



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

**THAIS LIMA FERREIRA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA MANGIFERINA  
FRENTE A CEPAS DE *Candida* spp. RESISTENTES AO FLUCONAZOL E SEU  
POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO**

**FORTALEZA**

**2023**

THAIS LIMA FERREIRA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA MANGIFERINA FRENTE  
A CEPAS DE *Candida* spp. RESISTENTES AO FLUCONAZOL E SEU POSSÍVEL  
MECANISMO DE AÇÃO

Dissertação de Mestrado apresentado ao  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Médica da Faculdade de Medicina da  
Universidade Federal do Ceará.

Orientadora: Profa. Dra. Cecília Rocha da Silva  
Coorientador: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre  
Júnior

FORTALEZA

2023

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

---

- F1a Ferreira, Thais Lima.  
Avaliação in vitro da atividade antifúngica da mangiferina frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol e seu possível mecanismo de ação / Thais Lima Ferreira. – 2023.  
104 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós- Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2023.  
Orientação: Profa. Dra. Cecilia Rocha da Silva.  
Coorientação: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.
1. Composto bioativo. 2. *Candida*. 3. Resistência microbiana. 4. Combinação de drogas. I. Título.  
CDD 616.9
-

THAIS LIMA FERREIRA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA MANGIFERINA FRENTE  
A CEPAS DE *Candida* spp. RESISTENTES AO FLUCONAZOL E SEU POSSÍVEL  
MECANISMO DE AÇÃO

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

Aprovada em: 12/07/2023.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Cecilia Rocha da Silva (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Solange de Oliveira Pinheiro  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof. Dr. Alexandre Magno Rodrigues Teixeira  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

A Deus.

Aos meus pais, Antonete e Ferreira.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por todas as oportunidades recebidas até o momento.

Aos meus pais, por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado.

À Profa. Dra. Cecília Rocha da Silva, pela excelente orientação, pelo apoio, pelos ensinamentos, sugestões e contribuições recebidos ao longo do mestrado.

Ao Prof. Dr. Hélio Vitoriano pela coorientação, pelo apoio, pelos ensinamentos e por me receber no LABIMAN.

Ao Prof. Dr. João Batista, pelo apoio e pelos ensinamentos recebidos no início da minha carreira acadêmica, que foram fundamentais para que eu pudesse chegar até este momento.

À Profa. Dra. Lívia Sá, por sempre se prontificar a ajudar e por suas excelentes contribuições, sugestões e ensinamentos.

Aos amigos e integrantes do LABIMAN, especialmente a Ma. Vitória Cabral, Ma. Lisandra Juvencio e Leilson Carvalho, por suas relevantes contribuições para o desenvolvimento do projeto.

Aos membros da banca examinadora pelo tempo, pelas valiosas contribuições e sugestões.

À coordenação e ao corpo docente do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica por suas contribuições em nossa formação acadêmica.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

“A persistência é o menor caminho do êxito”

(Charles Chaplin)

## RESUMO

As infecções fúngicas matam cerca de 1,5 milhão de pessoas todo ano. Dentre os fungos patogênicos de importância médica tem-se as leveduras do gênero *Candida*, responsáveis por taxas de mortalidade que variam de 20 a 50%, principalmente por causarem infecções oportunistas em indivíduos imunocomprometidos. O fluconazol é um fármaco comumente utilizado na clínica para o tratamento das candidíases. Com o aumento de cepas resistentes ao fluconazol, os produtos naturais podem ser uma fonte de compostos bioativos com atividade antimicrobiana. Sendo assim, este estudo teve por objetivo avaliar a atividade antifúngica da mangiferina diante de cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol. Os ensaios de microdiluição em caldo mostraram que a mangiferina apresenta atividade antifúngica diante de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis* resistentes ao fluconazol, além de apresentar atividade sinérgica ou aditiva com fluconazol, itraconazol e anfotericina B, demonstrada por meio do índice de concentração inibitória fracionada. A mangiferina foi capaz de melhorar a atividade antibiofilme dos antifúngicos frente ao biofilme formado e em formação de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol, por meio do ensaio colorimétrico com MTT. Ensaios *in silico* mostraram que a mangiferina apresentou interações com alvos de *Candida albicans* responsáveis por mecanismos relacionados à patogênese, como exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase, CYP51 e complexo de citocromo BC1 de levedura. Ensaios de citometria de fluxo mostraram que a mangiferina foi capaz de provocar a despolarização de membrana mitocondrial, aumento das espécies reativas de oxigênio e a externalização da fosfatidilserina, sugerindo morte celular por apoptose. Por fim, a mangiferina não apresentou efeito citotóxico em células MRC-5 pelo teste alamar blue. Dessa forma, a mangiferina, isolada e combinada à antifúngicos convencionais, apresenta potencial antifúngico diante de células planctônicas e biofilmes de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol.

**Palavras-chave:** Composto bioativo. *Candida*. Resistência microbiana. Combinação de drogas.

## ABSTRACT

Yeast infections kill an estimated 1.5 million people each year. Among the pathogenic fungi of medical importance, there are yeasts of the genus *Candida*, responsible for mortality rates ranging from 20 to 50%, mainly because they cause opportunistic infections in immunocompromised individuals. Fluconazole is a drug commonly used in the clinic for the treatment of candidiasis. With the increase of fluconazole resistant strains, natural products can be a source of bioactive compounds with antimicrobial activity. Therefore, this study aims to evaluate the antifungal activity of mangiferin against strains of *Candida* spp. resistant to fluconazole. The microdilution assays in broth showed that mangiferin has antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis* resistant to fluconazole, in addition to presenting synergistic or additive activity with fluconazole, itraconazole and amphotericin B, demonstrated by the calculation of the fractional inhibitory concentration index. Mangiferin was able to improve the antibiofilm activity of antifungals against preformed and mature *Candida* spp. resistant to fluconazole, by means of the colorimetric assay with MTT. In silico assays showed that mangiferin exhibited interactions with *Candida albicans* targets responsible for mechanisms related to pathogenesis, such as exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase, CYP51 and yeast cytochrome BC1 complex. Flow cytometry assays showed that mangiferin was able to cause depolarization of the mitochondrial membrane, increase in reactive oxygen species and externalization of phosphatidylserine, suggesting cell death by apoptosis. Finally, mangiferin showed no cytotoxic effect on MRC-5 cells by the alamar blue test. Thus, mangiferin, isolated and combined with conventional antifungals, has antifungal potential against planktonic cells and biofilms of *Candida* spp. resistant to fluconazole.

**Keywords:** Bioactive compound. *Candida*. Microbial resistance. Drug combination.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mecanismo de ação de antifúngicos frente a <i>Candida</i> spp.....	12
Figura 2 - Representação estrutural do Fluconazol .....	13
Figura 3 - Representação estrutural do Itraconazol .....	14
Figura 4 - Representação estrutural da Anfotericina B .....	15
Figura 5 - Mecanismos de resistência apresentados por <i>Candida</i> spp. frente aos azóis .....	18
Figura 6- Processo de formação do biofilme.....	24
Figura 7 - Representação estrutural da Mangiferina em pH fisiológico.....	30
Figura 8- Fluxograma da metodologia utilizada.....	33
Figura 9 - Atividade da Mangiferina isolada e combinada aos antifúngicos frente ao biofilme de <i>Candida</i> spp .....	45
Figura 10- Redução do número de células viáveis das cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes ao fluconazol .....	48
Figura 11 - Avaliação do potencial transmembranar mitocondrial das cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes ao fluconazol.....	50
Figura 12 - Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio pelas cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes ao fluconazol .....	51
Figura 13 - Marcação da fosfatidilserina com anexina V em cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes ao fluconazol.....	53
Figura 14- Complexo de interação formado entre a Mangiferina e os principais alvos de <i>C. albicans</i> .....	58
Figura 15 - Visualização tridimensional dos resultados das simulações de docking para <i>C. albicans</i> ALS3 com a Mangiferina e o fluconazol .....	61
Figura 16 - Células planctônicas de <i>C. albicans</i> tratadas com Mangiferina e antifúngicos isolados e combinados visualizadas por microscopia eletrônica de varredura.....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade antifúngica da Mangiferina e dos antifúngicos frente as cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes ao fluconazol .....	40
Tabela 2 - Interação resultante das combinações entre a Mangiferina e os antifúngicos.....	42
Tabela 3 - Pontuações de interação de ligação, RMSD, $K_i$ , $pK_i$ , aminoácidos e tipos de interação de Mangiferina nos receptores <i>C. albicans</i> .....	54
Tabela 4 - Tipos de interações e distâncias (Å) entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos de <i>Candida albicans</i> ALS3 .....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ampho B	Anfotericina B
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FLC	Fluconazol
HEPES	N - (2-Hidroxietyl) piperazina-N' - (ácido 2-etanosulfônico)
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória de cinquenta por cento
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
IP	Iodeto de propídio
ITR	Itraconazol
<i>M. indica</i>	<i>Mangifera indica</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MGF	Mangiferina
MMOPS	Ácido Morfolinopropanosulfônico
MTT	(3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazólio)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	4
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 Gênero <i>Candida</i> .....	5
2.2 Epidemiologia das infecções por <i>Candida</i> spp. ....	7
2.3 Antifúngicos disponíveis contra <i>Candida</i> spp. ....	11
2.4 Resistência aos azóis .....	16
2.5 Fatores de Virulência de <i>Candida</i> spp. ....	20
2.5.1 Mudança fenotípica.....	20
2.5.2 Adesão a superfícies .....	21
2.5.3 Enzimas hidrolíticas.....	22
2.5.4 Biofilmes .....	23
2.5.5 Fatores de virulência de <i>Candida</i> spp. candidatos a alvo de novas drogas antifúngicas .....	25
2.6 Novas estratégias terapêuticas contra <i>Candida</i> spp.....	27
2.7 Mangiferina.....	29
3. HIPÓTESES .....	31
4. OBJETIVOS .....	32
4.1 Objetivo geral.....	32
4.2 Objetivos específicos.....	32
5. MATERIAS E MÉTODOS .....	33
5.1 Microrganismos e fármacos utilizados .....	33
5.2 Teste de sensibilidade antifúngica (TSA) .....	34
5.3 Ensaio de <i>checkerboard</i> .....	34
5.4 Ensaio com biofilme .....	34
5.5 Ensaio de citotoxicidade.....	35
5.5.1 Avaliação da viabilidade celular .....	35
5.5.2 Teste hemolítico.....	35
5.6 Ensaio de citometria de fluxo .....	36
5.6.1 Determinação da viabilidade celular .....	36
5.6.2 Avaliação do potencial de membrana ( $\Delta\psi_m$ ).....	36
5.6.3 Detecção das espécies reativas de oxigênio (EROs) .....	36
5.6.4 Marcação por Anexina V.....	37
5.7 Docagem molecular .....	37

5.7.1 Preparação de ligantes e receptores para simulações de docagem .....	37
5.7.2 Análise do possível mecanismo de ação <i>in silico</i> .....	37
5.7.3 Simulação da docagem molecular .....	38
5.7.4 Visualização dos modos de ligação e interações receptor-ligante .....	38
5.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	38
5.9 Análise estatística.....	39
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
<b>6.1 Atividade antimicrobiana da Mangiferina.....</b>	<b>40</b>
<b>6.2 Interação da Mangiferina com os antifúngicos.....</b>	<b>41</b>
<b>6.3 Atividade antimicrobiana da Mangiferina sobre o biofilme de <i>Candida</i> spp. ....</b>	<b>43</b>
6.3.1 Atividade antimicrobiana das combinações diante do biofilme pré-formado de <i>Candida</i> spp. ....	43
6.3.2 Atividade antimicrobiana das combinações diante do biofilme formado de <i>Candida</i> spp. ....	44
<b>6.4 Ensaio de citometria de fluxo .....</b>	<b>48</b>
6.4.1 Viabilidade celular .....	48
6.4.2 Alteração no potencial transmembranar mitocondrial de <i>Candida</i> spp. ....	49
6.4.3 Produção de EROs .....	50
6.4.4 Externalização da fosfatidilserina .....	52
<b>6.5 Ensaios de docagem molecular .....</b>	<b>53</b>
6.5.1 Interação da Mangiferina com alvos de <i>C. albicans</i> relacionados a diferentes mecanismos de ação .....	53
6.5.2 Interação da Mangiferina com o resíduo ALS3 de <i>C. albicans</i> .....	60
<b>6.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....</b>	<b>61</b>
<b>6.7 Ensaio de citotoxicidade e hemolítico da Mangiferina.....</b>	<b>63</b>
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>8 CONCLUSÃO.....</b>	<b>70</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXO A – TABELA SUPLEMENTAR (S1).....</b>	<b>93</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Apesar de fazer parte da microbiota comensal da pele, mucosa oral, vaginal e gastrointestinal humana, as leveduras do gênero *Candida* são um dos principais patógenos conhecidos por causarem infecções superficiais e sistêmicas (BERKOW; LOCKHART, 2017; ICHIKAWA et al., 2019; VIEIRA et al., 2018). Essas infecções oportunistas costumam acometer principalmente indivíduos imunocomprometidos, destacando-se a espécie *Candida albicans* como a principal responsável por essas infecções. Contudo, o número de infecções causadas por *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* vem aumentando e o seu isolamento tornou-se frequente (MARAK; DHANASHREE, 2018; SANTOS et al., 2018a).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou em 2022 uma lista de patógenos fúngicos prioritários. Sendo assim, 19 patógenos fúngicos foram classificados e categorizados em três grupos prioritários, sendo *C. albicans* classificada no grupo de prioridade crítica, enquanto *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foram classificadas no grupo de alta prioridade, o que reforça a necessidade de estudos voltados para esses patógenos (WHO, 2022).

Dentre os fármacos disponíveis para o tratamento de doenças fúngicas, o fluconazol (FLC) é um dos principais utilizados na clínica para o tratamento das candidíases (NOCUA-BÁEZ et al., 2020). Contudo, seu uso de forma generalizada, em infecções recorrentes e em tratamentos de longa duração tem levado ao aumento de cepas de *Candida* resistentes ao FLC. Sendo assim, a falta de novos fármacos antifúngicos, o pequeno arsenal de antifúngicos disponíveis e o crescente aumento de cepas resistentes, faz necessária a busca por novas estratégias antifúngicas (BERMAN; KRYSAN, 2020; MARAK; DHANASHRE, 2018).

Uma alternativa a essa problemática é a combinação de drogas. Essa combinação pode resultar em drogas que poderão agir de forma sinérgica ou aditiva, diminuindo a concentração necessária dos fármacos para atingir o efeito desejado, além de apresentar mecanismo de ação em mais de um alvo por vez, dificultando o surgimento de mecanismos de resistência (LEE et al., 2020; MURPHY; BICANIC, 2021).

Junto a isso, a obtenção de compostos antifúngicos provenientes de produtos naturais também é uma proposta visada, já que esses produtos apresentam compostos bioativos, os quais podem ter atividade antimicrobiana, além de possivelmente apresentar segurança para uso em humanos e animais, ter baixo custo e apresentar poucos efeitos colaterais (ASIF et al., 2016; SANTOS et al., 2018b, SOLIMAN et al., 2017). Os compostos bioativos também podem apresentar atividades sinérgica ou aditiva com antifúngicos tradicionais, representando uma

alternativa promissora contra espécies resistentes aos antifúngicos (RODRIGUES et al., 2016; SANTOS et al., 2018b).

Sendo assim, a Mangiferina (MGF) (1,3,6,7-Tetrahydroxixantona C<sub>2</sub>-β-D-glucosídeo) é uma xantona encontrada naturalmente em plantas da família *Anacardiaceae* e *Gentianaceae*, como *Mangifera indica* (GOLD-SMITH; FERNANDEZ; BISHOP, 2016). Por possuir diversas atividades terapêuticas, é utilizada na medicina tradicional em alguns países por apresentar propriedades antimicrobiana, antioxidante, hepatoprotetora, anticancerígena, imunomoduladora, antidiabética, hipolipêmica e analgésica (IMRAN et al., 2017; KUMAR et al., 2021).

Alguns estudos já demonstram que a MGF apresenta tanto atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*, dentre outras, quanto antifúngica contra *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum* e *C. albicans* (ISHAQUE et al., 2022; ŠAVIKIN et al., 2009; SHEN et al., 2021; ŠILER et al., 2014; TCHINDA et al., 2019). Contudo, até o presente momento, não há relatos na literatura sobre a atividade antimicrobiana da MGF diante de *Candida* spp. resistente ao FLC e nem de sua interação com antifúngicos convencionais, como azóis e polienos.

Dessa forma, este estudo visa avaliar a atividade antifúngica da MGF em cepas de *Candida* spp. resistentes ao FLC, tanto na forma planctônica quanto na forma de biofilme, além de avaliar seu possível mecanismo de ação contra as células fúngicas, sua citotoxicidade e sua interação farmacológica quando combinada a antifúngicos convencionais, como FLC, Itraconazol (ITR) e Anfotericina B (Ampho B).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Gênero *Candida*

Taxonomicamente, *Candida* spp. pertence ao reino *Fungi*, divisão *Eumycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Blastomycetes* e família *Cryptococcaceae* (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). Existem mais de 300 espécies pertencentes ao gênero *Candida*. As espécies patogênicas mais conhecidas são *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr* e *C. lusitaniae*. Contudo, é sabido que outras espécies consideradas não patogênicas também já foram isoladas de materiais clínicos, assim como novas espécies de importância médica surgiram, como *C. auris*, um patógeno emergente, que pode causar surtos em hospitais (TAKASHIMA; SUGITA, 2022).

Quanto a sua morfologia, *Candida* spp. possuem um formato oval (leveduriforme), apresentando brotamentos durante seu crescimento. Além disso, dependendo da espécie,

também produzem hifas e/ou pseudo-hifas como resultado do crescimento contínuo dos brotos, formando cadeias longas que possuem constrição nos septos entre as células, com exceção da espécie *C. glabrata*, que produz apenas blastoconídios. A espécie *C. albicans* é pleomórfica e também produz hifas verdadeiras, assim como tubo germinativo, durante a sua incubação em soro a 37°C por 90 minutos (BROOKS et al., 2014).

De modo geral, as espécies desse gênero crescem em meio ágar, a temperatura de 25°C a 37°C, em incubação de 24 a 72h, produzindo colônias de textura glabrosa e relevo convexo, com cor variando de branca a creme, verso e reverso de mesma coloração e sem pigmento difusível, além de apresentar odor de levedo (BROOKS et al., 2014; SIDRIM; ROCHA, 2004). Quanto aos aspectos morfológicos observados na prova de microcultivo, *C. albicans* apresenta blastoconídios em cacho e clamidoconídios, *C. tropicalis* apresenta blastoconídios em cadeias simples ou ramificadas, *C. parapsilosis* apresenta blastoconídios gigantes e pseudo-hifas curvas e finas e *C. glabrata* apresenta apenas pequenos blastoconídios (SIDRIM; ROCHA, 2004).

A espécie *C. albicans* faz parte da microbiota comensal humana, sendo encontrada em diversos sítios, como nas mucosas orofaríngea, intestinal, vaginal e na pele. Em indivíduos saudáveis não costuma causar infecções. Contudo, quando há uma perturbação na homeostase do organismo humano, essa levedura multiplica-se e invade os tecidos, causando doenças conhecidas como candidíases, as quais podem ser orofaríngea, esofágica, vulvovaginal e cutânea. Em casos mais graves também pode causar infecções invasivas, disseminando-se no sangue (candidemia), como também no sistema nervoso central, olhos, coração, ossos e outros órgãos internos, causando grande mortalidade em indivíduos imunocomprometidos (LOPES; LIONAKIS, 2022; TALAPKO et al., 2021; WHO, 2022).

As espécies *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* também fazem parte da microbiota humana, assim como também podem causar infecções invasivas, afetando indivíduos com doenças graves e com sistema imunológico debilitado. *C. tropicalis* destaca-se por afetar a população pediátrica, principalmente em unidades de terapias intensivas (UTI), mas também possui altas taxas de mortalidade em adultos. Já *C. parapsilosis* destaca-se por causar infecções invasivas em indivíduos com câncer e que foram submetidos a transplante de órgãos ou medula óssea, afetando também crianças (WHO, 2022).

Por outro lado, o patógeno emergente *C. auris* apresenta algumas características distintas das outras espécies de *Candida*. Dentre essas características, podemos citar a termotolerância, por tolerar altas temperaturas e crescer a 42°C, e a osmotolerância, por tolerar concentrações de sal (NaCl)  $\geq 10\%$  (AHMAD; ALFOUZAN, 2021; DU et al., 2020). *C. auris* também pode sobreviver em superfícies por um longo período de tempo e resistir a ação de alguns

desinfetantes, além de apresentar resistência intrínseca a uma ou mais classes de fármacos utilizados nas infecções por *Candida* spp. (DU et al., 2020; WHO, 2022).

