



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE BIOMEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**DANIEL VIEIRA MARTINS**

**EFEITO ANTIFÚNGICO DO GERANIOL SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E  
BIOFILMES DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *Candida parapsilosis*.**

**FORTALEZA**

**2023**

**DANIEL VIEIRA MARTINS**

**EFEITO ANTIFÚNGICO DO GERANIOL SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E  
BIOFILMES DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *Candida parapsilosis*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia. Área de concentração: Micologia Médica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha.

Coorientadora: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

**FORTALEZA**

**2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

M342e Martins, Daniel Vieira.

Efeito antifúngico do geraniol sobre células planctônicas e biofilmes do complexo de espécies *Candida parapsilosis*. / Daniel Vieira Martins. – 2023.  
54 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Marcos Fábio Gadelha Rocha.

Coorientação: Profa. Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante.

1. Óleos essenciais. 2. Atividade fungicida. 3. Sinergismo. 4. Fatores de virulência. I. Título.

CDD 616.9

---

**DANIEL VIEIRA MARTINS**

**EFEITO ANTIFÚNGICO DO GERANIOL SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E  
BIOFILMES DO COMPLEXO DE ESPÉCIES *Candida parapsilosis*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Micologia Médica.

Aprovada em: 23/10/2023.

BANCA EXAMINADORA –

---

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha (Orientador)  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Profª. Dra. Géssica dos Santos Araújo  
Centro Universitário Fametro (UNIFAMETRO)

---

Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

À Deus.

Aos meus amados pais, Wilson e Celiene.

E a minha eterna avó Celina.

## AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente à CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio e ao CNPq por todo o suporte para o desenvolvimento de minha pesquisa.

A Universidade Federal do Ceará, que acompanha desde minha graduação em Ciências Biológicas até a pós graduação.

Ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) por ter me recebido com tanto carinho e me fornecido a oportunidade de realizar a pesquisa.

Aos meus professores e orientadores, Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha e Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, por muito mais que uma excelente orientação, me ensinaram muito além do que apenas o conhecimento científico, sendo minhas fontes de inspiração não só profissional, mas pessoal. Vocês representam o que eu mais admiro na docência e só despertaram ainda mais meu amor pelo que eu faço. Sou eternamente grato por todo conhecimento compartilhado e todas as experiências que vivenciei graças a vocês.

Agradeço aos professores Dra. Débora Castelo Branco, Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro, Dra. Glauca Morgana e Dr. José Júlio Sidrim, do corpo docente do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica, que me acolheram e me ensinaram muito mais do que eu poderia imaginar. Vocês não só transmitiram conteúdos, mas me inspiraram a querer aprender cada vez mais sobre microbiologia.

A todos meus amigos do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), onde tive a oportunidade de conhecer pessoas incríveis e compartilhar as mais diversas experiências e amizades. A Tetê, Anderson, Mirele e Feynman pela amizade e momentos incríveis compartilhados e em especial, as meninas do time MF: Géssica, Gleici e Lara, por terem sido minhas mentoras e compartilhado comigo tanto tempo e conhecimento, me motivando a evoluir cada vez mais. E não poderia deixar de agradecer as minhas parceiras de esterilização, Raíssa e Tati, por todas as conversas, brincadeiras, desabafos e a amizade de vocês, vocês são incríveis e admiro demais nossos momentos. Sempre levarei todos os meus colegas do CEMM no coração.

Agradeço sempre por minha família, que está ao meu lado apoiando em minhas decisões e dando suporte em quaisquer dificuldades. Meu pai Wilson, minha mãe Celiene, meu irmão Thiago e meu cachorrinho Dexter são o que tenho de mais precioso em minha vida e jamais conseguiria chegar aqui sem eles. Em especial a memória de minha avó Celina, que partiu no dia em que realizei um sonho: Entrar para o programa de mestrado em microbiologia médica. Sei que de algum lugar a senhora está torcendo por mim e me acompanhando.

As minhas amizades incríveis que sempre estiveram do meu lado e sempre acreditaram em mim, principalmente meu grupinho especial da biologia: João, Eli e Carol. Vocês foram o melhor presente que ganhei na minha graduação em Ciências Biológicas, já contando 9 aninhos de uma amizade e uma parceria crescente que eu sei que vou levar para o resto da vida.

Aos meus amigos de infância e dos tempos de escola que carrego no coração e que os laços só se fortalecem cada vez mais em nossas saídas, conversas, sessões de rpg, rolês de bicicleta e churrascos. Especialmente o grupo dos escorpiões, desde os tempos de criança: Raul, Ramon, Artur e Airton. E meu grupinho da adolescência: Artur, Victor, Davi, Felipe, João Felipe e Toshiro. São tantos anos de amizades e momentos incríveis que não daria para descrever. Por fim, agradeço também as novas amizades que cultivei durante os anos de mestrado e se tornaram pessoas muito importantes em minha vida, principalmente a Bia e a Renata. Eu amo vocês e espero poder comemorar esse momento com todos.

Por fim, agradeço a Deus por me acompanhar não só nos momentos difíceis, mas também nos momentos incríveis que vivenciei durante minha pós-graduação.

“Nos campos da observação, o acaso favorece apenas as mentes preparadas.”

- Louis Pasteur

## RESUMO

Espécies do complexo *Candida parapsilosis* representam uma ameaça emergente ao ambiente nosocomial em razão da sua capacidade de produzir biofilmes aderentes a dispositivos médicos. Diante de uma ascensão global de cepas resistentes a antifúngicos usuais em tratamentos, o geraniol, um terpeno isolado de diferentes óleos essenciais, apresentou-se como um composto promissor por sua atividade antimicrobiana e potencial antifúngico. Com base nessas evidências, este estudo avaliou os efeitos *in vitro* do geraniol contra espécies do complexo *C. parapsilosis*, nas formas planctônica e biofilme, e sua interação com outros antifúngicos. 18 isolados foram submetidos ao ensaio de microdiluição em caldo, utilizando geraniol (4 - 1024  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), fluconazol (0,125 - 64  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), itraconazol (0,0313 - 16  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), anfotericina b (0,0313 - 16  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) e caspofungina (0,0162 - 8  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Ademais, foi realizado a contagem de células para a determinação da concentração fungicida mínima. Os fármacos foram testados em biofilmes maduros, utilizando o ensaio de redução do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio (MTT) para determinar a atividade metabólica e do ensaio de quantificação da biomassa por coloração com cristal violeta. O teste de interação entre o geraniol e os antifúngicos foi realizado pelo método de tabuleiro de xadrez (checkerboard), utilizando as combinações: geraniol com anfotericina b, fluconazol e caspofungina. A CIM para geraniol ficaram entre as faixas 256-512  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , enquanto para os fármacos antifúngicos foram: anfotericina b <0,031 - 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , fluconazol 0,25 - 4  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , itraconazol <0,031 - 0,25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e caspofungina 0,125 - 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . 2 cepas de *Candida metapsilosis* foram sensível dose-dependente (CIM<sub>50</sub> 4  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) ao fluconazol e 1 cepa de *Candida orthopsilosis* foi sensível dose-dependente ao fluconazol e itraconazol (respectivamente CIM<sub>50</sub>, 4  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e 0,25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), enquanto 7 cepas apresentaram sensibilidade reduzida a anfotericina b (CIM<sub>100</sub> 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). O geraniol apresentou atividade antibiofilme, com redução média na atividade metabólica de 38,33% ( $\pm 20,90\%$ ) e 30,69% ( $\pm 17,37\%$ ) na biomassa total dos biofilmes maduros, nas concentrações de CIM ( $p < 0.05$ ). Os biofilmes de *C. orthopsilosis* apresentaram-se tolerantes à redução da atividade metabólica na concentração CIM, em comparação com as outras cepas do complexo. O geraniol apresentou sinergismo com anfotericina b e caspofungina. Os resultados obtidos demonstram a eficácia da atividade antifúngica do geraniol contra cepas do complexo *Candida parapsilosis*, em sua forma planctônica e biofilmes maduros, além de uma potencial combinação com anfotericina b e caspofungina a ser explorada.

**Palavras-chave:** Óleos essenciais; Atividade fungicida; Sinergismo; Fatores de virulência.

## ABSTRACT

*Candida parapsilosis* species complex represents an emerging threat to the nosocomial environment due to their ability to produce biofilms adherent to medical devices. Faced with a global rise in strains resistant to common antifungal treatments, geraniol, a terpene isolated from different essential oils, presented itself as a promising therapeutic alternative due to its antimicrobial activity and antifungal potential. Based on this evidence, this study evaluated the in vitro effects of geraniol against species of the *C. parapsilosis* complex, in planktonic and biofilm forms, and its interaction with other antifungals. 18 isolates were subjected to broth microdilution assay, using geraniol (4 - 1024  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), fluconazole (0.125 - 64  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), itraconazole (0.0313 - 16  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), amphotericin b (0.0313 - 16  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) and caspofungin (0.01625 - 8  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). In addition, a cell count was performed to determine the minimum fungicide concentration. The drugs were tested in mature biofilms, using the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) reduction assay to determine metabolic activity and the biomass quantification by crystal violet staining assay. The interaction test between geraniol and antifungals was carried out using the checkerboard method, using the compounds: geraniol with amphotericin b, fluconazole and caspofungin. The MIC for geraniol was between the ranges 256-512  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , while for antifungal drugs they were: amphotericin b <0.031 - 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , fluconazole 0.25 - 4  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , itraconazole <0.031 - 0.25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  and caspofungin 0.125 - 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . 2 strains of *Candida metapsilosis* were dose-dependently sensitive ( $\text{MIC}_{50}$  4  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) to fluconazole and 1 strain of *Candida orthopsilosis* was dose-dependently sensitive to fluconazole and itraconazole (respectively  $\text{MIC}_{50}$ , 4  $\mu\text{g ml}^{-1}$  and 0.25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), while 7 strains had reduced sensitivity to amphotericin b (MIC 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Geraniol showed antibiofilm activity, with an average reduction in metabolic activity of 38.33% ( $\pm 20.90\%$ ) and 30.69% ( $\pm 17.37\%$ ) in the total biomass of mature biofilms, at MIC concentrations ( $p < 0.05$ ). *C. orthopsilosis* biofilms proved to be more resistant to reduced metabolic activity at the MIC concentration, compared to other strains in the complex. Geraniol showed synergism with amphotericin b and caspofungin. The results obtained demonstrate the effectiveness of geraniol's antifungal activity against strains of the *Candida parapsilosis* complex, in its planktonic form and mature biofilms, in addition to a potential combination with amphotericin b and caspofungin to be explored.

**Keywords:** Essential oils; Fungicidal activity; Synergism; Virulence factors.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Principais padrões morfológicos da ordem <i>Saccharomycetales</i> .....	16
Figura 2 – Representação esquemática dos fatores de virulência de <i>Candida albicans</i> sobre o tecido do hospedeiro.....	20
Figura 3 – Etapas da formação dos biofilmes .....	21
Figura 4 – Proporção das espécies de <i>Candida</i> mais relevantes em quadros de candidemia .....	22
Figura 5 – Candidíase cutânea congênita em neonato.....	23
Figura 6 – Caracterização macroscópica e microscópica de cepas do complexo <i>C. parapsilosis</i> .....	25
Figura 7 – Cálculo do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) .....	33
Figura 8 – Atividade anti-biofilme do geraniol sobre cepas do complexo <i>C. parapsilosis</i> , em conjunto .....	36
Figura 9 – Ação do geraniol sobre a atividade metabólica e biomassa de biofilmes, por espécie, do complexo <i>C. parapsilosis</i> .....	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Morfologia de espécies patogênicas de <i>Candida</i> .....	17
Tabela 2 – Cepas do complexo <i>Candida parapsilosis</i> do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) utilizadas no estudo, com sua respectiva origem e coloração em meio cromogênico.....	30
Tabela 3 – Sensibilidade antifúngica de células planctônicas de espécies do complexo <i>Candida parapsilosis</i> em comparação ao controle <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019, contra fluconazol (CIM <sub>50</sub> ), itraconazol (CIM <sub>50</sub> ), anfotericina b (CIM <sub>100</sub> ), caspofungina (CIM <sub>50</sub> ) e geraniol (CIM <sub>100</sub> ) .....	34
Tabela 4 – Relação entre geraniol CIM <sub>100</sub> e concentração fungicida mínima (CFM), por cepa .....	35
Tabela 5 – Concentração inibitória mínima (CIM) do geraniol combinado com os antifúngicos, frente as espécies do complexo <i>Candida parapsilosis</i> e suas respectivas interpretações baseados no cálculo do ICIF .....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CIM	Concentração inibitória mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
CLSI	<i>Clinical &amp; Laboratory Standards Institute</i>
NAC's	Cepas não-albicans ( <i>Non-albicans strains</i> )
UFC	Unidades formadoras de colônias
DO	Densidade óptica
YEPD	Extrato de levedura peptona dextrose
BDA	Ágar batata-dextrose
PBS	Tampão fosfato-salina
ICIF	Índice de concentração inibitória fracionada
AMB	Anfotericina b
L-AMB	Anfotericina lipossomal b
ABLC	Complexo lipídico de anfotericina b
ABCD	Dispersão coloidal de anfotericina b
FLC	Fluconazol
ITC	Itraconazol
CAS	Caspofungina
GER	Geraniol
EPV	Endocardite fúngica de prótese valvar
BDG	(1,3)- $\beta$ -d-glucano
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio

## LISTA DE SÍMBOLOS

μl	Microlitro
μg	Micrograma
%	Porcentagem
™	Marca Registrada
nm	Nanômetro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
2.1	O gênero <i>Candida</i> : Taxonomia e morfologia.....	15
2.2	Patologia e fatores de virulência .....	18
2.3	A ascensão de cepas não-albicans (NAC's) e o complexo <i>Candida parapsilosis</i> .....	21
2.4	Diagnóstico, tratamento e mecanismos de resistência.....	24
2.5	Componentes naturais com potencial antifúngico .....	27
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	29
<b>4</b>	<b>OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICO</b> .....	29
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	29
5.1	Microrganismos .....	29
5.2	Sensibilidade planctônica e atividade fungicida.....	31
5.3	Formação de biofilmes e sensibilidade de biofilmes maduros <i>in vitro</i> .....	31
5.4	Interação do geraniol com fármacos antifúngicos .....	32
5.5	Análise estatística .....	33
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	34
6.1	Sensibilidade planctônica e atividade fungicida.....	34
6.2	Formação de biofilmes e sensibilidade de biofilmes maduros <i>in vitro</i> .....	35
6.3	Interação do geraniol com fármacos antifúngicos .....	38
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	39
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	43
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	44

## 1. INTRODUÇÃO

Leveduras do gênero *Candida* são ubíquas no meio ambiente e na microbiota do ser humano, como em regiões cutânea, oral e vulvovaginal (KRANEVELD et al., 2012; TORTELLI et al., 2020). Espécies de *Candida* ainda representam os patógenos fúngicos oportunistas mais comuns, causando desde infecções mucocutâneas e superficiais, até infecções sistêmicas (PEREIRA et al., 2021; LOPES e LIONAKIS, 2022). Dentre as 200 espécies de *Candida* conhecidas, em média apenas 30 são capazes de causar doenças em humanos, sendo a espécie *Candida albicans* a mais prevalente em casos de candidíase superficial e invasiva (ESPINOSA-HERNÁNDEZ, 2020). No entanto, o aumento de espécies não-*albicans* (NAC's) tornou-se cada vez mais relevante, devido a fatores como sensibilidade reduzida ou resistência intrínseca a medicamentos antifúngicos convencionais usados no tratamento de infecções por *Candida* spp. (DEORUKHKAR, 2014; GUINEA, 2014).

O complexo *Candida parapsilosis*, composto por três espécies crípticas ou morfologicamente indistinguíveis: *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis*, é descrito como a segunda maior causa de infecções na corrente sanguínea por *Candida* spp. (candidemias) em países da América Latina, como no Brasil, onde é responsável em média por 15-30% das ocorrências de candidemias (COLOMBO et al., 2013; GUINEA, 2014; DOI et al., 2016). Espécies deste complexo representam uma ameaça emergente principalmente a pacientes imunocomprometidos ou em ambiente nosocomial, geralmente associados ao uso de cateteres venosos centrais, válvulas protéticas e outros dispositivos médicos (BARCHIESI et al., 2016), sendo os neonatos o grupo mais afetado (PAMMI et al., 2013). Dentre os fatores determinantes para a patogenicidade desses organismos, pode-se citar a formação de pseudohifas, produção de enzimas hidrolíticas e principalmente a formação de biofilmes, dificultando o tratamento por formar uma comunidade complexa que protege as células microbianas de fatores externos, como o sistema imunológico do hospedeiro e a ação de antifúngicos (THOMPSON, 2011; CAVALHEIRO e TEIXEIRA, 2018; TÓTH, 2019). Apesar da semelhança morfológica entre essas espécies, ainda existem diferentes aspectos a serem elucidados, como diferenças na formação de biofilme e sensibilidade a diversos antifúngicos (BRILHANTE et al., 2018; CORDEIRO et al., 2018).

