

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
NATURAIS E BIOTECNOLOGIA

PAULO CÉSAR TRINDADE DA COSTA

ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE
DERIVADOS FURÂNICOS CONTRA *CANDIDA* spp.

Cuité - PB

2020

PAULO CÉSAR TRINDADE DA COSTA (Bolsista CAPES)

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE DERIVADOS FURÂNICOS
CONTRA *CANDIDA* spp.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Naturais e Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Wylly Araújo de Oliveira
Co-orientadora: Profa. Dra. Francinalva Dantas de Medeiros

Cuité - PB

2020

C837a Costa, Paulo César Trindade da.

Análise da atividade antifúngica de derivados furânicos contra *Candida* spp. / Paulo César Trindade da Costa. – Cuité: CES, 2020.

58 fl.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais e Biotecnologia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2020.

Orientador: Dr. Wyly Araújo de Oliveira.

Coorientadora: Dra. Francinalva Dantas de Medeiros.

1. Antifúngicos. 2. *Candida* spp. 3. Compostos furânicos. 4. Micromorfologia. 5. Biossíntese de ergosterol. I. Título.

Biblioteca do CES - UFCG

CDU 615.281.9

Ficha catalográfica elaborada na fonte - Responsabilidade Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

Aprovação em ____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wylly Araújo de Oliveira
Universidade Federal de Campina Grande
Orientador

Profa. Dra. Francinalva Dantas de Medeiros
Universidade Federal de Campina Grande
Co-orientadora

Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas
Universidade Federal de Campina Grande
Examinador interno

Profa. Dra. Júlia Beatriz Pereira de Souza
Universidade Federal de Campina Grande
Examinadora externa

Cuité - PB

2020

Aos meus pais, Josenaldo e Aparecida,

Aos meus irmãos, Aline e Pablo,

À família e amigos,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe **Maria Aparecida** e ao meu pai **Josenaldo Nicolau**, por todos os ensinamentos transmitidos que fundamentaram a minha ascensão pessoal e profissional.

Agradeço a minha irmã Aline Aparecida e meu irmão Pablo Emanuel por todos os momentos compartilhados que serviram também para meu processo de formação. Agradeço a minha Família, representada pela minha avó Rosedete Trindade.

Agradeço ao Professor Wylly Araújo de Oliveira, meu orientador, por ter me concedido o privilégio de trabalhar e aprender com ele, culminando em uma efetiva evolução. Sou grato também a minha co-orientadora, Professora Francinalva Dantas de Medeiros, por também fazer parte deste processo de formação.

Agradeço a equipe do Professor Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas pela parceria, contribuindo significativamente para a execução desta pesquisa.

Agradeço a minha equipe de pesquisa, em especial ao Thales Santos, Josivan Júnior e Alison Pontes.

Agradeço ao ex-Presidente Luis Inácio Lula da Silva por dar início a um modelo governamental que proporcionou maior inclusão social e, de certa forma, ampliou os horizontes para os menos favorecidos.

Agradeço à CAPES, órgão que me concedeu a bolsa, por incentivar o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a todos os meus amigos de infância da cidade de Algodão de Jandaíra, assim como aos demais que tive a oportunidade de conhecer e viver momentos de aprendizado.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia e à Universidade Federal de Campina Grande por toda a estrutura ofertada permitindo a execução deste trabalho.

E a todos que se julgam por direito,

O aprendiz é um mestre em formação. (Fernanda Simões Rodrigues)

RESUMO

COSTA, P. C. T. **ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE DERIVADOS FURÂNICOS CONTRA CANDIDA spp.** 2020. 58 f. Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia. Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2020.

O gênero *Candida* representa a principal causa de infecções de origem fúngica. Algumas espécies se destacam como promotoras de doenças em humanos, como a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Para a avaliação da atividade antifúngica foi realizada a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), o ensaio de associação com antifúngicos e verificação o efeito das substâncias teste sobre a micromorfologia de *C. albicans*, o efeito sobre a cinética de crescimento de *C. albicans* e a análise da da biossíntese de ergosterol. As concentrações inibitórias mínimas do ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico, (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila, da anfotericina B e do fluconazol isoladamente contra quatro espécies de *Candida* spp variaram de 64 a 512 µg/mL, 64 a 512 µg/mL, 1 a 2 µg/mL e 32 a 256 µg/mL, respectivamente. O efeito sinérgico do ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico foi observado quando associado à anfotericina B contra *C. albicans* e *C. tropicalis*, já com relação ao (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila, observou-se efeito sinérgico quando associado ao fluconazol contra *C. glabrata*, não houve antagonismo entre as substâncias contra nenhuma das cepas testadas. O ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico e o (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila promoveram alterações morfológicas em *C. albicans*, diminuindo a quantidade de estruturas de resistência e virulência, como a formação de pseudo-hifas, blastoconídeos e claminoconídeos, assegurando o potencial antifúngico destas substâncias. Ainda, foi possível identificar o caráter fungistático e fungicida do ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico e do (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila, respectivamente, através do estudo da cinética de crescimento de *C. albicans*. Finalmente, observou-se que o ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico aumentou a quantidade de ergosterol em *C. albicans* e o (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila inibiu a biossíntese de ergosterol pela levedura. Portanto, este estudo expressa grande utilidade no sentido de detalhar a atividade antifúngica de ambos os compostos.

Palavras-chave: *Candida* spp; Compostos furânicos; Antifúngicos; Terapia combinada; Micromorfologia; Curva de crescimento; Biossíntese de ergosterol.

ABSTRACT

COSTA, P. C. T. ANALYSIS OF THE ANTIFUNGAL ACTIVITY OF FURANIC DERIVATIVES AGAINST CANDIDA spp. 2020. 58 f. Master's Degree – Program of Post-Graduation in Natural Sciences and Biotechnology. Federal University of Campina Grande, Cuité, 2020.

The genus *Candida* represents the main cause of infections of fungal origin. Some species stand out as disease promoters in humans, such as *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*. For an evaluation of the antifungal activity performed with the determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), the association test with antifungals and verification of the effect of the test tests on the micromorphology of *C. albicans*, or the effect on the growth kinetics of *C. albicans* and the analysis of ergosterol biosynthesis. As minimal inhibitions of (E) -3- (furan-2-yl) acrylic acid, (E) -3- (furan-2-yl) propyl acrylate, amphotericin B and fluconazole alone against four species of *Candida* spp varies from 64 to 512 µg / mL, 64 to 512 µg / mL, 1 to 2 µg / mL and 32 to 256 µg / mL, respectively. The synergistic effect of (E) -3- (furan-2-yl) acrylic acid was observed when associated with amphotericin B against *C. albicans* and *C. tropicalis*, in relation to (E) -3- (furan-2-yl) propyl acrylate, synergistic effect when associated with fluconazole against *C. glabrata*, there was no antagonism between the substances against any of the tested strains. Propyl (E) -3- (furan-2-yl) acrylic and propyl (E) -3- (furan-2-yl) acrylic promoted morphological changes in *C. albicans*, decreasing the amount of resistance structures and virulence, such as the formation of pseudo-hyphae, blastoconides and claminconides, guarantee or antifungal potential of these substances. It was also possible to identify the fungicidal and fungicidal character of (E) -3- (furan-2-yl) acrylic acid and propyl (E) -3- (furan-2-yl) acrylate, respectively, during the study of growth kinetics of *C. albicans*. Finally, (E) -3- (furan-2-yl) acrylic acid increased the amount of ergosterol in *C. albicans* and (E) -3- (furan-2-yl) propyl acrylate inhibited the biosynthesis of ergosterol by yeast. Therefore, this study demonstrated great utility in the sense of identifying the antifungal activity of both compounds.

Keywords: *Candida* spp; Furanic compounds; Antifungals; Combination therapy; Micromorphology; Growth curve; Ergosterol biosynthesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química dos compostos sintéticos.....	23
Figura 2 - Efeito do ácido (<i>E</i>)-3-(furan-2-il)acrílico e controles na micromorfologia de <i>C. albicans</i> ATCC 76485 após 4 dias de cultivo.....	31
Figura 3 - Efeito do (<i>E</i>)-3-(furan-2-il)acrilato de propila e controles na micromorfologia de <i>C. albicans</i> ATCC 76485 após 4 dias de cultivo.....	32
Figura 4 - Viabilidade de <i>C. albicans</i> ATCC 76485 quando exposta ao ácido (<i>E</i>)-3-(furan-2-il)acrílico e controles.....	35
Figura 5 - Viabilidade de <i>C. albicans</i> ATCC 76485 quando exposta ao (<i>E</i>)-3-(furan-2-il)acrilato de propila e controles.....	36
Figura 6 - Inibição da contagem em logUFC/mL de <i>Candida albicans</i> em 24h quando exposta a diversas concentrações do ácido (<i>E</i>)-3-(furan-2-il)acrílico, do (<i>E</i>)-3-(furan-2-il)acrilato de propila, da anfotericina B e do fluconazol.....	37
Figura 7 - Curva de calibração utilizando padrão de ergosterol.....	39
Figura 8 - Exemplos de cromatogramas do padrão de ergosterol e do microrganismo quando exposto às substâncias testadas.....	40
Figura 9 - Análise quantitativa do ergosterol em <i>C. albicans</i> após tratamento com diversas concentrações de fluconazol, do ácido (<i>E</i>)-3-(furan-2-il)acrílico, do (<i>E</i>)-3-(furan-2-il)acrilato de propila.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - CIM dos antifúngicos para <i>Candida</i> spp.....	29
Tabela 2 – Conteúdo de ergosterol nas amostras e redução ou aumento em comparação com o controle.....	42
Tabela 3 - Tipo de interação entre as substâncias sintéticas e antifúngicos comerciais para <i>C. albicans</i>	43
Tabela 4 - Tipo de interação entre as substâncias sintéticas e antifúngicos comerciais para <i>C. glabrata</i>	43
Tabela 5 - Tipo de interação entre as substâncias sintéticas e antifúngicos comerciais para <i>C. parapsilosis</i>	43
Tabela 6 – Tipo de interação entre as substâncias sintéticas e antifúngicos comerciais para <i>C. tropicalis</i>	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC – *ATP Binding Cassete*

ATP – *Adenosine triphosphate* – Trifosfato de adenosina

ASD – *Agar sabouraud dextrose*

CFM – Concentração fungicida mínima

CIF – Concentração inibitória fracionada

CIM – Concentração inibitória mínima

CES – Centro de Educação e Saúde

CSD – *Caldo sabouraud dextrose*

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

D1 – Ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico

D2 – (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPP – Dimetilalil pirofosfato

FPP – Farnesil pirofosfato

HMG-CoA – 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA

h – Horas

ICIF – Índice de concentração inibitória fracionada

IPP – Isopentenil pirofosfato

KOH – Hidróxido de potássio alcoólico

Log₁₀ – Logaritmo na base 10

min – Minutos

PCR – *Polymerase chain reaction*

RNA – Ácido ribonucleico

Rpm – Rotações por minuto

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida

TTC – Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UFCG – Universidade Federal de Campina Grande

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Por cento

α - Alfa

β - Beta

\leq - Menor ou igual

\geq - Maior ou igual

\pm - Mais ou menos

mg – miligrama

mL - mililitro

μg - Micrograma

μL – Microlitro

nm – Nanômetro

μm - Micrômetro

R^2 - Coeficiente de determinação

CV% - Coeficiente de variação

$^{\circ}\text{C}$ – Grau Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 Epidemiologia e infecções	17
3.2 Fatores de virulência	18
3.3 Metabolismo e alteração morfológica	19
3.4 Resistência microbiana	19
3.5 Novos alvos terapêuticos	20
3.6 Compostos furânicos	21
3.7 Combinação entre antimicrobianos	21
3.8 Biossíntese do ergosterol	22
4 METODOLOGIA	23
4.1 Local de trabalho	23
4.2 Substâncias sintéticas	23
4.3 Cepas de <i>Candida</i> e condição de crescimento	24
4.4 Preparação do inóculo e agentes antifúngicos	24
4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	24
4.6 Ensaio de Sinergismo – Método <i>Checkerboard</i>	25
4.7 Efeito dos compostos furânicos sobre a micromorfologia de <i>C. albicans</i>	25
4.8 Efeito dos compostos furânicos sobre a cinética de crescimento de <i>C. albicans</i> (<i>time-kill</i>)	26
4.9 Extração, determinação e quantificação do ergosterol	27
4.10 Análise estatística dos dados	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 CIM dos compostos furânicos, anfotericina B e fluconazol sobre <i>Candida</i> spp	29
5.2 Efeitos dos compostos furânicos, anfotericina B e fluconazol sobre a micromorfologia de <i>Candida albicans</i>	30
5.3 Efeito dos compostos furânicos sobre a cinética de crescimento de <i>Candida albicans</i> (<i>time-kill</i>)	35

5.4 Determinação e quantificação do ergosterol em <i>C. albicans</i>.....	38
5.5 Associação dos compostos furânicos com anfotericina B ou fluconazol sobre <i>Candida spp</i>.....	42
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, aproximadamente 2 milhões de mortes foram registradas em todo o mundo devido a infecções fúngicas (DENNING; BROMLEY, 2015). Tais infecções são frequentemente causadas por fungos do gênero *Candida* (GONÇALVES et al., 2016). De acordo com Quindós et al. (2018) e Lewis, Viale e Kontoyiannis (2012), cerca de 95% de todas as infecções invasivas por *Candida* são causadas por cinco espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

As infecções causadas por fungos são consideradas doenças sérias e com risco de vida, particularmente entre os pacientes imunocomprometidos, a exemplo de indivíduos com Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (SIDA), além daqueles que recebem quimioterapia antineoplásica, terapia imunossupressora ou tratamento com antibióticos de amplo espectro. Portanto, à medida que os números desses pacientes crescem gradualmente, a incidência de infecções fúngicas oportunistas tende a aumentar. No entanto, muitos fungos patogênicos também são responsáveis por uma gama de infecções que afetam indivíduos aparentemente saudáveis (PINTO et al., 2013; REVELAS; LIANNOS; ARVANITAKIS, 2013).

O fungo *C. albicans* compõe naturalmente o microbioma humano, e reside como um comensal inofensivo ao longo da vida em indivíduos saudáveis. No entanto, em algumas circunstâncias já supracitadas, este fungo pode causar infecções que variam de infecções superficiais da pele a infecções sistêmicas com risco vital (WILSON, 2018; GAJDÁCS et al., 2019).

Para crescer e prosperar em uma ampla gama de hospedeiros os fungos empregam estratégias comuns e distintas, que não dependem apenas de certos fatores de virulência, mas também da flexibilidade metabólica, justamente porque além de fornecer a plataforma para assimilação e crescimento de nutrientes em diversos nichos de hospedeiros, a adaptação metabólica afeta a suscetibilidade de *Candida* a estresses, que são na maioria das vezes impostos pelo hospedeiro e também fármacos antifúngicos (BROWN et al., 2014; WILSON, 2018).

