272, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.190454>.

RICCOMBENI A, VIDANES G, PROUX-WÉRA E, WOLFE KH, Butler G. 2012. Sequence and analysis of the genome of the pathogenic yeast *Candida orthopsilosis*. 2012. **PLoS One** 7:e35750. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035750>.

ROCHA et al, Virulence of clinical isolates of *Candida tropicalis*. *Rev. Investig, Bioméd. São Luís*, 9(2): 118-128, 2017.

RYBAK JM, et al.Loss of c-5 sterol desaturase activity results in increased resistance to azole and echinocandin antifungals in a clinical isolate of *Candida parapsilosis*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 61, n. 9, 2017.

SACHIN, C. D.; RUCHI, K.AND SANTOSH S. In vitro evaluation of proteinase, phospholipase and haemolysin activities of *Candida* species isolated from clinical

specimens **International J. of Medicine and Biomedical Research.**, v. 1, n, 2, p. 153-157, 2012.

SANDHYARANI T, SRIKUMAR R, PRABHAKAR REDDY E, & LATHA S. (2019). Molecular detection of *Candida* species by restriction fragment length Polymorphism (RFLP) analysis of PCR from HIV infected persons . **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**,v, 10, n. 3, p 1596-1601,2019. DOI. <https://doi.org/10.26452/ijrps.v10i3.1317>.

SARDI JC, SCORZONI L, BERNARDI T, FUSCO-ALMEIDA AM, MENDES GIANNINI M J. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **J Med Microbiol** . v, 62, p. 10-24, 2013.

SAVASTANO, C. et al. *Candida glabrata* among *Candida* spp. From environmental health practitioners of a Brazilian Hospital. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 47, n. 2, p. 367-372, June 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.05.001>.

SEYEDMOUSAVI, S., et al. Systemic antifungal agents: current status and projected future developments. **Methods Mol Biol**, v.1508, pp. 107-139, 2017.

SHAFREEN R M, MUTHAMIL S, PANDIAN S K. Inhibition of *Candida albicans* virulence factors by novel levofloxacin derivative. **Appl Microbiol Biotechnol**; v.98, p. 6775–85, 2014.

SHAO T et al. Commensal *Candida albicans* positively calibrates systemic TH17 immunological responses. **Cell Host Microbe.**, v.13, n.25, p. 404-417, Mar, 2019. PMID: 30870622; PMCID: PMC6419754.DOI: 10.1016/j.chom.2019.02.004.

SHAWN R. LOCKHART, BRENDAN R. JACKSON, SNIGDHA VALLABHANENI, LUIS OSTROSKY-ZEICHNER, PETER G. PAPPAS, TOM CHILLER. Thinking beyond the Common *Candida* Species: Need for Species-Level Identification of *Candida* Due to the Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* .*Journal of Clinical Microbiology*,v. 55, n. 12, p. 3324-3327, Nov 2017. DOI: 10.1128/JCM.01355-17.

SCHARMANN U, KIRCHHOFF L, CHAPOT VLS, et al. Comparison of four commercially available chromogenic media to identify *Candida albicans* and other medically relevant *Candida* species. **Mycoses.**, v. 63, n. 823, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/myc.13119>.

SHIGEMURA K, et al. Comparison of the clinical risk factors between *Candida albicans* and *Candida non-albicans* species for bloodstream infection. **Journal Antibiot**, Tokyo, 2014. DOI: 10.1038/ja.2013.141.

SILVA, H. M. Caracterização e identificação de leveduras do gênero *Candida* em pacientes transplantados de medula óssea. 2011. 68f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2011.

SILVA DM, SOUZA TC, ALENCAR CFC, SOUZA IS, BANDEIRA MFCL, FERNANDES OCC. Virulence factors of *Candida* species from the oral mucosa and prostheses of elderly people from a riverside community in the Amazon state, Brazil. *Rev Odontol UNESP*. 2019;48:e20190094. <https://doi.org/10.1590/1807-2577.0941>.

SILVA, S., NEGRI, M., HENRIQUES, M., OLIVEIRA, R., WILLIAMS, D. W., AND AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.36, p.288–305,2012.DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00278.x

SILVA S.L.; LIMA, M. E. de; SANTOS, R. D. T. dos; LIMA, E. de O. Onychomycoses devido a fungos do gênero *Candida*: uma revisão da literatura. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento, [S. l.]**, v. 9, n. 8, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i8.5771.

SOLL D. R. The role of phenotypic switching in the basic biology and pathogenesis of *Candida albicans*, **Journal of Oral Microbiology**, v.6, n. 12014. DOI: 10.3402/jom.v6.22993.

SOUZA, P M de et al. Application of microbial α -amylase in industry-A review. **Brazilian journal of microbiology**, v. 41, n4, p. 850-861, 2010.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 204237, 2013. ISSN 2314-6141.