O uso de substâncias derivadas do metabolismo secundário de plantas, como óleos essenciais, tem demonstrado uma notável atividade antimicrobiana contra leveduras como

*Candida albicans*, tanto em sua forma planctônica, como em biofilmes (BONA *et al.*, 2016; NAZZARO *et al.*, 2017; GARCIA *et al.*, 2021). Compostos como os terpenóides, presentes nos óleos essenciais, apresentam atividade antibacteriana, fungicida e também podem desempenhar papel adjuvante, aumentando a eficácia de outros medicamentos em cepas resistentes (ZACCHINO *et al.*, 2017; SHABAN, 2020).

O geraniol (3,7-dimetil-octatrieno-2,6-dien-1-ol) é um composto de álcool monoterpênico acíclico derivado de diferentes óleos essenciais, como rosa e citronela. Este composto pode comprometer o desenvolvimento de leveduras ao romper a membrana celular do fungo, interferindo na síntese de ergosterol e indicando um potencial fungicida (SHARMA, 2016). O geraniol vem apresentando atividade antifúngica e antibacteriana promissora, além de poder atuar como adjuvante (KANNAPPAN *et al.*, 2019; GUPTA, 2021). Estudos também destacam um possível potencial sinérgico com outros antimicrobianos, devido à sua capacidade de aderir aos lipídios da membrana celular do microrganismo, tornando-o mais permeável aos fármacos combinados (LIRA *et al.*, 2020), entretanto, estudos sobre este composto contra biofilmes maduros incluindo diferentes espécies de *Candida* ainda são limitados, principalmente quando envolve as diferentes espécies do complexo *C. parapsilosis*. Nesse contexto, o presente estudo avaliou o efeito *in vitro* do geraniol contra células planctônicas e de biofilmes maduros das diferentes espécies do complexo *C. parapsilosis*, bem como suas interações com antifúngicos clássicos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O gênero *Candida*: Taxonomia e morfologia

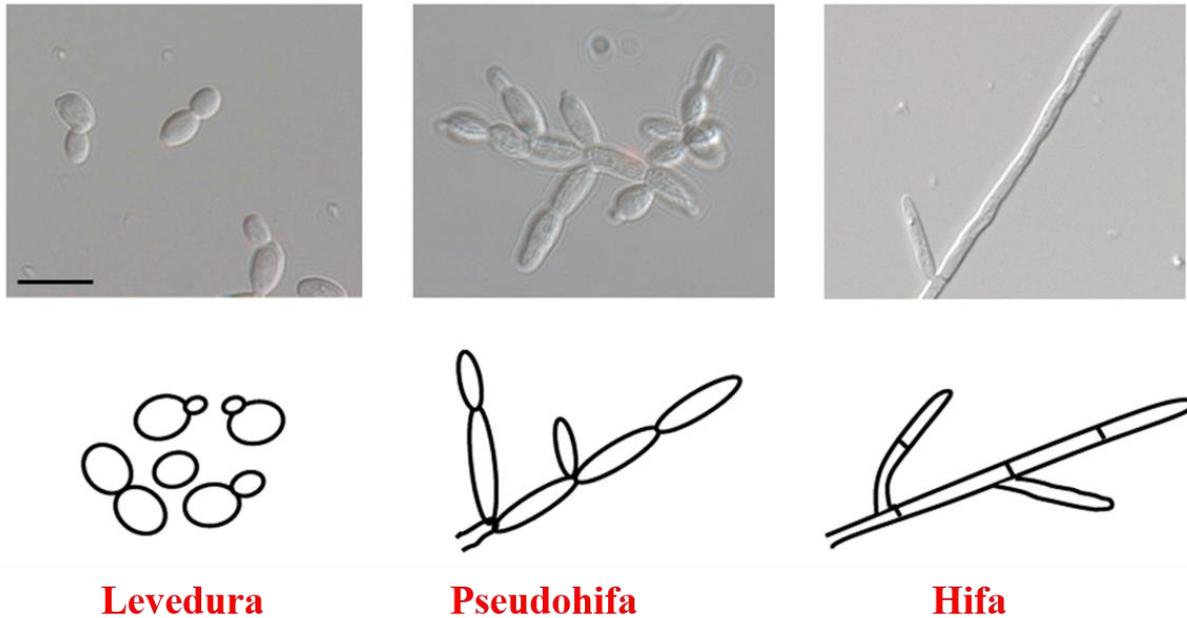
Fungos do gênero *Candida* estão presentes na maioria dos ambientes conhecidos, associados a solos úmidos, água, vegetação em decomposição, até a colonização da microbiota de animais. Na espécie humana, são comensais em microbiotas importantes, como a oral e a vulvovaginal (KRANEVELD et al, 2012; TORTELLI, 2020).

Espécies desse gênero pertencem ao filo *Ascomycota*, sendo este o maior e mais representativo dentre os grupos fúngicos, com aproximadamente 15 classes, 68 ordens, 327 famílias, 6.300 gêneros e mais 64.000 espécies (WIJAYAWARDENE et al, 2017), distintas entre 3 principais subfilos: *Pezizomycotina*, *Taphrinomycotina* e *Saccharomycotina* (HIBBET et al, 2007).

O subfilo *Saccharomycotina* (anteriormente *Hemiascomycetes*) é caracterizado pelas “leveduras verdadeiras”, sendo os indivíduos desse grupo predominantemente unicelulares e muitas vezes acompanhadas por pseudohifas e/ou hifas verdadeiras. Possuem parede celular com predominância de  $\beta$ -glucano e produzem de um ou mais ascósporos (estrutura reprodutiva característica dos Ascomicetos) formados em ascos e podendo ser convertidos a partir de células individuais ou produzidas a partir de um ascóforo simples (HIBBET et al, 2007). A ordem *Saccharomycetales* se destaca dentre o subfilo *Saccharomycotina* pela presença de importantes gêneros fúngicos, como o *Saccharomyces* e *Candida* (HIBBET et al, 2018).

Fungos da ordem *Saccharomycetales* apresentam 3 principais padrões morfológicos de crescimento celular: leveduras, pseudohifas e hifas verdadeiras, conforme demonstrado na Figura 1. Leveduras são unicelulares e possuem células ovaladas com padrões predominantemente de brotamento axial ou bipolar, como em *Candida* spp. e *Saccharomyces* spp. Já fungos que formam pseudohifas ou hifas apresentam filamentos alongados de células interligadas (THOMPSON, 2011).

**Figura 1.:** Principais padrões morfológicos da ordem *Saccharomycetales*



Imagens de células de *Candida albicans* visualizadas por microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) (bar 5-10 mm). (Inferior) Representação esquemática de cada morfologia.

Fonte: Thompson, (2011), com adaptações.

Células com pseudohifas geralmente são elipsoidais e apresentam constrições entre a célula-mãe e o filamento, formando uma série de leveduras alongadas unidas entre si, dando um aspecto semelhante a uma hifa verdadeira (THOMPSON, 2011). Já as hifas apresentam formas tubulares, uniformes, com ausência de constrições e divisão em compartimentos por estruturas chamadas septos. Essas estruturas ainda apresentam poros responsáveis por realizar a comunicação celular entre as células das hifas (THOMPSON, 2011; TORTORA et al, 2017).

Com aproximadamente 200 espécies conhecidas, indivíduos do gênero *Candida* são leveduras que apresentam polimorfismo, crescendo na sua forma leveduriforme durante a fase saprófita e filamentosa ao atingir os tecidos, onde encontra temperaturas entre 35-37 °C, formando hifas verdadeiras ou pseudohifas, com exceção da *Candida glabrata*, que não costumam formar filamentos, permanecendo apenas como células haploides (BRANDT et al, 2011; TORTORA et al, 2017; ESPINOSA-HERNÁNDEZ, 2020). Contudo, alguns fatores de estresse, como exposição a altos níveis de CO<sub>2</sub>, ainda podem induzir a formação de pseudohifas em leveduras da espécie *C. glabrata* (SASANI, 2016).

Enquanto a maioria das espécies de *Candida*, como as cepas do complexo *Candida parapsilosis*, produzem apenas pseudohifas, 3 espécies são conhecidas por

produzirem hifas verdadeiras, conforme demonstrado na Tabela 1, sendo essas: *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida dubliniensis*. (THOMPSON, 2011).

**Tabela 1.:** Morfologias de espécies patogênicas de *Candida*.

<b>Espécie</b>	<b>Morfologias</b>
<i>C. glabrata</i>	Levedura, pseudohifa.
<i>C. lusitaniae</i>	Levedura, pseudohifa.
<i>C. guilliermondii</i>	Levedura, pseudohifa.
<i>C. parapsilosis</i>	Levedura, pseudohifa.
<i>C. tropicalis</i>	Levedura, pseudohifa e hifa verdadeira.
<i>C. dubliniensis</i>	Levedura, pseudohifa e hifa verdadeira.
<i>C. albicans</i>	Levedura, pseudohifa e hifa verdadeira.

Fonte: Thompson, (2011), com adaptações.

Embora se tenha conhecimento da espécie *Candida parapsilosis* desde o século XX, quando foi inicialmente descrita como *Monilia parapsilosis* (ASHFORD, 1928), observou-se uma grande variabilidade genética entre isolados dessa espécie, o que levou pesquisadores da época a agruparem esses indivíduos em 3 grupos genéticos distintos (Grupos I, II e III), baseando-se nos padrões eletroforéticos de diversas enzimas ( $\alpha$ -esterase, superóxido-dismutase e glicose-6-fosfato desidrogenase), além do sequenciamento de regiões de rDNA (ITS1, ITS2 e 5.8S) (LIN et al, 1995). Segundo a segregação dos grupos genéticos de *C. parapsilosis*, TAVANTI e colaboradores realizaram novas análises moleculares a partir da técnica de MLST (*Multilocus Sequence Typing*), e constataram polimorfismos em genes específicos que caracterizavam 3 indivíduos distintos, propondo uma nova reformulação taxonômica em um complexo de espécies, o complexo *Candida parapsilosis*. A nova divisão organizou o complexo em 3 espécies: *Candida parapsilosis strictu sensu*, *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis*, sendo essa classificação taxonômica seguida até os dias atuais (TAVANTI et al., 2005).

A partir da caracterização do complexo, muitos estudos foram desenvolvidos buscando compreender melhor individualmente essas novas espécies, desde ocorrências ambientais como em fontes agrícolas (ROBL et al., 2014) ou em animais de cativeiro e de vida livre (BRILHANTE et al., 2014; BRILHANTE et al., 2016; SIDRIM et al., 2016), seus fatores de risco em pacientes, virulência e patogenicidade (TÓTH, 2019), perfil de

sensibilidade antimicrobiano (CORDEIRO et al., 2017; BRILHANTE et al., 2018) e até estratégias de triagem clínica baseadas no fenótipo (CORDEIRO et al, 2018). Contudo, suas diferenças biológicas continuam a serem elucidadas pelos pesquisadores, principalmente em relação a seus biofilmes.

Em sua maioria, espécies de *Candida* se reproduzem assexuadamente por brotamento, formando uma estrutura denominada blastoconídio. Contudo, muitos estudos discutem mecanismos de reprodução sexuada entre indivíduos do gênero como alternativa reprodutiva para a manutenção da espécie (ALBY e BENNETT, 2010). Estratégias reprodutivas e o polimorfismo, formando estruturas mais complexas como hifas e pseudohifas são fatores essenciais para compreender a patogenicidade desses microrganismos.

## **2.2 Patologia e fatores de virulência**

Embora façam parte da microbiota comensal, espécies de *Candida* destacam-se por serem os mais representativos patógenos fúngicos em humanos. Com aproximadamente 30 espécies conhecidas capazes de causar infecções em humanos, sendo essas caracterizadas como agentes oportunistas, afetando principalmente pacientes imunocomprometidos (ARENDRUP, 2013; ESPINOSA-HERNÁNDEZ, 2020). Infecções por *Candida* spp., ou candidíases, variam desde infecções superficiais na pele ou mucosas, mas também infecções sistêmicas, como em casos de candidemia (ou septicemia por *Candida*) (ESPINOSA-HERNÁNDEZ, 2020; MBA, 2020).

Casos de candidíase mucocutânea são os mais prevalentes dentre os quadros clínicos ocasionados por *Candida* spp., sendo a mucosa oral, vulvovaginal, esofágica e nasal os sítios mais afetados (MBA, 2020; LOPES, 2022). As manifestações clínicas de casos de candidíase mucocutânea variam desde quadros agudos, subagudos e crônicos envolvendo lesões na mucosa e reações inflamatórias dependendo do sítio anatômico atingido, podendo atingir inclusive indivíduos imunocompetentes (MBA, 2020; TALAPKO, 2021; LOPES, 2022).

Apesar de micoses superficiais apresentarem uma prevalência medial global de 20-25%, infecções superficiais na pele por *Candida* spp. são menos frequentes quando comparados aos dermatófitos, ocorrendo prioritariamente em pacientes imunocomprometidos ou com alguma deficiência inata em sua imunidade (ESPINOSA-HERNÁNDEZ, 2020; LOPES, 2022). Contudo, suas manifestações clínicas se caracterizam por ocasionar um espessamento da pele, hiperqueratose e formação de eritemas, com leve descamação na

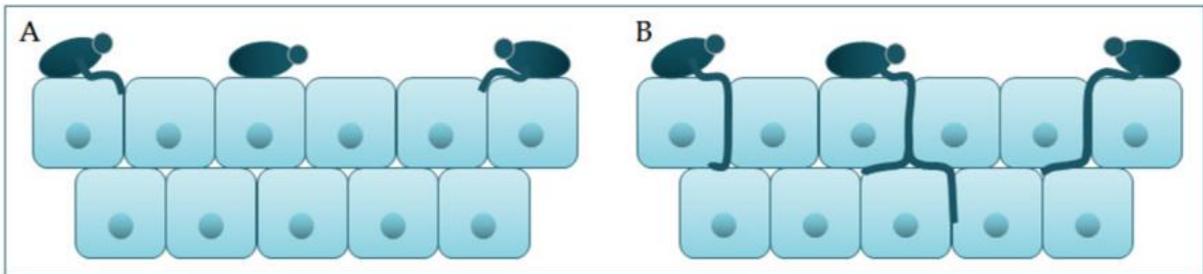
superfície e pápulas e pústulas satélites na periferia (ESPINOSA-HERNÁNDEZ, 2020; TALAPKO, 2021).

Em relação a infecções sistêmicas, *Candida* spp. continuam sendo a causa mais comum de infecções fúngicas invasivas, com apenas 5 espécies (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, e *C. krusei*) compondo mais de 92% dos casos globais de candidemia (GUINEA, 2014), tornando-se uma doença emergente principalmente em pacientes imunocomprometidos e em ambiente hospitalar (ARENDRUP, 2013; GUINEA, 2014; TALAPKO, 2021). Casos de candidíase invasiva na corrente sanguínea ainda podem levar a quadros clínicos mais graves como infecções da bexiga e dos rins, endoftalmite, meningite, infecções osteoarticulares, endocardite, peritonite e infecções intra-abdominais, pneumonia, empiema, mediastinite e pericardite (ARENDRUP, 2013; TALAPKO, 2021). Fatores de risco para casos de candidemia variam desde pacientes imunocomprometidos com cuidados intensivos, danos na mucosa gastrointestinal, pacientes em uso contínuo de antibióticos de amplo espectro e uso de dispositivos médicos como cateter (IOANNOU et al., 2020<sub>A</sub>; IOANNOU et al., 2020<sub>B</sub>; TALAPKO, 2021).

Apesar de muitos indivíduos se apresentarem assintomáticos em casos de candidíase, o potencial patogênico desses agentes etiológicos se deve a um arsenal de fatores de virulência que podem se manifestar a partir do contato com cepas externas ou até mesmo através dos próprios comensais, com base em alterações da homeostase do hospedeiro (TALAPKO, 2021; LOPES, 2022). Esses fatores de virulência são responsáveis por evadir as defesas do hospedeiro e permitir o desenvolvimento do agente etiológico nos sítios atingidos.

Dentre esses fatores de virulência associados à *Candida* spp, o polimorfismo ao atingir os tecidos do hospedeiro se destaca principalmente em cepas produtoras de hifas, como *C. albicans*, permitindo que o microrganismo penetre mais profundamente nos tecidos do hospedeiro através da secreção de enzimas extracelulares, como demonstrado na Figura 2 (AOKI et al, 2011). Contudo, a formação de pseudohifas também é um importante fator de virulência, principalmente por auxiliar na adesão e principalmente a formação de estruturas ainda mais complexas, como os biofilmes (CHOW, 2008; SASANI, 2016).