A resistência antifúngica emergiu como um novo problema global, levantando principalmente questões de saúde pública. Logo, é importante compreendermos que os fungos, inclusive do gênero *Candida*, são capazes de desenvolver diversos mecanismos celulares de resistência aos antifúngicos. Neste sentido, é extremamente importante a busca por novos fármacos que atuam em vias metabólicas do microrganismo, dentre outras estratégias (REVIE et al., 2018).

Devido ao limitado arsenal de agentes antifúngicos alternativos disponíveis em caso de falha dos convencionais, a possibilidade de expansão da resistência antifúngica em *Candida* tem sido motivo de preocupação (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017). Além da resistência, a menor eficácia clínica e os efeitos colaterais agudos e crônicos também são fatores preocupantes (LOCKHART, 2014). Este fato direciona a comunidade científica a realizar pesquisas buscando encontrar novas substâncias e alvos celulares que fundamentem cada vez melhor a prática clínica.

Muitos compostos são sintetizados em laboratório a partir de outros pré-existentes. No caso dos compostos furânicos, os derivados do furfural são particularmente promissores, uma vez que o furfural é um material de partida de baixo custo que ocorre frequentemente na natureza podendo ser obtido de várias fontes de biomassa, como sabugo de milho, casca de arroz e bagaço de cana-de-açúcar (BINDER et al., 2010).

A busca por novos alvos terapêuticos é dificultada pelas estreitas relações evolutivas entre o patógeno e o hospedeiro humano, devido ao número reduzido de alvos únicos que podem ser explorados terapêuticamente (REVIE et al., 2018). No entanto, algumas estratégias surgem como importantes na busca por melhorias no combate a infecções fúngicas, a exemplo da combinação entre antifúngicos (KLIBBER, 2012).

Além disso, saber os mecanismos de atuação das substâncias é extremamente importante para a sua utilização clínica e, de acordo com Prasad, Shah e Rawal (2016), a análise do conteúdo de ergosterol em *C. albicans* como maneira de melhorar o entendimento do modo de ação das substâncias é relevante, uma vez que grande parte dos antifúngicos têm como alvo a biossíntese do ergosterol.

Alguns fatores como o aumento da incidência de infecções fúngicas, novos casos de patógenos resistentes a medicamentos e também a toxicidade de antifúngicos disponíveis, são os principais fomentadores de estudos de novas substâncias com atividade antifúngica. Diante deste contexto, este estudo propôs investigar a eficácia antifúngica de duas substâncias sintéticas derivadas do furfural sobre *Candida* spp.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a atividade antifúngica de compostos furânicos contra *Candida* spp.

2.2 Objetivos específicos

Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de compostos furânicos contra *Candida* spp;

Determinar o efeito da associação do ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico e do (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila com anfotericina B ou com o fluconazol contra *Candida* spp;

Investigar a interferência de compostos furânicos sobre a micromorfologia de *Candida albicans*.

Investigar o efeito de compostos furânicos sobre a cinética de crescimento de *Candida albicans*.

Avaliar a interferência do ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico e do (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila sobre a biossíntese de ergosterol por *Candida albicans*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Epidemiologia e infecções

Nas últimas décadas, ocorreu um aumento substancial na incidência de infecções causadas por fungos do gênero *Candida*, o crescimento acontece de maneira constante ao longo dos anos, podendo variar de 9 a 26 casos a cada 100.000 habitantes (GONÇALVES et al., 2016; CORTÉS et al., 2020). Como espécies causadoras da candidíase, a *Candida albicans* aparece como principal causadora (REVELAS; LIANNOS; ARVANITAKIS, 2020). Outras espécies importantes causadoras são a *C. glabrata*, a *C. parapsilosis*, a *C. tropicalis* e a *C. krusei* (LOCKHART, 2014; QUINDÓS et al., 2018).

Embora a *Candida albicans* seja o agente causador da maioria das candidíases, este cenário vem mudando, e outras espécies emergentes do gênero *Candida*, incluindo *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, passaram a representar graves ameaças às populações de pacientes (AHMAD et al., 2011; CASTRO, 2017; DADAR et al., 2018).

Segundo Lockhart (2014), a proporção de infecções causadas por cada uma das cinco espécies vem sofrendo alteração ao longo dos anos. Na década de 80, *C. albicans* foi isolada na maioria dos casos, causando até 76% de todas as infecções. A distribuição das espécies começou a mudar a partir de 1990, em que a *C. albicans* vem se tornando menos predominante e outras espécies do gênero *Candida*, como *C. glabrata*, aumentando de maneira proporcional. No Brasil, das espécies não *albicans*, *C. parapsilosis* ocorre com mais frequência, contrastando com dados dos países da Europa e América do Norte, em que a *C. glabrata* é a segunda espécie frequentemente mais isolada após *C. albicans*, este fato pode provavelmente ser atribuído à profilaxia com fluconazol, devido seu potencial em conferir resistência em *C. glabrata* (DA MATTA; SOUZA; COLOMBO, 2017). Na Ásia, um estudo epidemiológico demonstrou padrões semelhantes aos da Europa e América do Norte, em que *C. glabrata* é a que mais ocorre das espécies não *albicans*, seguido por *C. parapsilosis* em menor proporção (DING et al., 2015).

O impacto causado na saúde pública pode ser mitigado, principalmente em termos econômicos e de saúde, através de medidas de prevenção e modificação dos fatores de risco (CHEEN, 2020).

Pacientes com neutropenia, queimaduras, infecção pelo HIV e pancreatite são mais vulneráveis às infecções de origem fúngica. Neste sentido, tende a ocorrer um aumento proporcional na prevalência de indivíduos suscetíveis e infecções fúngicas. As espécies de *Candida* são capazes de ocasionar desde doenças mucocutâneas superficiais até outras

doenças mais complexas como candidíase hepatoesplênica e candidemia, podendo envolver qualquer estrutura anatômica (REVELAS; LIANNOS; ARVANITAKIS, 2020).

3.2 Fatores de virulência

O fungo polimórfico *C. albicans* é componente natural do microbioma humano. Em um número superavitário da população, *C. albicans* reside como um comensal inofensivo ao longo da vida (WILSON et al., 2018; ROMO; KUMAMOTO, 2020). No entanto, em algumas circunstâncias, este fungo pode causar infecções que variam de acordo com o grau de patogenicidade, podendo causar desde infecções superficiais da pele até infecções sistêmicas colocando a vida em risco. Os fatores de virulência são vários, e estão associados ao potencial patogênico deste microrganismo (MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

O potencial patogênico deste fungo é representado por vários fatores de virulência, como as moléculas que medeiam a adesão e invasão de células hospedeiras, a secreção de hidrolases, a transição de levedura à hifa, detecção de contato, comutação fenotípica e formação de biofilme (MAYER; WILSON; HUBE, 2013). Ademais, a comutação fenotípica ocorre simultaneamente às alterações na expressão do antígeno e morfologia das colônias, esta troca fornece flexibilidade às células, aumentando a capacidade de adaptação dos microrganismos a condições hostis mediadas tanto pelo hospedeiro como pelos fármacos (CALDERONE; FONZI, 2001).

O metabolismo, não por acaso, considerando que a transição morfológica também o caracteriza, é um dos fatores mais importantes para a sobrevivência dos microrganismos. Algumas vias metabólicas são comuns para a maioria dos microrganismos, a glicólise é a principal delas, mas também existem, dentre outras vias, a via de biossíntese de ergosterol, via das pentoses-fosfato, o ciclo do ácido tricarboxílico, biossíntese de aminoácidos e biossíntese de componentes da parede celular (HAN; CANNON; VILLAS-BÔAS, 2011; GOW; LATGE; MUNRO, 2017).

Além de várias atividades comuns para o crescimento fúngico, diferentes estratégias podem ser empregadas e, apesar da resposta do hospedeiro, podem ocasionar a doença. Dois processos são necessários para que ocorra patogênese, a sobrevivência e crescimento do microrganismo infectante e o dano ao hospedeiro, caracterizando os sintomas (BRUNKE et al., 2016).

A capacidade que os microrganismos, a exemplo de *C. albicans*, tem para infectar tais nichos hospedeiros diversos é suportada por uma extensa gama de fatores de virulência e outros atributos que refletem aptidão. Pode-se citar como fatores de virulência a transição

morfológica entre as formas de levedura e hifa, a expressão de adesinas e invasinas na superfície celular, a troca fenotípica, a formação de biofilmes e a secreção de enzimas hidrolíticas (WILSON et al., 2018). Somando-se aos atributos de aptidão, que incluem flexibilidade metabólica, rápida adaptação a flutuações no pH ambiental, mecanismos robustos de resposta ao estresse e complexos e eficientes sistemas de aquisição de nutrientes (BROWN et al., 2014; ROMO; KUMAMOTO, 2020). Dentre os fatores de virulência supracitados, alguns merecem destaque, como a transição morfológica, formação de biofilme e adaptação metabólica.

3.3 Metabolismo e alteração morfológica

Existem diversas vias metabólicas nos microrganismos com algumas especificidades. Em síntese, as vias do metabolismo do carbono central (definido como a transformação enzimática de carbono através de vias metabólicas) nos micro-organismos são a glicólise, via das pentoses fosfato, do ácido tricarboxílico, ciclo do glioxilato e biossíntese de aminoácidos, dentre outras. Temos também a via de biossíntese do ergosterol, que é apontada como uma das principais vias-alvo de agentes antimicrobianos, daí surge o interesse pelas vias metabólicas em geral, neste trabalho. Sendo assim, é extremamente importante o conhecimento das vias metabólicas que ocorrem nos microrganismos, principalmente patogênicos, para o desenvolvimento de tratamentos antifúngicos eficazes (ASKEW et al., 2009; RHEE et al., 2011; LEWIS; VIALE; KONTOYIANNIS, 2012).

No que se refere a transição morfológica, ao infectar os hospedeiros alguns patógenos ambientais podem perceber condições favoráveis e iniciar programas de virulência definidos. Alguns fatores como modificação da temperatura corporal e outros sinais relacionados ao hospedeiro podem induzir alterações morfológicas modificando o perfil de expressão gênica de patógenos fúngicos comensais, a exemplo da *Candida* (BOYCE; ANDRIANOPOULOS, 2015; BRUNKE et al., 2016). Acredita-se que os fatores citados anteriormente contribuam conferindo mais adaptabilidade ao patógeno para uma subsequente condição hostil no hospedeiro (BRUNKE; HUBE, 2014). No entanto, é importante ressaltar que as ambas as formas morfológicas são importantes no processo patogênico, desenvolvendo funções distintas em estágios diferentes da doença, desde o dano até a evasão imune e resposta do hospedeiro (JACOBSEN et al., 2012).

3.4 Resistência microbiana

A resistência aos antifúngicos emergiu como um novo problema global, levantando principalmente questões de saúde pública. Desta maneira, é importante compreendermos que os fungos, inclusive do gênero *Candida*, são capazes de desenvolver diversos mecanismos celulares de resistência aos antifúngicos (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

A maioria das cepas desenvolvem resistência por meio de uma seleção gradual de um conjunto de mecanismos de resistência à fármacos. Alguns fatores são apontados como potenciais causadores de resistência antifúngica, como o tratamento a longo prazo em pacientes, a maioria dos agentes terapêuticos serem fungistáticos e não fungicidas, a superexpressão ou mutação das enzimas alvo dos fármacos e a ativação transcricional dos genes que codificam as bombas de efluxo de fármacos da *ATP Binding Cassette* (ABC). Esse último, juntamente com as barreiras de permeabilidade atribuídas ao biofilme, reduzem as concentrações celulares das drogas. Neste sentido, é extremamente importante a busca por novos alvos, como a biossíntese de aminoácidos e outros compostos, dentre outras estratégias (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017; REVIE et al., 2018).

A possibilidade de aumento da resistência aos antifúngicos tem sido motivo de preocupação. As poucas classes de medicamentos antifúngicos disponíveis dificultam o tratamento do paciente, uma vez que a resistência ocorre tanto a classes únicas como a múltiplos fármacos (SRINIVAZAN; LOPEZ-RIBOT; RAMASUBRAMANIAN, 2014).

Apesar da crescente conscientização e da melhoria das estratégias de tratamento, o desenvolvimento frequente de resistência aos antifúngicos usados em ambientes clínicos contribui de maneira significativa para o aumento do número de infecções. Mesmo sendo um fenômeno natural, a resistência a fármacos antifúngicos pode comprometer dentre outros fatores, os avanços no desenvolvimento de técnicas efetivas de diagnóstico e novos antifúngicos (SRINIVAZAN; LOPEZ-RIBOT; RAMASUBRAMANIAN, 2014).

3.5 Novos alvos terapêuticos

Os antimicrobianos têm como principais mecanismos farmacodinâmicos a interferência no metabolismo celular, inibição da biossíntese de ergosterol e inibição da biossíntese protéica (COSTA; JÚNIOR, 2017). Atualmente, muitos estudos estão voltados para a produção de novos fármacos e alternativas de tratamento, impulsionando o surgimento de novos alvos antimicrobianos emergentes, a exemplo da rifampicina, que ocasiona a inibição da síntese de RNA à medida que induz uma alteração conformacional na subunidade

β da RNA polimerase causando uma diminuição na afinidade de ligação; Além da isoniazida, da capreomicina, da etionamida e, ainda, da bedaquilina, que representa um importante inibidor da síntese de ATP mitocondrial. (HOAGLAND et al., 2016).

Em meio a emergente resistência aos antibióticos que produz uma incompatibilidade entre a incidência de resistência microbiana e o desenvolvimento de novos antifúngicos, a busca por novos alvos terapêuticos vem sendo objeto de estudo pelos pesquisadores, e a terapia combinada aparece como um modelo de tratamento que vem ganhando forma e solidez ao surgirem evidências científicas de sua importância num contexto de combate às infecções (CAMPITELLI et al., 2017).

De maneira tradicional, os fármacos antimicrobianos são desenvolvidos para inibir o crescimento ou matar um microrganismo por meio de interferências nos seus processos biológicos essenciais. Atualmente se discute uma abordagem mais específica, onde a virulência surge como alvo e representa um novo alvo para desenvolvimento de medicamentos antifúngicos. Neste sentido, a transição de levedura para hifa, por contribuir para a patogênese de *C. albicans*, parece constituir um alvo para a síntese de novos fármacos antifúngicos (JACOBSEN et al., 2012; VILLA et al., 2020).

