



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

JAIANE ALVES BRASIL

**VIGILÂNCIA EM SAÚDE ÚNICA DA RESISTÊNCIA A ANTIFÚNGICOS E A
COMPOSTOS DE AMÔNIO QUATERNÁRIO EM *Candida* SPP. NO CEARÁ E
BUSCA POR ALTERNATIVA TERAPÊUTICA**

FORTALEZA-CEARÁ

2026

JAIANE ALVES BRASIL

**VIGILÂNCIA EM SAÚDE ÚNICA DA RESISTÊNCIA A ANTIFÚNGICOS E A
COMPOSTOS DE AMÔNIO QUATERNÁRIO EM *Candida* SPP. NO CEARÁ E
BUSCA POR ALTERNATIVA TERAPÊUTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Microbiologia Médica.

Orientadora: Prof. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia

Coorientadora: Prof. Dra. Gabriela Silva Cruz

FORTALEZA-CEARÁ

2026

JAIANE ALVES BRASIL

**VIGILÂNCIA EM SAÚDE ÚNICA DA RESISTÊNCIA A ANTIFÚNGICOS E A
COMPOSTOS DE AMÔNIO QUATERNÁRIO EM *Candida* SPP. NO CEARÁ E
BUSCA POR ALTERNATIVA TERAPÊUTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Microbiologia Médica.

Aprovada em: 26 / 01 / 2026.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Erika Helena Salles de Brito
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro -Brasileira (UNILAB)

Prof. Dra Gabriela Silva Cruz
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro -Brasileira (UNILAB)

Prof. Dra Kássia Jéssica Galdino da Silva
Nantes Université (France)

Prof. Dr. Pedro Filho Noronha de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Rafael Wesley Bastos
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

À minha família, dedico.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, ao CNPQ e à FUNCAP pelo apoio financeiro para realização do doutorado e a Universidade Federal do Ceará (UFC), pelo apoio e disponibilização do espaço, estrutura e recursos para concretização das pesquisas.

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim e ao Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, pela dedicação e comprometimento com a pesquisa.

À minha orientadora Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia pela sua postura íntegra, idônea e sensível. Um exemplo de inspiração e admiração. Pela determinação e destreza com que orienta os caminhos da pesquisa. Obrigada pelas contribuições dessa trajetória e amadurecimento acadêmico.

À Dra. Glaucia Morgana de Melo Guedes, pela amizade, e partilha de conhecimento. Sou grata pelos conselhos tão preciosos. Aos professores do programa que contribuem imensamente com a formação dos alunos que passam pelo laboratório GrAMM.

À Dra. Gabriela Silva Cruz, pela amizade, companheirismo nos experimentos, ensinamentos, construção e aprimoramento deste trabalho.

Aos colegas do GrAMM, pela escuta sensível, laços de afeto e múltiplos ensinamentos nessa caminhada, de forma especial: Abílio, Vinícius, Aline, Juliana Nobre, Rodrigo Guedes, Ivan, Pedro, Marcos, Leones, Isabela, Sara, Késia Emilly, Gabriel, Jorge, Bruno Amâncio e Carliane que se fizeram irmãos desde sempre. À todos do GrAMM, que proporcionaram momentos de discussão e aprendizagem, fortalecendo o ambiente de trabalho.

Aos porteiros, seu Valdenir e Maurício, e seu João, da limpeza, por todo zelo, gentileza e presença cuidadosa.

À Terezinha de Jesus, pelo apoio técnico.

Aos meus amados pais Juracir Brasil e Juarez Alves, e às minhas irmãs e irmãos. Obrigada por existirem. Por vocês sou todo amor.

À Laura Brasil, Pedro Brasil e Gabriel Alves vocês inspiram meu amor, fé, alegria, bravura e memórias lindas.

À Thiago e Izabel Pereira pelo companheirismo e amor.

À Luana Gaudêncio à quem tenho a honra de chamar de amiga, irmã, psicóloga! Obrigada por ser meu ponto de apoio tantas vezes, e não soltar a minha mão.

Às amigas Miliane Palácio, Thamires Guerreiro, Luana Falcão obrigada pelos dias genuínos compartilhados. À Lívia, Gleiciane, Lana, Gessica, Xhaulla pelos cafés e bons momentos de alegria.

À Deus pelas bênçãos infinitas na minha vida.

“Tudo é vivo e tudo fala ao redor de nós, embora com vida e voz que não são humanas, mas que podemos aprender a escutar, porque muitas vezes essa linguagem secreta ajuda a esclarecer o nosso próprio mistério.” (Cecília Meireles)

“Por minha alma inconquistável”. (W.E. Henley – Invictus)

RESUMO

Sob a perspectiva One Health, o enfrentamento da resistência antifúngica por *Candida spp.* exige uma compreensão de múltiplos fatores, como a interação com ambientes e agentes químicos. Ademais, o reposicionamento e a combinação de fármacos são estratégias para superar falhas terapêuticas. Esse estudo objetivou isolar e identificar *Candida spp.*, provenientes de amostras clínicas humanas (n=59), superfícies hospitalares (n=25); animais de produção (n=107) e ambiente destes animais (n=9); analisar o perfil de sensibilidade aos antifúngicos FLC, MCF e AMB; e efeito do cloreto de benzalcônio (BZ) e cloreto de didecil dimetil amônio (DDAC) contra os isolados na forma planctônica e de biofilmes; assim como, avaliar o efeito da deferiprona (DEF), um quelante de ferro, sobre *Candida spp.* (n=25), oriundas da micoteca, na forma planctônica e de biofilmes, isolada e em combinação com os antifúngicos fluconazol (FLC), anfotericina B (AMB) e caspofungina (CAS). Por fim, foi avaliada se a inibição do fungo por DEF, era revertida com sulfato de ferro II (FeSO₄). A sensibilidade aos antifúngicos, e compostos de amônia quaternária, e a deferiprona foi analisada conforme o documento m27-a3 do CLSI. O método de *checkerboard* foi utilizado para avaliar a interação entre deferiprona e os antifúngicos FLC, AMB e CAS. A atividade antibiofilme dos antifúngicos, dos compostos de amônia e da deferiprona foi avaliada por meio da redução de MTT e da quantificação de biomassa por cristal violeta. Foram isoladas 109 leveduras de *Candida spp.* O FLC apresentou CIM de 0,125 a 64 µg/ml para os isolados de origem humana; 0,5 a 4 µg/ml para os isolados de ambiente hospitalar; 0,125 a 64 µg/ml para isolados de origem animal, e 1 e 32 µg/ml para identificados de ambiente animal. As CIMs para MCF variaram de 0,06 a 0,5 µg/ml para isolados de origem humana; 0,06 a 1 µg/ml para isolados de ambiente hospitalar; 0,06 a 0,1 µg/ml para isolados de origem animal, e foi de 0,03 µg/ml para isolados de ambiente animal. AMB exibiu CIMs de 0,03 a 1 µg/ml para isolados de origem humana; 0,12 a 0,5 µg/ml para isolados de ambiente hospitalar; 0,03 a 1 µg/ml para isolados de origem animal, e 0,06 e 0,25 µg/ml para isolados de ambiente animal. DDA apresentou CIM entre 0,0625 e 1 µg/mL e BZ apresentou CIMs variando de 0,06 – 4 µg/ml. Biofilmes em formação e maduros de *Candida spp.* apresentaram redução significativa de atividade metabólica e de biomassa após exposição a BZ e DDA. A DEF apresentou CIM variando de 16 a 1024 µg/mL contra os isolados testados. No ensaio *checkerboard*, a DEF reduziu as CIMs de FLC, AMB e CAS em até 8, 32 e 64 vezes, respectivamente, contra a forma planctônica. No ensaio de MTT, DEF causou aumento da atividade metabólica de biofilmes em formação de *C. tropicalis* e *C. glabrata*; e tendência à redução de atividade metabólica de biofilmes maduros de *Candida spp.* (n=12) à 1024 µg/mL. A análise por cristal violeta revelou aumento da biomassa de biofilmes em formação de *C. parapsilosis*, quando tratados com DEF; e tendência à redução de biofilmes maduros de *Candida spp.* (n=12) para as concentrações 256 a 1024 µg/mL e 2 a 32 µg/mL, quando comparados aos controles sem droga. A suplementação com (FeSO₄) reduziu a eficácia antifúngica da DEF contra *Candida spp.*, na forma planctônica. DEF demonstrou atividade antifúngica, e sinergismo com FLC, AMB e CAS contra *Candida spp.*, com maior eficácia observada contra *C. glabrata*. Além disso, DEF influenciou significativamente a formação de biofilmes, apresentando um efeito espécie-dependente. No entanto, sua eficácia foi significativamente reduzida pela suplementação com FeSO₄, demonstrando que atua diretamente no equilíbrio do ferro para *Candida spp.*

Palavras-chave: Epidemiologia fúngica; Didecil Dimetil Amônio; Cloreto de Benzalcônio; Deferiprona; Biofilme.

ABSTRACT

From a One Health perspective, tackling antifungal resistance in *Candida* spp. requires an understanding of multiple factors, such as interaction with environments and chemical agents. Furthermore, drug repositioning and combination therapy are strategies to overcome therapeutic failures. This study aimed to isolate and identify *Candida* spp. from human clinical samples (n=59), hospital surfaces (n=25), production animals (n=107), and the environment of these animals (n=9); analyze the sensitivity profile to the antifungals FLC, MCF, and AMB; and the effect of benzalkonium chloride (BZ) and didecyl dimethyl ammonium chloride (DDAC) against isolates in planktonic and biofilm forms, as well as evaluate the effect of deferiprone (DEF), an iron chelator, on *Candida* spp. in planktonic and biofilm forms, isolated and in combination with the antifungals fluconazole (FLC), amphotericin B (AMB), and caspofungin (CAS). Finally, it was evaluated whether the inhibition of the fungus by DFP was reversed with ferrous sulfate (FeSO₄). Sensitivity to antifungals, quaternary ammonium compounds, and deferiprone was analyzed according to document m27-a3. The checkerboard method was used to evaluate the interaction between deferiprone and the antifungals. The antibiofilm activity of the antifungals, ammonium compounds, and deferiprone was evaluated by MTT reduction and biomass quantification by crystal violet. 109 *Candida* spp. yeasts were isolated. FLC showed variable MIC, from 0.125 to 64 µg/ml for isolates of human origin; 0.5 to 4 µg/ml for isolates from hospital environments; 0.125 to 64 µg/ml for isolates of animal origin, and 1 to 32 µg/ml for isolates from animal environments. MICs for MCF ranged from 0.0625 to 0.5 µg/ml for isolates of human origin; 0.0625 to 1 µg/ml for isolates from hospital environments; 0.0625 to 0.1 µg/ml for isolates of animal origin, and 0.03 µg/ml for isolates from animal environments. AMB exhibited MICs of 0.031 to 1 µg/ml for isolates of human origin; 0.125 to 0.5 µg/ml for isolates from hospital environments; 0.031 to 1 µg/ml for isolates of animal origin, and 0.06 and 0.25 µg/ml for isolates from animal environments. DDA showed MICs between 0.0625 and 1 µg/mL, and BZ showed MICs ranging from 0.0625–4 µg/mL. Forming and mature *Candida* spp. biofilms showed a significant reduction in metabolic activity and biomass after exposure to BZ and DDA. DEF showed MICs ranging from 16 to 1024 µg/mL against the tested isolates. In the checkerboard assay, DEF reduced the MICs of FLC, AMB, and CAS by up to 8, 32, and 64 times, respectively, against the planktonic form. In the MTT assay, DEF caused an increase in the metabolic activity of forming biofilms of *C. tropicalis* and *C. glabrata*; and a tendency towards reduced metabolic activity of mature *Candida* spp. biofilms (n=12) at 1024 µg/mL. Crystal violet analysis revealed an increase in the biomass of forming *C. parapsilosis* biofilms when treated with DEF; and a tendency towards a reduction in mature *Candida* spp. biofilms (n=12) at concentrations of 256 to 1024 µg/mL and 2 to 32 µg/mL, when compared to drug-free controls. Supplementation with (FeSO₄) reduced the antifungal efficacy of DEF against planktonic *Candida* spp. DEF demonstrated antifungal activity and synergism with FLC, AMB, and CAS against *Candida* spp., with greater efficacy observed against *C. glabrata*. Furthermore, DEF significantly influenced biofilm formation, showing a species-dependent effect. However, its effectiveness was significantly reduced by supplementation with FeSO₄, demonstrating that it acts directly on iron balance for *Candida* spp.

Keywords: Fungal epidemiology; Didecyl Dimethyl Ammonium; Benzalkonium Chloride; Deferiprone; Biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Molécula de deferiprona e vias de ligação com íons ferro (Fe^{3+}) reduzido a (Fe^{2+}).....	36
Figura 2 -	Fluxograma experimental deste estudo.....	45
Figura 3 -	Mapa de calor projetado pelo software GraphPad Prism 7.0. Efeitos da interação entre a deferiprona e os antifúngicos FLC, AMB e CAS sobre células plactônicas de <i>Candida</i> spp. após 24 h de incubação à 35 ° C. O crescimento foi quantificado por espectrofotômetro a 630 nm. (*) Representa CIM combinadas.....	80

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 -** Atividade metabólica e biomassa de biofilmes em formação de *Candida* spp. expostos à concentrações (0,0625 a 32 µg/mL) de Cloreto de Benzalcônio. A atividade metabólica das células no biofilme foi obtida por ensaio da redução do MTT e a quantificação da biomassa por coloração com cristal violeta. Barras pretas (controle) correspondem ao biofilme não tratado com Cloreto de Benzalcônio..... 67
- Gráfico 2 -** Atividade metabólica e biomassa de biofilmes em formação de *Candida* spp. expostos durante a adesão a concentrações (0,0625 a 32 µg/mL) de Cloreto de Didecil Dimetil Amônio. A atividade metabólica das células no biofilme foi obtida por ensaio da redução do MTT e a quantificação da biomassa por coloração com cristal violeta. Barras pretas (controle) correspondem ao biofilme não tratado com Cloreto de Benzalcônio. (*) Representa diferença estatística significativa em relação ao grupo controle..... 69
- Gráfico 3 -** Atividade metabólica e biomassa de biofilmes maduro de *Candida* spp. expostos a diferentes concentrações (0,0625 a 32 µg/mL) de Cloreto de Benzalcônio. A atividade metabólica das células no biofilme foi obtida por ensaio da redução do MTT e a quantificação da biomassa por coloração com cristal violeta. Barras pretas (controle) correspondem ao biofilme não tratado com Cloreto de Benzalcônio..... 72
- Gráfico 4 -** Atividade metabólica e biomassa de biofilmes maduro de *Candida* spp. expostos a diferentes concentrações (0,0625 a 32 µg/mL) de Cloreto de Didecil Dimetil Amônio. A atividade metabólica das células no biofilme foi obtida por ensaio da redução do MTT e a quantificação da biomassa por coloração com cristal violeta. Barras pretas (controle) correspondem ao biofilme não tratado com Cloreto de Didecil Dimetil Amônio..... 74
- Gráfico 5 -** Espécies de *Candida* expostas a concentrações variáveis, de 2 a 1024 µg/ml, de DEF isolada e suplementada com 10 µM do sal

FeSO₄. A barra de controle representa células cultivadas em RPMI 1640, sem adição de DEF ou suplementação com FeSO₄. As barras associadas à “ DEF” representam células cultivadas em contato com concentrações variáveis de DEF sem suplementação de FeSO₄. As barras “ Def+ FeSO₄” representam células crescidas em contato com DEF, em concentrações variáveis, com suplementação de FeSO₄. Os dados são expressos como média ± desvio padrão do crescimento fúngico a 630 nm. (*) Representa diferença estatística significativa entre a densidade óptica (crescimento microbiano) na presença de DEF e aquela na presença de DEF e de FeSO₄, sendo comparado ao crescimento em concentrações correspondentes de DEF..... 78

Gráfico 6 - Atividade metabólica e biomassa de biofilmes em formação de *Candida* spp. tratadas com deferiprona nas concentrações de MIC, MIC / 2 e MIC / 4. *Candida albicans* (N = 6); *Candida glabrata* (N = 6); *Candida parapsilosis* (N = 6); *Candida tropicalis* (N = 6). (*) Representa diferença estatística significativa em relação ao grupo controle..... 82

Gráfico 7 – Atividade metabólica e biomassa de biofilmes maduros de *Candida* spp. expostos às concentrações (2 a 1024 de DEF. A Atividade metabólica das células no biofilme foi obtido por ensaio da redução do MTT e a quantificação da biomassa por coloração com cristal violeta. Barras pretas (controle) correspondem ao biofilme não tratado com deferiprona. (*) Representa diferença estatística significativa em relação ao grupo controle..... 84

Gráfico 8 - Atividade metabólica e biomassa de biofilmes maduros de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* expostas às concentrações de 2 a 1024 µg/mL de DEF. A Atividade metabólica das células no biofilme foi obtido por ensaio da redução do MTT e a quantificação da biomassa por coloração com cristal violeta. Barras pretas (controle) correspondem ao biofilme não tratado com

deferiprona. (*) Representa diferença estatística significativa em
relação ao grupo controle..... 85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Cepas de <i>Candida</i> spp., de origem humana e ambiente hospitalar do projeto One health utilizadas nesse estudo.....	56
Tabela 2 -	Cepas de <i>Candida</i> spp., de origem animal e ambiental do projeto One health utilizadas nesse estudo.....	57
Tabela 3 –	Concentrações inibitórias mínimas <i>in vitro</i> dos antifúngicos fluconazol, micafungina e anfotericina B por espécies de <i>Candida</i> de origem humana e ambiente hospitalar na forma planctônica.....	59
Tabela 4 –	Concentrações inibitórias mínimas <i>in vitro</i> dos antifúngicos fluconazol, micafungina e anfotericina B por espécies de <i>Candida</i> de origem animal e ambiente animal na forma planctônica.....	60
Tabela 5 –	Concentrações inibitórias mínimas <i>in vitro</i> de compostos quaternários de amônio contra <i>Candida</i> spp. de origem humana e ambiente hospitalar na forma planctônica	63
Tabela 6 –	Concentrações inibitórias mínimas <i>in vitro</i> de compostos quaternários de amônio contra <i>Candida</i> spp. de origem animal e ambiente hospitalar na forma planctônica	63
Tabela 7 –	Concentrações inibitórias mínimas, <i>in vitro</i> de compostos quaternários de amônio por espécies, contra <i>Candida</i> spp. de origem humana e ambiente hospitalar na forma planctônica	64
Tabela 8 –	Concentrações inibitórias mínimas, <i>in vitro</i> de compostos quaternários de amônio por espécies, contra <i>Candida</i> spp. de origem animal e ambiente animal na forma planctônica.....	65
Tabela 9 -	Concentração Inibitória Mínima de deferiprona, fluconazol, anfotericina B e caspofungina isoladamente e em combinação contra cepas de <i>Candida</i> spp.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BZ	Cloreto de Benzalcônio
DDAC	Cloreto de Didecil Dimetil Amônio
AMB	Anfotericina B
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosine Triphosphate (trifosfato de adenosina)
BHI	Brain Heart Infusion
CAS	Caspofungina
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIMS	Concentração Inibitória Mínima de Células Sésseis
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CNA	<i>Candida Não-Albicans</i>
DEF	Deferiprona
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsufóxido
ECV	Valores de Corte Epidemiológico
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
FDA	Food and Drug Administration
Fe ³⁺	Ferro Férrico
Fe ²⁺	Ferro Ferrroso
FeSO ₄	Sulfato de Ferro II
FLC	Fluconazol
GrAMM	Grupo Aplicado em Microbiologia Médica
HNTs	Nanotubos de Haloisita
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídio
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
MOPS	Ácido 3-Morfolinopropanosulfônico
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo

NaClO	Hipoclorito de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PDA	Ágar Batata Dextrose
QACs	Amônio Quaternário
RAM	Resistência Antimicrobiana
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
FeSO ₄	Sulfato de Ferro II
S	Sinergismo
TSA	Teste de Sensibilidade Antifúngica
UFC	Universidade Federal do Ceará
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
VRC	Voriconazol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	Aspectos históricos e evolução do conceito One Health.....	21
2.2	Importância da abordagem one health para estudos com <i>Candida</i> spp.....	23
2.3	Compostos de Amônio Quaternário (CAQs)	29
2.4	Potencial de reposicionamento da deferiprona como agente antimicrobiano.....	35
3	HIPÓTESES	40
4	OBJETIVOS.....	41
4.1	Objetivo geral.....	41
4.2	Objetivos específicos.....	41
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
5.1	Local de estudo.....	42
5.2	Micro-organismos.....	42
5.3	Delineamento do estudo.....	42
5.4	Isolamento de <i>Candida</i> spp.....	46
5.5	Processamento e identificação de amostras.....	46
5.6	Ensaio de sensibilidade a antifúngicos e a desinfetantes derivados de amônia quaternária.....	47
5.6.1	<i>Antifúngicos, cloreto de didecildimetilamônio e cloreto de benzalcônio.....</i>	47
5.6.2	<i>Inóculo fúngico.....</i>	47
5.6.3	<i>Determinação das concentrações inibitórias mínimas dos antifúngicos fluconazol, micafungina e anfotericina B e dos desinfetantes cloreto de didodecildimetilamônio e cloreto de benzalcônio contra <i>Candida</i> spp. na forma planctônica.....</i>	48
5.6.4	<i>Avaliação do efeito dos desinfetantes cloreto de didecildimetilamônio e cloreto de benzalcônio sobre biofilmes em formação de <i>Candida</i> spp.....</i>	48

5.6.5	<i>Avaliação do efeito dos desinfetantes cloreto de didodecildimetilamônio e cloreto de benzalcônio contra biofilmes maduro de Candida spp.</i>	49
5.7	Sensibilidade de <i>Candida spp.</i> a antifúngicos e à deferiprona.....	50
5.7.1	<i>Drogas</i>	50
5.7.2	<i>Microrganismos</i>	50
5.7.3	<i>Ensaio de sensibilidade</i>	50
5.8	Elucidação de mecanismo de ação da deferiprona contra <i>Candida spp.</i> na forma planctônica.....	51
5.9	Interação entre deferiprona e antifúngicos contra <i>Candida spp.</i> na forma planctônica.....	52
5.10	Avaliação do efeito da deferiprona contra biofilmes em formação de <i>Candida spp.</i>	52
5.11	Avaliação do efeito da deferiprona contra biofilmes maduros de <i>Candida spp.</i>	53
5.12	Análise estatística.....	53
6	RESULTADOS.....	54
6.1	Isolamento e identificação de <i>Candida spp.</i>	54
6.2	Sensibilidade planctônica.....	58
6.2.1	<i>Sensibilidade de Candida spp. na forma planctônica aos antifúngicos fluconazol, micafungina e anfotericin B.</i>	58
6.2.2	<i>Sensibilidade de Candida spp. na forma planctônica aos desinfetantes cloreto de didecil dimetil amônio e cloreto de benzalcônio.</i>	61
6.2.3	<i>Análise do biofilme após exposição à cloreto de didecil dimetil amônio e cloreto de benzalcônio.</i>	67
6.2.4	<i>Efeito dos desinfetantes cloreto de didecil dimetil amônio e cloreto de benzalcônio sobre biofilmes de candida spp. em formação.</i>	67
6.2.5	<i>Efeito dos desinfetantes cloreto de didecil dimetil amônio e cloreto de benzalcônio sobre biofilmes de candida spp. maduro.</i>	72
6.4	Teste de sensibilidade planctônica à deferiprona e antifúngicos clássicos.....	74
6.5	Elucidação do mecanismo de atividade antifúngica da deferiprona.....	77

6.6	Análise da interação entre deferiprona e antifúngicos contra células planctônicas.....	79
6.7	Análise do biofilme após exposição deferiprona.....	81
6.7.1	<i>Efeito da deferiprona sobre biofilmes em formação de Candida spp.....</i>	81
6.7.2	Quantificação de biomassa e viabilidade celular de biofilmes maduro de <i>Candida pp.....</i>	83
7	DISCUSSÃO.....	86
8	CONCLUSÃO.....	95

1 INTRODUÇÃO

Espécies de *Candida* são encontradas no ambiente e fazem parte da microbiota normal do corpo humano e animal colonizando a pele, trato gastrointestinal e urogenital. Contudo, essas espécies podem ser patogênicas (Armstrong-James; Harrison, 2012) podendo causar desde infecções superficiais da mucosa oral e vaginal, até infecções hematogênicas e dos tecidos profundos (Singh; Fatima Hameed, 2015; Donders; Sobel, 2017; Bays *et al* 2024).

Candida albicans é a espécie mais comumente isolada em infecções invasivas. No entanto, nas últimas décadas, observou-se um aumento global nestes casos por outras espécies de *Candida* não-*albicans*. Uma análise recente de dez anos revelou que *C. glabrata* (atualmente *Nakaseomyces glabrata*) é a mais prevalente entre essas espécies, seguida por *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*) (Rodríguez-Cerdeira, *et al* 2024). Os quadros invasivos causados por estas espécies (Pappas *et al* 2018; Ahmed *et al.*, 2022) têm sido associados a cepas resistentes a drogas antifúngicas, (Pappas *et al.*, 2018; Arendrup; Patterson, 2017; Farmakiotis; Kontoyiannis, 2017., Lass-Flörl *et al.*, 2024), o que representa um importante desafio para saúde pública (Bassetti *et al.*, 2017; Bays *et al.*, 2024)

A resistência microbiana é uma das ameaças mais críticas à saúde pública do século XXI, sendo fortemente influenciada por fatores ambientais, clínicos e zoonóticos. No contexto da abordagem One Health, torna-se essencial investigar como os fungos oportunistas interagem com esses ambientes e com produtos químicos amplamente utilizados em práticas sanitárias e industriais (Robinson *et al.*, 2022; Hernando-Amado *et al.*, 2020). Estudos recentes ressaltam a necessidade de considerar as interações entre microrganismos patogênicos e contaminantes ambientais, como os desinfetantes, na evolução da resistência antifúngica (Casadevall *et al.*, 2023; Morio *et al.*, 2022). Castelo-Branco *et al.* (2021) ressaltam como o uso de fungicidas ambientais podem favorecer o surgimento de cepas resistentes, destacando a importância de abordagens integradas para o enfrentamento desse problema.

Um dos exemplos mais preocupantes nesse cenário é a crescente prevalência de infecções causadas por leveduras do gênero *Candida*, especialmente em ambientes hospitalares e comunitários; onde espécies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* estão entre os principais agentes de candidíase sistêmica e superficial, com destaque para sua capacidade de formar biofilmes e resistir a antifúngicos comumente utilizados, como o fluconazol. Entretanto, *C. krusei* possui resistência intrínseca ao fluconazol e tem se mostrado persistente em superfícies hospitalares e dispositivos médicos (Silva *et al.*, 2021).

Nesse contexto, os compostos de amônio quaternário (QACs), como o didecil dimetil amônio (DDAC) e o cloreto de benzalcônio (BZ) destacam-se por sua ampla aplicação, como desinfetantes em ambientes hospitalares, domésticos, industriais e agrícolas devido à sua eficácia contra microrganismos. No setor hospitalar, são empregados na desinfecção de superfícies, instrumentos e equipamentos médicos. Contudo, estudos recentes sugerem que a exposição contínua ou subletal a QACs pode favorecer adaptações fenotípicas e seleção de cepas mais tolerantes, especialmente entre microrganismos formadores de biofilmes (Buffet-Bataillon *et al.*, 2021; Tezel; Pavlostathis, 2015; Moore *et al.*, 2023).

Estudos recentes destacam o papel de leveduras emergentes sob a óptica *One Health*, demonstrando como fatores ambientais e antropogênicos contribuem para o aumento da resistência antifúngica e a persistência desses microrganismos em diferentes nichos ecológicos. De Almeida *et al.* (2023); Silva-Rocha *et al.* (2020) e Ferreira *et al.* (2023) demonstraram que o uso indiscriminado de antimicrobianos e fungicidas agrícolas, como o tebuconazol, tem contribuído para a seleção de leveduras resistentes em ambientes urbanos e rurais. Esses achados reforçam a importância da vigilância integrada, especialmente em regiões com características ambientais e socioeconômicas críticas, como o Nordeste brasileiro.

As infecções invasivas por *Candida spp.* estão frequentemente associadas a fatores de patogenicidade, como a formação de biofilmes (Kart; Yabanoglu Ciftci; Nemitlu, 2020; Rocha *et al.*, 2019), a capacidade de realizar transição morfológica, a produção de aglutininas, aspartil proteases, lipases e fosfolipases (Monroy-Pérez *et al.*, 2016). Além disso, a síntese de sideróforos é um fator crítico para a virulência de *Candida spp.*, pois permite a captação eficiente de ferro, um nutriente indispensável para seu crescimento e potencial infeccioso. (Pecoraro *et al.*, 2014).

Embora a atividade antimicrobiana da deferiprona - DEF - (*3-Hydroxy-1,2-dimethyl-4(1H)-pyridone*)- tenha sido demonstrada contra fungos patogênicos, como *Rhizopus oryzae* (Ibrahim *et al.*, 2006), *Aspergillus fumigatus* (Nazik *et al.*, 2015) e *Sporothrix spp.* (Brilhante *et al.*, 2021), e bactérias, incluindo *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* (Thompson *et al.*, 2012) e *Burkholderia pseudomallei* (Guedes *et al.*, 2023), sua ação contra *Candida spp.* ainda não havia sido investigada.

Este estudo propõe investigar a atividade antifúngica do DDAC e do BZ contra as principais espécies de *Candida* de importância médica: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*, na forma planctônica e formação de biofilmes, a partir de isolados obtidos do estado do Ceará no contexto One Health (humanos, animais e ambientes

animais e hospitalar). Ademais, considerando que o ferro (Fe) é um micronutriente essencial para a sobrevivência e virulência dos fungos, e a sua limitação, por meio de quelantes, leva a uma diminuição no crescimento destes microrganismos (Ibrahim *et al.* 2006; Zarembler *et al.* 2009; Leal Jr *et al.* 2013; Leal Jr *et al.* 2013) este estudo também analisa o efeito antifúngico da deferiprona um quelante de ferro, isolado e em combinação com antifúngicos FLC, AMB e CAS contra células planctônicas e biofilmes de *Candida* spp. Por fim, foi realizado um ensaio de suplementação com sulfato ferroso (FeSO_4 , 10 μM), para verificar se a inibição induzida pela DEF poderia ser revertida.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos históricos e evolução do conceito One Health

One Health reúne a ideia de que a saúde humana, animal e ambiental são interdependentes, e que desafios sanitários complexos demandam respostas intersetoriais e multidisciplinares. As bases históricas do termo One Health remontam a pensadores e práticas médicas e veterinárias dos séculos XIX e XX (Destoumieux-Garzón et al., 2018).

No século XIX, o médico e patologista alemão Rudolf Virchow é frequentemente citado como um intelectual do movimento que viria a se consolidar como One Health. Atuando na medicina humana, Virchow trabalhava em estreita relação com a veterinária; além disso, foi o primeiro a utilizar o termo zoonose. Defensor do ensino veterinário, o patologista reconhecia que a saúde animal impacta diretamente a saúde humana. Sua ênfase na continuidade entre doenças humanas e animais, expressa em sua frase: “entre a medicina humana e a animal não há linha divisória e nem deveria haver elas se correlacionam” reflete, de forma indireta, a ideia de que não há saúde sem saúde animal”. Ao unir essa perspectiva à visão social da medicina e ao estudo da patologia em populações, Virchow considerou fatores sociais e interespecies na origem das doenças, abrindo caminho para uma abordagem integrada e abrangente da saúde (Gyles, 2016).

Já na transição do século XIX para o XX, o médico canadense William Osler, considerado o pai da patologia veterinária, destacou a importância da medicina comparada ao reconhecer que o conhecimento veterinário podia enriquecer a prática médica humana (Osler, 1903). Ele abordou a inter-relação entre homem e animal e é autor da frase que fundamentou o uso racional de antimicrobianos: “Um dos principais deveres de um médico é educar as massas para não tomar remédios” (Osler, 1910). Seus escritos e ensinamentos consolidaram a comparação entre doenças humanas e animais como uma ferramenta valiosa para o avanço científico e clínico.

Mais adiante, James H. Steele, veterinário e pioneiro da saúde pública veterinária, criou a divisão veterinária dentro do Departamento de Saúde Pública dos Estados Unidos. Ele desenvolveu e institucionalizou práticas de vigilância e controle de zoonoses, aproximando a veterinária dos serviços de saúde pública e evidenciando a importância estrutural da presença de profissionais veterinários nos sistemas de saúde humana. Steele também escreveu sobre a

integração da saúde humana e animal, defendendo uma abordagem única e interconectada da saúde (Schultz, 2014).

Calvin W. Schwabe, por sua vez, conceituou e difundiu o termo “One Medicine”, propondo explicitamente a integração entre medicina humana e veterinária, inclusive em educação e pesquisa. Para Schwabe, as semelhanças entre doenças e princípios patológicos em diferentes espécies justificavam abordagens conjuntas, antecipando o que hoje entendemos por One Health (Zinsstag et al., 2011).

Esses autores e trajetórias não “criaram” o One Health de maneira unívoca, mas construíram um corpo de ideias e práticas que tornou plausível a integração interdisciplinar exigida pelo conceito atual. Nessa perspectiva, sua consolidação global se deu principalmente a partir da atuação conjunta da Organização Mundial da Saúde (OMS), Organização Mundial da Saúde Animal (OIE, atual WOAHA) e Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), que em 2008 lançaram a Iniciativa Tripartite One Health, marco institucional da integração entre os três setores (FAO, OIE & WHO, 2010).

Em 2015, essas organizações publicaram o Plano de Ação Global para o Combate à Resistência aos Antimicrobianos (Global Action Plan on Antimicrobial Resistance), documento orientador que definiu cinco eixos estratégicos: melhoria da conscientização, fortalecimento da vigilância, redução da incidência de infecções, uso otimizado de antimicrobianos e investimento em pesquisa e inovação. O plano reconhece que o uso excessivo e indevido de antimicrobianos em humanos, animais e meio ambiente impulsiona o surgimento e a disseminação da resistência antimicrobiana (RAM), uma das maiores ameaças à saúde pública contemporânea (WHO, 2015).

O Brasil aderiu a tal iniciativa por meio do Plano de Ação Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência aos Antimicrobianos (PAN-BRAGG, 2018), coordenado pela ANVISA em parceria com os Ministérios da Saúde, da Agricultura e do Meio Ambiente. Esse plano representa a tradução local da estratégia tripartite e estabelece ações de vigilância integrada da RAM no território nacional (ANVISA, 2018).