**Figura 2.:** Representação esquemática dos fatores de virulência de *Candida albicans* sobre o tecido do hospedeiro

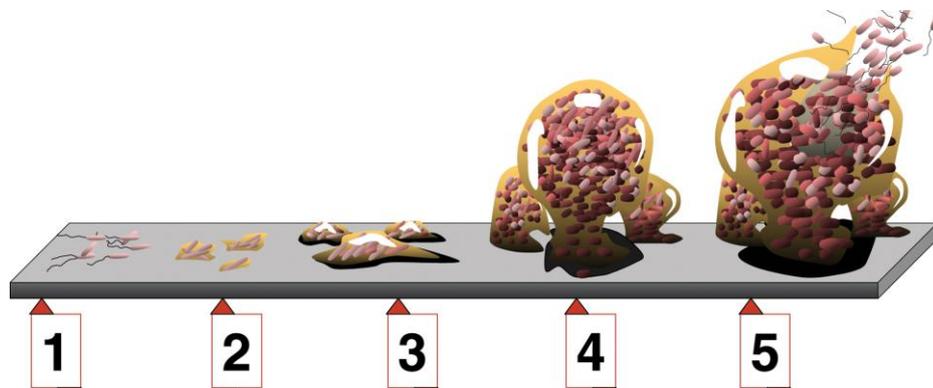


(A) adesão e colonização e (B) penetração e invasão de *C. albicans*. Fonte: Talapko, (2021)

Os biofilmes fúngicos são estruturas formadas por um aglomerado de células unidas a um substrato e protegidas por uma matriz extracelular polimérica (MEC), conferindo adesão aos tecidos do hospedeiro e principalmente, fornecendo maior tolerância às drogas antifúngicas. Vale destacar que tais estruturas se apresentam como um desafio para o tratamento em casos de candidemias invasivas (BRILHANTE et al., 2018; CAVALHEIRO e TEIXEIRA, 2018). Essas comunidades podem ocorrer com espécies únicas ou mistas e partem da ação de outros fatores de virulência importantes em *Candida* spp., as adesinas e invasinas (CAVALHEIRO e TEIXEIRA, 2018; PEREIRA, 2020). Por exemplo, as adesinas reconhecem ligantes como proteínas, fibrinogênios e fibronectinas e se ligam a eles, fazendo com que a célula se mantenha aderida ao tecido do hospedeiro (TALAPKO, 2021).

A adesão das leveduras a uma determinada superfície, seguida de sua reprodução, levam a formação de pequenas colônias, sendo a primeira etapa para o estabelecimento dos biofilmes. Em sua etapa intermediária, as células produzem uma matriz extracelular polimérica, promovendo o desenvolvimento de uma estrutura tridimensional, formando o biofilme desenvolvido, na fase de maturação. Células progênicas desses biofilmes ainda podem se disseminar, ao se desprenderem e migrarem para outros nichos, formando novas comunidades, conforme demonstrado na Figura 3 (CAVALHEIRO e TEIXEIRA, 2018). Vale ressaltar que em sua maioria, diferentes espécies de *Candida* apresentam distintas propriedades em seus biofilmes, desde a formação de hifas, até a composição orgânica da matriz extracelular polimérica. No caso de espécies de do complexo *Candida parapsilosis*, a formação de biofilmes é seu principal fator de virulência, e sua capacidade aderente se deve a sua composição predominantemente formada por blastoconídios e agregados de pseudohifas, com matriz extracelular polimérica principalmente composta por carboidratos e baixos níveis de proteínas (BRANCO, 2023).

**Figura 3.:** Etapas da formação dos biofilmes



Etapas da formação de biofilmes: 1- Adesão, 2- Colonização, 3- Produção da matriz extracelular (MEC), 4- Maturação, 5- Dispersão

Fonte: Monroe, (2007). Com adaptações.

A presença desses fatores de virulência, bem como o processo de formação e a caracterização dos biofilmes entre as diferentes espécies de *Candida* e até mesmo dentro do complexo *Candida parapsilosis*, ressaltam a importância clínica de se conhecer individualmente esses microrganismos e assim orientar a um tratamento adequado a espécie invasora.

### **2.3 A ascensão de cepas não-albicans (NAC's) e o complexo *Candida parapsilosis***

Por muitos anos houve uma hegemonia da *Candida albicans* como agente etiológico da candidíase, tanto em infecções superficiais, mucocutâneas e até mesmo candidíases invasivas, com cerca de 70-80% de prevalência em isolados clínicos (Silva, 2011). Embora esse agente etiológico ainda predomine os casos clínicos de candidíase superficial, na última década vem-se reportando uma ascensão de outras espécies de *Candida* com grande relevância clínica, sendo esse grupo denominado cepas não-albicans (NAC's) e representando uma ameaça emergente (SILVA, 2011; DEORUKHKAR, 2014).

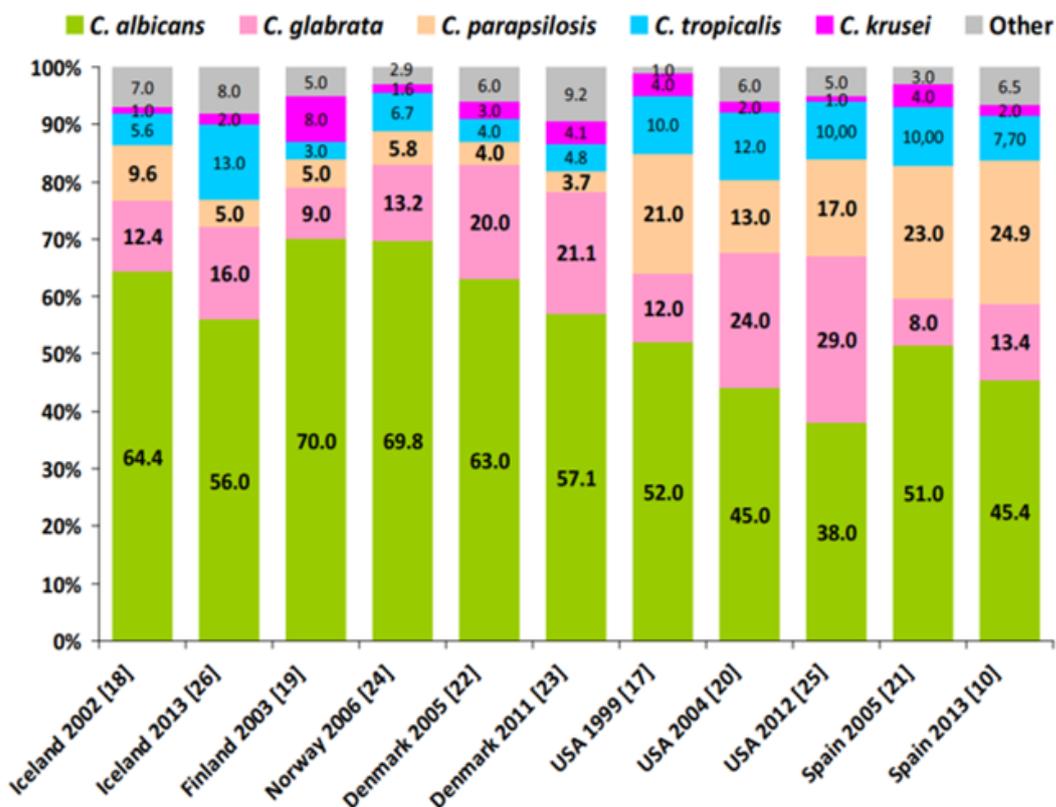
Por muito tempo hipotizou-se que a dominância da espécie *C. albicans* em relação às NAC's se devia pela sua capacidade de filamentação com hifas verdadeiras, enquanto a maioria das espécies não-albicans apresentava apenas pseudohifas ou hifas com menor capacidade invasiva (DEORUKHKAR, 2014). Contudo, estudos recentes demonstraram que o aumento da filamentação em algumas espécies de *Candida*, como *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* ocasionou uma diminuição de sua patogenicidade, refutando o aumento da filamentação em *C. albicans* como fator determinante em sua dominância como

agente etiológico da candidíase (BANERJEE, 2019; KADOSH, 2020). Ademais, espécies não-albicans demonstraram a produção de fatores de virulência outrora característicos da espécie *C. albicans*, além de apresentarem uma reduzida susceptibilidade a antifúngicos comumente utilizados em tratamentos de candidíase, sendo a classe dos azólicos a mais afetada (SILVA, 2011; DEORUKHKAR, 2014).

Mesmo em casos de candidemias, a prevalência de *C. albicans* vem reduzindo com os anos e espécies emergentes vêm se destacando principalmente no ambiente hospitalar. A prevalência das NAC's em casos de candidemia varia de acordo com a região geográfica, como demonstrado na Figura 4, sendo *C. glabrata* a mais reportada em estudos do norte da Europa e USA, enquanto na Espanha e no Brasil se destaca a espécie *C. parapsilosis* (GUINEA, 2014). Outros fatores de risco como a idade, pacientes em unidades de tratamento intensivo e higienização do hospital podem afetar essa distribuição (GUINEA, 2014).

Dentre as cepas não-albicans emergentes, indivíduos da espécie *Candida parapsilosis* vem atraindo a atenção dos pesquisadores pela alta incidência em infecções hospitalares, principalmente na América Latina (GUINEA 2014; TÓTH 2019). Ademais, diferenças na virulência, nos mecanismos reguladores e de resistência aos medicamentos antifúngicos e nos grupos de pacientes em risco, indicam que o vasto conhecimento acerca de *C. albicans* não pode ser estendido em infecções por *C. parapsilosis* (TÓTH, 2019).

**Figura 4:** Proporção das espécies de *Candida* mais relevantes em quadros de candidemia.

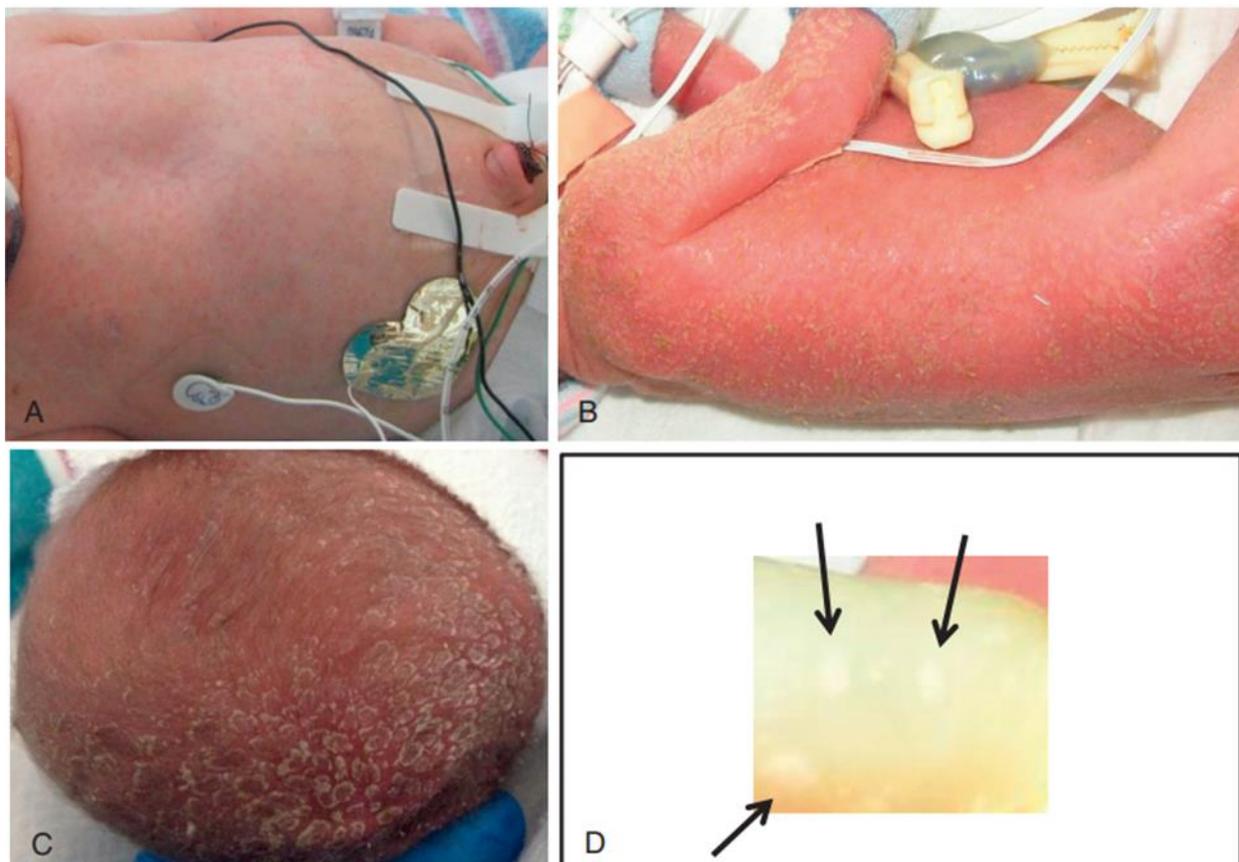


Proporção das espécies de *Candida* mais relevantes em estudos de populacionais que relatam quadros de candidemia em diferentes países.

Fonte: Guinea, (2014)

No Brasil, o complexo *C. parapsilosis* é responsável por 15-30% das ocorrências de candidemias (COLOMBO et al., 2013), sendo uma ameaça emergente no ambiente nosocomial, devido a fatores como sua capacidade colonizar dispositivos e materiais protéticos, contaminação durante nutrição parenteral, sofrerem alterações fenotípicas formando pseudohifas, secreção de enzimas hidrolíticas e principalmente, a formação de biofilmes aderentes em dispositivos médicos (PRISTOV e GHANNOUM, 2019). Ademais, espécies do complexo *C. parapsilosis* são as mais prevalentes em infecções superficiais e sistêmicas em neonatos sob cuidados em unidades de tratamento intensivo, principalmente aquelas em exposição a dispositivos invasivos, com predomínio de ventilação assistida, além de baixo peso e idade gestacional, como demonstrado na Figura 5 (GARZILLO et al., 2017). A transmissão do agente etiológico ainda pode ocorrer horizontalmente devido a presença de cepas do complexo *C. parapsilosis* nas mãos de profissionais de saúde, que aliado a más praticas de biossegurança, podem ocasionar infecções sistêmicas em pacientes sem evidências anteriores de colonização (THOMAZ, et al. 2018).

**Figura 5.:** Candidíase cutânea congênita em neonato.



Manifestações clínicas de candidíase cutânea congênita em neonato. (A) Erupção maculopapular; (B) Erupção cutânea descamativa branco-amarelada em base eritematosa; (C) Descamação com erupção cutânea seca, rachada e escamosa; (D) Placas branco-amareladas do cordão umbilical.

Fonte: Kaufman (2019).

Espécies do complexo *C. parapsilosis* compartilham de estratégias de sobrevivência no hospedeiro em sua forma planctônica, sendo capazes de perdurar dentro de fagócitos e células endoteliais, realizando brotamento intracelular, formando pseudohifas e exocitose induzida (TÓTH, 2019). Em células endoteliais ainda apresentaram resistência à acidificação e aos neutrófilos *in vitro* (GLASS, 2014). Contudo, sua principal ameaça se encontra em seus biofilmes, onde o complexo *C. parapsilosis* apresenta o segundo lugar na produção deste fator de virulência dentre as espécies de *Candida*, com biofilmes *in vitro* ainda mais resistentes a diversos antifúngicos usuais no tratamento de candidemias (KUHN, et al. 2002; SILVA, et al. 2012). Sua preferência por aderir e formar biofilmes resistentes em substratos como dispositivos médicos de administração intravenosa e até válvulas protéticas podem levar a quadros clínicos ainda mais graves, como a endocardite fúngica invasiva, sendo as espécies do complexo *C. parapsilosis* as NAC's os agentes fúngicos mais comuns nesses casos (GARZONI, 2007). A morbimortalidade em pacientes com endocardite fúngica de prótese valvar (EPV) pode chegar a 57% principalmente em decorrência das dificuldades de tratamento, sendo a válvula mitral o sítio intracardíaco mais afetado (TAN et al., 2019; IOANNOU et al., 2020<sub>B</sub>).