3.6 Compostos furânicos

Os derivados furânicos, de maneira crescente, são moléculas de interesse da comunidade científica (DANG et al., 2017). Eles podem ser encontrados na natureza ou produzidos industrialmente. Na natureza, o mais abundante é o furfural, sendo este e o hidroximetilfurfural presentes em alimentos ricos em açúcar ou dessecados, a exemplo do mel e frutas secas. Na indústria, estes compostos são produzidos em larga escala para diversas aplicações, dentre elas a fabricação de produtos farmacêuticos (NTX, 2010).

Estes compostos possuem anéis aromáticos de cinco membros contendo oxigênio e podem ser bioativados por epoxidação, fato que caracteriza a sua toxicidade. Em relação aos medicamentos, aproximadamente 23% sofrem epoxidação e, portanto, são mais tóxicos (WIERCKX et al., 2011; DANG et al., 2017).

A toxicidade de alguns derivados furânicos pode ter como alvos os microrganismos. No entanto, podem ser desenvolvidas estratégias de defesa, a exemplo da oxidação e/ou redução das formas furânicas. Neste sentido é importante a investigação do seu potencial benéfico no tratamento de doenças causadas por microrganismos (MICHAIL et al., 2007).

3.7 Combinação entre antimicrobianos

Em pacientes de alto risco ou com isolados resistentes que não tenham respondido bem às estratégias padrão, a terapia antifúngica é uma ferramenta terapêutica que pode ser utilizada. Esta tem como objetivo principal melhorar a resposta e reduzir a mortalidade. Sendo a consequência de uma interação positiva entre os agentes (sinergia), ainda, a adição de outro agente pode permitir uma redução da dose em outro, podendo gerar um resultado clinicamente interessante, dada a toxicidade de alguns agentes antifúngicos, particularmente anfotericina B (JOHNSON; PERFECT, 2007; DOERN, 2014). Segundo Campitelli et al. (2017), a inexistência de um consenso em muitos cenários clínicos torna mais evidente a importância da realização de mais estudos que envolvam terapias antifúngicas combinadas.

3.8 Biossíntese de ergosterol

Diversos lipídeos compõem a membrana celular fúngica, sendo os glicerofosfolipídeos, esfingolipídeos e esteróis, como o ergosterol. Este é responsável por manter o crescimento normal, a viabilidade, a integridade e a função celular dos fungos. O fato do ergosterol estar ausente nos animais o torna um alvo útil para os antifúngicos, caracterizando a importância de buscar novos fármacos que atuem sobre a via biossintética deste componente celular (WEI et al., 2020).

Diversos medicamentos antifúngicos de uso clínico atuam inibindo as principais enzimas que envolvem biossíntese de ergosterol, outros se ligam firmemente ao ergosterol (PRASAD; SHAH; RAWAL, 2016). Os azóis, como o fluconazol, inibem a enzima responsável pela desmetilação do lanosterol, acarretando no acúmulo concomitante de intermediários anteriores da via. Já os polienos, a exemplo da anfotericina B, ligam-se ao ergosterol e causam a formação de poros que causam vazamento de íons e macromoléculas, contribuindo para a morte celular (MUTOSA; MANGOYI; MUKANGANYAMA, 2015; LIU et al., 2019).

A via de biossíntese do ergosterol ocorre em quase todas as leveduras, embora a maiorias das pesquisas sejam concentradas em *S. cerevisiae* e *C. albicans*. É uma via complexa que envolve quase 30 enzimas e pode ser dividida em três etapas: biossíntese de mevalonato, biossíntese de farnesil pirofosfato e biossíntese de ergosterol (HU et al., 2017).

A condensação de duas moléculas de acetil-CoA em acetoacetil-CoA catalisada pela acetil-CoA acetiltransferase dá início a via biossintética do ergosterol. Após isso, a condensação de um terceiro acetil-CoA pela hidroximetilglutaril-CoA sintase forma o 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA), que ainda é mais reduzido pelas enzimas redutoras de HMG-CoA à ácido mevalônico. Na segunda etapa, o mevalonato é fosforilado pela

mevalonato cinase, existindo também uma fosforilação adicional pela fosfomevalonato cinase, gerando mevalonato-5-pirofosfato. Em seguida, isopentenil pirofosfato (IPP) através da descarboxilação por mevalonato de pirofosfato descarboxilase. Posteriormente, a IPP isomerase catalisa IPP em dimetilalil pirofosfato (DPP) e farnesil pirofosfato (FPP). Na última etapa, a esqualeno sintase catalisa duas moléculas de FPP, formando o esqualeno, que é o precursor de todos os esteróis. O esqualeno é então epoxidado pela esqualeno epoxidase produzindo epóxido de esqualeno, que é convertido em lanosterol pela lanosterol sintase. A conversão de lanosterol em zimosterol envolve várias reações de desmetilação, redução e dessaturação. Em seguida, a esterol C-24 metiltransferase transforma zimosterol e fecosterol, e as esterol C-8 isomerase converte fecosterol em episterol. Por fim, o episterol é ainda mais dessaturado, ocorrendo a formação do ergosterol (LIU et al., 2019; KLUG; DAUM, 2014).

Neste sentido, o presente estudo julgou importante a investigação dos efeitos das substâncias teste sobre o conteúdo de ergosterol em *C. albicans*.

4 METODOLOGIA

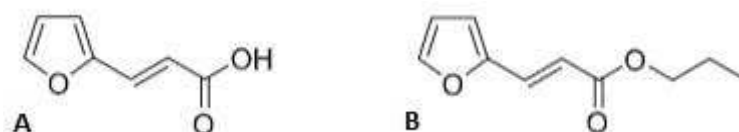
4.1 Local de trabalho

Os ensaios laboratoriais referentes à pesquisa de atividade antifúngica foram realizados no laboratório de bioquímica e no laboratório do Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia, ambos localizados no Centro de Educação e Saúde (CES), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

4.2 Compostos furânicos

Os compostos furânicos foram sintetizadas no Laboratório de Síntese Orgânica e Química Medicinal pela equipe supervisionada pelo Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas, sendo elas o ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico (derivado 1) e o (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila (derivado 2).

Figura 1 - Estrutura química dos compostos sintéticos



Legenda: A: ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico; B: (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila.

Fonte: Próprio autor.

4.3 Cepas de *Candida* e condição de crescimento

As cepas testadas foram *C. albicans* ATCC 76485, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC 90030 e *C. tropicalis* ATCC 13803. Após o cultivo, os microrganismos foram mantidos em *agar sabouraud dextrose* sob refrigeração (4 °C) durante o período de realização dos experimentos, este processo ocorrera mensalmente para manutenção da viabilidade das células.

4.4 Preparação do inóculo e agentes antifúngicos

O inóculo de cada uma das cepas testadas foi preparado adicionando algumas colônias do microrganismo em solução salina (NaCl 0,9%) até formar uma suspensão com aproximadamente $1-5 \times 10^5$ UFC/mL, ajustado de acordo com o tubo 0,5 da escala de *McFarland*.

O meio de cultura utilizado nos ensaios para avaliação da atividade antifúngica foi o *caldo sabouraud dextrose*, preparado de acordo com as instruções do fabricante.

As soluções com os derivados furânicos e agentes antifúngicos foram preparadas no momento de execução dos testes, dissolvendo-as inicialmente em dimetilsulfóxido (DMSO) e depois tendo o seu volume final completado com água destilada estéril. Foram realizados controles com DMSO.

4.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As concentrações inibitórias mínimas dos compostos furânicos, anfotericina B e fluconazol contra *Candida* spp. foram determinadas de acordo com o método de microdiluição utilizando placas de microtitulação de 96 poços (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016; CLSI, 2008).

Em uma placa com 96 cavidades, os compostos furânicos e os agentes antifúngicos foram testados nas concentrações de 512 a 1 µg/mL, em diluições seriadas 1:2. As placas com *Candida* spp, meio de cultura e agentes antifúngicos foram incubadas a 35 °C por 24-48 horas. Após esse período se observou o crescimento fúngico.

A CIM foi a menor concentração das substâncias capaz de inibir o crescimento do microrganismo. Os testes foram realizados em duplicata.

Após o período de incubação, a fim de confirmar a presença de microrganismos viáveis, foram colocados em cada cavidade 20 µL de corante TTC (cloreto de 2,3,5-trifenil

tetrazólio), um aceptor de elétrons (DIAS et al., 2018; KUMAR; TARAFDAR, 2003). A mudança de coloração do meio, deixando-o avermelhado, indica atividade das enzimas desidrogenases, que estão envolvidas no processo de respiração celular, elas atuam reduzindo o TTC a trifenil formazano, um composto de coloração avermelhada (KUMAR; TARAFDAR, 2003). Logo, este método distingue amostras viáveis de amostras não viáveis (DESWAL; CHAND, 1997).

4.6 Ensaio de sinergismo - método *Checkerboard*

As associações do ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico ou do (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila com a anfotericina B e fluconazol contra os microrganismos foram determinadas através do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) usando o método de microdiluição *Checkerboard* de acordo com a CIM (CUENCA-ESTRELA, 2004).

A concentração de cada substância com potencial antifúngico na combinação variou entre CIM/8 e CIMx8, sendo diluídas na razão de 1:2. Inicialmente, 100 µL do meio de cultura foram adicionadas nas cavidades das placas de microdiluição. Posteriormente, 50 µL de cada substância testada em diversas concentrações (CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIMx2, CIMx4 e CIMx8) foram inseridos no sentido vertical (anfotericina B ou fluconazol) e horizontal (ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico ou (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato) de propila das microplacas. Desta maneira, as diversas concentrações do derivado 1 ou derivado 2 foram testadas na presença de diferentes concentrações dos agentes antifúngicos. (LEWIS et al., 2002; CORREA-ROYERO et al., 2010).

O ICIF foi calculado através da soma do CIF A + CIF B, em que A representa o ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico ou o (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila e B a anfotericina ou fluconazol. O CIF A, por sua vez, foi calculado através da relação CIM A combinado/ CIM A sozinho, enquanto que o CIF B expressa a mesma relação entre CIM B combinado e CIM B sozinho (CORREA-ROYERO et al., 2010; VITALE; AFELTRA; DANNAOUI, 2005). Dois compostos são considerados sinérgicos se o ICIF for $\leq 0,5$, existe aditividade quando o ICIF for $>0,5$ e $\leq 1,0$, diz-se que há indiferença quando o ICIF estiver entre 1,0 e 4,0 e quando o ICIF for $>4,0$ ocorre antagonismo entre as substâncias testadas (DOERN, 2014; LEWIS et al., 2002; CORREA-ROYERO et al., 2010; GUO et al., 2010).

4.7 Efeito dos compostos furânicos sobre a micromorfologia de *C. albicans*

Para a análise de uma possível interferência dos compostos testados na transição morfológica de *C. albicans*, utilizou-se a técnica de microcultivo em lâmina em uma câmara

úmida (metodologia proposta por Dalmau). O meio de cultura ágar fubá acrescido de *tween* 80 a 1% fracionado em tubos estéreis contendo os compostos testados em concentrações correspondentes a CIM. Posteriormente à homogeneização, cada meio de cultura foi colocado sobre uma lâmina de vidro. Logo após a solidificação do meio, o microrganismo foi semeado no *ágar*, formando duas estrias paralelas, em seguida uma lamínula foi inserida para cobrir o microcultivo e as placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 48-72 horas, após isso as placas de Petri foram incubadas a 25 ± 2 °C por mais 48-72 horas. As lâminas foram analisadas diariamente durante 5 dias por microscopia óptica utilizando microscópio, em um aumento de 400x, para a observação da ausência ou presença de estruturas características (WALSH; HAYDEN; LARONE, 2018; SIDRIM; ROCHA, 2004).

4.8 Efeito dos compostos furânicos sobre a cinética de crescimento de *C. albicans* (time-kill).

O estudo da interferência dos compostos furânicos sobre a curva de crescimento de *C. albicans* ATCC 76485 foi realizado utilizando a metodologia de Klepser et al., (1998) com algumas adaptações. Neste ensaio, foram testadas as concentrações inibitórias mínimas do ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico (D1) e do o (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila (D2), além da anfotericina B (Anf) e fluconazol (flu), em seguida foi observado o comportamento do crescimento de *C. albicans*.

Inicialmente, em uma proporção de 1:10 foi inoculado uma suspensão da levedura em CSD contendo os compostos D1 e D2 em diferentes concentrações (CIM e CIMx2). Os controles realizados com anfotericina B e fluconazol também foram realizados nas concentrações descritas acima, além de controles de viabilidade fúngica e esterilidade do meio.

Nos intervalos 0 h, 4 h, 8 h e 24 h posteriores à incubação, uma alíquota de 10 µL da solução foi semeada de maneira uniforme em placas de ASD. As placas inoculadas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24-48 h. Em seguida foi realizada a contagem de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) presentes nas placas de Petri e determinada a quantidade por UFC/mL de solução em cada período para cada substância e suas concentrações. O experimento foi realizado em triplicata.

A construção das curvas de crescimento se deu através da plotagem da contagem média de colônias (\log_{10} UFC/mL) em função do tempo (horas). O composto teste é considerado fungicida quando a redução no crescimento é maior ou igual a 3 Log_{10} (>99,9%)

UFC/mL comparado com o inóculo inicial, e atividade fungistática ocorre quando a redução do crescimento fúngico é menor que $3 \log_{10}$ (<99,9%) UFC/mL (KLEPSEK et al., 1998).

4.9 Extração, determinação e quantificação do ergosterol.

O ergosterol das células fúngicas foi extraído conforme relatado por Arthington-skaggs, Warnock e Morrison (2000), com algumas modificações. Sucintamente, o microrganismo foi inoculado em tubos contendo CSD, com adição das respectivas moléculas testadas em diferentes concentrações (CIMx2, CIM e CIM/2). As culturas foram incubadas a 35 °C durante 24 horas. Após este período, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos e em seguida o peso úmido dos sedimentos foi determinado. Posteriormente, 3 mL de uma solução de hidróxido de potássio alcoólico a 25% (25 g de KOH e 36 mL de água destilada estéril levados a 100 mL com etanol a 100%). As suspensões foram então incubadas em banho-maria a 80 °C por 1 hora. Após isso, houve adição de uma mistura de 1 mL de água e 3 mL de heptano, seguido por uma mistura vigorosa no vórtex durante 5 minutos. Finalmente, a camada heptânica foi filtrada e transferida para *vials* devidamente identificados, para posterior quantificação do ergosterol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

A quantificação do ergosterol foi realizada em equipamento de CLAE (*Shimadzu*) com detector de UV com arranjo de diodos, com varredura na região do UV-visível, monitorando o comprimento de onda de 282 nm. As análises foram realizadas no modo isocrático, com metanol como fase móvel com fluxo de 1,4 mL/min. Como fase estacionária foi utilizada coluna analítica C18 Shim-pack CLC-ODS (250 x 4,6 mm DI), com tamanho da partícula de 5 µm, sob uma temperatura de 30 °C.