Quanto a sua morfologia, *C. auris* é um blastoconídeo que se reproduz por brotamento. Contudo, algumas cepas formam agregados celulares, por não conseguir liberar as células-filhas durante o processo de brotamento. Esses agregados são semelhantes a pseudo-hifas. Portanto, *C. auris* apresenta cepas agregativas e não agregativas. Quanto a produção de hifas verdadeiras, ainda não há um consenso na literatura sobre isso, mas acredita-se que essas podem ser produzidas por *C. auris* em condições específicas (AHMAD; ALFOUZAN, 2021; DU et al., 2020).

Essa espécie encontra-se principalmente na pele de pacientes colonizados, podendo colonizar também axila, virilha, trato respiratório e urinário (AHMAD; ALFOUZAN, 2021; DU et al., 2020). Sua transmissão costuma acontecer dentro de hospitais, onde é responsável por causar candidemias. As infecções por *C. auris* afetam indivíduos imunocomprometidos, idosos, pacientes submetidos a cirurgia, hemodiálise, ventilação mecânica, nutrição parenteral e ao tratamento com antibióticos de amplo espectro, além de indivíduos com dispositivos médicos, diabetes e doença renal crônica, dentre outros fatores (DU et al., 2020; WHO, 2022).

## **2.2 Epidemiologia das infecções por *Candida* spp.**

Apesar de serem subestimadas, as infecções fúngicas representam grande ameaça à população, matando cerca de 1,5 milhão de pessoas todo ano, tendo uma taxa de mortalidade tão expressiva quanto a de doenças, como a tuberculose e a malária (FISHER et al., 2018). O número de casos de doenças fúngicas graves tem aumentado, devido ao crescimento do número de pessoas imunocomprometidas, destacando-se pacientes oncológicos, transplantados e portadores do vírus HIV, e também de idosos (ENOCH et al., 2017; TORTORANO et al., 2021).

Dentre os principais patógenos fúngicos de importância médica pode-se destacar as leveduras do gênero *Candida*. A espécie mais associada a infecções por *Candida* spp. é *Candida albicans*. Contudo, é possível notar que nos últimos anos, apesar de ainda ser maior em números, as infecções por *C. albicans* vem diminuindo, passando de 57,4% entre 1997 e 2001 para 46,4% entre 2015 e 2016, enquanto há um aumento no número de infecções causadas por outras espécies de *Candida* não-*albicans*, como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. auris* (DU et al., 2020; FRIEDMAN; SCHWARTZ, 2019; LAMOTH et al., 2018; PFALLER et al., 2019; VASILYEVA et al., 2018).

A distribuição das espécies costuma estar relacionada com sua localização geográfica. Na Europa, *C. albicans* é a maior causadora de infecções, correspondendo a 70% dos casos,

seguida por *C. glabrata*, *C. parapsilosis* (ambas com 14%), *C. tropicalis* (7%) e *C. krusei* (2%). Já no Brasil, *C. albicans* também é a maior causadora de infecções, representando 40,9% dos casos, seguida por *C. tropicalis* com 20,9%, *C. parapsilosis* com 20,5% e *C. glabrata* com 4,9% (RODRIGUES; GOMES; RODRIGUES, 2020). Nos Estados Unidos há predominância de infecções por *C. albicans* (36%), seguido por *C. glabrata* (27%), *C. parapsilosis* (15%) e *C. tropicalis* (9%) (CLEVELAND et al., 2015).

Sendo assim, espécie *C. glabrata* é mais comum na América do Norte, enquanto que *C. parapsilosis* é mais comum na América Latina, ambas correspondendo a 24,3% dos isolados nos respectivos locais. No Mediterraneo a espécie mais comum é *C. parapsilosis* e na Ásia há uma maior prevalência de *C. tropicalis*, sendo que na China essa espécie corresponde a 18,7% dos isolados da corrente sanguínea, atrás apenas de *C. albicans* e *C. parapsilosis* que correspondem a 32,9% e 27,1% dos isolados, respectivamente (PFALLER et al., 2019). Além das áreas geográficas, as infecções também estão relacionadas ao estado de saúde da população analisada, acometendo principalmente pacientes hospitalizados, internados em UTI e enfermarias, pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos e hematológicos, e neonatos (TORTORANO et al., 2021).

Em relação as taxas de mortalidade no Brasil, um estudo mostrou que a mortalidade por candidemia em um hospital no Nordeste brasileiro foi de 55,9%. As espécies mais prevalentes foram *C. albicans* (35,5%), *C. tropicalis* (27,4%), *C. parapsilosis* (21,6%) e *C. glabrata* (11,8%), contudo, as principais responsáveis pelas causas de morte foram *C. albicans* (61,1%), e *C. glabrata* (100%). Além disso, os principais fatores de risco associados a morte por candidemia foram idade, choque séptico e ventilação mecânica. Esse estudo também mostrou que, apesar do baixo índice de resistência a antifúngicos, 20,5% dos isolados eram sensíveis dose-dependente ao FLC, especialmente *C. glabrata*, enquanto que a resistência a equinocandinas e Ampho B permanecem raras (MEDEIROS et al., 2019).

No Sudeste brasileiro, a taxa de mortalidade por candidemia em adultos foi de 58,9% nos últimos 20 anos, em um estudo retrospectivo realizado por Braga et al. (2018), com taxa de incidência de 1,3 episódios a cada 1.000 admissões. Os principais agentes causadores de infecção foram *C. albicans* (37,5%), *C. tropicalis* (28,1%), *C. parapsilosis* (18,4%) e *C. glabrata* (6,9%). Além disso, outro estudo relatou que candidemia está associada a maior risco de morte em adultos, estando associada a fatores de risco, como tempo de internação, terapia renal substitutiva, ventilação mecânica e nutrição parenteral total. A espécie *C. parapsilosis* foi a principal causadora de candidemias (HOHMANN et al., 2023).

Em um estudo no Sul do Brasil, *C. albicans* foi o agente mais isolado em candidemias

(49%), seguido por *C. parapsilosis* (23%) e *C. tropicalis* (15%). A taxa de mortalidade foi de 48% e de incidência foi de 1,2 episódios por 1.000 internações (OLIVEIRA et al., 2021). Reforçando a relevância das candidemias no cenário brasileiro, no estudo de Dantas et al. (2021) foi mostrado que a candidíase invasiva foi a segunda maior causa de morte no Brasil em 85 anos e que sua alta incidência foi devido a presença de comorbidades, como câncer, diabetes e síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA).

Em relação a população pediátrica, a incidência anual de candidíase invasiva foi de 1,24 casos por 1.000 internações em um hospital pediátrico no Sul do Brasil, sendo *C. parapsilosis* (35,8%) o principal responsável por essas infecções, seguido de *C. albicans* (29,2%) e *C. tropicalis* (21,9%) (RODRIGUES et al., 2022). Outro estudo mostrou que a taxa de mortalidade por candidemia na população pediátrica foi de 14%, sendo os principais agentes etiológicos os mesmos relatados no estudo anteriormente citado. Os fatores de risco observados foram internação em UTI, formação de biofilme, trombocitopenia, doenças cardíacas e insuficiência renal (RODRIGUES et al., 2019).

Em relação ao cenário mundial, a espécie *C. albicans* é o principal agente causador de infecções invasivas e sistêmicas, com mortalidade variando de 20 a 50%, mesmo com a disponibilidade de antifúngicos ativos contra a infecção. O tempo de permanência no hospital é em torno de 2 a 4 semanas, podendo durar até 2 meses, dependendo do estado de saúde do paciente. Além disso, é possível notar ao longo do tempo um aumento nas taxas de resistência aos azóis, principalmente em países de baixa e média renda (WHO, 2022).

As taxas de mortalidade de *C. parapsilosis* em candidíases invasivas é de 20 a 45%, sendo um importante patógeno relacionado a colonização de dispositivos médicos, destacando-se sua capacidade de formar biofilmes em cateteres venosos centrais. Além disso, pode causar infecções em indivíduos que fazem uso prolongado de nutrição parenteral, assim como em recém-nascidos prematuros (TORTORANO et al., 2021; WHO, 2022).

Nos últimos 10 anos tem aumentado o número de infecções invasivas causadas por *C. parapsilosis*, tornando essa a principal espécie de *Candida* não *C. albicans* causadora de infecções invasivas em algumas regiões. A resistência a antifúngicos dessa espécie é considerada moderada, com taxas de resistência aos azóis maiores que 10%. Vale ressaltar que a formação de biofilmes confere altas taxas de resistência a todos os antifúngicos (WHO, 2022).

A espécie *C. tropicalis* acomete mais pacientes oncológicos, hematológicos e hepatopatas crônicos, com altas taxas de mortalidade em adultos, correspondendo de 55 a 60%, assim como em pacientes pediátricos, correspondendo de 26 a 40%. As taxas de resistência aos azóis podem variar de 0 a 20%, mas há relatos também de taxas de 40 a 80% (TORTORANO

et al., 2021; WHO, 2022).

Além disso, as candidíases oral, esofágica e vulvovaginal costumam ser mais causadas com mais frequência por *C. albicans*. As duas primeiras costumam acometer principalmente pessoas com sistema imunológico debilitado ou com doenças de base, como infecção por HIV, uso de aparelhos ortodônticos, idosos e diabéticos (MAYER; WILSON; HUBE, 2013; TALAPKO et al., 2021).

Na candidíase vulvovaginal, *C. albicans* também se destaca como um importante fator etiológico, mas outras espécies, como *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, também são importantes causadores da doença e algumas vezes são responsáveis por infecções recorrentes por apresentarem resistência aos antifúngicos utilizados nos tratamentos (ŻYREK et al., 2021). Dentre os fatores que predispõem a infecção estão a idade, acometendo principalmente mulheres jovens sexualmente ativas, fatores hormonais; como aumento da produção de estrogênio; gravidez, uso de dispositivos intrauterinos, tratamento com antibióticos de amplo espectro e diabetes (CZECHOWICZ; NOWICKA; GOŚCINIAK, 2022)

Além de *C. albicans*, as infecções fúngicas invasivas também são causadas com frequência por *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. kefyr*. Devido a sua disseminação pelo organismo, essas leveduras podem causar meningites, infecções abdominais e endocardites em pacientes internados em unidades de terapia intensiva, com nutrição parenteral, câncer, imunodeprimidos e idosos (KHAN et al., 2021; TALAPKO et al., 2021).

A espécie *C. auris* também se destaca como um importante causador de candidemias em pacientes críticos internados em enfermarias e UTI por um longo período de tempo. As candidemias por *C. auris* afetam tanto adultos quanto crianças e apresentam taxas de mortalidade variando entre 29% e 53%, podendo chegar até 72% (AHMAD; ALFOUZAN, 2021; WHO, 2022). Esse patógeno já foi isolado em mais de 40 países, causando surtos em diferentes hospitais ao redor do mundo, principalmente durante a pandemia da COVID-19 (AHMAD; ALFOUZAN, 2021; DU et al., 2020; WHO, 2022).

Quanto a epidemiologia de *C. auris* no Brasil, o estudo de Melo et al. (2023), realizado em um hospital no Nordeste do Brasil entre dezembro de 2021 e março de 2022, identificou 11 isolados clínico de *C. auris* obtidos de amostras de urina e swabs de vigilância axilar e inguinal de pacientes colonizados. Além disso, todos os isolados eram fortes produtores de biofilme.

Outro estudo, realizado em um hospital do nordeste brasileiro em dezembro de 2020 durante a pandemia da COVID-19, identificou um total de 8 isolados clínicos de *C. auris* obtidos de swabs de axila, virilha, narina e orelha de 47 pacientes em UTI. Dentre as superfícies inanimadas analisadas, termômetros, grades de camas, monitores de sinais vitais e bandejas

foram os principais responsáveis pelo isolamento de *C. auris*. Os isolados de *C. auris* foram sensíveis ao FLC, voriconazol, Ampho B e anidulafungina e, de 3 pacientes que apresentavam candidemia por *C. auris* e vinheram a óbito, um óbito foi atribuído a essa infecção (ALMEIDA JR et al., 2021).

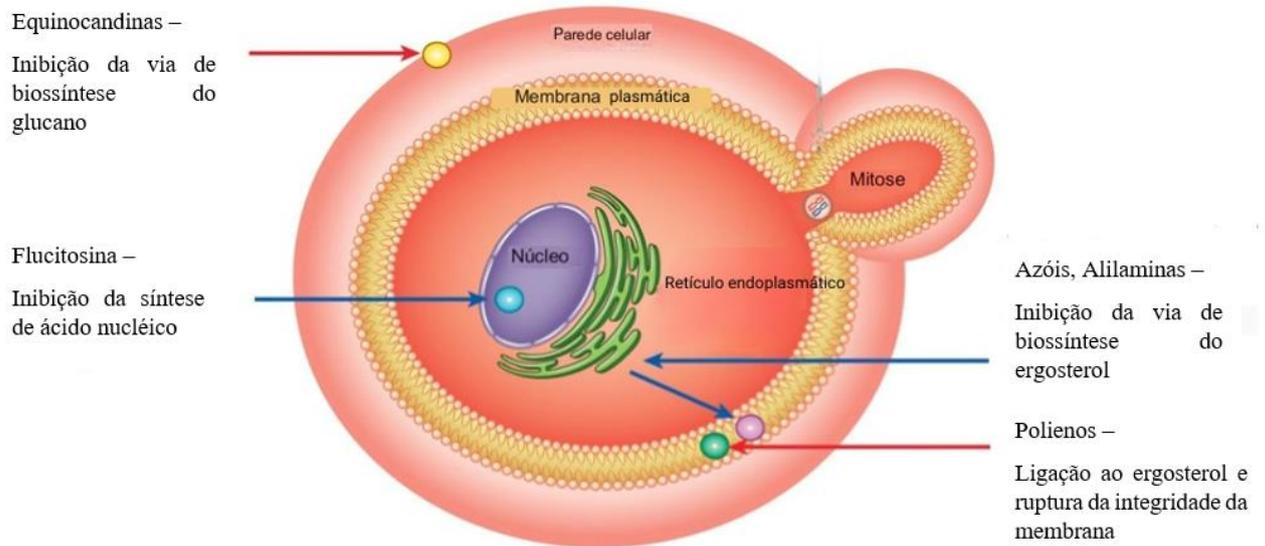
É importante destacar que *C. auris* pode apresentar resistência intrínseca a uma ou mais classes de antifúngicos, com altas taxas de resistência ao fluconazol (87 a 100%), resistência variável aos outros azóis e taxas de resistência moderada a baixa frente a Ampho B (8 a 35%) e as equinocandinas (0 a 8%). Há relatos também de cepas pan-resistentes (AHMAD; ALFOUZAN, 2021; DU et al., 2020; WHO, 2022). Além disso, a produção de biofilme contribui para a resistência aos antimicrobianos, para os casos de candidemia, para sua persistência em superfícies e transmissão no ambiente hospitalar (AHMAD; ALFOUZAN, 2021).

Vale ressaltar que a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou em 2022 uma lista de patógenos fúngicos prioritários, levando em consideração critérios, como taxa de mortalidade, incidência anual, distribuição global atual, internação, complicações e sequelas, resistência antifúngica, prevenção, acesso a testes de diagnóstico e tratamentos baseados em evidências. Ao final, 19 patógenos fúngicos foram classificados e categorizados em três grupos prioritários com base em suas pontuações numéricas (WHO, 2022). Sendo assim, *C. albicans* e *C. auris* foram classificadas no grupo de prioridade crítica, enquanto *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foram classificadas no grupo de alta prioridade, o que reforça a necessidade de estudos voltados para esses patógenos.

### **2.3 Antifúngicos disponíveis contra *Candida* spp.**

As classes de antifúngicos disponíveis contra as infecções fúngicas causadas são polienos, azólicos, equinocandinas, flucitosina e alilaminas (Figura 1) (SANTOS et al., 2018b; TORTORANO et al., 2021; WHALEY et al., 2017).

Figura 1- Mecanismo de ação de antifúngicos frente a *Candida* spp.



Fonte: Adaptado de SANTOS et al., 2018b.

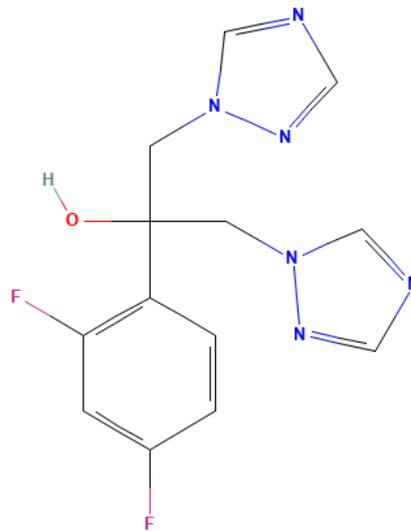
Os azóis agem interferindo no processo de biossíntese do ergosterol, que ocorre no retículo endoplasmático da célula fúngica, ao inibir a enzima lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase, a qual é codificada pelo gene *ERG11*, provocando o acúmulo de esteróis tóxicos (14- $\alpha$ -metil-3,6-diol) na membrana e reduzindo a concentração de ergosterol nessa, causando alterações estruturais e funcionais (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017; SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLÖRL, 2015; SANTOS et al., 2018b).

Os primeiros azóis foram comercializados em 1969. Os azóis apresentam um anel azol de 5 membros que podem ter 2 ou 3 átomos de nitrogênio ligados a uma cadeia lateral, o que os caracteriza como imidazóis ou triazóis, respectivamente. Os imidazóis, como cetoconazol, miconazol, clotrimazol, são utilizados para micoses superficiais. Já os triazóis, como o FLC, ITR, voriconazol, posaconazol e isavuconazol, podem ser utilizados em variados tipos de infecções fúngicas (ALLEN et al., 2015; SANTOS et al., 2018b). Os triazóis sistêmicos costumam ser utilizados na prevenção e tratamento de infecções fúngicas em pacientes imunocomprometidos (NIVOIX; LEDOUX; HERBRECHT, 2020).

Os azóis são fungistáticos e o FLC é o fármaco pertencente a essa classe mais utilizado na clínica para o tratamento das candidíases. O FLC (Figura 2) é a droga de escolha para o tratamento de candidíase esofágica e orofaríngea, candidemia em pacientes não neutropênicos não críticos e sem uso anterior de azóis e candidíase invasiva em pacientes neutropênicos

(NOCUA-BÁEZ et al., 2020). Apesar de apresentar atividade contra a maioria das espécies de *Candida* (exceto *C. krusei* e em menor grau *C. glabrata*), o FLC apresenta limitações quanto ao seu espectro de atividade (SABATELLI et al., 2006).

Figura 2 - Representação estrutural do Fluconazol

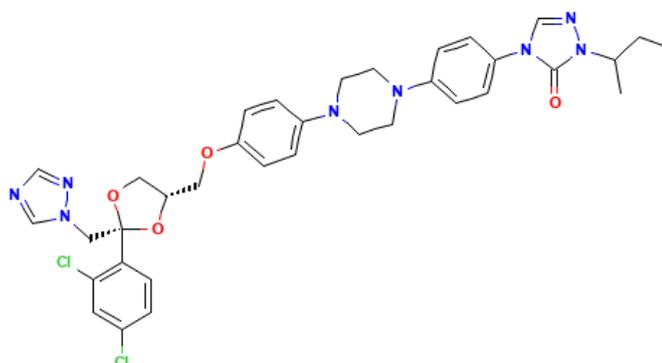


Fonte: PubChem (2023).

O FLC oral e intravenoso surgiu em 1990, apresentando-se seguro para uso e com ampla utilização clínica. É bem absorvido no trato gastrointestinal, sem sofrer interferência do pH gástrico, apresenta metabolização hepática, eliminação renal e tem a capacidade de se difundir por líquidos corporais, como no líquido cefalorraquidiano, atingindo até 70% da concentração sérica (ZONIOS, BENNETT, 2008).

Em 1992, surgiu o ITR oral em cápsulas e, em 1997, em solução de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina a 40% para uso oral e intravenoso (ALLEN et al., 2015; NIVOIX; LEDOUX; HERBRECHT, 2020). O ITR (Figura 3) é lipofílico, portanto é pouco solúvel em água, sendo necessária sua administração com ciclodextrina para melhorar sua solubilidade. Além disso, sua absorção pode ser afetada pelo pH gástrico, tem volume de distribuição elevado, eliminação renal, é metabolizado pelo fígado, podendo interagir com outros fármacos que são metabolizados pela via metabólica CYP450 (NOCUA-BÁEZ et al., 2020). O ITR apresenta atividade contra *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp., *Aspergillus* spp., dermatófitos e fungos dimórficos (SABATELLI et al., 2006).

Figura 3 - Representação estrutural do Itraconazol



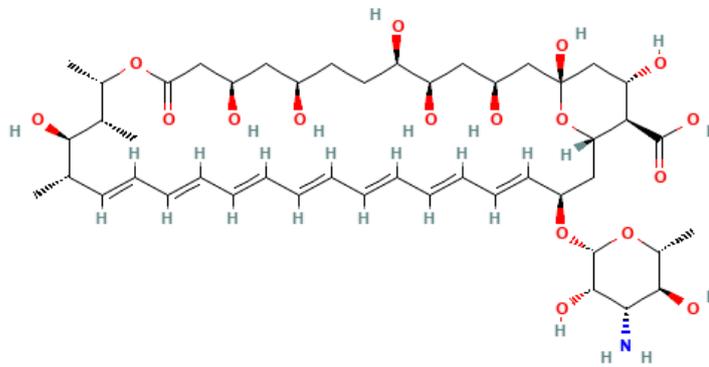
Fonte: PubChem (2023).