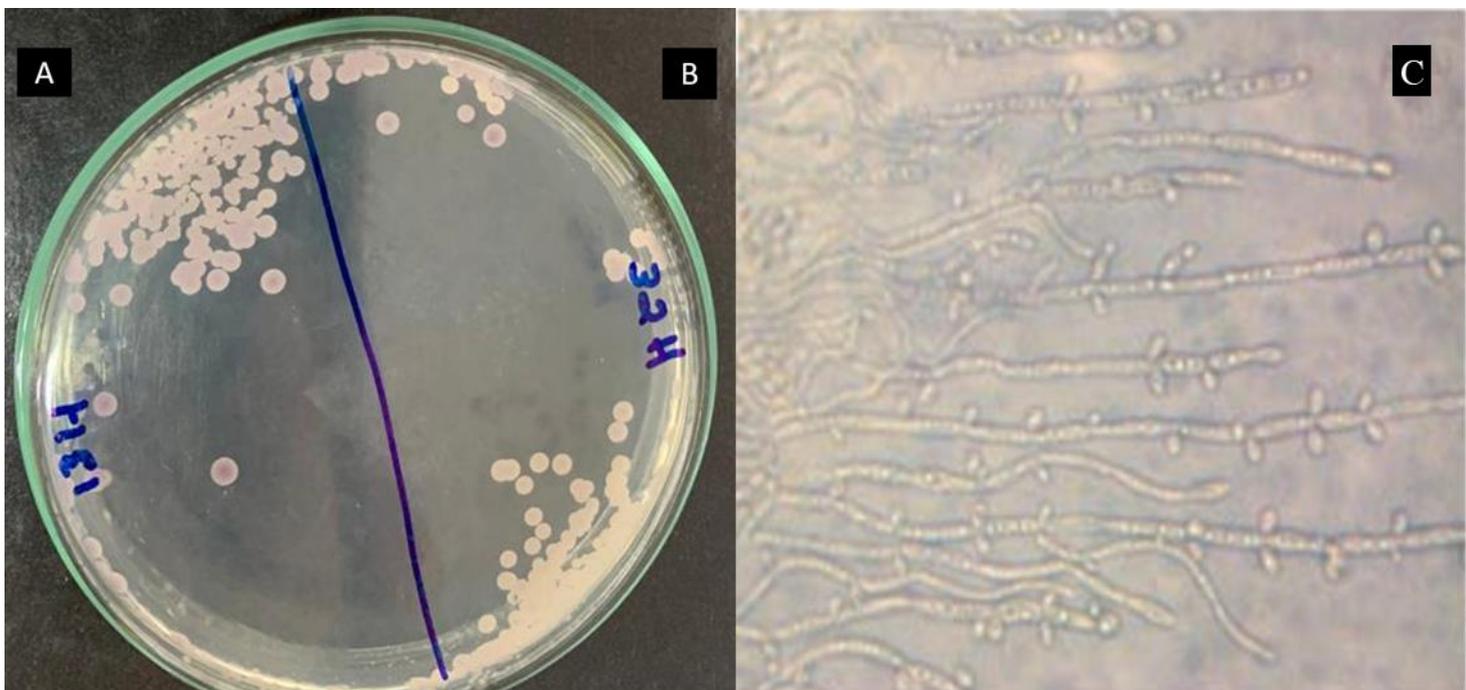
De modo geral, o controle da formação de biofilme é o principal desafio em quadros de candidemias por cepas do complexo *C. parapsilosis*, tornando necessário o aperfeiçoamento de modelos experimentais para o estudo desse fator de virulência.

#### **2.4 Diagnóstico, tratamento e mecanismos de resistência**

O diagnóstico laboratorial de infecções causadas espécies do complexo *C. parapsilosis* depende prioritariamente do sítio da infecção. Em casos de candidíase superficial e mucocutâneas, é necessário realizar o exame direto para a observação de suas estruturas morfológicas. Inicialmente, a levedura deve ser isolada, geralmente em meio Sabouraud Dextrose Agar ou ágar batata, a 35-37 °C durante 24-48 horas, podendo ainda ser cultivada em um meio CHROMagar™ *Candida* e novamente incubadas a 35-37 °C durante 24-48 horas. Após o crescimento das colônias em meio cromogênico, é possível diferenciar algumas espécies patogênicas a partir do padrão de coloração apresentado (LUND et al, 2010), sendo

essa técnica utilizada para o isolamento primário e identificação presuntiva rápida de *Candida* spp. Apesar de efetiva para diferenciar cepas de *C. albicans* (coloração esverdeada), *C. tropicalis* (coloração azul) e *C. glabrata* (coloração rosa-escuro), as técnicas baseadas em meio cromogênico não são capazes de distinguir as espécies do complexo *C. parapsilosis*, onde o padrão de coloração das 3 espécies se assemelham em uma variância de colônias brancas e roxa (CORDEIRO et al., 2018). Técnicas como microcultivo em ágar fubá-tween 80, possibilitam a visualização microscópica dos padrões morfológicos de filamentação, sendo um recurso na identificação de espécies do complexo *C. parapsilosis* pela presença característica das pseudohifas curvas e “células gigantes”, conforme demonstrado na Figura 6 (LUND et al, 2010). Para uma diferenciação mais precisa entre as espécies do complexo, ainda é necessário o uso de técnicas moleculares (CORDEIRO et al., 2018). Já em casos de candidíase invasiva, o padrão ouro é a cultura em locais normalmente estéreis acessados pela aspiração por agulha, biópsia ou em amostras de sangue (BARANTSEVICH & BARANTSEVICH, 2022).

**Figura 6.:** Caracterização macroscópica e microscópica de cepas do complexo *C. parapsilosis*.



Cepas do complexo *C. parapsilosis* em meio CHROMagar™ Candida, BD™ e microcultivo em ágar fubá-tween 80. (A) *Candida metapsilosis* (colônias roxas); (B) *Candida parapsilosis strictu sensu* (colônias brancas); (C) Microcultivo de *C. parapsilosis*, apresentando as “células gigantes” e aglomerado de pseudohifas.

Fonte: Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) e Silva et al., 2012.

O tratamento para quadros clínicos de candidíase e principalmente candidemias pode ser desafiador devido à limitação de antifúngicos no mercado e seus elevados níveis de toxicidade relacionados à proximidade metabólica entre o agente etiológico e o hospedeiro. As opções terapêuticas para candidíase invasiva estão geralmente limitadas a três classes de antifúngicos administrados sistemicamente, sendo eles: polienos, azólicos e equinocandinas. Contudo, devido à toxicidade dos polienos como a anfotericina B, as outras classes apresentaram-se altamente eficazes e bem tolerados e, portanto, os mais amplamente utilizados (TALAPKO, 2021; BARANTSEVICH & BARANTSEVICH, 2022).

O principal polieno utilizado em tratamento de infecções por *Candida* spp. é a anfotericina b. Essa importante classe de antifúngicos possui mecanismo de ação baseado na ligação ao ergosterol da membrana fúngica, formando poros e rompendo a célula, sendo assim, um antifúngico com ótima atividade fungicida (BASSETI et al, 2019). Porém, isoladamente a anfotericina b apresenta elevada citotoxicidade, sendo substituída por formulações de anfotericina b ligada a lipídios, como anfotericina lipossomal b (L-AMB), complexo lipídico de anfotericina b (ABLC) e dispersão coloidal de anfotericina b (ABCD). Apesar de sua eficácia, geralmente entram como fármacos de segunda linha nos tratamentos de candidíase invasiva (BASSETI et al, 2019, TALAPKO, 2021).

Os azólicos possuem sua atividade antifúngica baseada na inibição da 14- $\alpha$ -esterol desmetilase, codificada pelo gene ERG11, que produz uma enzima envolvida na biossíntese do ergosterol, um importante esterol da membrana fúngica (WHALEY et al, 2017; BASSETI et al, 2019). Na maioria dos casos, sua resistência está relacionada a mutações pontuais no gene ERG11, diminuindo a susceptibilidade aos azólicos em indivíduos com a sequência de aminoácidos alterada. Ademais, a super-expressão do gene ERG11 devido a mutações em outros genes reguladores do mesmo, também podem levar a quadros de resistência aos azólicos. Outro mecanismo conhecido de resistência ao azólicos se deve a super-expressão de genes de bomba de efluxo, como os genes MDR1, CDR1 e CDR2, atuando na remoção do fármaco da célula e impedindo sua atividade (WHALEY et al, 2017; BASSETI et al, 2019).

Por muito tempo os azólicos foram classificados como droga de primeira escolha no tratamento de infecções por *Candida* spp, sendo o fluconazol o principal representante em casos de infecções invasivas e trazendo vantagens como toxicidade limitada e boa administração oral (WHALEY et al, 2017). Contudo, muitas cepas não-*albicans* apresentam resistência intrínseca ou adquirida aos azólicos, sendo esse um dos fatores determinantes na

ascensão desses agentes etiológicos, principalmente no estado de biofilmes maduros (CAVALHEIRO e TEIXEIRA, 2018).

Devido a crescente resistência aos azólicos, medicamentos da classe das equinocandinas se tornaram os principais fármacos de primeira escolha em cerca de 70-75% dos casos de candidíase invasiva, tendo como representantes a caspofungina, micafungina e anidulafungina. Sua desvantagem é a administração exclusivamente intravenosa (BARANTSEVICH e BARANTSEVICH, 2022). Equinocandinas agem sobre a parede celular do fungo, inibindo a síntese do (1,3)- $\beta$ -d-glucano (BDG), um dos principais componentes da parede celular fúngica. Dessa forma, essa classe de fármacos pode apresentar uma atividade fungicida sobre a maioria das espécies de *Candida*, incluindo biofilmes resistentes a azólicos (KATRAGKOU et al., 2019).

Normalmente as espécies do complexo *C. parapsilosis* apresentam altas taxas de susceptibilidade aos azólicos, embora os mecanismos de resistência apresentados possam se manifestar em cepas resistentes ou dose dependente, sendo esses casos frequentes no ambiente nosocomial (WHALEY et al, 2017). Porém, cepas do complexo *C. parapsilosis* reiteradamente demonstram os valores de concentração inibitória mínima (CIM) mais elevados dentre as espécies de *Candida* (TÓTH, 2019; BARANTSEVICH e BARANTSEVICH, 2022). Diante desses desafios, torna-se necessário a realização de testes de sensibilidade aos antifúngicos em casos de candidíase invasiva por cepas do *C. parapsilosis*, de forma a direcionar para o tratamento mais adequado ao paciente.

## **2.5 Componentes naturais com potencial antifúngico**

Em resposta a crescente resistência aos antifúngicos convencionais e o surgimento de cepas de *Candida* multirresistentes, surge uma demanda por alternativas aos antifúngicos sintéticos no combate a microrganismos patogênicos. Dessa forma, substâncias naturais com potencial antimicrobiano vêm tomando cada vez mais destaque como possíveis alternativas terapêuticas (NAZZARO, 2017). Dentre esses produtos naturais, os óleos essenciais vegetais se sobressaem devido suas propriedades antimicrobianas eficazes e de baixa toxicidade. Esses compostos são extratos líquidos voláteis e lipofílicos, produzidos a partir do metabolismo secundário das plantas como estratégia de sobrevivência contra estresse ambiental e patógenos (ABERS et al., 2021).

Os óleos essenciais são utilizados terapeuticamente de forma aromática, tópica ou interna. Sendo o grande foco das pesquisas sobre óleos essenciais concentrado na atividade

antimicrobiana através do contato direto com a forma líquida do óleo (KOHLERT, 2000). Dentre os componentes dos óleos essenciais, os terpenóides e os polifenóis representam os mais eficazes compostos antimicrobianos, apresentando atividade antibacteriana, fungicida e também podem desempenhar papel adjuvante (ZACCHINO et al., 2017; SHABAN, 2020). Ademais, a terapia combinada desses compostos com os antifúngicos clássicos tornou-se uma área de interesse no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra fungos multirresistentes e ainda reduzir a toxicidade dos medicamentos antifúngicos (SHABAN, 2020), sendo capazes de erradicar até mesmo biofilmes maduros de *Candida albicans* (GARCIA et al. 2021).

Presente em diferentes óleos essenciais, o geraniol (3,7-dimetil-octatrieno-2,6-dien-1-ol) é um composto de álcool monoterpênico acíclico que vem ganhando atenção dos pesquisadores pela sua eficácia tanto pela sua atividade antibacteriana (KANNAPPAN et al., 2019), mas também por sua ampla atividade antifúngica (GUPTA, 2021). Além disso, o geraniol possui um potencial sinérgico com outros antimicrobianos utilizados clinicamente, devido a sua capacidade de aderir aos lipídios da membrana celular do microrganismo, tornando-a mais permeável a entrada de outros fármacos combinados (LIRA et al., 2020). Esse composto possui uma atividade anti-candida descrita em algumas espécies, tendo seu mecanismo de ação baseado na interferência sobre a síntese do ergosterol e pela ação sobre a ATPase fúngica, sendo esses fatores essenciais para a estabilidade da membrana plasmática fúngica, proporcionando ao geraniol uma possível propriedade fungicida (SHARMA, 2016).

Contudo, estudos acerca da atividade desse composto em biofilmes maduros de cepas do complexo *Candida parapsilosis* ainda são escassos, principalmente em casos de candidíase invasiva onde o tratamento precisa ser ponderado. Diante da busca por alternativas terapêuticas, o presente estudo escolheu avaliar o potencial do geraniol na erradicação de leveduras do complexo *C. parapsilosis* de diversas origens, em suas formas planctônicas e biofilmes maduros.

### 3. HIPÓTESES

- ✓ Geraniol apresenta atividade antifúngica sobre células planctônicas e biofilmes de cepas do complexo de espécies *C. parapsilosis*
- ✓ Geraniol apresenta sinergismo com os antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina frente células planctônicas do complexo de espécies *C. parapsilosis*

### 4. OBJETIVO GERAL/ OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#### Objetivo Geral

O presente trabalho avaliou os efeitos *in vitro* do geraniol sobre a sensibilidade do complexo de espécies *C. parapsilosis*, em sua forma planctônica e biofilmes formados, além de sua interação com as principais classes de drogas antifúngicas.

#### Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a sensibilidade planctônica entre as diferentes cepas do complexo *Candida parapsilosis* ao geraniol e outros antifúngicos (fluconazol, itraconazol, anfotericina b, caspofungina);
- ✓ Avaliar o efeito do geraniol na atividade metabólica dos biofilmes formados das espécies do complexo *Candida parapsilosis*;
- ✓ Avaliar o efeito do geraniol na biomassa total dos biofilmes formados das espécies do complexo *Candida parapsilosis*;
- ✓ Observar se há diferença entre as espécies do complexo *Candida parapsilosis* na sensibilidade das formas planctônicas e biofilmes maduros ao geraniol;
- ✓ Buscar possíveis interações *in vitro* entre o geraniol com antifúngicos das principais classes com aplicação terapêutica em infecções por cepas do complexo *Candida parapsilosis*.

### 5. METODOLOGIA

#### 5.1 Microorganismos

Foram utilizadas um total de 18 cepas do complexo *C. parapsilosis*, sendo 7 *C. parapsilosis strictu sensu*, 6 *C. metapsilosis* e 5 *C. orthopsilosis*, de origens humana, animal e ambiental, conforme representado na Tabela 2. As cepas pertencem à micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), da Universidade Federal do Ceará e encontravam-se estocadas em solução salina a 4 °C. As cepas foram cultivadas em caldo peptona dextrose com extrato de levedura (YEPD) a 35 °C por 48 horas e mantidas em ágar

batata dextrose (BDA) a 25 °C. Para a confirmação da pureza das cepas, foram analisados aspectos morfológicos em meio CHROMagar Candida® (HiCrome Candida Differential Agar; HiMedia Laboratories, Índia) e os aspectos microscópicos foram observados por microcultivo em ágar fubá-tween 80. Todas as cepas foram previamente identificadas pela técnica de PCR, tendo como alvo o gene SADH (5'-GTTGATGCTTTGGATTGT-3'), com enzima de restrição BanI (New England Biolabs, EUA) e primers S1F (5'-GTTGATGCTGTTGGATTGT-3') e S1R (5' '-CAATGCCAAATCTCCCAA-3') (CORDEIRO et al., 2018; CASTELO-BRANCO et al., 2021; SIDRIM et al., 2021).

**Tabela 2:** Micoteca de isolados do complexo *Candida parapsilosis* do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) utilizadas no estudo, com sua respectiva origem e coloração em meio cromogênico.