A análise cromatográfica foi desenvolvida e validada, utilizado o método de adição de padrão, por meio dos parâmetros especificidade, linearidade, precisão e exatidão, por meio análises em triplicata inter e intradia, para isso foi utilizado ergosterol (Sigma Chemical) como padrão analítico (CABRAL; FIGUEROA; FARIÑA, 2013). A linearidade foi avaliada de faixa de 0,63 a 10 µg/mL.

4.10 Análise estatística dos dados

Os dados obtidos nos ensaios de CIM, estudo de associação e ensaio de micromorfologia foram analisados através de estatística descritiva. A curva de cinética de crescimento foi plotada pelo \log_{10} UFC/mL em função do tempo (horas) e das concentrações

dos compostos testados e para a análise estatística foi utilizado um software. Os dados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CIM dos compostos furânicos, anfotericina B e fluconazol sobre *Candida* spp

As atividades antifúngicas do ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico, (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila, anfotericina B e fluconazol foram investigadas (tabela 1). Analisando a tabela 1 foi possível verificar que houve divergência no crescimento das cepas de *Candida* de acordo com os compostos antifúngicos e suas diferentes concentrações.

Tabela 1 - CIM dos antifúngicos para *Candida* spp

ANTIFÚNGICOS	<i>C. albicans</i> ATCC 76485	<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803
D1	64 µg/mL	256 µg/mL	512 µg/mL	256 µg/mL
D2	256 µg/mL	512 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL
Anfotericina B	1 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	1 µg/mL
Fluconazol	256 µg/mL	256 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL

Legenda: D1: ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico; D2: (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila.

Fonte: Próprio autor.

As CIMs do derivado 1 e derivado 2 contra *Candida* spp variaram de 64 a 512 µg/mL. Constatou-se que *C. albicans* e *C. glabrata* foram mais suscetíveis ao primeiro antifúngico sintético e o segundo foi mais eficaz contra *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. As CIMs da anfotericina B foram inferiores às das substâncias sintéticas contra todas as cepas testadas, variando entre 1 e 2 µg/mL. O fluconazol, por sua vez, em comparação com o ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico, apresentou menor CIM para *C. parapsilosis*, CIM igual para *C. glabrata* e maior CIM para *C. albicans*, e em relação ao (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila os valores de CIM foram iguais contra *C. albicans* e menores frente às outras cepas testadas, havendo variação de 32 a 256 µg/mL. A confirmação da CIM ocorreu a partir da mudança de coloração do meio após a adição de TTC, demonstrando viabilidade dos microrganismos.

A determinação da CIM é de extrema importância, pois permite a identificação da quantidade de agente antimicrobiano adequada a administrar aos pacientes, de acordo com a sua infecção. Uma CIM baixa representa maior potência e menor probabilidade de o microrganismo desenvolver resistência, ao contrário, a CIM elevada acarreta em maior risco de resistência aos fármacos. (ANDREWS, 2001).

Muitos pesquisadores investigam a atividade antifúngica de substâncias contra *Candida* spp, Gabriel et al. (2020) por exemplo, avaliaram a capacidade de inibição de três derivados de imidazol e observaram uma potente atividade desses compostos sobre espécies

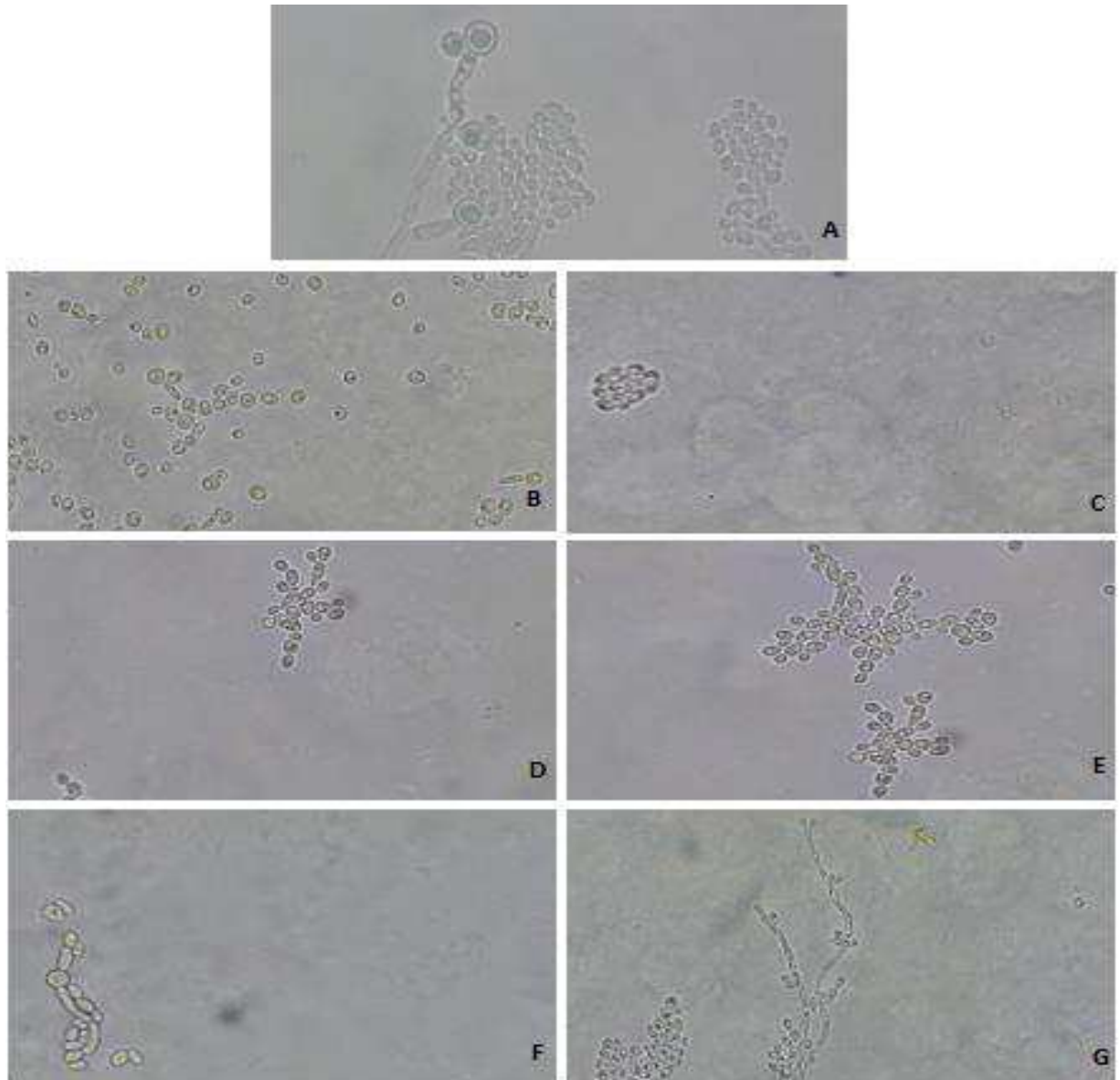
de *Candida*. Xie, Liu e Zhou (2020) avaliaram os efeitos *in vitro* do alcaloide bioativo natural berberina contra *Candida* spp, eles observaram valores de CIM no geral menores do que os valores deste estudo para D1 e D2. Zhou et al. (2017) identificaram efeito antifúngico do magnolol contra várias espécies de *Candida*, com concentrações inibitórias mínimas variando de 10 a 40 µg/mL.

5.2 Efeitos dos compostos furânicos, anfotericina B e fluconazol sobre a micromorfologia de *Candida albicans*

Quando foi feito o microcultivo em lâmina de *C. albicans* ATCC 76485 na presença e ausência de D1 e D2, da anfotericina B e do fluconazol (figuras 2 e 3) no intuito de verificar a inibição da expressão de fatores de virulência, observou-se que os compostos testes demonstraram eficácia em reduzir o desenvolvimento de estruturas de virulência como pseudo-hifas, blastoconídeos e clamidoconídeos quando comparado com o controle com o microrganismo cultivado na ausência de qualquer composto teste. Quando o microrganismo é cultivado em agar fubá na ausência de qualquer fármaco podem ser observadas pseudo-hifas com blastoconídeos, com clamidoconídeo terminal com parede espessa. A anfotericina B e o fluconazol aparentemente foram mais eficazes que os fármacos testes na inibição da formação de estruturas de virulência.

Quando a concentração dos comportos furânicos e controles foi a CIM/2 houve diminuição da capacidade de inibição da formação das estruturas. No caso dos controles, a formação de blastoconídeos em cachos ocorreu em maior escala, no entanto não houve formação de pseudo-hifas, fato que ocorreu no caso dos fármacos testados.

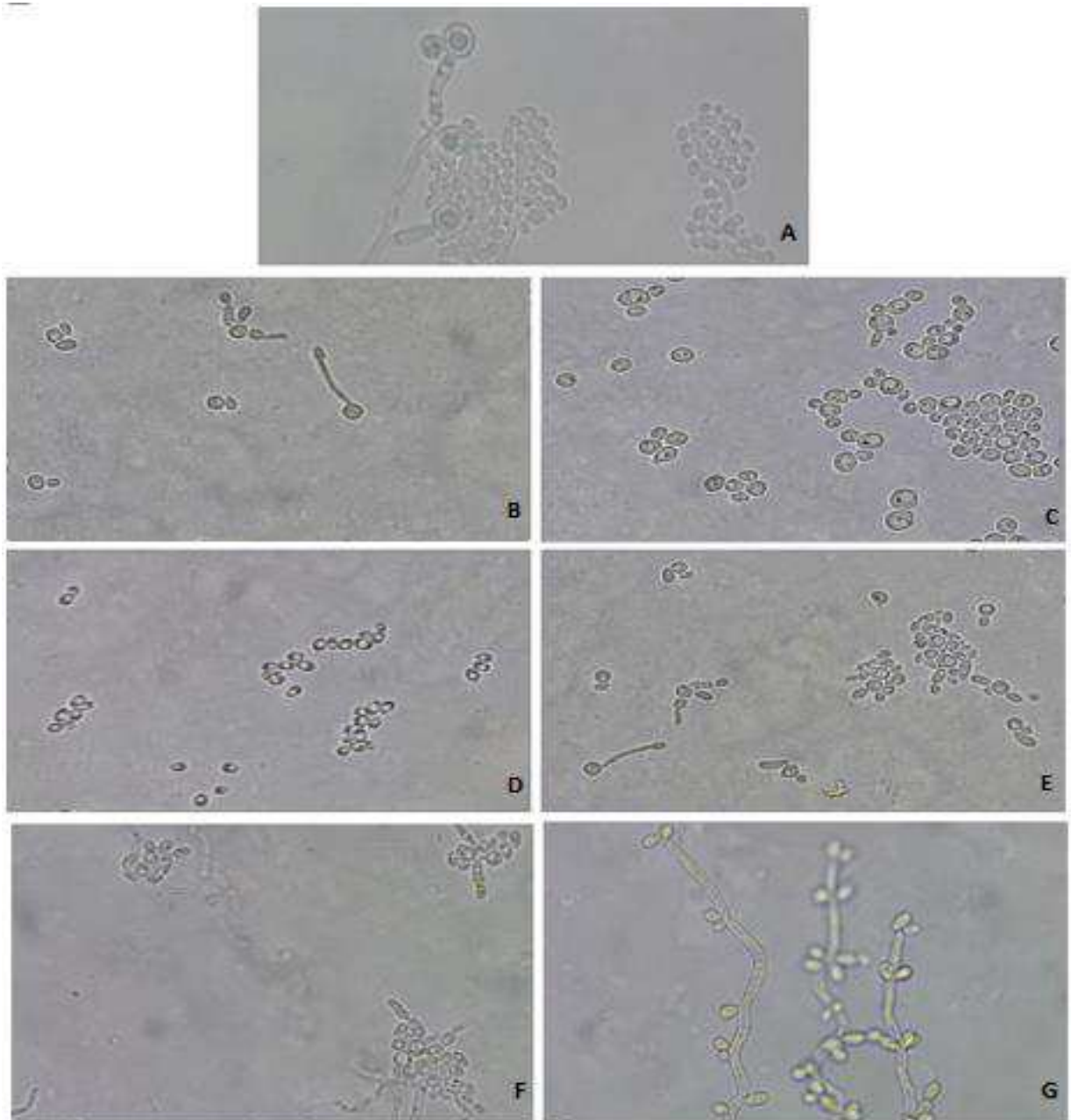
Figura 2 - Efeito do ácido (E)-3-(furan-2-il)acrílico e controles na micromorfologia de *C. albicans* ATCC 76485 após 4 dias de cultivo



Legenda: A: Micromorfologia do microrganismo sem a substância teste; B: micromorfologia do microrganismo quando exposto à anfotericina B na sua CIM; C: micromorfologia do microrganismo quando exposto à anfotericina B na sua CIM/2; D: micromorfologia do microrganismo quando exposto ao fluconazol na sua CIM; E: micromorfologia do microrganismo quando exposto ao fluconazol na sua CIM/2; F: micromorfologia do microrganismo quando exposto ao ácido (E)-3-(furan-2-il)acrílico na sua CIM; G: micromorfologia do microrganismo quando exposto ao ácido (E)-3-(furan-2-il)acrílico de propila na sua CIM/2.

Fonte: Próprio autor.

Figura 3 - Efeito do (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila e controles na micromorfologia de *C. albicans* ATCC 76485 após 4 dias de cultivo



Legenda: A: Micromorfologia do microrganismo sem a substância teste; B: micromorfologia do microrganismo quando exposto à anfotericina B na sua CIM; C: micromorfologia do microrganismo quando exposto à anfotericina B na sua CIM/2; D: micromorfologia do microrganismo quando exposto ao fluconazol na sua CIM; E: micromorfologia do microrganismo quando exposto ao fluconazol na sua CIM/2; F: micromorfologia do microrganismo quando exposto ao (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila na sua CIM; G: micromorfologia do microrganismo quando exposto ao (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila na sua CIM/2.

Fonte: Próprio autor.

C. albicans é um fungo polimórfico que pode crescer como leveduras ou hifas. As células de levedura podem favorecer a disseminação, e a formação de hifas e pseudo-hifas está associada à adesão, invasão, dano, aquisição de ferro e escape de fagócitos e da corrente sanguínea (VILA et al., 2017), e essas funções distintas tornam ambas as formas morfológicas importantes para a virulência (JACOBSEN et al, 2012). Diante disto, o estudo sobre as alterações morfológicas promovidas pelos compostos teste contribui para detalhar a atividade antifúngica do ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico e do (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila.