De modo geral, vale ressaltar que os azóis também apresentam limitações, podendo apresentar efeito hepatotóxico, podem interagir com outras drogas, já que inibem as enzimas do citocromo P450 de mamíferos, além da aquisição de resistência a essas drogas em algumas cepas (LEE et al., 2020; SANTOS et al., 2018). Com o intuito de melhorar essa problemática, alterações nas moléculas do FLC e do ITR, da primeira geração do triazol, deram origem ao voriconazol e ao posaconazol, respectivamente, que fazem parte da segunda geração e apresentam atividade antifúngica mais potente e específica, sendo utilizados em tratamentos sistêmicos (SANTOS et al., 2018).

Os polienos também agem a nível de membrana celular ao se ligar ao ergosterol presente nela. Com isso, há perda de componentes intracelulares, por meio da formação de poros, o que acarreta na morte celular. Os polienos são considerados a classe mais antiga utilizada para o tratamento de infecções sistêmicas (LEE et al., 2020; PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017; TORTORANO et al., 2021). A Ampho B e suas formulações lipídicas (complexo lipídico e lipossomal de Ampho B), além da nistatina e natamicina fazem parte dessa classe (CAROLUS et al., 2020; NIVOIX; LEDOUX; HERBRECHT, 2020).

A Ampho B (Figura 4) possui atividade fungicida pelo mecanismo de formação de poros na membrana mencionado anteriormente. Além disso, um outro possível mecanismo de ação ainda estudado desse fármaco, é a sua capacidade de causar estresse oxidativo, contribuindo com mais danos à célula fúngica (MESA-ARANGO; SCORZONI; ZARAGOZA, 2012; NIVOIX; LEDOUX; HERBRECHT, 2020).

Figura 4 - Representação estrutural da Anfotericina B



Fonte: PubChem (2023).

Esse fármaco foi o primeiro antifúngico utilizado para o tratamento de doenças fúngicas invasivas, sendo desenvolvida na década de 1950. Devido aos seus diversos efeitos colaterais, destacando-se sua nefrotoxicidade, foram criadas formulações lipídicas, durante a década de 1990, com o intuito de reduzir sua citotoxicidade (CAROLUS et al., 2020; NIVOIX; LEDOUX; HERBRECHT, 2020). Isso ocorre porque, apesar da Ampho B possuir uma alta afinidade pelo ergosterol da membrana celular fúngica do que pelo colesterol, também ocorre uma ruptura não seletiva da membrana celular dos mamíferos (READIO; BITTMAN, 1982).

A Ampho B tem uso terapêutico para micoses sistêmicas e possui um amplo espectro de atividade contra patógenos fúngicos humanos, como *Cryptococcus neoformans*, *Candida* spp., exceto *C. lusitaniae*, *Aspergillus* spp., *Histoplasma* spp., e os agentes das mucormicoses (CAROLUS et al., 2020; CHANDRASEKAR, 2011; NIVOIX; LEDOUX; HERBRECHT, 2020), sendo considerada uma medicamento padrão-ouro para o tratamento de pacientes considerados de risco (SANTOS et al., 2018b). Raramente ocorre resistência a Ampho B em *C. albicans*, devido as desvantagens evolutivas ocasionadas por essa resistência (LEE et al., 2020).

As equinocandinas começaram a ser utilizadas no início dos anos 2000, sendo a classe mais recente de antifúngicos sistêmicos. Elas agem na parede celular fúngica, ao inibir a enzima  $\beta$ -(1,3)-D-glucana sintase e, conseqüentemente, a síntese de  $\beta$ -(1,3)-D-glucano, um polissacarídeo presente majoritariamente na parede celular fúngica e que está ausente em células de mamíferos. Tal inibição acarreta em perda da osmolaridade e da integridade da

parede celular fúngica, impedindo o brotamento em leveduras e o crescimento de hifas em fungos filamentosos (NIVOIX; LEDOUX; HERBRECHT, 2020; TORTORANO et al., 2021).

As equinocandinas tem atividade fungicida e dentro dessa classe podemos destacar micafungina, caspofungina e anidulafungina (TORTORANO et al., 2021). De modo geral, esses fármacos possuem atividade contra a maioria das espécies de *Candida*, até mesmo diante de *C. albicans* resistentes ao FLC, além de *Aspergillus* spp., fungos filamentosos e dimórficos (NIVOIX; LEDOUX; HERBRECHT, 2020). Além disso, são drogas de escolha para o tratamento de candidíases invasivas, mas não apresentam atividade contra *Cryptococcus* spp. na clínica. Dentre as suas vantagens, as equinocandinas apresentam segurança no uso, agem seletivamente sobre os fungos, apresentam poucas interações medicamentosas e raramente há isolados clínicos de *Candida* spp. resistentes. Contudo, são clinicamente utilizadas por administração intravenosa, devido a baixa absorção oral (LEE et al., 2020).

Na classe das alilaminas tem-se a terbinafina, que age a nível de membrana plasmática ao inibir a enzima esqualeno epoxidase, levando ao acúmulo de esqualeno, um precursor do ergosterol, conseqüentemente, diminuindo a quantidade de ergosterol produzido. Tal fármaco apresenta atividade fungicida e é utilizado contra dermatófitos, *Candida* spp., *Pityrosporum* spp., alguns fungos filamentosos e dimórficos. Pode ser utilizado em monoterapias para infecções fúngicas superficiais e em combinação com outros antifúngicos em infecções disseminadas (CHOWDHARY et al., 2014; SANTOS et al., 2018b).

Por fim, a flucitosina age na síntese de ácido nucléico. Esse fármaco é transportado por uma permease e, dentro da célula fúngica, enzimas codificadas pelos genes *FCY1* e *FUR1* irão convertê-lo em 5-fluorouracil e 5-fluorouridina monofosfato, que na sua forma ativa serão responsáveis por inibir a timidilato sintetase e, conseqüentemente, a replicação e transcrição do DNA e a síntese protéica (ARENDRUP; PATTERSON, 2017; SANTOS et al., 2018b).

A flucitosina é fungistática e apresenta atividade contra *Candida* spp., *C. neoformans*, agentes das cromomicoses e tem menor atividade contra *Aspergillus* spp. (PERFECT; DURACK, 1982; PFALLER et al., 1994; QUEIROZ-TELLES et al., 2017). Contudo, a flucitosina apresenta citotoxicidade, quando utilizada isoladamente, causando efeitos adversos, como insuficiência hepática e supressão da medula óssea, além de uma rápida aquisição de resistência por *Candida* spp. Devido a isso, é preferível seu uso em associação com Ampho B, para evitar tais efeitos (SANTOS et al., 2018b).

## **2.4 Resistência aos azóis**

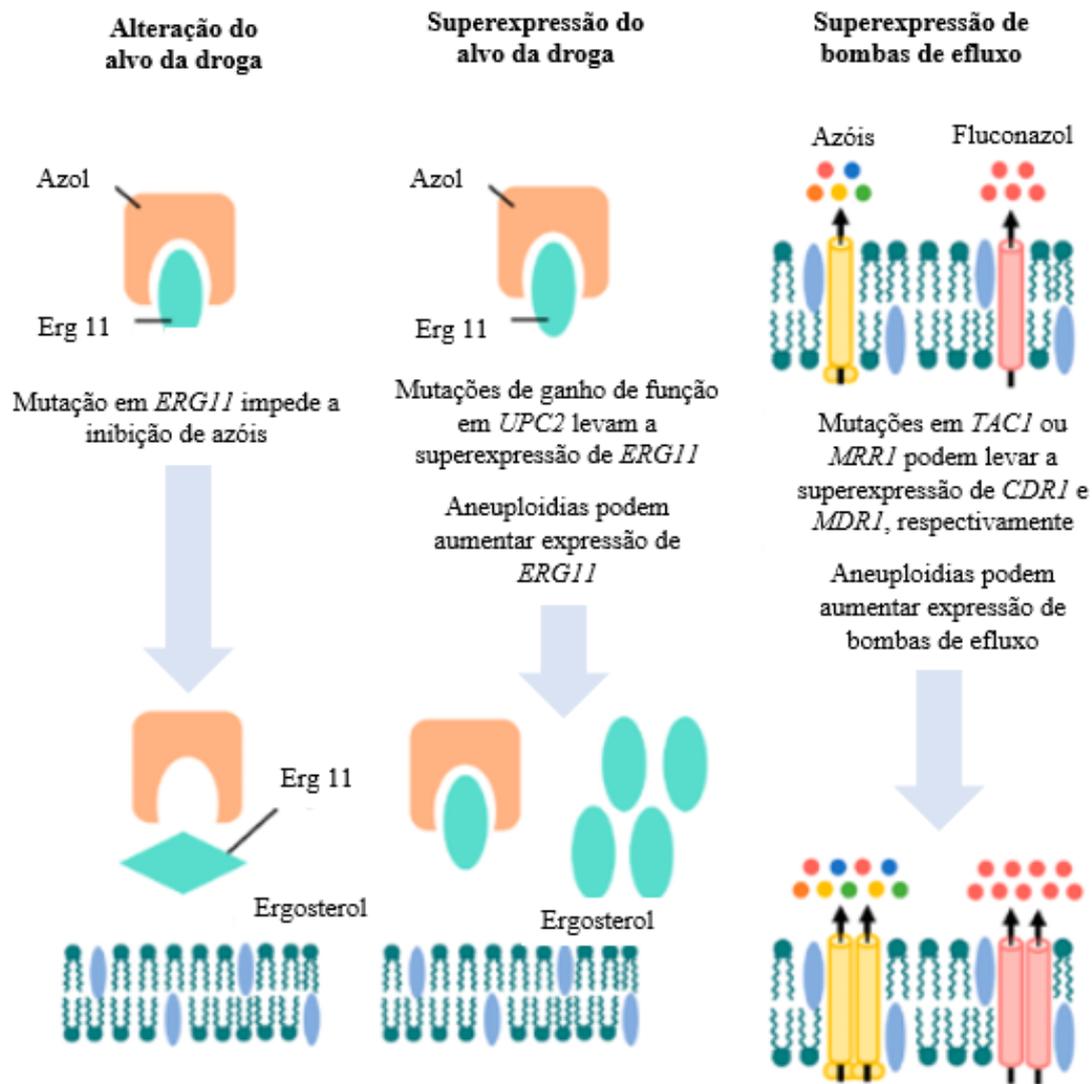
A resistência aos antifúngicos ocorre quando uma cepa possui uma concentração inibitória mínima (CIM) a um dado antifúngico maior do que os pontos de cortes clínicos

específicos ou quando uma cepa possui valor de CIM para um antifúngico maior do que o valor de CIM apresentado por uma cepa de referência (BERMAN; KRYSAN, 2020; LEE et al., 2020).

Além disso, a resistência pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca ocorre quando todos os isolados de uma determinada espécie são resistentes a um antifúngico, sem que se tenha tido uma exposição anterior a esse. A resistência de *C. krusei* ao FLC é um exemplo de resistência intrínseca. Já a resistência adquirida ocorre quando um microrganismo adquire resistência a um antifúngico, ao qual anteriormente ele era sensível, devido a exposição prolongada (TORTORANO et al., 2021).

Existem alguns mecanismos que culminam em uma resistência aos antifúngicos (Figura 5). No caso dos azóis, um mecanismo de resistência que pode ocorrer é modificação da enzima lanosterol 14  $\alpha$ -desmetilase (CYP51), a qual é codificada pelo gene *ERG11* (SANTOS et al., 2018b). A substituição de aminoácidos nessa enzima, devido a ocorrência de mutações próximas ao sítio catalítico, por exemplo, diminui a afinidade de ligação da droga a ela (LEE et al., 2020; REVIE et al., 2018). Mais de 140 substituições de aminoácidos na enzima lanosterol demetilase são conhecidas por conferir resistência aos azóis em *C. albicans* (LEE et al., 2020).

Figura 5 - Mecanismos de resistência apresentados por *Candida* spp. frente aos azóis



Fonte: Adaptado de LEE et al., 2020.

Além disso, a superexpressão de *ERG11* também confere resistência aos azóis, uma vez que há um aumento na produção de enzimas e diminuição da sensibilidade à droga (REVIE et al., 2018; ROBBINS; CAPLAN; COWEN, 2017). Mutações de ganho de função no ativador transcricional *UPC2* em *C. albicans*, o qual regula genes relacionados à biossíntese do ergosterol, aumentam a expressão desses genes relacionados à biossíntese e a quantidade de ergosterol produzida, diminuindo a sensibilidade ao FLC (BERMAN; KRYSAN, 2020).

Um outro mecanismo de resistência que pode ocorrer em *Candida* spp. é a resistência aos azóis como resposta ao estresse causado pela droga. Tal resistência é mediada por *ERG3*, por meio da alteração da via de biossíntese do ergosterol. Quando o gene *ERG3* sofre uma

mutação de perda de função, é codificada a enzima  $\Delta$ -5,6-dessaturase. Devido a isso, não irá ocorrer a conversão de 14- $\alpha$ -metilfecosterol em 14- $\alpha$ -metil-3,6-diol. Dessa forma, 14- $\alpha$ -metilfecosterol será incorporado à membrana plasmática, sem afetar a função da membrana. Assim, o ergosterol da membrana plasmática será substituído por outro esterol, comprometendo a atividade antifúngica dos azóis (COWEN et al., 2015; LEE et al., 2020; SANTOS et al., 2018b).

Além disso, mutações no gene *ERG3* acarretam em uma menor produção de ergosterol, com aumento de esteróis alternativos, o que pode resultar em resistência cruzada a azóis e polienos (COWEN et al., 2015). Alguns reguladores de resposta ao estresse estão envolvidos nessa resistência, tais como proteína fosfatase calcineurina, proteína quinase pck1 e, principalmente, a chaperona molecular Hsp90 (proteína de choque térmico 90), além de outros reguladores (LEE et al., 2020).

Por outro lado, há também a resistência aos azóis, por meio da regulação positiva de bombas de efluxo presentes na membrana plasmática fúngica. Uma das principais classes de bombas de efluxo envolvidas na resistência é a superfamília de cassete de ligação de ATP (ABC). A superexpressão de Cdr1 e Cdr2, transportadores ABC homólogos, conferem resistência aos azóis, principalmente quando há envolvimento de Cdr1. O fator de transcrição Tac1 regula a expressão de *CDR1* e *CDR2*. Mutações de ganho de função em alelos de Tac 1 provocam a superexpressão de *CDR1* e *CDR2*, culminando na resistência aos azóis. (BERMAN; KRYSAN, 2020; LEE et al., 2020; REVIE et al., 2018).

Essa resistência é observada especialmente em terapias antifúngicas de longo prazo, sendo que a superexpressão de Cdr1 confere resistência ao FLC, ITR e cetoconazol, enquanto que a superexpressão de Cdr2 confere resistência ao FLC e cetoconazol, mas não ao ITR (SANTOS et al., 2018b).

Outra classe de bombas de efluxo que conferem resistência aos azóis é a superfamília do facilitador principal (MF). A resistência ao FLC em *C. albicans* foi relacionada ao transportador MF conhecido como Mdr1 (resistência a múltiplas drogas 1), o qual é regulado pelo fator de transcrição Mrr1 (regulador de resistência a múltiplas drogas 1) (BERMAN; KRYSAN, 2020). O fator de transcrição Mrr1 está mais fortemente relacionado à resistência ao FLC, de tal modo que sua exclusão diminui a resistência ao FLC mais do que a simples exclusão de Mdr1, demonstrando que o fator de transcrição pode estar relacionado a outros causadores de resistência (LEE et al., 2020). A superexpressão de transportadores codificados por *MDR1* confere resistência especificamente ao FLC (SANTOS et al., 2018b).

Outro fato a ser considerado quanto a resistência aos azóis, é a plasticidade genômica

de *Candida* spp. como resposta a perturbações ambientais. As alterações genéticas causadas por esses estresses provocam aumento do número de bombas de efluxo e alterações nos alvos da droga, dentre outros. Em isolados resistentes a azóis de *C. albicans* foi constatada a presença comum de uma aneuploidia que consiste na duplicação do braço esquerdo do cromossomo 5, o que leva a um aumento do número de cópias de *ERG11* e *TAC1*. Outra aneuploidia observada em cepas de *C. albicans* resistentes a azóis foi o aumento do número de cópias dos cromossomos 3, 4 e 6, mostrando que a diversidade genômica traz vantagens adaptativas a cepas de *Candida* (BERMAN; KRYSAN, 2020; LEE et al., 2020; REVIE et al., 2018).

Por fim, além da resistência adquirida, algumas espécies de *Candida* também podem apresentar resistência intrínseca aos azóis, como *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. auris*. No caso de *C. glabrata*, é possível observar resistência intrínseca ao FLC, que ocorre devido ao aumento de bombas de efluxo por meio da superexpressão de transportadores ABC. Além disso, essa espécie também é capaz de realizar transporte ativo de esteróis exógenos, contornando as alterações causadas pelo FLC na via de biossíntese do ergosterol (LEE et al., 2020).

No caso de *C. krusei* os mecanismos de resistência intrínseca ainda estão pouco elucidados. Contudo, acredita-se que podem estar relacionados a sensibilidade aos azóis de sua enzima Erg11 e pela superexpressão de bombas de efluxo (LEE et al., 2020). Em isolados de *C. auris* resistentes aos azóis foi observado substituições de aminoácidos em alvos de Erg11, assim como ocorre em cepas de *C. albicans* resistentes aos azóis. Contudo, ainda são poucos os estudos nessa área (CHOWDHARY et al., 2018; LOCKHART et al., 2019; MONTOYA; MOYE-ROWLEY; KRYSAN, 2019).

## **2.5 Fatores de Virulência de *Candida* spp.**

As espécies de *Candida* possuem diversos fatores de virulência, como capacidade de adesão, tanto a células quanto a superfícies abióticas, produção de enzimas hidrolíticas, proteases, fosfolipases e hemolisinas, além da formação de biofilmes, escape do sistema imune do hospedeiro, adaptação a fatores ambientais desfavoráveis, mudança fenotípica e capacidade de filamentação (CZECHOWICZ; NOWICKA; GOŚCINIAK, 2022; GIRELLI; BENEDETTI, 2018).

### **2.5.1 Mudança fenotípica**

Sabe-se que *Candida* spp. apresenta crescimento polimórfico, podendo assumir a forma de blastoconídios, tubo germinativo, hifas e pseudo-hifas dependendo da espécie. Tal característica possibilita sua adaptação às condições do ambiente em que se encontra, sendo a

troca fenotípica influenciada por fatores, como temperatura, pH e disposição de nutrientes e de oxigênio. Vale ressaltar que esse processo é reversível (CASSONE, 2015; SUDBERY, 2011).

A mudança fenotípica desempenha um importante papel para a virulência de *Candida* spp., por estar relacionada a invasão e danos ao tecido do hospedeiro, escape do sistema imunológico, formação de biofilmes e a patogênese *in vivo* (NOBLE; GIANETTI; WITCHLEY, 2017). No processo de colonização e disseminação no organismo, essas leveduras costumam apresentar-se na forma de blastoconídio e nos processos de adesão, invasão tecidual, secreção de enzimas hidrolíticas e sobrevivência dentro de macrófagos costumam estar associados a forma filamentososa. É descrito também que a forma filamentososa pode apresentar menor sensibilidade a antifúngicos do que a forma de blastoconídio (CASSONE, 2015; SILVA et al., 2012; SUDBERY, 2011; TANG et al., 2019). Dessa forma, os blastoconídios representam a forma comensal de *Candida* spp. enquanto a sua filamentação representa sua forma patogênica (MAYER; WILSON; HUBE, 2013; TSUI; KONG; JABRA-RIZK, 2016).

Vale ressaltar também que a mudança fenotípica pode ocorrer quando *C. albicans* está presente em um ambiente com quantidades limitadas de amônia, sua principal fonte de nitrogênio (MORSCHHÄUSER, 2011). Essa mudança fenotípica, devido a falta de nitrogênio, e a captação de amônia são regulados pelo transceptor de amônio metilamônia permease, Mep2 (VAN DEN BERG et al, 2016). Apesar de Mep1 e Mep3 também estarem presentes em fungos, Mep2 tem maior expressão e sua deleção exclusiva impacta negativamente na indução da filamentação, o que não ocorre com a deleção de seus outros dois parálogos (BRITO et al., 2020; VAN DEN BERG et al 2016).

### **2.5.2 Adesão a superfícies**

O primeiro passo necessário para estabelecer uma infecção por *Candida* spp. é a sua adesão a uma superfície, seja ela biótica ou abiótica. É a partir disso que a levedura será capaz de invadir os tecidos, bem como formar o biofilme. Alguns fatores estão relacionados a esse processo. Um deles diz respeito ao tipo de interação entre *Candida* spp. e a superfície celular, envolvendo forças eletrostáticas e hidrofobicidade, as quais vão depender do tipo de microrganismo envolvido no processo e quanto a composição estrutural da célula, bem como sua interação com o microrganismo (SIKORA et al., 2015; SILVA et al., 2011). Um maior grau de hidrofobicidade parece favorecer uma melhor adesão a superfícies abióticas, como próteses de composição acrílica, por exemplo (SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2012).