Código da Cepa	Espécie	Origem	Sítio de Isolamento	CHORMagar
3H	<i>C. parapsilosis strictu sensu</i>	Veterinária	Pele/Anuro	Branca
7H	<i>C. parapsilosis strictu sensu</i>	Veterinária	Cavidade Oral/Iguana	Branca
32H	<i>C. parapsilosis strictu sensu</i>	Veterinária	Cavidade Oral/Anuro	Branca
CEMM 01-1-196	<i>C. parapsilosis strictu sensu</i>	Veterinária	Conjuntiva ocular /Equino	Roxa
CEMM 01-1-186	<i>C. parapsilosis strictu sensu</i>	Veterinária	Cloaca/Papagaio verde	Branca
CEMM 01-1-214	<i>C. parapsilosis strictu sensu</i>	Veterinária	Boca/morcego	Branca
9	<i>C. parapsilosis strictu sensu</i>	Ambiental	Solo	Branca
13H	<i>C. metapsilosis</i>	Veterinária	Cavidade Oral/Cobra	Roxa
CEMM 01-1-208	<i>C. metapsilosis</i>	Humana	Aspirado brônquico	Branca
CEMM 01-1-167	<i>C. metapsilosis</i>	Humana	Hemocultura	Branca
CEMM 01-1-175	<i>C. metapsilosis</i>	Indeterminada	Indeterminada	Branca
CEMM 01-1-199	<i>C. metapsilosis</i>	Veterinária	Nasal /Equino	Roxa
CEMM 05-1-054	<i>C. metapsilosis</i>	Humana	Clínica (não especificado)	Roxa
CEMM 05-5-092	<i>C. orthopsilosis</i>	Humana	Hemocultura	Roxa
CEMM 01-1-200	<i>C. orthopsilosis</i>	Veterinária	Nasal /Equino	Branca
CEMM 01-1-178	<i>C. orthopsilosis</i>	Veterinária	Papo/Papagaio mangue	Branca
CEMM 01-1-210	<i>C. orthopsilosis</i>	Veterinária	Anal/ morcego	Branca
CEMM 01-1-217	<i>C. orthopsilosis</i>	Humana	Pele	Branca

## 5.2 Sensibilidade planctônica e atividade fungicida

O teste de sensibilidade foi realizado com base no documento M27-Ed4 do *Clinical Laboratory Standard Institute - Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast* (CLSI, 2017). Os antifúngicos foram testados nas concentrações preconizadas pelo CLSI, com intervalos que variaram de 0,125 a 64  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para FLC, 0,01625 a 8  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para CAS e de 0,03215 a 16  $\mu\text{g ml}^{-1}$  para ITR e AMB. A faixa de concentração do geraniol (Sigma-Aldrich Chemical Co.) utilizada foi de 4 a 1024  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Os inóculos foram preparados a partir de culturas das cepas do complexo *C. parapsilosis* previamente semeadas em ágar batata dextrose (BDA) e incubadas por 48 horas a 35 °C. Para tanto, as colônias foram suspensas em solução salina estéril (0,9%) e a suspensão obtida foi ajustada até atingir a turbidez equivalente a 0,5 na escala de McFarland (equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ). Posteriormente, a suspensão obtida foi diluída nas proporções 1:50 e 1:20 em meio RPMI para obtenção de um inóculo apresentando concentração final de 0,5 a  $2,5 \times 10^3$  células/mL. Aliquotas de 100  $\mu\text{L}$  do inóculo foram adicionadas às placas de cultura de 96 poços fundo U já contendo 100  $\mu\text{L}$  de RPMI-1640 suplementado com as drogas, distribuídas em diluições seriadas. Posteriormente, as placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas. Para a AMB e geraniol a concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada como aquela capaz de inibir 100% do crescimento fúngico. Já para FLC, ITR e CAS, a CIM foi definida como a menor concentração capaz de reduzir em 50% o crescimento fúngico. Foi utilizado *Candida parapsilosis* ATCC 22019 como controle de qualidade (BRILHANTE *et al.*, 2018). Para determinar a concentração fungicida mínima (CFM) do geraniol, uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  baseada na CIM<sub>100</sub> e as demais acima de cada cepa foi retirada e cultivada em placas contendo meio BDA a 35 °C por 48 horas. As colônias foram contadas para determinar o número de unidades formadoras de colônias (UFC  $\text{mL}^{-1}$ ) em cada concentração, sendo considerada a concentração fungicida mínima (CFM) a partir de placas que apresentassem  $\leq 1$  colônia ou não apresentassem crescimento fúngico (TAKAHAGI-NAKAIRA, 2009).

## 5.3 Formação de biofilmes e sensibilidade de biofilmes maduros *in vitro*

Para avaliação da capacidade de formação de biofilme dos isolados, as cepas foram cultivadas em ágar batata dextrose (BDA) e incubadas por 48h a 35°C. O inóculo foi ajustado para 1,0 na escala McFarland (equivalente a  $3,0 \times 10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ) em meio RPMI-1640. Aliquotas de 200  $\mu\text{l}$  foram transferidas para placas de poliestireno de 96 poços de fundo plano, em triplicata, que foram incubadas a 35 °C por 48 horas e depois lavadas com solução

salina tamponada com fosfato (PBS) para remoção de células não aderentes. Posteriormente, os biofilmes foram fixados com 100 µl de metanol 100%. Em seguida, foram adicionadas alíquotas de 100 µl de cristal violeta 0,3% por 20 min a 25 °C. Posteriormente, a solução corante foi aspirada e os poços foram lavados duas vezes com 200 µl de água destilada estéril e foram adicionados 150 µl de ácido acético a 33% por 30s. Por fim, o volume foi transferido para outra placa e lido em espectrofotômetro a 540 nm para obtenção dos valores de densidade óptica (DO). Os valores de corte (DOc) para o ensaio de formação de biofilme foram definidos como três desvios padrão acima da DO média do controle negativo. As cepas foram classificadas como não produtoras de biofilme ( $OD \leq ODc$ ), produtoras fracas ( $ODc < OD \leq 2xODc$ ), produtoras moderadas ( $2xODc < OD \leq 4xODc$ ) ou produtoras fortes ( $OD > 4xODc$ ) (CORDEIRO et al., 2015)

Para determinar a suscetibilidade dos biofilmes maduros, as drogas foram diluídas em RPMI-1640 e adicionados aos biofilmes maduros novamente formados conforme descrito anteriormente, com concentrações padronizadas para cada cepa, seguindo: CIM/4 (64-128 µg mL<sup>-1</sup>), CIM/2 (128- 256 µg mL<sup>-1</sup>), CIM (256-512 µg mL<sup>-1</sup>), CIM2x (512-1024 µg mL<sup>-1</sup>) e CIM4x (1024-2048 µg mL<sup>-1</sup>). As placas foram novamente incubadas a 35°C por 48h. A atividade metabólica dos biofilmes foi quantificada pelo ensaio de redução com brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio (MTT) e a densidade óptica (DO) foi lida em espectrofotômetro a 630 nm. Para avaliar a biomassa, os biofilmes foram fixados com 100 µl de metanol 100% e o teste com cristal violeta foi realizado conforme descrito anteriormente. Por fim, o volume foi transferido para outra placa e a DO foi lida em espectrofotômetro a 540 nm. Observou-se uma redução na atividade metabólica e na biomassa a partir da DO média de cada concentração em comparação com o controle livre de droga. Todo o experimento de suscetibilidade antifúngica foi conduzido em duplicata. (BRILHANTE et al., 2018; CASTELO-BRANCO et al., 2021).

#### **5.4 Interação do geraniol com fármacos antifúngicos**

O teste de interação do geraniol com fármacos antifúngicos foi realizado por microdiluição em caldo utilizando a metodologia *checkerboard* (SINGH et al., 2019). Foi escolhido 3 cepas de cada espécie e um antifúngico de cada classe para os testes de interação, sendo as combinações: geraniol + fluconazol, geraniol + anfotericina b e geraniol + caspofungina. Inicialmente, 50 µL de RPMI-1640 foram distribuídos em uma placa de fundo em U de 96 poços. Na primeira coluna foi colocada uma alíquota de 50 µL do antifúngico

clássico, em concentração 8x maior que o padrão (AMB: 128  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; FLC: 512  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; CAS: 64  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) e em seguida, diluído horizontalmente em faixa padronizada (AMB: 0,0313 a 16  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; CAS: 0,01625 a 8  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; FLC: 0,125 a 64  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). O geraniol foi diluído verticalmente nas concentrações de 16 a 1025  $\mu\text{g ml}^{-1}$  e em seguida, uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  foi adicionada às colunas da placa inicial, formando uma combinação de todas as concentrações da faixa. Posteriormente, colônias foram suspensas em solução salina estéril (0,9%) e a suspensão obtida foi ajustada até atingir a turbidez equivalente a 0,5 na escala de McFarland (equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ). A suspensão obtida foi novamente diluída nas proporções 1:50 e 1:20 em meio RPMI para obtenção de um inóculo, sendo adicionado alíquotas de 100  $\mu\text{l}$  do mesmo. O controle positivo livre de drogas e o controle negativo (somente o meio de cultura) foram realizados na última coluna do quadro. A placa foi incubada por 24-48h a 35°C e a leitura visual das concentrações inibitórias mínimas (CIM<sub>50%</sub> e CIM<sub>100%</sub>) foi realizada em ambos os tempos. Para determinar se houve sinergismo foi realizado o cálculo do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF), sendo  $\text{ICIF} = \text{CIF}_A + \text{CIF}_B$  (Figura 7), onde  $\text{CIF}_A$  é a CIM do antifúngico clássico em combinação dividido pela CIM da droga A isolada (controle), e  $\text{CIF}_B$  é a CIM do geraniol em combinação/geraniol CIM isolado. Combinações com  $\text{ICIF} \leq 0,5$  são consideradas sinérgicas, enquanto aquelas com  $1 > \text{ICIF} > 0,5$  são consideradas aditivas, aquelas com  $1,0 < \text{ICIF} \leq 4$  são consideradas indiferentes e aquelas com  $\text{ICIF} > 4$  são classificadas como antagônicas (ODDS, 2003).

**Figura 7:** Cálculo do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF). Fonte: CEMM

$$\text{ICIF} = \text{CIF}_{C1} + \text{CIF}_{C2} = \frac{\text{CIM}_{a,b}}{\text{CIM}_a} + \frac{\text{CIM}_{b,a}}{\text{CIM}_b}$$

### 5.5 Análise estatística

Foram aplicados testes paramétricos para grupos de dados no qual foram verificadas simetrias e variâncias semelhantes. Na comparação entre esses grupos foi utilizado o teste t de Student ou ANOVA, seguido do teste post hoc de Tukey para análise de dados pareados. Para os grupos de dados em que foi verificada assimetria ou alta dispersão foram utilizados o teste não paramétrico de Wilcoxon ou o teste de Friedman para dados pareados e o teste de Kruskal-Wallis para dados não pareados, ambos seguidos do teste post hoc de Dunn

para comparação entre pares. Em todas as situações, o nível máximo de significância adotado para conclusões afirmativas foi de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Sensibilidade planctônica e atividade fungicida

A sensibilidade de cepas planctônicas ( $n = 18$ ) ao geraniol e aos antifúngicos está apresentada na Tabela 3. O geraniol apresentou atividade inibitória frente as cepas do complexo de espécies *C. parapsilosis*, com os valores de CIM<sub>100%</sub> variando de 256-512  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Para as drogas antifúngicas, os valores de CIM variaram de  $<0,031 - 1,0 \mu\text{g ml}^{-1}$  para anfotericina b,  $0,25 - 4 \mu\text{g ml}^{-1}$  para fluconazol,  $<0,031 - 0,25 \mu\text{g ml}^{-1}$  para itraconazol e  $0,125 - 1 \mu\text{g ml}^{-1}$  para caspofungina. Duas cepas de *Candida metapsilosis* foram sensível dose-dependente (CIM<sub>50</sub>  $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) a FLC, uma *Candida orthopsilosis* foi sensível dose-dependente a FLC e ITC (respectivamente CIM<sub>50</sub>,  $4 \mu\text{g ml}^{-1}$  e  $0,25 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) e 7 cepas foram sensível dose dependente a AMB (respectivamente: 3 *C. parapsilosis*, 3 *C. orthopsilosis* e 1 *C. metapsilosis*)

**Tabela 3.:** Sensibilidade antifúngica de células planctônicas de espécies do complexo *Candida parapsilosis* em comparação ao controle *C. parapsilosis* ATCC 22019, contra fluconazol (CIM<sub>50</sub>), itraconazol (CIM<sub>50</sub>), anfotericina b (CIM<sub>100</sub>), caspofungina (CIM<sub>50</sub>) e geraniol (CIM<sub>100</sub>).

Complexo <i>Candida parapsilosis</i>	n	CIM ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )				
		Fluconazol (n)	Itraconazol (n)	Anfotericina b (n)	Caspofungina (n)	Geraniol (n)
<i>C. parapsilosis strictu sensu</i>	7	0.25 (1)	$<0.031$ (3)	0.062 (1)	0.5 (1)	256 (3)
		0.5 (3)	0.031 (4)	0.125 (1)	1 (6)	512 (4)
		1 (3)		0.25 (1) 0.5 (1) 1 (3) <sup>D</sup>		
<i>C. metapsilosis</i>	6	0.5 (1)	$<0.031$ (2)	0.062(1) 0.25 (1)	0.125 (2)	256 (3)
		1 (1)	0.031 (1)	0.5 (1)	0.25 (2)	512 (3)
		2 (3)	0.062 (3)	0.125 (2)	0.5 (1)	
		4 (2) <sup>SDD</sup>		1 (1) <sup>D</sup>	1 (1)	
<i>C. orthopsilosis</i>	5			0.062 (2) 1 (3) <sup>D</sup>	0.25 (1)	256 (3)
		1 (2)	0.062 (2)		0.5 (4)	512 (2)
		2 (2)	0.125 (2)			
		4 (1) <sup>SDD</sup>	0.25 (1) <sup>SDD</sup>			
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019		2	0.062	0.25	0.5	256

SDD, sensível dose dependente; R, resistente; Pontos de interpretação da CIM: fluconazol: 2<sup>S</sup>: sensível, 4<sup>SDD</sup>, 8<sup>R</sup>; itraconazol:  $\leq 0.125$ <sup>S</sup>,  $0.25-0.5$ <sup>SDD</sup>,  $\geq 1$ <sup>R</sup>; anfotericina b: 1<sup>D</sup> sensibilidade reduzida; caspofungina:  $\leq 2$ <sup>S</sup>, 4<sup>SDD</sup>,  $\geq 8$ <sup>R</sup>.

Ao comparar os valores de CIM entre as cepas do complexo, os isolados de *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* apresentaram valores de CIM mais elevados para azóis, em contraste com as cepas de *C. parapsilosis strictu sensu*, que apresentaram valores de CIM mais elevados para anfotericina b e caspofungina. Em relação ao geraniol, as cepas de *C. orthopsilosis* apresentaram os menores valores de CIM em comparação às demais espécies. Ao avaliar a concentração fungicida mínima (CFM) de geraniol, é possível observar menor ( $\leq 1$  colônia) ou ausência de crescimento fúngico no meio de cultivo. Em 5 cepas os valores de CFM estão de acordo com os valores da CIM, enquanto em 13 casos a CFM foi superior ao CIM, conforme demonstrado na Tabela 4.

