



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA E PATOLOGIA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

LARA ELLOYSE ALMEIDA MOREIRA

**EFEITO *IN VITRO* DO ÁCIDO TÂNICO SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E
BIOFILMES DE *Candida* spp. E SEU MECANISMO DE AÇÃO**

**FORTALEZA
2024**

LARA ELLOYSE ALMEIDA MOREIRA

EFEITO *IN VITRO* DO ÁCIDO TÂNICO SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E
BIOFILMES DE *Candida* spp. E SEU MECANISMO DE AÇÃO

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:
Microbiologia Humana e Animal

Orientadora: Profa. Dra. Cecília Rocha da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre
Júnior.

FORTALEZA

2024

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)

M837e Moreira, Lara Elloyse Almeida.
Efeito in vitro do ácido tânico sobre células planctônicas e biofilmes de *Candida* spp. e seu mecanismo de ação / Lara Elloyse Almeida Moreira. – 2024.
80 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2024.

Orientação: Profa. Dra. Cecília Rocha da Silva.

Coorientação: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Junior.

1. Infecções fúngicas. 2. Resistência fúngica. 3. Candidíases. 4. Biofilme. 5. Ácido Tânico. I. Título.
CDD 616.9

LARA ELLOYSE ALMEIDA MOREIRA

**EFEITO *IN VITRO* DO ÁCIDO TÂNICO SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E
BIOFILMES DE *Candida spp.* E SEU MECANISMO DE AÇÃO**

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:
Microbiologia Humana e Animal

Orientadora: Profa. Dra. Cecília Rocha da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre
Júnior.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Cecília Rocha da Silva (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. João Batista de Andrade Neto
Centro Universitário Christus (Unichristus)

Prof. Dr. Hélcio Silva dos Santos
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

A Deus

Aos meus pais, Luiz Carlos e Tânia

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida e por todas as bênçãos ao longo desta jornada.

À Nossa Senhora, pela luz e pela intercessão em cada etapa.

Aos meus pais, Luiz Carlos e Tânia, por todo o apoio, amor, carinho e esforços.

À minha avó, Elza Almeida (*in memoriam*), por todo amor e sabedoria a mim passados ao longo da vida.

Ao Thierry Mendes, por todo amor, companheirismo e torcida.

À minha orientadora, profa. Dra. Cecília Rocha, pela confiança, paciência, doçura, conselhos e orientação.

Ao meu coorientador, prof. Dr. Hélio Vitoriano, pela confiança, oportunidades e palavras de sabedoria.

Aos professores Dra. Livia Gurgel e Dr. João Batista, pela disponibilidade, colaborações neste trabalho e em minha trajetória profissional. Ao Prof. Dr. Bruno Coêlho, pelas enriquecedoras contribuições.

Aos integrantes do Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas por toda a colaboração neste trabalho. Em especial a Daniel Sampaio, Vitória Farias, Amanda Dias, Janielly Castelo Branco, Tatiana Paiva e Érica Rayanne.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Médica (PPGMM/UFC).

À Central Analítica da Universidade Federal do Ceará, pela viabilização de etapas deste trabalho.

À CAPES, pela manutenção da bolsa de auxílio.

Aos membros desta banca, pela colaboração e disponibilidade.

“E sabemos que todas as coisas contribuem juntamente para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o seu propósito.”

Romanos 8:28

RESUMO

As infecções fúngicas são um emergente problema de saúde pública, principalmente em ambientes nosocomiais e em pacientes imunossuprimidos. *Candida* spp. caracteriza-se como um importante gênero oportunista que, com o passar dos anos, apresenta cada vez mais estirpes resistentes aos tratamentos antifúngicos utilizados. Com a crescente resistência clínica, observa-se uma mudança na epidemiologia das infecções por *Candida*, o que destaca a necessidade de novas estratégias terapêuticas. Nesse contexto, produtos de origem natural se destacam por apresentar relatos na literatura acerca da sua atividade antifúngica *in vitro*, em que os taninos são uma importante classe de destaque. Nesse viés, o ácido tânico é um tanino hidrolisável que apresenta diversas propriedades biológicas já evidenciadas *in vitro*, como antioxidante e anticâncer, além de antimicrobiana frente a vírus, parasitas e bactérias. Contudo, há escassos relatos na literatura sobre sua propriedade antifúngica frente a *Candida* spp. Portanto, o presente estudo teve como finalidade avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do ácido tânico, isolada e associada a antifúngicos comumente utilizados na terapêutica, assim como também, avaliar sua citotoxicidade, sua propriedade antibiofilme e elucidar seu mecanismo de ação frente a cepas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol. A técnica de microdiluição em caldo foi utilizada para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a técnica do *checkerboard* foi utilizada para determinar a interação farmacológica entre o ácido tânico e os antifúngicos. A avaliação da citotoxicidade foi avaliada em células de fibroblastos murinos L929 e seu efeito hemolítico em hemácias de camudongos. Seu mecanismo de ação foi avaliando por ensaios de citometria de fluxo e seu efeito antibiofilme foi avaliado em placas de 96 poços. O ácido tânico apresentou CIMs variando entre 0,06 a 0,5 µg/ml. Os ensaios de interação farmacológica demonstraram que 100% das interações foram indiferentes na combinação de ácido tânico + anfotericina B; 93,75% das interações foram indiferentes e uma cepa apresentou interação antagonista na combinação ácido tânico + itraconazol e a combinação de ácido tânico + fluconazol apresentou 75% de interações indiferentes, 12,5% sinérgicas e 12,5% aditivas. O ácido tânico não apresentou efeitos citotóxicos e hemolíticos nas concentrações em que exerce sua atividade antifúngica. Além disso, indica-se que seu mecanismo de ação é exercido através de uma atividade pró-oxidante, ocorrendo produção de espécies reativas de oxigênio nas células fúngicas, que geram estresse oxidativo, resultando na indução de sinais mediadores de apoptose. Sua atividade antibiofilme ocorre em maiores concentrações, inibindo cerca de 50% do biofilme em concentrações de 128x CIM. Desta forma, o ácido tânico apresenta potencial atividade antifúngica frente a cepas sensíveis e

resistentes ao fluconazol em concentrações seguras, tanto em células planctônicas como em biofilme. Contudo, mais estudos são necessários para promover tais aplicações *in vivo*.

Palavras-chave: Infecções fúngicas. Resistência fúngica. Candidíases. Biofilme. Ácido Tânico

ABSTRACT

Fungal infections are an emerging public health problem, particularly in nosocomial settings and in immunosuppressed patients. *Candida* spp. is characterized as an important opportunistic genus that, over the years, presents more and more strains resistant to the antifungal treatments used. With increasing clinical resistance, a change in the epidemiology of *Candida* infections is observed, which highlights the need for new therapeutic strategies. In this context, products of natural origin stand out for presenting reports in the literature about their *in vitro* antifungal activity, in which tannins are an important class of emphasis. In this context, tannic acid is a hydrolyzable tannin that has several biological properties already demonstrated *in vitro*, such as antioxidant and anticancer, as well as antimicrobial against viruses, parasites and bacteria. However, there are few reports in the literature about its antifungal properties against *Candida* spp. Therefore, the present study aimed to evaluate the *in vitro* antifungal activity of tannic acid, isolated and associated with antifungals commonly used in therapy, as well as evaluating its cytotoxicity, its antibiofilm property and elucidating its mechanism of action against *Candida* spp. sensitive and resistant to fluconazole. The broth microdilution technique was used to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the checkerboard technique was used to determine the pharmacological interaction between tannic acid and antifungals. The evaluation of cytotoxicity was evaluated in L929 murine fibroblast cells and its hemolytic effect on mouse red blood cells. Its mechanism of action was evaluated by flow cytometry assays and its antibiofilm effect was evaluated in 96-well plates. Tannic acid showed MICs ranging from 0.06 to 0.5 µg/ml. Pharmacological interaction tests demonstrated that 100% of interactions were indifferent in the combination of tannic acid + amphotericin B; 93.75% of the interactions were indifferent and one strain showed an antagonistic interaction in the combination of tannic acid + itraconazole and the combination of tannic acid + fluconazole showed 75% of indifferent interactions, 12.5% synergistic and 12.5% additive. Tannic acid did not present cytotoxic and hemolytic effects at the concentrations at which it exerts its antifungal activity. Furthermore, it is indicated that its mechanism of action is exerted through pro-oxidant activity, with the production of reactive oxygen species in fungal cells, which generate oxidative stress, resulting in the induction of signals that mediate apoptosis. Its antibiofilm activity occurs in higher concentrations, inhibiting around 50% of the biofilm at concentrations of 128x MIC. Therefore, tannic acid has potential antifungal activity against strains sensitive and resistant to fluconazole at safe concentrations, both in planktonic cells and in biofilm. However, more studies are needed to promote such applications *in vivo*.

Keywords: Fungal infections; Fungal resistance; Candidiasis; Biofilm; Tannic acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Patogênese da candidíase invasiva	23
Figura 2 – Estágios de formação do biofilme em <i>Candida</i> spp.	30
Figura 3 – Mecanismos dos principais fármacos utilizados em infecções de <i>Candida</i> spp.	33
Figura 4 – Mecanismos moleculares de resistência em <i>Candida</i> spp.	36
Figura 5 – Estrutura química do ácido tânico (AT)	40
Figura 6 - Fluxograma das metodologias empregadas	44
Figura 7 – MEV de Células planctônicas de <i>C. albicans</i> tratadas e não tratadas com ácido tânico.	55
Figura 8 – Ensaio de hemólise do ácido tânico (AT)	56
Figura 9 – Ensaio de citometria do ácido tânico frente <i>C. albicans</i>	58
Figura 10 – Ensaio de citometria do ácido tânico frente <i>C. parapsilosis</i>	59
Figura 11 – Ensaio de citometria do ácido tânico frente <i>C. tropicalis</i>	60
Figura 12 – Efeito de AT sobre biofilmes formados de <i>Candida</i> spp.	61

Figura 13 – Efeito de AT sobre biofilmes em formação de *Candida* spp.

..... 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeitos do AT e dos fármacos antifúngicos frente a cepas de <i>Candida</i> spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol e suas interações.	53
Tabela 2 – Atividade citotóxica de AT em células L929	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5FC	5-flucitosina
ALS	Sequência semelhante a aglutinina
AMB	Anfotericina B
AT	Ácido tânico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FLC	Fluconazol
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionária
IP	Iodeto de propídeo
ISRS	Inibidores Seletivos da Recaptação da Serotonina
ITC	Itraconazol
LABIMAN	Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistentes à Meticilina
MTT	Brometo de difeniltetrazólio[3-(4,5-Dimetiltiazol2-il) -2,5-difeniltetrazolio brometo]
MOPS	Ácido morfolinopropanosulfônico
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PGA30	<i>Predicted Glycosylphosphatidylinositol-anchored</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
Sars-CoV-2	Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	Infecções fúngicas	20
2.2	O gênero <i>Candida</i> spp. e a epidemiologia das infecções associadas	22
2.3	Fatores de virulência de <i>Candida</i> spp.	25
2.3.1	<i>Adesão</i>	25
2.3.2	<i>Mudança fenotípica</i>	26
2.3.3	<i>Enzimas hidrolíticas</i>	27
2.3.4	<i>Biofilmes</i>	28
2.4	Tratamentos antifúngicos para <i>Candida</i> spp.	30
2.5	Resistência fúngica	34
2.6	Novas estratégias terapêuticas	36
2.7	Taninos e suas propriedades antimicrobianas	39
2.7.1	<i>Ácido tânico</i>	40
3	HIPÓTESES	42
4	OBJETIVOS	43
4.1	Objetivo geral	43
4.2	Objetivos específicos	43
5	METODOLOGIA	44
5.1	Obtenção das cepas	44
5.2	Ativos utilizados	45
5.3	Testes de sensibilidade antifúngica	45
5.3.1	Determinação da concentração inibitória mínima dos ativos	45
5.3.2	Efeito das combinações pela técnica da microdiluição em caldo	46
5.3.3	Análise dos dados dos testes de sensibilidade	46
5.4	Visualização das estruturas microscópicas de <i>Candida</i> por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	46
5.5	Inibição da proliferação de células L929	47
5.6	Ensaio de hemólise	47
5.7	Ensaio para detecção de alterações celulares	48
5.7.1	<i>Tratamento de células de Candida spp.</i>	48
5.7.2	<i>Determinação da densidade numérica de células viáveis</i>	48
5.7.3	<i>Avaliação do potencial de despolarização transmembrana ($\Delta\psi_m$)</i>	49
5.7.4	<i>Detecção do potencial de AT em induzir apoptose celular</i>	49
5.7.5	<i>Detecção das espécies reativas de oxigênio</i>	49
5.7.6	<i>Análise dos dados de alteração celular</i>	49
5.8	Ensaio para determinação de atividade contra biofilme de <i>Candida</i> spp.	50
5.8.1	<i>Preparação dos biofilmes de Candida spp.</i>	50
5.8.2	<i>Determinação da atividade do ácido tânico frente aos biofilmes formados de Candida spp.</i>	50
5.8.3	<i>Determinação da atividade do ácido tânico frente aos biofilmes em formação de Candida spp.</i>	50
5.8.4	<i>Análise dos dados dos ensaios de biofilme</i>	50

6	RESULTADOS	52
6.1	Atividade antifúngica de AT frente a cepas sensíveis e resistentes ao fluconazol	52
6.2	Efeito da combinação de AT com antifúngicos	52
6.3	Efeito de AT na morfologia de <i>Candida albicans</i>	54
6.4	Avaliação da citotoxicidade de AT em células L929	56
6.5	Avaliação do ensaio de hemólise	56
6.6	Densidade numérica de células viáveis	57
6.7	Despolarização mitocondrial	57
6.8	Apoptose celular	57
6.9	Formação de EROs	58
6.10	Atividade do AT frente a biofilmes formados de <i>Candida spp.</i>	61
6.11	Atividade do AT frente a biofilmes em formação de <i>Candida spp.</i>	62
7	DISCUSSÃO	63
8	CONCLUSÃO	68
9	REFERÊNCIAS	69

1. INTRODUÇÃO

As infecções emergiram nas últimas décadas como uma importante causa de doenças, especialmente entre indivíduos imunossuprimidos ou hospitalizados com doenças de base grave, causando infecções de alta morbidade e mortalidade (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017). As doenças fúngicas matam mais de 1,5 milhões de indivíduos e afetam mais de um bilhão de pessoas ao redor do mundo (BONGOMIN et al., 2017). No Brasil, as estimativas do Ministério da Saúde, de 2016, sugerem que mais de 3,8 milhões de indivíduos sofram de infecções fúngicas graves (FIOCRUZ, 2019). Além disso, no ano de 2022, a Organização Mundial da Saúde publicou uma lista alertando acerca dos principais patógenos fúngicos emergentes e sua relevância clínica, em que patógenos como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida auris* e *Cryptococcus neoformans*, *Candida glabrata*, *Histoplasma* spp. foram classificados como fungos de fundamental importância clínica (OMS, 2022 ; FISHER; DENNING, 2023).

Neste sentido, *Candida* spp. são os patógenos fúngicos mais comuns das superfícies mucosas, como cavidade oral, trato gastrointestinal e trato geniturinário (DE BARROS, 2020). São capazes de causar doenças, conhecidas como candidíases, que se referem a infecções cutâneas, mucosas e de órgãos profundos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017; PAPPAS et al., 2018). Na presença de fatores de comprometimento da resposta imune, *Candida* spp. pode disseminar-se e invadir a corrente sanguínea, levando a graves infecções oportunistas profundas (PAPPAS et al., 2018).

Um dos principais fatores que contribuem para a virulência de *Candida* spp. é a sua versatilidade em se adaptar a diferentes habitats para crescimento e formação de comunidades microbianas ligadas à superfície, conhecidas como biofilmes (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018; SENEVIRATNE; JIN; SAMARANAYAKE, 2008). Quando os microrganismos apresentam-se desta forma, apresentam menores taxas de crescimento e maior resistência aos tratamentos antimicrobianos, comportando-se de forma muito diferente das células planctônicas (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018; CZECHOWICZ, NOWICKA, GOŚCINIAK, 2022).

O arsenal de medicamentos para estes patógenos é bem menor quando comparado ao de bactérias, principalmente devido à similaridade entre as células eucarióticas fúngicas e de mamíferos (SCORZONI et al., 2016). Desta forma, há dificuldade de se encontrar drogas antifúngicas, e as opções terapêuticas atualmente disponíveis são restritas a poucas classes de

fármacos, em sua maioria, tóxicos e caros (RODRIGUES, 2019). Além disso, as cepas de *Candida* spp. estão se tornando cada vez mais resistentes aos antifúngicos, em que a resistência clínica é definida como a falha em erradicar uma infecção fúngica, apesar da administração de um agente antifúngico com comprovada atividade *in vitro* (PAI et al., 2018). A resistência adquirida em patógenos fúngicos pode ser acelerada por múltiplos fatores, incluindo, a plasticidade genética de um organismo, a existência de cepas hipermutadoras ou pressões ambientais que resultam em cepas que se tornam resistentes a fungicidas agrícolas, levando à resistência cruzada em isolados clínicos (REVIE et al., 2018).

Neste contexto, há uma necessidade urgente de identificação, de desenvolvimento, de validação e de progressão de novas estratégias e abordagens que possam ser utilizadas (QADRI; SHAH ; MIR, 2021). Dentre as alternativas, a utilização de produtos naturais e a combinação de compostos destacam-se como alternativas bastante promissoras. Os produtos naturais podem representar uma alternativa para aumentar a eficiência de medicamentos cuja eficácia é enfraquecida pelo aumento da resistência (GUGLIELMI; PONTECORVI; ROTONDI, 2020). Contudo, o potencial das plantas como fonte de novos medicamentos ainda é pouco explorado (MAHESH; SATISH, 2008). Na associação de compostos, a técnica mais empregada é o método *checkerboard*, com o objetivo de determinar o ICIF (Índice de Concentração Inibitória Fracionária) e averiguar qual o tipo de interação farmacológica existente entre tais agentes (BIDAUD et al., 2021).

Uma das classes de compostos naturais mais estudadas é a dos taninos, em que um dos representantes desta classe é o ácido tânico, um tanino hidrolisável presente em diversas plantas, como o carvalho, o castanheiro e a cicuta (SIENIAWSKA; BAJ, 2017; KAZMAREK, 2020; YAN et al., 2020). O ácido tânico apresenta propriedades antibacterianas (HANCOCK et al., 2010; DONG et al., 2018), antivirais (LIU; CHEN; HAGEDORN, 2015; SHIRASAGO et al., 2019) e antiparasitárias (ALAVINIA et al., 2018). Contudo, poucos estudos reportam acerca de suas propriedades antifúngicas, sendo, portanto, de suma importância investigar tais propriedades tendo em vista a crescente resistência fúngica.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade anti-*Candida in vitro* do ácido tânico na forma planctônica, sua interação farmacológica com os antifúngicos fluconazol, itraconazol e anfotericina B; sua atividade em biofilmes pré-formados e maduros, além de avaliar seus efeitos citotóxicos em células de mamíferos e seu possível mecanismo de ação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Infecções fúngicas

Os fungos são organismos que constituem o reino *Fungi*, uma importante linhagem de eucariontes que apresentam cerca de 3 - 5 milhões de espécies (SISCAR-LEWIN; HUBE; BRUNKE, 2022). São organismos ubíquos que possuem como principal objetivo degradar a matéria orgânica (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017). Além disso, são capazes de colonizar seres humanos, em que os gêneros *Candida*, *Penicillium*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* e *Malassezia* destacam-se como os principais constituintes da micobiota (BELVONCIKOVA et al., 2022).

Entretanto, a partir da década de 1950, a importância clínica das doenças fúngicas aumentou drasticamente. Fatores como a introdução de corticosteróides para o tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias e os avanços na terapia antimicrobiana de amplo espectro alterou o microbioma, aumentando a suscetibilidade a doenças fúngicas, como candidíase orofaríngea e vaginal. Além disso, nesta época houve também importantes avanços nos tratamentos quimioterápicos, o que por sua vez reduz a imunidade e associa-se a doenças fúngicas invasivas, como a aspergilose (CASADEWALL, 2021). Nas décadas de 1980 e 1990, o aumento das infecções fúngicas pôde também ser atribuído à epidemia global do vírus HIV, que ocasionou um aumento do número de pacientes imunodeprimidos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

No contexto da pandemia de COVID-19, foi demonstrado que o vírus pode estar relacionado com um aumento de infecções fúngicas, tendo em vista que infecção por SARS-CoV-2 leva a uma diminuição das células TCD4 e TCD8, resultando em um sistema imunológico debilitado que torna os pacientes mais suscetíveis a contraírem infecções fúngicas. Além disso, a pandemia de COVID-19 pode ter aumentado a transmissão de outras infecções fúngicas nosocomiais (SHARMA et al., 2021). Globalmente, estima-se que as doenças fúngicas matam mais de 1,5 milhões de indivíduos e afetam mais de um bilhão de pessoas ao redor do mundo (BONGOMIN et al., 2017).