As adesinas presentes na parede celular de *Candida* spp. também desempenham um importante papel no processo de adesão, ao se ligarem aos seus respectivos ligantes

(GONÇALVES et al., 2016; SIKORA et al., 2015). As principais adesinas são as proteínas de sequência semelhante a aglutinina (Als), as adesinas epiteliais (Epa), destacando-se a Epa1 como a principal representante desse grupo, a proteína 1 da parede da hifa (Hwp1), presente em leveduras com capacidade de formar hifas, dentre outras adesinas. Todas essas proteínas são relevantes ao processo de adesão, uma vez que estudos já demonstraram que a deleção delas em cepas mutantes apresentam drástica perda de virulência e capacidade de adesão (SIKORA et al., 2015; SILVA et al., 2011).

### 2.5.3 Enzimas hidrolíticas

As enzimas hidrolíticas secretadas por *Candida* spp. servem tanto para a obtenção de nutrientes quanto auxiliar no estabelecimento da infecção, uma vez que elas auxiliam na degradação de moléculas que podem ser utilizados pela levedura, como também permitem a evasão do sistema imunológico do hospedeiro e ajudam no processo de invasão de tecidos. As principais enzimas hidrolíticas de *Candida* spp. são as proteases, hemolisinas, fosfolipases e lipases (CZECHOWICZ; NOWICKA; GOŚCINIAK, 2022).

Dentre as proteases, o grupo mais descrito e relevante para a virulência de *Candida* spp. são as aspartil proteases secretadas (Sap). Essas proteases são formadas por um grupo de 10 genes que podem ser encontrados em *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* (GONÇALVES et al., 2016; SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2012).

As Sap estão relacionadas a formação de hifas, mudança fenotípica, aumento da adesão e invasão de tecidos do hospedeiro, além de degradar algumas proteínas produzidas pelo sistema imune, como imunoglobulinas, peroxidase, colágeno, fibronectina, proteínas do complemento, dentre outras (HACIOGLU et al., 2019; JAFARI et al., 2017). Vale ressaltar que a SAP9 e SAP10 não são secretadas, pois são endopeptidases, e sua função está relacionada a manter a integridade da parede celular e promover adesão (SIKORA et al., 2011).

A espécie *C. glabrata* não possui os genes Sap, mas são capazes de produzir as yapsinas, que também são proteases, que são codificadas por 11 genes YPS e têm a função de manter a integridade da parede celular, adesão e permitir a sobrevivência dentro dos macrófagos (SIKORA et al., 2011; SIKORA et al., 2015).

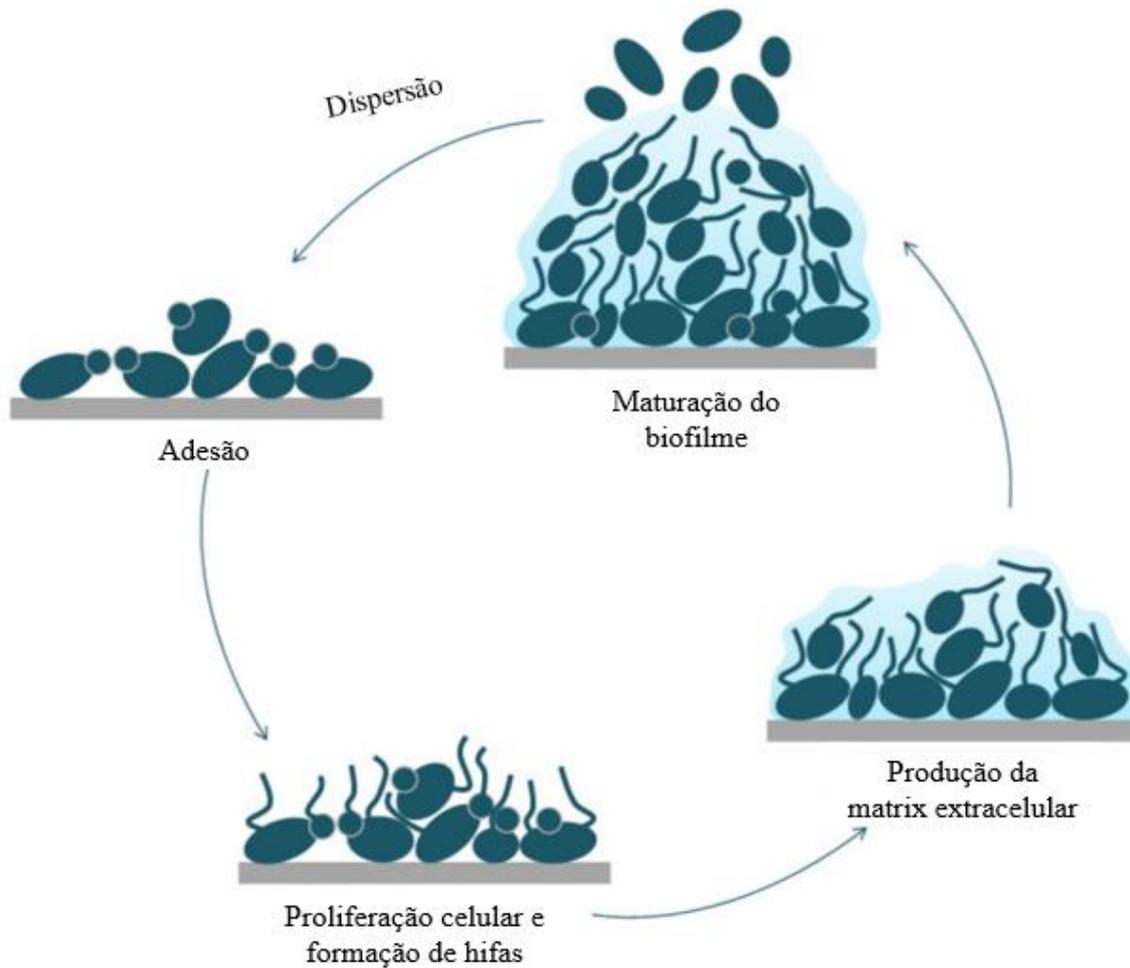
As fosfolipases são importantes para a invasão dos tecidos e progressão da infecção, uma vez que promovem a lise dos fosfolipídios da membrana celular, com consequente lise das células. As lipases são responsáveis pela hidrólise e síntese de gliceróis e estão relacionadas a adesão, invasão e sobrevivência dentro de macrófagos, enquanto as hemolisinas lisam as hemácias do hospedeiro para obtenção de ferro (GONÇALVES et al., 2016; HACIOGLU et al., 2019; SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2012).

#### **2.5.4 Biofilmes**

A formação do biofilme é de grande relevância para a virulência de *Candida* spp., pois, além de ser a forma que essas leveduras se encontram naturalmente no ambiente, também confere resistência tanto aos antifúngicos quanto ao sistema imunológico do hospedeiro (NOBILE; JOHNSON, 2015; SILVA et al., 2009; TULASIDAS et al., 2018). O biofilme consiste em uma estrutura tridimensional, complexa, composta por células com diferentes formas morfológicas, em diferentes camadas, envolvida por uma matriz polissacarídica extracelular (MEC), que podem estar presentes tanto em superfícies bióticas quanto abióticas (CZECHOWICZ; NOWICKA; GOŚCINIAK, 2022; PRIYA; PANDIAN, 2020).

Sua formação inicia-se com o processo de adesão das células a uma superfície, formando a base do biofilme (Figura 6). Em seguida, ocorre a proliferação dessas células, com formação de longas estruturas filamentosas e início da produção da MEC. Depois ocorre a fase de maturação do biofilme, na qual a estrutura da MEC apresenta-se bem consolidada e, por fim, ocorre o rompimento da matriz e dispersão das células não aderentes presentes no biofilme, as quais se disseminam no organismo do hospedeiro e dão origem a um novo processo de formação do biofilme em outros locais (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018; MCCALL et al., 2019; TALAPKO et al., 2021).

Figura 6- Processo de formação do biofilme



Fonte: Adaptado de TALAPKO et al., 2021.

A matriz polissacarídica extracelular é composta por polímeros e DNA extracelulares, que mantêm a estrutura do biofilme e permite sua ligação a uma superfície (LI et al., 2020; TALAPKO; ŠKRLEC, 2020). Além desse componente, a matriz também conta com  $\beta$ -1,3-glucano que ajuda a conferir resistência aos antifúngicos, uma vez que impede a interação das drogas com seus respectivos alvos (KARYGIANNI et al., 2020).

Dentro do biofilme, há canais que permitem a troca de água e nutrientes, além de moléculas que permitem uma comunicação entre os microrganismos presentes ali dentro de forma coordenada, conhecido como *quorum sensing*, bem como moléculas autoindutoras que funcionam como sinais reguladores do crescimento populacional do biofilme, suprimindo genes alvo quando necessário. Tais características permitem que o biofilme tenha um tamanho ideal e possa também ativar fenótipos de virulência (PALUCH et al., 2020; TALAPKO; ŠKRLEC, 2020).

Vale ressaltar que a expressão de genes na formação do biofilme é fundamental tanto para regular os fatores de transcrição para o seu desenvolvimento e características de virulência, bem como para regular o metabolismo das células presentes dentro do biofilme, para que essas possam sobreviver ao estresse oxidativo, a um ambiente com poucos nutrientes e baixas concentrações de oxigênio, além de aumentar a expressão de genes necessários relacionados a produção de ergosterol, glicólise e metabolismo de ácidos graxos (BONHOMME; D'ENFERT, 2013; MURILLO et al., 2005; TALAPKO et al., 2021).

As leveduras *Candida* spp. são importantes formadores de biofilmes em dispositivos médicos, como cateteres vasculares, cateteres urinários, próteses articulares e dentárias, marcapassos, dentre outros. As infecções relacionadas com cateteres costumam ser mais preocupantes, por aumentarem a morbimortalidade de indivíduos internados, já que estão fortemente associadas a biofilmes fúngicos e assim podendo levar a uma candidemia, aumentando também o tempo de internação e os custos do hospital com o tratamento (ICHIKAWA et al., 2019; PINHATI et al., 2016; RODRIGUES et al., 2020). A formação de biofilmes funciona como uma barreira que protege tais patógenos contra o sistema imunológico do hospedeiro, bem como de drogas antifúngicas, limitando o arsenal de antifúngicos eficientes contra biofilmes (VERA-GONZÁLEZ; SHUKLA, 2020).

O biofilme é a forma em que *Candida* costuma ser encontrada na natureza. Mesmo que na forma planctônica uma determinada cepa não apresente resistência intrínseca a um antifúngico, essa cepa em biofilme pode apresentar resistência intrínseca a múltiplas drogas, devido a superexpressão de genes que codificam bombas de efluxo e por expressarem CDR1 e MDR1 durante as diferentes fases do biofilme. Podem também apresentar alterações na composição da membrana plasmática e parede celular e apresentar modificações nas respostas ao estresse (BERMAN; KRYSAN, 2020; REVIE et al., 2018).

### **2.5.5 Fatores de virulência de *Candida* spp. candidatos a alvo de novas drogas antifúngicas**

A nível de parede celular, um importante fator de virulência das espécies de *Candida* a ser destacado é a Exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase, uma hidrolase que está envolvida no metabolismo do  $\beta$ -1,3-glucano, um dos principais polissacarídeos que compõem a parede celular de *Candidia* spp. Essa enzima é responsável por remodelar a parede celular da levedura (CUTFIELD et al., 1999). Sabe-se que a parede celular atua na proteção das células fúngicas contra insultos osmóticos e oxidativos e que alterações em sua estrutura podem conferir resistência aos antifúngicos (NETT et al., 2007).

A nível de membrana plasmática, destaca-se a CYP51, uma enzima importante para a via de biossíntese do ergosterol em fungos. Alterações de afinidade com a CYP51 causadas por mutação e a superexpressão dessa enzima representam mecanismos de resistência aos azóis, o que a torna um importante alvo para novas drogas (PARKER et al., 2014; RABELO et al., 2017).

Outro alvo relevante para novos antifúngicos é o complexo de citocromo BC1 de levedura, que desempenha um importante papel na cadeia respiratória mitocondrial, por desencadear o processo de geração da força motriz de prótons na membrana interna mitocondrial, a qual é necessária para produção de ATP. Sua inibição acarreta na não produção de ATP, com consequente morte celular (JOVIĆ; ŠMUC, 2021; MUSSO; FABBRINI; DALLAVALLE, 2020).

A disfunção mitocondrial também está relacionada ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o seu acúmulo no espaço intracelular é prejudicial às células. Assim, enzimas com atividade antioxidante, como a superóxido dismutase, convertem EROs em compostos não prejudiciais à levedura, como o peróxido de hidrogênio e o oxigênio. A inibição dessa enzima desempenha um papel crucial para o acúmulo de radicais livres intracelular, levando à morte celular por apoptose, devido ao estresse oxidativo, o que também a torna um alvo relevante para novas drogas antifúngicas (KIM; WOO; LEE, 2019).

Dentre as superóxido dismutases, pode-se destacar a superóxido dismutase 5, que está relacionada à eliminação de radicais livres, tanto intracelular quanto extracelular, em *C. albicans*, gerados pela respiração celular mitocondrial, durante a fase de crescimento exponencial e na transição para a forma de hifa. Essa enzima é induzida diante de situações de estresse oxidativo ou osmótico e sua deleção torna a levedura mais suscetível aos radicais livres, sendo necessária para a virulência de *C. albicans* (MARTCHENKO et al., 2004).

O material genético fúngico também pode ser um alvo de novas drogas. Um importante alvo seria a DNA Polimerase de Levedura ETA. É sabido que as DNA polimerases de *C. albicans* são essenciais para a estabilidade do genoma fúngico, desempenhando um importante papel em sua patogênese, bem como na resistência aos azóis (PEROUMAL et al., 2019). Outro alvo relevante é a proteína de telômero de levedura Cdc13 OB4. As proteínas Cdc13 de *C. albicans* são capazes de se associar ao DNA *in vivo* e regular o comprimento dos telômeros, ao manter o equilíbrio entre o recrutamento das telomerasas no processo de replicação e por

proteger os telômeros, cobrindo suas extremidades, ao formar um complexo com outras proteínas (GE et al., 2020; YU et al., 2012).

Um outro alvo a ser considerado é a timidilato quinase, uma enzima responsável pela biossíntese de timidina trifosfato, a qual é um nucleotídeo fundamental para o processo de replicação do DNA fúngico. A enzima presente em *C. albicans* apresenta diferenças bioquímicas com a timidilato quinase de humanos, o que a torna um alvo promissor na busca por novas drogas específicas contra fungos (HUANG et al., 2019).

Além disso, o RNA fúngico também pode fornecer possíveis alvos para novas terapias. Drogas que conseguem interagir com os íntrons do grupo I do loop J4/5 são capazes de agir no RNA de *C. albicans*, visto que os loops internos são necessários para a funcionalidade do RNA. O loop J4/5 é particularmente interessante, pois, além de ser altamente conservado em eucariotos e procariotos, está presente nos íntrons de auto-splicing do grupo I, o qual está relacionado com a maturação dos ribossomos. Portanto, drogas que interajam com esse alvo podem inativar o RNA fúngico (ZNOSCO et al., 2004).

## **2.6 Novas estratégias terapêuticas contra *Candida* spp.**

O desenvolvimento de novas drogas antifúngicas tem ocorrido de forma lenta, devido a alguns fatores, como o fato das células fúngicas serem eucarióticas e a capacidade do composto de atravessar a parede celular e membrana plasmática do fungo (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, et al., 2017; REVIE et al., 2018).

A falta de novos fármacos antifúngicos, junto com o pequeno arsenal de antifúngicos disponíveis e com o crescente aumento de cepas apresentando resistência, faz necessária a busca por novos compostos e novas estratégias antifúngicas. Uma alternativa é o desenvolvimento de drogas voltadas contra um alvo específico do microrganismo, sendo este relacionado ao seu crescimento ou a um fator de virulência, o que ajudaria a preservar os microrganismos comensais do hospedeiro, por não agir contra eles, além de aumentar o número de possíveis alvos antifúngicos e diminuir a pressão seletiva no surgimento da resistência às drogas (CUI et al., 2015).

Uma outra estratégia visada nos últimos anos é o reposicionamento de fármacos já disponíveis no mercado, uma vez que o desenvolvimento de novos medicamentos costuma ser um processo caro e demorado, estimando-se um gasto de US \$300 milhões de dólares em um período de 10 anos da descoberta até a regulamentação do fármaco. Dessa forma, o reposicionamento de fármacos é mais vantajoso, uma vez que já se sabe sobre seu perfil

farmacológico, alvos celulares, mecanismo de ação, citotoxicidade e segurança para uso, o que otimiza o tempo de sua aprovação regulatória (KIM et al., 2020).

Alguns estudos investigam também o uso de terapias imunológicas contra candidíases vaginais, por meio do desenvolvimento de citocinas, anticorpos e imunomoduladores contra alvos específicos, relacionados a fatores de virulência, e, até mesmo, o desenvolvimento de vacinas anti-*Candida* (BERNARDIS et al., 2015). Dentre os alvos cotados para o desenvolvimento de vacinas estão os antígenos  $\beta$ -glucanos da parede celular e a proteína Als3 (ARMSTRONG-JAMES et al., 2017; EDWARDS et al., 2018).

O uso de peptídeos, que consistem em moléculas com atividade antifúngica oriundas de células do hospedeiro, também são uma alternativa explorada. Pequenos peptídeos catiônicos também podem ser obtidos de proteínas maiores que desempenham atividade antimicrobiana. Seu modo de ação está basicamente ligado à sua capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana celular fúngica, tendo como alguns exemplos a lisozima, lactoferrina humana, histatina e defensinas, dentre outras (MEHRA et al., 2012; SANTOS et al., 2018b).

Outra estratégia que pode ser utilizada é a combinação de drogas, que podem agir de forma sinérgica ou aditiva, diminuindo a concentração necessária dos fármacos para atingir o efeito desejado, comparado ao uso de fármacos isolados, além de apresentar mecanismo de ação em mais de um alvo por vez, dificultando o surgimento de mecanismos de resistência (LEE et al., 2020; SANTOS et al., 2018b).

A terapia combinada já é uma realidade no tratamento de algumas doenças, como tuberculose, malária e da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (LEE et al., 2020; ROBBINS; WRIGHT; COWEN, 2016; SPITZER; ROBBINS; WRIGHT, 2017). A combinação de drogas com mecanismos de ação diferentes proporciona um maior número de alvos visados em processos intracelulares, dificultando o desenvolvimento de resistência, uma vez que o microrganismo precisaria apresentar mutações em diversos genes para driblar o efeito das drogas simultaneamente (LEE et al., 2020; ROBBINS; CAPLAN; COWEN, 2017; SPITZER; ROBBINS; WRIGHT, 2017).

Ademais, a terapia combinada também pode aumentar o potencial fungicida de drogas fungistáticas, como os azóis. Ao reduzir o número de microrganismos, também seria reduzida a probabilidade do desenvolvimento de uma resistência (SPITZER; ROBBINS; WRIGHT, 2017). A partir dessas combinações, compostos que isoladamente não apresentam efeito sobre um patógeno, podem levar o microrganismo à morte quando combinados (BERMAN; KRYSAN, 2020).

A combinação de drogas com moléculas que têm como alvo alguns mecanismos de

resistência já foram reportados na literatura. Dentre elas, podemos citar a iKIX1, uma molécula capaz de inibir bombas de efluxo, sensibilizando isolados de *C. glabrata* resistentes aos azóis, e assim melhorando a resposta terapêutica ao uso do FLC (NISHIKAWA et al., 2016).

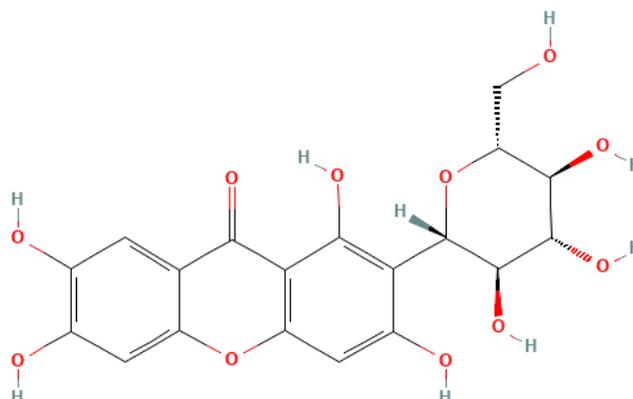
Os conhecimentos obtidos com a medicina popular permitem investigar a obtenção de novos compostos antimicrobianos por meio de produtos naturais. Esses produtos podem apresentar compostos bioativos, os quais podem agir sobre o crescimento microbiano, na integridade da parede e/ou membrana celular fúngica, induzir apoptose, dentre outros mecanismos, além de possivelmente apresentarem segurança para uso em humanos e animais, ter baixo custo e apresentar poucos efeitos colaterais evidentes (ASIF et al., 2016; SANTOS et al., 2018b; SOLIMAN et al., 2017). Além disso, a fitoterapia é uma ferramenta acessível a populações de baixo poder aquisitivo, sem contar a grande variedade de plantas e de seus produtos disponíveis mundialmente (SANTOS et al., 2018b).