Existem compostos que conseguem inibir a transição de levedura à hifa, este processo ocorre através da inibição dos mecanismos de transdução de sinais que envolvem a formação da hifa (JACOBSEN et al, 2012), visto que a modificação morfológica é especificamente desencadeada por múltiplos sinais e é controlada por vias complexas de sinalização que permitem a integração do programa de desenvolvimento modificado na célula (RIQUELME et al, 2018).

Morfologicamente, as hifas formam redes filamentosas que se estendem em suas pontas enquanto se ramificam em regiões subapicais. O alongamento rápido da ponta necessita da inserção massiva da membrana e a extensão da parede celular contendo quitina rígida. Este processo depende da ação coordenada dos citoesqueletos de microtúbulos e actina e dos motores correspondentes e proteínas associadas, o que proporciona um fluxo contínuo de vesículas secretoras. Logo, o alongamento da hifa implica a adição contínua de nova membrana plasmática, proteínas e material da parede celular na extremidade apical da hifa (RIQUELME et al., 2018). Nesse sentido, a literatura apresenta várias substâncias capazes de inibir a dinâmica da actina, incluindo a latrunculina e a citocalasina A (RIQUELME; FISCHER; BARTNICKI-GARCIA, 2003).

Segundo Kadosh (2019), existe uma forte associação entre a morfologia e virulência de *C. albicans* e, apesar de muito pouco se saber sobre o controle translacional da transição morfológica nesta levedura, há uma associação da região não traduzida (UTR) 5' ao controle de transição morfológica e a diversos genes relacionados à virulência, o que fundamenta essa relação entre transição morfológica e patogenicidade.

Os compostos sintéticos promoveram um efeito inibidor do desenvolvimento de estruturas de virulência como pseudo-hifas, blastoconídeos e clamidoconídeos quando comparado com o controle com o microrganismo cultivado na ausência de qualquer substância teste. Essas estruturas estão relacionadas a reprodução e virulência dos microrganismos e, por isso, têm sido alvo de estudos que visam desenvolver medicamentos

antifúngicos, visto que além das proteases aspárticas secretadas, fosfolipases e calcineurina, a transição morfológica também representa um alvo terapêutico para o desenvolvimento de novos antifúngicos, sobretudo pela probabilidade diminuída de causar resistência (CALUGI; TRABOCCHI; GUARNA, 2011; GAUWERKY; BORELLI; KORTING, 2009).

Um fator importante a levar em consideração ao desenvolver um antifúngico é diminuir a probabilidade de resistência a esse medicamento, e uma das maneiras mais discutidas nos últimos anos é ter como alvo a virulência dos microrganismos, uma vez que a não atuação sobre os processos biológicos essenciais torna mais difícil a adaptação por parte do microrganismo através da diminuição da pressão seletiva (JIANG; BUSSEY; ROEMER, 2002).

Diversas substâncias têm seu efeito inibidor da transição morfológica documentado pelos pesquisadores, essas compõem diferentes classes e podem atuar através de mecanismos de ação também divergentes. Ainda, estão de acordo com a tendência atual no desenvolvimento de medicamentos antifúngicos, ou seja, contribuem para atenuar problemas de resistência e fornecer opções alternativas de tratamento (SHARECK; BELHUMEUR, 2011).

Dentre as diversas substâncias que têm a capacidade de inibir a transição morfológica, assim como os compostos testados neste trabalho, podemos citar algumas substâncias derivadas da piperazina, que reduziram a formação de hifas em células de *C. albicans* em mais de 50% (ZHAO et al., 2018). Meng et al., (2019), avaliaram 28 compostos quanto à sua eficácia na inibição da transição de levedura à hifa. Destes, vários compostos mostraram forte atividade para atenuar este processo. Outro estudo também identificou a inibição da formação hifálica quando *C. albicans* foi exposta a substâncias como o α -longipineno e o linalol, reduzindo desta maneira a virulência do microrganismo (MANOHARAN et al., 2017). Ademais, alguns inibidores da cicloxigenase, como o diclofenaco sódico e o resveratrol, demonstraram efeito inibidor da transição morfológica. No entanto, não se sabe se esse efeito ocorreu de maneira direta ou indireta por eles reduzirem a viabilidade das células de *C. albicans* (GHALEHNOO et al., 2010; OKAMOTO-SHIBAYAMA; SATO; AZUMA, 2010).

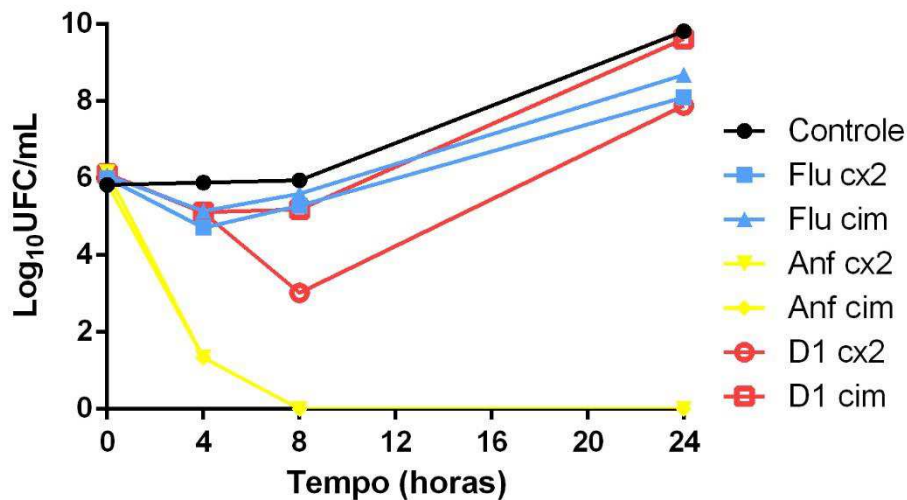
A literatura evidencia que muitas outras moléculas têm o poder de modular a morfogênese em *C. albicans*. Porém, poucas dessas substâncias tiveram seus mecanismos investigados. Ainda, os poucos estudos que investigaram os modos de ação, demonstraram em sua maioria que esses compostos têm como alvo componentes da via de sinalização Ras1p, independentemente da estrutura da molécula (SHARECK; BELHUMEUR, 2011). Fato que

fomenta estudos a fim de elucidar os mecanismos pelos quais as substâncias testadas no presente estudo atuam para inibir a transição morfológica.

5.3 Efeito dos compostos furânicos sobre a cinética de crescimento de *C. albicans* (time-kill)

Verificou-se o efeito dos antifúngicos sobre a cinética de crescimento de *C. albicans* objetivando avaliar a viabilidade da levedura em diferentes intervalos de tempo. Tal viabilidade foi determinada quando tratada na ausência e na presença de várias concentrações de D1, de D2, da anfotericina B e do fluconazol. As figuras 4 e 5 contêm os resultados do número de logUFC/mL de acordo com os intervalos de tempo para as diferentes concentrações utilizadas sobre *C. albicans*. Desta maneira, foi possível observar um comportamento semelhante entre D1 e o fluconazol (figura 4), e entre D2 e a anfotericina B (figura 5) ao longo do tempo.

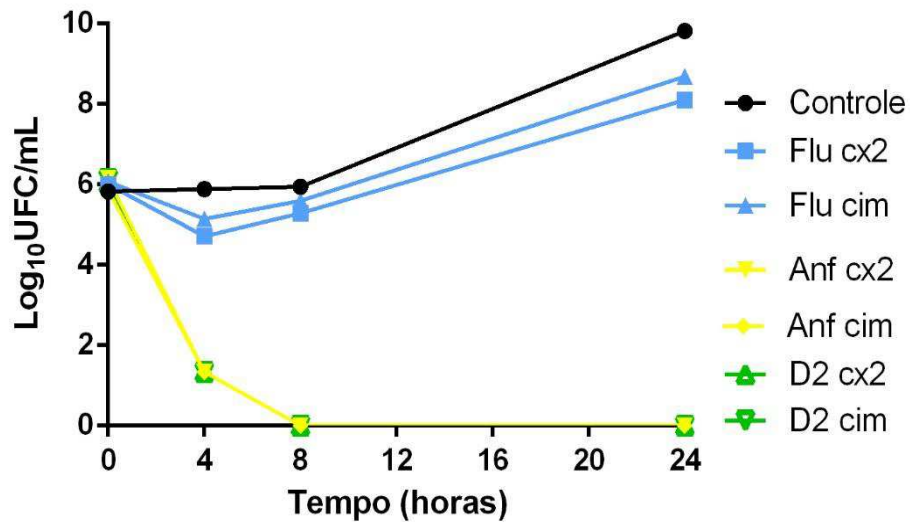
Figura 4 - Viabilidade de *C. albicans* ATCC 76485 quando exposta ao ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico e controles



Legenda: Flu: fluconazol; Anf: Anfotericina B; D1: ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico.

Fonte: Próprio autor.

Figura 5 - Viabilidade de *C. albicans* ATCC 76485 quando exposta ao (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila e controles



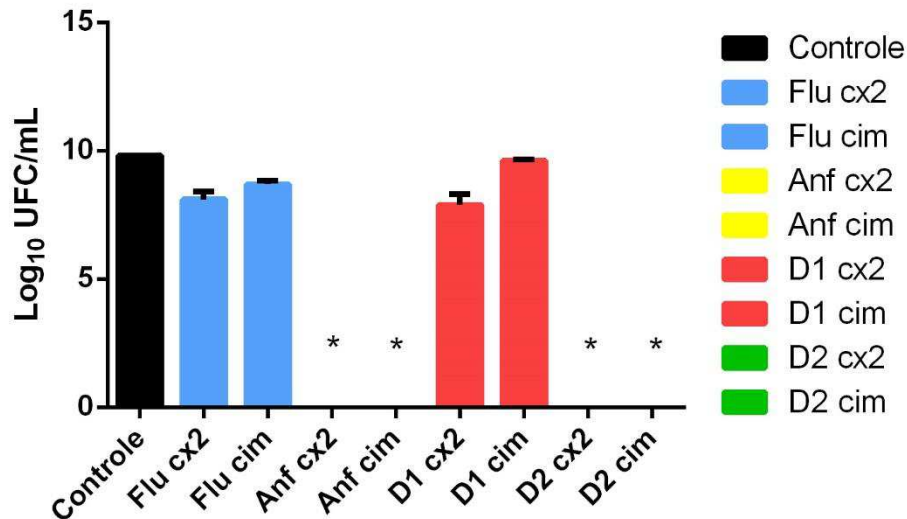
Legenda: Flu: fluconazol; Anf: Anfotericina B; D2: (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila.

Fonte: Próprio autor.

Além da análise da viabilidade da levedura em diferentes intervalos de tempo, também foi analisada a inibição do crescimento microbiano após 24 horas (figura 6). De acordo com a figura 6, tanto a D2 como a anfotericina B demonstraram um comportamento fungicida enquanto D1 e o fluconazol demonstraram um perfil fungistático.

Para esta análise, no intuito de avaliar se o conjunto de dados são ou não paramétricos, foram realizados 3 testes (Shapiro-Wilk, D'agostino-Person e Kolmogorov-Sminorv), em seguida, descartada a normalidade, foi aplicado um teste não paramétrico (Kruskal-Wallis), com pós teste de Dunn, para observar se houve significância estatística no tempo 24 h das variáveis com relação ao controle (figura 6).

Figura 6 - Inibição da contagem em logUFC/mL de *Candida albicans* em 24h quando exposta a diversas concentrações do ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico, do (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila, da anfotericina B e do fluconazol



Legenda: Flu: fluconazol; Anf: Anfotericina B; D1: ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico; D2: (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila. * $p < 0,05$ quando comparados ao controle (Kruskal-Wallis - Dunn).

Fonte: Próprio autor

As figuras 4 e 5 mostram que os dois compostos testados contribuíram para a redução das populações de cepas de *C. albicans* durante todos os tempos em relação ao controle. No entanto essa redução foi menor que 99,9% após o período de 24 h para D1 (figura 6), demonstrando seu caráter fungistático interrompendo o metabolismo do fungo sem matá-lo, já D2 inibiu significativamente o crescimento a partir das 4 h, caracterizando seu potencial fungicida, ou seja, causou a destruição do microrganismo por desencadear alterações incompatíveis com sua vida. Observa-se ainda, que o efeito inibitório sobre o crescimento microbiano de D1 foi melhor do que o observado no fluconazol na concentração CIMx2 às 24 horas, e o efeito de D2 se assemelhou ao da anfotericina B em todos os tempos e nas duas concentrações testadas.

Ao analisar o efeito das substâncias nos referidos tempos, pode-se observar que o propil (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato causou redução significativa no crescimento fúngico nos tempos 4 h, 8 h e 24 h nas duas concentrações testadas, de maneira semelhante à anfotericina. Neste sentido, também é importante destacar que a atividade do outro composto teste é independente de concentração, uma vez que não foi observado aumento significativo da

atividade com o aumento da concentração, tal como o fluconazol (SCORNEAUX et al., 2017; KLEPSER et al., 1997).

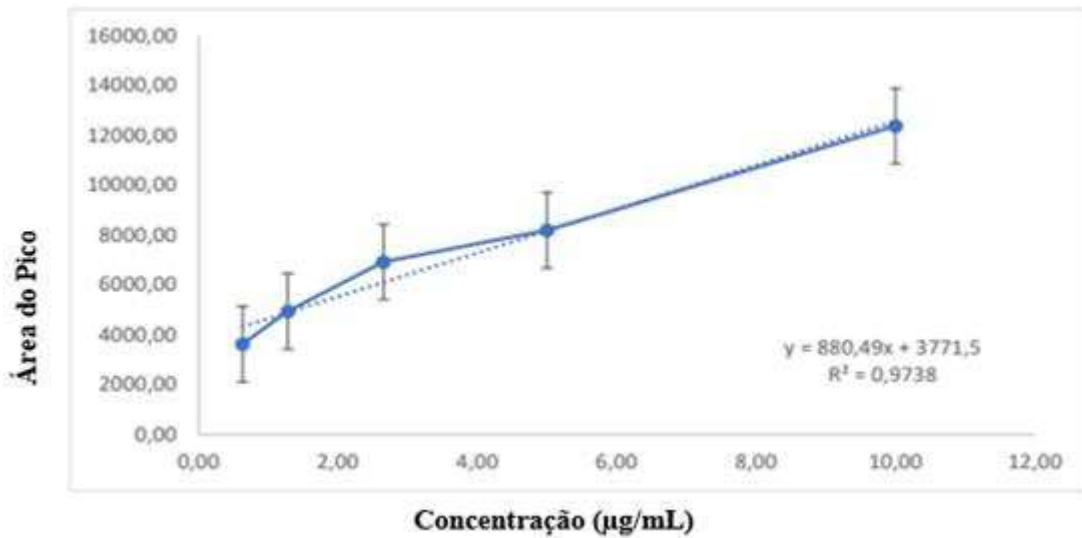
Resultados semelhantes foram descritos por Sousa et al. (2016), eles analisaram os efeitos de componentes do óleo essencial de *Coriandrum sativum* na curva de crescimento de *C. albicans* ATCC 76485, e observaram efeitos fungistáticos na CIM e fungicidas na CIMx2. Dois compostos inéditos de classe 1,3,4-oxadiazol tiveram seus efeitos *in vitro* observados por Capoci et al. (2019), a cinética da curva de crescimento sugeriu um perfil fungistático que permaneceu por 24 a 36 horas, sendo melhor que o fluconazol.