**Tabela 4.:** Coleção de cepas utilizadas no estudo, com suas respectivas origens e relação entre geraniol CIM<sub>100</sub> e concentração fungicida mínima (CFM), por cepa

Cepa	Espécie	Origem	CIM ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	CFM ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	UFC (UFC mL <sup>-1</sup> )
3H	<i>C. parapsilosis strictu sensu</i>	Veterinária	512	>1024	4.5 x 10 <sup>3</sup>
7H	<i>C. parapsilosis strictu sensu</i>	Veterinária	512	1024	0
32H	<i>C. parapsilosis strictu sensu</i>	Veterinária	256	1024	0
CEMM 01-1-196	<i>C. parapsilosis strictu sensu</i>	Veterinária	512	>1024	-
CEMM 01-1-186	<i>C. parapsilosis strictu sensu</i>	Veterinária	256	512	0
CEMM 01-1-214	<i>C. parapsilosis strictu sensu</i>	Veterinária	512	>1024	3.6 x 10 <sup>3</sup>
9	<i>C. parapsilosis strictu sensu</i>	Ambiental	256	1024	0
13H	<i>C. metapsilosis</i>	Veterinária	512	512	0
CEMM 01-1-208	<i>C. metapsilosis</i>	Humana	256	256	1.0 x 10 <sup>2</sup>
CEMM 01-1-167	<i>C. metapsilosis</i>	Humana	256	256	0
CEMM 01-1-175	<i>C. metapsilosis</i>	Indeterminada	512	512	0
CEMM 01-1-199	<i>C. metapsilosis</i>	Veterinária	512	512	0
CEMM 05-1-054	<i>C. metapsilosis</i>	Humana	256	1024	0
CEMM 05-5-092	<i>C. orthopsilosis</i>	Humana	256	>1024	-
CEMM 01-1-200	<i>C. orthopsilosis</i>	Veterinária	512	1024	0
CEMM 01-1-178	<i>C. orthopsilosis</i>	Veterinária	256	512	0
CEMM 01-1-210	<i>C. orthopsilosis</i>	Veterinária	256	512	0
CEMM 01-1-217	<i>C. orthopsilosis</i>	Humana	256	1024	0

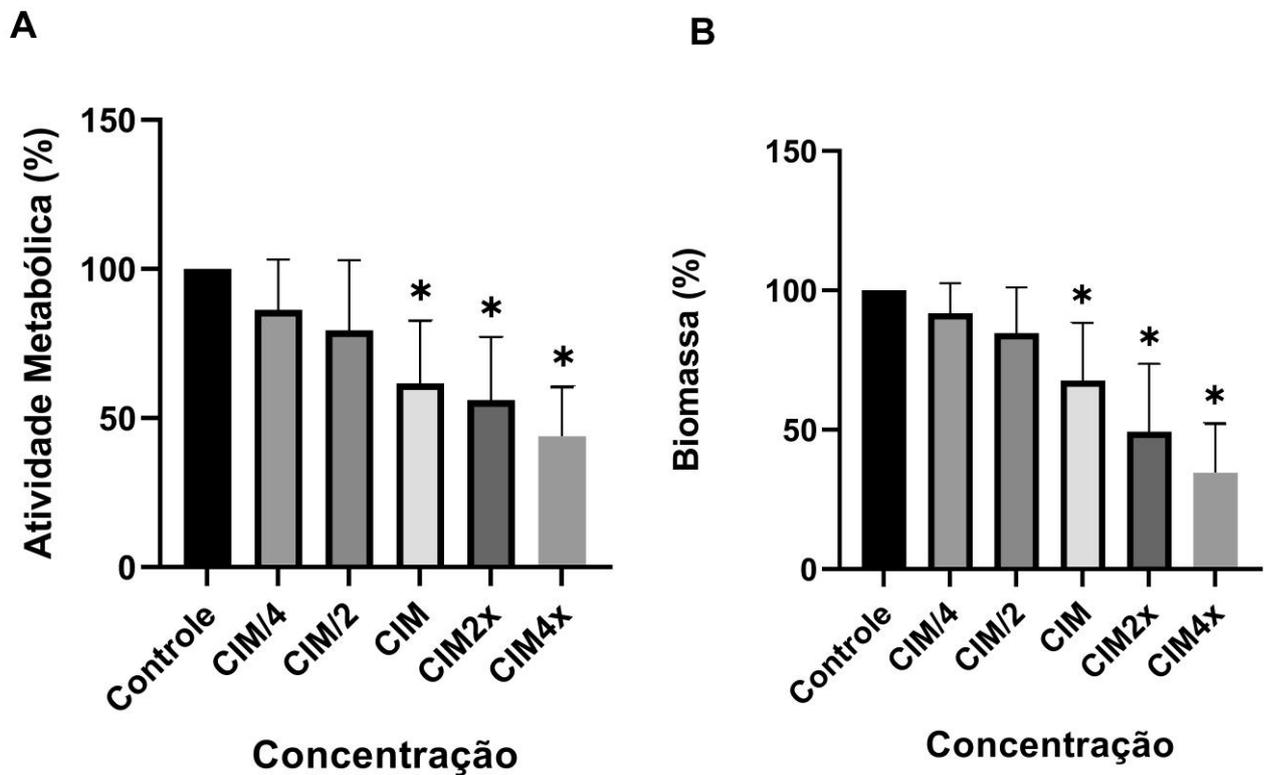
Nota: (-) representa que não foi possível realizar a contagem de unidades formadoras de colônias (>300 colônias)

## 6.2 Formação de biofilmes e sensibilidade de biofilmes maduros *in vitro*

Todas as cepas testadas foram capazes de formar biofilmes, sendo 15 classificadas como formadoras fortes, enquanto 3 cepas (sendo 2 *C. orthopsilosis* e 1 *C. parapsilosis strictu sensu*) foram classificadas como formadoras moderadas.

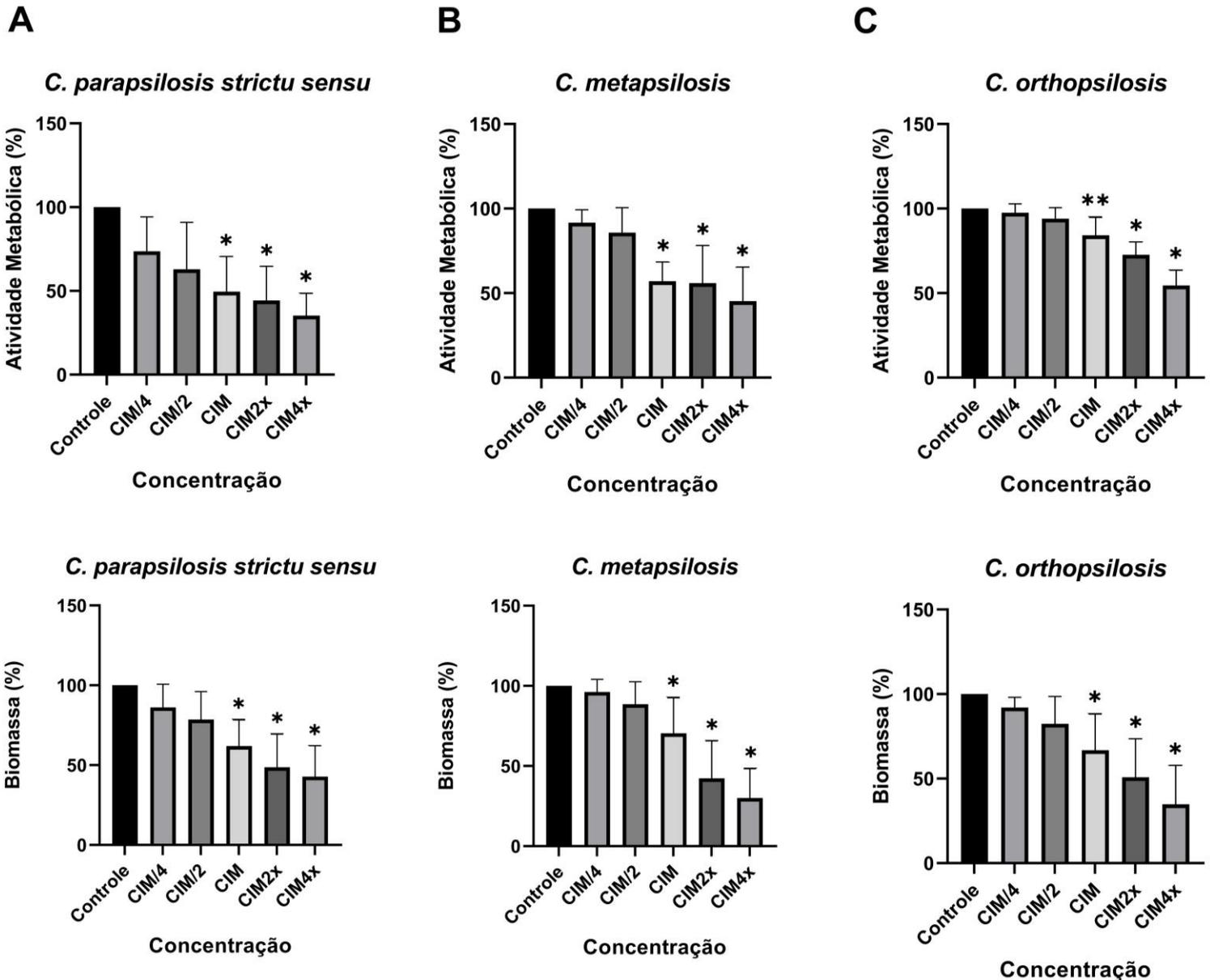
Ao avaliar o efeito do geraniol em biofilmes formados após 48 horas, nos valores de CIM (256-512  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi possível observar redução média da atividade metabólica de 38,33% ( $\pm 20,90\%$ ) e 30,69% ( $\pm 17,37\%$ ) na biomassa total quando comparado ao controle livre de drogas, avaliando em conjunto toda as cepas testadas ( $n = 18$ ). A redução aumenta proporcionalmente a concentração utilizada da droga, com reduções significativas ( $p < 0.05$ ) nas concentrações CIM (256-512  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), CIM2x (512-1024  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e CIM4x (1024-2048  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), conforme observado na Figura 8.

**Figura 8.:** Atividade anti-biofilme do geraniol sobre cepas do complexo *C. parapsilosis*, em conjunto.



Efeitos do geraniol na redução da atividade metabólica (A) e da biomassa (B) em todos os 18 biofilmes maduros agrupados do complexo *C. parapsilosis*, em média. Os valores foram padronizados seguindo os ranges baseados no CIM de cada cepa, com range: CIM/4 (64-128  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), CIM/2 (128- 256  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), CIM (256-512  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), CIM2x (512-1024  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e CIM4x (1024-2048  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A atividade metabólica do biofilme e a redução da biomassa foram comparadas por ANOVA e pós-teste de Tukey. \*Indica diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos expostos ao geraniol e controle de crescimento livre de drogas.

**Figura 9:** Ação do geraniol sobre a atividade metabólica e biomassa de biofilmes, por espécie, do complexo *C. parapsilosis*.



Sensibilidade antifúngica de biofilmes maduros de leveduras do complexo *Candida parapsilosis* (n = 18) ao geraniol e seus efeitos na atividade metabólica e redução de biomassa em concentrações baseadas na MIC: CIM/4 (64-128  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), CIM/2 (128- 256  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), CIM (256-512  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), CIM2x (512-1024  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e CIM4x (1024-2048  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); Em ordem: (A) *Candida parapsilosis strictu sensu* (n = 7), (B) *Candida metapsilosis* (n = 6) e (C) *Candida orthopsilosis* (n = 5). Os dados são expressos pela média dos valores de absorvância normalizados com o controle de crescimento sem droga ( $p < 0,05$ ). A atividade metabólica do biofilme e a redução da biomassa foram comparadas por ANOVA e pós-teste de Tukey. \*Indica diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre espécies do complexo *C. parapsilosis*. \*\* Indica diferenças estatisticamente significativas ( $p = 0,0058$ ), entre a atividade metabólica de *C. orthopsilosis* em comparação com outras espécies do complexo, apresentando maiores valores de DO.

Ao avaliar o efeito dos fármacos em biofilmes formados após 48 horas entre as espécies do complexo *C. parapsilosis* separadamente, o geraniol apresentou redução média, da menor (CIM/4) para a maior concentração (CIM4x), de 34-62% da atividade metabólica e de 17-57% da biomassa de biofilmes da espécie *C. parapsilosis strictu sensu* (n = 7), 8-56% da atividade metabólica e 8-74% da biomassa do biofilme da espécie *C. metapsilosis* (n = 6) e 1-43% da atividade metabólica e 2-76% da biomassa do biofilme das espécies de *C. orthopsilosis* (n = 5), conforme demonstra na Figura 7 anteriormente. Comparando os valores de absorvância (OD) da atividade metabólica e biomassa entre as espécies do complexo, houve um pico de redução da atividade metabólica na faixa de concentração de CIM entre as espécies *Candida parapsilosis strictu sensu* e *Candida metapsilosis*, enquanto os biofilmes de *Candida orthopsilosis* demonstraram menor sensibilidade a redução da atividade metabólica pelo geraniol (p = 0,0058). No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre as espécies ao comparar os valores de absorvância da biomassa em todas as concentrações testadas.

### 6.3 Interação do geraniol com fármacos antifúngicos

Ao comparar a interação entre as combinações de fármacos testadas com geraniol pelos valores do ICIF (n = 9), foi possível observar sinergismo ( $ICIF \leq 0,5$ ) entre as combinações de geraniol/anfotericina b em duas cepas, respectivamente da espécie *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*, enquanto uma única cepa da espécie *C. metapsilosis* apresentou sinergismo ( $ICIF \leq 0,5$ ) com a combinação geraniol/casposfungina após 48 horas de exposição, conforme demonstrado na Tabela 5. 55,6% das cepas testadas foram parcialmente sinérgicas ou aditivos ( $ICIF: 0,5 - 1$ ) a combinação anfotericina b/geraniol, sendo capazes de reduzir drasticamente os valores de CIM do geraniol ( $16 - 512 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), enquanto 22,2% apresentaram-se como indiferentes ( $ICIF: 1 - 4$ ). Estes resultados sugerem uma combinação potencial entre anfotericina b e geraniol contra células do complexo *C. parapsilosis*. Ao observar as interações entre geraniol/casponfungina, apenas 1 indivíduo apresentou sinergismo, enquanto os demais se dividiram entre parcialmente sinérgico ou aditivo (44,5%) e indiferente (44,5%). Em relação ao fluconazol, não foi observado sinergismo e a maioria dos indivíduos foi parcialmente sinérgico ou aditivo (66,7%), enquanto o restante permaneceu classificado indiferente (33,3%), mesmo em cepas sensíveis dose-dependentes. Porém, houve grande redução dos valores de CIM<sub>50</sub> do fluconazol ( $0,125 - 4 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) na inibição completa das células em combinação com o geraniol. Ao comparar os

valores do ICIF após 48h, não houve diferença estatística entre as combinações farmacológicas testadas, o mesmo acontecendo ao comparar a diferença entre os valores do FICI após 24h e 48h de exposição. Não foi detectado nenhum antagonismo dentre as combinações teste realizadas.

**Tabela 5:** Concentração inibitória mínima (CIM) do geraniol combinado com os antifúngicos frente as espécies do complexo *Candida parapsilosis* e suas respectivas interpretações baseados no cálculo do ICIF.

Espécies	Concentração inibitória mínima (µg/ml)							Interpretação ICIF		
	Drogas isoladas				Drogas Combinadas			GER/AMB	GER/CAS	GER/FLC
	GER	AMB	CAS	FLC	GER/AMB	GER/CAS	GER/FLC			
<i>Candida parapsilosis</i>	512	1	0,5	1	256/0,031	256/0,031	256/0,125	ADT	ADT	ADT
	256	1	1	1	128/0,031	128/0,031	128/0,125	ADT	ADT	ADT
	512	1	1	1	512/0,031	512/0,031	512/0,125	IND	IND	IND
<i>Candida metapsilosis</i>	512	1	0,125	4	32/0,062	256/0,031	128/2	SIN	ADT	ADT
	512	0,25	1	4	256/0,125	128/0,25	256/0,125	IND	SIN	ADT
	512	0,5	0,125	2	256/0,062	512/0,031	256/0,5	ADT	IND	ADT
<i>Candida orthopsilosis</i>	256	1	0,5	2	32/0,25	256/0,031	128/1	SIN	IND	IND
	512	1	0,5	4	16/0,5	512/0,031	512/0,125	ADT	IND	IND
	512	1	0,5	2	256/0,031	256/0,031	256/0,125	ADT	ADT	ADT

Abreviações: geraniol (GER); anfotericina b (AMB); caspofungina (CAS); fluconazol (FLC); sinergismo (SIN); aditivo (ADT); Indiferente (IND).

## 7. DISCUSSÃO

A crescente resistência aos antifúngicos clássicos em cepas do complexo *Candida parapsilosis* é uma ameaça emergente. Principalmente envolvendo resistência aos azólicos, além de elevados valores de CIM para equinocandinas, tendo o Brasil uma crescente prevalência desses casos (YAMIN, 2022). Apesar deste estudo não apresentar nenhuma cepa resistente aos antifúngicos clássicos testados, isolados sensíveis dose-dependente requerem uma atenção especial por sua sensibilidade reduzida e necessidade de ajuste na dosagem do medicamento (WILLEMS, 2020), principalmente quanto a anfotericina b, pois mesmo que raramente apresentem-se cepas resistentes, elevadas doses aumentam sua citotoxicidade (CAROLUS, 2020). Com isso, muitos estudos exploram o potencial antimicrobiano de óleos como capim-limão e gerânio, principalmente em sua forma líquida e podendo apresentar atividade antibiofilme sobre importantes fungos de relevância clínica, como cepas de *C. albicans*, tendo ambos óleos o geraniol como principal componente constituinte, destacando

esse potencial antifúngico terpênico (KOHLEERT et al., 2000; ABERS, 2021; GARCIA et al., 2021). Estudos com geraniol isolado já relatam atividades antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias, antitumorais e outras atividades biológicas, mas principalmente seu potencial de diminuir a concentração inibitória mínima de outras drogas em interação (LIRA et al., 2020; KIM, 2022).