Ademais, os compostos bioativos também podem apresentar atividades sinérgica ou aditiva com antifúngicos tradicionais, representando uma alternativa promissora contra espécies resistentes aos antifúngicos (RODRIGUES et al., 2016). Contudo, o mecanismo de ação pelo qual essa atividade sinérgica ocorre costuma ser pouco explorada na literatura, necessitando de mais estudos que se proponham a elucidar tais mecanismos (SANTOS et al., 2018b).

## 2.7 Mangiferina

Como uma possível alternativa para a baixa quantidade de compostos antifúngicos disponíveis contra cepas resistentes, têm-se a MGF (Figura 7) (1,3,6,7-Tetrahidroxixantona C<sub>2</sub>-β-D-glucosídeo), uma xantona encontrada naturalmente em plantas da família *Anacardiaceae* e *Gentianaceae*, como a *Mangifera indica*, conhecida popularmente como Mangueira (GOLD-SMITH; FERNANDEZ; BISHOP, 2016). A manga é um fruto que possui altas concentrações de MGF, a qual pode ser encontrada também no cerne, folha, caroço e na casca do caule da mangueira (FOMENKO; CHI, 2016; IMRAN et al., 2017).

Figura 7 - Representação estrutural da Mangiferina em pH fisiológico



Fonte: PubChem (2023).

Por possuir diversas atividades terapêuticas, a MGF é utilizada na medicina tradicional em alguns países por apresentar propriedades antiviral, antioxidante, hepatoprotetora, anticancerígena, imunomoduladora, antidiabética, hipolipêmica e analgésica. Em Cuba, por exemplo, Vimang® é um medicamento que contém aproximadamente 20% de MGF, produzido a partir do extrato aquoso da *M. indica* e é utilizado por pessoas com diversos tipos de câncer, devido ao seu potencial antiinflamatório, antioxidante e analgésico (FOMENKO; CHI, 2016; IMRAN et al., 2017; SINGH et al., 2012). Já o Salaretin®, também composto por MGF, é utilizado no Sri Lanka para ajudar no tratamento da diabetes tipo 2 (SINGH et al., 2012).

Há relatos na literatura de que a MGF apresenta baixa citotoxicidade (REDDEMAN et al., 2019; RODEIRO; DELGADO; GARRIDO, 2014) e apresenta atividade antimicrobiana, tanto contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa*, dentre outras, bem como contra fungos filamentosos e leveduras, como *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum* e *C. albicans* (ŠAVIKIN et al., 2009; ŠILER et al., 2014; SHEN et al., 2021; TCHINDA et al., 2019).

Vale ressaltar que a maioria dos estudos sobre a MGF são voltados para sua atividade antibacteriana, sendo necessário mais estudos que avaliem sua atividade diante de espécies fúngicas de importância médica, como *Candida* spp. Portanto, a justificativa desse estudo está pautada em explorar o potencial antifúngico do composto bioativo MGF, isoladamente e em combinação com antifúngicos convencionais, frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao FLC, além de investigar seu possível mecanismos de ação frente a essas leveduras.

### 3. HIPÓTESES

3.1 A MGF apresenta atividade antifúngica diante de cepas de *Candida* spp. resistentes ao FLC na forma planctônica.

3.2 A associação da MGF com FLC, ITR e Ampho B reduz a CIM dos antifúngicos contra cepas de *Candida* spp. resistentes ao FLC na forma planctônica.

3.3 A associação da MGF com os antifúngicos melhora a atividade antifúngica desses contra o biofilme pré-formado e formado de cepas de *Candida* spp. resistentes ao FLC.

3.4 A CIM da MGF não apresenta citotoxicidade.

3.5 A MGF apresenta mecanismo de ação diante de *Candida* spp. resistentes ao FLC, por possivelmente provocar a despolarização da membrana mitocondrial e elevar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).

3.6 A MGF não apresenta atividade antifúngica frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao FLC.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica da MGF isolada e em combinação com antifúngicos convencionais frente a cepas de *Candida* spp. resistentes ao FLC.

### 4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Determinar a CIM da MGF, FLC, ITR e Ampho B das cepas de *Candida* spp. resistentes ao FLC na forma planctônica;

4.2.2 Avaliar o tipo de interação farmacológica da MGF quando combinada com FLC, ITR e Ampho B, por meio do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF);

4.2.3 Determinar o potencial antibiofilme da MGF, FLC, ITR e Ampho B, isolados e em combinação, em biofilmes pré-formado e formado das cepas de *Candida* spp. resistentes ao FLC;

4.2.4 Avaliar a citotoxicidade da MGF em células MRC-5;

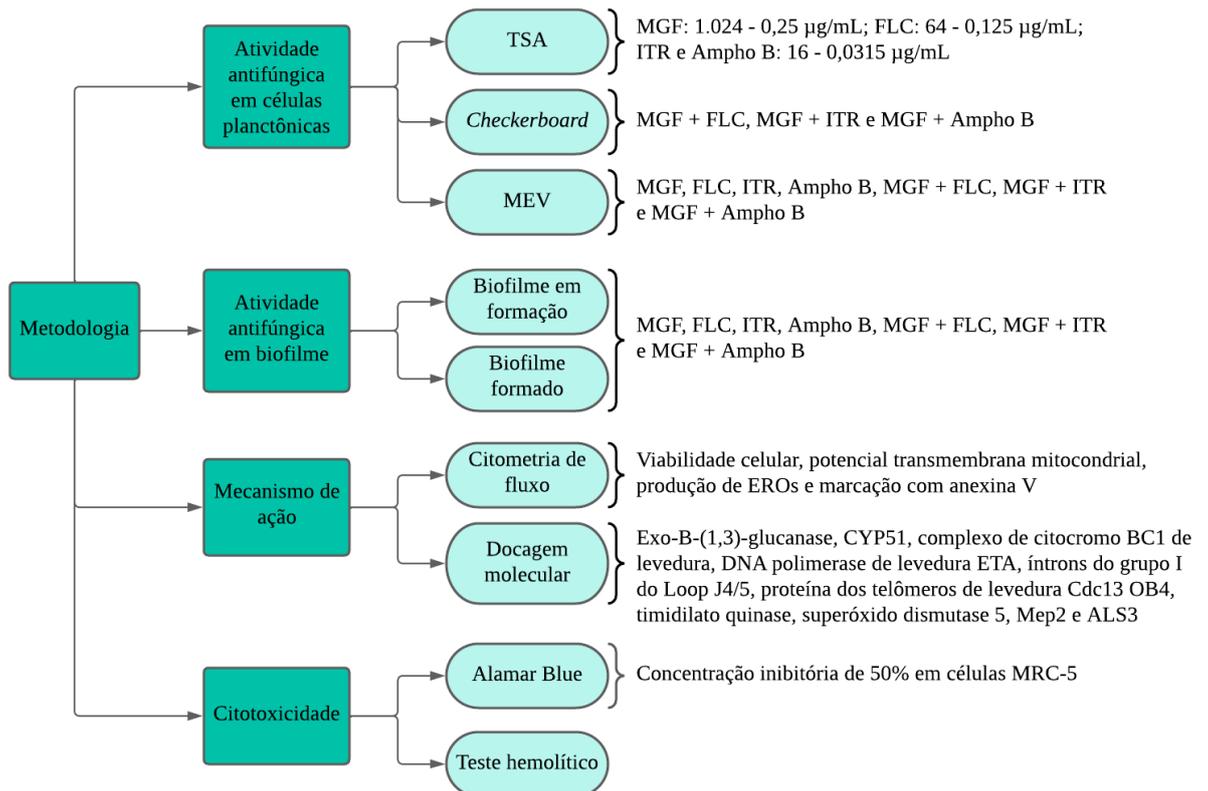
4.2.5 Avaliar o possível mecanismo de ação da MGF em cepas de *Candida* spp., por meio de técnicas de citometria de fluxo e docagem molecular.

4.2.6 Avaliar os danos estruturais causados pela MGF isolada e em combinação com FLC, ITR e Ampho B em células planctônicas de *C. albicans* resistente ao FLC, por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV).

## 5. MATERIAS E MÉTODOS

O fluxograma a seguir mostra a metodologia utilizada resumidamente (Figura 8).

Figura 8- Fluxograma da metodologia utilizada



Fonte: Autoria própria (2023).

### 5.1 Microrganismos e fármacos utilizados

Foram utilizadas 14 cepas de *Candida* spp., sendo 3 cepas de *C. albicans*, 4 cepas de *C. tropicalis*, 4 cepas de *C. parapsilosis*, 1 cepa de *C. glabrata*, todas essas provenientes de isolados clínicos, e 2 cepas controles provenientes de *American Type Culture Collection* (ATCC), *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. Todas as cepas pertencem ao Laboratório de Bioprospecção de Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN) da Universidade Federal do Ceará (UFC). As cepas foram incubadas a 35°C por 24 h em ágar Sabouraud dextrose (Himedia, Mumbai, Índia) (SILVA et al., 2013). Em relação aos fármacos, foram utilizados o composto MGF e os fármacos FLC, ITR e Ampho B, todos obtidos comercialmente da Sigma-Aldrich (USA). O FLC foi solubilizado em água destilada estéril e MGF, ITR e Ampho B foram solubilizados em Dimetilsulfóxido (DMSO), com concentração  $\leq 2,5\%$ . O

projeto foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o código ABB9F08.

## 5.2 Teste de sensibilidade antifúngica (TSA)

O teste de sensibilidade antifúngica foi realizado por microdiluição em caldo, de acordo com o protocolo M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). O FLC foi testado na faixa de concentração de 0,125 - 64 µg/mL, enquanto que ITR e Ampho B foram testados na faixa de concentração entre 0,0315 - 16 µg/mL e a MGF na faixa de 0,25 - 1.024 µg/mL. As microplacas com 96 poços foram incubadas a 35°C por 24 h e os resultados lidos visualmente, conforme recomendação do CLSI (2012). A CIM foi considerada a menor concentração capaz de inibir 50% do crescimento fúngico para a MGF, FLC e ITR. Para a Ampho B, a CIM foi considerada a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento fúngico. As cepas com  $CIM \geq 8 \mu\text{g/mL}$  para FLC foram consideradas resistentes (CLSI, 2012).

## 5.3 Ensaio de checkerboard

Foi utilizada a técnica de checkerboard, na qual cada poço da placa de cultura contém uma combinação única de diferentes MGF, FLC, ITR e Ampho B (ODDS, 2003). A interação entre as drogas foi determinada pelo cálculo do índice de ICIF:  $ICIF = [CIM_A \text{ combinado}] / [CIM_A \text{ sozinho}] + [CIM_B \text{ combinado}] / [CIM_B \text{ sozinho}]$ , sendo  $[CIM_A \text{ combinado}]$  e  $[CIM_B \text{ combinado}]$  os CIMs da MGF e dos antifúngicos em combinação, e  $[CIM_A \text{ sozinho}]$  e  $[CIM_B \text{ sozinho}]$  os CIMs da MGF e dos antifúngicos isolados. A interação entre as drogas foi definida como sinérgica (SIN) ( $ICIF \leq 0,5$ ), aditiva (ADD) ( $0,5 < ICIF \leq 1,0$ ), indiferente (IND) ( $1,0 < ICIF \leq 4,0$ ) ou antagonista (ANT) ( $ICIF > 4,0$ ) (JORGE et al, 2017).

## 5.4 Ensaios com biofilme

O biofilme foi realizado conforme descrito por Pierce et al. (2008), com algumas modificações. Foram utilizadas as cepas *C. albicans* 2, *C. tropicalis* 2 e *C. parapsilosis* 2. Foram analisadas as atividades antibiofilme da MGF isolada (CIM, 2x CIM, 3x CIM), da MGF associada ao FLC, ITR, Ampho B (CIM, 2x CIM, 3x CIM) e dos antifúngicos isolados no CIM de cada espécie. Na combinação com FLC, foram considerados os valores de MIC obtidos no TSA para cada uma das três espécies representativas. Já na combinação com ITR e Ampho B foram considerados os valores de CIM obtidos no checkerboard para cada espécie. Os inóculos das cepas de *Candida* spp. e diferentes concentrações das drogas foram adicionados aos poços no mesmo dia e as placas foram incubadas por 24 h a 35°C, para o biofilme em formação. Já no biofilme formado, as diferentes concentrações das drogas foram adicionadas aos poços contendo biofilme viável de 24h e as placas incubadas a 35°C por 24h. A viabilidade celular de ambos os biofilmes foi avaliada por ensaio colorimétrico de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-

il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT; 1 mg/mL). As placas foram lidas no espectrofotômetro leitor de microplacas Biochrom Asys UVM 340 (Biochrom Ltd., Cambridge, UK) a 492 nm (SÁ et al., 2020). A redução do crescimento foi comparada ao poço que estava livre de fármaco.

## **5.5 Ensaio de citotoxicidade**

### **5.5.1 Avaliação da viabilidade celular**

O teste Alamar Blue foi realizado com células MRC-5 (fibroblastos de pulmão) ( $1 \times 10^6$  células/mL) após 24h de exposição à substância-teste. A MGF (0,29 a 150  $\mu\text{g/mL}$ ) foi adicionada a cada poço e incubada por tempos apropriados. O grupo controle recebeu a mesma quantidade de veículo. Vinte e quatro horas antes do final da incubação, 10  $\mu\text{L}$  de solução estoque (0,312 mg/mL) de Alamar Blue (Resazurin, Sigma-Aldrich) foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida usando um leitor multiplaca (DTX 880 Multimode Detector, Beckman Coulter®) e a citotoxicidade da droga foi quantificada como a porcentagem de absorbância de controle em 570 nm e 595 nm. Neste teste, a absorbância do Alamar Blue no meio de cultura é medida em um comprimento de onda maior e menor. A absorbância do próprio meio também é medida nos mesmos comprimentos de onda mais altos e mais baixos. A absorbância do meio sozinho é então subtraída da absorbância do meio mais Alamar Blue no comprimento de onda mais alto. Este valor é chamado  $AO_{HW}$ . A absorbância do meio sozinho também é subtraída da absorbância do meio mais Alamar Blue no comprimento de onda mais baixo para obter o  $AO_{LW}$ . Um fator de correção,  $R_0$ , pode ser calculado a partir de  $AO_{HW}$  e  $AO_{LW}$ , onde  $R_0 = AO_{LW}/AO_{HW}$ . A porcentagem pela qual Alamar Blue é reduzido por células viáveis foi expressa da seguinte forma: % reduzido =  $A_{LW} - (A_{HW} \times R_0) \times 100$  (CAVALCANTI et al., 2020).

### **5.5.2 Teste hemolítico**

O teste hemolítico foi realizado em placas de 96 poços seguindo o método descrito por Berlinck et al. (1996). Cada poço recebeu 50  $\mu\text{L}$  de solução de NaCl a 0,85% contendo 10 mM de  $\text{CaCl}_2$ . O primeiro poço representou o controle negativo (RPMI). No segundo poço, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de substância de teste (MGF) e 50  $\mu\text{L}$  de RPMI. A MGF foi testada nas concentrações de 100 e 300  $\mu\text{g/mL}$ . O composto foi diluído em série com NaCl 0,85% até o 11º poço consecutivo. O último poço recebeu 50  $\mu\text{L}$  de 0,2% Triton X-100 (em solução salina) para obter 100% de hemólise (controle positivo). Cada poço recebeu 100  $\mu\text{L}$  de uma suspensão a 2% de eritrócitos de camundongos em solução salina contendo 10 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Após incubação em temperatura ambiente por 3h e centrifugação, o sobrenadante foi transferido para uma nova placa e a hemoglobina liberada foi medida usando um leitor multiplaca (Spectra Count, Packard, Ontario, Canada) a 540 nm. Os testes foram realizados em triplicado em três

ensaios independentes (CAVALCANTI et al., 2020).

## 5.6 Ensaio de citometria de fluxo

Para o ensaio de citometria de fluxo, foram utilizadas as cepas representativas *C. albicans* 2, *C. parapsilosis* 2 e *C. tropicalis* 2. As cepas foram incubadas em Ágar Sabouraud por 24h a 35° C, foram suspensas em 5mL de YPD (yeast extract-peptone-dextrose) e reincubadas nas mesmas condições. Posteriormente, as células foram centrifugadas (2.500 rpm por 5 min), lavadas três vezes com uma solução salina a 0,85% e, por fim, as células foram ressuspensas (~10<sup>6</sup> células/mL) em meio RPMI (SILVA et al., 2013; NETO et al., 2014).

Para determinar a viabilidade celular, avaliar o potencial transmembrana mitocondrial, produção de EROs e marcação com anexina V, as cepas de *Candida* spp. resistentes ao FLC foram expostas a MGF, FLC, ITR e Ampho B isolados nos CIM de cada cepa, além das combinações MGF + FLC, MGF + ITR e MGF + Ampho B também nos CIM obtidos nas combinações das drogas para cada cepa. O meio RPMI-1640 foi utilizado como controle negativo e todas as amostras foram incubadas por 24h a 37°C. Todos os experimentos foram feitos em triplicata, em dias diferentes, com 10.000 eventos avaliados (SILVA et al., 2013; NETO et al., 2014).

### 5.6.1 Determinação da viabilidade celular

Após a exposição às drogas por 24h, as células de *Candida* spp. foram avaliadas pela exclusão de iodeto de propídio (PI; 2 µg/ml). Para cada experimento, 10.000 eventos foram avaliados e os detritos celulares foram omitidos da análise. A fluorescência celular foi então determinada por citometria de fluxo usando um citômetro FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) (SILVA et al., 2013).

### 5.6.2 Avaliação do potencial de membrana ( $\Delta\psi_m$ )

O potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) foi determinado de acordo com a retenção do corante rodamina 123 (Rho 123) pelas cepas fúngicas após 24 h de exposição às drogas. As células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS), incubadas com Rho 123 (1 µg/ml) a 35°C por 15 min no escuro e, em seguida, lavadas duas vezes com PBS. Em seguida, as células foram incubadas novamente em PBS a 35°C no escuro por 30 min, e a fluorescência foi medida por citometria de fluxo (FACSCalibur flow cytometer). Para cada experimento, 10.000 eventos foram avaliados e os detritos celulares foram omitidos da análise (SILVA et al., 2013; NETO et al., 2014).

### 5.6.3 Detecção das espécies reativas de oxigênio (EROs)

Para a detecção de EROs produzidas durante 24 horas de exposição aos fármacos, as células foram incubadas com 20 µM CM-H<sub>2</sub>DCFDA [5-(e-6)-clorometil-2',7'-

diclorodihidrofluoresceína diacetato acetil éster] por 30 min no escuro a 35°C. Em seguida, as células foram colhidas, lavadas, ressuspensas em PBS e imediatamente analisadas por citometria de fluxo FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). A intensidade de fluorescência do DCF é proporcional à quantidade intracelular de EROs formada (SILVA et al., 2013; NETO et al., 2014).

#### **5.6.4 Marcação por Anexina V**

As células de levedura foram colhidas por centrifugação e digeridas com 2 mg/mL de zimoliase 20T (Seikagaku Corp. Japão) em tampão de fosfato de potássio (PPB, 1 M de sorbitol, pH 6,0) por 2 h a 30 °C. Os protoplastos foram então corados com Anexina V marcada com FITC e PI usando um kit de detecção de apoptose FITC-Anexina V (Guava Nexin Kit, Guava Technologies). Posteriormente, as células foram lavadas com PPB, incubadas por 20 min em tampão de ligação de anexina contendo 5 µL/mL de FITC-Anexina V e 5 µL de PI e analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur flow cytometer). Para cada experimento (n = 2), 10.000 eventos foram avaliados e os detritos celulares foram omitidos da (SILVA et al., 2013; NETO et al., 2014).

### **5.7 Docagem molecular**

#### **5.7.1 Preparação de ligantes e receptores para simulações de docagem**

A estrutura química da MGF (CID5281647) foi obtida no repositório PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), o confômero de menor energia foi salvo em pH fisiológico utilizando o código MarvinSketch (CSIZMADIA, 1999) e otimizado utilizando o código Avogadro (HANWELL et al., 2012), configurado para utilizar algoritmo *steepest descente* com ciclos de 50 interações, aplicando o campo de força MMFF94 (*Merck Molecular Force Field*) (HALGREN, 1996; NETO et al., 2021).

#### **5.7.2 Análise do possível mecanismo de ação in silico**

Para investigar o mecanismo de ação da MGF frente à *C. albicans*, as estruturas dos alvos foram obtidas no repositório *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>), PDBs ID 1JIH (TRINCAO et al., 2001); 1TUT (ZNOSKO et al., 2004); 3RMH (YU et al., 2012), 4N3T (GLEASON et al., 2014), 1EQP (CUTFIELD; SULLIVAN; CUTFIELD, 2000), 5AEZ (VAN DEN BERG, et al, 2016), 5TZ1 (HARGROVE et al, 2017), 5UIV (SINHA; RULE, 2017) e 1KB9 (LANGE, 2001). A estrutura ALS3 de *C. albicans* também foi selecionada no repositório de proteínas *Protein Data Bank* (<https://www.rcsb.org/>), depositada com resolução de 1,40 Å e determinada por *X-Ray Diffraction* (LIN et al. 2014). A preparação dos receptores *C. albicans* seguiu a metodologia proposta por Silva et al. (2022a), onde foram removidos os resíduos, adicionados os hidrogênios polares e as cargas Gasteiger calculadas (GUERRA,

2019; LUCIO et al., 2020; YAN et al, 2014) utilizando o código Autodocktools™ (HUEY; MORRIS; FORLI, 2012).