Em 2022, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou uma lista alertando sobre os principais patógenos fúngicos emergentes e sua relevância clínica. De fundamental importância destacaram-se *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida auris* e *Cryptococcus neoformans*, seguidos de *Candida glabrata*, *Histoplasma* spp. e fungos

causadores de mucormicose ou micetoma. Além disso, espécies do gênero *Fusarium*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* foram classificados como patógenos de grande importância (OMS, 2022 ; FISHER; DENNING, 2023). Neste sentido, destaca-se que as infecções fúngicas são um problema de saúde pública emergente, em que pesquisas laboratoriais e clínicas devem ser direcionadas a combater a presente problemática.

As infecções fúngicas se iniciam pelo pulmão (por inalação de ar contaminado) ou pela pele (nas unhas e na mucosa), pelo contato direto (por exemplo, através de feridas), e raramente também no trato gastrointestinal, pela ingestão de comida ou água (GISI, 2021). Estas infecções fúngicas são denominadas micoses, e podem ser classificadas a partir do sítio de infecção, em que as micoses superficiais são aquelas limitadas às superfícies da pele e dos pelos, não são destrutivas e possuem apenas importância estética. São causadas por organismos como *Malassezia* spp., *Piedraia hortae* e *Trichosporon* spp (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017). Já as micoses cutâneas são aquelas que ocorrem na camada queratinizada da pele, pêlos e unhas. São capazes de provocar respostas imunes no hospedeiro que geram sintomas, como prurido, descamação, perda de pêlos e lesões arredondadas na pele. As micoses subcutâneas, por sua vez, envolvem as camadas mais profundas da pele, incluindo córnea, músculos e tecido conjuntivo. São causadas por um largo espectro de fungos que são introduzidos nos tecidos mais profundos e permanecem localizados, causando a formação de abscessos e úlceras que não cicatrizam (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

No Brasil, as estimativas do Ministério da Saúde, de 2016, sugerem que mais de 3,8 milhões de indivíduos sofram de infecções fúngicas graves. Em 2017, houve 390 mil casos de aspergilose alérgica broncopulmonar; quase 600 mil de asma severa afetada por fungos, principalmente causadas por *Aspergillus* sp.; 28 mil casos de candidemia e 6,8 mil casos de meningite por *Cryptococcus* (FIOCRUZ, 2019). Entretanto, as micoses sistêmicas não são doenças de notificação no país, tornando os dados presentes imprecisos. A incidência, a prevalência e a morbidade destas micoses baseia-se em análises retrospectivas de séries de casos, ou estudo de isolados (GIACOMAZZI et al., 2016).

Além disso, o tratamento das infecções fúngicas apresentam custos bastante elevados e dispendiosos aos sistemas de saúde. Nos Estados Unidos, os gastos de tratamento das doenças fúngicas foram maiores que US \$7,2 bilhões em 2017, em que US \$4,5 foram direcionados a pacientes hospitalizados e US \$2,6 bilhões para pacientes ambulatoriais (BENEDICT et al.,

2019). Já no Brasil, o custo estimado do tratamento de doenças fúngicas pode superar R\$400 mil por paciente (BORBA et al., 2018).

2.2. O gênero *Candida* spp. e a epidemiologia das infecções associadas

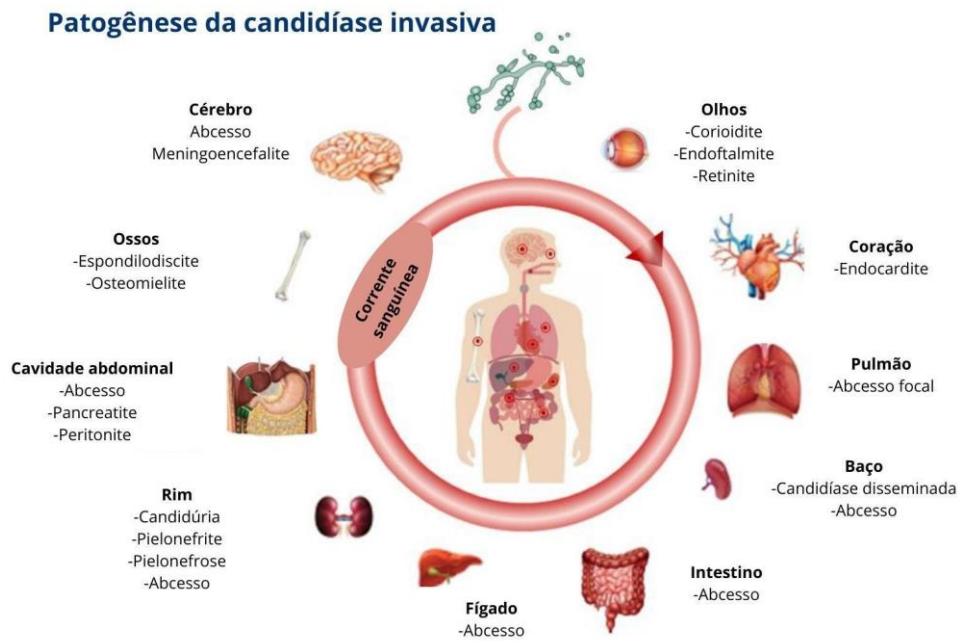
O gênero *Candida* spp. é classificado no reino *Fungi*, divisão Eumycota, subdivisão Deuteromycotina, classe Blastomycetes, família Cryptococcaceae (SIDRIM; ROCHA 2004). Em cultura, *Candida* spp. formam colônias brancas, lisas e convexas. Todas as espécies do gênero *Candida* apresentam-se sob a forma de células leveduriformes ovais que produzem brotamentos ou blastoconídios. As espécies de *Candida*, exceto *C. glabrata*, produzem hifas verdadeiras e pseudo-hifas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017). Os microrganismos deste gênero podem ser detectados nas superfícies mucosas de 50 a 70% de humanos saudáveis (PAPPAS et al., 2018).

Existem mais de 150 espécies conhecidas de *Candida*. No entanto, cerca de 20 destas são reconhecidas por causarem doenças, dentre estas, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida dubliniensis*, *Candida pelliculosa*, *Candida kefyr*, *Candida lipolytica*, *Candida famata*, *Candida inconspicua*, *Candida rugosa* e *Candida norvegensis* (SARDI et al., 2013; YAPAR, 2014). Além destas, a espécie *Candida auris* foi descoberta em 2009 no Japão. Esta espécie é um patógeno emergente de infecções nosocomiais e já é considerado um grave problema de saúde global devido a sua intrínseca resistência a antifúngicos disponíveis (AHMAD; ALFOUZAN, 2021).

Candida spp. são os patógenos fúngicos mais comuns das superfícies mucosas, como cavidade oral, trato gastrointestinal e trato geniturinário (DE BARROS, 2020). São capazes de causar doenças, conhecidas como candidíases, que se referem a infecções cutâneas, mucosas e de órgãos profundos causadas por fungos do gênero *Candida* (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017; PAPPAS et al., 2018).

Em condições normais, comporta-se como um organismo comensal. Contudo, na presença de fatores de comprometimento da resposta imune, *Candida* spp. pode disseminar-se e invadir a corrente sanguínea, promovendo o crescimento excessivo dos fungos, levando a graves infecções oportunistas profundas, apresentadas na Figura 1.

Figura 1: Patogênese da candidíase invasiva



Fonte: Adaptada de Riera et al (2022).

Mundialmente, o gênero *Candida* é reportado como o principal agente fúngico associado a septicemias (PAPPAS et al., 2018). A candidíase invasiva tem sido atribuída a uma mortalidade de 40% a 50% em unidades de terapia intensiva (UTIs), sendo atualmente a quarta infecção nosocomial da corrente sanguínea mais comum nos Estados Unidos (CHEN et al., 2021). Na Europa, a incidência de candidemia foi estimada em aproximadamente 79 casos por dia, dos quais 29 pacientes tiveram um desfecho fatal em um mês de infecção (KOEHLER et al., 2019). O custo estimado das hospitalizações por infecções por *Candida* foram de US \$1,4 bilhão a nível global (BENEDICT et al., 2019).

Embora *C. albicans* seja a espécie mais presente em infecções por *Candida* spp. a candidemia causada por *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* também se tornou motivo de preocupação nas últimas décadas, principalmente pelo seu perfil de resistência a antifúngicos (RODRIGUES et al., 2017). Nesse viés, um estudo de coorte realizado na Arábia Saudita, entre janeiro de 2006 e dezembro de 2017 demonstrou que a distribuição de espécies não-*albicans* apresentou grande relevância clínica, correspondendo a: *C. glabrata* (30,1%), *C. parapsilosis* (19,4%), *C. tropicalis* (17,9%), *C. krusei* (3,1%), *C. famata* (2,3%), Complexo *Trichosporon asahii*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr* e *C. lusitaniae* (0,5% cada), outras espécies não-*albicans* (1,5%), e 23,5% representados por *C. albicans* (ALDARDEER et al., 2020). Além disso,

observa-se que há um crescente aumento na incidência de infecções por *C. auris*, em que esta espécie se torna cada vez mais um importante patógeno da corrente sanguínea, com notificações relatadas em 45 países (AHMAD; ALFOUZAN, 2021; BANDARA; SAMARANAYAKE, 2022).

Na América do Sul, relatórios publicados entre 2017 e 2021 indicam que *C. albicans* continua a ser a espécie mais prevalente, enquanto a espécie não-*albicans* mais frequente é *C. parapsilosis*. Além disso, o primeiro surto relatado de *C. auris* na América do Sul ocorreu na Venezuela em março de 2012. Desde então, diferentes países americanos publicaram surtos e casos isolados. Entre eles estão a Colômbia em 2015, os Estados Unidos em 2016, o Panamá e o Canadá em 2017, a Costa Rica e o Chile em 2019, bem como o Peru e o Brasil em 2020 (RIERA et al., 2022).

No Brasil, as taxas brutas de mortalidade por candidemia apresentam um alarmante nível nos hospitais, que variam de 21% a 80%, a depender da região analisada (SILVA et al., 2019; BARRIENTOS et al., 2021). Demonstra-se que as taxas de incidência de candidemia variam de 0,58 até um total cumulativo de 42,59 por 1.000 admissões hospitalares no país (MATTOS et al., 2017; SILVA et al., 2019). Doi et al. (2016) realizaram um estudo multicêntrico em 16 hospitais brasileiros, entre 2007 e 2010, demonstrando que a taxa bruta de mortalidade por candidemia durante a internação hospitalar foi de 72,2%. As espécies mais prevalentes no estudo foram *C. albicans* (34,3%), *C. parapsilosis* (24,1%), *C. tropicalis* (15,3%) e *C. glabrata* (10,2%). Um dado alarmante do estudo é que apenas 47 dos 137 isolados de *Candida* foram enviados ao laboratório de referência para testes de suscetibilidade antifúngica.

Na região Centro Oeste do Brasil, Santana et al. (2019) demonstraram que espécies não-*albicans* foram predominantes nos casos de candidúria, em que *C. tropicalis* foi a mais prevalente. Fatores como antibioticoterapia, uso de sonda vesical e diabetes foram os predisponentes mais frequentes nos pacientes. Na região Sudeste, Canela et al. (2017) relataram que *C. albicans* foi a espécie predominante nos casos de candidemia em um hospital terciário (44%), seguida por *C. glabrata* (19%), *C. tropicalis* (19%) e *C. parapsilosis* (14%). Esteves et al. (2020), realizaram um estudo em três hospitais da região Sudeste e caracterizam o perfil dos pacientes mais acometidos com candidemias. A idade média dos pacientes foi de 56 anos e 62% eram do sexo masculino, com mortalidade em 30 dias em 28,2% dos casos. Na região Sul, Oliveira et al. (2021) avaliaram oito hospitais do Paraná e detectaram que os fatores de risco

associados à candidemias foram câncer, cirurgias recentes, ventilação mecânica, nutrição parenteral, uso de drogas vasoativas, corticosteróides e diálise, em que a espécie mais isolada foi *C. albicans* (49 isolados), seguida por *C. parapsilosis* (23 isolados) e *C. tropicalis* (15 isolados).

No Nordeste do Brasil, Medeiros et al. (2019) relataram que as espécies mais prevalentes nas candidemias são *C. albicans*: 35,3%, *C. tropicalis*: 27,4%, *C. parapsilosis*: 21,6% e *C. glabrata*: 11,8%. Além disso, Silva (2019) demonstrou que dentre os casos de candidemia avaliados em um hospital de Pernambuco, 60% foram causados por espécies não-*albicans*, 38,4% por *C. albicans* e em 1,6% foram identificadas nas amostras duas espécies de *Candida* spp. Almeida et al. (2021), por sua vez, aponta os primeiros relatos de *C. auris* no estado da Bahia, em que entre dezembro de 2020 e fevereiro de 2021, nove pacientes estavam colonizados pela levedura multirresistente, sendo este patógeno a causa de óbito de dois pacientes.

Diante do exposto, é possível afirmar que as doenças causadas por *Candida* spp., são uma preocupação de nível global. Tais patógenos apresentam taxas crescentes de incidência e prevalência, bem como altas taxas de mortalidade associadas a pacientes hospitalizados.

2.3. Fatores de virulência de *Candida* spp.

Uma forma de desenvolver novos antifúngicos mais eficientes é a partir da compreensão acerca dos mecanismos de patogenicidade (YANG et al., 2003). Neste sentido, compreende-se que a patogenicidade de *Candida* spp. é intermediada por diversos fatores de virulência, ainda não totalmente compreendidos. Destes é possível mencionar: adesão, mudança fenotípica, fosfolipases e a capacidade de formar biofilmes.

2.3.1 Adesão

A adesão ao tecido é uma importante etapa no processo de colonização e infecção por *Candida*. Este gênero pode aderir a várias células hospedeiras como epitélios, endotélios e fagócitos. A adesão diminui a extensão da depuração pelas defesas do hospedeiro e também promove que enzimas e toxinas de *Candida* cheguem às células do hospedeiro. (DEORUKHKAR; ROUSHANI, 2017).

A adesão ajuda as células de *Candida* a penetrar, disseminar e permanecer nos tecidos, sendo este processo influenciado por vários fatores, como o tipo de proteínas da parede celular

e propriedades físico-químicas da superfície celular. Três tipos de interações foram propostos para aderências de *Candida* spp. para as células hospedeiras. Esses incluem interação proteína-proteína, interação semelhante à lectina e interações incompletamente definidas (HOSTETTER, 1994; ZUO et al., 2021).

Esse processo ocorre com a ajuda de proteínas de adesão, que são variadas a depender da espécie. Em *C. albicans*, a família ALS (Sequência semelhante a aglutinina) está associada à adesão e invasão nas células hospedeiras, bem como à sua estratégia de aquisição de ferro (CIUREA et al., 2020). As adesinas reconhecem e se ligam a proteínas, fibrinogênio e fibronectina. Adesinas como Als3 e Hwp1 são predominantemente expressas durante o processo de formação de hifas na adesão de *C. albicans* ao hospedeiro (YANG et al., 2017).

C. parapsilosis tem cinco genes ALS, bem como seis genes para Pga30 (predicted glycosylphosphatidylinositol-anchored), importantes para o processo de adesão. A adesão de *C. glabrata*, por sua vez, depende de Epa (adesinas epiteliais) e proteínas semelhantes a Epa para ligação à célula hospedeira. Epa1 desempenha um papel fundamental na ligação às células epiteliais e é caracterizada por alta heterogeneidade. À medida que a heterogeneidade desta adesina aumenta, também aumentam as chances de ocorrência de cepas hiper virulentas (YANG et al., 2017; DEORUKHKAR; ROUSHANI, 2017; CIUREA et al., 2020).

2.3.2 Mudança fenotípica

Mudança fenotípica é definida como a capacidade dos microrganismos de alternar reversivelmente e em alta frequência entre diferentes morfologias. Este processo regula várias características fenotípicas envolvidas na patogênese, como adesão às células hospedeiras, expressão da hidrofobicidade da superfície celular e secreção de proteinases ((DEORUKHKAR; ROUSHANI, 2017).

As diferentes formas morfológicas de *Candida* desempenham um papel importante na virulência. Embora as formas de hifas sejam mais invasivas do que as formas de levedura, acredita-se que a forma de levedura seja principalmente envolvida na disseminação no organismo do hospedeiro (DEORUKHKAR; ROUSHANI, 2017; MBA; NWEZE, 2020). O fenômeno do dimorfismo está intimamente relacionado à adaptabilidade de *Candida* spp. ao microambiente, em resposta a sinais externos, como mudanças de temperatura, pH, disponibilidade de oxigênio, falta de nutrientes ou presença de soro, induzindo o crescimento de filamentos (CZECHOWICZ; NOWICKA; GOŚCINIAK, 2022).

2.3.3 Enzimas hidrolíticas

As espécies de *Candida* são capazes de produzir e secretar várias enzimas hidrolíticas, incluindo proteases, fosfolipases e hemolisinas (SILVA et al., 2011). A produção de enzimas hidrolíticas promove que *Candida* spp. obtenha nutrientes pela digestão de diversas moléculas, sendo também um fator de virulência, pois as enzimas facilitam a invasão tecidual e a inativação dos componentes do sistema imunológico do hospedeiro (CZECHOWICZ; NOWICKA; GOŚCINIAK, 2022).

As aspartil proteases secretadas (SAP) são o grupo de enzimas presentes em *Candida*, codificadas por uma grande família de genes SAP. Estão presentes em vários organismos do gênero e causam danos nos tecidos e células do hospedeiro, sequestro de respostas imunes e ocultação de células imunes inatas, permitindo a sobrevivência e invasão do patógeno. (SHING et al., 2019). São reconhecidos dez genes relacionados a estas enzimas em *C. albicans*, três em *C. parapsilosis*, quatro em *C. tropicalis* e sete genes em *C. dubliniensis*. *C. glabrata* é a única do gênero sem esses genes, porém apresenta yapsinas, enzimas proteolíticas codificadas por um agrupamento de 11 genes YPS (CZECHOWICZ; NOWICKA; GOŚCINIAK, 2022).

Fosfolipases são um heterogêneo grupo de enzimas que compartilham a capacidade de hidrolisar uma ou mais ligações éster em glicerofosfolipídios. Em *C. albicans* são classificadas como A, B, C e D, em que esta classificação é utilizada para indicar a ligação específica direcionada de clivagem na molécula de fosfolipídio (MAHMOUD, 2000). As fosfolipases têm como alvo os fosfolipídios da membrana e digerem esses componentes, levando à lise celular o dano direto às células hospedeiras, sendo um mecanismo importante que contribui para a virulência microbiana (BARRETT-BEE, 1985; SRIPHANNAM et al., 2019).

As hemolisinas são produzidas por espécies de *Candida* spp. para degradar a hemoglobina e extrair ferro elementar das células hospedeiras (SILVA et al., 2011). A capacidade dos organismos patogênicos de adquirirem ferro dos hospedeiros é um fator de importância crítica no estabelecimento da infecção, sendo este um elemento essencial para os processos metabólicos, como a síntese de DNA (MANN; MOSSER; BUCKLEY, 1994). É demonstrado que *C. albicans* apresenta uma interessante capacidade de utilizar o ferro adquirido para produzir um fator hemolítico que pode liberar mais hemoglobina através da lise dos eritrócitos (WATANABE, 1999). Além disso, é demonstrado que o gene da proteína

semelhante à hemolisina (HLP) é associado ao potencial hemolítico em estirpes de *C. glabrata* (LUO et al., 2004).

Para a espécie *C. albicans* foi identificada a toxina peptídica citolítica denominada candidalisina. Ao ser secretada, esta danifica diretamente as membranas epiteliais, desencadeando uma via de sinalização que ativa a imunidade epitelial. Demonstra-se que as cepas de *C. albicans* sem essa toxina não ativam nem danificam as células epiteliais (MOYES et al., 2016).

2.3.4 Biofilmes

Um dos principais fatores que contribuem para a virulência de *Candida* spp. é a sua versatilidade em se adaptar a diferentes habitats para crescimento e formação de comunidades microbianas ligadas à superfície, conhecidas como biofilmes (SENEVIRATNE; JIN; SAMARANAYAKE, 2008; CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018). Biofilmes são estruturas microbianas tridimensionais que se desenvolvem em superfícies bióticas ou abióticas. As células do biofilme são envoltas em uma matriz extracelular e são altamente tolerantes a insultos antimicrobianos e imunológicos (DONLAN; COSTERTON, 2002). Quando os microrganismos estão desta forma, apresentam menores taxas de crescimento e maior resistência aos tratamentos antimicrobianos, comportando-se de forma muito diferente das células planctônicas (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018; CZECHOWICZ, NOWICKA, GOŚCINIAK, 2022).