5.4 Determinação e quantificação do ergosterol em *C. albicans*

Para o método cromatográfico de quantificação do ergosterol, foi estabelecido um modelo de calibração linear, por meio do método de adição de padrão. Para o cálculo da concentração desconhecida de ergosterol foi construída uma curva da área obtida referente às concentrações crescentes de ergosterol padrão adicionada, em função de sua concentração, obtendo uma equação do tipo: $y = ax + b$.

A extrapolação da reta para o eixo das abscissas determinou a concentração desconhecida da substância analisada. Isso foi obtido tomando y como 0, e encontrado o valor de x .

Neste sentido, a curva de calibração foi linear entre as concentrações de adição, com coeficiente de determinação R^2 igual a 0,9738, demonstrando uma boa linearidade entre as áreas de pico e as concentrações de ergosterol de 0,63 a 10 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 7). Os resultados encontrados para repetibilidade e precisão mostram que o método de quantificação do ergosterol fornece resultados concordantes. Os coeficientes de variação (CV%) obtidos foram majoritariamente abaixo de 20%, dada a complexidade da matriz biológica (CHIOCCHIO; MATKOVIC, 2011).

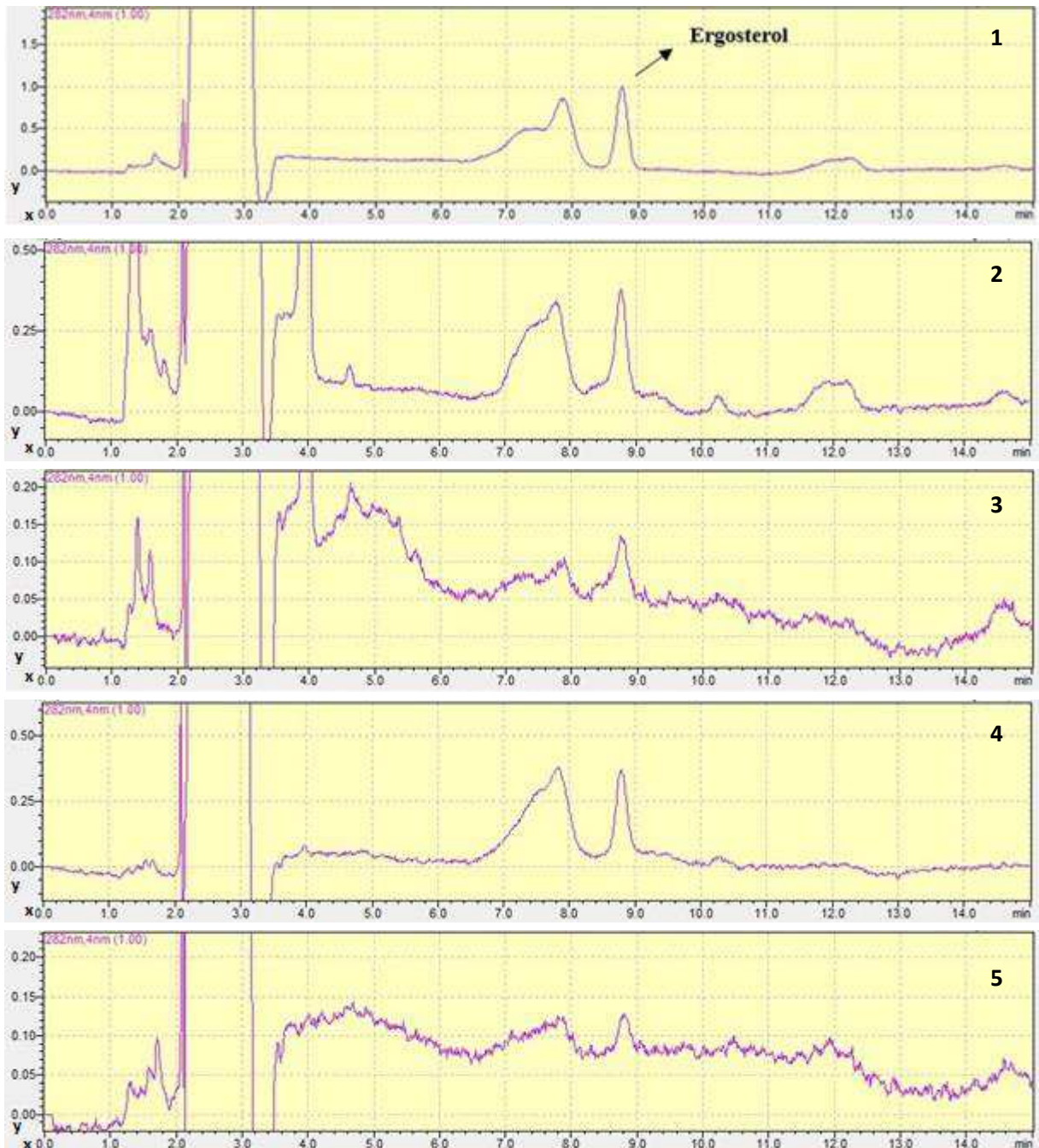
Figura 7 - Curva de calibração utilizando padrão de ergosterol

Legenda: Áreas de cada ponto foram determinadas em triplicata.

Fonte: Próprio autor.

A análise que ocorreu por meio de cromatogramas nos forneceu informações de área de pico, altura do pico e tempo de retenção do ergosterol, entre outras. A figura 8 apresenta alguns exemplos de cromatogramas obtidos neste trabalho, onde aparentemente se torna possível a observação da diminuição da área do pico, por exemplo, quando o microrganismo é exposto ao fluconazol (cromatograma 3) e ao (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila nas concentrações de CIMx2 (cromatograma 5) em comparação com o controle (cromatograma 2). Ainda, observa-se um aumento do pico quando o microrganismo foi exposto ao ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico (cromatograma 4).

Figura 8 - Exemplos de cromatogramas do padrão de ergosterol e do microrganismo quando exposto às substâncias testadas

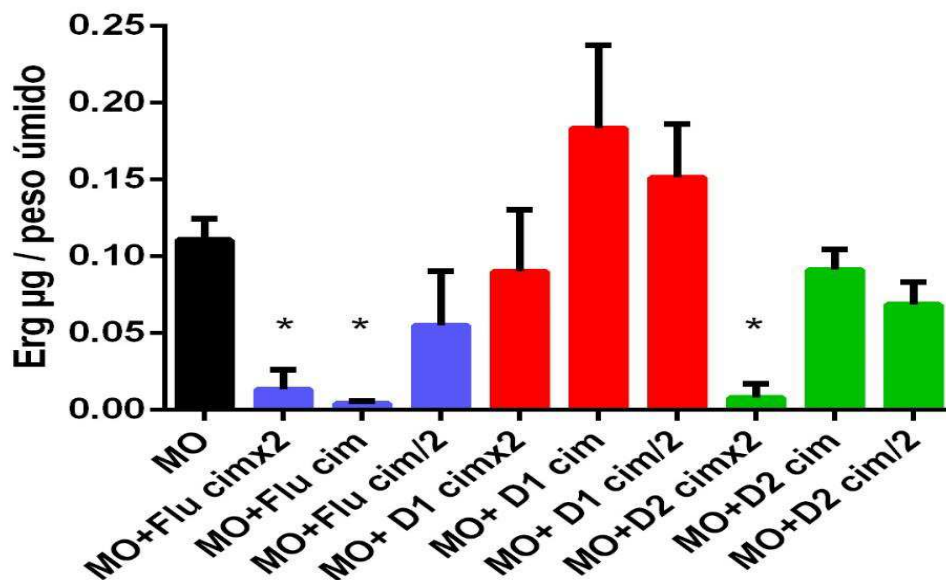


Legenda: Comatograma 1: padrão do ergosterol; Cromatograma 2: Microrganismo sem exposição à substância; Cromatograma 3: Microrganismo exposto ao fluconazol (CIMx2); Cromatograma 4: Microrganismo exposto ao ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico (CIMx2); Cromatograma 5: Microrganismo exposto ao (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila (CIMx2).

Fonte: Próprio autor.

O tempo de retenção do ergosterol foi de aproximadamente 8,79 minutos. As análises de quantificação do ergosterol, realizadas no intuito de verificar o efeito dos antifúngicos sobre a biossíntese deste esterol na levedura, revelaram que o conteúdo de ergosterol diminuiu significativamente após o tratamento controle com o fluconazol na CIMx2 e na CIM, diminuindo respectivamente 69% e 79%, e com o (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila na CIMx2, diminuindo sua produção em 75%, em relação ao controle ($p < 0,05$). Ademais, foi possível observar, na CIM, que o ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico induziu um aumento do conteúdo de ergosterol nas células de *C. albicans* (Figura 9).

Figura 9 - Análise quantitativa do conteúdo de ergosterol em *Candida albicans* após tratamento com diversas concentrações de fluconazol, ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico ou (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila



Legenda: Flu: fluconazol; D1: ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico; D2: (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila. * $p < 0,05$ quando comparados ao controle (ANOVA – Dunnett's).

Fonte: Próprio autor.

O ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico induziu aumento do conteúdo de ergosterol, tanto na CIM como na CIMx2, porém a produção de ergosterol ocorreu em menor proporção quando a concentração do fármaco foi aumentada. Este fato pode ser atribuído a capacidade de as leveduras lidarem com o estresse, sendo essencial criar mecanismos de defesa, neste caso, provavelmente a maior expressão dos genes que codificam a biossíntese de ergosterol, uma vez que a alta concentração de ergosterol tem um papel de manutenção da membrana (MUTASA; MANGOYI; MUKANGANYAMA, 2015).

Tabela 2 – Conteúdo de ergosterol nas amostras e redução ou aumento em comparação com o controle

Amostras:	Controle	Flu CIMx2	Flu CIM	D1 CIMx2	D1 CIM	D2 CIMx2	D2 CIM
Conteúdo de erg:	0,112	0,035	0,024	0,129	0,212	0,028	0,092
+ ou – de erg (%):	-	-69%	-79%	+15%	+89%	-75%	-18%

Legenda: Flu: Fluconazol; D1: ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico; D2: (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila; + ou -: Redução ou aumento; Erg: Ergosterol.

Fonte: Próprio autor.

Neste estudo, também identificou-se que o (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila diminuiu o conteúdo de ergosterol na levedura, exercendo seu efeito fungicida visando a biossíntese de ergosterol em *C. albicans* e prejudicando a integridade da membrana.

Outros estudos, a exemplo do de Liu et al. (2017), também identificaram moléculas capazes de inibir a biossíntese do ergosterol, eles observaram que o eucarobustol E, um meroterpenóide do formil-cloroglucinol derivado do *eucalipto robusta*, regulou negativamente a atividade dos genes envolvidos na biossíntese do ergosterol, diminuindo consequentemente a sua produção. Su et al. (2018), ao estudarem o mecanismo de ação da bafilomicina C1, descobriram que essa substância inibiu a atividade de genes relacionados à biossíntese de ergosterol, resultando na redução do conteúdo de ergosterol bem menor do que a que ocorreu neste estudo, em aproximadamente 41% em comparação com o controle. Os efeitos do extrato etanólico de folhas de *Combretum zeyheri* na biossíntese de ergosterol em *C. albicans* foram investigados através da quantificação do ergosterol na presença e ausência do extrato. Os autores observaram inibição desta via tanto na CIM como na concentração subinibitória, sendo a diminuição do conteúdo de ergosterol dependente da dose (MUTOSA; MANGOYI; MUKANGANYAMA, 2015). Pagniez et al. (2020), descobriram que uma nova molécula híbrida de 1,2,4-triazol-indol apresentou eficácia antifúngica e atuou na inibição da via de biossíntese do ergosterol, reduzindo em 82% a sua produção, valor um pouco maior do que o encontrado neste estudo.

5.5 Associação dos compostos furânicos com anfotericina B ou fluconazol sobre *Candida* spp

Quando os compostos D1 e D2 foram testados em associação com a anfotericina B ou com o fluconazol contra *Candida* spp., objetivando avaliar os efeitos das interações entre os

antifúngicos, observou-se resultados que estenderam-se do indiferente ao sinérgico, não houve nenhuma interação antagônica (tabelas 3 a 6).

Tabela 3 - Tipo de interação entre os compostos furânicos e antifúngicos comerciais para *C. albicans*

<i>C. albicans</i> ATCC 76485				
COMBINAÇÃO DE ANTIFÚNGICOS	CIF A	CIF B	ICIF	TIPO DE INTERAÇÃO
D1 + Anf	0,125	0,25	0,375	Sinergismo
D1 + Flu	1,0	0,25	1,25	Indiferença
D2 + Anf	1,0	0,5	1,5	Indiferença
D2 + Flu	0,5	0,125	0,625	Aditismo

Legenda: D1: ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico; D2: (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila.

Fonte: Próprio autor.

Tabela 4 - Tipo de interação entre os compostos furânicos e antifúngicos comerciais para *C. glabrata*

<i>C. glabrata</i> ATCC 90030				
COMBINAÇÃO DE ANTIFÚNGICOS	CIF A	CIF B	ICIF	TIPO DE INTERAÇÃO
D1 + Anf	2,0	0,5	2,5	Indiferença
D1 + Flu	2,0	1,0	3,0	Indiferença
D2 + Anf	0,125	1,0	1,125	Indiferença
D2 + Flu	0,125	0,25	0,375	Sinergismo

Legenda: D1: ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico; D2: (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila.

Fonte: Próprio autor.

Tabela 5 - Tipo de interação entre os compostos furânicos e antifúngicos comerciais para *C. parapsilosis*

<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019				
COMBINAÇÃO DE ANTIFÚNGICOS	CIF A	CIF B	ICIF	TIPO DE INTERAÇÃO
D1 + Anf	0,25	0,5	0,75	Aditismo
D1 + Flu	0,5	0,25	0,75	Aditismo
D2 + Anf	0,125	1,0	1,125	Indiferença
D2 + Flu	0,125	1,0	1,125	Indiferença

Legenda: D1: ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico; D2: (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila.

Fonte: Próprio autor.