SPETTEL K,. Analysis of antifungal resistance genes in *Candida albicans* and *Candida glabrata* using next generation sequencing. **PLoS ONE**, v. 14, n.1, 2019.

SULE H., KUMURYA A. S, SHEMA F. B. Candidiasis opportunistic mycosis within Nigeria: A Review. **UJMR**, v. 4, n. 1, p. 77 – 82, Jun,2019.

SUN M, CHEN C, XIAO W, CHANG Y, LIU C, XU Q. Increase in *Candida parapsilosis* candidemia in cancer patients. **Mediterr J Hematol Infect Dis.**, v. 1, n. 1, Jan, 2019. PMID: 30671218; PMCID: PMC6328045.DOI: 10.4084/MJHID.2019.012.

SUNDARRAM, AJITA ET MURTHY, THIRUPATHIHALLI PANDURANGAPPA KRISHNA. α -amylase production and applications: a review. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*,, vol. 2, no 4, p. 166-175, 2014.

STEPHEN, A et al. Non-toxic antimicrobials that evade drug resistance. **Nat Chem Biol.**, v. 11, n. 7, p. 481-487, Jul 2015.

SZERENCSEÉS, B., IGAZ, N., TÓBIÁS, Á. Size-dependent activity of silver nanoparticles on the morphological switch and biofilm formation of opportunistic pathogenic yeasts. **BMC Microbiol** v.20, n.176, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01858-9>.

- TAFF, H. T. et al. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future microbiology*, v. 8, n. 10, p. 1325-1337, 2013.
- TAFF, H. T.; NETT, J. E.; ANDES, D. R. Comparative analysis of *Candida* biofilm quantitation assays. *Sabouraudia*, v. 50, n. 2, p. 214-218, 2012.
- TAKAHASHI, J. A., LIMA, G. S., DOS SANTOS, G. F.; LYRA, F. H.; DA SILVA, HUGHES, A. F., GONÇALVES, F. A. G. Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados. **Rev. Virtual Quim**, v. 9, n. 6, Nov-Dez 2017.
- TAMER, F., & YUKSEL, M. E. Onychomycosis due to mixed infection with nondermatophyte molds and yeasts. **Our Dermatology Online**, v.10, n. 3, p. 267-269,2019. DOI: 10.7241/ourd.20193.10.
- TANG, J. L., et al. High incidences of invasive fungal infections in acute myeloid leukemia patients receiving induction chemotherapy without systemic antifungal prophylaxis: a prospective observational study in Taiwan. **PLoS ONE** 10:e0128410, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0128410.
- TAP et al. A fatal case of *Candida auris* and *Candida tropicalis* candidemia in neutropenic patient. **Mycopathologia**, v. 183, p. 559-564, 2018.
- TAVARES, A. H.; BÜRCEL, P. H.; BOCCA, A. L. Turning up the heat: inflammasome activation by fungal pathogens. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 7, p. e1004948, 2015.
- TEDILA, H., ASSEFA, A., & HAJI, F. Candidiasis and opportunistic mycosis in human. **Novel Research in Microbiology Journal**, v. 3, n.1, p. 190-203, 2019. DOI: 10.21608/NRMJ.2019.28105.
- TELLAPRAGADA, C. et al. Antifungal susceptibility patterns, in vitro production of virulence factors, and evaluation of diagnostic modalities for the speciation of pathogenic *Candida* from blood stream infections and vulvovaginal candidiasis. **Journal of pathogens**, v. 2014, 2014.
- TERÇAS A L G, MARQUES SG, MOFFA EB, ALVES MB, de AZEVEDO CMPS, SIQUEIRA WL and MONTEIRO CA Antifungal drug susceptibility of *Candida* species isolated from HIV-positive patients recruited at a public hospital in São Luís, Maranhão, **Brazil. Front. Microbiol.**, v. 8, n. 298, 2017. DOI:3389/fmicb.2017.00298.
- TONG Y., TANG J. *Candida albicans* infection and intestinal immunity **.Microbiological Research** n. 198, p.27-35, 2017.
- TOZZO, A. B & GRAZZIOTIN, N. A Vulvovaginal candidiasis. **Erechim**. v.36, n.133, p.53-62,2012.
- TRAESEL, G. K. et al. Evaluation of embryotoxic and teratogenic effects of the oil extracted from *Caryocar brasiliense* Cambess pulp in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 110, 74-82, 2017.

TRAESEL, G. K. et al. Oral acute and subchronic toxicity studies of the oil extracted from pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) pulp in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 97, 224-231, 2016.

TSAI, P.; CHEN, Y.; HSU, P. AND LAN, C. Study of *Candida albicans* and its interactions with the host: A mini review. *Biomedicine*.v, 3, p.51-64, 2013.