### 5.7.3 Simulação da docagem molecular

Foram realizadas 50 simulações de docking molecular utilizando o código AutodockVina (TROTT; OLSON, 2010), *Lamarckian Genetic Algorithm* (LGA), *Exhaustiveness* 64 (MARINHO et al., 2020) e espaço de simulação envolvendo toda a estrutura dos alvos proteicos através dos eixos (x, y, z) e *size* (x, y, z) descritos na tabela complementar S1 (Tabela S1). Nas simulações com a ALS3 o *grid box* foi centralizado em toda a proteína com os parâmetros 102Åx126Åx92Å e dimensões (x, y, z) = (-5,806, 2,952, -13,754). Cada simulação gera 20 poses e a *best pose* é selecionada através do parâmetro estatístico RMSD (*Root Mean Square Deviation*) com valores até 2,0 Å (YUSUF et al, 2008) e energia de afinidade inferior a -6,0 kcal/mol (SHITYAKOV; FÖRSTER, 2014; SILVA et al, 2021).

### 5.7.4 Visualização dos modos de ligação e interações receptor-ligante

Os códigos UCSF Chimera™ (PETTERSEN et al, 2004), *Discovery studio visualizer™ viewer* (BIOVIA, 2016) e *Pymol* (DELANO, 2020) foram utilizados para análise dos dados. As interações moleculares e ligações de hidrogênio foram calculadas através do código *Discovery studio visualizer™ viewer* (BIOVIA, 2016).

Os valores das constantes de inibição ( $K_i$ ) foram determinados através da energia de afinidade de cada complexo formado utilizando a equação 1 (KADELA-TOMANEK et al, 2021).

$$K_i = e^{(\Delta G/RT)} \quad (1)$$

onde  $\Delta G$  é a energia livre de ligação em  $\text{kJ mol}^{-1}$ ,  $R$  ( $8.32 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) é a constante do gás,  $T$  (298 K) é a temperatura absoluta e  $K_i$  é a constante de inibição.

A força das ligações de hidrogênio foi avaliada utilizando os valores das distâncias entre os átomos doadores e receptores, sendo consideradas ligações fortes quando apresentam distâncias entre 2,5-3,1 Å, moderada entre 3,1-3,55 Å e fraca quando apresentam distâncias superiores a 3,55 Å (IMBERTY et al., 1991).

## 5.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Inicialmente, a cepa *C. albicans* 3 foi repicada em ágar sabouraud por 24h a 35°C. Posteriormente, o inóculo foi preparado na escala 0,5 de McFarland e depois foi diluído ( $5,0 \times 10^2$  a  $2,5 \times 10^3$  células/mL). Em seguida, as células de *C. albicans* foram tratadas com MGF,

FLC, ITR e Ampho B isoladas e com as combinações MGF + FLC, MGF + ITR e MGF + Ampho B, na concentração CIM para as respectivas drogas. Após 24h de incubação, as células planctônicas de *C. albicans* foram fixados com solução de glutaraldeído a 2,5% (Sigma-Aldrich, MO, EUA) em tampão cacodilato (0,15M) (Electron Microscopy Sciences, PA, EUA), com adição de azul de Alcian a 0,1% (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), durante a noite a 4°C. As células planctônicas foram então lavadas duas vezes com tampão cacodilato. Em seguida, foi realizada uma série de desidratação alcoólica ascendente: etanol 50, 70, 80, 90, 95 e 100%, seguido de secagem por 15-30 min. Após a secagem, as células planctônicas foram desidratadas com hexametildissilazano (Sigma-Aldrich) por 30 min e secos durante a noite em dessecador. As lamínulas contendo as células planctônicas foram revestidas com 10 nm de ouro e observadas em microscópio eletrônico de varredura Quanta FEG 450 em modo de alto vácuo na Central Analítica da UFC. As imagens foram processadas no software Photoshop CC5 (Adobe) (HOLANDA et al., 2021).

### **5.9 Análise estatística**

Todos os ensaios foram realizados em triplicata em dias diferentes. Médias aritméticas foram utilizados para análise estatística das variáveis contínuas (ICIF). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre as concentrações usadas nos ensaios com biofilme e no ensaio hemolítico, os dados foram comparados por análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Já no ensaio de citotoxicidade, os resultados da concentração inibitória de cinquenta por cento ( $CI_{50}$ ) e dos intervalos de confiança de 95% foram obtidos pela regressão linear. Os dados obtidos nos ensaios de citometria de fluxo foram comparados por análise de variância ANOVA, seguido do teste de Newman-Keuls ( $p < 0,05$ ). A análise de dados foi realizada pelo programa GraphPad Prism® 6,0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Atividade antimicrobiana da Mangiferina

Em relação à atividade antifúngica das drogas, foi observado uma variação dos valores de CIM entre as três espécies. Os valores de CIM para MGF variaram de 0,5 a 341,3 µg/mL, FLC variaram de 8 a 64 µg/mL, ITR variaram de 0,2 a 5,3 µg/mL e para Ampho B variaram de 1 a 5,3 µg/mL (Tabela 1).

Tabela 1 - Atividade antifúngica da Mangiferina e dos antifúngicos frente as cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol

Cepas	Valores de CIM			
	MGF	FLC	ITR	Ampho B
	(µg/mL) CIM <sub>50%</sub>	(µg/mL) CIM <sub>50%</sub>	(µg/mL) CIM <sub>50%</sub>	(µg/mL) CIM <sub>100%</sub>
<i>C. albicans</i> 1	0,5	26,7	2,7	2,0
<i>C. albicans</i> 2*	21,3	26,7	0,7	2,7
<i>C. albicans</i> 3**	341,3	32,0	0,7	2,0
<i>C. tropicalis</i> 1	53,3	16,0	2,0	5,3
<i>C. tropicalis</i> 2*	42,7	26,7	0,6	3,3
<i>C. tropicalis</i> 3	53,3	26,7	2,3	1,0
<i>C. tropicalis</i> 4	53,3	32,0	2,3	2,0
<i>C. parapsilosis</i> 1	53,3	16,0	0,2	1,2
<i>C. parapsilosis</i> 2*	42,7	26,7	0,5	1,0
<i>C. parapsilosis</i> 3	53,3	21,3	2,0	5,3
<i>C. parapsilosis</i> 4	149,3	8,0	0,3	1,3
<i>C. glabrata</i>	2,0	64,0	5,3	3,3
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	53,3	1,0	1,2	2,0
<i>C. krusei</i> (ATCC 6258)	42,7	16,0	0,7	2,7

Valor da concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% (CIM<sub>50</sub>) do crescimento fúngico, após incubação por 24h, da Mangiferina (MGF), Fluconazol (FLC) e Itraconazol (ITR) em µg/mL e a concentração inibitória mínima capaz de inibir 100% (CIM<sub>100</sub>) do crescimento fúngico, após incubação por 24h, da Anfotericina B (Ampho B) em µg/mL. *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. krusei* (ATCC 6258) foram utilizadas como controle. As cepas com (\*) foram escolhidas como cepas representativas de cada espécie para os ensaios de biofilme e citometria de fluxo. A cepa com (\*\*) foi utilizada na microscopia eletrônica de varredura (MEV).

## **6.2 Interação da Mangiferina com os antifúngicos**

MGF apresentou aproximadamente 7,1% (n = 1) de atividade sinérgica com FLC, 28,6% (n = 4) com o ITR e 42,9% (n = 6) com Ampho B. MGF apresentou atividade aditiva em aproximadamente 57,1% (n = 8) das cepas com o FLC, 64,3% (n = 9) com ITR e 50% (n = 7) com Ampho B. MGF foi indiferente na interação com FLC em aproximadamente 35,7% (n = 5) das cepas e em 7,1% (n = 1) com ITR e Ampho B, respectivamente. Não foi observado antagonismo da MGF com nenhuma das drogas analisadas (Tabela 2).

Tabela 2 - Interação resultante das combinações entre a Mangiferina e os antifúngicos

Cepas	MGF/FLC			MGF/ITRA			MGF/ Ampho B		
	MGF/FLC	ICIF	Interpretação	MGF/ITRA	ICIF	Interpretação	MGF/ Ampho B	ICIF	Interpretação
<i>C. albicans</i> 1	0,2/13,3	0,9	ADD	0,4/2,2	1,6	IND	0,5/2,0	2,0	IND
<i>C. albicans</i> 2*	21,3/26,7	2,0	IND	10,6/0,3	0,9	ADD	10,6/1,3	1,0	ADD
<i>C. albicans</i> 3**	71,1/6,7	0,4	SIN	170,6/0,3	0,9	ADD	71,1/0,4	0,4	SIN
<i>C. parapsilosis</i> 1	26,6/8,0	1,0	ADD	26,6/0,1	1,0	ADD	17,8/0,4	0,6	ADD
<i>C. parapsilosis</i> 2*	21,3/13,3	1,0	ADD	17,8/0,2	0,8	ADD	21,3/0,5	1,0	ADD
<i>C. parapsilosis</i> 3	26,6/10,6	1,0	ADD	8,9/0,3	0,3	SIN	11,1/1,1	0,4	SIN
<i>C. parapsilosis</i> 4	149,3/8,0	2,0	IND	74,6/0,1	0,8	ADD	62,2/0,5	0,8	ADD
<i>C. tropicalis</i> 1	44,4/13,3	1,6	IND	13,3/0,5	0,4	SIN	8,9/0,9	0,4	SIN
<i>C. tropicalis</i> 2*	14,2/8,8	0,6	ADD	14,2/0,2	0,6	ADD	10,7/0,8	0,4	SIN
<i>C. tropicalis</i> 3	35,5/17,8	1,4	IND	11,1/0,5	0,4	SIN	26,6/0,5	1,0	ADD
<i>C. tropicalis</i> 4	22,2/13,3	0,8	ADD	17,8/0,8	0,6	ADD	13,3/0,5	0,4	SIN
<i>C. glabrata</i>	0,8/26,7	0,8	ADD	0,4/1,1	0,4	SIN	1,0/1,6	1,0	ADD
<i>C. parapsilosis</i> ATCC2019	17,8/0,3	0,6	ADD	17,8/0,4	0,6	ADD	26,6/1,0	1,0	ADD
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	24,9/9,3	1,2	IND	16,0/0,3	0,8	ADD	10,7/0,7	0,4	SIN

A atividade antifúngica da Mangiferina combinada ao Fluconazol (MGF/FLC), ao Itraconazol (MGF/ITRA) e a Anfotericina B (MGF/Ampho B) foi avaliada pelo cálculo do índice da concentração inibitória fracionada (ICIF). A interação entre as drogas foi definida como sinérgica (SIN) ( $ICIF \leq 0,5$ ), aditiva (ADD) ( $0,5 < ICIF \leq 1,0$ ), indiferente (IND) ( $1,0 < ICIF \leq 4,0$ ) ou antagonista (ANT) ( $ICIF > 4,0$ ). *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. krusei* (ATCC 6258) foram utilizadas como controle. As cepas com (\*) foram escolhidas como cepas representativas de cada espécie para os ensaios de biofilme e citometria de fluxo. A cepa com (\*\*) foi utilizada na microscopia eletrônica de varredura (MEV).

### **6.3 Atividade antimicrobiana da Mangiferina sobre o biofilme de *Candida* spp.**

Em relação a atividade antibiofilme da MGF isolada, não houve redução estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na viabilidade celular em nenhuma das concentrações analisadas diante dos biofilmes pré-formado e formado de *C. albicans* e *C. tropicalis* e diante do biofilme formado de *C. parapsilosis*. Apenas no biofilme pré-formado de *C. parapsilosis* houve redução de 9% na concentração 3x CIM.

#### **6.3.1 Atividade antimicrobiana das combinações diante do biofilme pré-formado de *Candida* spp.**

Em relação a combinação MGF + FLC, em *C. albicans* (Figura 9 A), houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) da viabilidade de 15% e 55% nas concentrações 2x CIM e 3x CIM, respectivamente, em relação ao controle. Não houve diferença significativa entre as combinações e FLC isolado. Em *C. tropicalis* (Figura 9 B) e *C. parapsilosis* (Figura 9 C), houve redução significativa de 13% e de 19% na concentração 3x CIM, respectivamente, em relação ao controle, além de apresentarem maior redução da viabilidade, comparando ao FLC isolado. Não houve redução da viabilidade para FLC isolado em nenhuma das cepas analisadas.

Em relação a combinação MGF + ITR, houve redução significativa da viabilidade ( $p < 0,05$ ) em todas as concentrações analisadas para *C. albicans* (41%, 59% e 80%), *C. tropicalis* (13%, 26% e 84%) e *C. parapsilosis* (39%, 69% e 79%) em relação ao controle. No ITR isolado, houve redução significativa de 55%, 14% e 59%, em relação ao controle, para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, respectivamente. Vale ressaltar que houve uma maior redução da viabilidade nas concentrações 2x CIM (para *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*) e 3x CIM (para as três espécies), comparando ao ITR isolado, apesar dessas concentrações serem menores ou parecidas com a do ITR isolado.

Na combinação MGF + Ampho B, houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) da viabilidade

em todas as concentrações analisadas de *C. albicans* (54%, 88% e 91%), *C. tropicalis* (56%, 85% e 90%) e *C. parapsilosis* (68%, 69% e 79%) em relação ao controle. Na Ampho B isolada, houve redução significativa de 88%, 89% e 49%, em relação ao controle, para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, respectivamente. Em *C. albicans* e *C. tropicalis*, não houve diferença significativa entre as combinações e a Ampho B isolada. Apesar disso, nas concentrações 2x CIM e 3x CIM para *C. tropicalis*, foi observada uma redução da viabilidade semelhante ao do antifúngico isolado, com uma menor concentração de Ampho B. Já para *C. parapsilosis*, todas as combinações apresentaram maior redução da viabilidade do que o antifúngico isolado, mesmo diante de concentrações menores ou parecidas a da Ampho B isolada.

### **6.3.2 Atividade antimicrobiana das combinações diante do biofilme formado de *Candida* spp.**

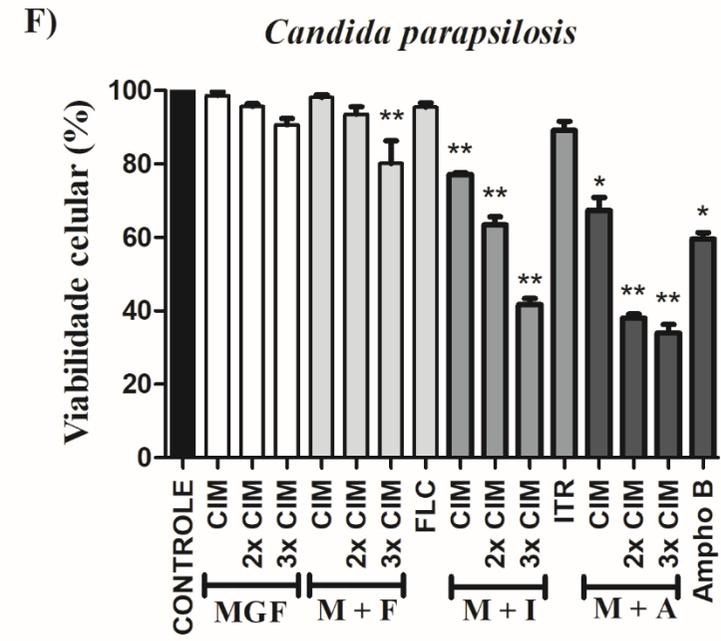
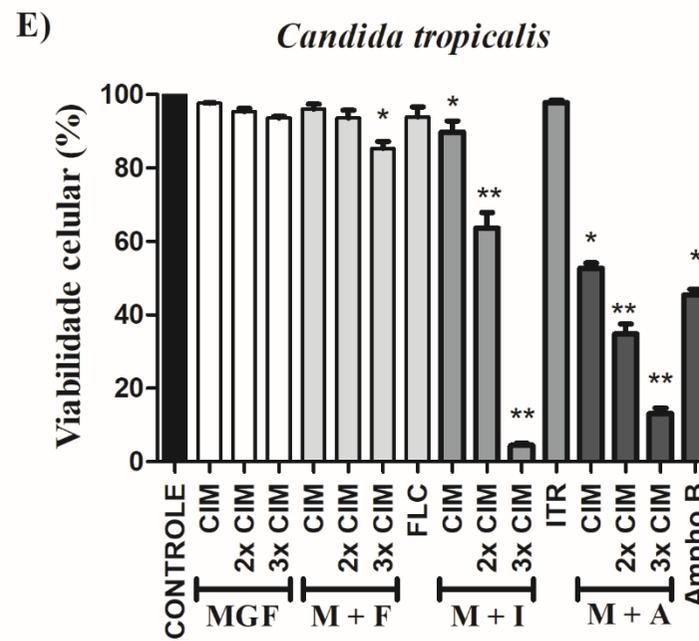
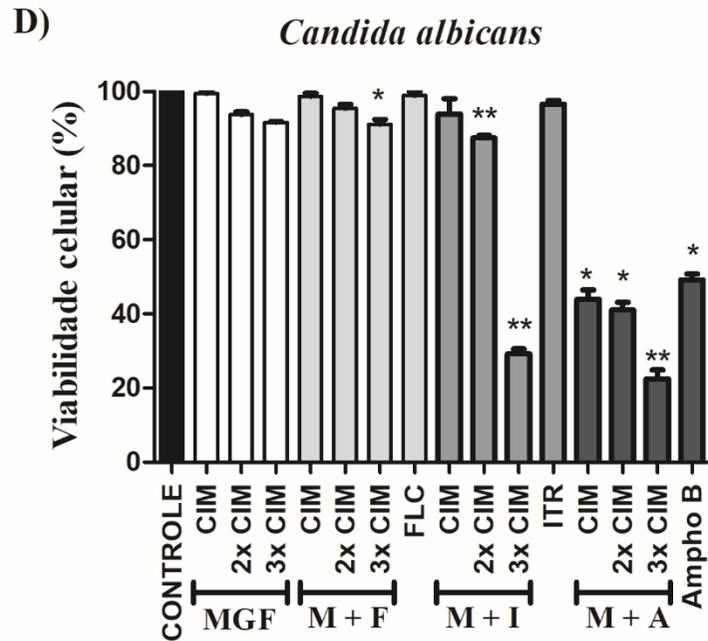
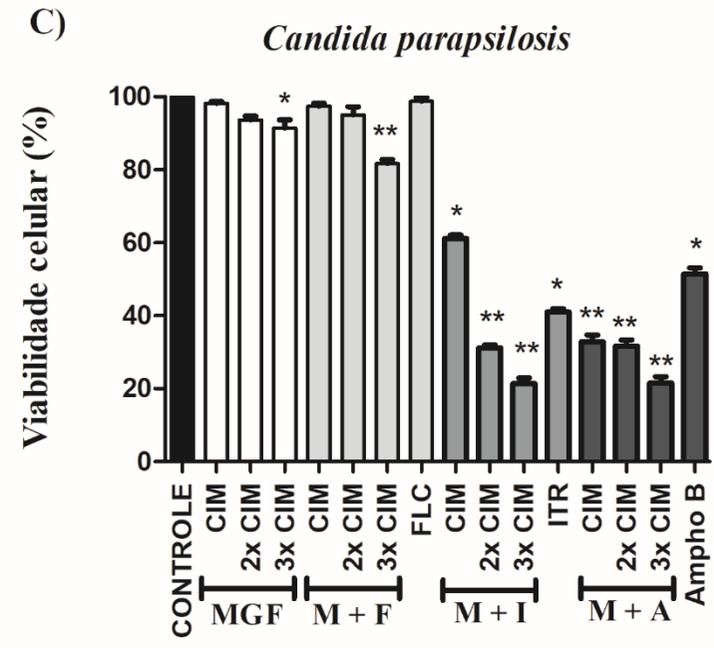
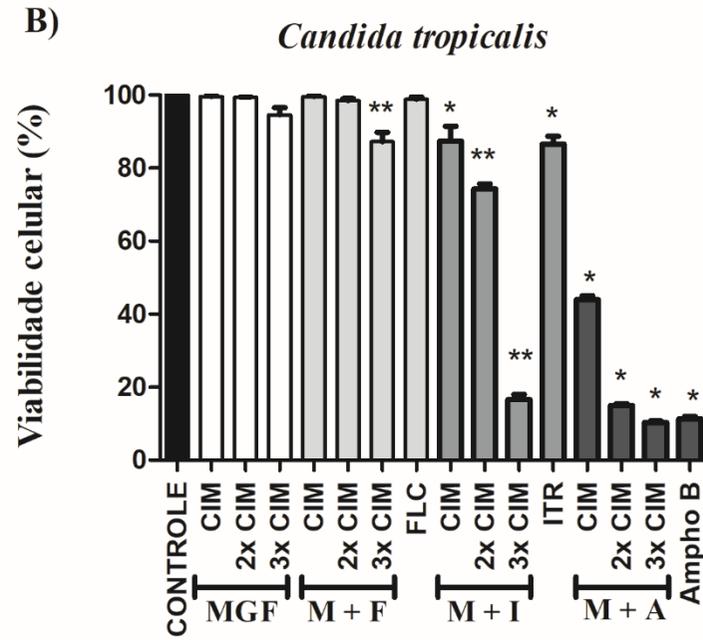
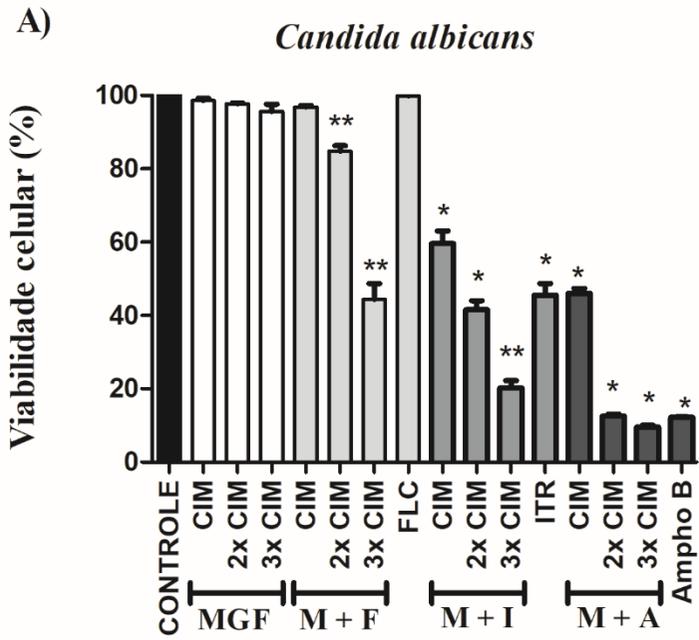
Na combinação MGF + FLC, houve redução significativa da viabilidade ( $p < 0,05$ ) de 9%, 15% e 20% na concentração 3x CIM para *C. albicans* (Figura 9 D), *C. tropicalis* (Figura 9 E) e *C. parapsilosis* (Figura 9 F), respectivamente, em relação ao controle. Para *C. parapsilosis*, na concentração 3x CIM, houve também maior redução da viabilidade, comparando ao FLC isolado. Para *C. albicans* e *C. tropicalis*, não houve diferença significativa entre as combinações e FLC isolado. Não houve redução da viabilidade para FLC isolado em nenhuma das cepas analisadas.