A capacidade de aderir a diferentes tipos de superfícies permite que os microrganismos formem biofilme em dispositivos médicos, como cateteres intravasculares, válvulas cardíacas protéticas e substituições articulares, ou em diferentes tecidos do hospedeiro (CAVALHEIRO & TEIXEIRA, 2018). É importante enfatizar que a dispersão das células do biofilme traz implicações clínicas, pois as células dispersas podem instigar a formação de novo biofilme ou espalhar-se em tecidos sensíveis do hospedeiro (MBA; NWEZE, 2020).

A formação de biofilmes de *Candida* spp. é dividida em três fases: fase inicial (0-6 horas), fase intermediária (7-12 horas) e fase madura (13-48 horas). Após o contato inicial e adesão das leveduras à superfície, ocorre a formação de microcolônias na camada basal e posteriormente a formação de camadas superiores, com a presença de hifas e produção da matriz extracelular. (GHANNOUM et al., 2015). Uma vez formado o biofilme maduro, ainda existe a

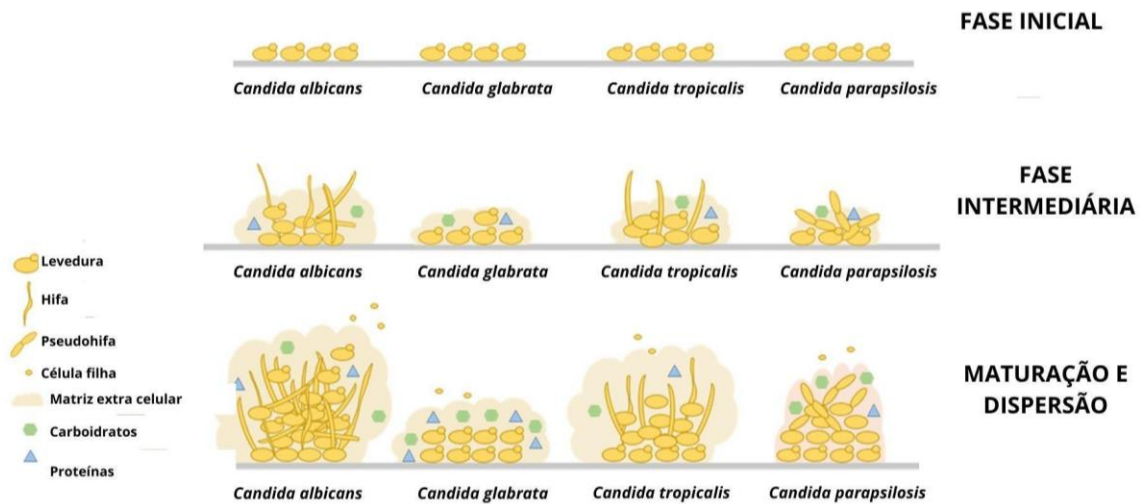
possibilidade de disseminação de células progênes do biofilme que se despreendem migrando para outros nichos para formar mais biofilme (CAVALHEIRO, TEIXEIRA et al., 2018).

A primeira etapa crucial da formação do biofilme é a adesão. Este processo depende de adesinas, que promovem a ligação a outras células, tanto epiteliais como a outras células microbianas, ou superfícies abióticas. Após a adesão, o desenvolvimento do biofilme continua através de modificações morfológicas, como o aumento do número de células e produção de EPS (substâncias poliméricas extracelulares), influenciando a arquitetura final do biofilme. Os biofilmes formados dependem do EPS produzido, que confere uma estrutura tridimensional hidratada semelhante a um gel, onde as células ficam parcialmente imobilizadas. O EPS desempenha diferentes funções, como defesa contra a fagocitose, estrutura para integridade do biofilme e prevenção da difusão de drogas (CAVALHEIRO, TEIXEIRA et al., 2018).

Cada espécie de *Candida* apresenta diferenças em termos de formação de biofilme, a depender de sua morfologia, características da matriz extracelular (MEC) e capacidade de conferir resistência antifúngica. Nesse contexto, entre as diferenças que podem ser mencionadas é que *C. tropicalis* tem maior produção de matriz EPS do que *C. glabrata* (CAVALHEIRO, TEIXEIRA 2018). Além disso, a matriz do biofilme de *C. albicans* é composta por carboidratos, proteínas, fósforo e hexosaminas, enquanto de *C. tropicalis* apresenta baixos níveis de carboidratos e proteínas em comparação com *C. albicans* e outras espécies não *albicans*. Já a matriz do biofilme de *C. glabrata* é feita de alta níveis de proteínas e carboidratos e a de *C. parapsilosis* contém principalmente carboidratos e baixos níveis de proteínas (DEORUKHKAR; ROUSHANI, 2017; CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018). Além disso, em comparação com *C. albicans*, os biofilmes de *C. auris* demonstram maior capacidade de formar biofilmes e suportam períodos mais longos de dessecação no ambiente (HORTON et al., 2020).

Os estágios de formação do biofilme em diferentes espécies de *Candida* spp. estão esquematizados na Figura 2.

Figura 2: Estágios de formação do biofilme em *Candida* spp.



Fonte: Adaptada de Cavalheiro & Teixeira (2018)

Tendo em vista a gravidade das infecções causadas por biofilmes de *Candida* spp., é de suma importância que estratégias terapêuticas sejam desenvolvidas e implantadas na procura de novas soluções que, isoladamente ou em conjunto com outras, possam combater o biofilme, seja no seu processo de formação ou na desagregação da estrutura do biofilme formada.

2.4 Tratamentos antifúngicos para *Candida* spp.

O arsenal de medicamentos antifúngicos é bem menor quando comparado ao de bactérias. Isto ocorre principalmente pela similaridade entre as células eucarióticas fúngicas e de mamíferos (SCORZONI et al., 2016). Desta forma, há uma dificuldade de se encontrar drogas antifúngicas, e as opções terapêuticas atualmente disponíveis são restritas a poucas classes de fármacos, em sua maioria, tóxicos e caros (RODRIGUES, 2019). Atualmente, os medicamentos para o tratamento de infecções causadas por *Candida* spp. compreendem três grandes classes de medicamentos: azólicos, polienos e equinocandinas (BEN-AMI, 2018).

Os azólicos são amplamente utilizados como antifúngicos de primeira linha para o manejo de infecções sistêmicas e tópicas em todo o mundo, devido ao seu preço relativamente baixo e eficácia para a maioria das infecções fúngicas (ASSRESS et al., 2021). Apresentam um anel imidazólico em sua estrutura, o qual pode conter três átomos de carbono e dois de

nitrogênio (imidazólicos), ou dois de carbono e três de nitrogênio (triazólicos) (GEORGOPAPADAKOU, 1998). Dentre os exemplos de drogas que compreendem esta classe de fármacos é possível mencionar fluconazol, itraconazol e miconazol. Os triazóis de primeira geração (itraconazol e fluconazol) exibem um espectro de atividade antifúngica mais amplo e apresentam perfis de segurança significativamente melhorados. O fluconazol é ativo contra *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma*, *Blastomyces* e *Coccidioides* spp. O itraconazol apresenta espectro mais amplo de atividade, sendo ativo também frente a espécies do gênero *Aspergillus*. No entanto, ambos apresentam limitações clínicas, pois são ineficazes contra alguns patógenos emergentes como os gêneros *Scedosporium*, *Fusarium* e *Mucorales* (CAMPOY; ADRIO, 2017).

O primeiro relatório sobre a atividade antifúngica de um composto azol foi apresentado por Woolley em 1944, uma descoberta inédita que declarou pela primeira vez o efeito antimicótico da porção benzimidazol de sua estrutura (SHAFIEI et al., 2020). O mecanismo de ação dos azóis consiste em ligar-se e inibir uma enzima do citocromo P450 codificada pelo gene ERG11, a lanosterol 14 α desmetilase. A inibição desta enzima ocasiona uma depleção de ergosterol e acúmulo de esteróis tóxicos, ocasionando um efeito fungistático (BEN-AMI, 2018).

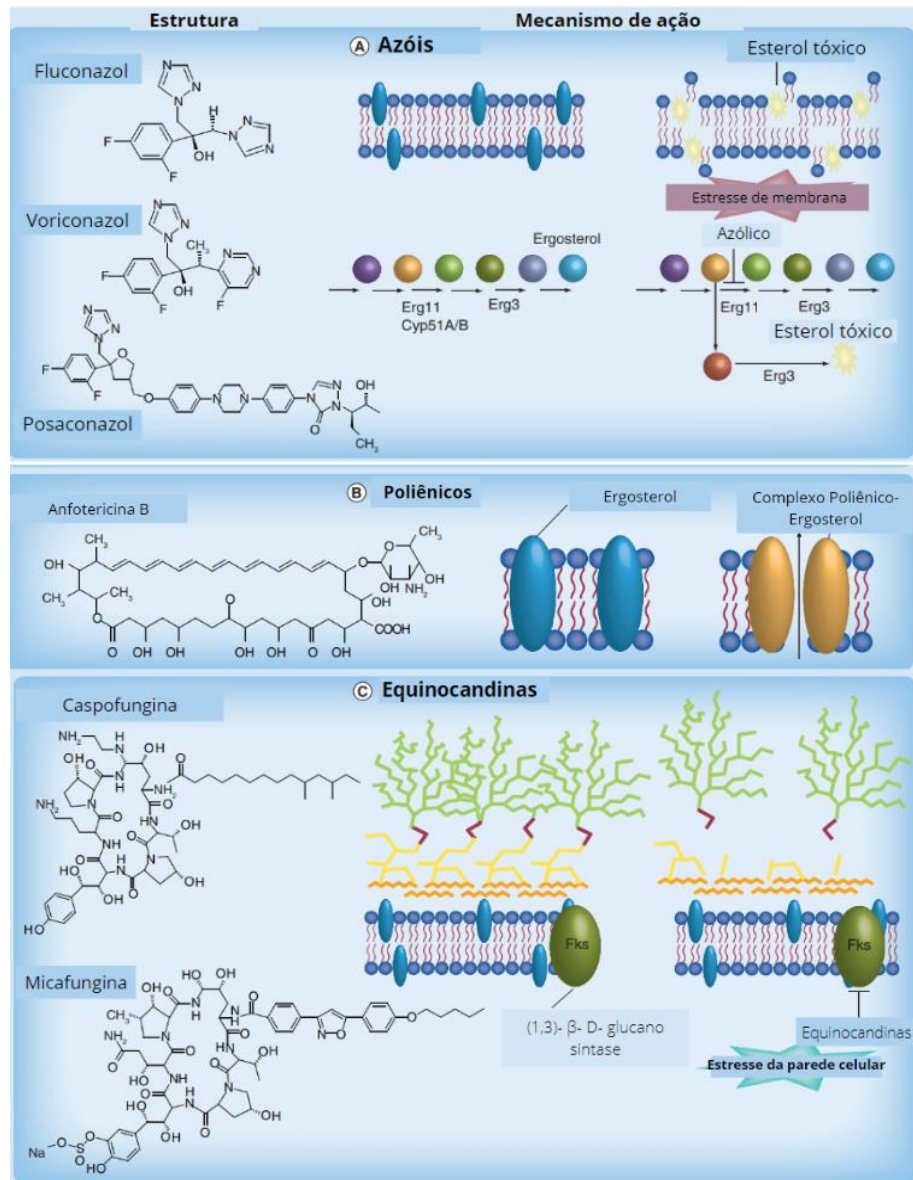
A estrutura dos poliênicos consiste em um anel macrolactona de carbonos poliinsaturados, onde os grupos hidroxila conferem um caráter anfipático à molécula. Esses medicamentos contêm um conjunto de quatro a oito ligações duplas conjugadas dentro do anel macrolactona (HARO-REYES et al., 2022.) Devido a esta propriedade anfipática, os polienos interagem com o ergosterol direcionado para o ambiente lipídico interno da membrana, enquanto a porção hidrofílica forma um canal aquoso (CAROLUS et al., 2020).

Os poliênicos, como a anfotericina B, nistatina e natamicina, interagem com o ergosterol fúngico formando poros que geram vazamento importantes elementos da membrana fúngica. Desta forma, a ligação do polieno ao ergosterol funciona como um canal iônico que libera íons e pequenas moléculas orgânicas da célula, o que desencadeia a morte celular (KRISTANC et al, 2019). A nistatina é amplamente prescrita para o tratamento de candidíase cutânea, vaginal e esofágica, enquanto a natamicina pode ser usada para o tratamento de ceratose fúngica ou infecções da córnea. A anfotericina B é recomendada para o tratamento de infecções por *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium* e *Cryptococcus* entre outros, sendo um fármaco ativo frente a maioria das leveduras e fungos filamentosos (CAMPOY; ADRIO, 2017).

As equinocandinas são metabólitos secundários de fungos, que contêm um núcleo composto por um hexapeptídeo cíclico e resíduos lipídicos, responsáveis por sua atividade antifúngica. Foram primeiramente identificados como agentes antifúngicos na década de 1970 (SZYMAŃSKI et al., 2022.) Os fármacos desta classe promovem a inibição da biossíntese de β -1,3-D-glucano, um componente essencial da parede celular fúngica (ZHAO; PERLIN et al., 2020). Fármacos dessa classe são fungicidas contra *Candida* spp., incluindo as cepas resistentes aos triazóis, como *C. glabrata* e *C. krusei* (CARMONA; LIMPER, 2017). Caspofungina, micafungina e anidulafungina apresentam atividade fungicida contra diferentes espécies de *Candida* spp. Além disso, os fármacos micafungina e anidulafungina foram licenciados para o tratamento de candidíase invasiva e candidíase esofágica (CAMPOY; ADRIO, 2017).

Os mecanismos de ação dos principais antifúngicos utilizados em infecções de *Candida* spp. estão descritos na Figura 3.

Figura 3: Mecanismos dos principais fármacos utilizados em infecções de *Candida* spp.



Fonte: Adaptada de XIE et al., 2014.

Além destes fármacos, outras pesquisas estão sendo voltadas ao desenvolvimento de medicamentos antifúngicos frente à *Candida* spp. É possível mencionar as aminopiperidinas, que demonstram-se promissoras frente a *Candida* spp. resistentes ao fluconazol. Além desta, o cocleato de anfotericina B (CAMB) promove o sequestro de ergosterol e foi desenvolvido como uma formulação oral de AMB. CAMB é composto de fosfatidilserina e precipitados de fosfolípido-cálcio, e demonstra-se eficaz frente a *C. albicans* em modelos murinos (HOUSŤ; SPÍŽEK; HAVLÍČEK, 2020). Além disso, uma nova classe de antifúngicos, as orotomidas, está em fase experimental e também permite a administração oral. Esta classe possui um novo

mecanismo de ação, promovendo a inibição da diidroorotato desidrogenase (DHODH), uma enzima chave na biossíntese da pirimidina (VAN DAELE et al., 2019).

2.5 Resistência fúngica

A resistência clínica é a falha em erradicar uma infecção fúngica, apesar da administração de um agente antifúngico com comprovada atividade *in vitro* (PAI et al., 2018). Por anos a resistência a múltiplas drogas foi confinada aos antibacterianos, contudo, a emergência de espécies fúngicas multirresistentes, como *Candida auris*, induz novos desafios aos órgãos de saúde (PERFECT; GHANNOUM, 2020). Demonstra-se que antes do uso extensivo de antifúngicos na clínica e no meio ambiente, as espécies fúngicas eram apresentavam perfis suscetíveis à grande parte das classes de antifúngicos. Contudo, o uso generalizado de antifúngicos alterou o cenário epidemiológico, em que patógenos resistentes são cada vez mais identificadas em ambientes clínicos e associadas à falha terapêutica (ARASTEHFAR et al., 2020).

Nesse contexto, estudos epidemiológicos demonstram que a crescente resistência fúngica é um grave problema de Saúde Pública. O Programa de Vigilância Antifúngica ARTEMIS demonstrou que 14% dos isolados de *C. glabrata* oriundos de infecções de corrente sanguínea foram relatados como resistentes ao fluconazol no período de 2001 a 2007, o que representou um aumento acentuado em relação à taxa de 9% registrada no período de 1992 a 2001 (PFALLER et al., 2009). Além disso, nos últimos anos, as cepas de *C. parapsilosis* resistentes ao fluconazol superaram os isolados suscetíveis ao fluconazol em ambientes de saúde (DANESHNIA, et al. 2023).

A resistência a agentes antifúngicos pode ser intrínseca ou primária, em que os fungos são resistentes a um fármaco antes da exposição, como por exemplo, *Candida krusei* ao fluconazol e *Candida não-albicans* a 5-flucitosina (PAI et al., 2018). Já a resistência adquirida pode ocorrer através de vários mecanismos. Exemplos incluem superexpressão do alvo do fármaco, substituições de aminoácidos no alvo do fármaco que impedem ligação de drogas, sinalização através de vias de resposta ao estresse, regulação positiva de bombas de efluxo ou alterações nas vias celulares (PAI et al., 2018). A resistência adquirida em patógenos fúngicos pode ser acelerada por múltiplos fatores, incluindo, a plasticidade genética de um organismo, a existência de cepas hipermutadoras ou pressões ambientais que resultam em cepas que se tornam resistentes a fungicidas agrícolas, levando à resistência cruzada em isolados clínicos.

Além disso, a formação de biofilmes fúngicos diminui globalmente a susceptibilidade fúngica aos medicamentos e as diferenças na permeabilidade celular podem impedir que um medicamento atinja seu alvo. O efeito combinado destes mecanismos contribuintes levam à seleção de organismos cada vez mais resistentes (REVIE et al., 2018).

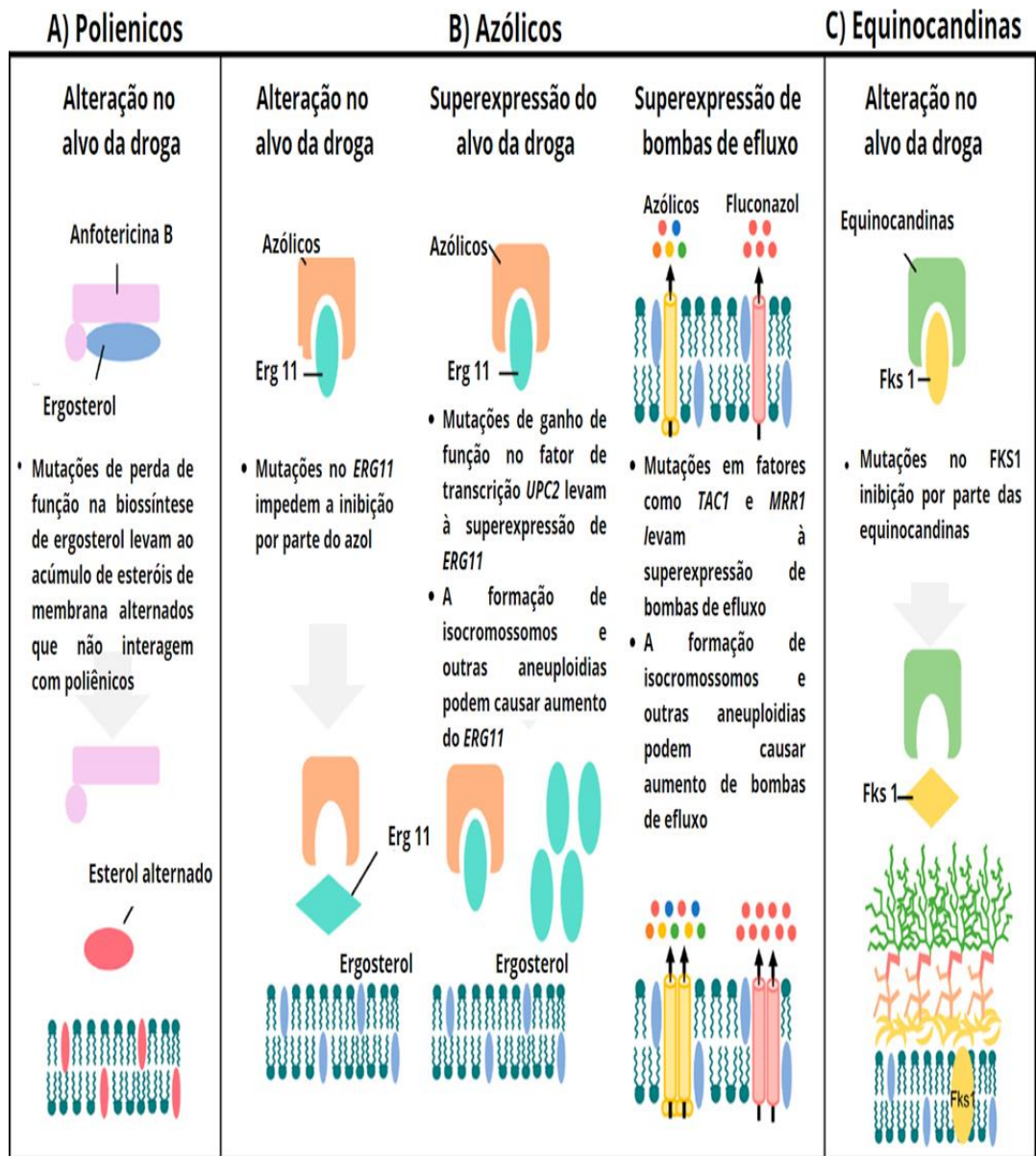
Por décadas, as infecções fúngicas causadas por *Candida* têm sido tratadas com azólicos. Entretanto, a resistência a estes fármacos aumentou, como reflexo da mudança na epidemiologia das infecções por espécies de *Candida*. No início da década de 1990, as infecções fúngicas eram causadas principalmente por *C. albicans*. Contudo, a incidência de candidíase invasiva, ocorre atualmente também devido a espécies não-*albicans*, como *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (PERFECT; GHANNOUM, 2020).