VARANO N et al, *Candida* spp infections in immunosuppressed patients. **J. Infect Control**, v.8, n.1, p. 17-23, Jan-Abr, 2019.

VALENZUELA-LOPEZ N, et al. Coelomycetous fungi in the clinical setting: morphological convergence and cryptic diversity. **J Clin Microbiol.**, v. 55, p. 552-567,2017.

VECCHIONE A, FLORIO W, CELANDRONI F, BARNINI S, LUPETTI A, GHELARDI E. Comparative evaluation of six chromogenic media for presumptive yeast identification. **J Clin Pathol.**, v. 70, n. 12, p. 1074-1078, 2017.

VIEIRA A J H & dos SANTOS J I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **RBAC.**, v. 49, n. 3, p. 235-239, 2017.

WANG et al. Virulence and antifungal susceptibility of microsatellite genotypes of *Candida albicans* from superficial and deep locations. **Yeast.**, v. 36, p. 363-373, 2019.

WATT, K. M., GONZALEZ, D., BENJAMIN, D.K.J., BROUWER, K.L., WADE, K.C., CAPPARELLI, E., BARRETT, J. AND COHEN-WOLKOWIEZ, M. 2015. Fluconazole population pharmacokinetics and dosing for prevention and treatment of invasive Candidiasis in children supported with extracorporeal membrane oxygenation, **J MembrBiol**, v. 247, n.3, 2015.

WEBB B J et al, Epidemiology and Clinical Features of Invasive Fungal Infection in a US Health Care Network, *Open Forum Infectious Diseases*,v .5, n. 8, Aug 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy187>

WICKES, B.L., WIEDERHOLD, N.P. Molecular diagnostics in medical mycology. **Nat Commun** v.9, n.5135, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07556-5>.

YANG ZT et al. Epidemiology, species distribution and outcome of nosocomial *Candida* spp. bloodstream infection in Shanghai. **BMC Infect Dis.**, v.14, n. 241, 2014

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

ZENG, B. et al. In vitro and in vivo effects of suloctidil on growth and biofilm formation of the opportunistic fungus *Candida albicans*. **Oncotarget**, v. 8, n. 41, p. 69972, 2017.

ZHANG L, et al. Development of fluconazole resistance in a series of *Candida parapsilosis* isolates from a persistent candidemia patient with prolonged antifungal therapy. **BMC Infect Dis.**, v. 15, n. 340, 2015.

ZHANG, M. R. et al. Molecular mechanism of azoles resistant *Candida albicans* in a patient with chronic mucocutaneous candidiasis. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-020-4856-8>. Disponível em: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-020-4856-8>. Acesso em: 02 Jun 2021.

ZHENG, Q. et al. Environmental and genetic regulation of white-opaque switching in *Candida tropicalis*. **Molecular microbiology**, v. 106, n. 6, p. 999-1017, 2017.

ZICCARDI, M. et al. *Candida parapsilosis* (sensu lato) isolated from hospitals located in the Southeast of Brazil: Species distribution, antifungal susceptibility and virulence attributes. *Int J Med Microbiol*, v. 305, n. 8, p. 848-59, Dec 2015. ISSN 1618-0607.

ZORE, G. B. et al. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. **Phytomedicine**, v. 18, n. 13, p. 1181–1190, 2011.

ZUZA-ALVES D L, SILVA-ROCHA WP AND CHAVES GM. An Update on *Candida tropicalis* Based on Basic and Clinical Approaches. **Front. Microbiol.**, v.8, n. 1927, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01927.

ANEXO

Parecer consubstanciado do CEP

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: BIOTECNOLOGIA DOS FUNGOS FILAMENTOSAS E LEVEDURAS DE SERES HUMANOS E AMBIENTE

Pesquisador: Geusa Felipa de Barros Bezerra

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 30994120.1.0000.5087

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHAO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.015.690

Considerações Finais a critério do CEP:**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1526385.pdf	04/05/2020 17:03:06		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_BIOTECNOLOGIA_DOS_FUNGOS_FILAMENTOSAS_corrigido1.pdf	04/05/2020 17:00:45	Geusa Felipa de Barros Bezerra	Aceito
Outros	carta_resposta_ao_CEP_UFMA_prof_a_Geusa.pdf	29/04/2020 16:28:51	Geusa Felipa de Barros Bezerra	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	novotcle_1.pdf	29/04/2020 16:28:03	Geusa Felipa de Barros Bezerra	Aceito
Orçamento	CARTA_AUTORIZACAO_ORCAMENTO.pdf	24/04/2020 09:10:41	Geusa Felipa de Barros Bezerra	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_Geusa.pdf	24/04/2020 09:10:23	Geusa Felipa de Barros Bezerra	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não