Nos últimos anos, a resistência fúngica ganhou destaque dentro da agenda One Health. Em 2022, a OMS publicou o documento “WHO Fungal Priority Pathogens List to Guide Research, Development and Public Health Action” (FPPL), que pela primeira vez classificou fungos patogênicos segundo sua relevância para a saúde pública. Nessa lista, o gênero *Candida* ocupa posição central: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* figuram como espécies de alta prioridade, enquanto *Candida auris* é reconhecida como patógeno crítico

devido à sua multirresistência, alta mortalidade associada e capacidade de disseminação ambiental (WHO, 2022).

O relatório ressalta que o avanço da resistência antifúngica em *Candida* spp. é impulsionado não apenas pelo uso clínico de antifúngicos azólicos, mas também pela exposição ambiental a fungicidas agrícolas estruturalmente semelhantes, como tebuconazol, propiconazol e difenoconazol. Essa sobreposição entre o uso agrícola e médico cria uma ponte ecológica de resistência cruzada, transformando solos e águas residuais em potenciais reservatórios de cepas resistentes (Morio et al., 2023; Castelo-Branco et al., 2023).

Nesse contexto, a abordagem One Health é essencial, pois reconhece que a resistência antifúngica não se restringe ao ambiente hospitalar: ela emerge e se dissemina em múltiplos ecossistemas. Estratégias integradas que envolvem biossegurança agrícola, controle ambiental, uso racional de antimicrobianos e vigilância laboratorial tornam-se indispensáveis para conter a expansão de espécies resistentes de leveduras do gênero *Candida* (FAO, 2023; WHO, 2022).

Além disso, o documento da OMS sobre fungos prioritários destaca que os impactos da resistência antifúngica ultrapassam a saúde humana, afetando a segurança alimentar, a produtividade agrícola e os ecossistemas naturais, pilares centrais da sustentabilidade. Portanto, a resistência em *Candida* spp., simboliza o desafio global de equilibrar saúde, meio ambiente e economia dentro da lógica do desenvolvimento sustentável, como proposto pelo conceito de Saúde Única (Casadevall et al., 2019; Chow et al., 2020).

2.2 Importância da abordagem One Health para estudos com *Candida* spp.

O reconhecimento das infecções fúngicas causadas por leveduras remota à antiguidade, com manifestações atualmente identificadas como candidíase oral, caracterizadas por lesões esbranquiçadas em indivíduos imunocomprometidos sendo descritas inicialmente por Hipócrates (c. 460–370 a.C.) e, posteriormente, por Galeno (c. 130–200 d.C.), constituindo os primeiros registros clínicos dessas infecções (Sidrim; Rocha, 2004).

O agente etiológico permaneceu desconhecido até o século XIX, quando Bernhard von Langenbeck (1839) realizou o primeiro isolamento de leveduras a partir da orofaringe de pacientes com febre tifoide, constituindo o primeiro registro microbiológico do microrganismo, ainda que sem definir sua relação causal com a doença (Hazen, 1995). A distinção definitiva da candidíase oral foi realizada por David Gruby (1842), e a relação de causalidade foi consolidada por Berg (1846). Nas décadas seguintes, o espectro clínico expandiu-se para incluir formas

sistêmicas e localizadas: Zenker (1861) descreveu o acometimento cerebral (Wittig et al., 1973), enquanto Mayer (1862) e Haussmann (1875) documentaram manifestações ginecológicas, incluindo a possibilidade de transmissão vertical (Sidrim; Rocha, 2004).

A nomenclatura do agente etiológico foi submetida à diversas revisões taxonômicas ao longo do século XIX. Inicialmente denominado *Oidium albicans* por Robin (1853) e *Monilia albicans* por Zopf (1890), o gênero *Candida*, e, sobretudo, a espécie *Candida albicans* foram formalmente propostos pela microbiologista holandesa Christine Berkhout em 1923, denominação que permanece vigente (Sidrim; Rocha, 2004).

Vale ressaltar, que embora o gênero *Candida* seja classificado no reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, subfilo *Saccharomycotina*, classe *Saccharomycetes* e ordem *Saccharomycetales* sua taxonomia e diversidade permanecem em revisão contínua (*Candida auris* (*Candidozyma auris*); *Candida catenulata* (*Diutina catenulata*); *Candida* complexo *haemulonii* (*Candidozyma haemuli*); *Candida glabrata* (*Nakaseomyces glabratus*); *Candida guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*); *Candida kefyr* (*Kluyveromyces marxianus*); *Candida krusei* (*Pichia kudriavzevii*); *Candida lusitanae* (*Clavispora lusitanae*); *Candida pararugosa* (*Wickerhamiella pararugosa*; *Candida rugosa* (*Diutina rugosa*). (Borman; Johnson, 2023). O gênero *Candida* compreende mais de 150 espécies, embora a maioria das infecções humanas seja atribuída a um pequeno grupo de patógenos. *Candida albicans* continua predominante, seguida por espécies não-*albicans* de relevância clínica, como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *Nakaseomyces glabratus* e *Pichia kudriavzevii*. A crescente prevalência de espécies reclassificadas, especialmente *N. glabratus*, segunda principal causa de candidemia, destaca a importância dessas distinções taxonômicas (Huang et al., 2025; Denning, 2024).

A redefinição taxonômica de *Candida glabrata*, atualmente, *Nakaseomyces glabrata*, representa uma das transformações mais relevantes na micologia médica contemporânea. Essa mudança baseia-se em evidências genômicas e filogenéticas representando a separação evolutiva do tradicional clado *Candida*. Em 2021, Andrew Borman e Elizabeth Johnson publicaram uma revisão abrangente sobre as recentes alterações na nomenclatura de fungos de importância médica, na qual defenderam a reclassificação de *Candida glabrata* para *Nakaseomyces glabrata* (Borman; Johnson, 2021). No ano seguinte, Masako Takashima e Takashi Sugita (2022) formalizaram a proposta de renomeação para *Nakaseomyces glabratus*.

Contudo, a adoção do novo nome *Nakaseomyces glabrata* (ou *glabratus*) tem sido alvo de críticas (Denning, 2024). Embora a proposta de renomeação seja cientificamente fundamentada, ao refletir com maior precisão a pureza taxonômica e a distinção filogenética da

espécie em relação ao clado *Candida*, surgem preocupações quanto às implicações práticas para a clínica e a saúde pública. Denning (2024) alerta que a alteração do nome de um patógeno que representa a segunda principal causa de candidemia pode gerar confusão em diagnósticos laboratoriais e entre profissionais de saúde, além de comprometer a vigilância epidemiológica. Por essas razões, o autor defende manter a nomenclatura *Candida glabrata* nos contextos clínico e de saúde pública, dada sua importância estratégica no manejo das infecções fúngicas.

Nesse contexto, compreender a morfofisiologia do gênero *Candida* é essencial para sustentar decisões taxonômicas e clínicas. A notável capacidade adaptativa dessas espécies está associada ao seu pleomorfismo, a habilidade de alternar entre formas leveduriformes (blastocónidios) e filamentosas (pseudo-hifas e hifas verdadeiras). Essa plasticidade morfológica constitui um fator essencial para a adesão, invasão tecidual e evasão das defesas do hospedeiro (Sidrim; Rocha, 2004).

Candida spp. integram a microbiota comensal de humanos e animais, colonizando predominantemente o trato gastrointestinal, cavidade oral e trato urogenital (Li et al., 2022). Dessa forma, infecções por *Candida* spp., são comumente de origem endógena, desencadeada por desequilíbrios na homeostase do hospedeiro, sobretudo em indivíduos imunocomprometido expostos a dispositivos invasivos (Gaspar et al., 2025; Valentine et al., 2025). Essa característica endógena, combinada à fatores ambientais, sociais e clínicos, constituem causas de mudanças epidemiológicas significativas: espécies de *Candida* não-*albicans* (CNA), incluindo *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. auris*, superam *C. albicans* em prevalência e frequentemente exibem resistência múltipla a antifúngicos (Motta; Rivas-Pinedo; Oñate, 2025).

Estudos indicam que as alterações climáticas, associadas a fatores antropogênicos, constituem os principais determinantes da emergência fúngica, modulando o crescimento, a distribuição e a virulência de fungos, com implicações em mais da metade das doenças infecciosas humanas descritas. O aumento das temperaturas médias globais e a modificação dos padrões pluviométricos têm promovido a disseminação geográfica de fungos patogênicos, incluindo espécies do gênero *Candida*, incluindo a espécie *C. auris*, multirresistente (Casadevall et al., 2019; Salazar-Hamm; Torres-Cruz, 2024; Seidel et al., 2024; Sedik et al., 2024 Bottery et al., 2025; George et al., 2025;).

Vale ressaltar, que uso intensivo de fungicidas azólicos na agricultura associado às mudanças climáticas favorecem a seleção de cepas resistentes, bem como a ocorrência de resistência cruzada a azóis clínicos (Castelo-Branco et al., 2020; Sidrim et al. 2021; Castelo-Branco et al., 2022, Bastos et al., 2025); além de fatores sociais e estruturais, como

desigualdade, deslocamento populacional e limitações no acesso ao diagnóstico que ampliam a vulnerabilidade a infecções oportunistas (Motta; Rivas-Pinedo; Oñate, 2025).

Portanto, sob a perspectiva One Health, a ocorrência de *Candida* em diversos nichos ambientais e animais destaca a importância de compreender sua ecologia além do hospedeiro humano. Essa visão integrada é fundamental para explicar os fatores ecológicos, ambientais e antropogênicos que influenciam sua disseminação e resistência. Nesse contexto, torna-se essencial discutir a epidemiologia de *Candida* no âmbito One Health, considerando como as interações entre ambiente, animais e humanos moldam o surgimento e a propagação dessas infecções.

A crescente incidência de candidíase invasiva e o aumento da resistência à antifúngicos têm consolidado as leveduras do gênero *Candida* como patógenos de relevância crítica na agenda de Saúde Pública global (Sabino, 2025). A epidemiologia desses fungos, no entanto, não pode mais ser restrita ao ambiente hospitalar ou à clínica humana, exigindo uma abordagem e meio ambiente (Ellwanger; Chies, 2023).

A interface One Health para *Candida* spp. é delineada, primariamente, pela circulação de cepas e pela pressão seletiva exercida agentes antifúngicos. O solo, a água, os hospitais e os animais (incluindo selvagens e de produção) atuam como reservatórios para seres humanos, sendo locais cruciais para a seleção e disseminação de resistência (Castelo-Branco *et al.*, 2020; ANVISA, 2022/2024). A maior preocupação reside na resistência aos azólicos, uma classe amplamente utilizada tanto na terapia humana quanto na agricultura (como fungicidas para culturas). A exposição ambiental a esses compostos, análogos aos fármacos clínicos, induz mecanismos de resistência em leveduras ambientais e animais, que podem subsequentemente ser transmitidas para humanos (Domán *et al.*, 2024).

Sidrim *et al.* (2021) evidenciaram, em seus estudos, que solos agrícolas expostos a fungicidas azólicos como tebuconazol e tetraconazol podem atuar como reservatórios de espécies de *Candida* patogênicas para humanos, incluindo *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. albicans* e *C. tropicalis*. A importância desses achados decorre do fato de que essas cepas ambientais não apenas exibem perfis *non-wild type* (não – selvagem), para azóis de uso clínico, como fluconazol e voriconazol, em suas formas planctônicas, mas também demonstram elevada capacidade de formar biofilmes resistentes tanto a azóis agrícolas quanto clínicos. Esses resultados reforçam a hipótese de que o uso extensivo de azóis na agricultura favorece a seleção de fungos resistentes, estabelecendo um elo preocupante entre saúde ambiental e saúde humana, e configurando uma ameaça à eficácia terapêutica dos antifúngicos devido ao risco de resistência cruzada.

Castelo-Branco *et al.* (2020) investigaram a ocorrência e os mecanismos de resistência a azólicos em espécies de *Candida* isoladas de animais, e confirmaram a presença de *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*) resistentes à azólicos, isolados de animais. O principal mecanismo de resistência identificado foi a atividade de bombas de efluxo; além disso, ao comparar os valores de corte epidemiológico (ECVs) para antifúngicos entre isolados de *Candida* de origem humana e animal, os autores observaram que os ECVs para as cepas de animais eram consistentemente mais altos. Isso sugere que a resistência aos azólicos emerge de nichos associados a animais, indicando a existência de fatores ambientais (como o uso de azólicos na agricultura) que impulsionam esse fenômeno. Portanto, os resultados desses estudos reforçam que a resistência aos azólicos constitui um fenômeno que transcende o ambiente clínico humano, sendo veiculado por mecanismos de efluxo em cepas de *Candida* spp de origem animais.

A exposição ambiental a fungicidas agrícolas do grupo dos azóis pode favorecer o desenvolvimento de resistência em leveduras patogênicas humanas, como *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp.. Revisões recentes indicam a existência de uma via ambiental alternativa para a seleção e aquisição de resistência antifúngica, distinta da observada em contextos clínicos. Nesse cenário, ambientes naturais e antrópicos, como solos e águas residuais, atuam como importantes reservatórios e potenciais *hotspots* de resistência, contribuindo para a disseminação de cepas resistentes no ecossistema. (Castelo-Branco *et al.*, 2022).

Um estudo multicêntrico brasileiro, sob a perspectiva One Health (Saúde Única), investigou a sensibilidade a antifúngicos de 571 isolados de leveduras, predominantemente do gênero *Candida*, coletados de pacientes, ambiente hospitalar, animais (suínos e aves) e seus respectivos ambientes. Embora a maioria dos isolados resistentes tenha vindo de pacientes, o estudo confirmou a presença de resistência também em cepas de origem animal e ambiental. A espécie *C. tropicalis* apresentou a maior taxa de resistência ao fluconazol (12%). Além disso, ao testar o azólico ambiental tebuconazol, 10,5% dos isolados demonstraram alta Concentração Inibitória Mínima (CIM), com 3,6% das cepas de *Candida* (especialmente *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*) exibindo resistência cruzada entre fluconazol (clínico) e tebuconazol (ambiental). Esse trabalho evidencia a necessidade de monitoramento multidisciplinar da resistência em diferentes nichos para compreender e combater a emergência da resistência antimicrobiana fúngica (Bastos *et al.*, 2025).

Evidências da epidemiologia genômica reforçam a interface complexa entre saúde humana, animal e ambiental. Um estudo comparando isolados de *C. albicans* humanos e aviários revelou que cepas de aves de vida livre apresentavam mecanismos de plasticidade

genômica, em genes associados à resistência antifúngica, reproduzindo os padrões encontrados em isolados clínicos humanos. Tais achados sugerem que a pressão dos fungicidas ambientais pode estar selecionando cepas resistentes em hospedeiros animais; visto que o reservatório animal e ambiental atua como um nicho para a seleção de cepas potencialmente resistentes, que podem se disseminar, reforçando a necessidade de uma vigilância integrada para mitigar o risco de candidíases resistentes na saúde pública (Domán *et al.*, 2024).

Ademais, estudos ressaltam que há uma emergência global do fungo multirresistente (*multidrug-resistant*) *C. auris*, propondo que ele possa ser uma se um patógeno fúngico a surgir diretamente das mudanças climáticas (Garcia-Bustos *et al.* 2024). O aquecimento global impulsionou a evolução do fungo, originário de um nicho ambiental (como pântanos ou ecossistemas salinos), conferindo-lhe termotolerância; tal adaptação térmica transformou-o em um patógeno capaz de infectar humanos, com o possível envolvimento de reservatórios animais intermediários (como aves, ou evidenciado pelo recente isolamento em um cão doméstico), levantando preocupações sobre a transmissão zoonótica (Garcia-Bustos *et al.* 2024). Os autores argumentam, ainda, que a disseminação da *C. auris* e a complexa dinâmica de sua evolução é marcada pela emergência simultânea de cinco clados geneticamente distintos em diferentes continentes, havendo urgência de uma abordagem One Health (Saúde Única), integrada e interdisciplinar, para compreender e mitigar os riscos representados por patógenos emergentes impulsionados por alterações ambientais.

C. auris tem se destacado como um dos principais desafios epidemiológicos devido à sua resistência a antifúngicos. No continente africano estudos demonstraram prevalência de *C. auris* de 8,74%, com uma taxa de letalidade associada de 39,46% em infecções documentadas. O fungo apresenta elevada resistência ao fluconazol e resistência moderada à anfotericina B, mantendo, entretanto, suscetibilidade às equinocandinas. A emergência e disseminação de *C. auris* são potencializadas em ambientes com recursos limitados, caracterizados por elevada incidência de comorbidades (HIV, diabetes e doenças cardiovasculares) e maior exposição a antimicrobianos (Chowdhary *et al.* 2024).

Estudos conduzidos durante a pandemia de COVID-19 no Brasil revelaram a presença de diversas espécies de *Candida* em amostras de esgoto. Os isolados apresentaram capacidade de formar biofilmes e produzir enzimas hidrolíticas, reforçando o potencial patogênico dessas espécies fora do ambiente hospitalar. Esse estudo amplia o entendimento sobre a circulação ambiental de *Candida spp.*, apontando o esgoto como um importante reservatório de microrganismos resistentes, adaptados a condições adversas, com implicações diretas para a saúde humana, animal e ambiental, especialmente diante das mudanças climáticas

e da crescente pressão seletiva causada pelo uso de antimicrobianos (Corrêa-Moreira *et al.* 2024).

A prevalência de patógenos fúngicos em ambientes aquáticos têm revelado a circulação de espécies clinicamente relevantes. Em amostras de águas costeiras do sul do Brasil, observou-se a detecção de *Aspergillus* spp. em 44% e *Candida* spp. em 40% das coletas. Tais achados demonstram que ecossistemas aquáticos costeiros funcionam como reservatórios de isolados fúngicos patogênicos e resistentes, reforçando a necessidade de vigilância ambiental (Andrade *et al.*, 2024).

A exposição ambiental a fungicidas agrícolas do grupo dos azóis pode favorecer o desenvolvimento de resistência em leveduras patogênicas humanas, como *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. Estudos recentes indicam a existência de uma via ambiental alternativa para a seleção e aquisição de resistência antifúngica, distinta da observada em contextos clínicos. Nesse cenário, ambientes naturais e antrópicos, como solos e águas residuais, atuam como importantes reservatórios e potenciais *hotspots* de resistência, contribuindo para a disseminação de cepas resistentes no ecossistema. (Castelo-Branco *et al.*, 2022).

O uso intensificado de antifúngicos da classe dos azóis na agricultura tem levantado preocupações quanto à possível ocorrência de resistência cruzada em leveduras patogênicas humanas. Esse cenário reforça a necessidade urgente de investigar e desenvolver alternativas eficazes para desinfecção e controle microbiano. Neste contexto, os Compostos de Amônio Quaternário (CAQs), como o BZ e DDAC destacam-se como biocidas potentes. Essa classe de substâncias é amplamente utilizada no setor de saúde pública e industrial por sua atividade antimicrobiana de amplo espectro e por seu mecanismo de ação distinto dos azóis, que envolve a desnaturação de proteínas e o dano às membranas celulares microbianas (McKeen, 2012; Ioannou *et al.*, 2007).

2. 3 Compostos de Amônio Quaternário (CAQs)

Os Compostos de Amônio Quaternário (CAQs) estão presentes como substâncias ativas em 292 desinfetantes aprovados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) para inibir quanto para inativar microrganismos prejudiciais, como vírus, bactérias e fungos, em superfícies inanimadas (USEPA, 2020). Entre os biocidas QACs registrados por agências reguladoras globais, destacam-se o DDAC e o BZ (EPA, 2022).

BZ é um tensoativo catiônico caracterizado por um átomo de nitrogênio quaternário ligado a cadeias alquilas aromáticas. Amplamente utilizado como desinfetante e

antisséptico, está presente em cerca de 20% dos produtos de higiene pessoal (Piovesan Pereira; Tagkopoulos, 2019; Isaac; Scheinman, 2017). Entre suas principais propriedades destacam-se a ação bactericida, fungicida e virucida (especialmente contra vírus envelopados), sua atividade surfactante que promove ruptura de membranas, boa estabilidade em formulações aquosas e eficácia em baixas concentrações, embora apresente sensibilidade à presença de matéria orgânica.

Já o DDAC é formado por duas cadeias alquilas (C10–C10) ligadas ao nitrogênio quaternário, característica que lhe confere maior hidrofobicidade e potência biocida. É amplamente empregado em produtos de uso industrial e comercial, incluindo desinfetantes hospitalares, limpeza de alto desempenho e descontaminação de superfícies (Shane et al., 2019). Suas propriedades incluem forte atividade biocida frente a bactérias, fungos e algas, elevada capacidade de interação com membranas celulares, alta estabilidade térmica e química, persistência prolongada nas superfícies e melhor performance na presença de matéria orgânica quando comparado a outros QACs.

Essa classe diversificada de substâncias químicas catiônicas possui uma vasta aplicação industrial e em produtos de consumo, devido, principalmente, às suas propriedades antimicrobianas, antiestáticas e surfactantes, tendo como mecanismo de ação desnaturar proteínas e danificar membranas celulares microbianas (McKeen, 2012; Ioannou, Hanlon; Denyer, 2007).

A importância destes CAQs é evidente em diversos setores de saúde pública, incluindo hospitais, residências, escolas e estabelecimentos de alimentação (Choi *et al.*, 2018; Havill, 2013; Weber *et al.*, 2013). Tal relevância foi reforçada durante a pandemia, quando agências como o Centro de Controle de Doenças (CDC) e a USEPA recomendaram o uso de desinfetantes contendo CAQs, como o DDAC, no controle de infecções em superfícies, incluindo o SARS-CoV-2 (Rutala; Weber, 2019). Em abril de 2024, produtos antimicrobianos à base de CAQs representavam quase metade (47%) da Lista da USEPA de produtos eficazes contra o SARS-CoV-2 (USEPA, 2024).

No ambiente agrícola, os Compostos de Amônio Quaternário (CAQs) também desempenham papel relevante, sendo utilizados em protocolos de biossegurança para higienização de instalações, equipamentos, utensílios de manejo e veículos, além do tratamento de superfícies em granjas, estufas, fazendas leiteiras e unidades de processamento de alimentos. Formuladas principalmente à base de BZC e DDAC, essas substâncias são aplicadas para reduzir a carga microbiana e prevenir surtos causados por patógenos de importância veterinária, como *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Campylobacter spp.*, *Listeria monocytogenes* e fungos

filamentosos presentes no solo e em materiais orgânicos (McDonnell; Russell, 1999; Saini et al., 2020). Sua elevada estabilidade, poder surfactante e ação residual favorecem o uso em condições rurais, onde há maior presença de matéria orgânica e biofilmes. Contudo, o emprego contínuo e, muitas vezes, intensificado desses agentes na agricultura, em sistemas intensivos de produção animal e no processamento primário vegetal, tem levantado preocupações emergentes sobre seleção de microrganismos mais tolerantes ou resistentes, incluindo leveduras ambientais e oportunistas associadas à saúde humana e animal (Tezel; Pavlostathis, 2015; Guo et al., 2019; Buffet-Bataillon et al., 2016), alinhando-se às discussões atuais da perspectiva One Health.

Assim como o DDAC, o BZ é um composto amplamente utilizado e reconhecido por sua importância no controle de microrganismos patogênicos, desempenhando papel relevante na saúde pública (Osimitz; Droege, 2025). A segurança desses compostos tem sido amplamente investigada em estudos toxicológicos recentes. As avaliações regulatórias indicam que os principais efeitos adversos relacionados ao DDAC e ao BZ são de natureza local, caracterizando-se por irritação ou corrosão em locais de contato quando presentes em concentrações elevadas (Luz *et al.*, 2020; Osimitz; Droege, 2025). O perfil toxicológico demonstra baixa absorção dérmica e oral, bem como limitada distribuição sistêmica, fatores essenciais para o entendimento de seu risco potencial.

Vale ressaltar que estudos científicos classificam esses compostos como não carcinogênicos, não genotóxicos ou não tóxicos para a reprodução e o desenvolvimento nas concentrações de 100 mg/kg/dia (ratos) e 9 mg/kg/dia (coelhos) para BZ, e 20 mg/kg/dia (ratos) e 3 mg/kg/dia (coelhos) para DDAC. Em aplicações farmacêuticas e de contato humano, o BZ é amplamente empregado em concentrações entre 4,5 e 100 µg/mL, sem evidências de genotoxicidade, carcinogenicidade ou toxicidade reprodutiva, enquanto exposições tópicas de curta duração de até 1.000 µg/mL estão associadas, no máximo, a efeitos irritativos locais. De forma semelhante, o DDAC (50–1.000 µg/mL) apresenta perfil de segurança comparável, com ausência de toxicidade sistêmica documentada em humanos nas concentrações utilizadas em produtos desinfetantes diluídos, sendo os efeitos adversos predominantemente restritos à irritação cutânea ou de mucosas em concentrações mais elevadas. Assim, quando empregados dentro dos limites estabelecidos por agências regulatórias, ambos os compostos são considerados seguros para uso humano, não sendo classificados como carcinogênicos, genotóxicos ou tóxicos para a reprodução e o desenvolvimento (Marple *et al.*, 2004; CIR, 2012; EMA, 2017; EPA, 2006; Severin *et al.*, 2020). Ainda assim, a presença residual de compostos de amônio quaternário permanece como um ponto de atenção quanto à exposição crônica,

embora as concentrações detectadas sejam consideradas de baixa relevância toxicológica segundo os dados disponíveis (Osimitz; Droege, 2025; LUZ *et al.*, 2020).

Estudos têm demonstrado a atividade antifúngica desses compostos, BZ e o DDAC, por meio da modificação de nanotubos de haloisita (HNTs). Esses nanotubos, partículas de argila tubular capazes de atuar como transportadoras, foram modificados utilizando os CAQs pelo método de carregamento a vácuo, resultando na síntese bem-sucedida de novos nanocompostos com elevado potencial antifúngico. Ademais, as análises das propriedades superficiais mostraram que a modificação conferiu aos HNTs carga superficial positiva e maior hidrofobicidade, características que aumentam a eficácia biocida ao favorecer a perturbação das membranas celulares fúngicas. A avaliação do desempenho antifúngico, realizada pelo teste de zona de inibição, confirmou que a combinação de HNTs com CAQs constitui uma estratégia promissora para o desenvolvimento de agentes antimicrobianos mais estáveis (Yue *et al.*, 2019).

Formulações contendo como princípio ativo o DDAC apresentaram atividade antifúngica contra diversas cepas resistente de *Aspergillus brasiliensis*. O DDAC se destaca por ser um dos poucos CAQs com atividade fungicida; além disso, a norma europeia BS EN-1650 exige que um desinfetante prove que consegue reduzir o número de fungos vivos em, no mínimo, 4log10 (o que significa matar 99,99% dos fungos). O DDAC atende a esse critério rigoroso, confirmando sua eficácia, e consolidando seu potencial como agente biocida de ampla aplicação em formulações desinfetantes industriais, hospitalares e ambientais (Polarine, 2012).

O fungo *Geotrichum citri-aurantii*, responsável pela deterioração pós-colheita dos cítricos e considerada uma das doenças mais significativas e economicamente prejudiciais na citricultura, mostrou-se sensível DDAC. Estudos *in vitro* demonstraram que o DDAC é capaz de eliminar 100% dos esporos em tempos de exposição muito curtos, entre 1 e 4 minutos, atuando por meio da perturbação da membrana celular do fungo (Diaz *et al.*, 2015).

Outros estudos, demonstraram que o DDAC possui atividade antimicrobiana de amplo espectro contra patógenos comuns em materiais de construção históricos. No estudo, as formulações contendo o composto provaram ser eficazes na desinfecção e proteção de madeiras e tijolos contra as bactérias *Staphylococcus equorum*, *Bacillus cereus*, *Sporosarcina aquimarina* e *Rhodococcus fascians*, além dos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Acremonium strictum*. Essa eficácia torna-o uma opção para restauração, considerando sua baixa toxicidade e estabilidade química para combater a biodegradação nesses materiais valiosos (Rajkowska *et al.*, 2016).

De forma semelhante, o BZ apresentou forte atividade antifúngica contra microrganismos provenientes de objetos de patrimônio cultural, demonstrando eficácia biocida significativa. Quando comparado a óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano), *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Lavandula angustifolia* (lavanda), tal composto mostrou-se um dos agentes mais potentes, requerendo baixas concentrações inibitórias mínimas (MIC) para inibir e eliminar os fungos testados; além disso, exibiu ação antifúngica contra todos os isolados avaliados, incluindo *Bipolaris spicifera*, *Epicoccum nigrum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* e *Trichoderma viride*, com *A. niger* e *A. ochraceus* sendo os mais sensíveis ao tratamento. Esses resultados sugerem-no como um biocida químico eficaz no combate à biodeterioração de substratos de pedra e madeira em artefatos históricos (Stupar *et al.*, 2014).

Os compostos de amônio quaternário, DDAC e BZ, têm ampla aplicações. O BZ, por exemplo, possui propriedades antimicrobianas de amplo espectro contra bactérias, fungos e vírus. Contudo, um estudo investigou o impacto da exposição frequente de microrganismos à BZ e constatou o surgimento de fenótipos de resistência cruzada, como cloranfenicol em *E. coli*, fluoroquinolonas e co-trimoxazol em *Listeria monocytogenes*, aminoglicosídeos em *Acinetobacter baumannii* (Kim *et al.*, 2018; Pereira; Tagkopoulos, 2019;; Silva *et al.*, 2023). Os autores analisaram as concentrações de BZ em produtos comerciais e correlacionaram-nas com a emergência de tolerância em populações microbianas, pois, o uso disseminado e constante de BZ propicia um ambiente seletivo que favorece microrganismos resistentes. Essa tolerância não se restringe aos próprios biocidas, mas pode gerar microrganismos que são potencialmente resistentes a uma variedade de outros compostos, incluindo antimicrobianos clinicamente importantes. Esse fenômeno de resistência cruzada é atribuído, em grande parte, à seleção de genes de resistência e à indução de bombas de efluxo (Pereira; Tagkopoulos, 2019).

Nesse contexto, os autores enfatizam que uma análise rigorosa de benefícios versus riscos deve guiar as ações regulatórias futuras sobre compostos como o BZ, dado o risco substancial que eles representam para a saúde humana e ambiental, ao potencialmente exacerbar o problema global da resistência antimicrobiana.

O BZ é amplamente utilizado como conservante em produtos oftalmológicos. Um estudo avaliou sua atividade antifúngica comparando a eficácia contra 216 isolados de fungos filamentosos, incluindo *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.* e *Alternaria alternata*, agentes causadores de ceratite fúngica. Os resultados mostraram que o BZ apresentou atividade antifúngica em concentrações variando entre 8 e 32 µg/mL contra todos os fungos testados, indicando seu potencial para investigação como agente terapêutico no tratamento da ceratite fúngica (Xu *et al.*, 2013).

Um estudo comparou a eficácia do BZ com o hipoclorito de sódio (NaOCl) na remoção de biofilmes formados por leveduras dos gêneros *Candida* (*C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr*) e *Rhodotorula mucilaginosa* em superfícies da indústria alimentícia. Os resultados demonstraram que o BZ apresentou maior atividade antifúngica que o NaOCl, promovendo significativa desestruturação do biofilme. Entretanto, ambos os desinfetantes mostraram eficácia limitada na prevenção do regresso dos biofilmes: mesmo após a aplicação bem-sucedida, algumas células de levedura sobrevivem e permanecem aderidas à superfície. Essas células residuais, protegidas pela matriz remanescente do biofilme ou por resistência intrínseca, atuam como focos de contaminação persistente. Os achados sugerem que, embora o BZ seja mais eficiente na remoção inicial, estratégias adicionais são necessárias para evitar a reincidência de contaminação em longo prazo no processamento de alimentos (Palencia Diaz *et al.*, 2024).

Um estudo investigou a tolerância de isolados clínicos de *Candida* spp. ao BZ, evidenciando que o principal impacto não está em sua ação imediata, mas na ocorrência de resistência cruzada. As cepas hospitalares demonstraram elevada atividade de bombas de efluxo, originalmente responsáveis pela expulsão de antifúngicos azólicos, como o fluconazol, mas também eficazes na remoção do BZ do interior celular. Dessa forma, o uso desse composto em ambientes hospitalares atua sob uma pressão seletiva já existente, favorecendo leveduras resistentes a fármacos que exibem tolerância simultânea ao mesmo. Esse mecanismo levanta preocupações quanto à efetividade do desinfetante na eliminação de cepas persistentes e multirresistentes de *Candida* em superfícies clínicas (Macedo *et al.*, 2025).

A adaptação de *Candida* spp. frente à exposição contínua a compostos antimicrobianos, como o BZ, demonstra a notável plasticidade metabólica e regulatória dessas leveduras. Essa capacidade de resposta ao estresse químico não se restringe à resistência a desinfetantes ou antifúngicos, mas também se estende a mecanismos de sobrevivência em microambientes nutricionalmente limitados. Entre esses mecanismos, destaca-se o controle da homeostase do ferro, elemento essencial tanto para o hospedeiro quanto para o patógeno, cuja disponibilidade restrita desencadeia estratégias específicas de aquisição e armazenamento por *Candida* spp.

2.4 Potencial de reposicionamento da deferiprona como agente antimicrobiano

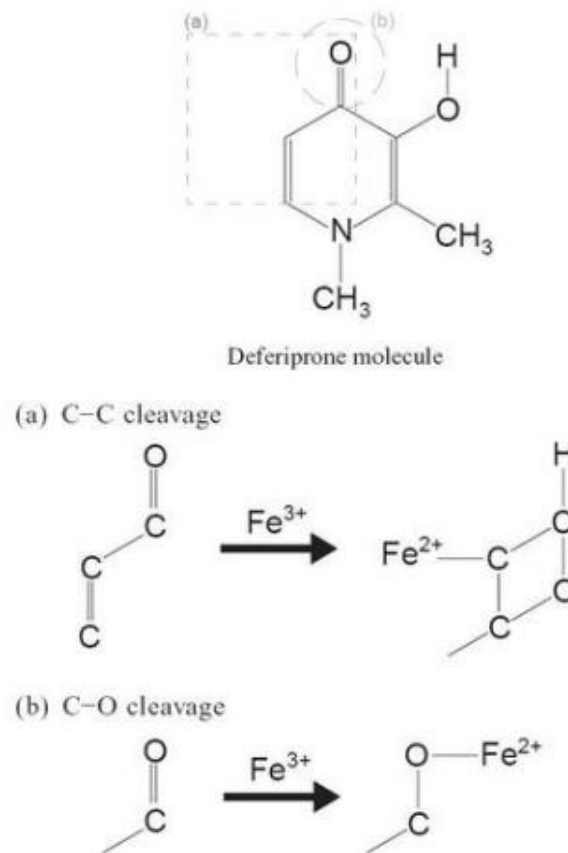
A Deferiprona (DEF) é um quelante de ferro pertencente à classe das 4-piridonas, quimicamente designada 1,2-dimetil-3-hidroxipirida-4-ona, sendo conhecida comercialmente

como L1, Ferriprox ou Kelfer. Trata-se de um quelante bidentado, ou seja, cada molécula possui dois átomos capazes de se ligar aos sítios de coordenação de íons ferro (Fe^{3+}) (Fe^{2+}) (**Figura 1**). Para formar um complexo estável completo com o ferro, são necessárias três moléculas de Deferiprona (Iberti *et al.*, 2005).