A resistência adquirida aos azóis pode ocorrer por meio de diversos mecanismos. Substituições em ERG11 levam a uma menor afinidade de ligação da droga pela enzima lanosterol desmetilase. Além disso, a superexpressão do alvo da droga pode ocorrer através de mutações no ativador transcricional, UPC2. A resistência aos azólicos também pode ser expressa por alterações em outros componentes da via biossintética do ergosterol e bombas de efluxo (PAPPAS et al., 2018; LEE et al., 2020; REVIE et al., 2020).

Neste contexto, as equinocandinas pareciam ser a resposta para a resistência aos azólicos, contudo, houve o surgimento de espécies de *Candida* que são resistentes a equinocandinas, principalmente em pacientes com exposição prolongada ao fármaco e em pacientes imunocomprometidos com candidemia recorrente (PRISTOV; GHANNOUM, 2019). A resistência às equinocandinas em *Candida* spp. é emergente, especialmente na espécie *C. glabrata*. A enzima alvo β -D-glucano sintase é codificada por FKS1 em *Candida* spp. e também é codificada por FKS2 em *C. glabrata*. Mutações nas regiões HS1 e HS2 desses genes foram identificadas como o mecanismo subjacente para a resistência (LEE et al., 2020). Neste contexto, o estudo de Ning et al (2023) traz a alteração em FKS1 como indutora de resistência à equinocandinas em *C. parapsilosis*.

A resistência aos polienos é extremamente incomum. Entretanto, nos raros casos em que ocorre, é mediada por alterações em enzimas que reduzem a afinidade de ligação ao fármaco ou por esgotamento do ergosterol da membrana (LEE et al., 2020).

Os principais mecanismos moleculares de resistência descritos aos antifúngicos majoritariamente utilizados na prática clínica estão descritos na Figura 4.

Figura 4: Mecanismos moleculares de resistência em *Candida* spp.

Fonte: Adaptado de LEE et al., 2020.

2.6 Novas estratégias terapêuticas

Embora estejam sendo realizados avanços para aumentar o arsenal antifúngico disponível, a taxa a que os antimicrobianos estão sendo desenvolvidos é largamente ultrapassada pela taxa do surgimento de resistência (LEE et al., 2020). Desta forma, há uma necessidade urgente de identificação, de desenvolvimento, de validação e de progressão de novas estratégias e abordagens que possam ser facilmente utilizadas para superar essa problemática (QADRI; SHAH ; MIR, 2021). Diante disso, novas estratégias terapêuticas vêm sendo exploradas, a

exemplo do reposicionamento de fármacos, combinação de drogas antifúngicas com fármacos de outras classes farmacológicas e a exploração da atividade antifúngica de produtos naturais.

O reposicionamento de fármacos é definido como o processo de descoberta de novos usos fora do escopo da indicação médica original para medicamentos pré-existentes (ASHBURN & THOR, 2004). Esta estratégia oferece vantagens em relação ao desenvolvimento de um novo medicamento para uma determinada indicação. Primeiramente, há um menor risco de falha terapêutica, tendo em vista que a droga pesquisada já foi considerada suficientemente segura em modelos pré-clínicos e humanos. Além disso, o prazo para o desenvolvimento de medicamentos pode ser reduzido, pois testes pré-clínicos, de segurança, de avaliação e, em alguns casos, de desenvolvimento de formulação já teriam sido previamente concluídos. Ademais, seriam necessários menores investimentos, visto que os custos de trazer um medicamento reposicionado ao mercado foram estimados em US\$ 300 milhões, em comparação com cerca de US\$ 2 a 3 bilhões para o desenvolvimento de um composto inovador (PUSHPAKOM et al., 2019; JARADA; ROKNE; ALHAJJ, 2020).

Acerca do reposicionamento para doenças antimicrobianas, observa-se que diversas pesquisas são direcionadas a essa temática nos últimos anos. Trabalhos demonstram que diversas classes farmacológicas, como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) possuem potencial atividade contra cepas de *Candida* spp. (SILVA et al., 2017; RODRIGUES et al., 2023) e *S. aureus* resistentes à meticilina (NETO et al., 2019; CABRAL et al., 2023). Além disso, já é reportada a atividade *in vitro* de compostos anestésicos (como o etomidato); (DO AMARAL VALENTE SÁ et al., 2020) e corticosteróides (como a dexametasona) (SILVA et al., 2022) frente a *Candida* spp.

Além disso, a associação de fármacos surgiu como uma abordagem para melhorar a eficácia da terapia antimicrobiana para infecções de difícil tratamento. Dentre as vantagens apresentadas por essa técnica, é possível mencionar que as combinações de medicamentos expandem o espectro de antibióticos para uma cobertura mais ampla de patógenos (ZHENG ; SUN; SIMEONOV, 2018). A terapia combinada é uma estratégia já utilizada no tratamento de doenças microbianas, como a tuberculose, em que são combinados os fármacos rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol (BRASIL, 2002).

Acerca da combinação de antifúngicos, a combinação de dois ou mais fármacos ou de medicamentos antifúngicos com compostos não antifúngicos, têm sido cada vez mais testadas empiricamente. Neste sentido, as principais vantagens de combinações de fármacos são

conseguir um efeito antifúngico com menores concentrações, promovendo a diminuição de efeitos colaterais tóxicos e do aparecimento de resistência fúngica (SVETAZ et al., 2016). Atualmente, a técnica mais utilizada é o método *checkerboard*, com o objetivo de determinar o ICIF (Índice de Concentração Inibitória Fracionária) para averiguar a interação entre agentes (BIDAUD et al., 2021). Nesse contexto, a avaliação da sensibilidade de dado patógeno fúngico a um fármaco é realizada pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), através de testes padronizados e correlacionados com pontos de corte.

Ao longo da história humana, a natureza é a fonte de inspiração para o desenvolvimento de terapias. A criação de produtos farmacêuticos inspirados na bioquímica de produtos naturais é o método mais experimentado e considerado uma verdadeira forma de descoberta de novos medicamentos (KAZMAREK, 2020). A utilização de plantas como medicamentos remonta à pré-história (COWAN, 1999). As plantas americanas já eram amplamente utilizadas muito antes da chegada dos europeus ao continente, no século XV (RICARDO et al., 2017). Desde o início do século XXI, a Organização Mundial da Saúde (OMS) vem estimulando o resgate de dados de plantas utilizadas na prática médica milenar, uma vez que são consideradas potencialmente úteis no desenvolvimento de novos medicamentos (OMS, 2002).

Os produtos naturais podem representar uma alternativa para aumentar a eficiência de medicamentos cuja eficácia é enfraquecida pelo aumento da resistência (GUGLIELMI; PONTECORVI; ROTONDI, 2020). Neste sentido, a procura de antimicrobianos inovadores a partir de produtos naturais é um segmento importante da medicina moderna para superar o impacto socioeconômico e de saúde causado por patógenos multirresistentes (KEBEDE; GADISA; TUFA, 2021). Contudo, o grande potencial das plantas como fonte de novos medicamentos ainda é pouco explorado. Entre as estimadas 250.000 - 500.000 espécies de plantas existentes, uma pequena porcentagem foi investigada fitoquimicamente e a fração submetida à triagem biológica ou farmacológica é ainda menor (MAHESH; SATISH, 2008).

Os compostos derivados de plantas são principalmente metabólitos secundários, que apresentam diversas propriedades pesquisadas pela Ciência, incluindo antimicrobianas. Nesse viés, os principais grupos de compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana das plantas incluem fenólicos, ácidos fenólicos, quinonas, saponinas, flavonóides, taninos, cumarinas, terpenóides e alcalóides (GYAWALI; IBRAHIM, 2014; HUANG et al., 2021; QADRI et al., 2022).

Neste sentido, a busca por medicamentos oriundos de plantas que apresentem atividade anti-*Candida* é promissora e amplamente reportada na literatura. A lista de produtos naturais que apresentam atividade *in vitro* é extensa e inclui diversos compostos. Contudo, mais estudos também são necessários para explorar o mecanismo por trás das descritas atividades e explorar o desenvolvimento de terapias *in vivo* (ZIDA et al., 2017; QADRI et al., 2022).

2.7 Taninos e suas propriedades antimicrobianas

Os taninos são um grupo de polifenóis solúveis em água, comumente presentes em diversas plantas (MAILOA et al., 2014). Os taninos são divididos em elagitaninos (ou taninos hidrolisáveis), proantocianidinas (ou taninos condensados) e galotaninos. Esses compostos fenólicos possuem grandes variações estruturais e constituem um grupo diversificado de metabólitos secundários (KACZMAREK, 2020). São utilizados principalmente pela indústria do couro para o tratamento da pele e coloração. Dentre outras aplicações para os taninos é possível mencionar: adesivos para indústria madeireira, espumas isolantes, indústria mineral, indústria de produção de vinho, nutrição animal, indústria petrolífera, estação de tratamento de água e proteção do metal contra corrosão (DAS et al., 2020). Além disso, diversos estudos demonstram aplicações terapêuticas destes fitoquímicos, como cardioprotetora, antidiabética e antiinflamatória (SIENIAWSKA; BAJ, 2017; TÜRKAN; TASLIMI; SALTAN, 2019; JING et al., 2022).

As propriedades antimicrobianas destes compostos naturais também são reportadas na literatura. A atividade antiviral dos taninos tem sido estudada contra alguns vírus, especialmente o vírus *Herpes simplex* (LIM et al., 2011; KARIMI et al., 2017; VILHELMOVA-ILIEVA et al., 2019), o vírus da imunodeficiência humana (NONAKA et al., 1990; LU et al., 2004; TROKHYMCHUK et al., 2018; SANNA et al., 2021) e o vírus da hepatite C (AJALA; JUKOV; MA, 2014; PATIL et al., 2022).

A atividade antibacteriana dos taninos também é amplamente explorada frente a microrganismos como *Staphylococcus aureus* e *Helicobacter pylori* (AKIYAMA et al., 2001; FUNATOGAWA et al., 2004; SHAHANI et al., 2012), assim como também frente a diversas espécies de parasitas, como espécies de *Leishmania* e nematódeos bovinos, como *Haemonchus contortus* (KOLODZIEJ et al., 2001; NOVOBILSKÝ et al., 2013; ACEVEDO-RAMÍREZ et al., 2019; KARIM et al., 2019).

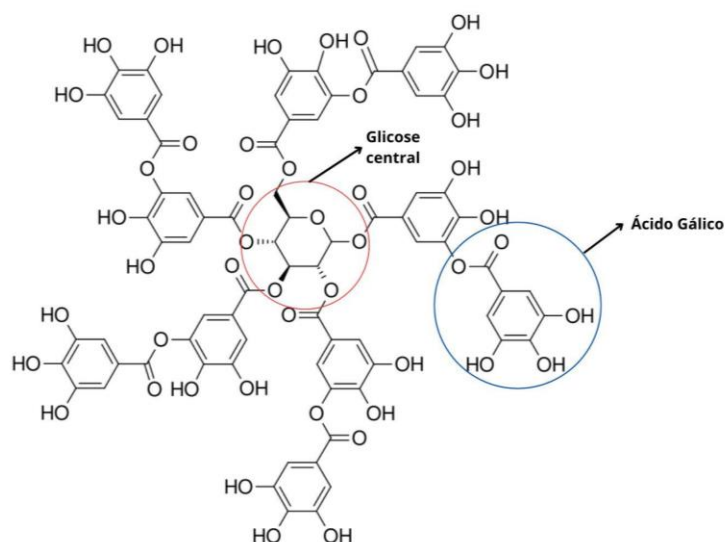
Nesse contexto, a atividade antifúngica dos taninos é amplamente reportada na literatura. O estudo de Baba-Moussa, Akpagana e Bouchet (1999) com extratos de plantas que apresentam grandes quantidade de taninos em sua composição demonstrou que tais extratos

inibiram o crescimento das espécies fúngicas *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*, em CIMs variando entre 0.25 – 4 mg/ml. Romani et al (2006) demonstraram a atividade antifúngica dos taninos condensados presentes na casca do pinheiro frente a espécies dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Filobasidiella*, *Issatchenkia* e *Saccharomyces* com CIMs variando de 200 a 4.000 g/ml. Ishida et al. (2006) demonstraram que a atividade antifúngica de *Stryphnodendron adstringens* contra *Candida* spp. pode ser atribuída à presença de taninos condensados. Além disso, Patel et al. (2011) demonstraram que taninos presentes no cranberry apresentam atividade antifúngica frente a *Candida glabrata*, *Candida lusitaniae*, *Candida krusei* e *Cryptococcus neoformans* em concentrações iguais ou inferiores a 1 µg/mL.

2.7.1 Ácido tânico (AT)

O ácido tânico (AT) é um tanino hidrolisável presente em diversas plantas, como carvalho, castanheiro e cicuta. Sua estrutura química é $C_{76}H_{52}O_{46}$ e consiste em uma molécula central de glicose ligada a dez moléculas de ácido gálico (SIENIAWSKA; BAJ, 2017; KAZMAREK, 2020; YAN et al., 2020) como demonstrada na Figura 5.

Figura 5 : Estrutura química do ácido tânico (AT)



Fonte: Autora

Além das aplicações industriais, o ácido tânico é pesquisado em diversas aplicações biológicas. Inúmeras pesquisas trazem o ácido tânico como um promissor agente anticâncer

(CHOWDHURY et al., 2019; GUO et al., 2021) e antioxidante (KAZMAREK, 2020; BALDWIN ; BOOTH, 2022).

Além disso, assim como outros taninos, AT apresenta atividades antibacterianas frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (HANCOCK et al., 2010; DONG et al., 2018), antivirais, frente ao vírus da hepatite C (LIU; CHEN; HAGEDORN, 2015; SHIRASAGO et al., 2019) e antiparasitárias frente a *Ichthyophthirius multifiliis*, um protozoário de peixes que causa prejuízos à indústria da aquicultura (ALAVINIA et al., 2018).

Contudo, a literatura apresenta escassos relatos acerca da atividade antifúngica do ácido tânico até o presente momento e não há relatos acerca do mecanismo anticandida em cepas sensíveis e resistentes. Desta forma, reitera-se a relevância do presente estudo em pesquisar as propriedades antifúngicas de AT, bem como seu possível mecanismo de ação frente *Candida* spp.

3. HIPÓTESES

- O ácido tânico possui atividade inibitória *in vitro* frente *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol em sua forma planctônica;
- O ácido tânico apresenta interações sinérgicas com os antifúngicos fluconazol, itraconazol e anfotericina B em cepas planctônicas de *Candida* spp.
- O ácido tânico age induzindo a apoptose celular em *Candida* spp. resistente ao fluconazol;
- O ácido tânico apresenta efeito inibitório em biofilmes maduros de *Candida* spp.
- O ácido tânico apresenta efeito inibitório nos biofilmes em formação de *Candida* spp.
- O ácido tânico não apresenta citotoxicidade e nem efeito hemolítico nas concentrações que exerce atividade antifúngica frente *Candida* spp.
- O ácido tânico não exibe atividade anticandida *in vitro* nas formas planctônica e de biofilme.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral:

Avaliar a ação antifúngica do ácido tânico frente a cepas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol, nas formas planctônicas e em biofilme.

4.2 Objetivos específicos:

- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do fluconazol, itraconazol, e anfotericina B das cepas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol em estudo;
- Determinar a CIM do ácido tânico das cepas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol em estudo;
- Avaliar e determinar o tipo de interação farmacológica que ocorre entre ácido tânico e os antifúngicos fluconazol, itraconazol e anfotericina B em cepas planctônicas sensíveis e resistentes ao fluconazol;
- Avaliar o efeito do ácido tânico em células de fibroblastos murinos e seu potencial de hemólise em eritrócitos de camudongos;
- Avaliar o mecanismo de ação do ácido tânico em cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol através dos ensaios de citometria de fluxo;
- Avaliar o efeito do ácido tânico em biofilmes formados por cepas de *Candida* spp.
- Avaliar o efeito do ácido tânico em biofilmes em formação de cepas de *Candida* spp.
- Avaliar as alterações morfológicas causadas pelo ácido tânico em isolado representativo de *Candida* spp. através de microscopia eletrônica de varredura.

5. METODOLOGIA

Na Figura 6, estão apresentadas as metodologias empregadas neste estudo, as quais se dividem em: atividade antifúngica, avaliação de efeitos citotóxicos, atividade frente biofilme e mecanismo de ação.

Figura 6: Fluxograma das metodologias empregadas



Fonte: Autora

5.1 Obtenção das cepas

No presente estudo, foram utilizadas 13 cepas de origem clínica de *Candida* spp. (SisGen: AF317AF) pertencentes ao Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN - UFC), em que seis destas são classificadas como sensíveis ao fluconazol (2 *C. albicans*, 2 *C. tropicalis* e 2 *C. parapsilosis*) e sete como resistentes ao fluconazol (2 *C. albicans*, 2 *C. tropicalis*, 2 *C. parapsilosis* e 1 *C. glabrata*). Além destas, também foram utilizadas as cepas padrão *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida auris* 01256P.

As cepas armazenadas em caldo Sabouraud dextrose (HiMedia, Mumbai, Índia) acrescido de glicerol (Dinâmica, São Paulo, Brasil) a uma temperatura de -20°C, foram

recuperadas com a utilização de 1 mL do meio caldo Sabouraud dextrose (HiMedia, Mumbai, Índia) e 100 µL da suspensão de leveduras. As cepas foram incubadas por 24h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ em estufa e transferidas para meio ágar Sabouraud dextrose sob as mesmas condições. Todos os procedimentos foram realizados sob normas de biossegurança nível 2 (DA SILVA et al., 2013).

5.2 Ativos utilizados

Ácido tânico (AT), fluconazol (FLC), itraconazol (ITC) e anfotericina B (AMB) utilizados neste estudo foram obtidos da Sigma-Aldrich (MO, EUA). ITC e AMB foram solubilizados em uma concentração de 2.5% v/v de dimetilsulfóxido (DMSO), enquanto FLC e AT foram solubilizados em água destilada estéril.

5.3 Testes de sensibilidade antifúngica

5.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima dos ativos

O teste de sensibilidade foi realizado com adaptações da metodologia de Microdiluição em Caldo, descrita pela norma M27-A3 do CLSI (CLSI, 2008). Foi utilizado o meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* RPMI 1640 (Vitrocell Embriolife, São Paulo, Brasil) com pH 7,0 tamponado com 0.165 M de ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Sigma, USA). Após a recuperação, as cepas utilizadas nos testes foram repicadas em meio de cultura Sabouraud Dextrose e incubadas em estufa, 24h antes da realização do teste, a uma temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Posterior a incubação, as colônias foram retiradas e inoculadas em solução salina estéril a 0.85% e sua densidade celular foi ajustada para a escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL). Em seguida, foram realizadas diluições em meio RPMI para a obtenção de um inóculo final contendo $0,5 - 2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

Os testes de Microdiluição em Caldo foram realizados em placas de 96 poços, estéreis e de formato em U. Para a preparação das placas, 100 µL de meio RPMI foram adicionados em cada fileira da mesma, exceto na fileira correspondente ao poço 2. Nesse poço, foram adicionados 200 µL das drogas em teste, as quais passaram por diluições seriadas de 100 µL entre os poços correspondentes às colunas 2 a 11.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de droga que impede o crescimento de 50% do microrganismo em análise visual, comparando com os crescimentos obtidos no controle positivo. Para a anfotericina B, a CIM foi considerada a menor concentração de droga que impede o crescimento de 100% do microrganismo. Os pontos

de corte para os antifúngicos foram determinados de acordo com o documento M27-S4 (CLSI, 2012), em que as cepas foram consideradas resistentes ao fluconazol quando CIM $\geq 8 \mu\text{g/mL}$, com exceção de *C. glabrata*, considerada resistente quando CIM $\geq 64 \mu\text{g/mL}$.