Tabela 6 - Tipo de interação entre os compostos furânicos e antifúngicos comerciais para *C. tropicalis*

<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803				
COMBINAÇÃO DE ANTIFÚNGICOS	CIF A	CIF B	ICIF	TIPO DE INTERAÇÃO
D1 + Anf	0,125	0,25	0,375	Sinergismo
D1 + Flu	0,5	0,5	1,0	Indiferença
D2 + Anf	0,5	0,125	0,625	Aditismo
D2 + Flu	1,0	1,0	2,0	Indiferença

Legenda: D1: ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico; D2: (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila.

Fonte: Próprio autor.

O tratamento de infecções por *Candida* com terapia combinada vem crescendo em decorrência da dificuldade do tratamento com monoterapia, principalmente devido à crescente resistência a drogas convencionais, uma vez que reduzir a dosagem necessária significa reduzir a probabilidade de desenvolvimento de resistência (MAŤÁTKOVÁ et al., 2017). Campitelli et al., (2017) também reforçam a necessidade do uso de compostos antifúngicos alternativos em associação com antifúngicos convencionais em busca de novas alternativas terapêuticas. Nesse sentido, existe a necessidade de pesquisar novas formas terapêuticas combinando agentes antifúngicos que sejam alternativos e eficazes.

O sinergismo farmacológico ocorre quando o efeito de dois ou mais agentes químicos combinados é mais eficaz que a soma dos efeitos individuais. Quando o efeito final dos agentes é quantitativamente igual à soma dos efeitos produzidos isoladamente diz-se que houve adição. Há indiferença quando a combinação das moléculas não resulta em efeitos positivos ou negativos e, quando a combinação diminui o efeito individual do outro medicamento ocorre antagonismo farmacológico (CHAVARRIA; ESPARZA; POZOS, 2018). A utilização de medicamentos combinados pode ser justificada pela maior eficácia, representada pela redução da toxicidade, ampliação do espectro de cobertura, maior taxa de resposta, redução na duração da terapia e prevenção da resistência (KLIBBER, 2012).

Na literatura, observa-se várias combinações que objetivam a consecução do efeito sinérgico entre diferentes compostos, por exemplo, Shinde et al., (2012) observaram efeitos sinérgicos da combinação da ciclosporina A com antifúngicos comerciais, como o fluconazol e anfotericina B. Hussain et al., (2018) também identificaram a potencialização da eficácia da nistatina e fluconazol pelas nanopartículas de prata.

Testes *in vitro* podem sugerir um antifúngico eficaz e estimar a dose necessária para alcançar o efeito desejado. Diante disto, a utilização de dados *in vitro* é essencial para a resolução de alguns problemas e orientação do planejamento de estudos clínicos (HIMRATUL-AZNITA; NOR-ZULAILA; NURUL-FATIHAH, 2016).

Neste estudo, três combinações resultaram em efeitos sinérgicos, duas combinações do ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico com anfotericina B sobre duas cepas de *Candida*, a *C. albicans* (ICIF 0,375) e a *C. tropicalis* (ICIF 0,375), outra combinação sinérgica foi a do (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila com o fluconazol contra *C. glabrata* (ICIF 0,375). Além deste, muitos outros estudos têm explorado o potencial sinérgico de anfotericina B e fluconazol com outros agentes antifúngicos (LIGNELL et al., 2007).

A interação combinada entre dois antifúngicos comerciais, o isavuconazol e anfotericina B, expressou resultados de indiferença para *C. albicans* e *C. parapsilosis*, além de antagonismo para *C. glabrata* (KATRAGKOU et al., 2017), seguindo o padrão deste estudo em que *C. glabrata* foi menos suscetível à combinações com anfotericina B. Outro estudo identificou efeito sinérgico da associação de ramnolípídeo com anfotericina B sobre *C. parapsilosis*, diferentemente do que ocorreu com a associação dos compostos sintéticos à anfotericina B (MAŤÁTKOVÁ et al., 2017).

Katragkou et al., (2015) evidenciaram interações sinérgicas e aditivas ao estudarem a associação do farnesol ao fluconazol em *Candida* spp. O fluconazol quando combinado com flavonoides também teve sua eficácia aumentada (LU et al., 2017).

Estes achados reforçam a importância da busca constante por novos agentes antifúngicos e combinações entre eles que objetivem o sucesso terapêutico de acordo com a especificidade do caso, fator que não deve ser negligenciado mediante as respostas divergentes acima discutidas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mediante os dados apresentados, é possível inferir que o ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico e o (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila possuem atividade antifúngica nas concentrações de 64 a 512 µg/mL. A atividade sinérgica do ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico foi observada quando associado à anfotericina B contra *C. albicans* ATCC 76485 e *C. tropicalis* ATCC 13803 e a do (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila quando associado ao fluconazol frente à *C. glabrata* ATCC 90030, não havendo antagonismo em nenhuma das possibilidades testadas. Portanto, a combinação dos compostos furânicos com a anfotericina B e fluconazol pode ser alvo de futuros estudos que objetivem melhorar o tratamento de infecções fúngicas. Além disso, o ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico e o (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila promoveram alterações morfológicas em *C. albicans*, diminuindo a quantidade de estruturas de resistência e virulência, como a formação de pseudo-hifas, blastoconídeos e claminoconídeos. Ainda, foi possível identificar o caráter fungistático e fungicida do ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico e do (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila, respectivamente, através do estudo da cinética de crescimento de *C. albicans*. Finalmente, observou-se que o ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico induziu aumento do conteúdo de ergosterol em *C. albicans*, efeito contrário ao do (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila, que atua na via biossintética do ergosterol, diminuindo seu conteúdo na levedura em 75% e apontando que esta substância pode representar um potente antifúngico com inibição da biossíntese do ergosterol. Testes *in vivo* precisam ser realizados mediante este potencial promissor destas substâncias sintéticas no âmbito farmacológico. Contudo, acreditamos que este estudo expressa grande utilidade para melhorar a compreensão da atividade antifúngica tanto do ácido (*E*)-3-(furan-2-il)acrílico como do (*E*)-3-(furan-2-il)acrilato de propila contra *Candida* spp.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, A.; KHAN, A.; AKHTAR, F.; YOUSUF, S.; XESS, I.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 30, n. 1, p. 41-50, 2011.
- ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. suppl_1, p. 5-16, 2001.
- ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; WARNOCK, D. W.; MORRISON, C. J. Quantitation of *Candida albicans* ergosterol content improves the correlation between in vitro antifungal susceptibility test results and in vivo outcome after fluconazole treatment in a murine model of invasive candidiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 8, p. 2081-2085, 2000.
- ASKEW, C.; SELLAM, A.; EPP, E.; HOGUES, H.; MULLICK, A.; NANTEL, A.; WHITEWAY, M. Transcriptional regulation of carbohydrate metabolism in the human pathogen *Candida albicans*. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 10, p. e1000612, 2009.
- BOYCE, K. J.; ANDRIANOPOULOS, A. Fungal dimorphism: the switch from hyphae to yeast is a specialized morphogenetic adaptation allowing colonization of a host. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 6, p. 797-811, 2015.
- BINDER, J. B.; BLANK, J. J.; CEFALI, A. V.; RAINES, R. T. Synthesis of furfural from xylose and xylan. **ChemSusChem**, v. 3, n. 11, p. 1268–1272, 2010.
- BROWN, A. J. P.; BROWN, G. D.; NETEA, M. G.; GOW, N. A. R. Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 11, p. 614-622, 2014.
- BRUNKE, S.; MOGAVERO, S.; KASPER, L.; HUBE, B. Virulence factors in fungal pathogens of man. **Current Opinion in Microbiology**, v. 32, p. 89-95, 2016.
- BRUNKE, S.; HUBE, B. Adaptive prediction as a strategy in microbial infections. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 1004356, 2014.

CABRAL, M. E.; FIGUEROA, L. I. C.; FARIÑA, J. I. Synergistic antifungal activity of statin–azole associations as witnessed by *Saccharomyces cerevisiae*-and *Candida utilis*-bioassays and ergosterol quantification. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 30, n. 1, p. 31-38, 2013.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 327-335, 2001.

CALUGI, C.; TRABOCCHI, A.; GUARNA, A. Novel small molecules for the treatment of infections caused by *Candida albicans*: a patent review (2002–2010). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 21, n. 3, p. 381-397, 2011.

CAMPITELLI, M.; ZEINEDDINE, N.; SAMAHA, G.; MASLAK, S. Combination antifungal therapy: A review of current data. **Journal of Clinical Medicine Research**, v. 9, n. 6, p. 451-456, 2017.

CAPOCI, I. R. G.; SAKITA, K. M.; FARIA, D. R.; VENDRAMINI, R.; VILUGRON, F. A.; ARITA, G. S.; OLIVEIRA, A. G.; FELIPE, M. S.; MAIGRET, B.; MENDONÇA, P. S. B.; KIOSHIMA, E. S.; SVIDZINSKI, T. I. E. Two new 1, 3, 4-oxadiazoles with effective antifungal activity against *Candida albicans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2130-2141, 2019.

CASTRO, M. C. A. **Ocorrência de espécies do complexo *Candida parapsilosis* em amostras biológicas de pacientes e profissionais de hospitais do Natal/RN**. 2017. Dissertação de Mestrado. Brasil.

CHAVARRÍA, B. D.; ESPARZA, V. V.; POZOS, G. A. Pharmacological Synergism: A Multimodal Analgesia Approach to Treat Dental Pain. **Odovtos International Journal of Dental Sciences**, v. 21, n. 1, p. 10-14, 2019.

CHIOCCHIO, V. M.; MATKOVIĆ, L. Determination of ergosterol in cellular fungi by HPLC. A modified technique. **Journal of Argentine Chemical Society**, v. 98, p. 10-15, 2011.

CHEN, Y. C. Invasive candidiasis in Asia. In: **Clinical Practice of Medical Mycology in Asia**. Springer, Singapore, 2020. p. 243-255.

CLSI. **Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica: norma aprovada- segunda edição.** M27A2, vol. 22, n. 15, 2002.

CORREA-ROYERO, J. TANGARIFE, V.; DURÁN, C.; STASHENKO, E.; MESA-ARANGO, A. In vitro antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 734-741, 2010.

CORTÉS, J. A.; RUIZ, J. F.; MELGAREJO-MORENO, L. N.; LEMOS, E. V. Candidemia en Colombia. **Biomédica**, v. 40, n. 1, 2020.

COSTA, A. L. P.; JUNIOR, A. C. S. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.

CUENCA-ESTRELLA, M. Combinations of antifungal agents in therapy—what value are they?. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 5, p. 854-869, 2004.

DA MATTA, D.; SOUZA, A.; COLOMBO, A. Revisiting species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates from Latin American medical centers. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 2, p. 24, 2017.

DADAR, M.; TIWARI, R.; KARTHIK, K.; CHAKRABORTY, S.; SHAHALI, Y.; DHAMA, K. *Candida albicans*-Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control—An update. **Microbial Pathogenesis**, v. 117, p. 128-138, 2018.

DANG, N. L.; HUGHES, T. B.; MILLER, G. P.; SWAMIDASS, S. J. Computational approach to structural alerts: furans, phenols, nitroaromatics, and thiophenes. **Chemical Research in Toxicology**, v. 30, n. 4, p. 1046-1059, 2017.

DENNING, D. W.; BROMLEY, M. J. How to bolster the antifungal pipeline. **Science**, v. 347, n. 6229, p. 1414-1416, 2015.

DESWAL, D. P.; CHAND, U. Standardization of the tetrazolium test for viability estimation in ricebean (*Vigna umbellata* (Thunb.) Ohwi & ohashi) seeds. **Seed Science and Technology**, v. 25, n. 3, p. 409-417, 1997.

DIAS, I. J.; DIAS, I. J.; TRAJANO, E. R. I. S.; CASTRO, R. D.; FERREIRA, G. L. S.; MEDEIROS, H. C. M.; GOMES, D. Q. C. Antifungal activity of linalool in cases of *Candida* spp. isolated from individuals with oral candidiasis. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 2, p. 368-374, 2018.

DING, X.; YAN, D.; SUN, W.; ZENG, Z.; SU, R.; SU, J. Epidemiology and risk factors for nosocomial *Non-Candida albicans* candidemia in adult patients at a tertiary care hospital in North China. **Medical Mycology**, v. 53, n. 7, p. 684-690, 2015.

DOERN, C. D. When does $2+2=5$? a review of antimicrobial synergy testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 12, p. 4124-4128, 2014.

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

DOŁOWY, M.; PYKA, A. Application of TLC, HPLC and GC methods to the study of amino acid and peptide enantiomers: a review. **Biomedical Chromatography**, v. 28, n. 1, p. 84-101, 2014.

GABRIEL, C.; GRENHO, L.; CERQUEIRA, F.; MEDEIROS, R.; DIAS, A. M.; RIBEIRO, A. I.; FERRAZ, M. P. Inhibitory Effect of 5-Aminoimidazole-4-Carbohydrazonamides Derivatives Against *Candida* spp. Biofilm on Nanohydroxyapatite Substrate. **Mycopathologia**, v. 184, n. 6, p. 775-786, 2020.

GAJDÁCS, M.; DÓCZI, I.; ÁBRÓK, M.; LÁZÁR, A.; BURIÁN, K. Epidemiology of candiduria and *Candida* urinary tract infections in inpatients and outpatients: Results from a 10-year retrospective survey. **Central European Journal of Urology**, v. 72, n. 2, p. 209, 2019.

GAUWERKY, K.; BORELLI, C.; KORTING, H. C. Targeting virulence: a new paradigm for antifungals. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 3-4, p. 214-222, 2009.

GHALEHNOO, Z. R.; RASHKI, A.; NAJIMI, M.; DOMINGUEZ, A. The role of diclofenac sodium in the dimorphic transition in *Candida albicans*. **Microbial Pathogenesis**, v. 48, n. 3-4, p. 110-115, 2010.

GONÇALVES, S. S.; SOUZA, A. C. R.; CHOWDHARY, A.; MEIS, J. F.; COLOMBO, A. L. Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. **Mycoses**, v. 59, n. 4, p. 198-219, 2016.

GOW, N. A. R.; LATGE, J. P.; MUNRO, C. A. The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 3, p. 1-25, 2017.

GUO, N.; WU, X.; YU, L.; LIU, J.; MENG, R.; JIN, J.; LU, H.; WANG, X.; YAN, S.; DENG, X. In vitro and in vivo interactions between fluconazole and allicin against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida albicans* determined by alternative methods. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 193-201, 2010.

HANCOCK, R. E. W.; SAHL, H. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 1551, 2006.

HAN, T.; CANNON, R. D.; VILLAS-BÔAS, S. G. The metabolic basis of *Candida albicans* morphogenesis and quorum sensing. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 8, p. 747-763, 2011.

HOAGLAND, D. T.; LIU, J.; LEE, R. B.; LEE, R. E. New agents for the treatment of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Advanced drug delivery reviews**, v. 102, p. 55-72, 2016.