Dessa forma, a deferiprona atua ligando-se a íons metálicos, principalmente ferro, formando complexos estáveis que podem ser excretados, o que reduz os níveis excessivos de ferro no organismo. Nos sistemas biológicos, tanto o ferro férrico (Fe^{3+}) quanto o ferro ferroso (Fe^{2+}) estão presentes, destacando o papel da deferiprona na modulação do metabolismo do ferro. O Fe^{3+} , a forma mais comum de ferro para armazenamento e transporte, é o principal alvo da deferiprona. Nas reações ilustradas na figura 1, ele aparece nos reagentes das clivagens C-C e C-O, indicando sua participação na formação do complexo quelado. Já o Fe^{2+} surge no produto final da clivagem C-C, sugerindo que, durante a interação com a molécula orgânica, ocorre redução do ferro de Fe^{3+} para Fe^{2+} . Biologicamente, o Fe^{2+} é mais reativo e potencialmente tóxico, podendo gerar radicais livres via reação de Fenton, o que torna essencial a capacidade da deferiprona de quelar, reduzir e controlar o ciclo redox do ferro (Wiwanitkit, 2006).

As reações (a) C-C cleavage e (b) C-O cleavage demonstram os mecanismos de clivagem das ligações na molécula orgânica em presença de Fe^{3+} . Na clivagem C-C, a deferiprona quebra uma ligação carbono-carbono, formando um produto que se complexa ao Fe^{2+} , evidenciando como a interação com o ferro altera a estrutura do quelante. Na clivagem C-O, a ligação carbono-oxigênio é rompida, formando um produto quelado ligado ao ferro. Assim, Fe^{3+} atua como catalisador ou reagente inicial, enquanto Fe^{2+} integra o produto final, mostrando a complexidade das interações químicas entre a deferiprona e o ferro, fundamentais para sua eficácia no controle da sobrecarga de ferro.

Figura 1 - Molécula de deferiprona e vias de ligação com íons ferro (Fe^{3+}) reduzido a (Fe^{2+}).



Legenda: molécula de deferiprona e duas vias de reação para ligação ao íon ferroso (Fe^{2+}), usando modelagem quântica. Clivagem C-C: quebra da ligação Carbono-Carbono (C-C) na estrutura do quelante e formação do complexo entre a deferiprona e o ferro (Fe^{2+}). (b) Clivagem C-O: quebra da ligação Carbono-Oxigênio (C-O); reação para a formação do complexo quelado de ferro (Fe^{2+}), como via alternativa. **Fonte:** (Wiwanitkit, 2006).

Clinicamente, a deferiprona (Ferriprox®), aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) em 14 de outubro de 2011, tem sido utilizada para tratamento de sobrecarga de ferro em pacientes com Talassemia Major, quando outras terapias não são adequadas, devido à sua capacidade de se ligar ao íon férrico (Fe^{3+}), da ferritina celular, facilitando sua excreção pela urina (Chiesi, 2021; Fda, 2011). Nessa perspectiva, o princípio fundamental de sua ação, privação de ferro, tem sido considerado alvo de interesse na terapêutica infecciosa; uma vez que o ferro é um micronutriente essencial para a sobrevivência e virulência da maioria dos microrganismos (Zarembler *et al.*, 2009).

O Fe desempenha papel central na biologia de microrganismos, uma vez que participa de processos vitais como respiração celular, síntese de DNA, regulação de enzimas e produção de fatores de virulência. Por essa razão, sua disponibilidade adequada no hospedeiro é importante para o sucesso da infecção por diversos fungos patogênicos. Estudos demonstram que a restrição de ferro, por meio do uso de quelantes, compromete a sobrevivência e reduz significativamente o crescimento fúngico (Zarembler *et al.*, 2009). Esse efeito foi evidenciado

em diferentes espécies, como *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium oxysporum*, em que a inibição da aquisição de ferro resultou em bloqueio da infecção e atenuação da patogenicidade (LEAL *et al.*, 2013).

Além disso, pesquisas envolvendo a deferiprona evidenciaram seu potencial antifúngico em modelos experimentais de mucormicose; no qual observou-se que a administração da DEF reduziu significativamente a progressão da infecção, sugerindo que a limitação da disponibilidade de ferro compromete a capacidade dos fungos da ordem *Mucorales* em sustentar seu crescimento e expressar fatores de virulência (Ibrahim *et al.*, 2006). Esse achado é particularmente importante, pois a mucormicose representa uma micose invasiva grave, frequentemente associada a altas taxas de mortalidade e limitada resposta às terapias antifúngicas convencionais, como anfotericina B e posaconazol. A ação da deferiprona nesse contexto reforça a hipótese de que estratégias terapêuticas baseadas no sequestro de ferro podem atuar como adjuvantes no tratamento de infecções fúngicas refratárias, especialmente em cenários nos quais o microrganismo desenvolve mecanismos de resistência ou quando o paciente apresenta contraindicações às drogas de primeira linha. Desse modo, a abordagem de privação de ferro pode ser uma inovação promissora no campo da micologia médica e da terapêutica antifúngica.

Estudos revelaram que a deferiprona possui atividade antifúngica contra fungos do gênero *Sporothrix*, inibindo o crescimento em concentrações de 8 a 32 µg/mL e reduzindo a formação de biofilmes; sugerindo, portanto, que a privação de ferro afeta a virulência e o metabolismo do fungo. Esses resultados indicam seu potencial como agente antifúngico, além de seu uso clínico como quelante de ferro (Brilhante *et al.*, 2021).

O fungo *Aspergillus fumigatus*, um importante patógeno oportunista responsável por infecções respiratórias graves em indivíduos imunocomprometidos, também apresentou sensibilidade à deferiprona, sendo inibido em concentrações de 174 µg/mL. Esse achado, reportado por Nazik *et al.* (2015), evidencia que a privação de ferro, mediada pelo quelante, interfere no crescimento fúngico, corroborando a relevância do metabolismo do ferro como alvo terapêutico em infecções causadas por *Aspergillus*.

Estudos adicionais, como o realizado por Ibrahim *et al.* (2006), avaliaram o efeito *in vivo* da deferiprona em camundongos, evidenciando sua atividade antifúngica contra *Rhizopus oryzae*, agente mais comum da mucormicose, em doses de 100.000 µg/kg. Neste modelo experimental, a deferiprona demonstrou eficácia tanto na sobrevida dos animais quanto na redução da carga fúngica cerebral, apresentando desempenho comparável ao antifúngico anfotericina B.

Zarembler *et al.* (2009) avaliaram a atividade antifúngica de quelantes de ferro, incluindo a deferiprona, tanto isoladamente quanto em combinação com antifúngicos azólicos, como fluconazol e cetoconazol, contra *Aspergillus fumigatus*. O estudo mostrou que a associação com azóis potencializou a inibição do crescimento fúngico, sugerindo que a privação de ferro pode aumentar a eficácia de tratamentos convencionais e representar uma estratégia promissora para o manejo de infecções fúngicas resistentes.

Leal *et al.* (2013) evidenciaram que a quelação de ferro com deferiprona, quando associada a antifúngicos azólicos e polienos, como fluconazol, voriconazol e anfotericina B, reduziu significativamente o crescimento de *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium oxysporum* em modelos de infecção da córnea, sugerindo que a privação de ferro compromete a colonização fúngica e potencializa a ação de drogas convencionais. Além disso, a deferiprona demonstrou efeito sinérgico contra *Sporothrix* spp., diminuindo os valores de CIM de terbinafina, itraconazol e anfotericina B em até 16 vezes, reforçando seu potencial em estratégias terapêuticas que exploram a dependência de ferro dos microrganismos (Brilhante *et al.* 2021).

Bortolami *et al.* (2021) observaram que a adição de ferro nos estados férrico (Fe^{3+}) e ferroso (Fe^{2+}) aos meios de cultura contendo biofilmes de *Candida albicans* ATCC 1023 diminuiu a atividade antifúngica da deferiprona (DEF) de maneira dependente da concentração do metal. Os resultados indicaram que o aumento da disponibilidade de ferro atenuou a inibição promovida pela DEF, evidenciando que o mecanismo de ação do quelante está diretamente relacionado à privação desse micronutriente essencial.

O estudo também sugeriu que a sensibilidade do biofilme à deferiprona é modulada pelo equilíbrio entre a quantidade de ferro disponível e a capacidade de quelagem do fármaco, destacando a importância do ferro como fator crítico para a sobrevivência e manutenção do biofilme de *C. albicans*. Esses achados reforçam a hipótese de que a eficácia de terapias baseadas em quelação de ferro pode ser influenciada pela presença de fontes exógenas de ferro, sendo relevante considerar esse aspecto em estratégias de combate a infecções fúngicas, especialmente em ambientes onde o micronutriente está disponível em diferentes concentrações.

Nazik *et al.* (2015) demonstraram que o ferro exerce um papel crucial na formação e manutenção de biofilmes de *Aspergillus fumigatus*, evidenciando a dependência fúngica desse micronutriente essencial. Em seus experimentos, a DFP apresentou efeito inibitório sobre biofilmes pré-formados de *A. fumigatus* em concentrações de 625 a 1.250 μM , quando comparada aos controles sem a droga, indicando que a privação de ferro compromete a integridade e a viabilidade do biofilme. A reversão parcial da inibição pelo ferro, observada

com a adição de FeCl₃ a concentrações ≥ 625 μM , confirma que a eficácia da DFP está diretamente ligada à limitação de ferro no ambiente. Além disso, a presença isolada de FeCl₃ em 2.500 μM estimulou significativamente o crescimento de *A. fumigatus*, reforçando que o ferro é um fator limitante para o desenvolvimento fúngico. Por fim, os autores observaram que a DEP inibiu biofilmes formados de *A. fumigatus* em concentrações variando de 156 a 2.500 μM , evidenciando que quanto maior a quantidade de quelante, maior a redução da biomassa e da viabilidade celular. Esses achados indicam que a estratégia de privação de ferro interfere diretamente nos processos metabólicos e estruturais do biofilme (Nazik *et al.* 2015)

A deferiprona, além de antifúngica, tem demonstrado atividade antibacteriana contra importantes patógenos hospitalares. Thompson *et al.* (2012) avaliaram a ação do quelante sobre *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, observando valores de concentração inibitória mínima (CIM) variando de 128 a ≥ 512 $\mu\text{g/mL}$. Tais resultados indicam que a privação de ferro, mediada pela DEF, pode comprometer o crescimento e a viabilidade de bactérias multirresistentes. A atividade antibacteriana do quelante reflete a importância do ferro como micronutriente essencial para a sobrevivência microbiana e reforça a possibilidade de explorar estratégias de limitação de ferro como abordagem adjuvante no combate a infecções complexas.

Thompson *et al.* (2012) observaram que a DEF apresenta atividade contra *Burkholderia pseudomallei*, com valores de CIM entre 4 e 64 $\mu\text{g/mL}$, indicando que concentrações baixas do quelante são suficientes para comprometer o crescimento da bactéria. Os autores também relataram que a combinação da DFP com antibióticos β -lactâmicos resulta em efeito sinérgico. Esses achados foram posteriormente corroborados por Guedes *et al.* (2022), que demonstraram que a DEP mantém a mesma faixa de CIM (4–64 $\mu\text{g/mL}$) e reduz as CIMs de amoxicilina/clavulanato e meropenem quando utilizada em combinação. Além disso, evidenciaram que a DEP diminui a formação de biofilmes em 21% (MIC) e 12% (MIC/2), e reduz a biomassa de biofilmes maduros em 47%, 59%, 52% e 30% nas concentrações de 512, 256, 128 e 64 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Apesar dessas reduções, a DEP não afetou a viabilidade dos biofilmes nem aumentou sua suscetibilidade a amoxicilina/clavulanato, meropenem ou doxiciclina. Em suma, os estudos demonstram que a DEP inibe o crescimento planctônico, potencializa a ação de β -lactâmicos e reduz tanto a formação quanto a biomassa de biofilmes de *B. pseudomallei*. Esses achados indicam que a deferiprona pode atuar como adjuvante terapêutico, aumentando a eficácia de antibióticos, reduzindo doses necessárias e ampliando estratégias de controle de patógenos resistentes.

3. HIPÓTESES

1. Cepas de *Candida* spp. isoladas de amostras clínicas de pacientes do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), de superfícies de ambientes clínicos do HUWC, de animais de produção e de ambientes desses animais apresentam sensibilidade ao cloreto de didecildimetilamônio (DDAC) e ao cloreto de benzalcônio (BZ) semelhante, indicando uma circulação interconectada dessas leveduras;
2. Os desinfetantes quaternários cloreto de didecildimetilamônio (DDAC) e o cloreto de benzalcônio (BZ) apresentam atividade antifúngica contra *Candida* spp. na forma planctônica;
3. Os Desinfetantes quaternários cloreto de didecildimetilamônio (DDAC) e o cloreto de benzalcônio (BZ) apresentam atividade antifúngica contra biofilmes em formação e maduro de *Candida* spp.;
4. Deferiprona apresenta atividade antifúngica contra *Candida* spp. na forma planctônica;
5. O efeito antifúngico da deferiprona é reduzido pela suplementação com sulfato de ferro II (FeSO_4);
6. A deferiprona apresenta sinergismo com fluconazol, anfotericina B e caspofungina contra *Candida* spp. na forma planctônica;
7. A deferiprona exerce efeitos seletivos na formação e maturação de biofilmes das espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*;

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a sensibilidade de *Candida* spp., planctônico e biofilme, a antifúngicos e a desinfetantes, sob a perspectiva One Health, e investigar o potencial antifúngico da deferiprona.

4.2 Objetivos específicos

- a) Isolar e identificar cepas de *Candida* spp. de amostras clínicas humanas, de superfícies hospitalares (HUWC) e de animais de produção;
- b) Determinar a sensibilidade das cepas de *Candida* spp. isoladas de seres humanos, de ambientes hospitalares e de animais a antifúngicos e a desinfetantes derivados de amônia quaternária;
- c) Avaliar a atividade de desinfetantes derivados de amônia quaternária contra biofilmes em formação e maduro de *Candida* spp.;
- d) Analisar a atividade antifúngica da deferiprona contra *Candida* spp. na forma planctônica;
- e) Investigar o mecanismo da deferiprona sobre *Candida* spp. na forma planctônica;
- f) Averiguar a interação entre deferiprona e antifúngicos (fluconazol, anfotericina B e caspofungina) contra *Candida* spp. na forma planctônica;
- g) Analisar a atividade da deferiprona contra biofilmes de *Candida* spp.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local de estudo

A presente pesquisa foi realizada no laboratório do Grupo Aplicado em Microbiologia Médica (GrAMM) pertencente ao Departamento de Patologia e Medicina Legal na Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC).

5.2 Microrganismos

Um total de 134 cepas foram utilizadas neste estudo. Dessas, cento e nove cepas do gênero *Candida* foram utilizadas como parte de um projeto multicêntrico, da temática One Health, coordenado por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais, do qual o Grupo Aplicado em Microbiologia Médica (GrAMM) da Universidade Federal do Ceará fez parte. Essas cepas incluíram 21 *Candida albicans*, 23 *Candida tropicalis*, 17 *Candida parapsilosis sensu stricto*, 18 *Candida krusei*, 13 *Candida glabrata*, 7 *Candida rugosa*, 4 *Candida orthopsilosis*, 3 *Candida kefyr*, 1 *Candida guilliermondii*, 1 *Candida dubliniensis* e 1 *Candida palmiophila*. Adicionalmente a este estudo foram incluídas 25 cepas do gênero *Candida* (6 *C. albicans*, 6 *C. parapsilosis sensu stricto*, 7 *C. tropicalis* e 6 *C. glabrata*) pertencentes à Coleção de Culturas do Centro Especializado em Micologia Médica, também da Universidade Federal do Ceará, Brasil. As cepas de referência *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* ATCC 750 e *C. parapsilosis sensu stricto* ATCC 22019 foram utilizadas como controle dos ensaios. Os isolados foram recuperados em caldo BHI (Sigma-Aldrich – EUA) e repicados em *Chromagar Candida* (BD Diagnostic Systems-França) para confirmação da pureza, sendo posteriormente cultivados em ágar batata dextrose (PDA) (Himedia, Índia) para testes subsequentes.

5.3 Delineamento do estudo

O presente estudo foi realizado em duas etapas:

1ª etapa: Como parte de um projeto multicêntrico, leveduras (n=59) do gênero *Candida* spp., isoladas de amostras clínicas de pacientes do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), em Fortaleza, Ceará, e identificadas pelo laboratório do mesmo hospital foram

cedidas gentilmente. Ademais, procedeu-se ao isolamento a partir de diferentes superfícies (n=25) de ambientes (Unidade de transplante e Clínica médica) do HUWC. Ainda nessa primeira etapa, amostras (n= 53) de swabs retais e orais de suínos (*Sus scrofa domesticus*); amostras (n= 54) cloacais e orais de aves (*Gallus gallus domesticus*); e amostras (n=9) de ambientes (solo e fezes) destes animais de produção, provenientes de propriedades da Região Metropolitana de Fortaleza e do interior do estado foram coletadas. As amostras foram processadas conforme descrito no tópico 5.5, e cultivadas em meio chromoagar *Candida* seguidas pela identificação via MALDI-TOF. Ademais, foi avaliada a sensibilidade planctônica desses isolados aos antifúngicos fluconazol, micafungina e anfotericina B, e aos desinfetantes derivados de amônia quaternária cloreto de didecildimetilamônio e do cloreto de benzalcônio bem como o efeito desses desinfetantes sobre biofilmes em formação e biofilmes maduros, conforme demonstrado no **Quadro 1**.

2ª etapa: Inicialmente, foi avaliada a sensibilidade de *Candida* spp. (6 *C. albicans*, 6 *C. parapsilosis sensu stricto*, 7 *C. tropicalis* e 6 *C. glabrata*), na forma planctônica, às drogas deferiprona, fluconazol, anfotericina B e caspofungina e, em seguida, averigou-se a interação entre deferiprona e as drogas antifúngicas. Posteriormente, investigou-se o mecanismo de atividade antifúngica da deferiprona, por meio da suplementação do meio de cultura com sulfato de ferro II (FeSO₄). Por último, foi avaliado o efeito da deferiprona sobre biofilmes em formação e biofilmes maduros de *Candida* spp (**Quadro 1**). A pesquisa foi conduzida conforme etapas demonstradas na **Figura 2**.

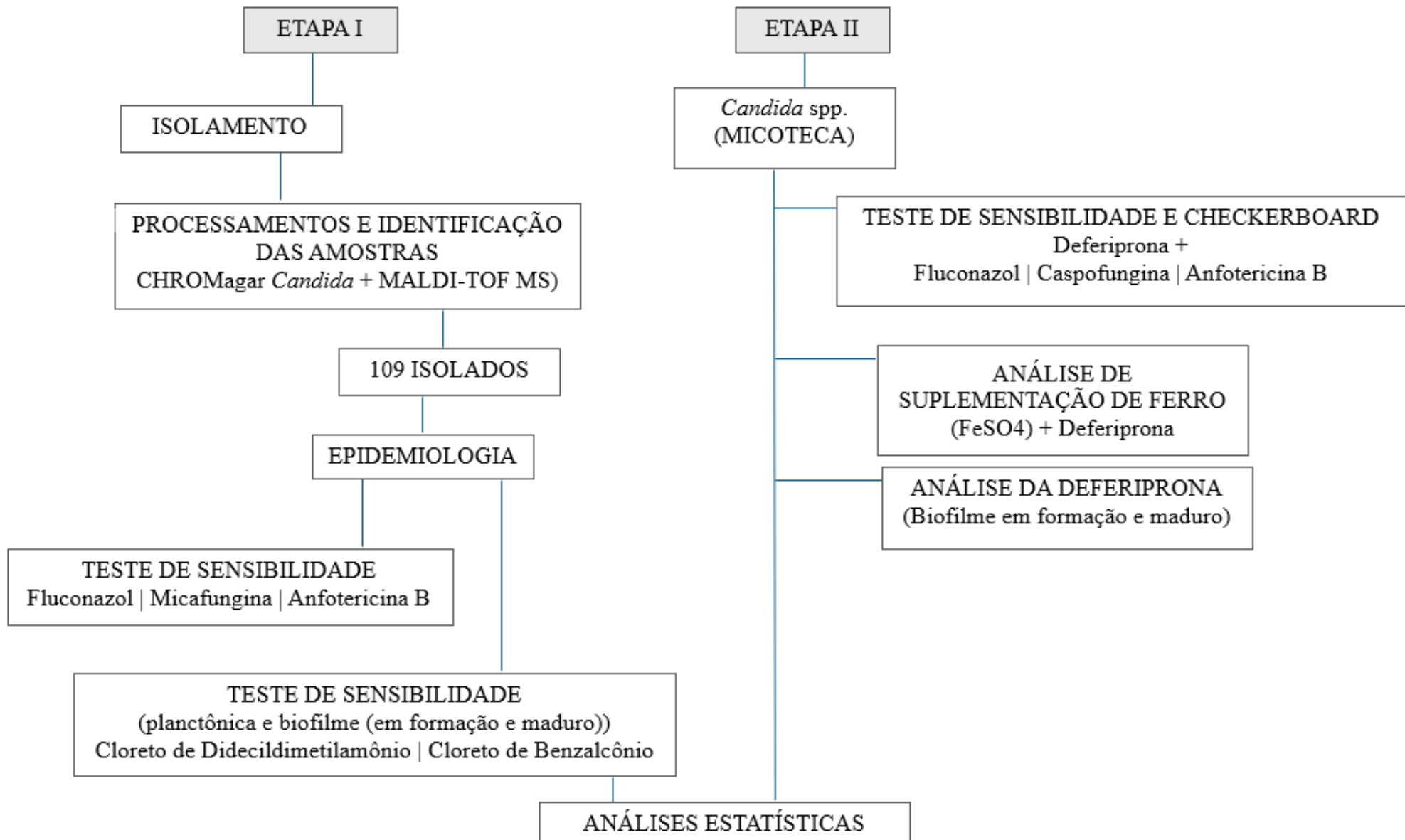
Quadro 1 – Distribuição das espécies de *Candida spp.* segundo os testes realizados

Espécies (n)	Origem (n)	Testes	Drogas
<i>Candida albicans</i> (20) <i>Candida tropicalis</i> (11) <i>Candida parapsilosis sensu stricto</i> (10) <i>Candida glabrata</i> (12) <i>Candida orthopsilosis</i> (2) <i>Candida guilliermondii</i> (1) <i>Candida dubliniensis</i> (1)	Humana (59) One health	TSA planctônico	FLC, MCF, AMB DDAC, BZ
<i>Candida parapsilosis sensu stricto</i> (7) <i>Candida orthopsilosis</i> (2)	Ambiente hospitalar (9) One health		
<i>Candida albicans</i> (1) <i>Candida tropicalis</i> (9) <i>Candida krusei</i> (14) <i>Candida glabrata</i> (1) <i>Candida rugosa</i> (2)	Suíno (27) One health		
<i>Candida rugosa</i> (4) <i>Candida tropicalis</i> (3) <i>Candida krusei</i> (4) <i>Candida kefyr</i> (3)	Ave (14) One health		
<i>Candida palmiellophila</i> (1) <i>Candida rugosa</i> (1)	Ambiental (2) One health		
<i>Candida albicans</i> (16) <i>Candida tropicalis</i> (21) <i>Candida krusei</i> (8) <i>Candida glabrata</i> (10) <i>Candida parapsilosis sensu stricto</i> (10)	Humana (40) Ambiente hospitalar (5) Animal (18) Ambiental (2) One health	Biofilme (formação e maduro)	DDAC, BZ
<i>Candida albicans</i> (6) <i>Candida tropicalis</i> (7) <i>Candida parapsilosis sensu stricto</i> (6) <i>Candida glabrata</i> (6)	Animal (25) (micoteca)	TSA planctônico	FLC, CAS, AMB DEF
<i>Candida albicans</i> (6) <i>Candida tropicalis</i> (7) <i>Candida parapsilosis sensu stricto</i> (6) <i>Candida glabrata</i> (6)	Animal (25) (micoteca)	Suplementação com sulfato de ferro II (FeSO ₄)	DEF
<i>Candida albicans</i> (6) <i>Candida tropicalis</i> (7) <i>Candida parapsilosis sensu stricto</i> (6) <i>Candida glabrata</i> (6)	Animal (25) (micoteca)	Ensaio de <i>checkerboard</i> planctônico	FLC, CAS, AMB DEF

<i>Candida albicans</i> (6) <i>Candida tropicalis</i> (7) <i>Candida parapsilosis sensu stricto</i> (6) <i>Candida glabrata</i> (6)	Animal (25) (micoteca)	Biofilme em formação	DEF
<i>Candida albicans</i> (3) <i>Candida tropicalis</i> (3) <i>Candida parapsilosis sensu stricto</i> (3) <i>Candida glabrata</i> (3)	Animal (12) (micoteca)	Biofilme maduro	DEF

AMB: amfotericina B. CAS: caspofungina. DEF: deferiprona. FLC: fluconazol. MCF: Micafungina. DDAC: Cloreto de didecil dimetil amônio. BZ: Cloreto de Benzalcônio. TSA: Teste de Sensibilidade Antifúngica.

Figura 2. Fluxograma experimental deste estudo.



1ª PARTE DO ESTUDO

5.4 Isolamento de *Candida* spp.

Para investigar a presença de *Candida* spp. no ambiente hospitalar foram realizadas coletas de amostras (n=25), com o auxílio de *swabs* de algodão estéreis umedecidos com solução salina estéril, em diferentes superfícies de ambientes do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), em Fortaleza, Ceará, a saber: unidade de transplante (Torneira de sala de medicação(1), carrinho de sala de medicação (1), carrinho de parada (1), mesa de Mayo (1), estestocópio (1), grade de leito de enfermaria 2 (1), maçaneta de enfermaria 2 (1), maçaneta de enfermaria 1 (1), bomba de infusão de enfermaria (1), dispensador de sabão (1), torneira de enfermaria (1), maçaneta de sala de medicação (1), maçaneta do isolamento 1 (1), torneira de isolamento, maçaneta de isolamento (2), armário de posto de enfermagem(1)); e Clínica médica (maçaneta da enfermaria 22 (2), carrinho de curativo (1), prancheta de posto de enfermagem (1), maçaneta de posto de enfermagem (1), pia de posto de enfermagem (2), bancada de posto de enfermagem (2), teclado (1), mouse (1). As amostras foram armazenadas em frascos estéreis, transportadas ao laboratório e processadas em até 24h.

Quanto ao isolamento de leveduras de *Candida* spp. de animais de produção, utilizados para consumo humano, as coletas foram realizadas no período de janeiro a março e de julho a setembro de 2023, em cinco propriedades, a saber: Aracoíaba – Ce (Sítio Encosta, Arraial e Sítio Arraial Santa Izabel); Iguatu -Ce (Sítio Lula) e região Metropolitana de Fortaleza (Fazenda Diógenes). Para tanto, foram coletadas um total de 107 amostras; dentre essas, amostras (n= 53) de *swabs* retais e orais de suínos (*Sus scrofa domesticus*); amostras (n= 54) cloacais e orais de aves (*Gallus gallus domesticus*); e amostras (n=9) de ambientes: fezes (n=7), solo (n=1) e água de poço (n=1). As coletas foram realizadas após submissão e aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

5.5 Processamento e identificação de amostras

As amostras oriundas de animais foram incubadas em água peptonada (1%) com cloranfenicol (0.05 g/L), durante 4 horas, à 37 °C. Em seguida, alíquotas de cada material foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose, suplementado com cloranfenicol (0,05 g/L). As placas foram incubadas a temperatura ambiente (~28 °C), por até cinco dias. As colônias sugestivas de *Candida* spp. foram reisoladas em meio cromogênico e identificadas por MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight),

na Universidade Federal de Minas Gerais.

5.6 Ensaios de sensibilidade a antifúngicos e a desinfetantes derivados de amônia quaternária

5.6.1 Antifúngicos, cloreto de didecildimetilamônio e cloreto de benzalcônio

Os agentes antifúngicos fluconazol (FLC; Sigma Aldrich, St Louis, EUA), micafungina (Sigma Aldrich, St Louis, EUA) e anfotericina B (AMB; Sigma Aldrich, St Louis, EUA) foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) a concentrações de 6.400 µg/ml (FLC) e 1.600 µg/ml (MCF e AMB); o cloreto de didecildimetilamônio (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e o cloreto de benzalcônio (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) também foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) para obtenção de soluções estoque a uma concentração de 2.000 µg/mL, ambos, conforme recomendado no documento M27-S4 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017). As soluções foram armazenadas a -20 °C até o momento de uso.

5.6.2 Inóculo fúngico

Nessa etapa, foram inclusos 109 isolados e *Candida* spp.: 21 *Candida albicans*, 23 *Candida tropicalis*, 18 *Candida parapsilosis sensu stricto*, 17 *Candida krusei*, 13 *Candida glabrata*, 7 *Candida rugosa*, 4 *Candida orthopsilosis*, 3 *Candida kefyr*, 2 *Candida metapsilosis*, 1 *Candida dubliniensis* e 1 *Candida palmiophila*. Os inóculos fúngicos para os ensaios na forma planctônica foram preparados a partir de culturas de *Candida* spp., previamente semeadas em ágar batata dextrose e incubadas por 24 horas a 35 °C. Os inóculos foram preparados em solução salina estéril (0,9%), e a suspensão obtida foi ajustada até atingir a turbidez equivalente a 0,5 na escala de McFarland, seguida pela diluição nas razões de 1:50 e 1:20 em meio RPMI 1640, para obtenção de um inóculo apresentando concentração final de 0,5 a $2,5 \times 10^3$ células/MI (CLSI, 2017).

5.6.3 Determinação das concentrações inibitórias mínimas dos antifúngicos fluconazol, micafungina e anfotericina B e dos desinfetantes cloreto de didodecildimetilamônio e cloreto de benzalcônio contra *Candida* spp. na forma planctônica

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos antifúngicos fluconazol, micafungina e anfotericina B, e dos desinfetantes cloreto de didecildimetilamônio e do cloreto de benzalcônio contra *Candida* spp. na forma planctônica foram determinadas por microdiluição em caldo, de acordo com o documento M27-A4 do Clinical and Laboratory Standards Institute, com adaptações (CLSI, 2017). Diluições seriadas dos compostos foram preparados em meio RPMI 1640 com L-glutamina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA), tamponadas a pH 7,0 com ácido morfolinopropanossulfônico 0,165 M (MOPS; Sigma Chemical Co., EUA) e adicionadas a placas de 96 poços. Os compostos foram testados em concentrações variando de 0,0625 a 32 µg/ml para cloreto de didodecildimetilamônio e cloreto de benzalcônio. Os inóculos foram preparados conforma descrito na seção anterior. Em seguida, alíquotas (100 µL) dos inóculos finais foram adicionados aos poços contendo as diluições seriadas dos compostos testados. As placas foram incubadas a 35 °C, por 24 h. As CIMs foram definidas como a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento, em comparação com o controle de crescimento, para azólicos e equinocandinas. Para anfotericina B, cloreto de didodecildimetilamônio e cloreto de benzalcônio, as CIMs foram definidas como a menor concentração de droga capaz de inibir 100% do crescimento fúngico. Todos os testes foram realizados em triplicata. As cepas *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foram utilizadas como controle. Além disso, foram incluídos controle de crescimento (inóculo sem antifúngico/sem composto) e controle de esterilidade (meio sem inóculo) em todas as etapas dos experimentos.

5.6.4 Avaliação do efeito dos desinfetantes cloreto de didecildimetilamônio e cloreto de benzalcônio sobre biofilmes em formação de *Candida* spp.

Foi avaliado o efeito dos desinfetantes cloreto de didecildimetilamônio e cloreto de benzalcônio na formação de biofilmes por 67 isolados de *Candida* spp., a saber 16 *Candida albicans*, 21 *Candida tropicalis*, 10 *Candida parapsilosis* sensu stricto, 12 *Candida glabrata* e 8 *Candida krusei*, realizados conforme descrito por Castelo-Branco et. al. (2020). A formação de biofilmes foi induzida em placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato, contendo 100 µL de RPMI por poço, aos quais foram adicionados 100 µL de inóculo fúngico preparado em

meio RPMI, a uma concentração de 2×10^6 células/mL. Para avaliar o efeito dos desinfetantes sobre essa fase, os desinfetantes foram adicionados ao meio de cultura (RPMI), nas concentrações variáveis de 0,0625 a 32 µg/ml no momento em que os inóculos fúngicos foram colocados nos poços. Em seguida, as placas foram incubadas a 35° C por 48 h. Após esse período, o sobrenadante foi removido, as placas foram lavadas duas vezes, com PBS estéril. Em seguida, os biofilmes foram avaliados quanto à atividade metabólica, alíquotas de 100 µL da solução MTT [0,5 mg/mL de MTT](Sigma Chemical Co., EUA)], preparada em PBS e filtrada em membrana de 0,22 µM, foram adicionadas aos poços e as placas foram incubadas no escuro a 37 °C, por 4 h. Posteriormente, a solução de MTT foi transferida para poços de uma nova placa, seguido por leitura em espectrofotômetro a 630 nm, para avaliação da atividade metabólica. A placa contendo os biofilmes aderidos foi, então, corada com cristal violeta para avaliação da biomassa, conforme descrito por Castelo-Branco et. al. (2020). Os ensaios foram realizados em triplicata. Foram incluídos controle de crescimento (inóculo sem antifúngico/sem composto) e controle de esterilidade (meio sem inóculo e compostos) em todas as etapas dos experimentos.

A concentração inibitória mínima dos compostos sobre biofilmes foi determinada como a concentração mínima capaz de reduzir em 90% (CIMS90) da atividade metabólica do biofilme quando comparado à atividade metabólica do controle de crescimento do biofilme da respectiva cepa sem a adição dos compostos, já a biomassa dos biofilmes foi analisada por meio da técnica de coloração com cristal violeta.