Os testes foram realizados em triplicata. As cepas *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foram utilizadas como controle de qualidade para os antifúngicos. AT foi testado na faixa de 0,03 - 1024 $\mu\text{g/mL}$. AMB e ITC foram testados nas faixas de concentração variando entre 0,03 - 16 $\mu\text{g/mL}$ e FLC variando entre 0,125 - 64 $\mu\text{g/mL}$.

5.3.2 Efeito das combinações das substâncias pela técnica de microdiluição em caldo

A avaliação da interação farmacológica entre AT e os antifúngicos foi realizada por meio do Método de *Checkerboard*. A classificação da interação das drogas foi considerada sinérgica, se ICIF $\leq 0,5$; aditiva, se ICIF = 1; indiferente, se $1 < \text{ICIF} < 4$ ou antagonista, se ICIF $> 4,0$ (ODDS, 2003; JORGE et al., 2017).

5.3.3. Análise dos dados dos testes de sensibilidade

Os testes foram realizados em triplicata, em dias diferentes. O resultado final foi determinado pela média aritmética dos valores de cada replicata.

5.4 Visualização das estruturas microscópicas de *Candida* por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A MEV foi realizada para avaliar o efeito do AT nas estruturas microscópicas de células planctônicas de *Candida* spp. O ensaio foi realizado com *Candida albicans* 1, tendo em vista sua relevância epidemiológica. O microrganismo foi repicado em meio ágar Sabouraud dextrose e incubado a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24h. Os inóculos foram então preparados em RPMI 1640 (pH 7,0) tamponado com MOPS com turvação referente à escala 0,5 de McFarland e diluídos até concentração de 0,5 a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. As leveduras foram então expostas às concentrações de : CIM (0,1 $\mu\text{g/mL}$) , 2x CIM (0,2 $\mu\text{g/mL}$) e 4x CIM (0,4 $\mu\text{g/mL}$) Posteriormente, as células foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24h.

Seguidamente, as amostras foram centrifugadas (2500 rpm, 5 min), lavadas com solução salina por três vezes e aderidas a lamínulas circulares de vidro (13mm) pré-tratadas com silano, na concentração de 2,5%. As células foram fixadas com solução de glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,15 M e azul de alcian (0,01%) e incubadas durante a noite a 4°C .

Subsequentemente, as células foram expostas a concentrações crescentes de etanol (50, 70, 80, 90, 95 e 100%) para desidratação. Por fim, as amostras foram submetidas a hexametildisilazano (Sigma-chemical) e revestidas com 20 nm de ouro. A observação das células fúngicas foi realizada através do microscópio eletrônico de varredura Quanta 450-FEG em modo de alto vácuo (DO AMARAL VALENTE SÁ et al., 2020).

5.5 Inibição da proliferação de células L929

O ensaio de citotoxicidade foi realizado de acordo com Cavalcanti et al. (2009). As células de fibroblastos murinos foram adquiridas através do Banco de Células do Rio de Janeiro da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil) e cultivadas em condições padrão (a 37 °C com 5% de CO₂) em meio essencial mínimo (MEM) contendo sais de Earle. Os meios de cultura foram suplementados com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 µg/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. Para a avaliação dos efeitos citotóxicos, as células foram cultivadas por dois dias antes do tratamento. Posteriormente, o meio foi substituído por meio fresco contendo ácido tânico ou DMSO, como controle. A concentração final de DMSO no meio de cultura foi mantida constante, ou seja, menor que 0.1 % (v/v).

As células L929 foram então plaqueadas em placas de 96 poços (0.3×10^6 células por poço), o ácido tânico (1.09 a 140 µg/mL) foi dissolvido em água e adicionado a cada poço, para posterior incubação por 72h. Em seguida, as placas foram centrifugadas e o meio substituído por meio fresco contendo 0,5 mg/mL de MTT. Três horas depois, o produto foi dissolvido em 150 µL de DMSO. O crescimento celular foi quantificado com base na capacidade das células viáveis em reduzir o MTT ao produto formazan. A absorbância foi então medida em um leitor de placas múltiplas (Spectra Count; Packard, Canadá). Os efeitos foram quantificados como a porcentagem de absorbância de controle do corante reduzido a 595 nm. O experimento foi realizado em duplicata e repetido três vezes.

5.6 Ensaio de hemólise

O ensaio de hemólise foi realizado em placas de 96 poços utilizando o método descrito por Berlinck et al. (1996). Os poços receberam 50 µL de solução salina contendo 10 mM de CaCl₂. O primeiro poço representou o controle negativo, contendo 1% de DMSO. No segundo poço foram adicionados 50 µL da substância teste e 50 µL de DMSO a 1%. O ácido tânico foi testado nas concentrações de 100, 500 e 1000 µg/mL. O composto foi então diluído em série até o 11º poço consecutivo. O último poço recebeu 50 µL de Triton X-100 a 0,2%, para obtenção

de 100% de hemólise (controle positivo). Posteriormente, cada poço recebeu 100 μ L de uma suspensão de eritrócitos de camundongos a 2%, contendo 10 mM de CaCl₂. Em seguida, as placas foram incubadas durante 4 horas à temperatura ambiente. Após isso, as placas foram centrifugadas, o sobrenadante foi transferido para uma nova placa e a hemoglobina liberada foi medida utilizando um leitor multiplacas (Spectra Count, Packard, Ontario, Canadá) a 540 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata em três ensaios independentes. O procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Ceará (COMEPE-UFC – protocolo número 281/09) e estão de acordo com as diretrizes brasileiras de pesquisa (Lei 466/2012, Conselho Nacional de Saúde) e com a Declaração de Helsinki.

5.7 Ensaios para detecção de alterações celulares

5.7.1 Tratamento de células de *Candida spp.*

Os seguintes ensaios foram realizados com as cepas representativas *Candida albicans* 1, *Candida parapsilosis* 1 e *Candida tropicalis* 1, tendo em vista sua relevância epidemiológica. Estas amostras foram utilizadas para avaliar efeitos na integridade da membrana celular, despolarização mitocondrial ($\Delta\psi_m$), estresse oxidativo e indução de apoptose celular. As cepas foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas. Posteriormente, as células foram suspensas em 5 mL de meio YPD e incubadas sob as mesmas condições. Subsequentemente, as células foram centrifugadas (3000 g, 5 min) e lavadas três vezes com solução salina estéril (0.85%). Por fim, as células ($\sim 10^6$ células/mL) foram ressuspensas em meio RPMI (Vitrocell Embriolife, São Paulo, Brasil), expostas às concentrações dos ativos e incubadas por 24 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ (DA SILVA et al., 2013; A. NETO et al., 2014).

AT isoladamente foi avaliado nas concentrações de CIM/2, CIM e 2xCIM para cada cepa; FLC avaliado em CIM e AMB na concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$. FLC foi utilizado como antifúngico para parâmetro de comparação e e AMB como controle positivo para morte celular.

5.7.2 Determinação da densidade numérica de células viáveis

O efeito de AT sobre a densidade de células microbianas viáveis foi avaliado pelo método de exclusão de iodeto de propídio (IP). As células tratadas foram incubadas com 2 mg/L

de IP e a fluorescência analisada por citometria de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Para cada experimento, 10.000 eventos foram avaliados. Os detritos celulares foram omitidos da análise (DA SILVA et al, 2013; A. NETO et al, 2014).

5.7.3 Avaliação do potencial de despolarização transmembrana ($\Delta\psi_m$)

As células foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS) e incubadas com rodamina 123 (5 $\mu\text{g/mL}$) (Sigma, USA) a 37 °C por 15 min ao abrigo da luz. A despolarização mitocondrial foi detectada por citometria de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Para cada experimento, 10.000 eventos foram avaliados. Os detritos celulares foram omitidos da análise (DA SILVA et al., 2013; A. NETO et al., 2014).

5.7.4 Detecção do potencial da AT em induzir apoptose celular

As suspensões microbianas foram centrifugadas (1.600 g por 10 min a 4°C) e digeridas por 2 h a 30°C em solução de tampão fosfato de potássio (pH 6,0) adicionado de sorbitol 1 M e zimoliase 20T em concentração de 2 mg/mL (Seikagaku Corp., Abingdon, UK), com o intuito de remover a parede celular fúngica. Em seguida, os protoplastos foram corados por um kit de detecção de apoptose FITC-Anexina V (Guava Nexin Kit, Guava Technologies), lavados com solução de tampão fosfato de potássio e incubados por 20 min com tampão de ligação de anexina (5 ml/ml FITC-Anexina V e 5 ml de PI). Em seguida, as amostras foram analisadas por citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Para cada experimento, 10.000 eventos foram avaliados. Os detritos celulares foram omitidos da análise (DA SILVA et al., 2013; A. NETO et al., 2014).

5.7.5 Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Para a detecção da produção de EROS, as células tratadas foram incubadas durante 30 minutos com 20 μM de CM-H2DCFDA [5-(e-6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína acetil éster] e lavadas com PBS. Em seguida, as células foram colhidas, lavadas, ressuspensas em PBS e analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). (DA SILVA et al., 2013; A. NETO et al., 2014).

5.7.6 Análise de dados dos ensaios de alteração celular

Os dados obtidos foram analisados a partir da média \pm erro padrão da média (E.P.M) de 3 experimentos independentes. A significância estatística de cada ensaio foi analisada pelo

GraphPad Prism (versão 6 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) usando análise de variância (ANOVA) e Student Newman Keuls ($p < 0,05$), para comparar os valores médios de cada teste em relação ao controle.

5.8 Ensaios para determinação de atividade contra biofilme de *Candida* spp.

Foram selecionadas 4 cepas de diferentes espécies de *Candida* como representativas, sendo elas *C. albicans* 1, *C. tropicalis* 1, *C. parapsilosis* 1 e a cepa padrão *C. auris* 01256P.

5.8.1 Preparação dos biofilmes de *Candida* spp.

A formação do biofilme foi realizada de acordo com a metodologia de Pierce et al. (2008), com modificações. As cepas de *Candida* spp. foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose incubadas por 24 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Seguidamente, as leveduras foram suspensas em 5 mL de meio YND e reincubadas sob as mesmas condições. As células foram então centrifugadas (3000 g, 5 min) e lavadas por três vezes com PBS. Posteriormente, ajustou-se a densidade celular no padrão 0,5 da escala de McFarland em meio RPMI. Por fim, foram inseridos 200 μL do inóculo em uma placa de 96 poços fundo chato e incubadas sob as condições mencionadas. No dia seguinte, o sobrenadante foi aspirado e a placa foi lavada delicadamente com PBS por três vezes para remoção das células não aderentes. Por fim, foi possível visualizar a formação de biofilme no fundo de cada poço.

5.8.2 Determinação da atividade do ácido tânico frente aos biofilmes formados de *Candida* spp.

As concentrações utilizadas para avaliar a atividade do ácido tânico frente ao biofilme formado de *Candida* spp foram 16x CIM, 32x CIM, 64x CIM e 128x CIM para cada cepa. Aos biofilmes formados de acordo com o tópico 5.7.1 foram adicionados 200 μl da concentração do ativo e posteriormente as placas foram incubadas por 24 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Seguidamente, os biofilmes foram lavados com PBS três vezes. Para a verificação da viabilidade celular foi utilizado o corante brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5 difenil tetrazólio (MTT) (1 mg/mL) (Sigma, USA). Após incubação de 18 a 20 ao abrigo da luz, o corante foi então removido e os poços lavados 3 vezes com PBS. Por fim, foram adicionados 200 μL DMSO e após 15 minutos, 100 μL foram retirados de cada poço e transferidos para uma nova placa. A leitura foi realizada em um leitor de microplaca Biochrom Asys UVM 340 (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino

Unido) a 540 nm. A redução do crescimento foi comparada ao poço que corresponde a 100% de crescimento, livre de drogas (PIERCE et al., 2008).

5.8.3. Determinação da atividade do ácido tânico sobre os biofilmes em formação de *Candida spp.*

As concentrações utilizadas para avaliar a atividade do ácido tânico frente ao biofilme ainda em formação foram 16x MIC, 32x MIC, 64x MIC e 128x MIC para cada cepa. As cepas de *Candida spp.* foram semeadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24h. No dia seguinte, as leveduras foram suspensas em 5 mL de meio YNB e reincubadas sob as mesmas condições. Seguidamente, as células foram centrifugadas (3000 g, 5 min) e lavadas com PBS por três vezes. As células foram ajustadas de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland em meio RPMI. Subsequentemente, foram inseridos 100 μL do inóculo e 100 μL da concentração das drogas em placa de 96 poços de fundo chato. As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24h. No dia seguinte, o sobrenadante foi retirado e a placa lavada delicadamente com PBS por três vezes. Para a verificação da viabilidade celular foi utilizado o corante brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio (MTT) (1 mg/mL) (Sigma, USA). Após incubação de 18 a 20 horas ao abrigo da luz, o corante foi removido, os poços lavados 3 vezes com PBS e então foram adicionados 200 μL DMSO. Após 15 minutos, foram retirados 100 μL de cada poço e transferidos para uma nova placa. A leitura foi realizada em um leitor de microplaca Biochrom Asys UVM 340 (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido) a 540 nm. A redução de crescimento foi comparada ao poço que corresponde a 100% de crescimento, livre de drogas (PIERCE et al., 2008).

5.8.4 Análise dos dados dos ensaios de biofilme

A significância estatística de cada ensaio foi analisada através do programa GraphPad Prism (versão 6 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA), utilizando a análise de variância unidirecional (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$). Os valores médios das absorvâncias dos testes foram comparados com o controle. Os ensaios foram realizados em triplicata em dias diferentes e a média dos resultados foi calculada.

6. RESULTADOS

6.1 Atividade antifúngica de AT frente a cepas sensíveis e resistentes ao fluconazol

Dentre as cepas clínicas utilizadas neste estudo, 54% (n = 7) eram resistentes ao FLC, 8% (n = 1) sensíveis dose dependentes e 38,5% (n = 5) sensíveis. As CIMs do FLC variaram de 8 a 32 µg/mL para cepas resistentes e 0,2 a 4 µg/mL para cepas suscetíveis. As CIMs do ITC variaram de 0,03 a 2 µg/mL e para AMB, os valores das CIMs variaram de 0,2 a 2 µg/mL. Os antifúngicos testados estavam dentro da faixa de concentração recomendada para as cepas de controle de qualidade. Para o AT, as CIMs variaram de 0,03 a 0,5 µg/mL (Tabela 1).

6.2 Efeito da combinação de AT com antifúngicos

Com base nos valores do ICIF, foram observadas interações indiferentes para 100% das cepas (n = 16) quando AMB e AT foram combinados. Para a combinação de AT e ITC, 93,75% das interações foram indiferentes (n = 15) e apenas uma interação foi classificada como antagonista. A combinação de FLC e AT apresentou resultados diferentes: 75% das interações foram classificadas como indiferentes (n = 12), 12,5% como sinérgicas e 12,5% como aditivas (n = 2) (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeitos do AT e dos fármacos antifúngicos frente a cepas de *Candida* spp. sensíveis e resistentes ao fluconazol, e suas interações

CEPAS	CIM isolada (µg/mL)				CIM associada (µg/mL)								
	AT	FLC	ITC	AMB	AT/FLC	ICIF	Interação	AT/ITC	ICIF	Interação	AT/AMB	ICIF	Interação
*# <i>C. albicans</i> 1	0,1	16	1	0,5	0,2/32	3,5	IND	0,1/0,8	1,6	IND	0,1/0,5	2	IND
<i>C. albicans</i> 2	0,3	16	0,5	1	0,3/16	2	IND	0,2/0,3	1,2	IND	0,3/1	2	IND
<i>C. albicans</i> 3	0,5	0,2	0,03	0,5	0,4/0,2	1,8	IND	0,3/0,1	4,3	ANT	0,4/0,4	1,6	IND
<i>C. albicans</i> 4	0,2	0,2	0,1	0,5	0,4/0,1	2,3	IND	0,1/0,1	1,4	IND	0,2/0,3	1,4	IND
# <i>C. parapsilosis</i> 1	0,2	8	0,06	0,5	0,2/6	1,5	IND	0,2/0,1	3	IND	0,2/0,4	1,6	IND
<i>C. parapsilosis</i> 2	0,2	8	0,2	0,5	0,2/0,8	2	IND	0,2/0,2	2	IND	0,2/0,4	1,6	IND
<i>C. parapsilosis</i> 3	0,2	4	0,2	0,5	0,2/4	2	IND	0,2/0,2	2	IND	0,2/0,4	1,6	IND
<i>C. parapsilosis</i> 4	0,3	0,5	0,06	0,5	0,1/0,1	0,5	SIN	0,3/0,06	2	IND	0,3/0,2	1,4	IND
# <i>C. tropicalis</i> 1	0,3	8	0,5	0,5	0,2/5	1,3	IND	0,2/0,3	1,1	IND	0,2/0,3	1,2	IND
<i>C. tropicalis</i> 2	0,2	16	1	1	0,2/16	1,6	IND	0,1/0,7	1,3	IND	0,2/0,8	1,6	IND
<i>C. tropicalis</i> 3	0,4	0,2	0,1	0,5	0,3/0,2	1,8	IND	0,4/0,1	2	IND	0,4/0,5	1,8	IND
<i>C. tropicalis</i> 4	0,5	0,2	0,1	0,5	0,2/0,02	0,5	SIN	0,3/0,1	1,3	IND	0,4/0,4	1,5	IND
<i>C. glabrata</i>	0,06	32	2	2	0,1/53,3	3,2	IND	0,06/2	2	IND	0,05/1,6	1,6	IND
# <i>C. auris</i> 01256P	0,2	4	0,2	2	0,1/2	1	ADT	0,1/0,2	1,6	IND	0,1/1,3	1,3	IND
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0,2	2	0,2	0,2	0,1/1	1,1	IND	0,2/0,2	2	IND	0,2/0,2	2	IND
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0,1	32	0,2	0,5	0,1/16	1	ADT	0,1/0,2	2	IND	0,1/0,5	2	IND

CIM: concentração inibitória mínima; ICIF: Índice da concentração inibitória fracionada; AT: Ácido Tânico; FLC: Fluconazol; ITC: Itraconazol; AMB: Anfotericina B; SIN: Sinergismo; ADT: Aditivo; IND: Indiferente; ANT: Antagonismo.

C. glabrata foi considerada resistente ao fluconazol se CIM ≥ 64 µg/mL e as outras espécies de *Candida* spp. quando CIM ≥ 8 µg/mL. Para *C. auris* não há parâmetro de corte de sensibilidade definido.

*Cepa utilizada nos ensaios de citometria de fluxo.

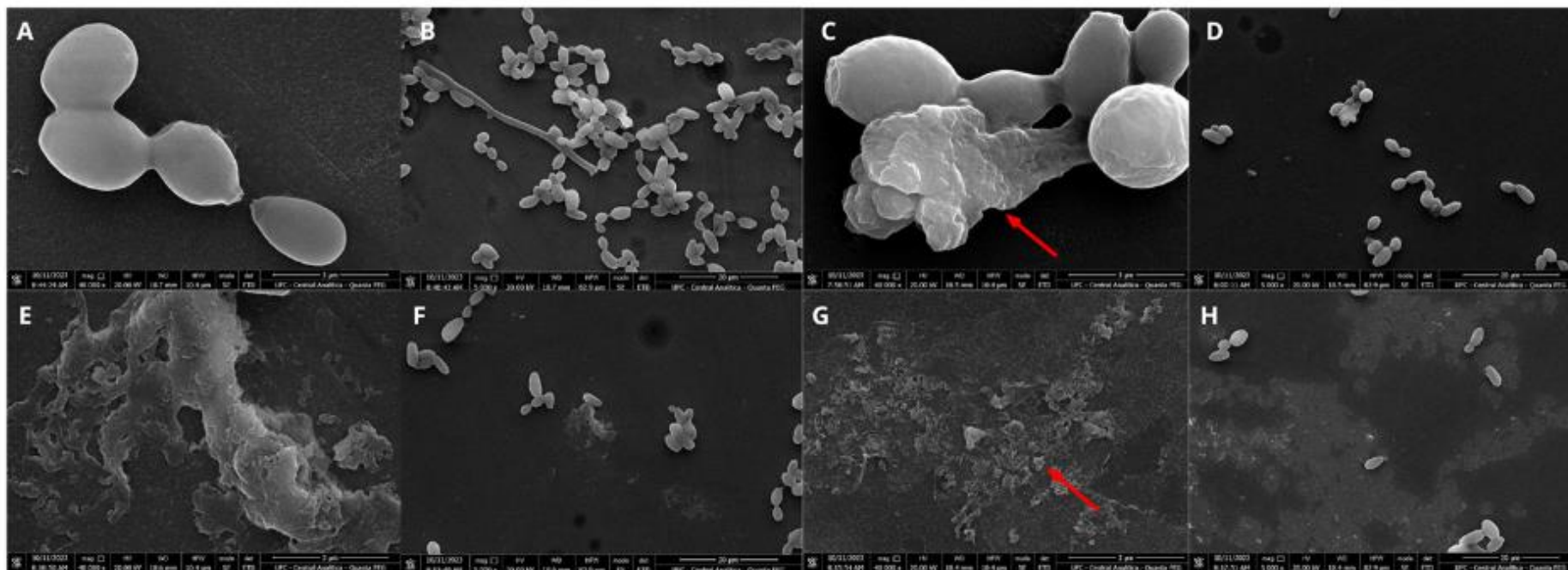
#Cepas utilizadas nos ensaios de biofilme.