Em todos os nossos isolados foi possível determinar a CIM de geraniol capaz de erradicar o crescimento de células planctônicas de espécies do complexo *C. parapsilosis in vitro* na faixa de 256-512  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Dentre os métodos de estudo de compostos farmacológicos, o método de microdiluição em caldo é amplamente utilizado por apresentar muitas vantagens em relação a outros métodos devido à sua alta sensibilidade e maior precisão e exatidão (OSTROSKY et al., 2008) Comparando com outros estudos que utilizaram o mesmo método, as espécies de *Candida* mostraram uma sensibilidade ao geraniol em uma faixa de  $\geq 128 \mu\text{g ml}^{-1}$  (MIRON et al., 2021). Apesar de nossos achados apresentarem valores elevados de CIM, elas ainda apresentaram boa atividade anti-candida isoladamente. A morte celular foi confirmada pelo teste de atividade fungicida (CFM), sendo possível observar um crescimento  $\leq 1$  colônias ou ausência de crescimento fúngico em 14/18 isolados, enquanto apenas três cepas da espécie *C. parapsilosis strictu sensu* e uma espécie de *Candida orthopsilosis* apresentaram crescimento superior a 1 colônia, após 48 horas de plaqueamento. O geraniol é capaz de induzir a morte celular por mecanismos já estudados, como comprometimento da integridade da membrana e da célula (SHARMA, 2016). A morte celular causada pela ação do geraniol foi confirmada pela observação da integridade da membrana ser inversamente proporcional à concentração do monoterpenóide. Esse processo decorre da interação do geraniol com os lipídios da membrana, causando extravasamento do conteúdo intracelular. Estudos também relataram morte celular induzida por mecanismo de apoptose em leveduras, como em *Saccharomyces cerevisiae*. Observou-se que cepas mutantes com deleção no gene YCA1, responsável pela via apoptótica dependente de metacaspases, apresentaram maior tolerância ao geraniol (SCARIOT, 2021).

A formação de biofilmes resistentes é o maior desafio na busca por antimicrobianos, e compostos com atividade anti-biofilme fornecem objetos de estudo promissores (MIRON et al., 2021). Em particular, mesmo os microrganismos sensíveis que são erradicados pela ação de fármacos na sua forma planctônica, podem apresentar resistência ao atingir o estado de biofilme maduro (CORZO-LEON et al., 2021). No complexo *C. parapsilosis*, apenas uma série de sequências semelhantes à aglutinina (Als) presentes nas pseudo-hifas, que juntamente

com o gene ortólogo CaAls7, são responsáveis induzir fatores determinantes para a adesão dos biofilmes do complexo *C. parapsilosis* a muitas superfícies diferentes (BERTINI et al., 2016; NAELE et al., 2018), ressaltando a importância de compostos capazes de erradicar essas estruturas. Nosso estudo demonstrou que mesmo em biofilmes maduros (após 48h de crescimento) de cepas do complexo *C. parapsilosis*, houve uma redução significativa na atividade metabólica e na biomassa dos biofilmes em todas as cepas sob ação do geraniol isoladamente, podendo reduzir em média 38,33% ( $\pm 20,90\%$ ) na atividade metabólica e 30,69% ( $\pm 17,37\%$ ) da biomassa na concentração CIM. Esta redução continua progressivamente em concentrações acima dos valores da CIM, podendo atingir a redução de até 62% da atividade metabólica e 76% na biomassa de biofilmes maduros ( $p < 0,05$ ) na maior concentração testada (CIM4x). Características como atividade metabólica e biomassa aliadas à microscopia são fatores determinantes para o estudo de biofilmes maduros. Essas condições podem afetar fatores essenciais como adesão e expressão gênica, tornando essencial a observação da atividade do composto no microrganismo (BRILHANTE et al., 2018; KOT, 2020). Estes resultados confirmam uma potencial atividade anti-biofilme do geraniol contra cepas do complexo *Candida parapsilosis*, tanto na redução da biomassa, quanto na redução da atividade metabólica. O potencial anti-biofilme também foi observado em outras espécies de *Candida* (SINGH, 2019; GUPTA, 2021).

Apesar dos elevados valores na redução da atividade metabólica, os biofilmes de *C. parapsilosis strictu sensu* foram os mais resilientes ao geraniol, com redução de 17-57% da biomassa total. Embora os biofilmes de *C. parapsilosis strictu sensu* sejam mais resistentes ao geraniol e aos antifúngicos, as cepas da espécie *C. orthopsilosis* foram significativamente menos sensíveis à redução da atividade metabólica pela ação do geraniol ( $p = 0,0058$ ) na concentração de CIM, indicando um possível mecanismo de resistência aos efeitos fungistáticos do geraniol em biofilmes de *C. orthopsilosis*. Porém, o mesmo não foi observado na redução da biomassa entre espécies. Apesar das diferenças entre as espécies ainda serem discutidas, outros trabalhos observaram distinções entre a composição dos biofilmes complexos de espécies, onde *C. parapsilosis strictu sensu* produziu biofilmes cada vez mais espessos com composição predominante de pseudohifas, enquanto indivíduos da espécie *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* apresentaram biofilmes finos com predomínio de blastoconídios (BRILHANTE et al., 2018).

Ao avaliar as interações com outros antifúngicos, o geraniol apresentou sinergismo quando combinado com a anfotericina b, sendo capaz de reduzir os valores de CIM da

anfotericina b ( $0,031 - 1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) e a CIM do geraniol ( $16 - 512 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), com apenas 22,2% de sendo as amostras indiferentes à combinação AMB/GER. A interação de geraniol e caspofungina mostrou-se um aditivo na maioria das cepas testadas, com apenas uma cepa da espécie *C. metapsilosis* apresentando sinergismo (ICIF = 0,5). Apesar de apresentar 44,5% das cepas como aditivo e um único isolado sinérgico, o geraniol foi capaz de reduzir consideravelmente a CIM da caspofungina ( $0,031 - 1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), demonstrando potencial a ser explorado em combinação com equinocandinas contra cepas do complexo *C. parapsilosis*. Quanto à combinação geraniol e fluconazol, a maioria foi aditiva (66,7%), sendo que apenas uma parcela menor foi caracterizada como indiferente em cepas do complexo *Candida parapsilosis*. O sinergismo que leva à redução dos valores da CIM permite que concentrações mais baixas do medicamento se tornem eficazes nas terapias (KHAN, 2012). Em nosso estudo, comparamos a interação do geraniol com um medicamento de cada classe de antifúngicos clássicos. O fluconazol atua bloqueando a biossíntese do ergosterol, enquanto a caspofungina atua inibindo a síntese da parede celular. Contudo, a anfotericina b distingue-se pela sua atividade fungicida, uma vez que o seu mecanismo de ação consiste na ligação ao ergosterol, seguida de perfuração e rompimento da membrana fúngica (VAZQUEZ, 2003; CAMPOY e ADRIO, 2017). A perfuração da membrana promovida pela ação da anfotericina b leva à formação de poros na célula, que podem atuar como facilitadores para a entrada de outras drogas (FERNANDES, 2020). Contudo, o mesmo mecanismo de desestabilização da membrana também é observado no geraniol, devido à sua capacidade de aderir aos lipídios da membrana celular do microrganismo e torná-la mais permeável (LIRA et al., 2020). Com base nessas evidências, acredita-se que o sinergismo da anfotericina b com o geraniol ocorreu através de uma ação conjunta na desestabilização da membrana, uma vez que os valores de CIM do geraniol e da anfotericina b foram significativamente reduzidos (até 32x menor), causando ruptura celular em concentrações mais baixas, e levando à sua atividade fungicida contra cepas do complexo *Candida parapsilosis*. Além disso, a eficiente atividade fungicida do geraniol e da anfotericina b contra isolados do complexo *C. parapsilosis* demonstra uma combinação potencial na erradicação de leveduras do complexo *in vitro*.

Já o potencial sinérgico da combinação caspofungina/geraniol e aditivo da combinação fluconazol/caspofungina também se demonstram de grande relevância, reduzindo significativamente os valores de CIM da caspofungina ( $0,031 - 1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) e do fluconazol ( $0,125 - 1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) em valores até 32x menores. A sinergia observada da combinação caspofungina/geraniol também podem ter relação direta a combinação entre seus mecanismos

de ação, onde a caspofungina por ser uma equinocandina, atua inibindo a síntese do (1,3)- $\beta$ -d-glucano (BDG), um importante componente da parede celular fúngica (KATRAGKOU et al., 2019), enquanto o geraniol é capaz de desestabilizar a membrana e permitir a entrada de outros fármacos (LIRA et al., 2020). Baseado nessas evidências, acredita-se que combinações de caspofungina/geraniol potencialize uma atividade fungicida combinada com menores valores de CIM pelo desequilíbrio da célula fúngica em suas estruturas essenciais. Esse resultado ressalta a importância de buscar por combinações sinérgicas capazes de diminuir os valores de CIM entre as cepas do complexo *C. parapsilosis*, visto que em comparação a outras espécies de *Candida*, essas apresentam os maiores valores de CIM para equinocandinas (BARANTSEVICH e BARANTSEVICH, 2022). Com um total de 27 testes de interação farmacológica realizados entre o geraniol e outros antifúngicos, dentre as cepas testadas do complexo *C. parapsilosis*, 11,1% apresentaram-se sinérgicas e 51,7% aditivas, sendo apenas 33,3% indiferentes e nenhum antagonismo. Dessa forma, o geraniol apresentou-se como um potencial composto a ser explorado em combinações com outros antifúngicos na erradicação de células planctônicas do complexo *C. parapsilosis*.

## 8. CONCLUSÃO

Por fim, estes resultados demonstram a eficácia da atividade antifúngica do geraniol contra cepas do complexo *Candida parapsilosis in vitro*, sendo capaz tanto de erradicar células planctônicas, quanto reduzir consideravelmente a atividade metabólica e biomassa em biofilmes formados. O potencial fungicida foi confirmado mesmo em cepas dose-dependentes ou com sensibilidade reduzida a antifúngicos clássicos. Além disso, seu sinergismo com a anfotericina b e caspofungina, aliado de sua atividade aditiva com fluconazol podem ser estratégias promissoras a serem exploradas. Contudo, por tratar-se de um estudo *in vitro*, torna-se necessário mais estudos para compreender os seus possíveis mecanismos de interação e aplicações terapêuticas.

## 9. REFERÊNCIAS

- ABERS, M., SCHROEDER, S., GOELZ, L., SULSER, A., ST. ROSE, T., PUCHALSKI, K., & LANGLAND, J. Antimicrobial activity of the volatile substances from essential oils. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 21, n.1, p.1–14, 2021.
- ALBY, K. & BENNETT, R. J. Sexual reproduction in the *Candida* clade: cryptic cycles, diverse mechanisms, and alternative functions. **Cell Mol Life Sci**. v. 67, n.19, p.3275–3285, 2010.
- AOKI, W., KITAHARA, N., MIURA, N., MORISAKA, H., YAMAMOTO, Y., KURODA, K., & UEDA, M. Comprehensive characterization of secreted aspartic proteases encoded by a virulence gene family in *Candida albicans*. **The Journal of Biochemistry**. v.150, n.4, p.431–438, 2011.
- ARENDRUP, M. C. *Candida* and Candidaemia: Susceptibility and Epidemiology. **Dan Med J**. v.60, n.11, 2013.
- ASHFORD, B. Certain conditions of the gastrointestinal tract in Puerto Rico and their relation to tropical sprue. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.8, p. 507–538, 1928.
- BANERJEE, M.; LAZZELL, A.L.; ROMO, J.A.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; KADOSH, D. Filamentation is associated with reduced pathogenicity of multiple non-albicans *Candida* species. **mSphere**. 2019.
- BARANTSEVICH, N.; BARANTSEVICH, E. Diagnosis and Treatment of Invasive Candidiasis. **Antibiotics**, v.11, p.718, 2022.
- BARCHIESI F, ORSETTI E, OSIMANI P, CATASSI C, SANTELLI F et al. Factors related to outcome of bloodstream infections due to *Candida parapsilosis* complex. **BMC Infect Dis**, v.16, p.387–394, 2016.
- BASSETTI, M., GIACOBBE, D. R., VENA, A., & WOLFF, M. Diagnosis and Treatment of Candidemia in the Intensive Care Unit. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v.40, n.4, p.524–539, 2019.
- BERTINI, A., ZOPPO, M., LOMBARDI, L., RIZZATO, C., DE CAROLIS, E., VELLA, A., TORELLI, R., SANGUINETTI, M., & TAVANTI, A. Targeted gene disruption in *Candida parapsilosis* demonstrates a role for CPAR2\_404800 in adhesion to a biotic surface and in a murine model of ascending urinary tract infection. **Virulence**, v. 7, p. 85–97, 2016.
- BONA, E., CANTAMESSA, S., PAVAN, M., NOVELLO, G., MASSA, N., ROCCHETTI, A., BERTA, G., & GAMALERO, E. Sensitivity of *Candida albicans* to essential oils: are they an alternative to antifungal agents? **Journal of Applied Microbiology**, v.121, p.1530–1545, 2016.

BRANCO, J., MIRANDA, I. M., & RODRIGUES, A. G. *Candida parapsilosis* Virulence and Antifungal Resistance Mechanisms: A Comprehensive Review of Key Determinants. **Journal of Fungi**, v. 9, 2023.

BRANDT ME, LOCKHART SR, WARNOCK DW. Laboratory Aspects of Medical Mycology. In: Kauffman, CA, Pappas PG, Sobel JD; Dismukes WE. **Essentials of clinical mycology**. 2nd ed. New York: Springer; p.3-27, 2011.

BRILHANTE, R.S., RODRIGUES, T. J., CASTELO-BRANCO, D. S., TEIXEIRA, C.E., MACEDO, R.B., BANDEIRA, S.P., ALENCAR, L.P., MONTEIRO, A.J., CORDEIRO, R. A, BANDEIRA, T.J., MOREIRA, J.L., SIDRIM, J.J., ROCHA, M.F. Antifungal susceptibility and virulence attributes of animal-derived isolates of *Candida parapsilosis* complex. **Journal of Medical Microbiology**, v.63, p.1568- 1572, 2014.

BRILHANTE, R.S., MAIA-JÚNIOR, J.E., OLIVEIRA, J.S., GUEDES, G.M., SILVA, A.L., MOURA, F.B., SALES, J.A., CASTELO-BRANCO, D.S., SIDRIM, J.J., CORDEIRO, R.A., PEREIRA-NETO, W.A., ROCHA, M.F. Yeasts from the microbiota of bats: a focus on the identification and antimicrobial susceptibility of cryptic species of *Candida*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, p. 1225-1228, 2016

BRILHANTE, R.S., SALES, J.A., SILVA, M.L., OLIVEIRA, J.S., PEREIRA, L.A., PEREIRA-NETO, W.A., CORDEIRO, R.A., SIDRIM, J.J., CASTELO-BRANCO, D.S., ROCHA, M.F. Antifungal susceptibility and virulence of *Candida parapsilosis* species complex: an overview of their pathogenic potential. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, p.903-914, 2018

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

CAROLUS, H., PIERSON, S., LAGROU, K., & VAN DIJCK, P. Amphotericin b and other polyenes—discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. **Journal of Fungi**, v. 6, p. 1–20, 2020.

CASTELO-BRANCO, D. DE S. C. M., DA GRAÇA-FILHO, R. V., DE OLIVEIRA, J. S., DA ROCHA, M. G., ARAÚJO, G. D. S., DE ARAÚJO NETO, M. P., CORDEIRO, R. DE A., PEREIRA-NETO, W. DE A., SIDRIM, J. J. C., BRILHANTE, R. S. N., & ROCHA, M. F. G. Yeast microbiota of free-ranging amphibians and reptiles from caatinga biome in ceará state, northeast brazil: High pathogenic potential of *Candida famata*. **Ciencia Rural**, v.51, 2021.

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. *Candida* Biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. **Frontiers in Medicine**, p.1–15. 2018.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts— 4th ed. CLSI standard M27. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA. 2017.

CHOW, J. K., GOLAN, Y., RUTHAZER, R., KARCHMER, A. W., CARMELI, Y., LICHTENBERG, D., CHAWLA, V., YOUNG, J., & HADLEY, S. Factors associated with candidemia caused by non-albicans *Candida* species versus *Candida albicans* in the intensive care unit. **Clinical Infectious Diseases**, v.46, p.1206–1213, 2008.

COLOMBO, A. L., GUIMARÃES, T., CAMARGO, L. F. A., RICHTMANN, R., DE QUEIROZ-TELLES, F., SALLES, M. J. C., DA CUNHA, C. A., YASUDA, M. A. S., MORETTI, M. L., & NUCCI, M. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.17, n.3, p.283–312, 2013.

CORDEIRO, R., OLIVEIRA, J. S., CASTELO-BRANCO, D. DE S. C. M., TEIXEIRA, C. E. C., DE FARIAS MARQUES, F. J., BITTENCOURT, P. V., CARVALHO, V. L., BANDEIRA, T. DE J. P. G., BRILHANTE, R. S. N., MOREIRA, J. L. B., PEREIRA-NETO, W. A., SIDRIM, J. J. C., & ROCHA, M. F. G. *Candida tropicalis* isolates obtained from veterinary sources show resistance to azoles and produce virulence factors. **Medical Mycology**, v. 53, n.2, p.145–152, 2015.