5.6.5 Avaliação do efeito dos desinfetantes cloreto de didodecildimetilamônio e cloreto de benzalcônio contra biofilmes maduro de *Candida spp*

Para análise do efeito do cloreto de didodecildimetilamônio e do cloreto de benzalcônio sobre biofilmes maduro de espécies de *Candida* (16 *Candida albicans*, 21 *Candida tropicalis*, 10 *Candida parapsilosis* sensu stricto, 12 *Candida glabrata* e 8 *Candida krusei*) a formação de biofilmes foi induzida em placas de poliestireno de 96 poços de fundo plano, conforme descrito na seção anterior (Castelo-Branco et. al. 2020). As placas foram incubadas a 35 C, por 48 h, para obtenção de biofilmes maduros. Após esse período, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados, duas vezes com PBS estéril, e 200 µl das drogas foram adicionadas em concentrações variando de 0,0625 a 32 µg/ml, e incubadas, novamente, a 35 °C, por 24 h. Posteriormente ao período de incubação, o sobrenadante foi removido, os poços

foram lavados, uma vez com PBS estéril, e foi avaliada a atividade metabólica e a biomassa. (Castelo-Branco et. al. 2020).

2ª PARTE DO ESTUDO

5.7 Sensibilidade de *Candida* spp. a antifúngicos e à deferiprona

5.7.1 Drogas

Os agentes antifúngicos fluconazol (FLC; Sigma Aldrich, St Louis, EUA), anfotericina B (AMB; Sigma Aldrich, St Louis, EUA), e caspofungina (CAS; Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) a concentrações de 6.400 µg/ml (FLC) e 1.600 µg/ml (AMB e CAS), conforme recomendado no documento M27-S4 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017), e armazenados a 20°C até o momento de uso. Deferiprona (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) solubilizada em água destilada a uma concentração de 7.000 µg/ml foi usada como solução de estoque.

5.7.2 Microrganismos

Vinte e cinco cepas do gênero *Candida* (6 *C.albicans*, 6 *C. parapsilosis sensu strictu*, 7 *C. tropicalis* e 6 *C. glabrata*) foram usadas nessa etapa. Adicionalmente, foram incluídas as cepas de referência: *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* ATCC 750 e *C. parapsilosis sensu stricto* ATCC 22019. Os isolados foram recuperados em caldo BHI (Sigma-Aldrich – EUA) e repicados em Chromagar Candida (BD Diagnostic Systems-França) para confirmação da pureza, sendo posteriormente cultivados em ágar batata dextrose (PDA) (Himedia, Índia) para testes subsequentes.

5.7.3 Ensaio de Sensibilidade

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) das drogas FLC, AMB, CAS e deferiprona contra *Candida* spp. na forma planctônica foram determinadas por microdiluição em caldo, de acordo com o documento M27-A4 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017), com adaptações. Diluições seriadas das drogas foram preparadas em meio RPMI

1640 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA), tamponadas a pH 7,0 com ácido morfolinopropanossulfônico 0,165 M (MOPS; Sigma Chemical Co., EUA) e adicionadas em placas de 96 poços. Os medicamentos foram testados em concentrações variando de 1 a 1024 µg/ml (deferiprona), 0,0625 a 64 µg/ml (FLC) e 0,03125 a 16 µg/ml (AMB e CAS).

Os inóculos fúngicos foram preparados em solução salina, a partir de culturas de 24 horas, e ajustados para uma concentração final de 0,5–2,5 10^3 cfu/ml em meio RPMI 1640. Em seguida, alíquotas (100 µL) dos inóculos na concentração final foram adicionadas aos poços contendo as diluições seriadas das drogas testadas. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. Para deferiprona e AMB, CIM foi definido como a menor concentração de droga capaz de inibir 100% do crescimento fúngico, enquanto para FLC e CAS, CIMs foram definidas como a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento fúngico, quando comparado com o controle de crescimento sem droga. Todos os testes foram realizados em triplicata. As cepas *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foram utilizadas como controles de qualidade dos ensaios.

5.8 Elucidação de mecanismo de ação da deferiprona contra *Candida* spp. na forma planctônica

Para avaliar se a inibição induzida por DFP está realmente associada à disponibilidade de ferro, foi investigado o efeito da adição de sulfato de ferro II (FeSO₄) (Fisson, Reino Unido) ao meio de cultura. Para tanto, foi adicionado o referido sal a uma concentração de 10 µM (Nevitt, 2011). Os inóculos das espécies de *Candida* (6 *C. albicans*, 6 *C. parapsilosis strictu sensu*, 7 *C. tropicalis* e 6 *C. glabrata*) foram preparados em solução salina, a partir de culturas com 24 horas de crescimento, e ajustados para uma concentração final de 0,5–2,5 $\times 10^3$ ufc/ml em meio RPMI, sob as mesmas condições descritas para o teste de sensibilidade.

As placas foram dispostas em dois grupos experimentais independentes: o primeiro, contendo inóculo na presença de DFP, sem adição de sulfato de ferro II; e o segundo, composto por inóculo na presença de DFP com suplementação de sulfato de ferro II. Em seguida, as placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. O efeito da suplementação de FeSO₄ sobre as células de *Candida* spp. foi avaliado por meio de espectrofotometria a 630 nm.

5.9 Interação entre deferiprona e antifúngicos contra *Candida* spp. na forma planctônica

Para avaliação da interação entre a deferiprona e os antifúngicos fluconazol (FLC), anfotericina B (AMB) e caspofungina (CAS) contra *Candida* spp. na forma planctônica, foi realizado o ensaio de *checkerboard* usando as concentrações de 1 a 1024 µg/ml para DFP, de 0,0625 a 64 µg/ml para FLC, de 0,015625 a 16 µg/ml para AMB e de 0,015625 a 16 µg/ml para CAS. O antifúngico (FLC, AMB ou CAS) foi adicionado na coluna 1 e diluições seriadas (2 vezes) foram realizadas nas colunas 1–10. Em outra microplaca, a deferiprona foi adicionada aos poços na linha A (colunas 1-11) e subsequentemente diluído 2 vezes das linhas A a G.

Concentrações fixas de deferiprona (16 µg/ml, 8 µg/ml e 4 µg/ml) também foram avaliadas em associação com os antifúngicos. Para isso, a deferiprona foi adicionada em cada poço da microplaca: linha A (16 µg/ml), linha B (8 µg/ml) e linha C (4 µg/ml). Em seguida, as diluições da deferiprona foram transferidas para a microplaca contendo as diluições do medicamento antifúngico.

Os inóculos das leveduras foram preparados em meio RPMI conforme descrito no tópico anterior. Aliquotas de 100 µL foram adicionadas a placas de 96 poços contendo a combinação de deferiprona e um antifúngico. As placas foram incubadas a 35° C por 24 h e os valores de MIC obtidos por leitura visual e espectrofotometria foram usados para determinar o índice de concentração inibitória fracionada (FICI) (Odds, 2003). As interações foram definidas como sinérgicas quando $FICI \leq 0,5$; indiferentes quando $0,5 < FICI \leq 4$ e antagônicas quando $FICI \geq 4$ (Odds, 2003).

5.10 Avaliação do efeito da deferiprona contra biofilmes em formação de *Candida* spp

Os biofilmes foram formados em placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato (Castelo-Branco *et al*, 2020). O inóculo foi previamente preparado em meio RPMI e ajustado para a concentração de 2×10^6 células/ml. Em seguida, alíquotas contendo 100 µl do inóculo foram transferidas para placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato, em seguida 100 µl do fármaco diluído em RPMI foi adicionado em concentrações de MIC, MIC/2 e MIC/4, as placas foram incubadas a 35° C por 48 h. Após o período, o sobrenadante foi removido, os poços foram lavados duas vezes com PBS estéril. Em seguida, a atividade metabólica dos biofilmes foi avaliada por ensaios de redução MTT (Sigma Chemical Corporation, EUA) e a biomassa quantificada por meio da técnica de coloração com cristal violeta (Castelo-Branco *et al*, 2020)

5.11 Avaliação do efeito da deferiprona contra biofilmes maduros de *Candida spp*

O biofilme foi formado seguindo as mesmas condições descritas previamente (Castelo-Branco *et al*, 2020), porém as drogas nas concentrações de 2 a 1024 µg/mL foram adicionadas sobre os biofilmes formados ao longo de 48 horas, quando são considerados maduros. Após a adição da droga, as placas foram incubadas a 35 °C, por 24 h, quando a atividade metabólica e a biomassa foram avaliadas seguindo a mesma metodologia descrita em seções anteriores (Castelo-Branco *et al*, 2020).

5.12 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, San Diego, EUA). Para os dados que apresentaram distribuição simétrica, foi utilizado o teste t de Student. Quando os dados exibiram assimetria, aplicou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon para comparações pareadas e o teste de Mann-Whitney para dados não pareados. Nas comparações entre três ou mais grupos, quando os dados apresentaram simetria e variâncias semelhantes, foi realizada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Tukey para comparações entre pares. Caso os dados apresentassem assimetria ou variâncias desiguais, utilizou-se o teste de Friedman, seguido pelo pós-teste de Dunn. Em todas as análises o nível de significância máximo adotado para conclusões afirmativas foi de 95 % ($P < 0,05$).

6 RESULTADOS

1ª ETAPA DO ESTUDO

6.1 Isolamento e identificação de *Candida* spp

No presente estudo foram obtidas 109 leveduras do gênero *Candida*., dentre essas, obteve-se 59 isolados clínico humano dos sítios anatômicos urina (27), lavado broncoalveolar (7), sangue (12), aspirado traqueal (4), linfonodo (1), líquido ascítico (1), fragmento ósseo (1), escarro (1), esôfago (1), orelha (2) e unha (2); além de 9 isolados de superfícies de ambiente hospitalar, incluindo carrinhos de parada cardiorrespiratória e de emergência (n=1), mesa de Mayo (n=1), carrinho de curativo (1), prancheta (1), pia de posto de enfermagem (1), torneira de enfermaria (1), maçaneta de isolamento 1(1), maçaneta posto de enfermagem (1) e bancada de posto de enfermagem (1) (**Tabela 1**).

Ademais, desse total (n=109), 41 leveduras do gênero *Candida* foram obtidas de animais de produção destinados ao consumo humano, incluindo suínos (*Sus scrofa domesticus*, n=27) e aves (*Gallus gallus domesticus*, n= 14); além de 2 isolados provenientes de ambientes desses animais (fezes e solo) (**Tabela 2**).

Quanto às espécies isoladas foram identificadas: *C. albicans* (n=21), *C. tropicalis* (n=23), *C. parapsilosis sensu stricto* (n=18), *C. krusei* (n=17), *C. glabrata* (n=13), *C. rugosa* (n=7), *C. orthopsilosis* (n=4), *C. kefyr* (n=3), *C. metapsilosis* (n=2), *C. dubliniensis* (n=1), *C. guilliermondii* (n=1) e *C. palmioleophila* (n=1).

C. albicans (n=20) foi predominante em amostras humanas, sendo isolada principalmente de urocultura (urina) (n = 9), lavado broncoalveolar (n=3) e hemocultura (sangue) (n=3), além dos espécimes clínicos: líquido ascítico (n=1), escarro (n=1) e dos sítios anatômicos: esôfago (n=1), fragmento ósseo (n=1) e orelha (n=1). *C. tropicalis* (n=11) foi comumente isolada de amostras humanas de urina (n=4), sangue (n=1), aspirado traqueal (n=3), lavado broncoalveolar (n=1), orelha (n=1) e unha (n=1). Já *C. parapsilosis* (10) foi identificada em amostras de sangue (4), urina (4), unha (1), lavado broncoalveolar (n=1). *C. glabrata* (*Nakaseomyces glabratus*)(12) foi isolada de urinocultura (urina) (n = 10), hemocultura (sangue) (n=1), lavado broncoalveolar (n=1). *C. orthopsilosis* (n=2) foi isolada de sangue (n=2), *C. guilliermondii* (n=1) de hemocultura (sangue) (n=1) enquanto *C. dubliniensis* (n=1) foi detectada em lavado broncoalveolar (n=1).

Em amostras de ambientes hospitalares (n=9), *C. parapsilosis sensu stricto* (n=7) foi prevalente, sendo isolada de carrinhos de parada cardiorrespiratória e de emergência (n=1), mesa de Mayo (n=1), carrinho de curativo (1), prancheta (1), pia de posto de enfermagem (1), torneira de enfermaria (1) e maçaneta de isolamento (1); seguida de *C. orthopsilosis* (n=2) isolada de maçaneta posto de enfermagem (1) e bancada de posto de enfermagem (1).

Já em amostras obtidas de suínos (*Sus scrofa domesticus*), dentre os 27 isolados de *Candida* spp., dos sítios oral (n=19) e reto (n=8), *C. krusei* (n= 14) foi a espécie mais isolada, da cavidade oral (n=10) e reto (n=4), seguida de *C. tropicalis* (n=9) do sítio oral (n=6) e reto (n=3), *C. rugosa* (n=2) oral (n=)2 , *C. albicans* (n =1)(oral (n=1) e *C. glabrata* (n=1) (oral =1).

C. rugosa (n=4) isoladas dos sítios cloacal (2/6) e oral (2/8) e *C. krusei* (n=4) do sítio oral (n=3) e cloacal (n=1) foram as espécies mais prevalentes dentre os isolados de aves (*Gallus gallus domesticus* (n= 14)), seguidos de *C. tropicalis* (n=3) isolada da cavidade cloacal (n=2) e oral (n=1), e *C. kefyr* (n=3) identificada na cavidade oral (n=3).

C. palmioleophila (n=1) e *C. rugosa*, (n=1) foram identificadas dentre os isolados (n=2) de ambientes dos animais do estudo; tendo sido isolada do solo (n=1) e fezes (n=1), respectivamente.

Tabela 1 - Cepas de *Candida* spp., de origem humana e ambiente hospitalar do projeto One health utilizadas nesse estudo.

Espécie	Origem	Sítio anatômico	Cepas (n)	Total		
<i>Candida albicans</i>	Humana	Urina	9	20		
		Líquido ascítico	1			
		Sangue	3			
		Lavado broncoalveolar	3			
		Esôfago	1			
		Fragmento ósseo	1			
		Escarro	1			
Orelha	1					
<i>Candida tropicalis</i>	Humana	Urina	4	11		
		Sangue	1			
		Aspirado traqueal	3			
		Lavado broncoalveolar	1			
		Orelha	1			
Unha	1					
<i>Candida parapsilosis sensu stricto</i>	Humana	Sangue	4	10		
		Urina	4			
		Unha	1			
		Lavado broncoalveolar	1			
<i>Candida glabrata (Nakaseomyces glabratus)</i>	Humana	Urina	10	12		
		Sangue	1			
		Lavado broncoalveolar	1			
<i>Candida orthopsilosis</i>	Humana	Sangue	2	2		
<i>Candida Guillermondii</i>	Humana	Sangue	1	1		
<i>Candida dubliniensis</i>	Humana	Lavado broncoalveolar	1	1		
		Ambiente hospitalar	Carrinho de parada		1	7
			Mesa de mayo		1	
			Carrinho curativo		1	
			Prancheta		1	
			Pia de posto de enfermagem		1	
			Torneira de enfermaria		1	
			Maçaneta de isolamento I		1	
<i>Candida orthopsilosis</i>	Ambiente hospitalar	Maçaneta de posto de enfermagem	1	2		
		Bancada de posto de enfermagem	1			

Tabela 2 - Cepas de *Candida* spp., de origem animal e ambiental do projeto One health utilizadas nesse estudo.

Espécie	Origem	Sítio anatômico	Cepas (n)	Total
<i>Candida albicans</i>	Suíno	Oral	1	1
<i>Candida tropicalis</i>	Suíno	Oral	6	9
		Reto	3	
<i>Candida krusei</i>	Suíno	Oral	10	14
		Reto	4	
<i>Candida glabrata</i> (<i>Nakaseomyces glabratus</i>)	Suíno	Oral	1	1
<i>Candida rugosa</i>	Suíno	Oral	2	2
<i>Candida rugosa</i>	Aves	Oral	2	4
		Cloacal	2	
<i>Candida tropicalis</i>	Aves	Oral	1	3
		Cloacal	2	
<i>Candida krusei</i>	Aves	Oral	3	4
		Cloacal	1	
<i>Candida kefyr</i>	Aves	Oral	3	3
<i>Candida palmiellophila</i>	Ambiental	Solo	1	1
<i>Candida rugosa</i>	Ambiental	Fezes	1	1

6.2 Sensibilidade planctônica

6.2.1 Sensibilidade de *Candida* spp. na forma planctônica aos antifúngicos fluconazol, micafungina e anfotericina B

O FLC apresentou MIC variável, de 0,125 a 64 µg/ml para os isolados de origem humana; 0,5 a 4 µg/ml para os isolados de ambiente hospitalar; 0,125 a 64 µg/ml para isolados de origem animal, e 1 e 32 µg/ml para identificados de ambiente animal. Os MICs para MCF variaram de 0,0625 a 0,5 µg/ml para isolados de origem humana; 0,0625 a 1 µg/ml para isolados de ambiente hospitalar; 0,0625 a 0,1 µg/ml para isolados de origem animal, e 0,03 µg/ml para isolados de ambiente animal. AMB exibiu MICs de 0,031 a 1 µg/ml para isolados de origem humana; 0,125 a 0,5 µg/ml para isolados de ambiente hospitalar; 0,031 a 1 µg/ml para isolados de origem animal, e 0,06 e 0,25 µg/ml para isolados de ambiente animal.

Sendo a moda de 1 µg/ml para FLC; 0,031 µg/ml para MCF e 0,5 µg/ml para AMB. Os resultados dos testes de sensibilidade desse estudo estão dispostos na **Tabela 3 e Tabela 4**.

Quanto aos isolados de origem humana, o FLC apresentou CIM de 0,125 a 64 µg/ml contra *C. albicans* (20), sendo 3/20 isolados resistentes. Quando exposto a *C. tropicalis* (11), o FLC exibiu MIC de 0,5 a 64 µg/ml, com 5/11 isolados resistentes. Entre os isolados de *C. glabrata*, 2/12 foram resistentes ao FLC. Contudo, as espécies *C. parapsilosis sensu stricto* (10); *C. orthopsilosis* (1); *C. guillermondii* (1) e *C. dubliniensis* (1) foram sensíveis ao FLC, que exibiu CIM de 0,125 a 2 µg/ml; 1 µg/ml; 0,25 µg/ml; 1 µg/ml, respectivamente. Da mesma forma, os isolados de ambiente hospitalar, *C. parapsilosis sensu stricto* (7) e *C. orthopsilosis* (2) foram sensíveis ao FLC, que apresentou CIM de 0,5 a 4 µg/ml, e 1 µg/ml. Todos os isolados de origem humana e ambiente hospitalar foram sensíveis à MCF e AMB. (**Tabela 3**).

Entre os isolados de origem suína, o FLC apresentou CIM de 0,5 a 64 µg/mL contra *Candida tropicalis* (n=9), com 4/9 isolados resistentes. Ademais, observou-se resistência para *C. glabrata* em 1/1 isolados e para *C. krusei* em 13/14 isolados. Os demais isolados de origem suína apresentaram sensibilidade à FLC, MCF e AMB (**Tabela 4**).

Nos isolados de origem aviária, verificou-se resistência ao FLC em *C. rugosa* (1/4 isolados); *C. tropicalis* (1/4 isolados) e em todos os isolados de *C. krusei* (3/3). Todos os outros isolados dessa origem mostraram-se sensíveis ao FLC, MCF e AMB (**Tabela 4**). *C. palmiophila* (1), isolada de ambiente animal mostrou-se resistente à FLC e sensível à MCF e

AMB; Já *C. rugosa*, também de origem de ambiente animal, apresentou sensibilidade ao FLC, MCF e AMB (Tabela 4).

Tabela 3 – Concentrações inibitórias mínimas *in vitro* dos antifúngicos fluconazol, micafungina e anfotericina B por espécies de *Candida* de origem humana e ambiente hospitalar na forma planctônica

Origem (n)	Espécies (n)	Concentração Inibitória Mínima (CIM)		
		FLC	MCF	AMB
Humana (59)	<i>Candida albicans</i> (20)	0,125 (2)	0,031 (15)	0,031 (1)
		0,25 (5)	0,0156 (5)	0,125 (4)
		0,5 (5)		0,25 (6)
		1(3)		0,5(9)
		2 (2)		
		64 (3)		
	<i>Candida tropicalis</i> (11)	0,5 (2)	0,0156 (2)	0,125 (1)
		1(2)	0,031 (8)	0,25 (4)
		2 (1)	0,5 (1)	0,5 (5)
		4 (1)		1(1)
		32 (1)		
	<i>Candida parapsilosis sensu stricto</i> (10)	0,125 (1)	0,031 (2)	0,125 (4)
		0,25 (3)	0,0625 (1)	0,25 (2)
		0,5 (3)	0,125 (2)	0,5 (4)
		1(2)	0,25 (2)	
2(1)		0,5 (2)		
		1 (1)		
<i>Candida glabrata (Nakaseomyces glabratus)</i> (12)		0,5 (2)	0,031 (10)	0,125 (3)
		1(4)	0,125 (1)	0,25 (1)
		2 (3)	0,25 (1)	0,5 (6)
		4 (1)		1 (2)
	32 (1)			
<i>Candida orthopsilosis</i> (2)	1 (2)	0,125 (2)	0,125 (2)	
Ambiente hospitalar (9)	<i>Candida parapsilosis sensu stricto</i> (7)	0,25 (1)	0,5 (1)	0,5 (1)
		1 (1)	0,031 (1)	0,125 (1)
		0,5 (4)	0,25 (1)	0,125 (2)
		1 (1)	0,5 (4)	0,25 (3)
	<i>Candida orthopsilosis</i> (2)	2 (1)	1 (2)	0,5 (2)
4 (1)				
	1 (2)	0,031 (1)	0,125 (2)	
		0,0625 (1)		

FLC: Fluconazol. MCF: Micafungina. AMB: Anfotericina B

Tabela 4 – Concentrações inibitórias mínimas *in vitro* dos antifúngicos fluconazol, micafungina e anfotericina B por espécies de *Candida* de origem animal e ambiente animal na forma planctônica

Origem (n)	Espécies (n)	Concentração Inibitória Mínima (CIM)		
		FLC	MCF	AMB
Suíno (27)	<i>Candida albicans</i> (1)	0,5 (1)	0,031 (1)	0,25 (1)
	<i>Candida tropicalis</i> (9)	0,5 (1)	0,031 (9)	0,0625(2)
		0,25 (1)		0,125 (3)
		1 (2)		0,25 (2)
		4 (1)		0,5 (2)
		8 (1)		
		32 (1)		
	<i>Candida krusei</i> (14)	64 (2)		
		2 (1)	0,015 (2)	0,125 (4)
		8 (2)	0,031 (7)	0,25 (1)
16 (2)		0,0625 (5)	0,5 (6)	
32 (7)			1 (3)	
	64 (2)			
	<i>Candida glabrata</i> (<i>Nakaseomyces glabratus</i>) (1)	64 (1)	0,031 (1)	0,5(1)
	<i>Candida rugosa</i> (2)	2 (1)	0,031 (1)	0,5 (2)
		4 (1)	0,0625 (1)	
Ave (14)	<i>Candida rugosa</i> (4)	1 (2)	0,031 (3)	0,5 (2)
		2 (1)	0,120 (1)	0,25 (1)
		8 (1)		1 (1)
	<i>Candida tropicalis</i> (3)	0,5 (1)	0,031 (3)	0,25 (3)
		1 (1)		
		32 (1)		
	<i>Candida krusei</i> (4)	8 (1)	0,015 (2)	0,25 (1)
		16 (2)	0,031 (2)	0,5 (3)
		32 (1)		
	<i>Candida kefyr</i> (3)	0,125 (3)	0,031 (3)	0,25 (1) 0,5 (2)
Ambiental (2)	<i>Candida palmiophila</i>	32 (1)	0,031 (1)	0,25 (1)
	<i>Candida rugosa</i>	1 (1)	0,031 (1)	0,0625 (1)

FLC: Fluconazol. MCF: Micafungina. AMB: Anfotericina B

6.2.2 Sensibilidade de *Candida* spp. na forma planctônica aos desinfetantes cloreto de didecil dimetil amônio e cloreto de benzalcônio

Os valores de CIM determinados para DDAC contra 109 cepas de *Candida* spp., estão demonstrados na **Tabela 5 e Tabela 6**. O DDAC apresentou concentrações inibitórias mínimas de 50% (CIM50) e concentrações inibitórias mínimas de 90% (CIM90) variando de 0,0625 a 1 µg/mL para os isolados de origem humana (n=43) (**Tabela 5**); e CIM50 e CIM90 de 0,125 a 0,5 µg/mL contra isolados de ambiente hospitalar (n=9) (**Tabela 5**). Para os isolados de origem animal (n=43), observou-se CIM50 e CIM90 de 0,0625 a 0,5 µg/mL (**Tabela 6**). Entre os isolados do ambiente animal (n=2) as CIM50 e CIM90 foram de 0,0625 e 0,5 µg/mL (**Tabela 6**). Sendo a moda de 0,5 µg/ml para CIM50 e CIM90 em isolados de origem humana; 0,125 µg/ml para CIM50 e CIM90 em isolados de ambiente hospitalar; e 0,125 µg/ml (CIM50 e CIM90) para os identificados de origem animal. Não foi observado moda para isolados de ambiente animal.

AS CIMs do cloreto de benzalcônio contra 113 isolados de *Candida* spp. estão apresentadas na **Tabela 5 e Tabela 6**. As CIM50 variaram de 0,0625 a 2 µg/mL, já as CIM90 foram de 0,0625 a 4 µg/mL para os isolados de origem humana (n=43) (**Tabela 5**); e CIM50 de 0,5 a 2 µg/mL e CIM90 1 a 4 µg/mL contra isolados de ambiente hospitalar (n=9) (**Tabela 5**). Para os isolados de origem animal (n=43), observou-se CIM50 de 0,0625 a 1 µg/mL e CIM90 de 0,0625 a 4 µg/mL (**Tabela 6**). Quanto aos isolados do ambiente animal (n=2) as CIM50 foram 0,125 e 0,25 µg/mL e a CIM90 foi 0,25 e 0,5 µg/mL (**Tabela 6**). Sendo a moda de 0,5 µg/ml para CIM50 e 1 µg/ml para CIM90 em isolados de origem humana; 2 µg/ml para CIM50 e 4 µg/ml para CIM90 em isolados de ambiente hospitalar; 0,25 µg/ml (CIM50), e 0,5 e 1 µg/ml (CIM90) para os identificados de origem animal. Isolados de ambiente animal não apresentaram moda.

O DDAC apresentou valores de CIM (CIM50 e CIM90) inferiores aos observados para o BZ nos isolados de origem humana. Para o BZ, as CIM50/CIM90 foram de 2 e 4 µg/mL com CIM50 de 2 µg/mL em 8/20 isolados de *C. albicans*; 1/10 isolados de *Candida parapsilosis sensu stricto* e 3/12 *Candida glabrata* (*Nakaseomyces glabratus*); e CIM90 de 2 e 4 µg/mL em 13/20 isolados de *C. albicans*; 2 µg/mL em 1/11 isolados de *C. tropicalis*; 2 e 4 µg/mL em 5/10 *Candida parapsilosis sensu stricto* e 2 µg/mL em 1/2 isolados de *C. orthopsilosis* (**Tabela 7**).

Nos isolados provenientes do ambiente hospitalar, BZ também apresentou aumento nos valores de CIMs (CIM50/CIM90) comparado às CIMs (CIM50/CIM90) de DDAC. Para

Candida parapsilosis sensu stricto, DDAC apresentou CIMs (CIM50/CIM90) de 0,125 a 0,5 µg/mL, já o BZ apresentou CIMs mais elevadas, com CIM50 de 0,5 a 2 µg/mL e CIM90 de 1 a 4 µg/mL. Contra *C. orthopsilosis* DDAC apresentou CIMs (CIM50/CIM90) de 0,125 µg/mL e BZ exibiu aumento das CIMs, CIM50 de 0,5 µg/mL e CIM90 de 1 µg/mL (**Tabela 7**).

O DDAC exibiu valores de CIM50 e CIM90 baixos entre as diferentes espécies isoladas de origem suína. Para *C. albicans*, ambos os valores foram de 0,125 e 0,5 µg/mL, respectivamente. Em *C. tropicalis*, observaram-se CIM50/CIM90 de 0,125 a 0,5 µg/mL. A espécie predominante dessa origem, *C. krusei*, apresentou CIM50 de 0,0625 a 0,25 µg/mL e CIM90 variando entre 0,0625 e 0,5 µg/mL, demonstrando CIMs igualmente baixas. Em *C. glabrata* (*Nakaseomyces glabratus*) e *C. rugosa* o DDAC demonstrou CIM50/ CIM90 de 0,125 µg/mL (**Tabela 8**).

Em contraste, o BZ apresentou valores de CIMs superiores aos observados para o DDAC, para todas as espécies de origem suína. Para *C. albicans*, as CIM50/CIM90 foram de 1 e 2 µg/mL, respectivamente. Em *C. tropicalis*, observaram-se CIMs de 0,0625 a 1 µg/mL para CIM50 e de 0,125 a 2 µg/mL para CIM90. Já em *C. krusei*, BZ apresentou CIM50 de 0,0625 a 1 µg/mL e CIM90 de 0,125 a 1 µg/mL. Em *C. glabrata*, a CIM50 foi de 1 µg/mL e a CIM90 foi 4 µg/mL; enquanto *C. rugosa* exibiu CIM50 de 0,5 µg/mL, e CIM90 0,5 a 1 µg/mL (**Tabela 8**).

Nos isolados provenientes de aves, o DDAC manteve valores de CIM50 e CIM90 baixos entre as espécies analisadas. Em *C. rugosa* a CIM50 foi de 0,0625 a 1 µg/mL, enquanto a CIM90 foi de 0,0625 a 0,25 µg/mL. Para *Candida tropicalis*, as CIM50/CIM90 variaram de 0,0625 a 0,5 µg/mL. Em *C. krusei*, observaram-se CIM50 entre 0,0625 e 0,125 µg/mL e CIM90 variando de 0,0625 a 0,5 µg/mL. De forma semelhante, *C. kefyr* apresentou CIM50/CIM90 de 0,0625 a 0,125 µg/mL. O BZ, entretanto, demonstrou CIM50/CIM90 elevadas, comparada às CIMs de DDAC, para *C. krusei*, exibindo valores de 0,5 µg/mL e 1 µg/mL, respectivamente. Enquanto para as outras espécies, os valores mantiveram-se baixos. Em *C. rugosa* a CIM50 /CIM90 foi de 0,0625 a 0,125 µg/mL. Para *C. tropicalis*, as CIM50 foram de 0,25 e 0,5 µg/mL, e 0,5 µg/mL para CIM90. Já em *C. kefyr*, as CIM50 variaram de 0,0625 a 0,125 µg/mL; e 0,125 a 0,5 µg/mL para CIM90 (**Tabela 8**). Para a espécie *C. palmiophila* e *C. rugosa* isoladas de ambiente animal, o DDAC exibiu valores de CIM50 e CIM90 de 0,5 µg/mL e 0,0625 µg/mL, respectivamente. Já o BZ, demonstrou aumento, com CIM50 e CIM90 de 0,125 µg/mL e 0,25 µg/mL, sucinto, contra essa cepa de *C. rugosa*. (**Tabela 8**).

Tabela 5 – Concentrações inibitórias mínimas *in vitro* de compostos quaternários de amônio contra *candida* spp. de origem humana e ambiente hospitalar na forma planctônica

Origem da cepa (n)	Concentração inibitória mínima (µg/mL)			
	DDAC		BZ	
	CIM50	CIM90	CIM50	CIM90
Humana (59)	0,0625 (7)	0,0625 (4)	0,0625 (2)	0,0625 (2)
	0,125 (7)	0,125 (6)	0,125 (4)	0,125(3)
	0,25 (21)	0,25 (6)	0,25 (1)	0,25 (3)
	0,5 (22)	0,5 (32)	0,5 (22)	0,5 (4)
	1 (2)	1(10)	1 (18) 2 (12)	1(21) 2 (16) 4 (10)
Ambiente hospitalar (9)	0,125 (6)	0,125 (4)	0,5 (3)	1 (3)
	0,25 (1)	0,25 (2)	1 (2)	2 (1)
	0,5 (2)	0,5 (3)	2 (5)	4 (5)

DDAC: Cloreto de didecil dimetil amônio. BZ: Cloreto de Benzalcônio. CIM50: Concentração Inibitória Mínima de 50%. CIM90: Concentração Inibitória Mínima de 90%.

Tabela 6 – Concentrações inibitórias mínimas *in vitro* de compostos quaternários de amônio contra *candida* spp. de origem animal e ambiente animal na forma planctônica

Origem da cepa (n)	Concentração inibitória mínima (µg/mL)			
	DDAC		BZ	
	CIM50	CIM90	CIM50	CIM90
Animal (43)	0,125 (17)	0,0625 (5)	0,0625 (8)	0,062 (1)
	0,25 (12)	0,125 (16)	0,125 (7)	0,125 (9)
	0,5 (4)	0,25 (14)	0,25 (10)	0,25 (2)
	0,0625 (10)	0,5 (8)	0,5(9) 1(9)	0,5 (15) 1 (15) 4 (1)
Ambiente animal (2)	0,0625 (1)	0,0625 (1)	0,125 (1)	0,25 (1)
	0,5 (1)	0,5 (1)	0,25 (1)	0,5 (1)

DDAC: Cloreto de didecil dimetil amônio. BZ: Cloreto de Benzalcônio. CIM50: Concentração Inibitória Mínima de 50%. CIM90: Concentração Inibitória Mínima de 90%.