Os valores de CIM e ICIF são médias aritméticas dos experimentos realizados em triplicata.

6.3 Efeito de AT na morfologia de *Candida albicans*

O tratamento com AT (Figuras 7C a H) causou danos morfológicos à estrutura externa de *Candida albicans* em todas as concentrações avaliadas, em comparação com o controle sem tratamento (Figuras 7A e 7B). Dentre as alterações, é possível observar a diminuição do número de células, a destruição da arquitetura celular, a redução de blastoconídeos e a presença de detritos celulares.

Figura 7 : MEV de Células planctônicas de *C. albicans* tratadas e não tratadas com ácido tânico.



Fonte: Autora. Microscopia eletrônica de varredura de células planctônicas de *Candida albicans*. (A e B) Controle (C e D) Tratamento com AT em CIM (0,1 µg/mL) (E e F) Tratamento com AT em 2x CIM (0,2 µg/mL) (G e H) Tratamento com AT em 4x CIM (0,4 µg/mL) Ampliação: 5.000×; barra: 20 µm. (B, D, F, H) Ampliação: 40.000×; barra: 5 µm. As partes da figura (A, C, E, G) representam (B, D, F, H) respectivamente, em ampliações menores.

6.4 Avaliação da citotoxicidade de AT em células L929

Após exposição de AT em fibroblastos murinos linhagem L929 foi observado que não houve interferência na proliferação celular. A concentração inibitória média (CI50) foi 65,72 $\mu\text{g/mL}$, como demonstrado na Tabela 2, portanto maior que o intervalo testado.

Tabela 2 – Atividade citotóxica de AT em células L929

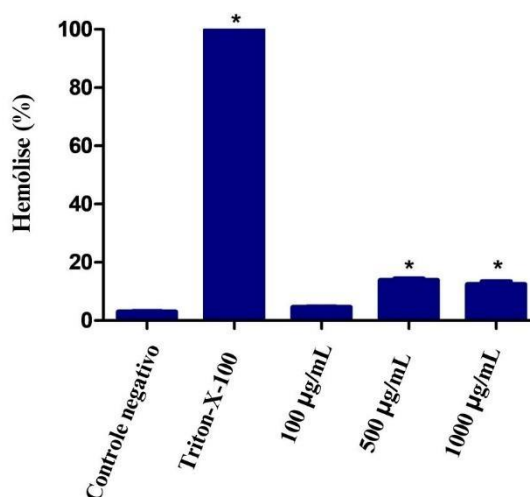
CI50 em células L929	
Ácido tânico	65,72 $\mu\text{g/mL}$ em 24h

CI50: concentração inibitória média. Atividade citotóxica do ácido tânico em células L929. Os dados de CI50 correspondem a a porcentagem de absorbância de controle do corante reduzido a 595 nm. O experimento foi realizado em duplicata e repetido três vezes.

6.5 Avaliação do ensaio de hemólise

O ácido tânico foi capaz de causar efeitos hemolíticos nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ (4,67%), 500 $\mu\text{g/mL}$ (13,9%) e 1000 $\mu\text{g/mL}$ (12,45%), como demonstrado na Figura 8.

Figura 8: Ensaio de hemólise do ácido tânico (AT)



Fonte: Autora. O controle negativo representa células não tratadas e Triton-X-100 foi utilizado como controle positivo. As concentrações testadas de AT foram 100 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$.

6.6 Densidade numérica de células viáveis

Após 24h de exposição, AT induziu redução na viabilidade celular. Para *C. albicans*, efeitos significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle ($2,4 \pm 0,1$) foram verificados em CIM/2 ($1,7 \pm 0,07$), CIM ($1,2 \pm 0,1$) e 2x CIM ($0,3 \pm 0,02$). Para *C. parapsilosis* efeitos significativos em relação ao controle ($2,1 \pm 0,07$) foram verificados em CIM/2 ($1,7 \pm 0,05$), CIM ($1,2 \pm 0,05$) e 2x CIM ($0,4 \pm 0,06$). Para *C. tropicalis* efeitos significativos em relação ao controle ($2,0 \pm 0,1$) foram observados em em CIM/2 ($1,6 \pm 0,1$), CIM ($1,2 \pm 0,06$) e 2x CIM ($0,6 \pm 0,08$).

Foi observada uma relação concentração dependente, em que para as maiores concentrações de AT foi observada uma maior diminuição de células viáveis. As células tratadas com FLC não apresentaram redução de viabilidade celular significativa em relação ao controle, enquanto para as tratadas com AMB ($4 \mu\text{g/mL}$) houve alta redução da densidade celular, como demonstrado nas Figuras 9, 10 e 11.

6.7 Despolarização mitocondrial

AT causou despolarização mitocondrial transmembrana em todas as concentrações testadas após 24 horas de tratamento ($p < 0,05$) em comparação com o controle. Para *C. albicans*, efeitos significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle ($3,1 \pm 0,05$) foram verificados em CIM/2 ($21,0 \pm 2,0$), CIM ($39,2 \pm 4,0$) e 2x CIM ($58,7 \pm 3,0$). Para *C. parapsilosis* efeitos significativos em relação ao controle ($2,6 \pm 0,1$) foram verificados em CIM/2 ($13,9 \pm 2,2$), CIM ($33,3 \pm 3,1$) e 2x CIM ($48,3 \pm 5,6$). Para *C. tropicalis* efeitos significativos em relação ao controle ($1,7 \pm 0,03$) foram observados em em CIM/2 ($16,2 \pm 1,7$), CIM ($34,7 \pm 4,0$) e 2x CIM ($48,3 \pm 5,6$).

Ressalta-se que as concentrações do controle positivo AMB ($4 \mu\text{g/mL}$) e AT nas concentrações de CIM apresentaram efeito semelhante em *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. A maior concentração de AT (2x CIM) aumentou consideravelmente a despolarização mitocondrial para todas as cepas. FLC não apresentou esse efeito para nenhuma das cepas testadas, como demonstrado nas Figuras 9, 10 e 11.

6.8 Apoptose celular

AT induziu apoptose em todas as concentrações. Para *C. albicans*, efeitos significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle ($1,5 \pm 0,03$) foram verificados em CIM/2 ($16,8 \pm 2,6$), CIM ($43,4 \pm 3,6$) e 2x CIM ($60,8 \pm 3,7$). Para *C. parapsilosis* efeitos significativos em

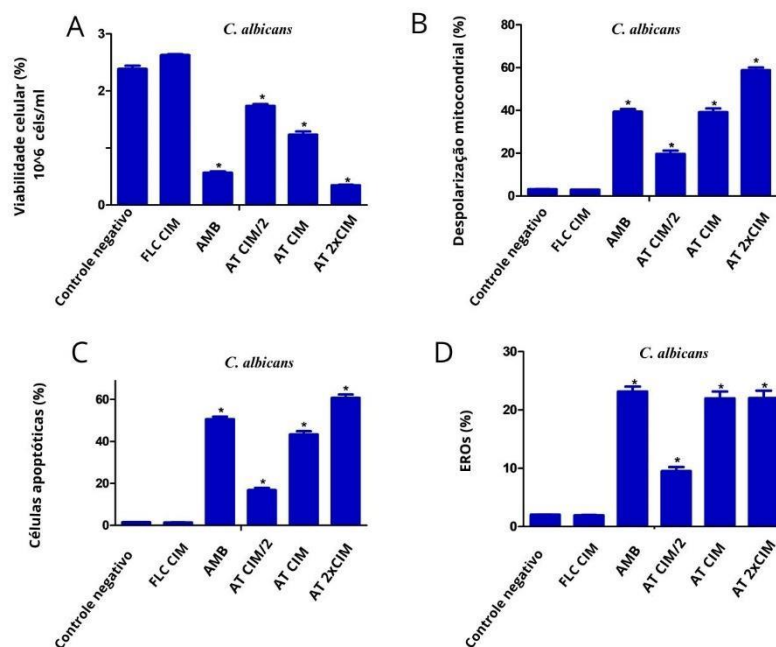
relação ao controle ($2,3 \pm 0,06$) foram verificados em CIM/2 ($22,6 \pm 2,2$), CIM ($49,3 \pm 3,2$) e 2x CIM ($59,1 \pm 4,1$). Para *C. tropicalis* efeitos significativos em relação ao controle ($1,2 \pm 0,9$) foram observados em em CIM/2 ($16,1 \pm 3,2$), CIM ($36,4 \pm 3,5$) e 2x CIM ($49,3 \pm 2,2$). Nota-se que AT na concentração de 2x CIM induziu um efeito apoptótico superior ao controle positivo ($50,6 \pm 2,9$) para a cepa de *C. albicans*, como demonstrado nas Figuras 9, 10 e 11.

6.9 Formação de EROs

O tratamento com AT apresentou níveis elevados de EROs intracelulares ($p < 0,05$), comparado ao controle não tratado em todas as concentrações testadas. Para *C. albicans*, efeitos significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle ($2,0 \pm 0,07$) foram verificados em CIM/2 ($9,5 \pm 1,7$), CIM ($21,9 \pm 2,8$) e 2x CIM ($22,3 \pm 3,4$). Para *C. parapsilosis* efeitos significativos em relação ao controle ($1,2 \pm 0,1$) foram verificados em CIM/2 ($7,7 \pm 2,9$), CIM ($15,5 \pm 2,9$) e 2x CIM ($15,4 \pm 3,9$). Para *C. tropicalis* efeitos significativos em relação ao controle ($1,7 \pm 0,01$) foram observados em em CIM/2 ($6,1 \pm 2,8$), CIM ($14,6 \pm 2,9$) e 2x CIM ($14,6 \pm 2,9$).

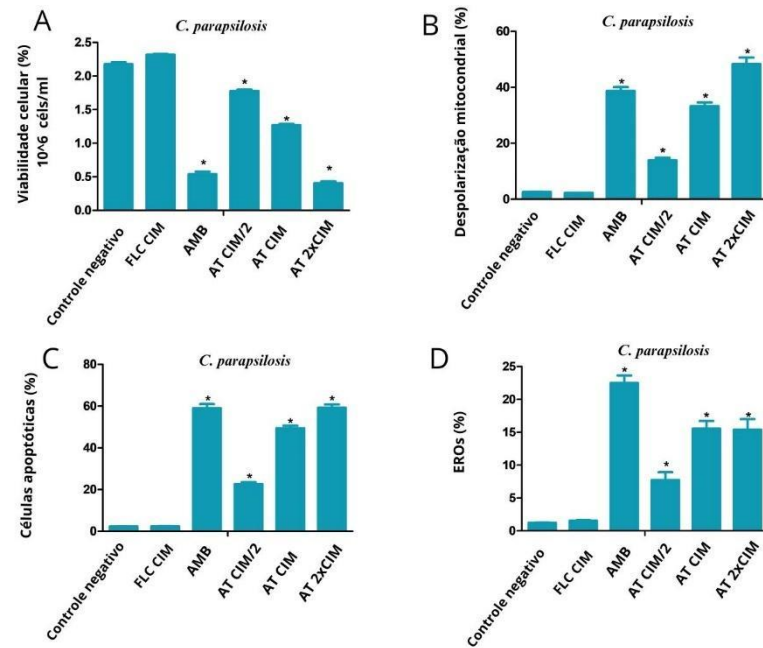
Para AMB houve grande produção de EROs para todas as cepas, enquanto o FLC não induziu tal produção. É importante notar que o AT nas concentrações de CIM e 2x CIM induziu produção de EROs semelhante para todas as cepas testadas, como demonstrado nas Figuras 9, 10 e 11.

Figura 9: Ensaio de citometria do ácido tânico frente *C. albicans*



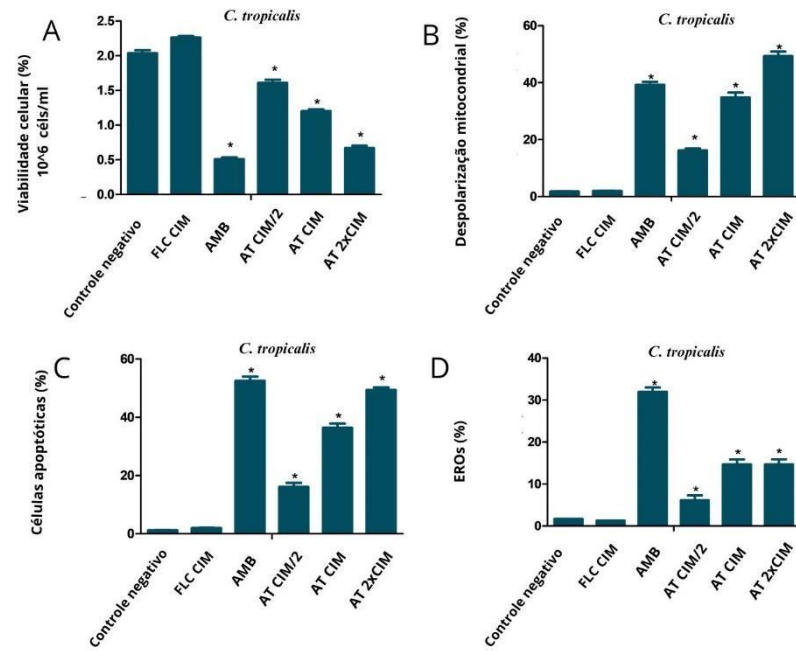
Fonte: Autora. O mecanismo de ação de AT foi avaliado nos ensaios de viabilidade celular (A); despolarização mitocondrial (B); apoptose (C) e EROs (D). Para *C. albicans* foram testados: FLC CIM (16 µg/mL); AMB (4 µg/mL); AT CIM/2 (0,05 µg/mL); AT CIM (0,1 µg/mL) e AT 2x CIM (0,2 µg/mL).

Figura 10: Ensaios de citometria do ácido tânico frente *C. parapsilosis*



Fonte: Autora. O mecanismo de ação de AT foi avaliado nos ensaios de viabilidade celular (A); despolarização mitocondrial (B); apoptose (C) e EROs (D). Para *C. parapsilosis* foram testados: FLC CIM (8 µg/mL); AMB (4 µg/mL); AT CIM/2 (0,1 µg/mL); AT CIM (0,2 µg/ml) e AT 2x CIM (0,4 µg/mL).

Figura 11: Ensaios de citometria do ácido tânico frente *C. tropicalis*

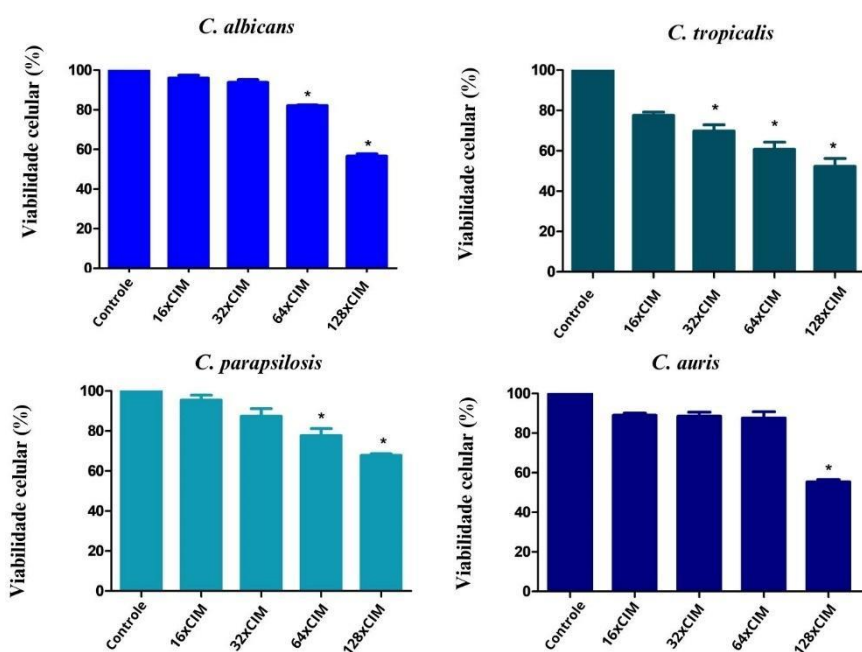


Fonte: Autora. O mecanismo de ação de AT foi avaliado nos ensaios de viabilidade celular (A); despolarização mitocondrial (B); apoptose (C) e EROs (D). Para *C. tropicalis* foram testados: FLC CIM (8 $\mu\text{g/mL}$); AMB (4 $\mu\text{g/mL}$); AT CIM/2 (0,15 $\mu\text{g/mL}$); AT CIM (0,3 $\mu\text{g/mL}$) e AT 2x CIM (0,6 $\mu\text{g/mL}$).

6.10 Atividade do AT frente a biofilmes formados de *Candida* spp.

AT apresentou redução significativa ($p < 0,05$) da viabilidade do biofilme formado em relação ao controle nas concentrações de 32x CIM, 64x CIM e 128x CIM para *C. tropicalis*. Para as cepas de *C. albicans* e *C. parapsilosis* houve redução significativa nas concentrações de 64 x CIM e 128x CIM. Para *C. auris*, foi apresentada redução significativa apenas em 128x CIM, como demonstrado na Figura 12.

Figura 12: Efeito de AT sobre biofilmes formados de *Candida* spp.

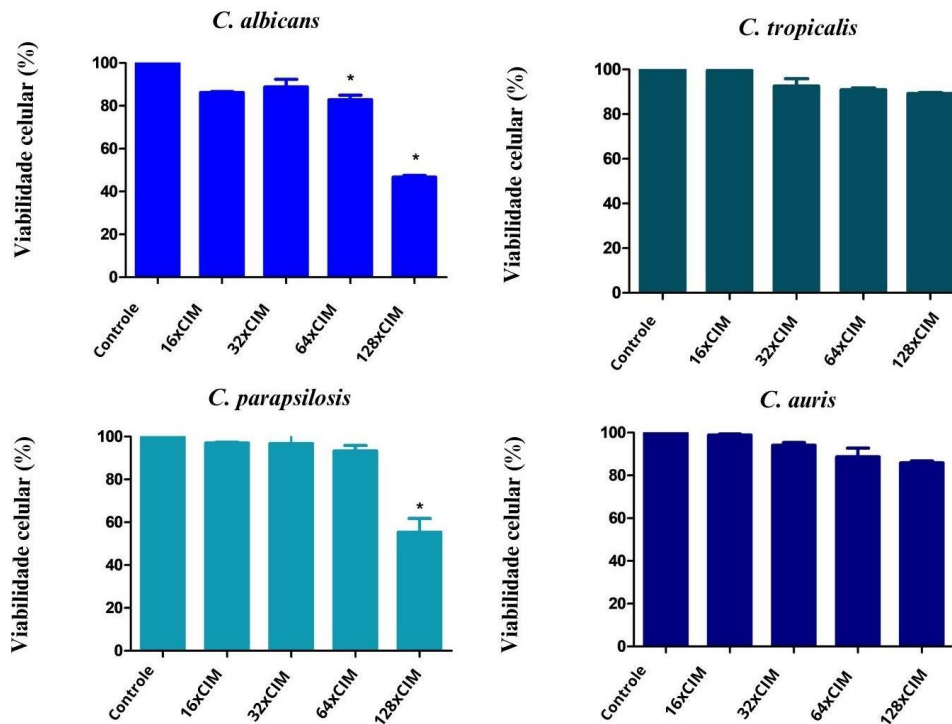


Fonte: Autora

6.11 Atividade do AT frente a biofilmes em formação de *Candida* spp.

O tratamento com AT apresentou redução significativa ($p < 0,05$) da viabilidade do biofilme em formação em relação ao controle nas concentrações de 64x CIM e 128x CIM para *C.albicans*. Para a cepa de *C. parapsilosis* houve redução significativa na concentração de 128x CIM. Para *C. auris* e *C. tropicalis* não foi apresentada redução significativa do biofilme em formação nas concentrações testadas, como demonstrado na Figura 13.