Na combinação MGF + ITR, houve redução significativa da viabilidade de 13% e 71% nas concentrações 2x CIM e 3x CIM para *C. albicans*, em relação ao controle. Por outro lado, houve redução da viabilidade em todas as concentrações analisadas de *C. tropicalis* (11%, 37% e 96%) e *C. parapsilosis* (23%, 37% e 59%) em relação ao controle. As concentrações 2x MIC e 3x CIM, em *C. albicans* e *C. tropicalis*, e todas as concentrações em *C. parapsilosis*, apresentaram maior redução da viabilidade do que ITR isolado, mesmo com concentrações menores ou parecidas a do antifúngico isolado. Não houve redução da viabilidade para ITR isolado em nenhuma das espécies analisadas.

Na combinação MGF + Ampho B, houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) da viabilidade em todas as concentrações analisadas de *C. albicans* (57%, 59% e 78%), *C. tropicalis* (48%, 66% e 87%) e *C. parapsilosis* (33%, 62% e 67%), em relação ao controle. Na Ampho B isolada, houve redução significativa de 51%, 55% e 41%, em relação ao controle, para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, respectivamente. Na concentração 2x CIM (para *C. tropicalis* e *C.*

*parapsilosis*) e na concentração 3x CIM (para as três espécies) houve maior redução da viabilidade, comparando a Ampho B isolada, mesmo com concentrações menores ou parecidas a do antifúngico isolado.

Figura 9 - Atividade da Mangiferina isolada e combinada aos antifúngicos frente ao biofilme de *Candida spp*



Atividade da mangiferina sozinha e em combinação com antifúngicos (FLC, ITR, Ampho B) contra células agrupadas em biofilmes pré-formado (A, B, C) e formado (D, F, G) de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, respectivamente, de acordo com o ensaio MTT. A Mangiferina foi avaliada isoladamente nas concentrações de CIM (21,3 µg/mL, 42,7 µg/mL, 42,7 µg/mL), 2x CIM (42,6 µg/mL, 85,4 µg/mL, 85,4 µg/mL) e 3x CIM (63,9 µg/mL, 128,1 µg/mL, 128,1 µg/mL), respectivamente. A Mangiferina foi avaliada em combinação com o fluconazol nas concentrações CIM (21,3 µg/mL MGF + 26,7 µg/mL FLC, 42,7 µg/mL MGF + 26,7 µg/mL FLC, 42,7 µg/mL MGF + 26,7 µg/mL FLC), 2x CIM (42,6 µg/mL MGF + 53,4 µg/mL FLC, 85,4 µg/mL MGF + 53,4 µg/mL FLC, 85,4 µg/mL MGF + 53,4 µg/mL FLC) e 3x CIM (63,9 µg/mL MGF + 80,1 µg/mL FLC, 128,1 µg/mL MGF + 80,1 µg/mL FLC, 128,1 µg/mL MGF + 80,1 µg/mL FLC), respectivamente, e FLC (26,7 µg/mL para as três espécies). A combinação com itraconazol foi avaliada nas concentrações CIM (10,6 µg/mL MGF + 0,3 µg/mL ITR, 14,2 µg/mL MGF + 0,2 µg/mL ITR, 17,8 µg/mL MGF + 0,2 µg/mL ITR), 2x CIM (21,2 µg/mL MGF + 0,6 µg/mL ITR, 28,4 µg/mL MGF + 0,4 µg/mL ITR, 35,6 µg/mL MGF + 0,4 µg/mL ITR) e 3x CIM (31,8 µg/mL MGF + 0,9 µg/mL ITR, 42,6 µg/mL MGF + 0,6 µg/mL ITR, 53,4 µg/mL MGF + 0,6 µg/mL ITR), ITR (0,7 µg/mL, 0,6 µg/mL, 0,5 µg/mL), respectivamente. A combinação com anfotericina B foi avaliada nas concentrações CIM (10,6 µg/mL MGF + 1,3 µg/mL Ampho B, 10,7 µg/mL MGF + 0,8 µg/mL Ampho B, 21,3 µg/mL MGF + 0,5 µg/mL Ampho B), 2x CIM (21,2 µg/mL MGF + 2,6 µg/mL Ampho B, 21,4 µg/mL MGF + 1,6 µg/mL Ampho B, 42,6 µg/mL MGF + 1 µg/mL Ampho B) e 3x CIM (31,8 µg/mL MGF + 3,9 µg/mL Ampho B, 32,1 µg/mL MGF + 2,4 µg/mL Ampho B, 63,9 µg/mL MGF + 1,5 µg/mL Ampho B), Ampho B (2,7 µg/mL, 3,3 µg/mL, 1 µg/mL), respectivamente. (\*) representa  $p < 0,05$  comparado ao controle, (\*\*) representa  $p < 0,05$  comparado ao antifúngico da combinação isolado, na análise por ANOVA seguida do teste de Tukey.

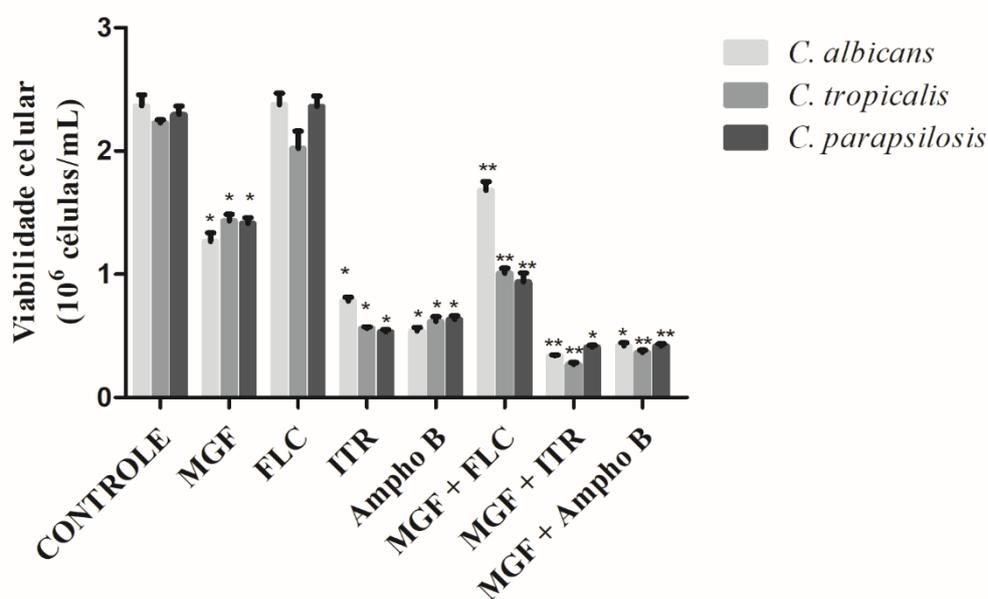
## 6.4 Ensaio de citometria de fluxo

### 6.4.1 Viabilidade celular

Em relação a viabilidade das células de *Candida* spp. após os tratamentos com MGF, ITR e Ampho B isolados, foi observada uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) da viabilidade celular em todos os tratamentos para *C. albicans* ( $1,26 \pm 0,07\%$ ,  $0,78 \pm 0,03\%$ ,  $0,54 \pm 0,03\%$ , respectivamente), *C. tropicalis* ( $1,43 \pm 0,05\%$ ,  $0,56 \pm 0,01\%$ ,  $0,62 \pm 0,04\%$ , respectivamente) e *C. parapsilosis* ( $1,41 \pm 0,04\%$ ,  $0,53 \pm 0,02\%$ ,  $0,63 \pm 0,03\%$ , respectivamente), em relação ao controle. Não houve diferença estatística entre o tratamento com FLC isolado e o controle nas três cepas de *Candida* spp. resistentes ao FLC.

Quanto a associação da MGF com os antifúngicos, houve maior redução da viabilidade celular ( $p < 0,05$ ) do que o controle e os antifúngicos isolados, mesmo em concentrações menores ou iguais aos valores de MIC das respectivas drogas. Em MGF + FLC, MGF + ITR e MGF + Ampho B houve redução da viabilidade, respectivamente, de  $1,68 \pm 0,07\%$ ,  $0,34 \pm 0,01\%$  e  $0,42 \pm 0,02\%$  para *C. albicans*,  $1,01 \pm 0,04\%$ ,  $0,27 \pm 0,01\%$  e  $0,37 \pm 0,02\%$  para *C. tropicalis* e de  $0,94 \pm 0,07\%$ ,  $0,41 \pm 0,02\%$  e  $0,42 \pm 0,02\%$  para *C. parapsilosis* (Figura 10).

Figura 10- Redução do número de células viáveis das cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol



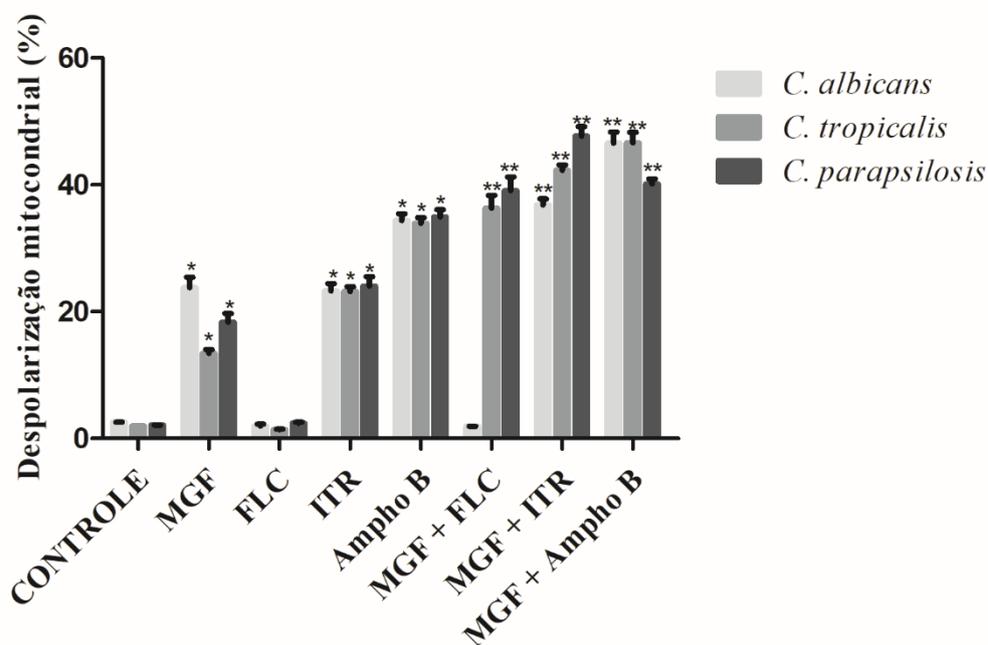
Avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo das células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* tratadas, respectivamente, com Mangiferina (MGF; 21,3 µg/mL, 42,7 µg/mL, 42,7 µg/mL), Fluconazol (FLC; 26,7 µg/mL para as três espécies), Itraconazol (ITR; 0,7 µg/mL, 0,6 µg/mL e 0,5 µg/mL), Anfotericina B (Ampho B; 2,7µg/mL, 3,3 µg/mL e 1,0 µg/mL), Mangiferina + Fluconazol (MGF + FLC; 21,3/26,7 µg/mL, 14,2/8,8 µg/mL e 21,3/13,3 µg/mL), Mangiferina + Itraconazol (MGF + ITR; 10,6/0,3 µg/mL, 14,2/0,2 µg/mL e 17,8/0,2 µg/mL) e Mangiferina + Anfotericina B (MGF + Ampho B; 10,6/1,3 µg/mL, 10,7/0,8 µg/mL e 21,3/0,5 µg/mL), após 24h de exposição. \* representa  $p < 0,05$  comparado ao controle (meio RPMI-1640 + microrganismo) e \*\* representa  $p < 0,05$  comparado ao antifúngico isolado, analisado por ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls.

#### **6.4.2 Alteração no potencial transmembranar mitocondrial de *Candida* spp.**

O tratamento com MGF, ITR e Ampho B isolados foi capaz de alterar o potencial transmembranar mitocondrial e aumentar significativamente ( $p < 0,05$ ) a despolarização mitocondrial em *C. albicans* ( $23,79 \pm 1,63\%$ ,  $23,28 \pm 1,15\%$ ,  $34,4 \pm 1,02\%$ , respectivamente), *C. tropicalis* ( $13,43 \pm 0,57\%$ ,  $23,18 \pm 0,75\%$ ,  $33,91 \pm 0,93\%$ , respectivamente) e *C. parapsilosis* ( $18,33 \pm 1,4\%$ ,  $24,03 \pm 1,48\%$ ,  $34,92 \pm 1,16\%$ , respectivamente), em relação ao controle. Não houve diferença estatística entre o tratamento com FLC isolado e o controle nas três cepas de *Candida* spp. resistentes ao FLC.

De modo geral, as combinações de MGF com os antifúngicos resultaram em uma maior despolarização mitocondrial ( $p < 0,05$ ) na maioria dos tratamentos, quando comparado ao controle e aos antifúngicos isolados. Em *C. albicans*, não houve diferença significativa entre MGF + FLC e o controle, porém houve aumento da despolarização mitocondrial em MGF + ITR e MGF + Ampho B de  $36,85 \pm 0,93\%$  e  $46,59 \pm 1,75\%$ , respectivamente. Já com as outras espécies, as combinações MGF + FLC, MGF + ITR e MGF + Ampho B aumentaram a despolarização mitocondrial, respectivamente, em  $36,31 \pm 2,01\%$ ,  $42,27 \pm 0,83\%$  e  $46,62 \pm 1,65\%$  para *C. tropicalis* e em  $39,1 \pm 2,14\%$ ,  $47,67 \pm 1,51\%$  e  $40,14 \pm 0,79\%$  para *C. parapsilosis* (Figura 11).

Figura 11 - Avaliação do potencial transmembranar mitocondrial das cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol



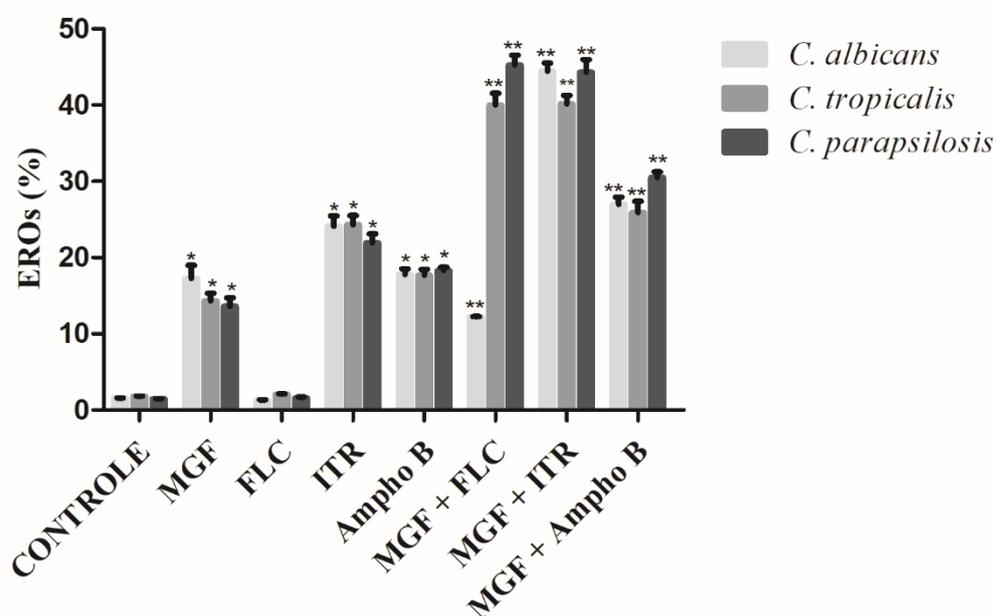
As células foram coradas com Rhodamine 123 (50 nM). As células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* foram tratadas, respectivamente, com Mangiferina (MGF; 21,3 µg/mL, 42,7 µg/mL, 42,7 µg/mL), Fluconazol (FLC; 26,7 µg/mL para as três espécies), Itraconazol (ITR; 0,7 µg/mL, 0,6 µg/mL e 0,5 µg/mL), Anfotericina B (Ampho B; 2,7 µg/mL, 3,3 µg/mL e 1,0 µg/mL), Mangiferina + Fluconazol (MGF + FLC; 21,3/26,7 µg/mL, 14,2/8,8 µg/mL e 21,3/13,3 µg/mL), Mangiferina + Itraconazol (MGF + ITR; 10,6/0,3 µg/mL, 14,2/0,2 µg/mL e 17,8/0,2 µg/mL) e Mangiferina + Anfotericina B (MGF + Ampho B; 10,6/1,3 µg/mL, 10,7/0,8 µg/mL e 21,3/0,5 µg/mL), após 24h de exposição. \* representa  $p < 0,05$  comparado ao controle (meio RPMI 1640) e \*\* representa  $p < 0,05$  comparado ao antifúngico isolado, analisado por ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls.

#### 6.4.3 Produção de EROs

Houve aumento significativo na produção de EROs ( $p < 0,05$ ) no tratamento com MGF, ITR, Ampho B isolados em *C. albicans* ( $17,26 \pm 1,73\%$ ,  $24,09 \pm 1,4\%$ ,  $17,75 \pm 0,75\%$ , respectivamente), *C. tropicalis* ( $14,31 \pm 0,99\%$ ,  $24,32 \pm 1,21\%$ ,  $17,67 \pm 0,78\%$ , respectivamente) e *C. parapsilosis* ( $13,61 \pm 1,12\%$ ,  $21,96 \pm 1,13\%$ ,  $18,3 \pm 0,42\%$ , respectivamente), em comparação ao controle. Não houve diferença estatística entre o tratamento com FLC isolado e o controle nas três cepas de *Candida* spp. resistentes ao FLC.

Quanto as combinações, todas resultaram em uma maior produção de EROs, em comparação ao controle e aos antifúngicos isolados nas três espécies. As combinações MGF + FLC, MGF + ITR e MGF + Ampho B aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ) a produção de EROs, respectivamente, em  $12,24 \pm 0,03\%$ ,  $44,42 \pm 1,11\%$  e  $26,97 \pm 0,97\%$  para *C. albicans*,  $40,04 \pm 1,54\%$ ,  $40,15 \pm 1,11\%$  e  $25,89 \pm 1,5\%$  para *C. tropicalis* e  $45,26 \pm 1,29\%$ ,  $44,33 \pm 1,66\%$  e  $30,51 \pm 0,7\%$  para *C. parapsilosis* (Figura 12).