Tabela 7. Concentrações inibitórias mínimas, *in vitro*, de compostos quaternários de amônio por espécies, contra *Candida* spp. de origem humana e ambiente hospitalar na forma planctônica

Origem (n)	Espécies (n)	Concentração Inibitória Mínima (CIM)				
		DDAC		BZ		
		CIM50	CIM90	CIM50	CIM90	
Humana (59)	<i>Candida albicans</i> (20)	0,0625 (2)	0,0625 (2)	0,5 (6)	0,5 (1)	
		0,125 (2)	0,25 (2)	1(6)	1(6)	
		0,25 (8)	0,5 (13)	2 (8)	2(8)	
		0,5 (7)	1(2)		4 (5)	
		1(1)	1(1)			
	<i>Candida tropicalis</i> (11)	0,0625 (2)	0,125 (2)	0,125 (3)	0,125 (3)	
		0,25 (2)	0,5 (5)	0,25 (1)	0,25 (1)	
		0,5 (6)	1 (4)	0,5 (5)	0,5 (2)	
		1 (1)		1 (2)	1 (4)	
					2(1)	
	Humana (59)	<i>Candida parapsilosis sensu stricto</i> (10)	0,0625 (1)	0,0625 (1)	0,0625 (1)	0,0625 (1)
			0,125 (1)	0,25 (2)	0,5 (4)	0,2 (1)
0,25 (6)			0,5 (6)	1 (4)	1 (3)	
0,5 (1)			1 (1)	2(1)	2 (4)	
1 (1)					4 (1)	
<i>Candida glabrata</i> (<i>Nakaseomyces glabratus</i>) (12)		0,0625 (2)	0,0625 (1)	0,0625 (1)	0,0625 (1)	
		0,125 (1)	0,125 (1)	0,125 (1)	0,25 (1)	
		0,25 (5)	0,25 (1)	0,5 (4)	1 (5)	
		0,5 (4)	0,5 (8)	1 (3)	2 (2)	
			1 (1)	2 (3)	4 (3)	
<i>Candida orthopsilosis</i> (2)		0,125 (2)	0,125 (1)	0,5 (1)	1 (1)	
			0,25 (1)	1 (1)	2 (1)	
<i>Candida guilliermondii</i> (1)	0,5 (1)	0,5 (1)	0,5 (1)	1 (1)		
<i>Candida Dubliniensis</i> (1)	0,5 (1)	0,5 (1)	1 (1)	1 (1)		
Ambiente Hospitalar (9)	<i>Candida parapsilosis sensu stricto</i> (7)	0,125 (4)	0,125 (2)	0,5 (1)	1 (1)	
		0,25 (1)	0,25 (2)	1 (1)	2 (1)	
		0,5 (2)	0,5 (3)	2 (5)	4 (5)	
	<i>Candida orthopsilosis</i> (2)	0,125 (2)	0,125 (2)	0,5 (2)	1 (2)	

DDAC: Cloreto de didecil dimetil amônio. BZ: Cloreto de Benzalcônio. CIM50: Concentração Inibitória Mínima de 50%. CIM90: Concentração Inibitória Mínima de 90%.

Tabela 8. Concentrações inibitórias mínimas, *in vitro* de compostos quaternários de amônio por espécies, contra *Candida* spp. de origem animal e ambiente animal na forma planctônica

Origem (n)	Espécies (n)	Concentração Inibitória Mínima (CIM)			
		DDAC		BZ	
		CIM50	CIM90	CIM50	CIM90
Suíno (27)	<i>Candida albicans</i> (1)	0,125 (1)	0,5 (1)	1 (1)	2 (1)
	<i>Candida tropicalis</i> (9)	0,125 (2)	0,125 (1)	0,065 (1)	0,125 (2)
		0,25 (4)	0,25 (5)	0,125 (2)	0,25 (1)
		0,5 (3)	0,5 (3)	0,25 (3)	0,5 (3)
	<i>Candida krusei</i> (14)	1 (3)	1 (3)		
		0,0625 (4)	0,0625 (1)	0,0625 (3)	0,125 (2)
		0,125 (5)	0,125 (7)	0,25 (4)	0,5 (5)
	<i>Candida glabrata</i> (<i>Nakaseomyces glabratus</i>) (1)	0,25 (5)	0,25 (5)	0,5 (3)	1 (7)
			0,5 (1)	1 (4)	
		<i>Candida rugosa</i> (2)	0,125 (1)	0,125 (1)	1(1)
Ave (14)	<i>Candida rugosa</i> (4)	0,125 (2)	0,125 (2)	0,5 (1)	0,5 (1)
					1 (1)
	<i>Candida tropicalis</i> (3)	0,125 (3)	0,0625 (1)	0,0625 (2)	0,0625 (1)
		0,0625 (1)	0,125 (2)	0,125 (2)	0,125 (3)
		0,25 (1)	0,25 (1)		
	<i>Candida krusei</i> (4)	0,25 (1)	0,0625 (1)	0,25 (2)	0,5 (3)
		0,5 (1)	0,25 (1)	0,5 (1)	
			0,5 (1)		
	<i>Candida kefyr</i> (3)	0,0625 (2)	0,0625 (1)	0,5 (4)	1 (4)
		0,125 (2)	0,125 (1)		
Ambiental (2)	<i>Candida palmiophilophila</i> (1)	0,0625 (2)	0,0625 (2)	0,0625 (2)	0,125 (1)
		0,125 (1)	0,125 (1)	0,125 (1)	0,25 (1)
	<i>Candida rugosa</i> (1)				0,5 (1)
		0,5 (1)	0,5 (1)	0,25 (1)	0,5 (1)
		0,0625 (1)	0,0625 (1)	0,125 (1)	0,25 (1)

DDAC: Cloreto de didecil dimetil amônio. BZ: Cloreto de Benzalcônio. CIM50: Concentração Inibitória Mínima de 50%. CIM90: Concentração Inibitória Mínima de 90%.

6.3 Análise do biofilme após exposição à cloreto de didecil dimetil amônio e cloreto de benzalcônio

6.3.1 Efeito dos desinfetantes cloreto de didecil dimetil amônio e cloreto de benzalcônio sobre biofilmes de *Candida* spp. em formação

Os biofilmes expostos ao cloreto de didecildimetilamônio (0,0625 a 32 µg/mL), apresentaram redução na atividade metabólica para cepas de *C. albicans* (4 a 32 µg/ml, P=0.0187), *C. tropicalis* (2 a 32 µg/mL, P=0.0156), *C. parapsilosis* (0,125 a 32 µg/mL, P=0.0188), *C. glabrata* (2 a 32 µg/mL, P=0.0176) e *C. krusei* (0,5 a 32 µg/mL, P=0.0179) quando comparadas aos controles, livre do composto de amônio quaternário (**Gráfico 2**). Observou-se também uma redução da biomassa para cepas de *C. albicans* (0,5 a 32 µg/mL, P=0.0154), *C. tropicalis* (2 a 32 µg/mL, P=0.0166), *C. parapsilosis* (0,5 a 2 µg/mL, P=0.0167) *C. glabrata* (2 a 32 µg/mL, P=0.0155) e *C. krusei* (16 a 32 µg/mL, P=0.0189), quando comparadas ao controle não exposto ao desinfetantes (**Gráfico 2**).

Os biofilmes analisados pela técnica de ensaio de redução MTT, após exposição ao cloreto de benzalcônio (0,0625 a 32 µg/mL) demonstraram redução significativa na atividade metabólica para cepas de *C. albicans* (2 a 32 µg/mL, P=0.01 P=0.0177), *C. tropicalis* (1 a 32 µg/mL, P=0.0156), *C. parapsilosis* (0,5 a 32 µg/mL, P=0.0186), *C. glabrata* (2 a 32 µg/mL, P=0.0169) e *C. krusei* (0,5 a 32 µg/mL, P=0.0176) quando comparadas aos controles, sem o composto (**Gráfico 1**). No tocante à biomassa, observou-se diminuição significativa para *C. albicans* (8 a 32 µg/mL, P=0.0167), *C. tropicalis* (1 a 32 µg/mL P=0.0187), *C. parapsilosis* (8 a 16 µg/mL, P=0.0179), *C. glabrata* (2 a 32 µg/mL, P=0.0157) e *C. krusei* (32 µg/mL, P=0.0155) quando comparadas aos controles de crescimento (**Gráfico 1**).

Gráfico 1 - Atividade metabólica e biomassa de biofilmes em formação de *Candida* spp. expostos a concentrações (0,0625 a 32 $\mu\text{g/mL}$) de cloreto de benzalcônio. A atividade metabólica das células no biofilme foi obtida por ensaio da redução do MTT e a quantificação da biomassa por coloração com cristal violeta. Barras pretas (controle) correspondem ao biofilme não exposto ao cloreto de benzalcônio.

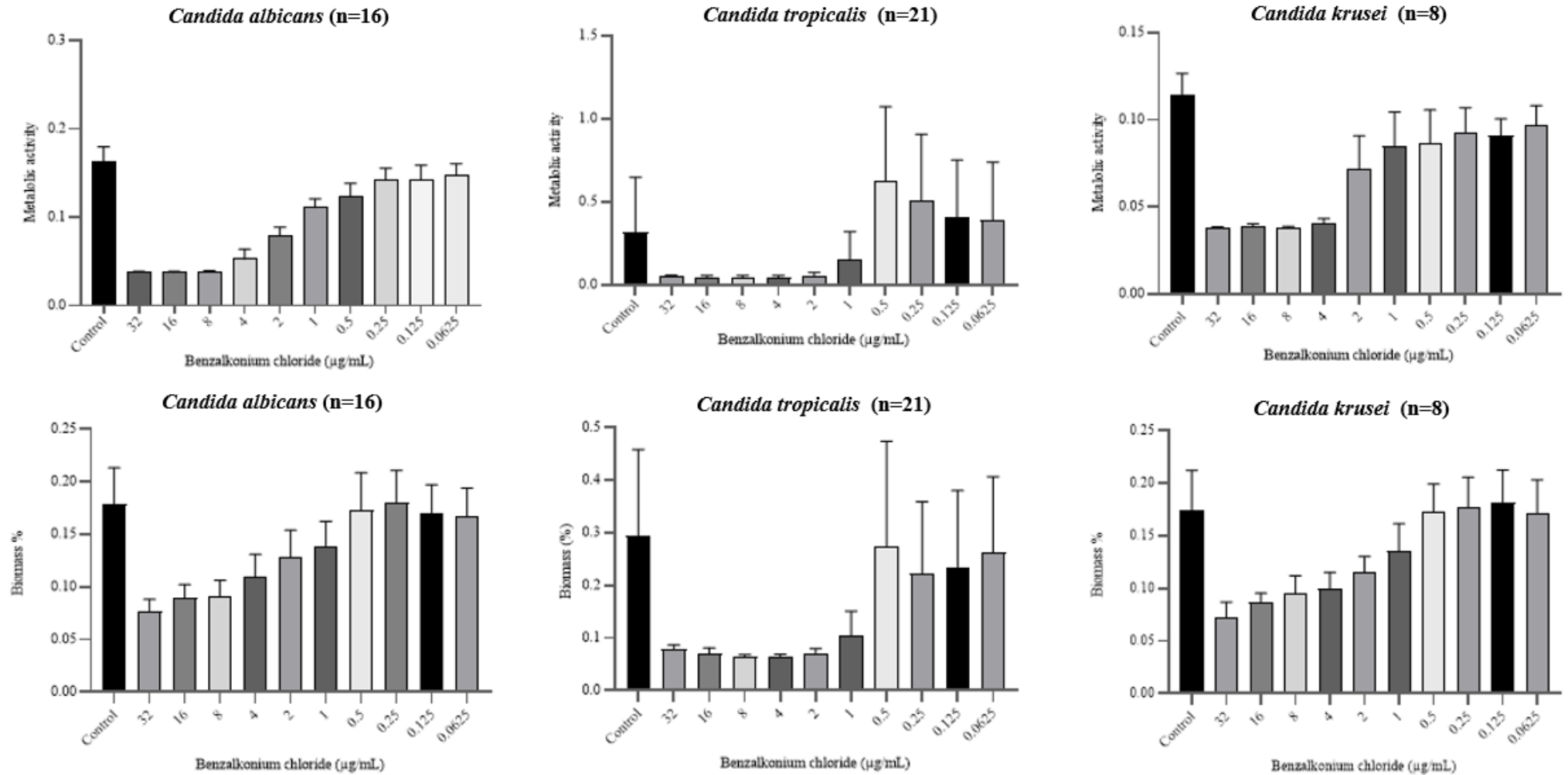


Gráfico 1 - Atividade metabólica e biomassa de biofilmes em formação de *Candida* spp. expostos durante adesão a concentrações (0,0625 a 32 $\mu\text{g/mL}$) de Cloreto de Benzalcônio. A atividade metabólica das células no biofilme foi obtida por ensaio da redução do MTT e a quantificação da biomassa por coloração com cristal violeta. Barras pretas (controle) correspondem ao biofilme não tratado com Cloreto de Benzalcônio.

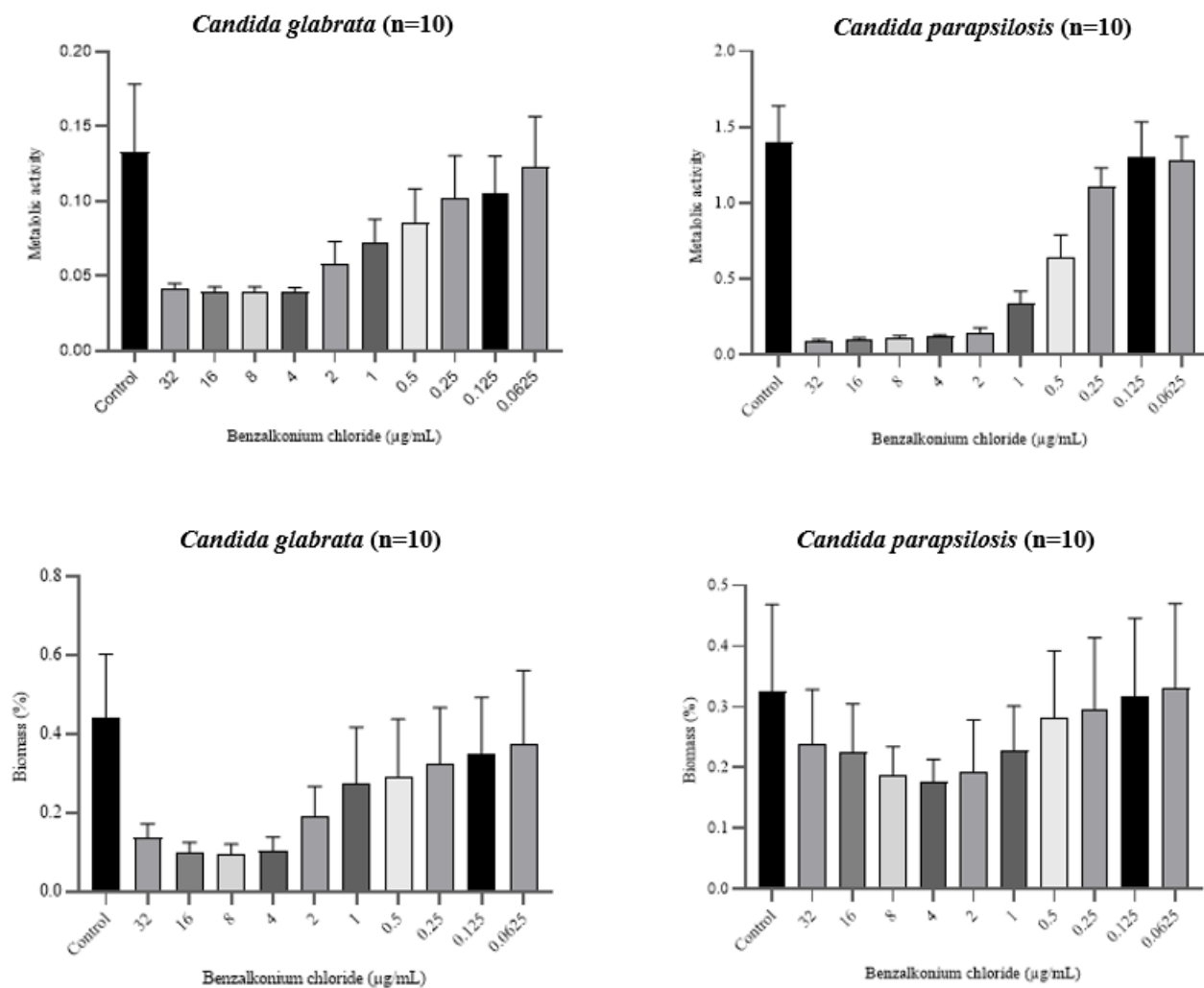


Gráfico 2 - Atividade metabólica e biomassa de biofilmes em formação de *Candida* spp. expostos a concentrações (0,0625 a 32 $\mu\text{g/mL}$) de cloreto de didecil dimetil amônio. A atividade metabólica das células no biofilme foi obtida por ensaio da redução do MTT e a quantificação da biomassa por coloração com cristal violeta. Barras pretas (controle) correspondem ao biofilme não tratado com Cloreto de Benzalcônio.

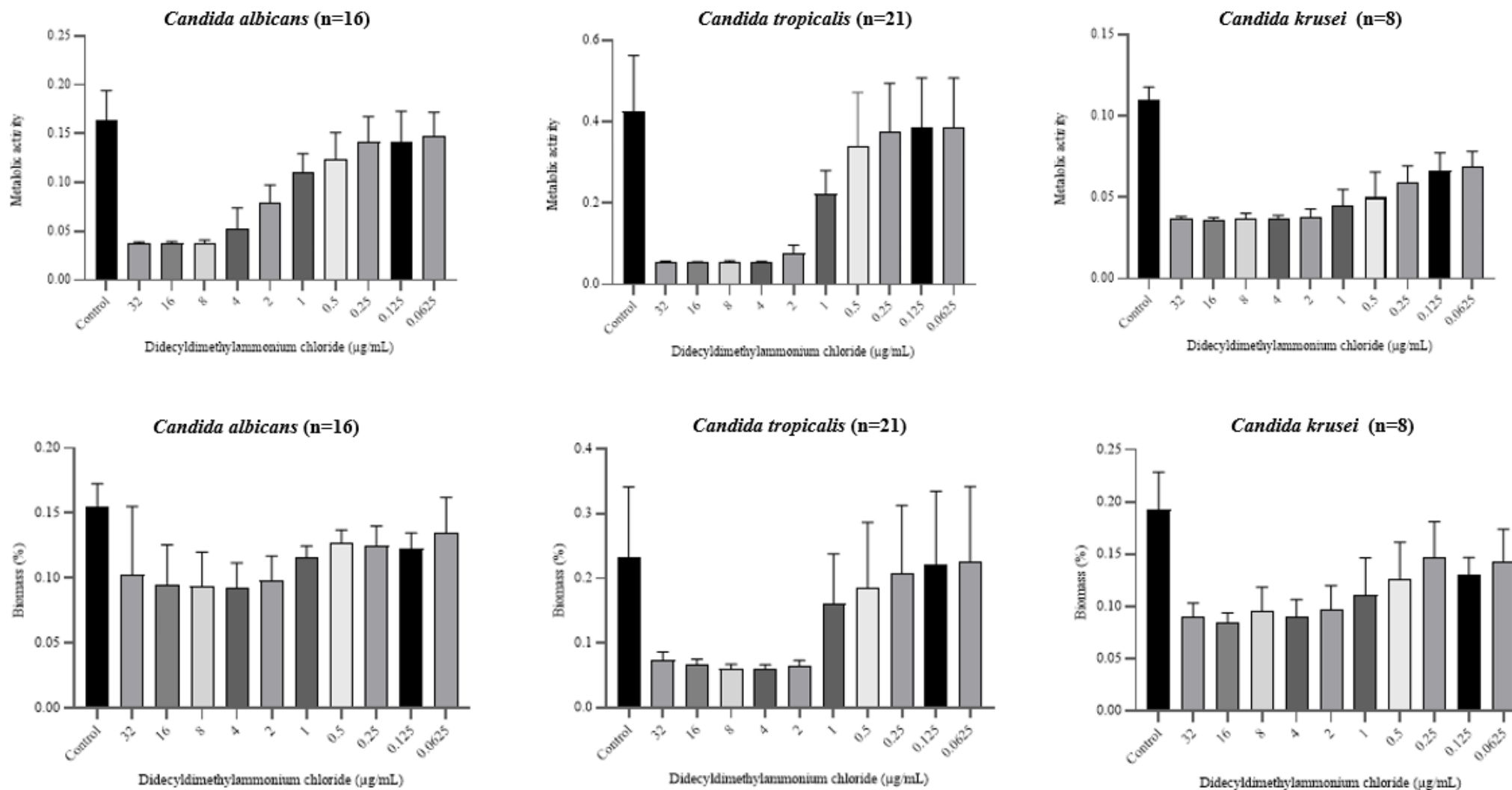
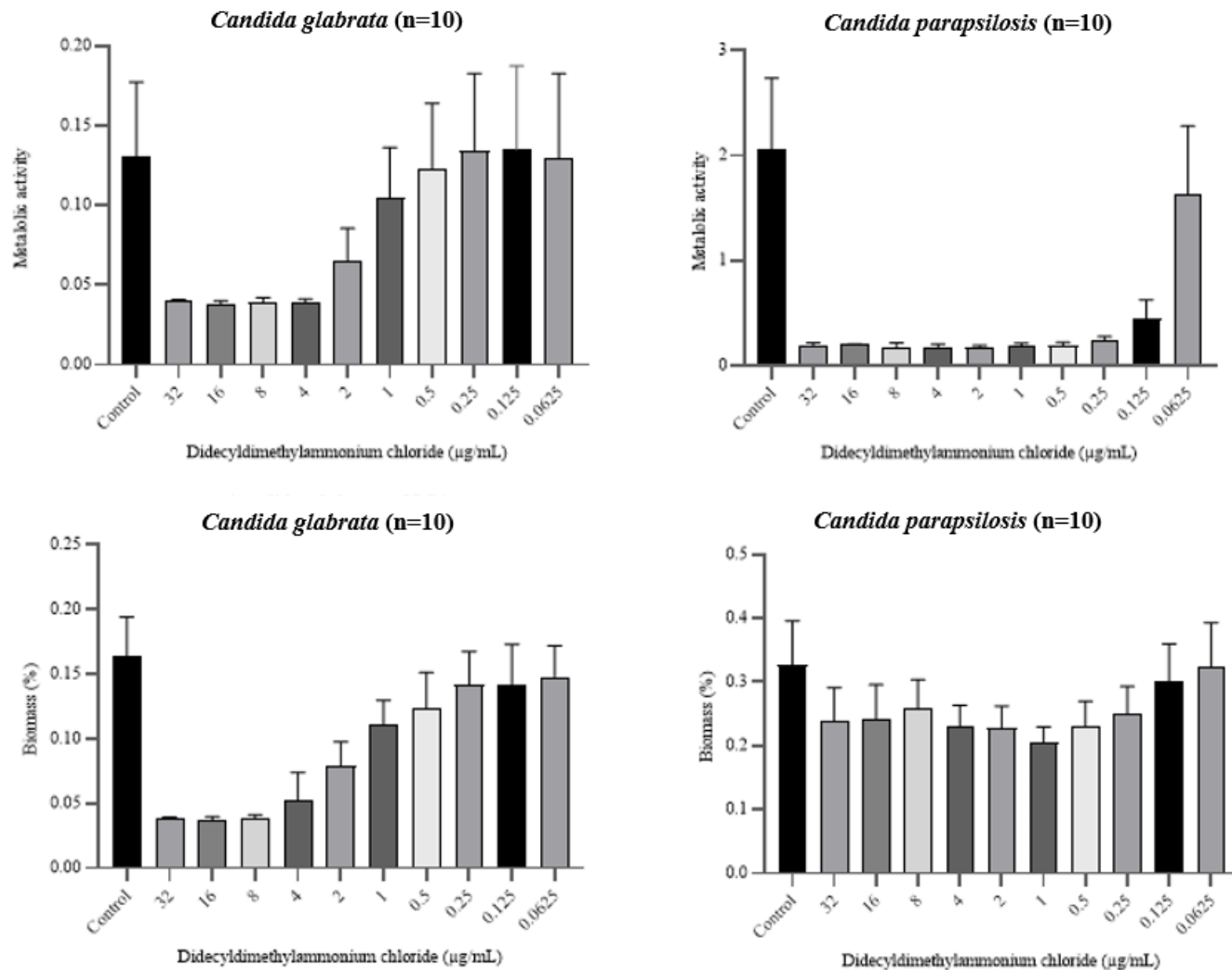


Gráfico 2 -Atividade metabólica e biomassa de biofilmes em formação de *Candida* spp. expostos durante a adesão a concentrações (0,0625 a 32 $\mu\text{g/mL}$) de Cloreto de Didecil Dimetil Amônio. A atividade metabólica das células no biofilme foi obtida por ensaio da redução do MTT e a quantificação da biomassa por coloração com cristal violeta. Barras pretas (controle) correspondem ao biofilme não tratado com Cloreto de Benzalcônio. (*) Representa diferença estatística significativa em relação ao grupo controle.



6.3.2 Efeito dos desinfetantes cloreto de didecil dimetil amônio e cloreto de benzalcônio sobre biofilmes de *Candida spp. maduro*

Os biofilmes maduros, analisados pela técnica de ensaio de redução MTT, após exposição ao cloreto de didodecildimetilamônio (0,0625 a 32 µg/mL) apresentaram redução na atividade metabólica para cepas de *C. albicans* (2 a 32 µg/mL), *C. tropicalis* (16 a 32 µg/mL), *C. parapsilosis* (0,125 a 32 µg/mL) e *C. krusei* (1 a 32 µg/mL) e *C. glabrata* (2 a 32 µg/mL) quando comparadas aos controles, livre de drogas (**Gráfico 4**). Ademais, observou-se redução da biomassa para cepas de *C. albicans* (8 a 32 µg/mL), *C. tropicalis* (32 µg/mL), *C. parapsilosis* (0,5 a 2 µg/mL), *C. krusei* (4 a 32 µg/mL) e *C. glabrata* (2 a 32 µg/mL) quando comparadas aos grupos não tratados (**Gráfico 4**).

Os biofilmes maduros após exposição ao cloreto de benzalcônio (0,0625 a 32 µg/mL), demonstraram redução significativa na viabilidade celular para cepas de *C. albicans* (0,25 a 32 µg/mL), *C. tropicalis* (8 a 32 µg/mL), *C. parapsilosis* (0,25 a 32 µg/mL), *C. krusei* (0,125 a 32 µg/mL) e *C. glabrata* (2 a 32 µg/mL) quando comparadas aos controles não expostos (**Gráfico 3**). adicionalmente, observou-se redução significativa da biomassa para cepas de *C. albicans* (0,25 a 32 µg/mL), *C. tropicalis* (16 a 32 µg/mL), *C. krusei* 0,0625 a 32 µg/mL) e *C. glabrata* (8 a 32 µg/mL) quando comparadas aos controles de crescimento. (**Gráfico 3**).

Gráfico 3 - Atividade metabólica e biomassa de biofilmes maduro de *Candida* spp. expostos a diferentes concentrações (0,0625 a 32 µg/mL) de Cloreto de Benzalcônio. A atividade metabólica das células no biofilme foi obtida por ensaio da redução do MTT e a quantificação da biomassa por coloração com cristal violeta. Barras pretas (controle) correspondem ao biofilme não tratado com Cloreto de Benzalcônio .

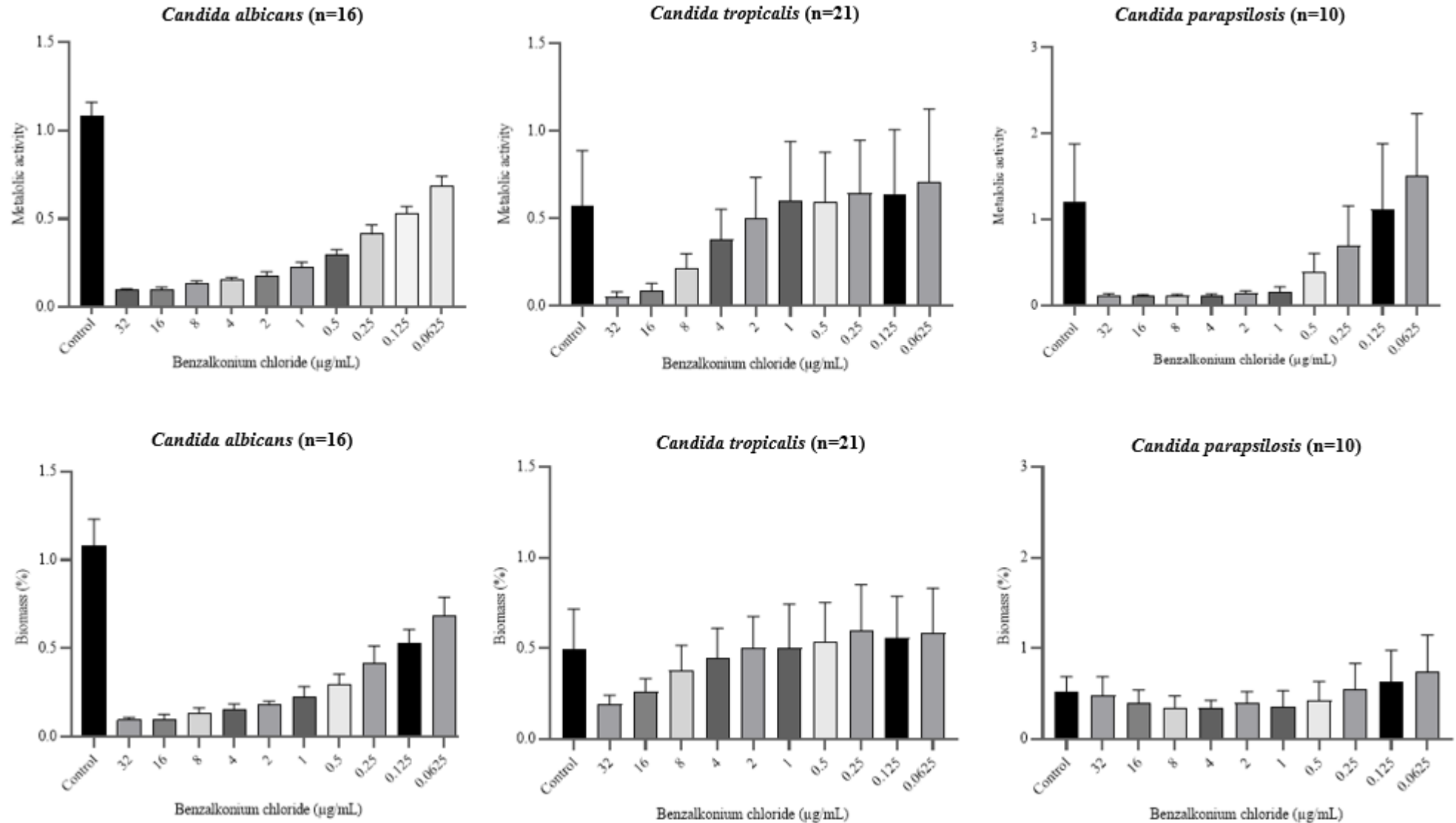


Gráfico 3 - Atividade metabólica e biomassa de biofilmes maduro de *Candida* spp. expostos a diferentes concentrações (0,0625 a 32 $\mu\text{g/mL}$) de Cloreto de Benzalcônio. A atividade metabólica das células no biofilme foi obtida por ensaio da redução do MTT e a quantificação da biomassa por coloração com cristal violeta. Barras pretas (controle) correspondem ao biofilme não tratado com Cloreto de Benzalcônio.

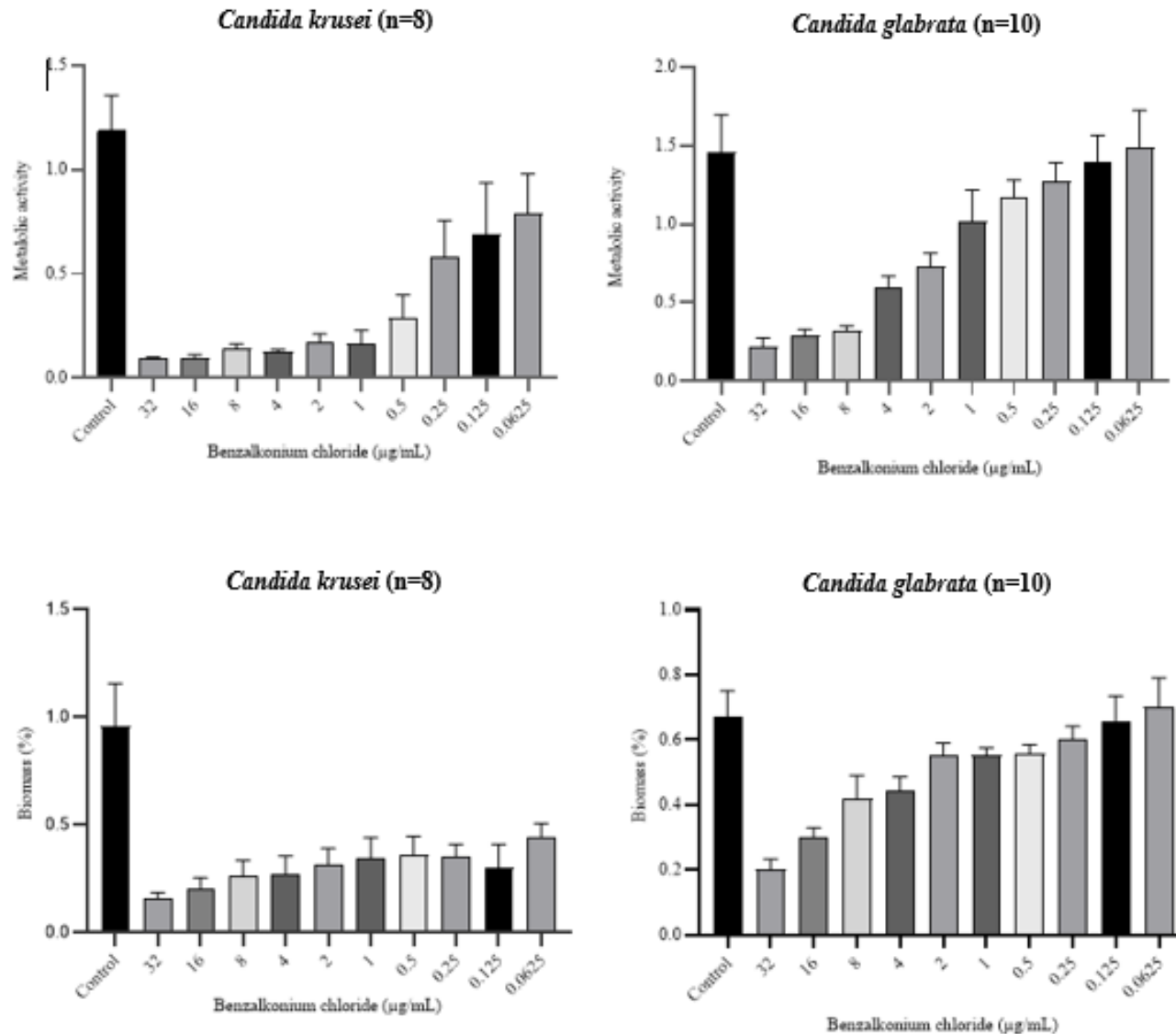


Gráfico 4 - Atividade metabólica e biomassa de biofilmes maduro de *Candida* spp. expostos a diferentes concentrações (0,0625 a 32 $\mu\text{g/mL}$) de Cloreto de Didecil Dimetil Amônio. A atividade metabólica das células no biofilme foi obtida por ensaio da redução do MTT e a quantificação da biomassa por coloração com cristal violeta. Barras pretas (controle) correspondem ao biofilme não tratado com Cloreto de Didecil Dimetil Amônio.