Figura 13: Efeito de AT sobre biofilmes em formação de *Candida* spp.



Fonte: Autora

7. DISCUSSÃO

No presente estudo foi demonstrado que o ácido tânico destaca-se como alternativa ao combate de diferentes espécies do gênero *Candida* spp. Nesse viés, os taninos são um grupo de bioativos amplamente estudados, compreendendo moléculas com propriedades antifúngicas evidenciadas e atribuídas à presença de grupos fenólicos em sua estrutura química (MARTINS et al., 2015). Corroborando com tal hipótese, a literatura apresenta dados da atividade anticandida de outros compostos fenólicos de origem vegetal, como o ácido elágico e o ácido cafeico (LI et al., 2015; SARDI et al., 2016). Além disso, a literatura apresenta a atividade antifúngica de AT frente a fungos filamentosos, como *Penicillium digitatum*, tendo em vista que AT apresentou efeito inibitório de 50% no crescimento micelial a 400 µg/mL (ZHU et al., 2019).

Tratando-se das cepas resistentes ao fluconazol, é possível observar que a CIM obtida de AT foi consideravelmente inferior a do FLC, como demonstrado, por exemplo, para *Candida albicans* 1 e *Candida glabrata*, que apresentaram respectivamente CIM para o FLC de 16 µg/mL e 32 µg/mL, enquanto para o AT as CIMs foram de 0,1 µg/mL e 0,06 µg/mL. Além disso, a CIM de AT foi semelhante a de outros antifúngicos já utilizados na terapêutica, como anfotericina B e itraconazol. Entretanto, é importante destacar que tais tratamentos antifúngicos disponíveis possuem estreitas janelas terapêuticas e elevada toxicidade. Dentre os principais efeitos tóxicos causados por esses antifúngicos é possível mencionar hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (SCORZONI et al., 2016; KYRIAKIDIS, et al., 2017 ; TRAGIANNIDIS et al., 2021). Desta forma, é de suma importância explorar novas estratégias terapêuticas que não possuam efeitos citotóxicos exacerbados.

Em nosso estudo, as concentrações antifúngicas do AT foram consideravelmente inferiores aos valores encontrados como citotóxicos em células L929 e aqueles capazes de apresentar capacidade hemolítica em hemácias de camudongos. Nesse viés, a literatura apresenta valores bem estabelecidos da toxicidade de AT em modelos animais. O estudo de Samanta et al. (2004) demonstrou que a dose letal mediana do ácido tânico é de 2260 mg/kg de peso corporal em ratos. Além disso, Zhu et al. (1992) concluíram que doses orais de 8.000 mg de AT por kg de peso corporal não produziu nenhum efeito renal ou lesão hepática em ovelhas. Em humanos, o efeito citotóxico do AT não é comprovado. A literatura apresenta casos de hepatotoxicidade grave reportados durante as décadas de 1930 e 1940, em pacientes que utilizaram AT em altas concentrações para tratamento de queimaduras graves. Entretanto, tal

efeito pôde também ser atribuído à própria patogênese da queimadura (BALDWIN & BOOTH, 2022). Embora demonstre-se que AT seja tóxico em concentrações suficientemente elevadas, existe uma janela terapêutica na qual esse composto apresenta propriedades benéficas, sem efeitos fisiológicos negativos reportados.

Acerca da associação entre AT e antifúngicos FLC, ITC e AMB não foram encontrados dados disponíveis na literatura. Nossos achados demonstraram que as combinações foram diferentemente classificadas, a depender dos antifúngicos. A combinação AT + FLC foi a mais promissora, apresentando 12,5% de interações sinérgicas e 12,5% de aditivas. A associação AT + ITC, por sua vez, demonstrou majoritariamente interações do tipo indiferente e apenas a interação com uma cepa foi classificada como antagonista. Rodrigues et al. (2023) traz a hipótese de que embora FLC e ITC pertençam à mesma classe de antifúngicos, estes medicamentos possuem estruturas químicas muito diferentes. Desta forma, diferentes interações farmacológicas podem ser observadas quando tais fármacos são combinados com outras drogas, uma vez que muitos fatores podem afetar as interações entre diferentes moléculas, como peso, solubilidade e efeitos estereoquímicos entre grupos funcionais, dentre outros. Acerca da combinação AT + AMB, 100% das interações foram classificadas como indiferentes, demonstrando-se que a utilização concomitante destes ativos não provoca redução do efeito antifúngico.

Sobre os ensaios realizados para elucidar o mecanismo de ação, demonstra-se que AT pode atuar na célula fúngica de diferentes maneiras. Neste contexto, o estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio no balanço entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes, podendo exercer efeitos deletérios, causados por espécies reativas de oxigênio. Dentre estes efeitos é possível mencionar danos de membrana, peroxidação lipídica e modificações no DNA e em proteínas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2015). A literatura reporta que taninos, incluindo o ácido tânico, podem apresentar dualidade nesta atividade, sendo esta tanto pró-oxidante quanto antioxidante, por mecanismos ainda não estabelecidos (KHAN, AHMAD & HADI., 2000; BOUKI et al., 2013; MOILANEN et al., 2016). Nosso estudo demonstrou que AT foi capaz de induzir a formação de EROs em *Candida* spp., portanto, exerceu um mecanismo pró-oxidante. Corroborando com esses achados, o estudo com amostras de vanádio de Liu et al. (2023) demonstrou que o composto causou aumentos na detecção de EROs, levando à diminuição do número de células, à destruição da arquitetura e ao vazamento dos materiais intracelulares, inibindo assim o crescimento e a reprodução de *C. albicans*, sendo tais efeitos

semelhantes aos observados em nossos ensaios de microscopia eletrônica de varredura para o ácido tânico.

Nosso estudo demonstra também que AT foi capaz de induzir apoptose e causar despolarização mitocondrial em células fúngicas. Corroborando com esse achado, a literatura apresenta diversos relatos de efeitos semelhantes gerados pelo AT em células cancerígenas de diferentes sítios, como câncer de mama, próstata, fígado e colorretal (BOOTH et al., 2013; NAGESH, et al., 2018; GENG, et al., 2019; SHAHABI NEJAD; KARAMI & DARVISH., 2023). Neste sentido, os estudos demonstram que AT interfere em vias de sinalização celulares e por consequência, em diversas funções biológicas, como proliferação e diferenciação celular, o que resulta em alterações mitocondriais que ativam uma cascata de apoptose intrínseca. (DARVIN et al., 2015 & 2017). Nossa hipótese é de que efeitos caracterizados para células cancerígenas também ocorram nas células fúngicas, tendo em vista as semelhanças estruturais entre células fúngicas e de mamíferos. Em concordância com tais achados, o estudo de Alam et al. (2023) demonstrou que um derivado do eugenol (composto fenólico presente no óleo de cravo) apresentou atividade antifúngica significativa causada por apoptose e por parada do ciclo celular na espécie *C. auris*.

Desta forma, nossos resultados propõem que a atividade antifúngica de AT em *Candida* spp. é exercida através de uma atividade pró-oxidante, em que ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio nas células fúngicas. Estas EROs geram um estresse oxidativo, resultando na indução de sinais mediadores de apoptose. Em decorrência destes processos, ocorre a diminuição do número de células viáveis. Contudo, estudos propõem outros mecanismos de ação para AT, os quais podem ocorrer concomitantemente aos achados em nossos ensaios. Dentre estes é possível mencionar que a adstringência de AT pode induzir a complexação com enzimas ou substratos necessários para a função das células e também gerar a precipitação de nutrientes essenciais. Além disso, outro mecanismo proposto, é que AT pode formar ligações de hidrogênio entre grupos da membrana plasmática, ocasionando alterações na permeabilidade da membrana e aumento da pressão osmótica (BALDWIN & BOOTH, 2022).

Os biofilmes constituem um importante fator de virulência do gênero *Candida* spp., tendo em vista que essa associação microbiana é formada especialmente em cateteres e dispositivos protéticos, constituindo um importante fator de infecções disseminadas por *Candida*, principalmente por tolerância intrínseca a quase todos os antifúngicos em uso clínico,

como os azólicos e a anfotericina B (d'ENFERT; BOUGNOUX, 2014; CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018). Desta forma, é de grande importância que o desenvolvimento de novas terapias antifúngicas esteja focado na prevenção e destruição de biofilmes. A literatura reporta que taninos podem apresentar atividade em biofilmes de *Candida* spp., (LUIZ et al., 2015; T MOREY., et al, 2016; DE FREITAS et al., 2018). Contudo, não há relatos sobre a atividade isolada de AT frente ao gênero. Nesse viés, a atividade antibiofilme de AT já é conhecida e reportada em bactérias, como *Staphylococcus aureus* (LEE et al., 2013; DONG et al., 2019) e *Pseudomonas aeruginosa* (O'MAY et al., 2012; SIDDIQUI, 2015). Tais ensaios demonstram que a atividade de AT se dá no processo de formação do biofilme e também em biofilmes maturados.

Acerca dos ensaios realizados para elucidar a atividade antibiofilme de AT, foi demonstrado que para biofilmes em formação das espécies *C. auris* e *C. tropicalis* não foi apresentada uma redução significativa do biofilme, o que pode ser explicado pelo mecanismo antibiofilme de AT estar relacionado a espécies específicas, contudo, mais estudos devem ser executados para avaliar como esse composto penetra e atua nessas estruturas. Nosso estudo demonstrou também que a atividade de AT em biofilmes de *Candida* spp. foi mais eficiente em biofilmes formados, tendo em vista que valores significativamente estatísticos de redução da viabilidade celular foram observados para todas as diferentes espécies testadas. Neste sentido, tal fenômeno pode ser atribuído a capacidade de AT em agir diferentemente, a depender do estágio de maturação do biofilme. A literatura reporta que outras substâncias agem de forma semelhante, como a N-acetilcisteína, que é mais eficaz em reduzir biofilmes formados ao atingir seus componentes solúveis, mas não interfere na síntese dos componentes da matriz durante a formação do biofilme (NUNES et al., 2020).

Nos últimos 20 anos, AT tem sido utilizado no desenvolvimento de muitos novos biomateriais. Graças à sua capacidade de formar inúmeras interações de ligações de hidrogênio com uma ampla variedade de moléculas, o composto tem chamado a atenção como um potencial agente de reticulação em hidrogel e biomateriais poliméricos. Além disso, AT tem sido usado para melhorar as propriedades mecânicas de biomateriais naturais e sintéticos existentes e para criar revestimentos de filmes finos e nanopartículas (BALDWIN & BOOTH, 2022).

Diante dos resultados do presente trabalho é possível vislumbrar aplicações das propriedades antifúngicas de AT, por exemplo, seu uso tópico. Nesse viés, Sahiner et al. (2016) mostram essa aplicação antimicrobiana em um hidrogel feito à base de AT. Uma das aplicações

propostas para o material é a proteção de feridas. O teste preliminar mostrou que o hidrogel é uma barreira eficiente contra microorganismos como *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus* e *C. albicans*.

É importante ressaltar que os dados obtidos para citotoxicidade em células de mamíferos demonstraram que AT é seguro nas concentrações que exerce sua atividade antifúngica, o que reforça a hipótese de que pode ser utilizado com segurança por pacientes. Apesar disso, mais estudos devem ser realizados para elucidar as características farmacocinéticas de AT, com o intuito de determinar possíveis aplicações antifúngicas *in vivo*.

8. CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou que AT é um potencial candidato a agente antifúngico, por apresentar atividade frente *Candida* spp. tanto em forma planctônica como em biofilme. Além disso, AT exerce tais atividades em concentrações consideradas seguras para células de mamíferos. Nesse viés, é de suma importância que mais estudos sejam realizados e para tornar o composto aplicável *in vivo*.

9. REFERÊNCIAS

- ACEVEDO-RAMÍREZ, P.M et al. Anthelmintic effect and tissue alterations induced in vitro by hydrolysable tannins on the adult stage of the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus*. **Veterinary parasitology**, v. 266, p. 1-6, 2019.
- AHMAD, S.; ALFOUZAN, W. *Candida auris*: Epidemiology, diagnosis, pathogenesis, antifungal susceptibility, and infection control measures to combat the spread of infections in healthcare facilities. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, p. 807, 2021.
- AKIYAMA, H. et al. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 487-491, 2001.
- AJALA, O.S.; JUKOV, A.; M.A, C. Hepatitis C virus inhibitory hydrolysable tannins from the fruits of *Terminalia chebula*. **Fitoterapia**, v. 99, p. 117-123, 2014.
- ALAM, H. et al. Cellular apoptosis and cell cycle arrest as potential therapeutic targets for eugenol derivatives in *Candida auris*. **Plos one**, v. 18, n. 6, p. e0285473, 2023.
- ALDARDEER, N.F. et al. Antifungal resistance in patients with *Candidaemia*: a retrospective cohort study. **BMC infectious diseases**, v. 20, p. 1-7, 2020.
- ALAVINIA, S.J. et al. The in vitro and in vivo effect of tannic acid on *Ichthyophthirius multifiliis* in zebrafish (*Danio rerio*) to treat ichthyophthiriasis. **Journal of fish diseases**, v. 41, n. 12, p. 1793-1802, 2018.
- ALMEIDA, J.N. de *et al.* Emergence of *Candida auris* in Brazil in a COVID-19 intensive care unit. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 3, p. 220, 2021.
- ARASTEHFAR, A. et al. Drug-resistant fungi: an emerging challenge threatening our limited antifungal armamentarium. **Antibiotics**, v. 9, n. 12, p. 877, 2020.
- ASHBURN, T.T.; THOR, K.B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature reviews Drug discovery**, v. 3, n. 8, p. 673-683, 2004.
- ASSRESS, H.A *et al.* Antifungal azoles and azole resistance in the environment: current status and future perspectives — a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 20, n. 4, p. 1011-1041, 2021.
- BABA-MOUSSA, F.; AKPAGANA, K.; BOUCHET, Ph. Antifungal activities of seven West African Combretaceae used in traditional medicine. **Journal of ethnopharmacology**, v. 66, n. 3, p. 335-338, 1999.
- BALDWIN, A.; BOOTH, B.W. Biomedical applications of tannic acid. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 36, n. 8, p. 1503-1523, 2022.
- BANDARA, N.; SAMARANAYAKE, L. Emerging and future strategies in the management of recalcitrant *Candida auris*. **Medical Mycology**, v. 60, n. 4, 2022.
- BARRETT-BEE, K. et al. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. **Microbiology**, v. 131, n. 5, p. 1217-1221, 1985.

BARRIENTOS, A.C. M et al. “Breakthrough Candidemia in Pediatric Patients With Cancer From a Brazilian Center”. *Pediatric Infectious Disease Journal*, vol. 40, no 3 de março de 2021, p. 251–54. 2021.

BELVONCIKOVA, P. et al. The human mycobiome: Colonization, composition and the role in health and disease. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 10, p. 1046, 2022.

BEN-AMI, R. Treatment of invasive candidiasis: A narrative review. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 97, 2018.

BENEDICT, K. *et al.* Estimation of Direct Healthcare Costs of Fungal Diseases in the United States. **Clinical Infectious Diseases**. v. 68, n. 11, p. 1791–1797, 2019.

BERLINCK, R.G.S. et al. Chemical and pharmacological characterization of halitoxin from *Amphimedon viridis* (Porifera) from the southeastern Brazilian coast. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 115, n. 2, p. 155-163, 1996.

BONGOMIN, F. et al. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases — Estimate Precision. **Journal of Fungi**. v. 3, n. 4, p. 57, 2017.

BOOTH, Brian W. et al. Tannic acid preferentially targets estrogen receptor-positive breast cancer. **International journal of breast cancer**, v. 2013, 2013.

BORBA, H. et al. Cost-effectiveness of amphotericin B formulations in the treatment of systemic fungal infections. **Mycoses**, v. 61, n. 10, p. 754-763, 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE POLÍTICAS DE SAÚDE. **Caderno de atencao básica: manual técnico para o controle da tuberculose: versão preliminar**. Brasil. Ministério da Saúde, 2002.

BIDAUD, A. *et al.* Techniques for the assessment of in vitro and in vivo antifungal combinations. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 113, 2021.

BOUKI, E. et al. Antioxidant and pro-oxidant challenge of tannic acid in mussel hemocytes exposed to cadmium. *Marine environmental research*, v. 85, p. 13-20, 2013.

CABRAL, V.P.F et al. Antibacterial activity of paroxetine against *Staphylococcus aureus* and possible mechanisms of action. **Future Microbiology**, n. 0, 2023.

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

CANELA, H.M.S. *et al.* Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. **Mycoses**, v. 61, n. 1, p. 11-21, 2018.

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

CAROLUS, H. et al. Amphotericin B and other polyenes—discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 321, 2020.

CASADEVALL, A. Immunity to invasive fungal diseases. **Annual review of immunology**, v. 40, p. 121-141, 2022.

CAVALCANTI, B. C. et al. Kauren-19-oic acid induces DNA damage followed by apoptosis in human leukemia cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 29, n. 7, p. 560–568. 2009.

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M.C. *Candida* biofilms: threats, challenges, and promising strategies. **Frontiers in medicine**, v. 5, p. 28, 2018.

CHEN, J. *et al.* Molecular Epidemiology, Antifungal Susceptibility, and Virulence Evaluation of *Candida* Isolates Causing Invasive Infection in a Tertiary Care Teaching Hospital. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, 2021.

CHOWDHURY, P. et al. Tannic acid-inspired paclitaxel nanoparticles for enhanced anticancer effects in breast cancer cells. **Journal of colloid and interface science**, v. 535, p. 133-148, 2019.

CIUREA, C. N et al. *Candida* and candidiasis—opportunism versus pathogenicity: a review of the virulence traits. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 857, 2020.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition M27-A3**. Disponível em: <www.clsi.org.>.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts fourth informational supplement M27-S4**. Disponível em: <www.clsi.org.>

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CZECHOWICZ, P.; NOWICKA, J.; GOŚCINIAK, G.. Virulence factors of *Candida* spp. and host immune response important in the pathogenesis of vulvovaginal candidiasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 11, p. 5895, 2022.

DANESHNIA, F. et al. Worldwide emergence of fluconazole-resistant *Candida parapsilosis*: current framework and future research roadmap. **The Lancet Microbe**, 2023.

DA SILVA, C.R *et al.* Synergistic effects of amiodarone and fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1691-1700, 2013.

DARVIN, P. et al. Tannic acid inhibits the Jak2/STAT3 pathway and induces G1/S arrest and mitochondrial apoptosis in YD-38 gingival cancer cells. **International journal of oncology**, v. 47, n. 3, p. 1111-1120, 2015.

DARVIN, P. et al. Tannic acid inhibits EGFR/STAT 1/3 and enhances p38/STAT 1 signalling axis in breast cancer cells. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 21, n. 4, p. 720-734, 2017.

DAS, A.K et al. Review on tannins: Extraction processes, applications and possibilities. **South African Journal of Botany**, v. 135, p. 58-70, 2020.

DE BARROS, P. et al. Candida biofilms: an update on developmental mechanisms and therapeutic challenges. **Mycopathologia**, v. 185, n. 3, p. 415-424, 2020.

DE FREITAS, A.L.D. et al. Proanthocyanidin polymeric tannins from *Stryphnodendron adstringens* are effective against *Candida* spp. isolates and for vaginal candidiasis treatment. **Journal of ethnopharmacology**, v. 216, p. 184-190, 2018.

DEORUKHKAR, S. C.; ROUSHANI, S. Virulence traits contributing to pathogenicity of *Candida* species. **Journal of Microbiology.& Experimentation**, v. 5, p. 00140, 2017.

DO AMARAL VALENTE SÁ, L.G. Antifungal activity of etomidate against growing biofilms of fluconazole-resistant *Candida* spp. strains, binding to mannoproteins and molecular docking with the ALS3 protein. **Journal of Medical Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 1221-1227, 2020.

DOI, A.M, et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance ProGram. **PLOS ONE**, v. 11, n.1, p. e0146909. 2016.

DONLAN R.M, COSTERTON J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 15, n.2, p. 167-193, 2002.