HU, Z.; HE, B.; MA, L.; SUN, Y.; NIU, Y.; ZENG, B. Recent advances in ergosterol biosynthesis and regulation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 270-277, 2017.

HIMRATUL-AZNITA, W. H.; NOR-ZULAILA, C. O.; NURUL-FATIHAH, K. Antifungal activity of dual combination of hydroxychavicol with commercialized agents against oral *Candida* species. **Springer Plus**, v. 5, n. 1, p. 1696, 2016.

HUSSAIN, M. A.; AHMED, D.; ANWAR, A.; PERVEEN, S.; AHMED, S.; ANIS, I.; SHAH, M. R.; KHAN, N. A. Combination Therapy of Clinically Approved Antifungal Drugs Is Enhanced by Conjugation with Silver Nanoparticles. **International Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 239-246, 2018.

- JACOBSEN, I. D.; WILSON, D.; WÄCHTLER, B.; BRUNKE, S.; NAGLIK, J. R.; HUBE, B. *Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 10, n. 1, p. 85-93, 2012.
- JIANG, B.; BUSSEY, H.; ROEMER, T. Novel strategies in antifungal lead discovery. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 5, p. 466-471, 2002.
- JOHNSON, M. D.; PERFECT, J. R. Combination antifungal therapy: what can and should we expect?. **Bone Marrow Transplantation**, v. 40, n. 4, p. 297-306, 2007.
- KADOSH, D. Regulatory mechanisms controlling morphology and pathogenesis in *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p. 27-34, 2019.
- KATRAGKOU, A.; MCCARTHY, M.; MELETIADIS, J.; HUSSAIN, K.; MORADI, P. W.; STRAUSS, G. E.; MYINT, K. L.; ZAW, M. H.; KOVANDA, L. L.; ROILIDES, R. P. E.; WALSH, T. J.; PETRAITS, V. In vitro combination therapy with isavuconazole against *Candida* spp. **Medical Mycology**, v. 55, n. 8, p. 859-868, 2017.
- KIBBLER, C. C. The Pro-debate: How can we improve the outcome of invasive fungal infection? The case for combination therapy. **Infection**, v. 16, p. 3-10, 2012.
- KLEPSER, M. E.; ERNST, E. J.; LEWIS, R. E.; ERNST, M. E.; PFALLER, M. A. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1207-1212, 1998.
- KLEPSER, M. E.; WOLFE, E. J.; JONES, R. N.; NIGHTINGALE, C. H.; PFALLER, M. A. Antifungal pharmacodynamic characteristics of fluconazole and amphotericin B tested against *Candida albicans*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 41, n. 6, p. 1392-1395, 1997.
- KLUG, L.; DAUM, G. Yeast lipid metabolism at a glance. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 3, p. 369-388, 2014.
- KRISHNASAMY, L.; KRISHNAKUMAR, S.; KUMARAMANICKAVEL, G.; SAIKUMAR, C. Molecular Mechanisms of Antifungal Drug Resistance in *Candida* Species. **Journal of Clinical & Diagnostic Research**, v. 12, n. 9, p. 1-6, 2018.
- KUMAR, P.; TARAFDAR, J. C. 2, 3, 5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) as electron acceptor of culturable soil bacteria, fungi and actinomycetes. **Biology and Fertility of Soils**, v. 38, n. 3, p. 186-189, 2003.

LAGUNES, L.; RELLO, J. Invasive candidiasis: from mycobiome to infection, therapy, and prevention. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 35, n. 8, p. 1221-1226, 2016.

LEWIS, R. E.; VIALE, P.; KONTOYIANNIS, D. P. The potential impact of antifungal drug resistance mechanisms on the host immune response to *Candida*. **Virulence**, v. 3, n. 4, p. 368-376, 2012.

LEWIS, R. E.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; KLEPSEK M. E. Comparison of Etest, chequerboard dilution and time–kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 345–351, 2002.

LIGNELL, A.; JOHANSSON, A.; LÖWDIN, E.; CARS, O.; SJÖLIN, J. A new in-vitro kinetic model to study the pharmacodynamics of antifungal agents: inhibition of the fungicidal activity of amphotericin B against *Candida albicans* by voriconazole. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 6, p. 613-619, 2007.

LIU, J. F.; XIA, J. J.; NIE, K. L.; WANG, F.; DENG, L. Outline of the biosynthesis and regulation of ergosterol in yeast. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 7, p. 98-106, 2019.

LIU, R. H.; SHANG, Z. C.; LI, T. X.; YANG, M. H.; KONG, L. Y. In vitro antibiofilm activity of Eucarobustol E against *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 8, p. e02707-16, 2017.

LU, M.; LI, T.; WAN, J.; LI, X.; YUAN, L.; SUN, S. Antifungal effects of phytocompounds on *Candida* species alone and in combination with fluconazole. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 2, p. 125-136, 2017.

LOCKHART, S. R. Current epidemiology of *Candida* infection. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 36, n. 17, p. 131-136, 2014.

MANOHARAN, R. K.; LEE, J. H.; KIM, Y. G.; KIM, S. I.; LEE, J. Inhibitory effects of the essential oils α -longipinene and linalool on biofilm formation and hyphal growth of *Candida albicans*. **Biofouling**, v. 33, n. 2, p. 143-155, 2017.

MAŤÁTKOVÁ, O.; KOLOUCHOVÁ, I.; KVASNIČKOVÁ, E.; JEŽDÍK, R.; MASÁK, J.; ČEJKOVÁ, A. Synergistic action of amphotericin B and rhamnolipid in combination on

Candida parapsilosis and *Trichosporon cutaneum*. **Chemical Papers**, v. 71, n. 8, p. 1471-1480, 2017.

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

MICHAIL, K.; MATZI, V.; MAIER, A.; HERWIG, R.; GREILBERGER, J.; JUAN, H.; KUNERT, O.; WINTERSTEIGER, R. Hydroxymethylfurfural: an enemy or a friendly xenobiotic? A bioanalytical approach. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 8, p. 2801-2814, 2007.

MENG, L.; ZHAO, H.; ZHAO, S.; SUN, X.; ZHANG, M.; DENG, Y. Inhibition of yeast-to-hypha transition and virulence of *Candida albicans* by 2-alkylaminoquinoline derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 4, p. e01891-18, 2019.

MUTASA, T.; MANGOYI, R.; MUKANGANYAMA, S. The effects of *Combretum zeyheri* leaf extract on ergosterol synthesis in *Candida albicans*. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 21, n. 2, p. 211-217, 2015.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. NTP toxicology and carcinogenesis studies of 5-(Hydroxymethyl)-2-furfural (CAS No. 67-47-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). **National Toxicology Program Technical Report Series**, n. 554, p. 7, 2010.

OKAMOTO-SHIBAYAMA, K.; SATO, Y.; AZUMA, T. Resveratrol impaired the morphological transition of *Candida albicans* under various hyphae-inducing conditions. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 942-945, 2010.

PAGNIEZ, F.; LÉBOUVIER, N.; NA, Y. M.; OURLIAC-GARNIER, I.; PICOT, C.; LE BORGNE, M.; LE PAPE, P. Biological exploration of a novel 1, 2, 4-triazole-indole hybrid molecule as antifungal agent. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 398-403, 2020.

PAPADOYANNIS, I. N.; THEODORIDIS, G. A. **Amino acids: analysis by HPLC: na introduction**. In *Encyclopedia of Chromatography*, 3rd edn, Cazes J (ed.). Taylor & Francis: New York, 2010; 68–74.

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

PFALLER, M.; NEOFYTOS, D.; DIEKEMA, D.; AZIE, N.; MEIER-KRIESCHE, H.; QUAN, S.; HORN, D. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004–2008. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 74, n. 4, p. 323-331, 2012.

PINTO, E.; HRIMPEN, K.; LOPES, G.; VAZ, S.; GONÇALVES, M.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of *Ferulago capillaris* essential oil against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 32, n. 10, p. 1311-1320, 2013.

PINTO, E.; AFONSO, C.; DUERTE, S.; SILVA, L. V.; COSTA, E.; SOUSA, E.; PINTO, M. Antifungal activity of xanthenes: Evaluation of their effect on ergosterol biosynthesis by high-performance liquid chromatography. **Chemical biology & drug design**, v. 77, n. 3, p. 212-222, 2011.

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

QUINDÓS, G.; MARCOS-ARIAS, C.; SAN-MILLÁN, R.; MATEO, E.; ERASO, E. The continuous changes in the aetiology and epidemiology of invasive candidiasis: from familiar *Candida albicans* to multiresistant *Candida auris*. **International Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 107-119, 2018.

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

REVELAS, A.; LIANNOS, E.; ARVANITAKIS, D. Fungal Infections in the Elderly, **Afro-Egyptian Journal of Infectious and Endemic Diseases**, v. 3, n. 1, p. 27-30, 2013.

RHEE, K. Y.; CARVALHO, L. P. S.; BRYK, R.; EHRT, S.; MARRERO, J.; PARK, W.; SCHNAPPINGER, D.; VENUGOPAL, A.; NATHAN, C. Central carbon metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*: an unexpected frontier. **Trends in microbiology**, v. 19, n. 7, p. 307-314, 2011.

RIQUELME, M.; AGUIRRE, J.; BARTNICKI-GARCÍA, S.; BRAUS, G. H.; FELDBRÜGGE, M.; FLEIG, U.; HANSBERG, W.; HERRERA-ESTRELLA, A.; KAMPER, J.; KUCK, U.; MOURINO-PEREZ, R. R.; TAKESHITA, N.; FISHER, R. Fungal

morphogenesis, from the polarized growth of hyphae to complex reproduction and infection structures. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.**, v. 82, n. 2, p. e00068-17, 2018.

RIQUELME, M.; FISCHER, R.; BARTNICKI-GARCIA, S. Apical growth and mitosis are independent processes in *Aspergillus nidulans*. **Protoplasma**, v. 222, n. 3-4, p. 211-215, 2003.

ROMO, J. A.; KUMAMOTO, C. A. On Commensalism of *Candida*. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 16-30, 2020.

ROSSETI, I. B. **Efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana e de compostos organocalcogêneos sobre *Candida Albicans***. 2015. 38f. Tese (Doutorado em Engenharia Biomédica) - Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, São José dos Campos, 2015.

SCORNEAUX, B.; ANGULO, D., BORROTO-ESODA, K.; GHANNOUM, M.; PEEL, M.; WRING, S. SCY-078 is fungicidal against *Candida* species in time-kill studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 3, p. 01961-16, 2017.

SHARECK, J.; BELHUMEUR, P. Modulation of morphogenesis in *Candida albicans* by various small molecules. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 8, p. 1004-1012, 2011.

SHINDE, R. B.; CHAUHAN, N. M.; RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. Sensitization of *Candida albicans* biofilms to various antifungal drugs by cyclosporine A. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 11, n. 1, p. 27, 2012.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Guanabara Koogan, 2004.

SOUSA, J. P.; QUEIROZ, E. O.; GUERRA, F. Q.; MENDES, J. M.; PEDROSA, Z. V.; ABRAHÃO FILHO, A. O.; PEREIRA, F. O.; TRAJANO, V. N.; SOUZA, F. S.; LIMA, E. O. Morphological alterations and time-kill studies of the essential oil from the leaves of *Coriandrum sativum* L. on *Candida albicans*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 15, n. 6, p. 398-406, 2016.

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

- SU, H.; HAN, L.; DING, N.; GUAN, P.; HU, C.; HUANG, X. Bafilomycin C1 exert antifungal effect through disturbing sterol biosynthesis in *Candida albicans*. **The Journal of Antibiotics**, v. 71, n. 4, p. 467, 2018.
- SUN, S.; GAP, Y.; LING, X.; LOU, H. The combination effects of phenolic compounds and fluconazole on the formation of ergosterol in *Candida albicans* determined by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Analytical biochemistry**, v. 336, n. 1, p. 39-45, 2005.
- VILA, T.; ROMO, J. A.; PIERCE, C. G.; MCHARDY, S. F.; SAVILLE, S. P.; LOPEZ-RIBOT, J. L. Targeting *Candida albicans* filamentation for antifungal drug development. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 150-158, 2017.
- VILLA, S.; HAMIDEH, M.; WEINSTOCK, A.; QASIM, M. N.; HAZBUN, T. R.; SELLAM, A.; HERNDAY, A. D.; THANGAMANI, S. Transcriptional control of hyphal morphogenesis in *Candida albicans*. **FEMS Yeast Research**, v. 20, n. 1, p. 5, 2020.
- VITALE, R. G.; AFELTRA, J.; DANNAOUI, E. Combinações antifúngicas. Em: **Agentes Antifúngicos: Métodos e Protocolos**. Totowa, NJ: Humana Press. 2005.
- WALSH, C. Opinion—anti-infectives: Where will new antibiotics come from?. **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 65, 2003.
- WALSH, T. J.; HAYDEN, R. T.; LARONE, D. H. **Larones's medically importante fungi: a guide to identification**. 6th, American Society of Microbiology (ASM press): Washington, DC, 2018.
- WIERCKX, N.; KOOPMAN, F.; RUIJSSENAARS, H. J.; WINDE, J. H. Microbial degradation of furanic compounds: biochemistry, genetics, and impact. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 6, p. 1095-1105, 2011.
- WILSON, D. *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 188-189, 2018.
- WEI, J.; BI, Y.; XUE, H.; WANG, Y.; ZONG, Y.; PRUSKY, D. Antifungal Activity of Cinnamaldehyde Against *Fusarium sambucinum* Involves Inhibition of Ergosterol Biosynthesis. **Journal of Applied Microbiology**, 2020.

XIE, Y.; LIU, X.; ZHOU, P. In vitro Antifungal Effects of Berberine Against *Candida* spp. In Planktonic and Biofilm Conditions. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 14, p. 87-101, 2020.

YUAN, J. P.; WANG, J. H.; LIU, X.; KUANG, H. C.; ZHAO, S. Y. Simultaneous determination of free ergosterol and ergosteryl esters in *Cordyceps sinensis* by HPLC. **Food Chemistry**, v. 105, n. 4, p. 1755-1759, 2007.

ZHAO, S.; HUANG, J. J.; SUN, X.; HUANG, X.; FU, S.; YANG, L.; LIU, X.; HE, F.; DENG, Y. (1-aryloxy-2-hydroxypropyl)-phenylpiperazine derivatives suppress *Candida albicans* virulence by interfering with morphological transition. **Microbial Biotechnology**, v. 11, n. 6, p. 1080-1089, 2018.

ZHOU, P.; FU, J.; HUA, H.; LIU, X. In vitro inhibitory activities of magnolol against *Candida* spp. **Drug design, Development and Therapy**, v. 11, p. 2653-2661, 2017.