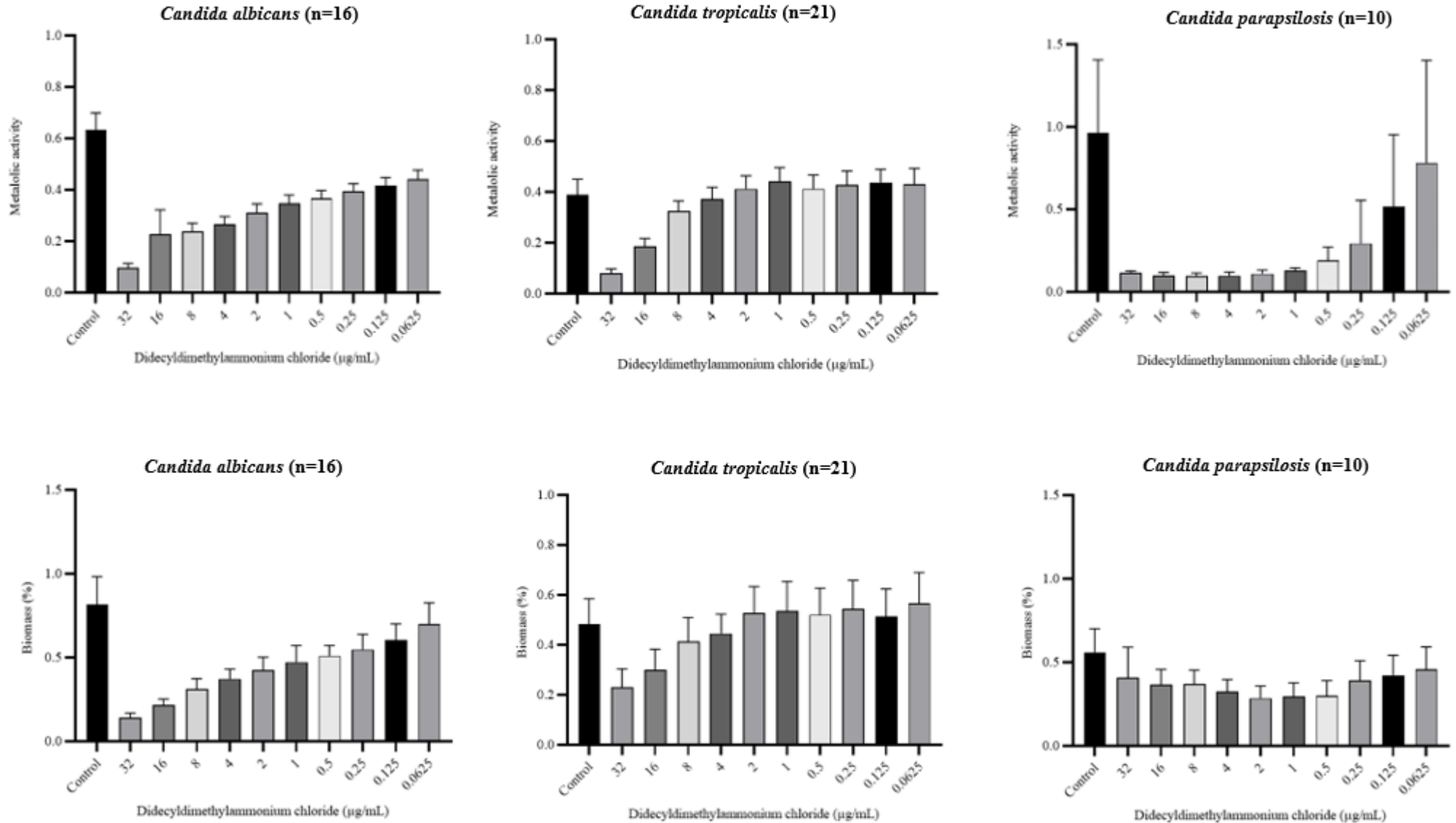
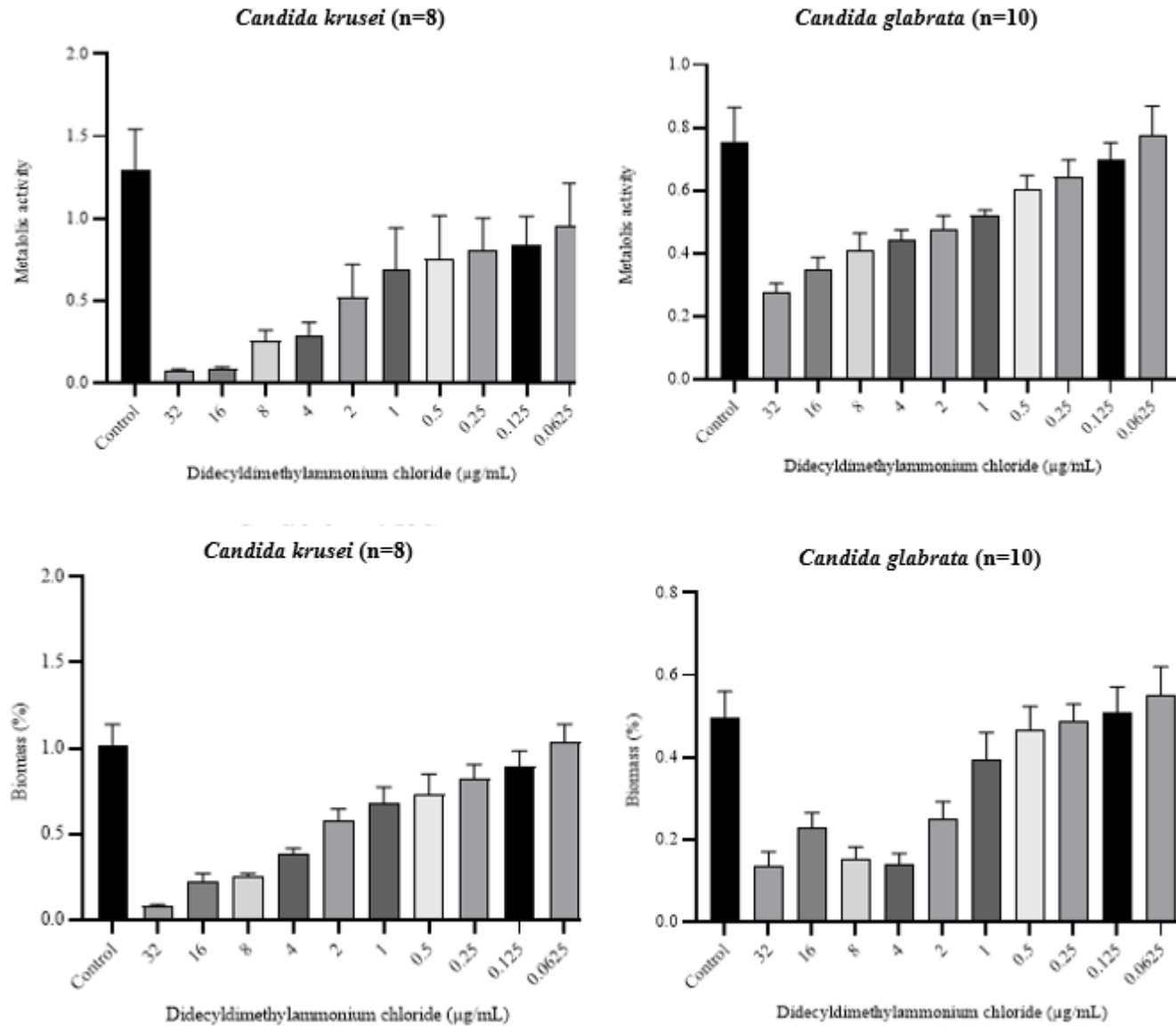


Gráfico 4 - Atividade metabólica e biomassa de biofilmes maduro de *Candida* spp. expostos a diferentes concentrações (0,0625 a 32 $\mu\text{g/mL}$) Cloreto de Didecil Dimetil Amônio. A atividade metabólica das células no biofilme foi obtida por ensaio da redução do MTT e a quantificação da biomassa por coloração com cristal violeta. Barras pretas (controle) correspondem ao biofilme não tratado com Cloreto de Benzalcônio.



2º ETAPA DO ESTUDO

6.4 Teste de sensibilidade planctônica à deferiprona e antifúngicos clássicos

A deferiprona exibiu CIMs variando de 16 a 1024 µg/mL contra os 25 isolados testados, sendo a média geométrica de 724,07 para *C. albicans*; 760,82 para *C. tropicalis*; 812,75 para *C. parapsilosis strictu sensu* e 64 para *C. glabrata*. As CIMs para FLC variaram de 0,25 a 16 µg/ml; 0,03 a >16 µg/ml para AMB e ≤ 0,03 a 16 µg/ml para CAS. Os resultados dos testes de sensibilidade de cada cepa do estudo estão dispostos na **tabela 9**.

Tabela 9 - Concentração Inibitória Mínima de deferiprona, fluconazol, anfotericina B e caspofungina isoladamente e em combinação contra cepas de *Candida* spp.

Espécies	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)												
	Drogas isoladas				Drogas combinadas								
	DEF	FLC	AMB	CAS	DEF16			DEF8			DEF4		
				FLC	AMB	CAS	FLC	AMB	CAS	FLC	AMB	CAS	
<i>Candida albicans</i> CO8	1024	8 ^R	>16 ^R	0,25	1 [*]	≤0,01 [*]	0,03 [*]	1 [*]	≤0,01 [*]	0,03 [*]	1 [*]	≤0,01 [*]	0,03 [*]
<i>Candida albicans</i> CO1	1024	16 ^R	0,06	1 ^R	8 [*]	0,06 ^I	1 ^I	8 [*]	0,06 ^I	1 ^I	8 [*]	0,125 ^I	1 ^I
<i>Candida albicans</i> ATCC	512	1	0,125	≤0,03	1 ^I	≤0,03 [*]	≤0,03 ^I	0,125 [*]	≤0,03 [*]	≤0,03 ^I	0,125 [*]	0,125 ^I	≤0,03 ^I
<i>Candida albicans</i> CC13	512	16 ^R	0,25	1 ^R	8 [*]	0,25 ^I	1 ^I	8 [*]	0,25 ^I	1 ^I	8 [*]	0,25 ^I	1 ^I
<i>Candida albicans</i> AO5-V	512	16 ^R	0,125	≤0,03	4 [*]	0,125 ^I	≤0,03 ^I	8 [*]	0,125 ^I	≤0,03 ^I	4 [*]	0,125 ^I	≤0,03 ^I
<i>Candida albicans</i> CP8	1024	16 ^R	0,125	0,25	16 ^I	0,25 ^I	0,25 ^I	16 ^I	0,25 ^I	0,25 ^I	16 ^I	0,125 ^I	0,25 ^I
Média geométrica	724,07												
<i>Candida tropicalis</i> ATCC	1024	2	0,25	≤0,03	2 ^I	0,125 [*]	≤0,03 ^I	2 ^I	0,125 [*]	≤0,03 ^I	2 ^I	0,25 ^I	≤0,03 ^I
<i>Candida tropicalis</i> HT02	512	0,5	0,125	1 ^R	0,5 ^I	0,125 ^I	≤0,03 [*]	1 ^I	0,125 ^I	≤0,03 [*]	1 ^I	0,125 ^I	≤0,03 [*]
<i>Candida tropicalis</i> HU09	512	2	0,25	≤0,03	2 ^I	0,25 ^I	≤0,03 ^I	4 ^I	0,125 [*]	≤0,03 ^I	4 ^I	0,25 ^I	≤0,03 ^I
<i>Candida tropicalis</i> HT01	1024	0,5	0,25	≤0,03	0,5 ^I	0,125 [*]	≤0,03 ^I	1 ^I	0,25 ^I	≤0,03 ^I	1 ^I	0,25 ^I	≤0,03 ^I
<i>Candida tropicalis</i> PVO2	1024	16 ^R	0,125	≤0,03	4 [*]	0,125 ^I	≤0,03 ^I	4 [*]	0,125 ^I	≤0,03 ^I	8 [*]	0,125 ^I	≤0,03 ^I
<i>Candida tropicalis</i> PVO34-A	512	0,25	0,125	≤0,03	0,25 ^I	0,125 ^I	≤0,03 ^I	0,25 ^I	0,125 ^I	≤0,03 ^I	0,25 ^I	0,125 ^I	≤0,03 ^I
<i>Candida tropicalis</i> HU04	1024	16	≤0,03	≤0,03	8 [*]	≤0,03 ^I	≤0,03 ^I	8 [*]	≤0,03 ^I	≤0,03 ^I	8 [*]	≤0,03 ^I	≤0,03 ^I
Média geométrica	760,82												
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC	1024	1	≤0,01	1 ^R	2 ^I	≤0,01 ^I	2 ^I	2 ^I	≤0,01 ^I	2 ^I	2 ^I	≤0,01 ^I	2 ^I
<i>Candida parapsilosis</i> JP18	512	0,25	0,25	0,25	0,5 ^I	0,25 ^I	0,25 ^I	0,5 ^I	0,25 ^I	0,25 ^I	0,25 ^I	0,25 ^I	0,25 ^I

AMB: anfotericina B; DEF: deferiprona; FLC: fluconazol; CAS: caspofungina; I: indiferente; *: sinergismo e diferença significativa quando comparado à droga testada isoladamente (P<0.05).; R: cepas resistentes;

<i>Candida parapsilosis</i> JT02	512	0,25	≤ 0,01	0,25	0,5 ^I	≤ 0,01 ^I	0,25 ^I	0,5 ^I	≤ 0,01 ^I	0,25 ^I	0,5 ^I	≤ 0,01 ^I	0,25 ^I
<i>Candida parapsilosis</i> JT24	1024	0,5	0,125	2 ^R	0,25 [*]	0,125 ^I	2 ^I	0,25 [*]	0,125 ^I	2 ^I	0,25 [*]	0,125 ^I	2 ^I
<i>Candida parapsilosis</i> JV17	1024	1	0,125	2 ^R	2 ^I	0,125 ^I	2 ^I	2 ^I	0,125 ^I	2 ^I	1 ^I	0,125 ^I	2 ^I
<i>Candida parapsilosis</i> JEV6	1024	0,5	≤ 0,01	0,25	1 ^I	≤ 0,01 ^I	0,25 ^I	1 ^I	≤ 0,01 ^I	0,25 ^I	0,5 ^I	≤ 0,01 ^I	0,25 ^I
Média geométrica	812,75												
<i>Candida glabrata</i> M6	32	2	>16 ^R	1 ^R	0,25 [*]	0,5 [*]	0,01 [*]	0,25 [*]	0,5 [*]	0,01 [*]	0,25 [*]	0,5 [*]	0,01 [*]
<i>Candida glabrata</i> C9	16	2	0,5	2 ^R	4 ^I	0,25 [*]	2 ^I	4 ^I	0,5 ^I	2 ^I	4 ^I	0,5 ^I	2 ^I
<i>Candida glabrata</i> AMEL	16	2	1	2 ^R	4 ^I	0,5 [*]	2 ^I	4 ^I	1 ^I	0,5 ^I	4 ^I	0,5 [*]	2 ^I
<i>Candida glabrata</i> IIU	256	1	1	0,125	2 ^I	0,25 [*]	0,125 ^I	2 ^I	0,25 [*]	0,06 [*]	2 ^I	0,25 [*]	0,125 ^I
<i>Candida glabrata</i> IFHCU	32	1	1	16 ^R	2 ^I	0,5 [*]	16 ^I	1 ^I	0,5 [*]	16 ^I	2 ^I	0,5 [*]	16 ^I
<i>Candida glabrata</i> HSS	32	1	1	2 ^R	2 ^I	0,25 [*]	2 ^I	2 ^I	0,5 [*]	1 [*]	2 ^I	0,5 [*]	2 ^I
Média geométrica	64												

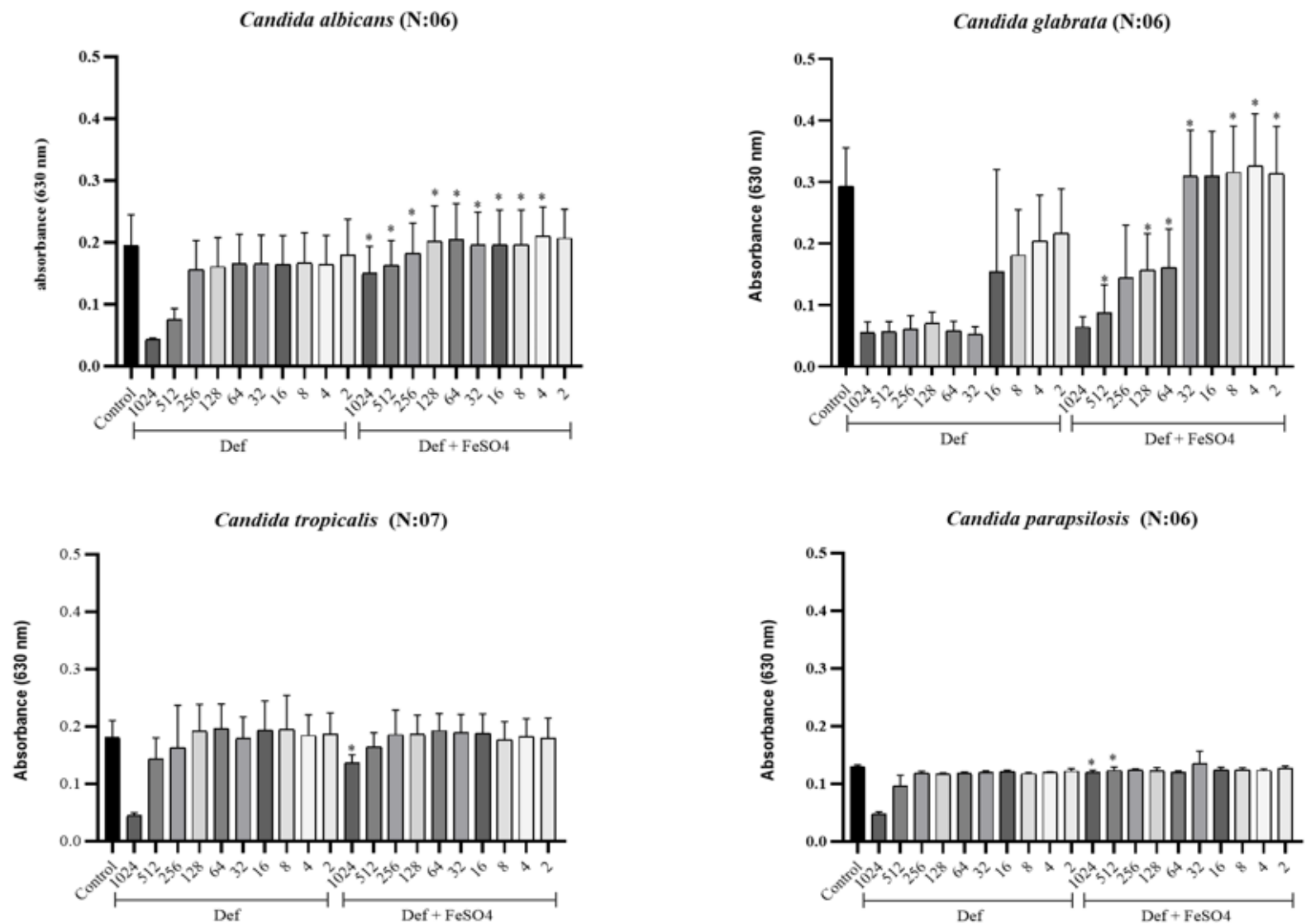
AMB: amfotericina B; DEF: deferiprona; FLC: fluconazol; CAS: caspofungina; I: indiferente; *: sinergismo e diferença significativa quando comparado à droga testada isoladamente (P<0.05). R: cepas resistentes;

6.5 Elucidação do mecanismo de atividade antifúngica da deferiprona

Os testes de suplementação com sulfato de ferro (II) (FeSO_4) (**Gráfico 5**) indicaram que a presença desse metal reduziu significativamente ($P < 0,05$) a eficácia antifúngica da DEF, apresentando novas CIMs que variaram de 4 a 1024 $\mu\text{g/ml}$ para *C. albicans*, 1024 $\mu\text{g/ml}$ para *C. tropicalis*, 512 a 1024 $\mu\text{g/ml}$ para *C. parapsilosis* e 2 a 512 $\mu\text{g/ml}$ para *C. glabrata*, em comparação ao controle sem suplementação de ferro (**Gráfico 5**).

Após exposição à deferiprona (DEF), observou-se uma redução significativa do crescimento de células planctônicas de *C. albicans* na concentração de 512 $\mu\text{g/mL}$, em comparação ao controle. No grupo tratado com DEF suplementada com sulfato ferroso (Def + FeSO_4), houve aumento significativo do crescimento celular nas concentrações de 4 a 1024 $\mu\text{g/mL}$, indicando que a adição de FeSO_4 reverteu o efeito inibitório da deferiprona e estimulou o crescimento planctônico de *C. albicans*. Para *C. tropicalis*, a DEF reduziu significativamente o crescimento planctônico na concentração de 1024 $\mu\text{g/mL}$. A suplementação com FeSO_4 reverteu esse efeito de forma significativa na mesma concentração. Em *C. parapsilosis*, observou-se inibição significativa do crescimento planctônico com DEF na concentração de 1024 $\mu\text{g/mL}$. A adição de FeSO_4 reverteu essa inibição de forma significativa nas concentrações de 512 a 1024 $\mu\text{g/mL}$. Já em *C. glabrata*, a DEF promoveu redução significativa do crescimento planctônico na maioria das concentrações testadas (2 a 512 $\mu\text{g/mL}$). A suplementação com FeSO_4 aumenta o crescimento de planctônico dessas espécies de *Candida*, mesmo na presença de DEF.

Gráfico 5 - Espécies de *Candida* expostas a concentrações variáveis, de 2 a 1024 µg/ml, de DEF isolada e suplementada com 10 µM do sal FeSO₄. A barra de controle representa células cultivadas em RPMI 1640, sem adição de DEF ou suplementação com FeSO₄. As barras associadas à “DEF” representam células cultivadas em contato com concentrações variáveis de DEF sem suplementação de FeSO₄. As barras “Def + FeSO₄” representam células crescidas em contato com DEF, em concentrações variáveis, com suplementação de FeSO₄. Os dados são expressos como média ± desvio padrão do crescimento fúngico a 630 nm. (*) Representa diferença estatística significativa entre a densidade óptica (crescimento microbiano) na presença de DEF e aquela na presença de DEF e de FeSO₄, sendo comparado ao crescimento em concentrações correspondentes de DEF.



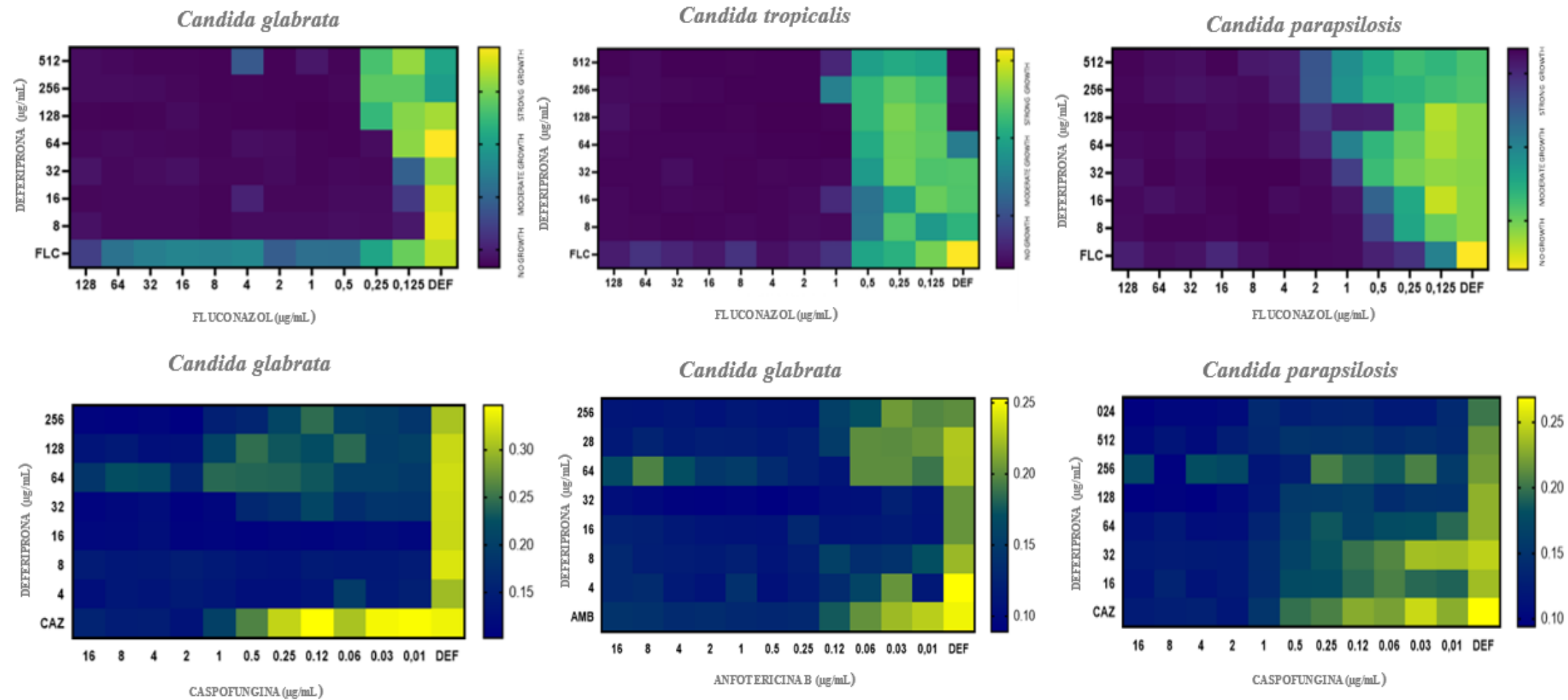
6.6 Análise da interação entre deferiprona e antifúngicos contra células planctônicas

No ensaio de *checkerboard*, a deferiprona reduziu os MICs do FLC, AMB e CAS contra cepas de *Candida* spp. resistentes a e sensíveis aos antifúngicos, conforme demonstrado nos mapas de calor (**Figura 3**), para escolha de concentrações fixas da DEF. Foi observado sinergismo em 5/6 cepas de *C. albicans*, 2/6 *C. tropicalis*, 1/6 *C. parapsilosis* e 6/6 *C. glabrata* (**Tabela 11**). Os MICs de FLC, AMB e CAS contra os isolados reduziram de 2 a 8 vezes; de 2 a 32 vezes e de 2 a 64 vezes, respectivamente, quando em combinação com deferiprona.

A deferiprona, nas concentrações de 16 µg/ml (DEF16), 8 µg/ml (DEF8) e 4 µg/ml (DEF4) demonstrou interação sinérgica contra *C. albicans* (4/6 cepas), na combinação FLC + DEF8; *C. tropicalis* (2/6 cepas) com FLC + DEF16, DEF8 e DEF4; *C. parapsilosis* (1/6 cepas) com FLC + DEF16, DEF8 e DEF4 e *C. glabrata* (1/6 cepas) com FLC + DEF16, DEF8 e DEF4; bem como, quando combinada com AMB contra *C. albicans* (2/6 cepas) nas concentrações de DEF16 e DEF8; contra *C. tropicalis* (2/6 cepas) nas concentrações de DEF16, DEF8 e *C. glabrata* (6/6 cepas) para DEF16, *C. glabrata* (4/6 cepas) para DEF8 e *C. glabrata* (5/6 cepas) para DEF4. Ademais, quando combinada com CAS, contra *C. albicans* (1/6 cepas) para DEF16, DEF8 e DEF4; *C. tropicalis* (1/6 cepas) para DEF16, DEF8 e DEF4 e *C. glabrata* (1/6 cepas) para DEF16 e DEF4, e *C. glabrata* (3 /6 cepas) para DEF8.

Nenhuma interação antagônica foi observada entre deferiprona e os antifúngicos testados, incluindo as cepas de referência *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida tropicalis* ATCC 750 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019.

Figura 3 - Mapa de calor projetado pelo software GraphPad Prism 7.0. Efeitos da interação entre a deferiprona e os antifúngicos FLC, AMB e CAS sobre células plactônicas de *Candida* spp. após 24 h de incubação à 35 ° C, para escolha de concentrações (16, 8 e 4 µg/mL) fixas. O crescimento foi quantificado por espectrofotômetro a 630 nm.



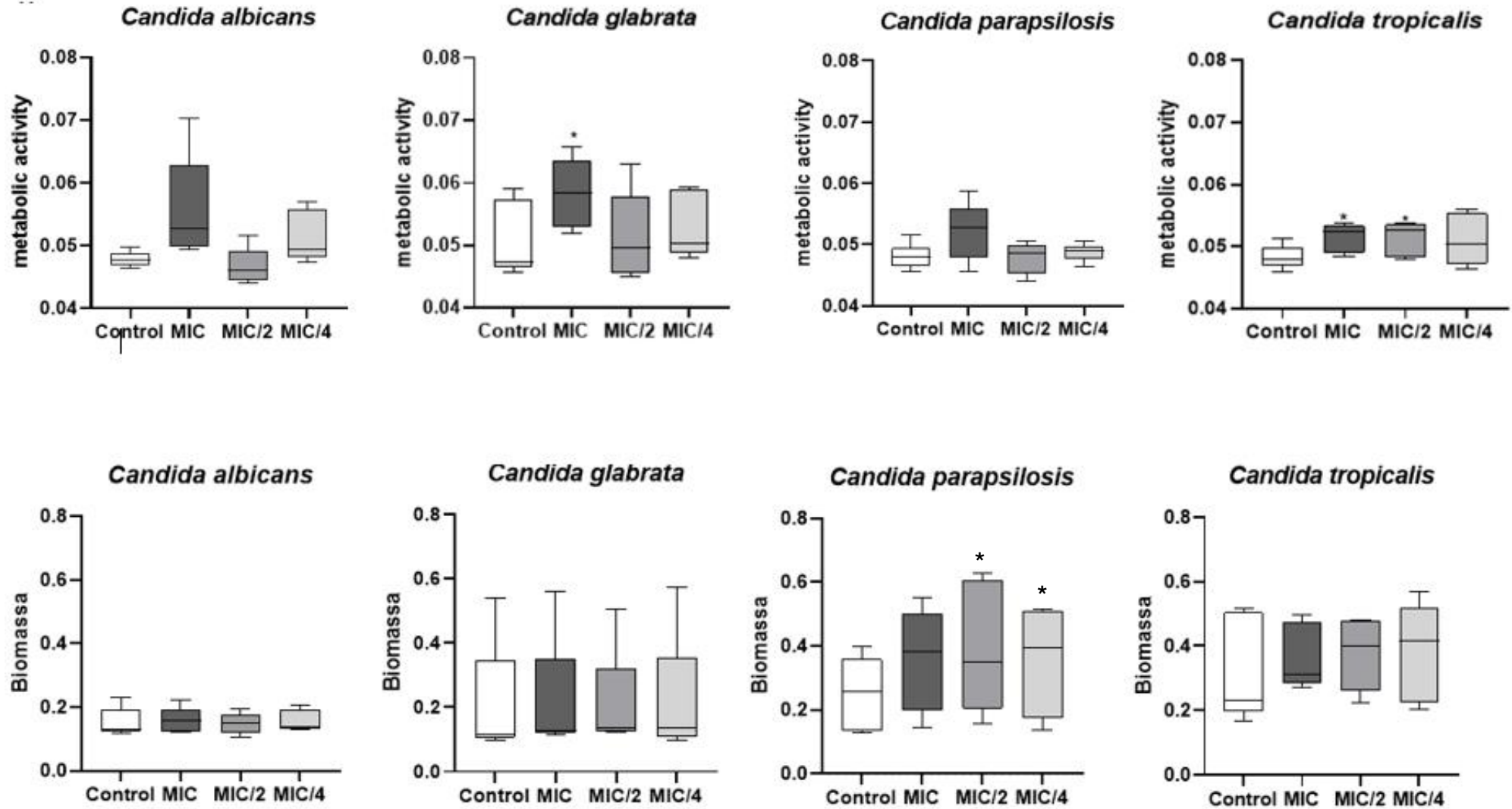
6.7 Análise do biofilme após exposição deferiprona

6.7.1 Efeito da deferiprona sobre biofilmes em formação de *Candida spp*

Após exposição à DEF, os biofilmes de *C. tropicalis* (MIC e MIC/2) e *C. glabrata* (MIC) apresentaram aumento significativo da atividade metabólica (P=0.0187 e P=0.0188) respectivamente), quando comparados aos controles livres de droga. Já as cepas de *C. albicans* e *C. parapsilosis* não apresentaram variação na atividade metabólica, mantendo níveis semelhantes aos observados no controle de crescimento (**Gráfico 6**).

No tocante à biomassa, os biofilmes expostos a DEF, nas concentrações de MIC, MIC/ 2 e MIC/ 4, demonstraram aumento significativo ($p = 0.0015$) na biomassa para cepas de *C. parapsilosis* (MIC/ 2 e MIC/4) quando comparadas aos controles de crescimento. No entanto, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* apresentaram biomassa semelhante aos observados no controle de crescimento (**Gráfico 6**).

Gráfico 6 - Atividade metabólica e biomassa de biofilme em formação de *Candida* spp. tratadas com deferiprona nas concentrações de MIC, MIC / 2 e MIC / 4. *Candida albicans* (N = 6); *Candida glabrata* (N = 6); *Candida parapsilosis* (N = 6); *Candida tropicalis* (N = 6). (*) Representa diferença estatística significativa em relação ao grupo controle.



6.7.2 Quantificação de biomassa e viabilidade celular de biofilmes maduro de *Candida spp*

Os biofilmes de analisados pela técnica de redução de MTT e coloração com cristal violeta, após exposição a DEF, nas concentrações de 2 a 1024 µg/mL demonstraram tendência à redução de atividade metabólica de *Candida spp.* (n=12) à 1024 µg/mL; e de biomassa para as concentrações 256 a 1024 µg/mL e 2 a 32 µg/mL, quando comparados aos controles, livre de tratamento (**Gráfico 7**).

C. albicans (n=3) apresentou redução de atividade metabólica quando exposta à DEF nas concentrações 2 a 32 µg/mL e 128 a 124 µg/mL; *C. glabrata* (n=3) em 4, 8 e 32 a 128 µg/mL e 1024 µg/mL; *C. parapsilosis* (n=3) nas concentrações de 256 a 1024 µg/mL; *C. tropicalis* (n=3) nas concentrações de 4, 8, 32 e 1024 µg/mL. Foi observado redução da biomassa em *C. albicans* (n=3) nas concentrações 4, 32 e 128 a 1024 µg/mL; *C. glabrata* (n=3) nas concentrações de 4 e 16 a 124 µg/mL; *C. parapsilosis* (n=3) nas concentrações de 2 a 64 µg/mL e 256 a 1024 µg/mL ; *C. tropicalis* (n=3) nas concentrações de 2 a 1024 e µg/mL, quando comparados aos controles sem tratamento (**Gráfico 8**).