DONG, G. et al. Antimicrobial and anti-biofilm activity of tannic acid against *Staphylococcus aureus*. **Natural product research**, v. 32, n. 18, p. 2225-2228, 2018.

ESTEVES, P. et al. (1,3) - β -D - glucan Is Able to Predict Therapeutic Failure of Patients with Candidemia and Not Only Mortality. **Mycoses**, vol. 64, no 3, março de 2021, p. 264–71. DOI.org (Crossref), doi:10.1111/myc.13224.

FIOCRUZ. Avanço dos fungos no Brasil: Radis alerta sobre infecções fúngicas que deixam sequelas e podem levar à morte. 2019. Disponível em: <https://informe.ensp.fiocruz.br/noticias/45257>> Acesso em 03 de novembro de 2023.

FISHER, M. C.; DENNING, D.W. The WHO fungal priority pathogens list as a game-changer. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 211-212, 2023.

FUNATOGAWA, K. et al. Antibacterial activity of hydrolyzable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. **Microbiology and immunology**, v. 48, n. 4, p. 251-261, 2004.

GENG, N. et al. Tannic acid synergistically enhances the anticancer efficacy of cisplatin on liver cancer cells through mitochondria-mediated apoptosis. **Oncology reports**, v. 42, n. 5, p. 2108-2116, 2019.

GEORGOPAPADAKOU, N.H. Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs. **Current opinion in microbiology**, v. 1, n. 5, p. 547-557, 1998.

GHANNOUM, M. et al. The role of echinocandins in *Candida* biofilm-related vascular catheter infections: in vitro and in vivo model systems. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 6, p. 618-621, 2015.

GIACOMAZZI, J. *et al.* The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, p. 145–150, 2016.

- GISI, U. Crossover between the control of fungal pathogens in medicine and the wider environment, and the threat of antifungal resistance. **Plant Pathology**, p. 1–19, 2021.
- GUGLIELMI, P.; PONTECORVI, V.; ROTONDI, G. Natural compounds and extracts as novel antimicrobial agents. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 30, n. 12, p. 949-962, 2020.
- GUO, Z. et al. Tannic acid-based metal phenolic networks for bio-applications: A review. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 9, n. 20, p. 4098-4110, 2021.
- GYAWALI, R.; IBRAHIM, S.A. Natural products as antimicrobial agents. **Food control**, v. 46, p. 412-429, 2014.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford university press, USA, 2015.
- HANCOCK, V. et al. Dietary plant components ellagic acid and tannic acid inhibit *Escherichia coli* biofilm formation. **Journal of medical microbiology**, v. 59, n. 4, p. 496-498, 2010.
- HARO-REYES, T. et al. Polyene antibiotics physical chemistry and their effect on lipid membranes; impacting biological processes and medical applications. **Membranes**, v. 12, n. 7, p. 681, 2022.
- HOSTETTER, M.K. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. **Clinical microbiology reviews**, v. 7, n. 1, p. 29-42, 1994.
- HORTON, M.V. et al. *Candida auris* forms high-burden biofilms in skin niche conditions and on porcine skin. **MSphere**, v. 5, n. 1. 2020.
- HOUŠŤ, J.; SPÍŽEK, J.; HAVLÍČEK, V.. Antifungal drugs. **Metabolites**, v. 10, n. 3, p. 106, 2020.
- HUANG, L. et al. The effects of natural products and environmental conditions on antimicrobial resistance. **Molecules**, v. 26, n. 14, p. 4277, 2021.
- ISHIDA, K. et al. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 942-949, 2006.
- JARADA, N.T; ROKNE, J.G.; ALHAJJ, R. A review of computational drug repositioning: strategies, approaches, opportunities, challenges, and directions. **Journal of Cheminformatics**, v. 12, n. 46. 2020.
- JING, W. et al. Pharmacological effects and mechanisms of tannic acid. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 154, p. 113561, 2022.
- JORGE, P. *et al.* Searching for new strategies against biofilm infections: Colistin-AMP combinations against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* single- and double-species biofilms. **PLoS One**, v. 12, n. 3. 2017.
- KACZMAREK, B. Tannic acid with antiviral and antibacterial activity as a promising component of biomaterials—A minireview. **Materials**, v. 13, n. 14, p. 3224, 2020.

KARIM, M. A. et al. In vitro evaluation of anthelmintic activity of tannin-containing plant *Artemisia* extracts against *Haemonchus contortus* from goat: Anthelmintic activity of tannin-containing plants *Artemisia*. **Journal of the Bangladesh Agricultural University**, v. 17, n. 3, p. 363-368, 2019.

KARIMI, A. et al. Anti-Herpes Simplex Virus Type-1 Activity and Phenolic Content of Crude Ethanol Extract and Four Corresponding Fractions of *Quercus brantii* L Acorn. **Journal of evidence-based complementary & alternative medicine**, v. 22, n. 3, p. 455-461, 2017.

KEBEDE, T.; GADISA, E.; TUFA, A. Antimicrobial activities evaluation and phytochemical screening of some selected medicinal plants: A possible alternative in the treatment of multidrug-resistant microbes. **PLoS One**, v. 16, n. 3, p. e0249253, 2021.

KHAN, N. S.; AHMAD, Aamir; HADI, S. M. Anti-oxidant, pro-oxidant properties of tannic acid and its binding to DNA. **Chemico-Biological Interactions**, v. 125, n. 3, p. 177-189, 2000.

KOEHLER, P. et al. Morbidity and mortality of candidaemia in Europe: an epidemiologic meta-analysis. **Clinical microbiology and infection**, v. 25, n. 10, p. 1200-1212, 2019.

KOLODZIEJ, H. et al. Antileishmanial activity of hydrolyzable tannins and their modulatory effects on nitric oxide and tumour necrosis factor- α release in macrophages in vitro. **Planta Medica**, v. 67, n. 09, p. 825-832, 2001.

KYRIAKIDIS, I. et al. Clinical hepatotoxicity associated with antifungal agents. **Expert opinion on drug safety**, v. 16, n. 2, p. 149-165, 2017.

KRISTANC, L. *et al.* The pore-forming action of polyenes: From model membranes to living organisms. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1861, n. 2, p. 418-430, 2019.

LEE, J. et al. Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. **Biofouling**, v. 29, n. 5, p. 491-499, 2013.

LEE, Y. et al. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. **Chemical reviews**, v. 121, n. 6, p. 3390-3411, 2020.

LI, Zhi-Jian et al. Antifungal activity of ellagic acid in vitro and in vivo. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 7, p. 1019-1025, 2015.

LIN, L.T. et al. Hydrolyzable tannins (chebulagic acid and punicalagin) target viral glycoprotein-glycosaminoglycan interactions to inhibit herpes simplex virus 1 entry and cell-to-cell spread. **Journal of virology**, v. 85, n. 9, p. 4386-4398, 2011.

LIU, S.; CHEN, R.; HAGEDORN, C.H. Tannic acid inhibits hepatitis C virus entry into Huh7. 5 cells. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0131358, 2015.

LIU, L. et al. Antibacterial activity of oxygen vacancy-mediated ROS production of V6O13 powder against *Candida albicans*. **Inorganics**, v. 11, n. 11, p. 429, 2023.

LU, L. et al. Tannin inhibits HIV-1 entry by targeting gp41. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, n. 2, p. 213-218, 2004.

LUIZ, R. L. F et al. Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are active against *Candida albicans* biofilms. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 1-11, 2015.

LUO, G. et al. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of HLP gene expression in *Candida glabrata* and its possible role in in vitro haemolysin production. **Apmis**, v. 112, n. 4-5, p. 283-290, 2004.

MAHESH, B.; SATISH, S. Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. **World journal of agricultural sciences**, v. 4, n. 5, p. 839-843, 2008.

MAHMOUD, A. G. Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 1, p. 122-43, 2000.

MAILOA, M. N. et al. Antimicrobial activities of tannins extract from guava leaves (*Psidium guajava* L.) on pathogens microbial. **International Journal of Scientific & Technology Research**, v. 3, n. 1, p. 236-241, 2014.

MANNS, J.M.; MOSSER, D.M.; BUCKLEY, H.R. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. **Infection and immunity**, v. 62, n. 11, p. 5154-5156, 1994.

MARTINS, N. et al. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 648-670, 2015.

MATTOS, K. et al. Variability in the clinical distributions of *Candida* species and the emergence of azole-resistant non-*Candida albicans* species in public hospitals in the Midwest region of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 50, n. 6, p. 843-47. 2017.

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

MEDEIROS, M.A.P de et al. Epidemiology and prognostic factors of nosocomial candidemia in Northeast Brazil: A six-year retrospective study. **PLoS One**, v. 14, n. 8, p. e0221033, 2019.

MOILANEN, J. et al. Biological activity of ellagitannins: effects as anti-oxidants, pro-oxidants and metal chelators. **Phytochemistry**, v. 125, p. 65-72, 2016.

MOYES, D.L. et al. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. **Nature**, v. 532, n. 7597, p. 64-68, 2016.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Microbiologia médica*. 8. ed. Rio de Janeiro (RJ): ELSEVIER, 2017.

NAGESH, P. K.B et al. Tannic acid induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in prostate cancer. **Cancers**, v. 10, n. 3, p. 68, 2018.

NETO, J. B. A. et al. Antifungal activity of naphthoquinoidal compounds in vitro against fluconazole-resistant strains of different *Candida* species: A special emphasis on mechanisms of action on *Candida tropicalis*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.

NETO, J.B.A. *et al.*. A mechanistic approach to the in-vitro resistance modulating effects of fluoxetine against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 127, p. 335-340, 2019.

NING, Y. *et al.* Decreased echinocandin susceptibility in *Candida parapsilosis* causing candidemia and emergence of a pan-echinocandin resistant case in China. **Emerging Microbes & Infections**, v. 12, n. 1, 2023.

NONAKA, G. *et al.* Anti-AIDS agents, 2: inhibitory effect of tannins on HIV reverse transcriptase and HIV replication in H9 lymphocyte cells. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 3, p. 587-595, 1990.

NOVOBILSKÝ, A. *et al.* In vitro effects of extracts and purified tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) against two cattle nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3-4, p. 532-537, 2013.

NUNES, T. *et al.* Fungistatic action of N-Acetylcysteine on *Candida albicans* biofilms and its interaction with antifungal agents. **Microorganisms**, v. 8, n. 7, p. 980, 2020.

ODDS, F.C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1-1, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE *et al.* Estratégia de medicina tradicional da OMS: 2002-2005. Organização Mundial da Saúde, 2002).

Organização Mundial de Saúde. Lista de patógenos fúngicos prioritários da OMS para orientar a pesquisa, o desenvolvimento e as ações de saúde pública. OMS. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>>. Acesso em 28 de outubro de 2023.

OLIVEIRA, C.S de, *et al.* Clinical and Epidemiological Aspects of Candidemia in Eight Medical Centers in the State of Parana, Brazil: Parana Candidemia Network. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, vol. 25, n. 1. 2017.

O'MAY, Che *et al.* Tannin derived materials can block swarming motility and enhance biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. **Biofouling**, v. 28, n. 10, p. 1063-1076, 2012.

PAI, V. *et al.* Antifungal resistance in dermatology. **Indian Journal of Dermatology**, v. 63, n. 5, p. 361, 2018.

PAPPAS, P.G. *et al.* Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1-20, 2018.

PATEL, K.D. *et al.* Proanthocyanidin-rich extracts from cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) selectively inhibit the growth of human pathogenic fungi *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 24, p. 12864-12873, 2011.

PATIL, V.S. *et al.* Hepatitis C Virus NS3/4A Inhibition and Host Immunomodulation by Tannins from *Terminalia chebula*: A Structural Perspective. **Molecules**, v. 27, n. 3, p. 1076, 2022

PERFECT, J.R.; GHANNOUM, M. Emerging issues in antifungal resistance. **Infectious Disease Clinics**. v. 34, n. 4, p. 921-943, 2020.

PFALLER, M. A. et al. Variation in susceptibility of bloodstream isolates of *Candida glabrata* to fluconazole according to patient age and geographic location in the United States in 2001 to 2007. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 10, p. 3185-3190, 2009.

PIERCE, C. G. et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocols**, v. 3, n. 9, p. 1494–1500, 2008.

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

PUSHPAKOM, S. *et al.* Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, p. 41–58, 2018.

QADRI, H. et al. Natural products and their semi-synthetic derivatives against antimicrobial-resistant human pathogenic bacteria and fungi. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 9, p. 103376, 2022.

QADRI, H.; SHAH, A.H.; MIR, M. Novel strategies to combat the emerging drug resistance in human pathogenic microbes. **Current Drug Targets**, v. 22, n. 12, p. 1424-1436, 2021.

REVIE, N.M. et al. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Current opinion in microbiology**, v. 45, p. 70-76, 2018.

RICARDO, L.M. et al. Plants from the Brazilian traditional medicine: species from the books of the Polish physician Piotr Czerniewicz (Pedro Luiz Napoleão Chernoviz, 1812–1881). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 3, p. 388-400, 2017.

RIERA, F.O et al. invasive candidiasis: Update and current challenges in the management of this mycosis in south america. **Antibiotics**, v. 11, n. 7, p. 877, 2022.

RODRIGUES, C.F. et al. *Candida glabrata* biofilms: how far have we come?. **Journal of fungi**, v. 3, n. 1, p. 11, 2017.

RODRIGUES, M.L. Negligenciadas entre as negligenciadas: perspectiva de prevenção, controle e diagnóstico de doenças causadas por fungos. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2019.

RODRIGUES, D.S. et al. Sertraline has fungicidal activity against *Candida* spp. and acts by inhibiting membrane and cell wall biosynthesis. **Future Microbiology**, n. 0, 2023

ROMANI, A. et al. Analysis of condensed and hydrolysable tannins from commercial plant extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 2, p. 415-420, 2006.

SAHINER, N. et al. Biocompatible and biodegradable poly (Tannic Acid) hydrogel with antimicrobial and antioxidant properties. *International journal of biological macromolecules*, v. 82, p. 150-159, 2016.

SAMANTA, S. et al. Impact of tannic acid on the gastrointestinal microflora. **Microbial ecology in health and disease**, v. 16, n. 1, p. 32-34, 2004.

SANNA, C. et al. In Vitro Anti-HIV-1 Reverse Transcriptase and Integrase Properties of Punica granatum L. Leaves, Bark, and Peel Extracts and Their Main Compounds. **Plants**, v. 10, n. 10, p. 2124, 2021.

SANTANA, M. M. P. DE et al. Epidemiological profile of patients hospitalized with candiduria in the Central-Western region of Brazil. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 36, n. 4, p. 175–180, 2019.

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

SARDI, J.C.O et al. Synthesis, antifungal activity of caffeic acid derivative esters, and their synergism with fluconazole and nystatin against Candida spp. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 86, n. 4, p. 387-391, 2016.

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

SENEVIRATNE, C. J.; JIN, L.; SAMARANAYAKE, L. P. Biofilm lifestyle of Candida: a mini review. **Oral diseases**, v. 14, n. 7, p. 582-590, 2008.

SHAFIEI, M. et al. History of the development of antifungal azoles: A review on structures, SAR, and mechanism of action. **Bioorganic chemistry**, v. 104, p. 104240, 2020.

SHAHABI NEJAD, F.; KARAMI, H.; DARVISH, M. Triggering of Endoplasmic Reticulum Stress by Tannic Acid Inhibits the Proliferation and Migration of Colorectal Cancer Cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 24, n. 8, p. 2705-2711, 2023.

SHAHANI, S. et al. Anti-Helicobacter pylori activity of the methanolic extract of Geum iranicum and its main compounds. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 67, n. 3-4, p. 172-180, 2012.

SHARMA, S. et al. Post coronavirus disease mucormycosis: A deadly addition to the pandemic spectrum. **The Journal of Laryngology & Otology**. v. 135, n.5, p. 442-447, 2021.

SHIRASAGO, Y. et al. Inhibition mechanisms of hepatitis C virus infection by caffeic acid and tannic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, n. 5, p. 770-777, 2019.

SIENIAWSKA, E.; BAJ, T. Tannins. In: **Pharmacognosy**. Academic Press, 2017. p. 199-232.

SIDDIQUI, M. F et al. The efficacy of tannic acid in controlling biofouling by Pseudomonas aeruginosa is dependent on nutrient conditions and bacterial density. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 104, p. 74-82, 2015.

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

SILVA, S. et al. Adherence and biofilm formation of non-Candida albicans Candida species. **Trends in microbiology**, v. 19, n. 5, p. 241-247, 2011.

SILVA, R.A.C *et al.* In vitro anti-*Candida* activity of selective serotonin reuptake inhibitors against fluconazole-resistant strains and their activity against biofilm-forming isolates. **Microbial Pathogenesis**. v. 107. p. 341-348, 2017.

SILVA, L.J. et al. Antifungal activity of dexamethasone against fluconazole-resistant *Candida albicans* and its activity against biofilms. **Future Microbiology**, v. 17, n. 8, p. 607-620, 2022.

SILVA, Renata Baltar da, et al. “Candidemia in a public hospital in Northeastern Brazil: Epidemiological features and risk factors in critically ill”. *Revista Iberoamericana de Micologia*, vol. 36, n o 4 de outubro de 2019, p. 181–85. 2019.

SINGH, D.K et al. Functional characterization of secreted aspartyl proteases in *Candida parapsilosis*. **Mosphere**, v. 4, n. 4. 2019.

SISCAR-LEWIN, S; HUBE, B; BRUNKE, S. Emergence and evolution of virulence in human pathogenic fungi. **Trends in Microbiology**, v. 30, n. 7, p. 693-704, 2022.

SRIPHANNAM, C. et al. Anti-fungal susceptibility and virulence factors of *Candida* spp. isolated from blood cultures. **Journal De Mycologie Medicale**, v. 29, n. 4, p. 325-330, 2019.

SVETAZ, L.A. et al. Antifungal drugs combinations: a patent review 2000-2015. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 26, n. 4, p. 439-453, 2016.

SZYMAŃSKI, M. et al. Echinocandins—structure, mechanism of action and use in antifungal therapy. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 876-894, 2022.

T MOREY, A. et al. Antifungal activity of condensed tannins from *Stryphnodendron adstringens*: effect on *Candida tropicalis* growth and adhesion properties. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 17, n. 4, p. 365-375, 2016.

TRAGIANNIDIS, A. et al. Antifungal agents and the kidney: pharmacokinetics, clinical nephrotoxicity, and interactions. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 20, n. 9, p. 1061-1074, 2021.

TROKHYMCHUK, T.Y et al. Anti-HIV activity of ellagitannins from alder tree fruits. **Biopolymers and Cell**, 2018.

TÜRKAN, F.; TASLIMI, P.; SALTAN, F.Z. Tannic acid as a natural antioxidant compound: Discovery of a potent metabolic enzyme inhibitor for a new therapeutic approach in diabetes and Alzheimer's disease. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, v. 33, n. 8, p. e22340, 2019.

VAN DAELE, R. et al. Antifungal drugs: what brings the future?. **Medical Mycology**, v. 57, n.3, p. S328-S343, 2019.

VILHELMOVA-ILIEVA, N. et al. Anti-herpes simplex virus type 1 activity of specially selected groups of tannins. **Drug research**, v. 69, n. 07, p. 374-373, 2019.

XIE, J.L. *et al.* Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. **Future microbiology** v. 9, n. 4, p. 523-542, 2014.

YAN, W. *et al.* Applications of tannic acid in membrane technologies: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 284, p. 102267, 2020.

YANG, Y. *et al.* Virulence factors of *Candida* species. **Journal of Microbiology Immunology and Infection**, v. 36, n. 4, p. 223-228, 2003.

WATANABE, T. *et al.* Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 145, n. 3, p. 689-694, 1999.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and clinical risk management**, p. 95-105, 2014.

ZHAO, Y.; PERLIN, D.S. Review of the novel echinocandin antifungal rezafungin: animal studies and clinical data. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 192, 2020.

ZHENG, W.; SUN, W.; SIMEONOV, A. Drug repurposing screens and synergistic drug-combinations for infectious diseases: Drug repurposing for infectious diseases. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 2, p. 181–191.2018.

ZHU, C. *et al.* Antifungal activity and mechanism of action of tannic acid against *Penicillium digitatum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 107, p. 46-50, 2019.

ZHU, J.; FILIPPICH, L.J; ALSALAMI, M. T. Tannic acid intoxication in sheep and mice. **Research in veterinary science**, v. 53, n. 3, p. 280-292, 1992.

ZIDA, A. *et al.* Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. **Journal de mycologie medicale**, v. 27, n. 1, p. 1-19, 2017.

ZUO, X. *et al.* Association of different *Candida* species with catheter-related candidemia, and the potential antifungal treatments against their adhesion properties and biofilm-forming capabilities. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 35, n. 4, 2021.