CORDEIRO, R.A., SALES, J.A., CASTELO-BRANCO, D.S., BRILHANTE R.S.N., PONTE, Y.B., ARAÚJO, G. S., MENDES, P.B., PEREIRA, V.S., ALENCAR, L.P., PINHEIRO, A.Q., SIDRIM, J.J., ROCHA, M.F. *Candida parapsilosis* complex in veterinary practice: A historical overview, biology, virulence attributes and antifungal susceptibility traits. **Veterinary Microbiology**, v.212, p. 22-30, 2017

CORDEIRO, R. A., SALES, J. A., PONTE, Y. B. D., MENDES, P. B. L., SERPA, R., EVANGELISTA, A. J., ALENCAR, L. P. D., PEREIRA-NETO, W. DE A., BRILHANTE, R. S. N., SIDRIM, J. J. C., CASTELO-BRANCO, D. S. C. M., & ROCHA, M. F. G. (2018). Phenotype-driven strategies for screening *Candida parapsilosis* complex for molecular identification. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.49, p.193–198, 2018.

CORZO-LEON, D. E., PEACOCK, M., RODRIGUEZ-ZULUETA, P., SALAZAR-TAMAYO, G. J., & MACCALLUM, D. M. General hospital outbreak of invasive candidiasis due to azole-resistant *Candida parapsilosis* associated with an Erg11 Y132F mutation. **Medical Mycology**, v. 59, p. 664–671, 2021.

DEORUKHKAR, S. C., SAINI, S., & MATHEW, S. Non- albicans *Candida* infection: An emerging threat. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, 2014.

DOI, A. M., PIGNATARI, A. C. C., EDMOND, M. B., MARRA, A. R., CAMARGO, L. F. A., SIQUEIRA, R. A., DA MOTA, V. P., & COLOMBO, A. L. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. **PLoS ONE**, v.11, p.1–9, 2016.

ESPINOSA-HERNÁNDEZ, V. M., MORALES-PINEDA, V., & MARTÍNEZ-HERRERA, E. Skin Infections Caused by Emerging *Candida* Species. **Current Fungal Infection Reports**, v. 14, p. 99–105, 2020.

FERNANDES, K. E., WEEKS, K., & CARTER, D. A. Lactoferrin is broadly active against yeasts and highly synergistic with amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, 2020.

GARZILLO, C., BAGATTINI, M., BOGDANOVIĆ, L., DI POPOLO, A., IULA, V. D., CATANIA, M. R., RAIMONDI, F., TRIASSI, M., & ZARRILLI, R. Risk factors for

*Candida parapsilosis* bloodstream infection in a neonatal intensive care unit: A case-control study. **Italian Journal of Pediatrics**, v. 43, p. 1–9, 2017.

GARCIA, L. G. S., DA ROCHA, M. G., LIMA, L. R., CUNHA, A. P., DE OLIVEIRA, J. S., DE ANDRADE, A. R. C., RICARDO, N. M. P. S., PEREIRA-NETO, W. A., SIDRIM, J. J. C., ROCHA, M. F. G., VIEIRA, R. S., & BRILHANTE, R. S. N. Essential oils encapsulated in chitosan microparticles against *Candida albicans* biofilms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 621–632, 2021.

GARZONI C, NOBRE VA, GARBINO J. *Candida parapsilosis* endocarditis: a comparative review of the literature. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 2007.

GLASS KA, LONGLEY SJ, BLISS JM, SHAW SK. Protection of *Candida parapsilosis* from neutrophil killing through internalization by human endothelial cells. **Virulence**, v. 6, p. 504–514, 2015.

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

GUPTA, P., GUPTA, H., & POLURI, K. M. Geraniol eradicates *Candida glabrata* biofilm by targeting multiple cellular pathways. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, p. 5589–5605, 2021.

HIBBETT, D. S., BINDER, M., BISCHOFF, J. F., BLACKWELL, M., CANNON, P. F., ERIKSSON, O. E., et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v.111, p. 509–547, 2007

HIBBETT, D., BLACKWELL, M., JAMES, T. J., & SPATAPHORA, J. Phylogenetic taxon definitions for Fungi. **IMA Fungus**, v. 9, n. 2, p. 291–298, 2018.

IOANNOU, P. *et al.* *Candida parapsilosis* endocarditis. Report of cases and review of the literature. **Germs**, v. 10, n. 3, p. 254–259, 2020a

IOANNOU, P., PAPAITSOU, I., & KOFTERIDIS, D. P. Fungal endocarditis in transplant recipients: A systematic review. **Mycoses**, v. 63, p. 952–963, 2020b.

KADOSH, D., & MUNDODI, V. A re-evaluation of the relationship between morphology and pathogenicity in *Candida* species. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p.16–18, 2020.

KANNAPPAN, A., BALASUBRAMANIAM, B., RANJITHA, R., SRINIVASAN, R., PACKIAVATHY, I. A. S. V., BALAMURUGAN, K., PANDIAN, S. K., & RAVI, A. V. *In vitro* and *in vivo* biofilm inhibitory efficacy of geraniol-cefotaxime combination against *Staphylococcus* spp. **Food and Chemical Toxicology**, p. 322–332, 2019.

KAUFMAN, D., LIKEN, H., & ODACKAL, N. J. Diagnosis, Risk Factors, Outcomes, and Evaluation of Invasive *Candida* Infections. **In Infectious Disease and Pharmacology**. Elsevier Inc. 2019.

KATRAGKOU A, ROILIDES E, WALSH TJ. Role of echinocandins in fungal biofilm-related disease: vascular catheter-related infections, immunomodulation, and mucosal surfaces. **Clin Infect Dis**, v. 6, 2015.

KHAN, M. S. A., MALIK, A., & AHMAD, I. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 50, p. 33–42, 2012.

KIM, C. M., KO, Y. J., LEE, S. B., & JANG, S. J. Adjuvant antimicrobial activity and resensitization efficacy of geraniol in combination with antibiotics on *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **PLoS ONE**, v. 17, p. 1–13, 2022.

KOHLERT C, RENSEN IV, MÄRZ R, SCHINDLER G, GRAEFE EU, VEIT M. Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile Terpenes in animals and humans. **Planta Med**, v. 66, n. 6, p. 495–505, 2000.

KOT, B., SYTYKIEWICZ, H., SPRAWKA, I., & WITESKA, M. Effect of Trans cinnamaldehyde on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation: Metabolic activity assessment and analysis of the biofilm-associated genes expression. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, 2020.

KRANEVELD, E. A., BUIJS, M. J., BONDER, M. J., VISSER, M., KEIJSER, B. J. F., CRIELAARD, W., & ZAURA, E. The relation between oral candida load and bacterial microbiome profiles in dutch older adults. **PLoS ONE**, v.7, p.1–8, 2012.

KUHN, D. M., GEORGE, T., CHANDRA, J., MUKHERJEE, P. K., & GHANNOUM, M. A. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: Unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 1773–1780, 2002.

LIN, D., L. C. WU, M. G. RINALDI, AND P. F. LEHMANN. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1815–1821, 1995.

LIRA, M. H. P. DE, ANDRADE JÚNIOR, F. P. DE, MORAES, G. F. Q., MACENA, G. DA S., PEREIRA, F. DE O., & LIMA, I. O. Antimicrobial activity of geraniol: an integrative review. **Journal of Essential Oil Research**, v.32, p.187–197, 2020.

LOPES, J. P.; LIONAKIS, M. S. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Virulence**, v. 13, p. 89–121, 2022.

LUND, R. G., DA SILVA NASCENTE, P., ETGES, A., RIBEIRO, G. A., ROSALEN, P. L., & DEL PINO, F. A. B. Occurrence, isolation and differentiation of *Candida* spp. and prevalence of variables associated to chronic atrophic candidiasis: Original article. **Mycoses**, v. 53, p. 232–238, 2010.

MBA, I. E., & NWEZE, E. I. Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 39, p. 1797–1819, 2020.

MIRON, D., BATTISTI, F., SILVA, F. K., LANA, A. D., PIPPI, B., CASANOVA, B., GNOATTO, S., FUENTEFRIA, A., MAYORGA, P., & SCHAPOVAL, E. E. S. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 660–667, 2014.

MONROE, D. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. **PLoS Biology** v.5, p.11, 2007.

NAZZARO, F., FRATIANNI, F., COPPOLA, R., & DE FEO, V. Essential oils and antifungal activity. **Pharmaceuticals**, v. 10, p. 1–20, 2017.

NEALE, M. N., GLASS, K. A., LONGLEY, S. J., KIM, D. J., LAFORCE-NESBITT, S. S., WORTZEL, J. D., SHAW, S. K., & BLISS, J. M. Role of the inducible adhesin CpAls7 in binding of *Candida parapsilosis* to the extracellular matrix under fluid shear. **Infection and Immunity**, v. 86, 2018.

ODDS, F.C. Synergy, Antagonism, and What the Chequerboard Puts between Them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, 2003.

OSTROSKY, E.A., MIZUMOTO M.K., LIMA M.E.L., KANEKO T. M., NISHIKAWA S.O., FREITAS B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira De Farmacognosia**, v. 18, p. 301–307, 2008.

PAMMI, M., HOLLAND, L., BUTLER, G., GACSER, A., & BLISS, J. M. *Candida parapsilosis* Is a Significant Neonatal Pathogen. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 32, p. 206–216, 2013.

PEREIRA, R., DOS SANTOS FONTENELLE, R. O., DE BRITO, E. H. S., & DE MORAIS, S. M. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v.131, p.11–22, 2021.

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

ROBL, D., THIMOTEO, S.S., DE SOUZA, G.C., BEUX, M.R., DALZOTO, P.R., PINHEIRO, R.L., PIMENTEL, I.C. Occurrence of *Candida orthopsilosis* in Brazilian tomato fruits (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Brazilian of Journal Microbiology**, v. 45, p. 105-109, 2014.

SASANI E, KHODAVAISSY S, AGHA KUCHAK AFSHARI S, DARABIAN S, REZAIIE S. Pseudohyphae formation in *Candida glabrata* due to CO2 exposure. **Curr Med Mycol**, v. 2, p. 49-52, 2016.

SCARIOT, F. J., PANSERA, M. S., DELAMARE, A. P. L., & ECHEVERRIGARAY, S. Citral and geraniol induce necrotic and apoptotic cell death on *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 1–10, 2021.

SIDRIM, J.J., CARVALHO, V.L., CASTELO-BRANCO, D.S., BRILHANTE, R.S., GUEDES, G.M., BARBOSA, G.R., LAZZARINI, S.M., OLIVEIRA, D.C., DE

MEIRELLES, A.C., ATTADEMO, F.L., FREIRE, A.C., PEREIRA-NETO, W. A., CORDEIRO, R.A., MOREIRA, J.L., ROCHA, M.F. Antifungal resistance and virulence among *Candida* spp. from captive Amazonian manatees and west Indian manatees: potential impacts on animal and environmental health. **Ecohealth**, v. 13, p.328-338, 2016

SIDRIM, J. J. C., DE MARIA, G. L., PAIVA, M. DE A. N., ARAÚJO, G. DOS S., DA GRAÇA-FILHO, R. V., DE OLIVEIRA, J. S., SALES, J. A., PEREIRA-NETO, W. A., GUEDES, G. M. DE M., CASTELO-BRANCO, D. DE S. C. M., CORDEIRO, R. DE A., BRILHANTE, R. S. N., & ROCHA, M. F. G. Azole-Resilient Biofilms and Non-wild Type *C. albicans* Among *Candida* Species Isolated from Agricultural Soils Cultivated with Azole Fungicides: an Environmental Issue? **Microbial Ecology**, v. 82, p. 1080–1083, 2021.

SILVA, S., NEGRI, M., HENRIQUES, M., OLIVEIRA, R., WILLIAMS, D. W., & AZEREDO, J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. **Trends in Microbiology**, v. 19, p. 241–247, 2011.

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

SINGH, S., FATIMA, Z., AHMAD, K., & HAMEED, S. Fungicidal action of geraniol against *Candida albicans* is potentiated by abrogated CaCdr1p drug efflux and fluconazole synergism. **PLoS ONE**, v. 13, p. 1–26, 2019.

SHABAN, S., PATEL, M., & AHMAD, A. Improved efficacy of antifungal drugs in combination with monoterpene phenols against *Candida auris*. **Scientific Reports**, v. 10, p. 1–8, 2020.

SHARMA, Y., KHAN, L. A., & MANZOOR, N. Anti-*Candida* activity of geraniol involves disruption of cell membrane integrity and function. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 26, p. 244–254, 2016.

TAKAHAGI-NAKAIRA, E., SUGIZAKI, M. F., & PERAÇOLI, M. T. S. Microdilution procedure for antifungal susceptibility testing of *Paracoccidioides brasiliensis* to amphotericin b and itraconazole. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v.15, n.4, p.718–731, 2009.

TALAPKO, J., JUZBAŠIĆ, M., MATIJEVIĆ, T., PUSTIJANAC, E., BEKIĆ, S., KOTRIS, I., & ŠKRLEC, I. *Candida albicans*-the virulence factors and clinical manifestations of infection. **Journal of Fungi**, v.7, n. 2, p.1–19., 2021.

TAN, W., DORA, A., LLURI, G., & ABOULHOSN, J. *Candida Parapsilosis* Endocarditis Following Transcatheter Pulmonary Valve Implantation. **World Journal for Pediatric and Congenital Heart Surgery**, v. 11, p. 112–113, 2020.

TAVANTI, A., DAVIDSON, A. D., GOW, N. A., MAIDEN, M. C., ODDS, F. C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p. 284–292, 2005.

THOMAZ, D. Y., DE ALMEIDA, J. N., LIMA, G. M. E., DE OLIVEIRA NUNES, M., CAMARGO, C. H., DE CARVALHO GRENFELL, R., BENARD, G., & DEL NEGRO, G. M. B. An azole-resistant *Candida parapsilosis* outbreak: Clonal persistence in the intensive care unit of a Brazilian teaching hospital. **Frontiers in Microbiology**, 2018.

THOMPSON, D. S., CARLISLE, P. L., & KADOSH, D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. **Eukaryotic Cell**, v. 10, p. 1173–1182, 2011.

TORTELLI, B. A., LEWIS, W. G., ALLSWORTH, J. E., MEMBER-MENEH, N., FOSTER, L. R., RENO, H. E., PEIPERT, J. F., FAY, J. C., & LEWIS, A. L. Associations between the vaginal microbiome and *Candida* colonization in women of reproductive age. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.222, 2020.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R; CASE, Christine L. Microbiologia. 12 Porto Alegre: Artmed, 935 p., 2017.

TÓTH, R., NOSEK, J., MORA-MONTES, H. M., GABALDON, T., BLISS, J. M., NOSANCHUK, J. D., TURNER, S. A., BUTLER, G., VÁGVÖLGYI, C., & GÁCSER, A. *Candida parapsilosis*: From genes to the bedside. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, 2019.

VAZQUEZ, J. A. Combination antifungal therapy against *Candida* species: The new frontier - Are we there yet? **Medical Mycology**, v. 41, p. 355–368, 2003.

WHALEY, S. G., BERKOW, E. L., RYBAK, J. M., NISHIMOTO, A. T., BARKER, K. S., & ROGERS, P. D. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-albicans *Candida* Species. **Frontiers in Microbiology**, p. 1–12, 2017.

WIJAYAWARDENE, N. N., HYDE, K. D., RAJESHKUMAR, K. C., HAWKSWORTH, D. L., MADRID, H., KIRK, P. M., BRAUN, U., SINGH, R. V., CROUS, P. W., KUKWA, M., LÜCKING, R., KURTZMAN, C. P., YURKOV, A., HAELEWATERS, D., APTROOT, A., THORSTEN LUMBSCH, H., TIMDAL, E., ERTZ, D., ETAYO, J., ... KARUNARATHNA, S. C. Notes for genera: *Ascomycota*. **In Fungal Diversity**, v. 86, 2017.

WILLEMS, H. M. E., AHMED, S. S., LIU, J., XU, Z., & PETERS, B. M. Willems H, Ahmed S, Liu J, Xu Z, Peters B. Vulvovaginal Candidiasis: A Current Understanding and Burning Questions. **J Fungi**, v.2, p. 1-20, 2020.

YAMIN, D., AKANMU, M. H., AL MUTAIR, A., ALHUMAID, S., RABAAN, A. A., & HAJISSA, K. Global Prevalence of Antifungal-Resistant *Candida parapsilosis*: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v.7, 2022.

ZACCHINO, S. A., BUTASSI, E., LIBERTO, M. DI, RAIMONDI, M., POSTIGO, A., & SORTINO, M. Plant phenolics and terpenoids as adjuvants of antibacterial and antifungal drugs. **Phytomedicine**, v. 37, p. 27–48, 2017.