Gráfico 7 - Atividade metabólica e biomassa de biofilmes maduros de *Candida* spp. expostos às concentrações (2 a 1024 µg/mL) de DEF. A Atividade metabólica das células no biofilme foi obtido por ensaio da redução do MTT e a quantificação da biomassa por coloração com cristal violeta. Barras pretas (controle) correspondem ao biofilme não tratado com deferiprona. (*) Representa diferença estatística significativa em relação ao grupo controle

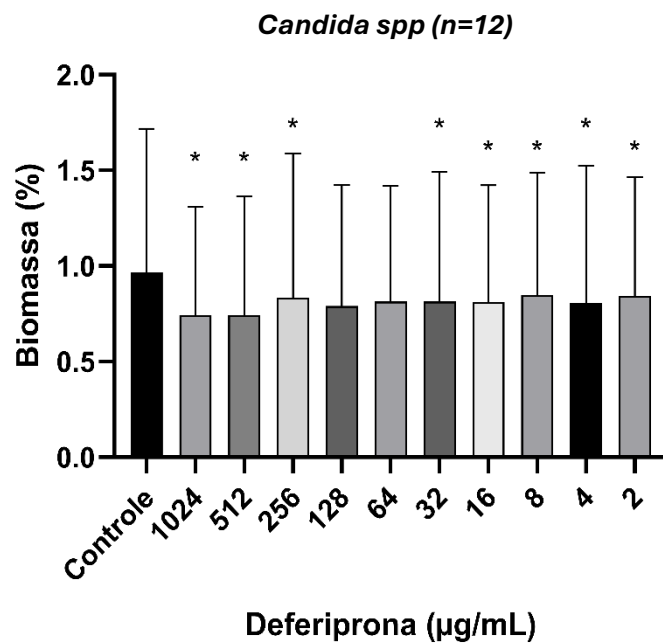
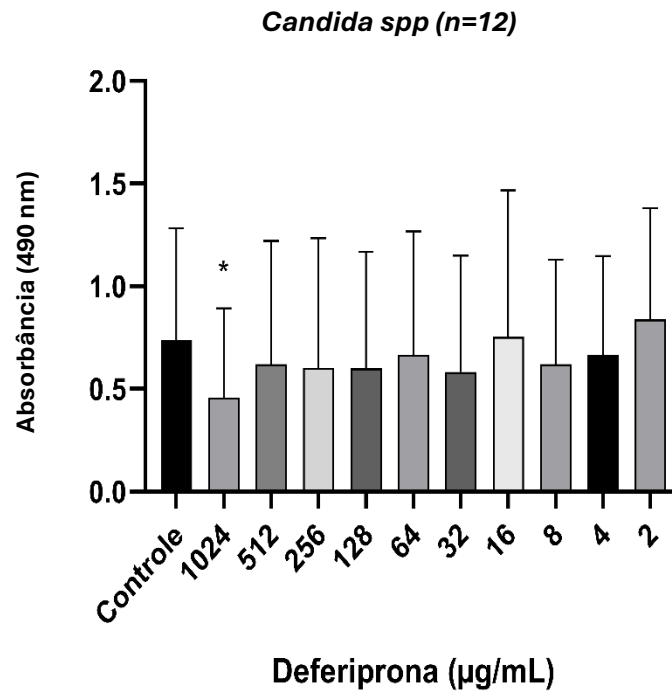
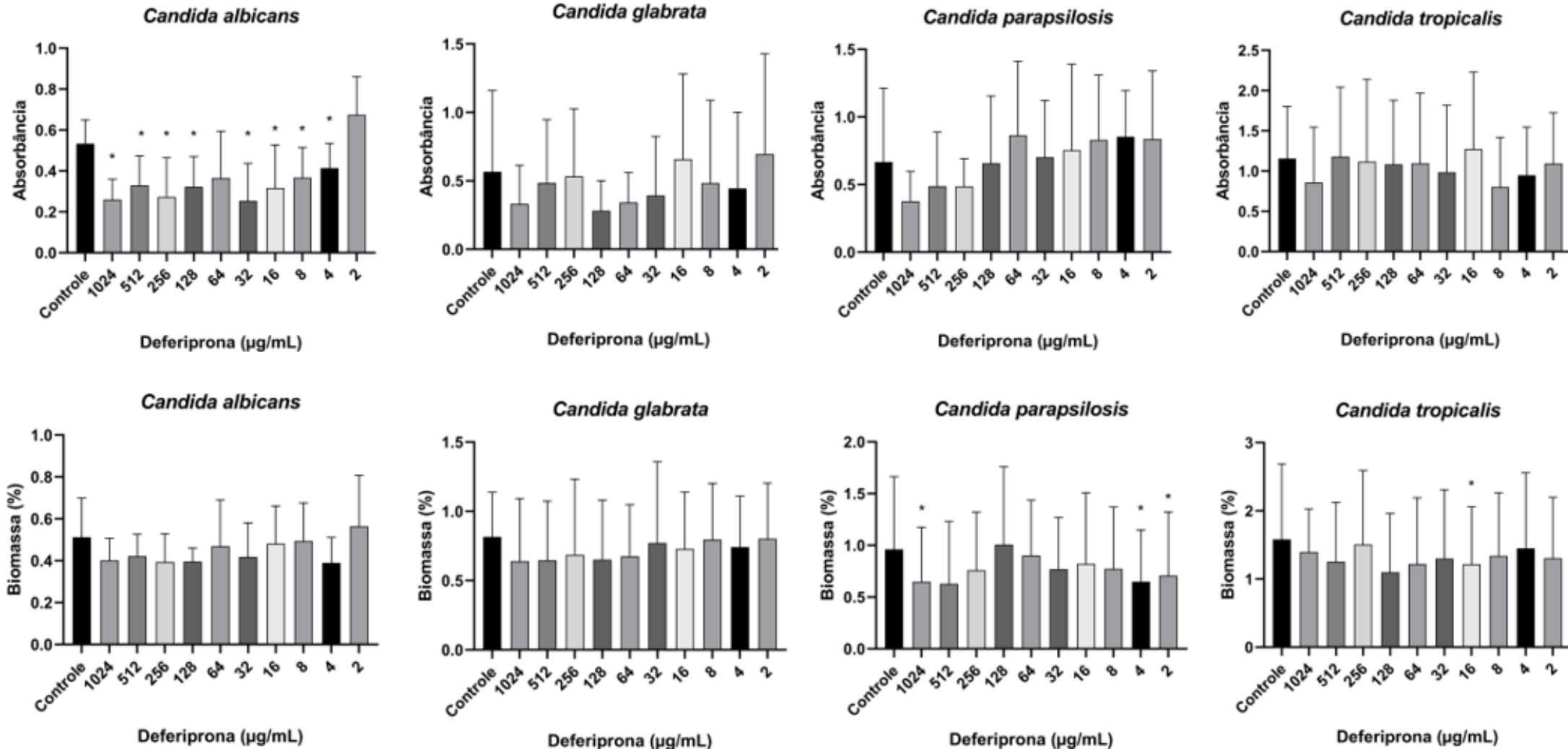


Gráfico 8 - Atividade metabólica e biomassa de biofilmes maduros de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* expostas às concentrações de 2 a 1024 µg/mL de DEF. A Atividade metabólica das células no biofilme foi obtido por ensaio da redução do MTT e a quantificação da biomassa por coloração com cristal violeta. Barras pretas (controle) correspondem ao biofilme não tratado com deferiprona. (*) Representa diferença estatística significativa em relação ao grupo controle



7 DISCUSSÃO

A resistência de leveduras do gênero *Candida* é uma das ameaças mais críticas à saúde pública contemporânea, sendo fortemente influenciada por fatores ambientais, clínicos e zoonóticos. No contexto da abordagem One Health torna-se essencial investigar como esses fungos oportunistas interagem com produtos químicos amplamente utilizados em práticas sanitárias e industriais, tais como o BZ e DDAC, visto que esses compostos de amônio quaternário (QACs) podem favorecer adaptações fenotípicas e seleção de cepas mais tolerantes, especialmente entre microrganismos formadores de biofilmes (Buffet-Bataillon *et al.*, 2021; Tezel; Pavlostathis, 2015; Moore *et al.*, 2023).

Considerando essa relação entre o uso de QACs e a adaptação microbiana, foi conduzido o presente estudo (Etapa 1), como parte de um projeto multicêntrico, com o objetivo de isolar e identificar cepas de *Candida spp.* provenientes de diferentes fontes no estado do Ceará, Brasil. Foram incluídas amostras clínicas de pacientes hospitalares, amostras de animais de produção (suínos e aves) e de superfícies do ambiente hospitalar. As leveduras foram processadas e identificadas por métodos bioquímicos e por análise molecular via espectrometria de massas (MALDI-TOF).

A partir dessa caracterização, buscou-se avaliar o efeito dos compostos QACs sobre biofilmes em formação (0h e 48h) e maduros de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei* isoladas do Ceará. Essa investigação representa uma abordagem inovadora, por integrar o conceito One Health à análise do impacto de saneantes sobre microrganismos patogênicos, contribuindo para o avanço do conhecimento em vigilância sanitária e para o desenvolvimento de estratégias de contenção da resistência fúngica emergente, com repercussões diretas sobre a saúde humana, animal e ambiental.

O perfil de distribuição das cepas isoladas revela a importância clínica e epidemiológica das espécies encontradas. A predominância da espécie *Candida albicans* em amostras clínicas humanas (urina, lavado broncoalveolar e sangue) (n=16), corrobora outros estudos da micologia médica, no qual a classifica como o principal agente etiológico das candidíases em humanos (Candido *et al.*, 2000; Mimica *et al.*, 2024). *C. tropicalis* (n=21) foi a espécie mais frequente no estudo, com isolados tanto em humanos quanto em animais de produção (suínos e aves). Sua presença em sítios anatômicos de animais, como reto, cavidade oral e cloaca, revela a crescente preocupação com o potencial zoonótico e a dispersão dessas leveduras em ambientes não-humanos (Santos *et al.*, 2009; Silva, 2010). Em aves, por exemplo, *C. tropicalis* tem sido frequentemente isolada e associada a problemas gastrointestinais (Ritchie

et al., 1994; Marinho et al., 2024), confirmando a relevância da vigilância em medicina veterinária.

A identificação da espécie *C. parapsilosis sensu stricto* tanto em amostras clínicas humanas, quanto em superfícies de equipamentos (carrinhos de parada cardiorrespiratória, mesas de Mayo e carrinhos de curativo) representa um achado de significância epidemiológica. Visto que, é um patógeno oportunista amplamente reconhecido pela sua capacidade de persistir no ambiente hospitalar (França; Ribeiro; Queiroz-Telles, 2008; Pacheco et al., 2022). A contaminação em superfícies inanimada sugere aprimoramento das práticas de desinfecção, a fim de mitigar o risco de transmissão cruzada e infecções relacionadas à assistência à saúde (Moore et al., 2023).

C. glabrata (n=10) predominante em urina humana, e *C. krusei* (n=8) isolada exclusivamente de animais, reitera a diversidade de fontes e a complexidade epidemiológica das candidíases, sendo esta última intrinsecamente resistente a fluconazol e, portanto, uma preocupação na clínica (Jadhav; Pal, 2006; Pacheco et al., 2022).

Este cenário epidemiológico de ampla distribuição de espécies de *Candida* em diferentes reservatórios (humano, animal e ambiente hospitalar) estabelece um contexto para a investigação da sensibilidade a desinfetantes. A relevância clínica da predominância de *C. albicans* em humanos (Candido et al., 2000; Mimica et al., 2024), o potencial zoonótico de *C. tropicalis* em animais de produção (Santos et al., 2009; Silva, 2010; Marinho et al., 2024; Ritchie et al., 1994), e a capacidade de persistência de *C. parapsilosis sensu stricto* em superfícies hospitalares (França; Ribeiro; Queiroz-Telles, 2008; Pacheco et al., 2022; Moore et al., 2023) demonstra a importância de agentes de controle eficazes.

Nesse contexto, BZ e DDAC, ambos sais de amônio quaternário, apresentaram efeito antifúngico contra as células planctônicas de *Candida* spp., com a maioria das CIMs variando de 0,0625 a 1 µg/mL; sendo observada variação nas CIMs, especialmente para o BZ: enquanto a maior parte dos isolados de origem humana e veterinária apresentou baixas CIMs, os isolados de ambiente hospitalar exibiram CIMs mais elevadas para o BZ (2 e 4 µg/mL).

Corroborando nossos estudos, Yoshimura *et al.* (2002) já haviam demonstrado em seus trabalhos a ação antifúngica do cloreto de benzalcônio sobre células planctônicas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, bem como, de fungos filamentosos como *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* e *Trichophyton rubrum*. De forma semelhante Micales-Glaeser, Lloyd e Woods (2004) investigaram, em seus estudos, a ação antifúngica do DDA, e constataram que esse QACs, se mostrou ativo contra fungos filamentosos, como *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium brevicompactum* e *Stachybotrys chartarum*.

Nesse trabalho, o DDA foi capaz de inibir o crescimento micelial, reduzir a esporulação e causar descoloração nos microrganismos testados, indicando perturbações tanto na estrutura celular quanto na produção de metabólitos secundários, como os pigmentos. Portanto, o DDA apresenta um amplo espectro de ação antifúngica, atuando de maneira eficaz tanto contra leveduras oportunistas quanto contra fungos filamentosos ambientais e potencialmente toxigênicos. Além disso, a ação do DDA em diferentes formas fúngicas (biofilme, micélio, esporos) reforça seu potencial para uso em contextos hospitalares, industriais e domiciliares, especialmente em superfícies sujeitas à contaminação fúngica.

BZ e DDAC apresentaram efeito antifúngico também contra biofilmes em formação (0h e 48h) e maduro de diferentes espécies do gênero *Candida*, incluindo *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. As concentrações testadas (0,0625 a 32 µg/mL) foram capazes de reduzir significativamente a atividade metabólica dos biofilmes, evidenciando que esses compostos interferem na viabilidade e desenvolvimento inicial dos biofilmes. Mazurkiewicz, Edyta, *et al.* (2024) apresentaram recentemente, em seus estudos, atividade fungicida, inibitória do crescimento planctônico e antibiofilme de sais de amônio quaternário do tipo formulado com surfactantes Gemini (diméricos), recentemente sintetizados por sua equipe. Os autores constataram que tais compostos foram capazes de inibir a formação de filamentos pela espécie *Candida albicans* e reduziram significativamente a adesão das células fúngicas às superfícies de aço inoxidável, silicone e vidro, com uma redução mais discreta observada no poliestireno.

Portanto, esses achados reforçam o potencial dos QACs (quaternary ammonium compounds) como agentes antifúngicos não apenas em aplicações desinfetantes, mas também na prevenção da formação de biofilmes clinicamente relevantes, como demonstrado em nossos estudos.

No entanto, o desafio persistente da resistência e a necessidade de estratégias mais eficazes contra infecções estabelecidas permanecem, visto que *Candida* spp. têm sido frequentemente relatada em casos de resistência antifúngica, constituindo um grave problema de saúde pública. O reposicionamento, bem como, a combinação de fármacos podem ser estratégias para mitigar falhas terapêuticas e potencializar a ação de antifúngicos. Portanto, visto que, o ferro (Fe) é um micronutriente essencial à sobrevivência de microrganismos, e sua restrição, por quelantes de ferro, causa redução de crescimento de outros fungos Ibrahim, *et al* 2006; Brilhante *et al* 2021; Zarembler *et al* 2009; Leal *et al* 2013), este estudo (etapa 2), também avaliou o efeito antifúngico da deferiprona, um quelante de ferro, isolado e em combinação com os antifúngicos FLC, AMB e CAS contra células planctônicas e biofilmes de *Candida albicans*,

Candida tropicalis, *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata*. A restrição da disponibilidade de ferro, por meio do quelante DEF, representa uma análise inovadora no combate a infecções causadas por essas espécies de *Candida*. Além disso, nosso estudo (Etapa 2) investiga potenciais interações sinérgicas entre a DEF e antifúngicos já utilizados na prática clínica, o que pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, incluindo opções eficazes contra infecções por *Candida* spp. resistentes aos tratamentos convencionais. Adicionalmente (Etapa 2), foi realizado um ensaio de suplementação com sulfato ferroso (FeSO_4 , 10 μM), com o objetivo de verificar se a inibição induzida pela DEF poderia ser revertida.

A deferiprona apresentou valores de CIM variando de 256 a 1024 $\mu\text{g/ml}$ para *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis strictu sensu*, enquanto para *Candida glabrata*, os valores foram inferiores, entre 16 e 256 $\mu\text{g/ml}$. Esses resultados indicam uma atividade antifúngica variável da deferiprona entre diferentes espécies de *Candida*, sugerindo uma maior sensibilidade de *C. glabrata* ao quelante de ferro, conforme evidenciado pelos valores de CIM mais baixos. Bortolami *et al.* (2021) relataram atividade antifúngica dos derivados 2b e 3b da deferiprona contra *Candida albicans* ATCC 1023, com valores de CIM entre 16 e 32 $\mu\text{g/ml}$, indicando uma eficácia superior em comparação à deferiprona testada isoladamente no presente estudo.

De forma semelhante, Brilhante *et al.* (2021) demonstraram que a deferiprona inibiu o crescimento de *Sporothrix* spp. em concentrações entre 8 e 32 $\mu\text{g/ml}$, reforçando o potencial antifúngico desse quelante. Além disso, o fungo *Aspergillus fumigatus* foi inibido à 1.250 μM da deferiprona, conforme reportado por Nazik *et al.* (2015). Esses achados sugerem que a eficácia da deferiprona pode variar entre diferentes espécies fúngicas, possivelmente devido a mecanismos específicos de captação de ferro. A menor CIM observada para *C. glabrata* pode estar relacionada a uma maior dependência desse fungo pelo ferro. Desse modo, nossos achados reforçam o potencial da deferiprona como uma possível estratégia antifúngica, ampliando o conhecimento sobre a influência da captação de ferro na susceptibilidade fúngica.

Outros estudos tais como o de Ibrahim *et al.* (2006) realizados, *in vivo*, em camundongos, demonstraram que este quelante também possui atividade antifúngica na concentração de 100.000 $\mu\text{g /kg}$, contra *Rhizopus oryzae*, causa mais comum de mucormicose; nesse estudo, a DEF foi eficaz na sobrevida e redução da carga fúngica cerebral dos animais, tanto quanto o antifúngico anfotericina B. Para os autores, a quelação de ferro foi o mecanismo de proteção. De forma semelhante, no presente estudo, a maior sensibilidade de *C. glabrata* pode estar relacionada a uma dependência mais elevada desse microrganismo ao ferro,

tornando-a mais vulnerável à ação do quelante (Nevitt, 2011). Os achados de Ibrahim *et al.* (2006) e do presente estudo reforçam a importância da privação de ferro como uma estratégia antifúngica eficaz. Assim, ambos os estudos apontam para o potencial terapêutico da modulação da disponibilidade de ferro, pela DEF, no controle de infecções fúngicas, incluindo aquelas causadas por patógenos resistentes aos antifúngicos convencionais.

Ademais, estudos demonstraram atividade antibacteriana desse quelante contra células de *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* exibindo MIC de 128 a ≥ 512 $\mu\text{g/ml}$ (Thompson *et al* 2012). Contra *Burkholderia pseudomallei* DEF apresentou MIC de 4 a 64 $\mu\text{g/mL}$, e exibiu sinergismo quando combinada com β -lactâmicos (Guedes *et al* 2023). Portanto, nossos estudos reforçam a versatilidade antimicrobiana da DEF e ampliam o conhecimento sobre seu potencial farmacológico, representando um avanço importante na busca por novas estratégias no combate à resistência antimicrobiana, ao demonstrar sua atividade antifúngica, especialmente contra *Candida glabrata*.

Nossos estudos demonstraram que a deferiprona possui potencial antifúngico contra *Candida glabrata* com valores de MIC reduzidos comparada a outras espécies utilizadas nos nossos ensaios. Hipotetiza-se que isso deve-se às diferenças nas vias metabólicas de homeostase de ferro entre *Candida glabrata* e outras espécies de *Candida* (Haas; Eisendle, 2008). A redução dos valores de MIC para *C. glabrata* pode indicar um mecanismo de ação diferenciado da deferiprona em relação aos antifúngicos tradicionais. Além de sequestrar ferro intracelular, a deferiprona pode interferir diretamente nos mecanismos de armazenamento de ferro, ou nas vias de transporte interno do ferro, o que afetaria a mobilização e utilização eficiente do ferro dentro da célula. Isso seria especialmente prejudicial para *Candida glabrata*, que possui um sistema de aquisição de ferro mais restrito em comparação a outras espécies, como *Candida albicans* (Nevitt, 2011).

Embora a deferiprona isolada tenha apresentado valores elevados de MIC contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis strictu sensu*, sua associação com antifúngicos reduziu os valores de MIC para FLC, AMB e CAS em até 64 vezes, demonstrando efeito sinérgico. Resultados semelhantes foram encontrados na combinação de DEF com fluconazol, ou com cetoconazol contra *Aspergillus fumigatus* (Zarembler *et al* 2009). A quelação de ferro utilizando deferiprona combinada à outras drogas reduziu o crescimento de *Aspergillus fumigatus* e *Fusarium oxysporum* em um modelo de infecção fúngica da córnea. Para os autores é possível que possam ser utilizados com sucesso para tratar uma ampla gama de infecções fúngicas (Leal *et al* 2013).

A combinação de deferiprona com FLC, AMB e CAS contra *C. albicans* reduziu significativamente as CIMs dos antifúngicos sendo observadas interações sinérgicas da combinação de DEF com FLC (4/6 cepas), AMB (3/6 cepas) e CAS (1/6 cepas). Esses achados sugerem essa espécie é sensível à privação de ferro, possivelmente devido à sua elevada dependência de processos fisiológicos mediados por ferro, como metabolismo mitocondrial, resposta ao estresse oxidativo e manutenção da integridade da parede celular (Van Genechten *et al*, 2024; Ramanan; Wang, 2000). O sinergismo com o fluconazol, observado mais expressivamente em nossos estudos, é relevante, haja vista, crescente incidência de resistência a azólicos nesta espécie, e aponta para um possível uso da deferiprona como agente adjuvante capaz de restaurar ou potencializar a eficácia de antifúngicos clássicos.

Para *C. tropicalis*, observou-se sinergismo em 2 de 6 cepas na combinação com FLC e AMB, e em apenas 1 cepa com CAS; tal efeito observado ainda representa uma contribuição terapêutica relevante, tendo em vista a importância clínica de *C. tropicalis*, frequentemente associada a infecções invasivas e resistência cruzada a múltiplas classes antifúngicas. A menor taxa de sinergismo sugere que esta espécie pode apresentar mecanismos compensatórios frente à limitação de ferro, ou uma menor dependência de vias metabólicas afetadas pela quelante (Prasad, *et al* 2006).

Já *C. parapsilosis* apresentou resposta menos expressiva à combinação de deferiprona com os antifúngicos, com sinergismo identificado em apenas 1 de 6 cepas na associação com fluconazol, e nenhuma interação sinérgica observada com AMB ou CAS. A baixa taxa de sinergismo observada sugere que esta espécie apresenta características fisiológicas e genéticas que limitam os efeitos de estratégias baseadas na privação de ferro (Chakraborty *et al* 2020). Vale ressaltar que nenhuma interação antagônica foi observada entre a DEF e os antifúngicos testados. Esses achados reforçam a possível ampliação do espectro de aplicação clínica da deferiprona, tradicionalmente empregada como agente quelante em contextos não infecciosos.

DEF reduziu significativamente as CIMs dos antifúngicos FLC, AMB e CAS, quando combinados, contra *Candida glabrata*, demonstrando interação sinérgica entre DEF e FLC em 1 de 6 cepas, com AMB em 6 de 6 cepas (100%) e com CAS em 1 de 6 cepas dessa espécie. *C. glabrata* apresenta um sistema de aquisição de ferro mais restrito em comparação a outras espécies, tornando-a mais dependente de fontes externas de ferro para suas funções vitais (Belenky *et al*, 2013). Esses achados corroboram os resultados de Brilhante *et al*. (2021), na qual, deferiprona quando associada com antifúngicos apresentou sinergismo, e reduziu os

valores de MIC tanto para terbinafina e itraconazol, quanto para o polieno AMB, em até 16 vezes, contra *Sporothrix* spp.

Os polienos, à exemplo da AMB, se ligam ao ergosterol da membrana celular fúngica, promovendo a formação de poros que levam ao extravasamento do conteúdo intracelular, acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), e, conseqüentemente, à apoptose e morte celular (Belenky *et al*, 2013). *C. glabrata* possui um único transportador de sideróforo denominado SIT1 (Transportador de Ferro Sideróforo), localizado na membrana plasmática do fungo; a expressão desse SIT1 é baixa na presença de ferro, mas aumenta significativamente em condições de deficiência de Fe; além disso, o crescimento dessa espécie é comprometido em meios com ferro quelado e em baixa disponibilidade (Belenky *et al*, 2013). Hipotetiza-se, portanto, que a interferência na homeostase de ferro pela DEF pode afetar diretamente a expressão do SIT1, comprometendo o crescimento da célula; e que a DEF potencializa o efeito da AMB, uma vez que a deficiência de ferro causada pela DEF pode tornar *C. glabrata* mais vulnerável à ação de AMB, já que a membrana celular enfraquecida é mais susceptível à formação de poros.

A relação entre a disponibilidade de ferro e o crescimento fúngico têm sido amplamente investigadas (Prasad, *et al* 2006). Para apoiar a hipótese de que a suplementação com ferro (II) pode reverter o efeito antifúngico da DEF sobre células planctônicas de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis strictu sensu*, realizamos ensaios utilizando meio de cultura enriquecido com 10 µM de Fe (II). Nossos resultados mostraram que a adição de ferro (II) reduziu significativamente a ação antifúngica da DEF contra essas espécies de *Candida*, sugerindo que a eficácia desse agente pode estar diretamente relacionada à disponibilidade de ferro no meio. De forma semelhante, Hellwig *et al.* (2021) analisaram o crescimento de *Sporothrix* spp. em diferentes concentrações de ferro e observaram que sua disponibilidade afetou tanto o crescimento quanto a viabilidade dos fungos frente ao estresse oxidativo, evidenciando o papel essencial do ferro no desenvolvimento fúngico. Além disso, estudos demonstraram que a limitação de ferro por quelantes, como a DEF, também foi eficaz na inibição do crescimento de espécies do complexo *Sporothrix schenckii*, apresentando atividade inibitória significativa contra células planctônicas e a formação de biofilmes (Brilhante *et al* 2021). Nossos resultados reforçam a importância do ferro na regulação do crescimento fúngico e destacam a atuação da DEF como potencial agente antifúngico.

Bortolami *et al.* (2021) notaram que a adição de Fe (III) e Fe(II) aos meios de cultura com biofilmes de *C. albicans* ATCC 10.23 reduziu a atividade de DEF de forma dependente da concentração. Nazik *et al.* (2015) já haviam demonstrado em seus estudos que

o ferro estimula tanto a formação quanto a manutenção de biofilmes já formados; em seus estudos a DFP sob concentrações de ≥ 625 a $1.250 \mu\text{M}$ demonstrou efeito inibitório contra biofilmes pré-formados de *Aspergillus fumigatus*, comparado aos controles sem a droga, a adição de FeCl_3 em concentrações $\geq 625 \mu\text{M}$ reverteu a inibição causada por $625 \mu\text{M}$ de DFP. Além disso, *A. fumigatus* aumentaram significativamente na presença de $2.500 \mu\text{M}$ de FeCl_3 , sozinho. A DFP, em concentrações de 156 a $2.500 \mu\text{M}$, inibiu biofilmes formados de *A. fumigatus*, de maneira dose-dependente. A combinação de $625 \mu\text{M}$ de DFP com qualquer concentração de FeCl_3 resultou em biofilmes significativamente menor do que nos controles; enquanto o FeCl_3 , sozinho, em concentrações $\geq 156 \mu\text{M}$ estimulou o crescimento biofilmes formado.

A deferiprona não apresentou efeito significativo sobre a biomassa de biofilmes em formação de espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*; bem como sobre a viabilidade celular de *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Contudo, este quelante aumentou de forma significativa estatisticamente, a biomassa de biofilmes em formação de *C. parapsilosis*, assim como a viabilidade celular de *C. tropicalis* e *C. glabrata* em comparação com os controles sem a droga. Tal aumento de biomassa contrasta com os estudos de Bortolami *et al.* (2021), que demonstraram atividade antifúngica dos derivados 2b e 3b da DEF, com MICs variando de 16 a $32 \mu\text{g/ml}$ contra biofilmes de *C. albicans* ATCC 10.23. Guedes *et al.* (2023) demonstraram em seus estudos que apesar da DEF não afetar a viabilidade do biofilme de *Burkholderia pseudomallei*, o quelante reduziu a biomassa dos biofilmes em até 21% . Outros estudos realizados por Guedes *et al.* (2023) comprovaram que concentração mínima de erradicação de biofilme (MBECs) da DEF de $\geq 1024 \mu\text{g/ml}$ reduziu a biomassa dos biofilmes de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa in vitro* e *ex vivo* em um modelo de ferida em pele suína. Portanto, em contraste com os estudos encontrados com bactérias, onde a DEF reduziu de forma unilateral a biomassa dos biofilmes, nossos estudos sugerem que o quelante de ferro DEF pode tanto não afetar, quanto promover a formação de biofilmes de *Candida* spp. de maneira espécie-dependente, onde, em algumas espécies fúngicas, a DEF não afetou diretamente a formação e viabilidade celular, mas ainda assim interferiu na formação e manutenção dos biofilmes.

Nossos estudos com biofilmes maduros corroboram os achados de Bortolami *et al.* (2021) no qual demonstraram que nenhum dos compostos sintetizados derivados da deferiprona apresentou atividade contra biofilmes maduros de *C. albicans*. Embora, contraste aos de Brilhante *et al.* (2021), no qual, os autores constataram que a deferiprona ($512 \mu\text{g/ml}$) reduziu a biomassa (47%) e a atividade metabólica (45%) de biofilmes maduros de *Sporothrix* spp.

Nesse contexto, nossos achados sugerem que, embora a DEF tenha potencial para interferir na biomassa de biofilmes maduros de *Candida glabrata* seu efeito pode variar dependendo da espécie e da concentração utilizada.

Este estudo determinou o perfil epidemiológico de *Candida* spp., isolada de humanos, animais e ambiente hospitalar; bem como a atividade antifúngica e antibiofilme do DDA e BZ ; além disso, demonstrou que a deferiprona exerce atividade antifúngica e efeito sinérgico em combinação com fluconazol, anfotericina B e caspofungina contra células planctônicas das espécies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*; com uma maior sensibilidade observada em *C. glabrata*. Ademais, a eficácia antifúngica do quelante foi significativamente reduzida pela suplementação com sulfato de ferro II (FeSO_4), evidenciando o papel do ferro na regulação da resposta antifúngica. Contudo, no modelo de biofilmes em formação e maduro, a deferiprona demonstrou alterações apenas contra *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, e *Candida glabrata*, não sendo observadas alterações relevantes nas demais espécies testadas.

8 CONCLUSÃO

- *Candida spp.* isoladas de amostras clínicas de pacientes do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), superfícies de ambientes clínicos do HUWC e de animais de produção e ambientes desses animais apresentam perfil epidemiológico a saber: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis sensu stricto* e *C. glabrata* predominaram em amostras humanas, e *C. krusei* foi exclusiva de animais de produção (suínos e aves);
- Isolados de origem humana, de animal de produção e ambiente desses animais de produção exibiram taxa de resistência ao FLC, com o maior número de isolados resistentes obtidos de animais;
- O cloreto de didecildimetilamônio (DDA) e o cloreto de benzalcônio (BZ) apresentam atividade antifúngica contra células planctônicas de *Candida spp.* isoladas de amostras humanas, de ambientes hospitalares e de animais de produção; BZ exibe valores de CIM mais elevados para as cepas de origem humana e hospitalar.
- Biofilmes (formação e maduro) de *Candida spp.* expostos ao cloreto de benzalcônio e ao cloreto de didecildimetilamônio apresentam redução significativa da atividade metabólica e da biomassa em comparação aos controles.
- Deferiprona apresentou atividade antifúngica contra células planctônicas de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*, com maior sensibilidade observada na espécie *C. glabrata*.
- Sinergismo entre deferiprona e fluconazol, anfotericina B e caspofungina foi observado contra cepas de *Candida spp.*,
- A adição de sulfato de ferro II (FeSO_4) reduziu significativamente a eficácia antifúngica da deferiprona, confirmando o papel regulador do ferro na resposta antifúngica.
- No modelo de biofilme, em formação e maduro, a deferiprona promoveu aumento de biomassa em *C. parapsilosis*, bem como da atividade metabólica em *C. tropicalis* e *C. glabrata* para biofilme em formação.
- Em biofilmes maduros observou-se redução de atividade metabólica e de biomassa em *Candida spp.*

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única – PAN-BRAGG**. Brasília: ANVISA, 2018.

AHMED, N.; MAIESHA, S. MAHMOOD, M.A. ULLAH, Y. ARAF, · TANJIM, I. RAHAMAN, · ABU, T. MOIN, MOHAMMAD, J. HOSEN. COVID-19-Associated Candidiasis: Possible Patho-Mechanism, Predisposing Factors, and Prevention Strategies. **Curr Microbiol.**, [S.l.], v. 79, p. 127, 2022.

ALMEIDA, R. S. et al. Iron Homeostasis in *Candida albicans*: the Role of Iron-Responsive Transcription Factors. **Microbiology Spectrum**, [S.l.], v. 10, n. 1, p. e01859-21, 2022.

AMMENDOLA, S. et al. *Salmonella Typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* Respond Differently to the Fe Chelator Deferiprone and to Some Novel Deferiprone Derivatives. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 22, n. 19, p. 10292, 2021.

ANDRADE, Emília Ferreira; POESTER, Vanice; ESPERON, Bruna Muradás; GOMES, Gisele de Quadros; XAVIER, Melissa O.; SEVERO, Cecília Bittencourt. Pathogenic *Aspergillus* spp. and *Candida* spp. in coastal waters from southern Brazil: an one health approach. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S.l.], v. 56, n. 1, p. 179-189, 2024.

ANSAH, M. **An in-vitro study investigating current and novel antimicrobial agents as potential topical treatments for cutaneous infections caused by bacteria, fungi and Leishmania**. 2025. Tese (Doutorado em Farmácia) – University of Wolverhampton, Wolverhampton, 2025.

ARMSTRONG-JAMES, D.; HARRISON, T.S. Immunotherapy for fungal infections. **Curr Opin Microbiol.**, [S.l.], v. 15, p. 434–439, 2012.

BARBEDO, G. D.; SGARBI, P. F. Biofilme de *Candida*: um desafio para o controle de infecção hospitalar. **Revista Brasileira de Microbiologia Clínica**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 55-62, 2010.

BASSETTI, M.; GARNACHO-MONTERO, J.; CALANDRA, T.; KULLBERG, B.; DIMOPOULOS, G.; AZOULAY, E.; CHAKRABARTI, A.; KETT, D.; LEON, C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; SANGUINETTI, M. TIMSIT, J.F.; RICHARDSON, M.D. SHORR, A.; CORNELLY, O.A. Intensive care medicine research agenda on invasive fungal infection in critically ill patients. **Intensive Care Med.**, [S.l.], v. 43, p. 1225–1238, 2017.

BASTOS, R. W.; PERES, N. T. A.; GALDINO, K. J.; SILVA, G. da; et al. Antifungal resistance in yeasts from One Health perspective: a Brazilian study. **Science of the Total Environment**, [S.l.], v. 946, p. 179139, 2025. Disponível em:https://www.researchgate.net/publication/390027357_Antifungal_resistance_in_yeasts_from_One_Health_perspective_A_Brazilian_study. Acesso em: 8 out. 2025.

BAYS, D.J.; JENKINS, E.N.; LYMAN, M.; CHILLER, T.; STRONG, N.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; HOENIGL, M.; PAPPAS, P.G.; THOMPSON, G.R. Epidemiology of Invasive Candidiasis. **Clin Epidemiol.**, [S.l.], v. 16, p. 549–566, 2024.

BELENKY, P.; CAMACHO, D.; COLLINS, J.J. Fungicidal Drugs Induce a Common Oxidative-Damage Cellular Death Pathway. **Cell Rep.**, [S.l.], v. 3, n. 350–358, 2013.

BENTO, L. A. et al. Análise da tolerância ao cloreto de benzalcônio em isolados bacterianos de superfícies hospitalares. **Revista de Controle de Infecção**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 112-118, 2018.

BORMAN, A. M.; JOHNSON, E. M. Changes in fungal taxonomy: mycological rationale and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 36, n. 4, e0009922, 2023.

BORMAN, A.M.; JOHNSON, E. M. Name Changes for Fungi of Medical Importance, 2018 to 2019. **J Clin Microbiol.**, [S.l.], v. 59, n. 4, p. e00331–21, 2021.

BORTOLAMI, M. et al. Design, synthesis and biological evaluation of a series of iron and copper chelating deferiprone derivatives as new agents active against *Candida albicans*. **Bioorg Med Chem Lett.**, [S.l.], v. 42, 2021.

BOTTERY, M.; SEDIK, S.; SCHWARTZ, I. S.; HOENIGL, M.; VAN RHIJN, N. Climate Change: Shifting Boundaries of Fungal Disease in Europe and Beyond. **Thorax**, [S.l.], v. 80, n. 6, p. 523–531, jun. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/thorax-2024-222168>. Acesso em: 8 out. 2025.

BRILHANTE, R. S. N. et al. The iron chelator deferiprone inhibits *Sporothrix spp.* planktonic growth and biofilm formation. **Mycopathologia**, [S.l.], v. 186, n. 4, p. 575–581, 2021.

BRILHANTE, R.S.N. et al. Antifungal activity of deferiprone and EDTA against *Sporothrix spp.*: Effect on planktonic growth and biofilm formation. **Med Mycol.**, [S.l.], v. 59, p. 537–544, 2021.

BUDAI, M.M.; VARGA, A.; MILESZ, S.; TÓZSÉR, J. BENKŐ, S. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans* activate the NLRP3 inflammasome. **Molecular Immunology**, [S.l.], v. 56, n. 4, p. 471-479, 2013.

BUFFET-BATAILLON, S. et al. Quaternary ammonium compounds: from antiseptic to antibiotic-resistance in environment and human health. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 18, n. 4, p. 1912, 2021.

CASADEVALL, A.; KONTOYIANNIS, D. P.; ROBERT, V. On the emergence of *Candida auris*: climate change, azoles, swamps, and birds. **mBio**, [S.l.], v. 10, n. 4, e01397-19, 2019.

CASTELO-BRANCO, D. et al. Collateral consequences of agricultural fungicides on pathogenic yeasts: A One Health perspective to tackle azole resistance. **Frontiers in Fungal Biology**, [S.l.], v. 4, p. 111234, 2023.

CASTELO-BRANCO, D. S. C. M. et al. Sidrim, Mini-review: from in vitro to ex vivo studies: an overview of alternative methods for the study of medical biofilms. **Biofouling**, [S.l.], v. 36, n. 9, p. 1129-1148, 2020.

CASTELO-BRANCO, D., LOCKHART, S. R., CHEN, Y., SANTOS, D. A., HAGEN, F., HAWKINS, N. J., et al. Azole resistance in *Candida* from animals calls for the One Health approach to tackle the emergence of antimicrobial resistance. **Medical Mycology**, [S.l.], v. 58, n. 7, p. 896–905, 2020.

CAZA, M.; KRONSTAD, J. W. Uptake and utilization of iron by pathogenic fungi. **Frontiers in Bioscience (Landmark Ed)**, [S.l.], v. 18, n. 4, p. 770-781, 2013.

CHAKRABORTY, T., TÓTH, Z., TÓTH, R., VÁGVÖLGYI, C.; GÁCSEER, A. Iron metabolism, pseudohypha production, and biofilm formation through a multicopper oxidase in the human-pathogenic fungus *Candida parapsilosis*. **Mosphere**, [S.l.], v. 5, n. 3, p. 10-1128, 2020.

CHATZIMOSCHOU, A. et al. Activities of triazole-echinocandin combinations against *Candida* species in biofilms and as planktonic cells. **Antimicrob Agents Chemother**, [S.l.], v. 55, p. 1968–1974. 2011.

CHEN, C.; PANDE, K. S.; FRENCH, D.; TUCH, B.B.; NOBLE, S.M. An iron homeostasis regulatory circuit with reciprocal roles in *candida albicans* commensalism and pathogenesis. **Cell Host Microbe**, [S.l.], v. 10, p. 118–135, 2011.

CHIESI. **Ferriprox® (Deferiprona)**: Bula. Chiesi Farmacêutica Ltda., 2021.

CHOI, C. Y. et al. Systematic Review of Health Risks Posed by Exposure to Quaternary Ammonium Compounds. **Environmental Science & Technology**, [S.l.], v. 52, n. 24, p. 14041-14052, 2018.

CHOW, N. A. et al. Tracing the evolutionary emergence of *Candida auris* in global healthcare settings. **Emerging Infectious Diseases**, [S.l.], v. 26, n. 6, p. 1192–1201, 2020.

CHOWDHARY, Anuradha et al. Epidemiology and drug resistance among *Candida* pathogens in Africa: *Candida auris* could now be leading the pack. **The Lancet Microbe**, [S.l.], v. 6, n. 3, p. e100996, 2024.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **M27-S4**: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 4. ed. Wayne, PA: CLSI, 2017.

COLOMBO, A. L., et al. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [S.l.], v. 46, n. 3, p. 195-207, 201.

CORAÇA-HUBER, D. C. et al. Iron chelation destabilizes bacterial biofilms and potentiates the antimicrobial activity of antibiotics against coagulase-negative Staphylococci. **Pathogens and Disease**, v. 76, n. 5, 2018.

CORRÊA-MOREIRA, D.; DA COSTA, G. L.; DE LIMA NETO, R. G. et al. Screening of *Candida* spp. in wastewater in Brazil during COVID-19 pandemic: workflow for monitoring fungal pathogens. **BMC Biotechnology**, [S.l.], v. 24, p. 43, 2024.

COSTA, A. C. **Atividade antifúngica dos quelantes deferiprona e ácido etilenodiaminotetracético frente a *Sporothrix spp.*: efeito no crescimento planctônico e formação de biofilmes.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2020.

DESTOUMIEUX-GARZÓN, D., MAVINGUI, P., BOETSCH, G., BOISSIER, J., DARRIET, F., DUBOZ, P., FRITSCH, C., GIRAUDOUX, P., LE ROUX, F., MORAND, S., PAILLARD, C., PONTIER, D., SUEUR, C.; VOITURON, Y. The One Health concept: 10 years old and a long road ahead. **Frontiers in Veterinary Science**, [S.l.], v. 5, n. 4, 2018.

DIAZ, L. E.; DEL CAMPO, R. M.; MARA, H. In Vitro Effectiveness of Disinfectants on *Geotrichum citri-aurantii* Spore Viability. **Acta Horticulturae**, Leuven, n. 1065, p. 1571-1575, 2015.

DOMÁN, M., BALLA, V., VARGA, S. G., OROSZ, G., SZEKERES, A., TÁNCZOS, B., & VÁGVÖLGYI, C. Genomic epidemiology of antifungal resistance in human and avian isolates of *Candida albicans*: a pilot study from the One Health perspective. **Frontiers in Veterinary Science**, [S.l.], v. 10, 2024.

DONDERS, G.G.G.; SOBEL, J.D. *Candida* vulvovaginitis: A store with a buttery and a show window. **Mycoses**, [S.l.], v. 60, p. 70–72, 2017.

DOUVAS, G. S.; MAY, M. H.; KOLNAGOU, A.; KONTOGHIORGHES, G. J. Effects on *Mycobacterium avium* replication in normal human macrophages by deferiprone (L1) and other iron chelators. Possible implications on toxicity. **Arzneimittel-Forschung**, [S.l.], v. 52, n. 1, p. 28-34, 2002.

ELLWANGER, J. H.; CHIES, J. A. B. Saúde Única (*One Health*): uma abordagem para entender, prevenir e controlar as doenças infecciosas e parasitárias. **Revista Bio Diverso**, [S.l.], v. 2, 2023.

FABIO, G. et al. Reversal of cardiac complications by deferiprone and deferoxamine combination therapy in a patient affected by a severe type of juvenile hemochromatosis (JH). **Blood**, [S.l.], v. 110, n. 1, p. 86-88, 2007.

FAO, OIE & WHO. **The FAO–OIE–WHO Collaboration: Sharing responsibilities and coordinating global activities to address health risks at the animal–human–ecosystems interfaces.** Roma: FAO, 2010.

FAO. **FAO One Health Priority Research Agenda on Antimicrobial Resistance.** Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2023.

FEIZI, S. et al. Deferiprone-gallium-protoporphyrin (IX): A promising treatment modality against *Mycobacterium abscessus*. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, [S.l.], v. 143, p. 102431, 2023.

FRANÇA, A. V.; RIBEIRO, S. A.; QUEIROZ-TELLES, F. C. parapsilosis: patógeno emergente em ambiente hospitalar. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 41, n. 3, p. 278-283, 2008.

GARCIA-BUSTOS, V. *Is Candida auris the first multidrug-resistant fungal zoonosis emerging from climate change?* **mBio**, [S.l.], v. 15, n. 4, e00146-24, 2024.

GASPAR, B. S.; ZHANG, F.; ZHANG, Z.; ZHANG, L. Gut Mycobiome: Latest Findings and Current Knowledge Regarding Its Significance in Human Health and Disease. **Microorganisms**, [S.l.], v. 11, n. 5, 2025.

GEORGE, M. E.; GAITOR, T. T.; CLUCK, D. B.; HENAO-MARTÍNEZ, A. F.; SELLS, N. R.; CHASTAIN, D. The impact of climate change on the epidemiology of fungal infections: implications for diagnosis, treatment, and public health strategies. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, [S.l.], v. 12, 2025.

GIFFORD, H. et al. Xenosiderophore transporter gene expression and clade-specific filamentation in *Candida auris* killifish infection. **BioRxiv**, [S.l.], 2024.

GUEDES, G. M. D. M. et al. Antibiofilm activity of promethazine, deferiprone, and Manuka honey in an ex vivo wound model. **Letters in Applied Microbiology**, [S.l.], v. 76, 2023.

GUEDES, G. M. M. et al. In vitro effect of the iron chelator deferiprone on the antimicrobial susceptibility and biofilms of *Burkholderia pseudomallei*. **Biofouling**, [S.l.], v. 39, n. 2, p. 143-151, 2023.

GUEDES, G.M. de et al. In vitro effect of the iron chelator deferiprone on the antimicrobial susceptibility and biofilms of *Burkholderia pseudomallei*. **Biofouling**, [S.l.], v. 39, p. 135–144, 2023.

HAAS, H. Fungal siderophore metabolism with a focus on *Aspergillus fumigatus*. **Nat. Prod. Rep.**, [S.l.], v. 31, p. 1266–1276, 2014.

HAAS, H.; EISENDLE, M.; TURGEON, B.G. Siderophores in fungal physiology and virulence. **Annu Rev Phytopathol**, [S.l.], v. 46, p. 149–187, 2008.

HAVILL, N. L. The evolving role of disinfectants in infection prevention. **Journal of Infection Prevention**, [S.l.], v. 14, n. 4, p. 156-160, 2013.

HAZEN, K. C. New and emerging yeast pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.l.], v. 8, n. 4, p. 462–478, 1995.

HELLWIG, A. H. S. et al. Scroferneker Influence of iron on growth and on susceptibility to itraconazole in *Sporothrix* spp. **Medical Mycology**, [S.l.], v. 59, n. 4, p. 400-403, 2021.

IBRAHIM, A. S. et al. Deferiprone iron chelation as a novel therapy for experimental mucormycosis. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 1070-1073, 2006.

IBRAHIM, A. S. et al. Deferiprone-mediated iron chelation as a novel therapeutic approach against mucormycosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. 4, p. 524-531, 2006.

IOANNOU, C. J.; HANLON, G. W.; DENYER, S. P. Action of disinfectant quaternary ammonium compounds against *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v. 51, n. 1, p. 296–306, 2007.

ISAAC, J.; SCHEINMAN, P. L. Benzalkonium chloride: an irritant and sensitizer. **Dermatitis**, [S.l.], v. 28, n. 6, p. 346–352, 2017.

JADHAV, P.; PAL, M. Candidíase em animais domésticos: um estudo retrospectivo. **Revista Indiana de Microbiologia Veterinária**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 45-50, 2006.

JOLDY DEVI, H.; GNANASEKARAN, P.; SUBARNA PRIYA, M.; PRADEEPA, R.; PANDIAN, S.; SARAVANAN, D.; VIVEKA, G.; FEMI, F. D. Comparative efficacy of *Syzygium cumini* leaf extract and chemical disinfectants against hospital floor isolates: First report of benzalkonium chloride-resistant *Mucor* sp. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, [S. l.], v. 12, n. 8, p. 119-126, 2023.

KÄMMER, B. et al. Espécies de *Candida* e fungemia: panorama atual. **The Lancet Infectious Diseases**, London, v. 20, n. 5, p. 550-557, 2020.

KART, D.; YABANOGLU CIFTCI, S.; NEMUTLU, E. Altered metabolomic profile of dual-species biofilm: Interactions between *Proteus mirabilis* and *Candida albicans*. **Microbiol Res.**, [S.l.], v. 230, p. 126346, 2020.

KENNEWELL, T. L. et al. Deferiprone and Gallium-Protoporphyrin Chitogel as an antimicrobial treatment: Preclinical studies demonstrating antimicrobial activity for *S. aureus* infected cutaneous wounds. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S.l.], v. 273, p. 136173, 2024.

KEYVANFAR, A., NAJAFIARAB, H., TALEBIAN, N., FALAH TAFTI, M., ADELI, G., GHASEMI, Z.; TEHRANI, S. Drug-resistant oral candidiasis in patients with HIV infection: a systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**, [S.l.], v. 24, n. 1, p. 546. 2024, 2024.

KONTOGHIORGHES, G. J. Deferiprone: A Forty-Year-Old Multi-Targeting Drug with Possible Activity against COVID-19 and Diseases of Similar Symptomatology. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 23, n. 12, p. 6734, 2022.

KONTOGHIORGHES, G. J. et al. The role of iron and chelators on infections in iron overload and non iron loaded conditions: prospects for the design of new antimicrobial therapies. **Hemoglobin**, [S.l.], v. 34, n. 3, p. 297-319, 2010.

LAI, Y. W. et al. Synergy and antagonism between iron chelators and antifungal drugs in *Cryptococcus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, [S.l.], v. 48, n. 4, p. 437-443, 2016.

LAILEMA, A.; MANISHA, G.; MUHAMMED, M. M.; KUMAR B. V. Antifungal drug resistance in *Candida*: A special emphasis on amphotericin B. **Microbial Pathogenesis**, [S.l.], v. 132, n. 5, p. 291-316, 2024.

- LASS-FLÖRL, C.; KANJ, S.S.; GOVENDER, N.P.; THOMPSON, G.R.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; GOVRINS, M.A. Invasive candidiasis. **Nat Rev Dis Primers**, [S.l.], v. 10, 2024.
- LEAL, S.M. S. et al. Targeting Iron Acquisition Blocks Infection with the Fungal Pathogens *Aspergillus fumigatus* and *Fusarium oxysporum*. **PLOS Pathogens**, [S.l.], v. 9, n. 7, 2013.
- LEITE-JR, D. P.; SANTOS, D. A.; DOMAN, M.; SZEKERES, A.; BALLA, V.; VAGVÖLGYI, C.; OROSZ, G. The *Candida* Genus Complex: Biology, Evolution, Pathogenicity, Virulence and *One Health* Aspects, Beyond the *Candida albicans* Paradigm. A Comprehensive Review. **Virology & Immunology Journal**, [S.l.], v. 7, n. 2, 2023.
- LESIC, B. et al. Comparison of the effects of deferiprone versus deferoxamine on growth and virulence of *Yersinia enterocolitica*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v. 46, n. 6, p. 1774-1777, 2002.
- LI, H., MIAO, M.-X., JIA, C.-L., CAO, Y.-B., YAN, T.-H., JIANG, Y.-Y., & YANG, F. Interactions between *Candida albicans* and the resident microbiota in the mouth, gut, blood, and vagina. **Frontiers in Microbiology**, [S.l.], v. 13, p. 930495, 2022.
- LIU, D. et al. Synthetic Porcine Hepcidin Exhibits Different Roles in *Escherichia coli* and *Salmonella* Infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v. 61, n. 10, p. e00599-17, 2017.
- LUZ, A. P. et al. Human health hazard assessment of quaternary ammonium compounds: Didecyl dimethyl ammonium chloride and alkyl (C12–C16) dimethyl benzyl ammonium chloride. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, [S.l.], v. 115, art. 104710, jul. 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32640297/>. Acesso em: 5 out. 2024.
- MACEDO, J. D. P., WATANABE, A. A. S., MACHADO, A. B. F., DINIZ, C. G., SILVA, V. L.; DIAS, V. C. Unveiling antifungal resistance and biocide tolerance in clinical isolates of *Candida* spp. **Future Microbiology**, [S.l.], v. 20, n. 6, p. 457-468, 2025.
- MANNS, J. M.; MOSSER, D. M.; BUCKLEY, H. R. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. **Infect Immun.**, [S.l.], v. 62, p. 5154–5156, 1994
- MARINHO, T. V. et al. Isolamento e perfil de resistência de *Candida* spp. de animais domésticos e selvagens. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 10, e18541/16807/232360, 2024.
- MCKEEN, L. 1 - Introduction to Food Irradiation and Medical Sterilization. In: MCKEEN L, editor. **The Effect of Sterilization on Plastics and Elastomers**. 3. ed. William Andrew Publishing, 2012. p. 1–40.
- MOORE, S. F. et al. Mechanisms of cross-resistance between disinfectants and antibiotics in bacteria and fungi. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 73, p. 102298, 2023.
- MORIO, F. et al. Environmental hotspots and azole-resistant *Candida* spp.: A One Health call for action. **Current Opinion in Microbiology**, [S.l.], v. 73, p. 102312, 2023.

MOTTA, J. C.; RIVAS-PINEDO, P.; OÑATE, J. M. Changing Climate, Changing Candida: Environmental and Social Pressures on Invasive Candidiasis and Antifungal Resistance in Latin America. **Journal of Fungi**, Basel, v. 11, n. 9, art. 609, 2025. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2309-608X/11/9/609>. Acesso em: 8 out. 2025.

NAZIK, H. et al. Effects of Iron Chelators on the Formation and Development of *Aspergillus fumigatus* Biofilm. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v. 59, n. 10, p. 6462-6469, 2015.

NAZIK, H. et al. Iron chelator deferiprone inhibits *Aspergillus fumigatus* growth and iron-regulated gene expression. **Medical Mycology**, [S.l.], v. 53, n. 4, p. 385–393, 2015.

NAZIK, H. et al. Stevens, Effects of iron chelators on the formation and development of *Aspergillus fumigatus* biofilm. **Antimicrob Agents Chemother**, [S.l.], v. 59, p. 6514–6520, 2015.

NEVITT, T.; THIELE, D.J. Host Iron Withholding Demands Siderophore Utilization for *Candida glabrata* to Survive Macrophage Killing. **PLoS Pathogens**, [S.l.], v. 7, n. 3, p. e1001322, 2011.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. **J Antimicrob Chemother**, [S.l.], v. 52, n. 1, 2003.

PACHECO, H. L. et al. Resistência aos antifúngicos de *Candida parapsilosis*. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, [S. l.], v. 17, n. 2, p. 145-152, 2022.

PAPPAS, P.G.; LIONAKIS, M.S.; ARENDRUP, M.C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; KULLBERG, B.J. Invasive candidiasis. **Nat Rev Dis Primers.**, [S.l.], v. 4, p. 1–20, 2018.

PARAMBATH, S et al. *Candida albicans*—A systematic review to inform the World Health Organization Fungal Priority Pathogens List. **Med Mycol.**, [S.l.], v. 62, 2024.

PECORARO, M. et al. The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) is required for epithelial invasion. **Molecular Microbiology**, [S.l.], v. 92, n. 5, p. 1056-1074, 2014.

PECORARO, M. et al. Iron chelation strategy for the treatment of *Candida* infections. **Current Pharmaceutical Design**, [S.l.], v. 20, n. 28, p. 4455-4464, 2014.

PEREIRA, B. M. P.; TAGKOPOULOS, I. Benzalkonium chlorides: uses, regulatory status, and microbial resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 85, n. 13, p. e00377-19, 2019.

PIOVESAN PEREIRA, B. M.; TAGKOPOULOS, I. Benzalkonium chlorides: uses, regulatory status, and microbial resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, [S.l.], v. 85, p. 13, 2019.

POLARINE, Jim. Fungicidal activity of globally acceptable quaternary ammonium disinfectants. **Journal of Validation Technology**, [S.l.], v. 18, n. 4, p. 53, 2012.

PRASAD, T., CHANDRA, A., MUKHOPADHYAY, C. K., & PRASAD, R. Unexpected link between iron and drug resistance of *Candida* spp.: iron depletion enhances membrane fluidity and drug diffusion, leading to drug-susceptible cells. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, [S.l.], v. 50, n. 11, p. 3597-3606, 2006.

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

RAJKOWSKA, K.; KOZIRÓG, A.; OTLEWSKA, A.; PIOTROWSKA, M.; NOWICKA-KRAWCZYK, P.; BRYCKI, B.; KUNICKA-STYCZYŃSKA, A.; GUTAROWSKA, B. Quaternary ammonium biocides as antimicrobial agents protecting historical wood and brick. **Acta Biochimica Polonica**, [S.l.], v. 63, n. 1, p. 153-159, 2016.

RAMANAN, N.; WANG, Y. A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. **SCIENCE**, [S.l.], v. 288, n. 5468, p. 1062-1064, 2020.

RANIERI, M. R. M. et al. Thiostrepton Hijacks Pyoverdine Receptors To Inhibit Growth of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v. 63, n. 9, p. e00627-19, 2019.

RIBEIRO, K. V. C. Efeito *in vitro* do quelante de ferro deferiprona sobre *Burkholderia pseudomallei* na forma planctônica e de biofilmes. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022.

RICHTER, K. et al. A Topical Hydrogel with Deferiprone and Gallium-Protoporphyrin Targets Bacterial Iron Metabolism and Has Antibiofilm Activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v. 61, n. 6, p. e00139-17, 2017.

RODRÍGUEZ-CERDEIRA, C.; PINTO-ALMAZÁN, R.; SAUNTE, D.M.L.; HAY, R.; SZEPIETOWSK, J.; MORENO-COUTIÑO, G.; SKERLEV, M.; PROHIC, A.; MARTÍNEZ-HERRERA, E. Virulence and resistance factors of *Nakaseomyces glabratus* (formerly known as *Candida glabrata*) in Europe: A systematic review. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 39, p. 255–256, 2024.

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. Disinfectants: benefits and controversies. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 4, p. 883-891, 2019.

SABINO, R. Addressing Critical Fungal Pathogens Under a One Health Perspective: Key Insights from the Portuguese Association of Medical Mycology. **PMC**, [S.l.], 2025

SALAZAR-HAMM, Paris; TORRES-CRUZ, Terry J. The impact of climate change on human fungal pathogen distribution and disease incidence. **Current Clinical Microbiology Reports**, [S.l.], v. 11, n. 3, p. 140–152, mar. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40588-024-00224-x>. Acesso em: 8 out. 2025.

SANTOS, A. D. et al. Ocorrência de *Candida* spp. em excretas de aves silvestres cativas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 29, n. 12, p. 1153-1158, 2009.

SCHULTZ, M. In Memoriam: James Harlan Steele (1913–2013). **Emerging Infectious Diseases**, [S.l.], v. 20, n. 3, p. 506–507, 2014. Disponível em: Acesso o link do PMC/NIH. Acesso em: 7 out. 2025.

SEDIK, S.; EGGER, M.; HOENIGL, M. Climate change and medical mycology. **Infectious Disease Clinics of North America**, [S.l.], v. 39, n. 1, p. 1–15, dez. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2024.11.002>. Acesso em: 8 out. 2025.

SEIDEL, D.; WURSTER, S.; JENKS, J. D.; SATI, H.; GANGNEUX, J.-P. et al. Impact of climate change and natural disasters on fungal infections. **Lancet Microbe**, [S.l.], v. 5, n. 6, p. e345–e355, jun. 2024.

SHANE, H. L.; LUKOMSKA, E.; KASHON, M. L.; ANDERSON, S. E. Topical application of the quaternary ammonium compound didecyldimethylammonium chloride activates type 2 innate lymphoid cells and initiates a mixed-type allergic response. **Toxicological Sciences**, v. 168, n. 2, p. 508–518, 2019.

SIDRIM, J. J. C.; DE MARIA, G. L.; PAIVA, M. A. N.; ARAÚJO, G. DOS S.; DA GRAÇA-FILHO, R. V.; DE OLIVEIRA, J. S.; SALES, J. A.; PEREIRA-NETO, W. A.; GUEDES, G. M. DE M.; CASTELO-BRANCO, D. DE S. C. M.; DE AGUIAR CORDEIRO, R.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G. Azole-Resilient Biofilms and Non-wild Type *C. albicans* Among *Candida* Species Isolated from Agricultural Soils Cultivated with Azole Fungicides: an Environmental Issue? **Microbial Ecology**, [S.l.], v. 82, n. 4, p. 1080-1083, Nov. 2021.

SINGH, S.; FATIMA, Z.; HAMEED, S. Predisposing factors endorsing *Candida* infections., *Le Infezioni in Medicina: Rivista Periodica Di Ezziologia, Epidemiologia, Diagnostica, Clinica e Terapia*. **Delle Patologie Infettive**, [S.l.], v. 23, p. 211–223, 2015.

SOTERIADOU, K. et al. Effect of iron chelation on the in-vitro growth of *Leishmania* promastigotes. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.l.], v. 35, n. 1, p. 147-154, 1995.

STUPAR, M.; GRBIĆ, M. L.; DŽAMIĆ, A. M.; MARIN, P. D.; RISTIĆ, M. S.; VUJISIC, L. V.; VUKOJEVIC, J. Antifungal activity of selected essential oils and biocide benzalkonium chloride against the fungi isolated from cultural heritage objects. **South African Journal of Botany**, Pretória, v. 93, p. 116-121, 2014.

TAKASHIMA, M.; SUGITA, T. Taxonomy of Pathogenic Yeasts *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, and *Trichosporon*. **Med Mycol J.**, [S.l.], v. 63, n. 4, p. 119–132, 2022.

TEZEL, U.; PAVLOSTATHIS, S. G. Quaternary ammonium compounds as antimicrobial agents, surfactants, and disinfectants: a review. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 49, n. 14, p. 8333-8341, 2015.

THOMPSON, G. R. et al. In vitro and in vivo activity of deferiprone against highly drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v. 56, n. 9, p. 4885-4889, 2012.

THOMPSON, M. G. et al. Antibacterial activities of iron chelators against common nosocomial pathogens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v. 56, n. 10, p. 5219-5226, 2012.

THOMPSON, M.G. et al. Antibacterial Activities of Iron Chelators against Common Nosocomial Pathogens. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 10, p. 5419-5421, 2012.

TRIPATHI, A.; NAHAR, A.; SHARMA, R.; KANASKIE, T.; AL-HEBSHI, N.; PURI, S. High iron-mediated increased oral fungal burden, oral-to-gut transmission, and changes to pathogenicity of *Candida albicans* in oropharyngeal candidiasis. **J Oral Microbiol**, [S.l.], v. 14, 2022.

TRIPATHI, P. et al. Iron sensing and acquisition in pathogenic fungi: Current knowledge and future directions. **Current Opinion in Microbiology**, [S.l.], v. 68, p. 102148, 2022.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **List N. disinfectants for use against SARS-CoV-2; 2022**. Disponível em: <https://www.epa.gov/coronavirus-and-disinfectants/about-list-n-disinfectants-coronavirus-covid-19> Acesso em: 27 jul. 2022.

UNITED STATES. Environmental Protection Agency (USEPA). **Alkyl (C12–C16) Dimethyl Benzyl Ammonium Chloride (ADBAC)**. Washington, D.C.: USEPA, 2017b. Disponível em: *Science and Ethics Review of AEATF II Protocol*. Acesso em: 27 jul. 2022.

UNITED STATES. Environmental Protection Agency (USEPA). **Didecyl Dimethyl Ammonium Chloride (DDAC)**. Washington, D.C.: USEPA, 2017a. Disponível em: *Science Review of AEATF II Wipe Study*. Acesso em: 27 jul. 2025.

UNITED STATES. Environmental Protection Agency (USEPA). **List N: Disinfectants for Coronavirus (COVID-19)**. Washington, D.C.: USEPA, 2024. Disponível em: List N: Disinfectants for Coronavirus (COVID-19). Acesso em: 27 jul. 2025.

UNITED STATES. Environmental Protection Agency (USEPA). **What is an Antimicrobial Pesticide?** Washington, D.C.: USEPA, 2020. Disponível em *Antimicrobial Performance Evaluation Program*. Acesso em: 27 jul. 2025.

VALENTINE, M.; WILSON, D.; GRESNIGT, M. S.; HUBE, B. Vaginal *Candida albicans* infections: host–pathogen–microbiome interactions. **FEMS Microbiology Reviews**, [S.l.], v. 49, n. 1, 2025.

VAN GENECHTEN, W.; VERGAUWEN, R.; VAN DIJCK, P. The intricate link between iron, mitochondria and azoles in *Candida* species. **The FEBS Journal**, v. 291, n. 16, p. 3568-3580, 2024.

WEBER, D. J. et al. Role of the environment in the transmission of *Clostridium difficile* in health care facilities. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, [S.l.], v. 34, n. 10, p. 1047-1053, 2013.

WEBER, T. et al. Iron acquisition and sensing in *Candida glabrata* and its impact on the host-pathogen interaction. **Virulence**, [S.l.], v. 11, n. 1, p. 111-125, 2020.

WEINBERG, E. D. Iron and susceptibility to infectious disease. **Science**, [S.l.], v. 184, n. 4140, p. 952-956, 31 maio 1974.

WEISSENBACH, P. et al. Distinct signalling pathways control haem and siderophore utilization in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, [S.l.], v. 65, n. 1, p. 197-212, 2007.

WEISSMAN, Z.; SHEMER, R.; CONIBEAR, E.; KORNITZER, D. An endocytic mechanism for haemoglobin-iron acquisition in *Candida albicans*. **Mol Microbiol.**, [S.l.], v. 69, p. 201–217, 2008

WHITE, T. C.; ESQUIVEL, B. D.; ROUSE SALCIDO, E. M.; SCHWEIKER, A. M.; BAKER, M. L.; WASSICK, R. S.; STROMBERG, A. J.; MEADOWS, K.; CASADEVALL, A.; GARRY, F. B. Is *Candida auris* the first multidrug-resistant fungal zoonosis emerging from climate change? **mBio**, [S.l.], v. 15, n. 2, 2024.

WINKELMANN, G. Ecology of siderophores with special reference to the fungi. **Biometals**, [S.l.], v. 20, n. 3-4, p. 595-617, 2007.

WIWANITKIT, V. Quantum chemical analysis of the deferiprone–iron binding reaction. **International Journal of Nanomedicine**, [S.l.], v. 1, n. 1, p. 111–113, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/nano.2006.1.1.111>. Acesso em: 9 out. 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fungal Priority Pathogens List to Guide Research, Development and Public Health Action**. Geneva: World Health Organization, 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Action Plan on Antimicrobial Resistance**. Geneva: WHO, 2015.

XU, Y.; HE, Y.; LI, X.; GAO, C.; ZHOU, L.; SUN, S.; PANG, G. Antifungal effect of ophthalmic preservatives phenylmercuric nitrate and benzalkonium chloride on ocular pathogenic filamentous fungi. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 75, n. 1, p. 64-67, 2013.

YUE, X.; YANG, X.; LI, H.; ZHANG, R.; QIN, D. Quaternary ammonium compounds-modified halloysite and its antifungal performance. In: HAN, Y. (Ed.). **Physics and Techniques of Ceramic and Polymeric Materials: Proceedings of the 2018 19th Chinese Materials Conference**, Xiamen, China, 12–16 jul. 2018. Singapore: Springer, 2019. p. 121–131.

ZAREMBER, K. A. et al. Antifungal activities of natural and synthetic iron chelators alone and in combination with azole and polyene antibiotics against *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S.l.], v. 53, n. 6, p. 2686-2692, 2009.

ZAREMBER, K. A. et al. Iron chelation in infectious disease. **Nature Reviews Microbiology**, [S.l.], v. 7, n. 10, p. 770-781, 2009.

ZAREMBER, K.A. et al. Antifungal activities of natural and synthetic iron chelators alone and in combination with azole and polyene antibiotics against *Aspergillus fumigatus*. **Antimicrob Agents Chemother**, [S.l.], v. 53, p. 2654–2656, 2009.

ZINSSTAG, J. et al. From “one medicine” to “one health” and systemic approaches to health and well-being. **Preventive Veterinary Medicine**, [S.l.], v. 101, n. 3-4, p. 148–156, 2011.