Figura 12 - Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio pelas cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol



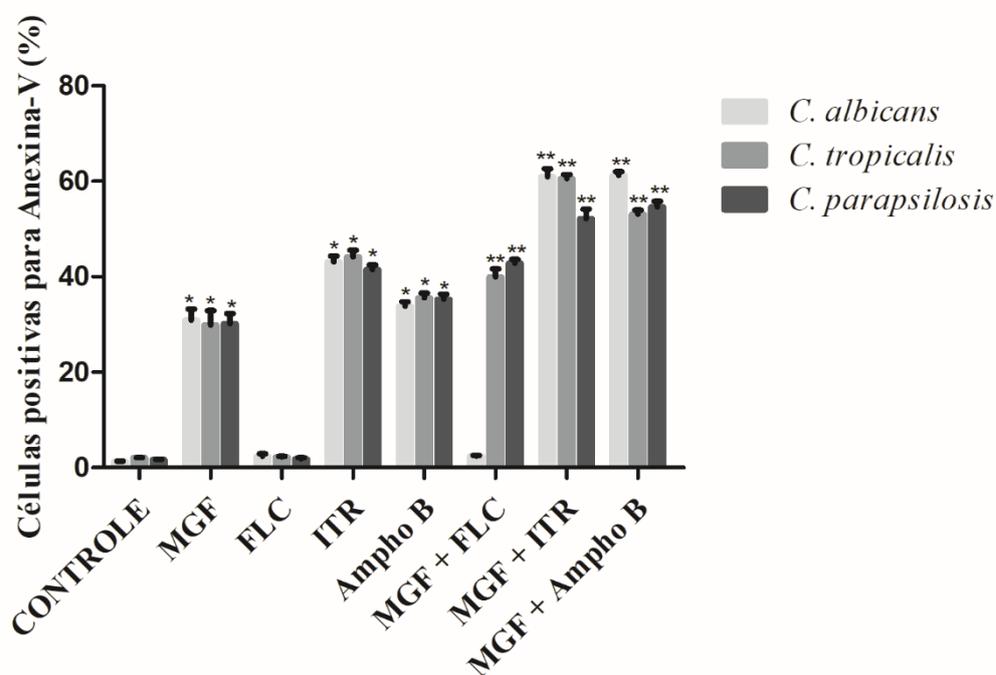
A porcentagem de formação de EROs foi avaliada após o tratamento das células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, respectivamente, com Mangiferina (MGF; 21,3  $\mu\text{g/mL}$ , 42,7  $\mu\text{g/mL}$ , 42,7  $\mu\text{g/mL}$ ), Fluconazol (FLC; 26,7  $\mu\text{g/mL}$  para as três espécies), Itraconazol (ITR; 0,7  $\mu\text{g/mL}$ , 0,6  $\mu\text{g/mL}$  e 0,5  $\mu\text{g/mL}$ ), Anfotericina B (Ampho B; 2,7  $\mu\text{g/mL}$ , 3,3  $\mu\text{g/mL}$  e 1,0  $\mu\text{g/mL}$ ), Mangiferina + Fluconazol (MGF + FLC; 21,3/26,7  $\mu\text{g/mL}$ , 14,2/8,8  $\mu\text{g/mL}$  e 21,3/13,3  $\mu\text{g/mL}$ ), Mangiferina + Itraconazol (MGF + ITR; 10,6/0,3  $\mu\text{g/mL}$ , 14,2/0,2  $\mu\text{g/mL}$  e 17,8/0,2  $\mu\text{g/mL}$ ) e Mangiferina + Anfotericina B (MGF + Ampho B; 10,6/1,3  $\mu\text{g/mL}$ , 10,7/0,8  $\mu\text{g/mL}$  e 21,3/0,5  $\mu\text{g/mL}$ ), após 24h de exposição. \* representa  $p < 0,05$  comparado ao controle (meio RPMI-1640) e \*\* representa  $p < 0,05$  comparado ao antifúngico isolado, analisado por ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls

#### 6.4.4 Externalização da fosfatidilserina

A MGF e os antifúngicos também foram analisados quanto a sua capacidade de externalizar a fosfatidilserina de células fúngicas marcadas com Anexina V, um indicador de apoptose celular. Sendo assim, houve aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do percentual de células com a fosfatidilserina externalizada após os tratamentos com MGF, ITR, Ampho B isolados em em *C. albicans* ( $30,89 \pm 2,37\%$ ,  $43,12 \pm 1,22\%$ ,  $33,81 \pm 0,95\%$ , respectivamente), *C. tropicalis* ( $29,87 \pm 3,04\%$ ,  $44,15 \pm 1,42\%$ ,  $35,55 \pm 1,04\%$ , respectivamente) e *C. parapsilosis* ( $30,16 \pm 2,13\%$ ,  $41,51 \pm 0,98\%$ ,  $35,3 \pm 1,08\%$ , respectivamente), em comparação com o controle. Não houve diferença estatística entre o tratamento com FLC isolado e o controle em nenhuma das cepas de *Candida* spp. resistentes ao FLC.

As combinações de MGF com os antifúngicos resultaram em maior percentual de células com a fosfatidilserina externalizada ( $p < 0,05$ ), em comparação ao controle e aos antifúngicos isolados, com exceção de MGF + FLC em *C. albicans*, na qual não houve diferença estatística com o controle. Nas combinações MGF + ITR e MGF + Ampho B houve aumento percentual de  $60,99 \pm 1,67\%$  e  $61,23 \pm 0,81\%$ , respectivamente, para *C. albicans*. Já com as outras espécies, as combinações MGF + FLC, MGF + ITR e MGF + Ampho B resultaram em aumento percentual, respectivamente, de  $39,99 \pm 1,64\%$ ,  $60,55 \pm 0,89\%$  e  $53,09 \pm 0,86\%$  para *C. tropicalis* e de  $42,81 \pm 0,79\%$ ,  $52,17 \pm 2,03\%$  e  $54,6 \pm 1,22\%$  para *C. parapsilosis* (Figura 13).

Figura 13 - Marcação da fosfatidilserina com anexina V em cepas de *Candida* spp. resistentes ao fluconazol



A intensidade de fluorescência indica a quantidade de células com externalização de fosfatidilserina. As células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* foram tratadas, respectivamente, com Mangiferina (MGF; 21,3 µg/mL, 42,7 µg/mL, 42,7 µg/mL), Fluconazol (FLC; 26,7 µg/mL para as três espécies), Itraconazol (ITR; 0,7 µg/mL, 0,6 µg/mL e 0,5 µg/mL), Anfotericina B (Ampho B; 2,7 µg/mL, 3,3 µg/mL e 1,0 µg/mL), Mangiferina + Fluconazol (MGF + FLC; 21,3/26,7 µg/mL, 14,2/8,8 µg/mL e 21,3/13,3 µg/mL), Mangiferina + Itraconazol (MGF + ITR; 10,6/0,3 µg/mL, 14,2/0,2 µg/mL e 17,8/0,2 µg/mL) e Mangiferina + Anfotericina B (MGF + Ampho B; 10,6/1,3 µg/mL, 10,7/0,8 µg/mL e 21,3/0,5 µg/mL), após 24h de exposição. \* representa  $p < 0,05$  comparado ao controle (meio RPMI -1640) e \*\* representa  $p < 0,05$  comparado ao antifúngico isolado, analisado por ANOVA seguida do teste de Newman-Keuls.

## 6.5 Ensaios de docagem molecular

### 6.5.1 Interação da Mangiferina com alvos de *C. albicans* relacionados a diferentes mecanismos de ação

Os complexos formados entre a MGF e os alvos *C. albicans* apresentaram RMSD na ordem de 1,055 Å a 1,861 Å, energia de afinidade na ordem de -9,1 kcal/mol a -6,9 kcal/mol,  $K_i$  na ordem de  $2,14 \times 10^{-7}$  a  $8,77 \times 10^{-6}$  e  $pK_i$  na ordem de 5,05 a 6,67, conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3 - Pontuações de interação de ligação, RMSD,  $K_i$ ,  $pK_i$ , aminoácidos e tipos de interação de Mangiferina nos receptores *C. albicans*

Receptor-Mangiferina	Afinidade (kcal/mol)	RMSD (Å)	$K_i$	$pK_i$	Resíduo	Interação	Distância (Å)
DNA polimerase de levedura ETA <sup>a</sup>	-7,1	1,753	$6,26 \times 10^{-6}$	5,20	Lys 399A	Hidrofóbica	5,47
					Gln 55A	Ligação de Hidrogênio	3,02
					Trp 56A	$\pi$ -Donor Ligação de Hidrogênio	3,30
					Val 126A	Ligação de Hidrogênio	2,31
					Asn 400A	Ligação de Hidrogênio	2,16
					Glu 422A	Ligação de Hidrogênio	2,63
					Arg 132A	<i>Unfavorable Donor-Donor</i>	2,26
Íntrons do grupo I do Loop J4/5 <sup>b</sup>	-7,1	1,861	$6,26 \times 10^{-6}$	5,20	Gua 3A	$\pi$ -Donor Ligação de Hidrogênio	3,25
Proteína de telômero de levedura Cdc13 OB4 <sup>c</sup>	-6,9	1,456	$8,77 \times 10^{-6}$	5,05	Pro 723B	Hidrofóbica	5,22
					Ser 606B	Ligação de Hidrogênio	2,05
					Thr 607B	Ligação de Hidrogênio	2,43
					Arg 711B	Ligação de Hidrogênio	2,70

					Cys 726B	Ligação de Hidrogênio	2,71
Superóxido dismutase 5 (SOD5) <sup>d</sup>	-7,3	1,707	$4,46 \times 10^{-6}$	5,35	Tyr 97A	Ligação de Hidrogênio	2,48
Exo-B-(1,3)-glucanase <sup>e</sup>	-9,1	1,250	$2,14 \times 10^{-7}$	6,67	Tyr 29A	Ligação de Hidrogênio	2,08
					Asn 146A	Ligação de Hidrogênio	2,56
					Asn 146A	Ligação de Hidrogênio	2,74
					Phe 144A	$\pi$ - $\pi$ Stacked	5,44
					Phe 258A	$\pi$ - $\pi$ Stacked	4,30
					Phe 258A	$\pi$ - $\pi$ Stacked	4,84
					Phe 229A	$\pi$ - $\pi$ Stacked	5,73
					Phe 229A	$\pi$ - $\pi$ Stacked	5,78
Mep2 <sup>f</sup>	-8,2	1,370	$9,79 \times 10^{-7}$	6,01	Val 111A	Hidrofóbica	4,38
					Val 111A	Hidrofóbica	4,54
					Val 111A	Ligação de Hidrogênio	3,77
					Trp 167A	Ligação de Hidrogênio	3,64
					Asp 180A	Ligação de Hidrogênio	1,83
					Asp 180A	Ligação de Hidrogênio	2,87
					Tyr 303A	Ligação de Hidrogênio	2,27
					Lys 112A	<i>Unfavorable Donor-Donor</i>	1,70

CYP51 <sup>g</sup>	-8,9	1,055	$3,00 \times 10^{-7}$	6,52	Ser 63B	Ligação de Hidrogênio	2,28
					Glu 70A	Ligação de Hidrogênio	2,65
					Glu 70B	Ligação de Hidrogênio	2,91
					Ser 74B	Ligação de Hidrogênio	2,89
					Trp 54B	$\pi$ - $\pi$ Stacked	3,67
					Trp 54B	$\pi$ - $\pi$ Stacked	3,99
					Trp 54B	$\pi$ - $\pi$ Stacked	4,13
					Trp 54B	$\pi$ - $\pi$ Stacked	5,28
					Timidilato Quinase <sup>h</sup>	-7,4	1,623
Tyr 100A	Ligação de Hidrogênio	2,60					
Gln 167A	Ligação de Hidrogênio	2,72					
Asp 13A	$\pi$ -Anion	3,75					
ADP 302A	$\pi$ -Anion	4,39					
ADP 302A	$\pi$ -Anion	4,31					
ADP 302A	$\pi$ -Anion	4,58					
MG 303A	$\pi$ -Cation	2,53					
MG 303A	$\pi$ -Cation	3,14					
MG 304A	<i>Metal-Acceptor</i>	2,31					
Complexo de Citocromo BC1 de Levedura <sup>i</sup>	-8,9	1,172	$3,00 \times 10^{-7}$	6,52	Arg 22B	Ligação de Hidrogênio	2,92

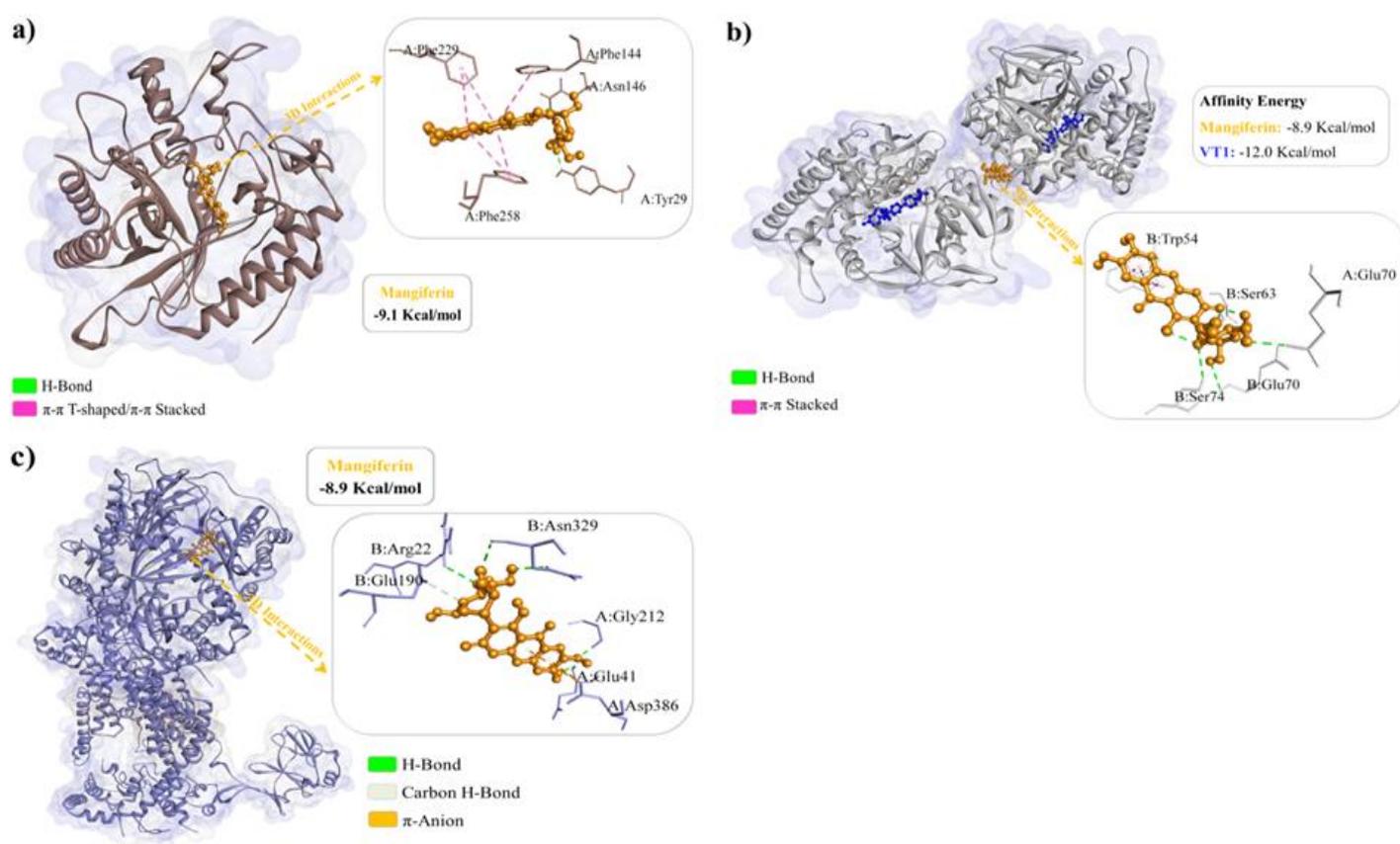
Glu 41A	Ligação de Hidrogênio	2,49
Glu 190B	Ligação de Hidrogênio	3,03
Gly 212A	Ligação de Hidrogênio	1,95
Asn 329B	Ligação de Hidrogênio	2,45
Asn 329B	Ligação de Hidrogênio	2,60
Asp 386A	$\pi$ -Anion	3,83
Asp 386A	$\pi$ -Anion	4,71

---

- a. A estrutura cristalina da DNA polimerase de levedura ETA - PDB ID: 1JIH.
- b. A estrutura cristalina dos Íntrons do grupo I do Loop J4/5 - PDB ID: 1TUT.
- c. A estrutura cristalina da proteína dos telômeros de levedura Cdc13 OB4 - PDB ID: 3RMH.
- d. A estrutura cristalina da Superóxido dismutase 5 (SOD5) - PDB ID: 4N3T.
- e. A estrutura cristalina da Exo-B-(1,3)-glucanase - PDB ID: 1EQP.
- f. A estrutura cristalina da Mep2 - PDB ID: 5AEZ.
- g. A estrutura cristalina da CYP51 - PDB ID: 5TZ1.
- h. A estrutura cristalina da Timidilato quinase - PDB ID: 5UIV.
- i. A estrutura cristalina do Complexo de citocromo BC1 de levedura - PDB ID: 1KB9.

A MGF formou complexos mais estáveis (menor energia) com os alvos Exo-B-(1,3)-glucanase (-9,1 kcal/mol), CYP51 (-8,9 kcal/mol) e Complexo de Citocromo BC1 de Levedura (-8,9 kcal/mol) (Figura 14 a-c). O cálculo da constante de inibição ( $K_i$ ) e  $pK_i$ , mostrou que a MGF necessitaria de uma menor concentração para inibir Exo-B-(1,3)-glucanase, CYP51 e Complexo de Citocromo BC1 de Levedura, pois estes complexos apresentaram os menores valores  $K_i$  e maiores  $pK_i$  (KADELA-TOMANEK et al., 2021)

Figura 14- Complexo de interação formado entre a Mangiferina e os principais alvos de *C. albicans*



A figura (a) mostra o complexo de interação Mangiferina/Exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase, figura (b) mostra o complexo de interação Mangiferina/CYP51 e a figura (c) mostra o complexo de interação Mangiferina/Complexo de citocromo BC1 de levedura.

A análise dos padrões de interação mostrou que o complexo MGF/Exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase é formado por três ligações de hidrogênio fortes envolvendo os resíduos Tyr 29A

(2,08 Å), Asn 146A (2,56 e 2,74 Å), três interações  $\pi$ - $\pi$  *Stacked* com os resíduos Phe 144A, Phe 258A e duas interações  $\pi$ - $\pi$  *Stacked* com Phe 229A.

O complexo MGF/CYP51 é formado por quatro ligações de hidrogênio fortes com os resíduos Ser 63B (2,28 Å), Glu 70A (2,65 Å), Glu 70B (2,91 Å), Ser 74B (2,89 Å) e quatro interações  $\pi$ - $\pi$  *Stacked* com Trp 54B. O redocking do inibidor VT1 co-cristalizado em CYP51 apresentou valores de 1,857 Å (RMSD), -12,0 kcal/mol (energia de afinidade),  $1,60 \times 10^{-9}$  (K<sub>i</sub>) e 8,79 (pK<sub>i</sub>). O sítio de ligação é composto pelos resíduos Tyr 64, Tyr 118, Leu 121, Thr 122, Phe 126, Ile 131, Tyr 132, Phe 228, Pro 230, Phe 233, Gly 303, Ile 304, Gly 307, Gly 308, Thr 311, Leu 376, His 377, Ser 378, Phe 380, Tyr 505, Ser 507 e Met 508 (HARGROVE et al., 2017). Foi observado que MGF se liga em uma região diferente do sítio de ligação do inibidor co-cristalizado, indicando um possível efeito sinérgico com VT1.

O complexo MGF/Complexo de citocromo BC1 de levedura é formado predominantemente por ligações de hidrogênio fortes envolvendo os resíduos Arg 22B (2,92 Å), Glu 41A (2,49 Å), Glu 190B (3,03 Å), Gly 212A (1,95 Å), Asn 329B (2,45 e 2,60 Å) e duas interações  $\pi$ -*Anion* com Asp 386A.

O complexo MGF/DNA Polimerase de Levedura ETA é formado por uma interação hidrofóbica com Lys 399A, quatro ligações de hidrogênio fortes com os resíduos Gln 55A (3,02 Å), Val 126A (2,31 Å), Asn 400A (2,16 Å), Glu 422A (2,63 Å), uma  $\pi$ -*Donor* ligação de hidrogênio moderada com Trp 56A (3,30 Å) e uma interação *Unfavorable Donor-Donor* com Arg 132A.

O complexo MGF/Ítrons do grupo I do Loop J4/5 é formado por uma  $\pi$ -*Donor* ligação de hidrogênio moderada com Gua 3A (3,25 Å). O complexo MGF/Proteína de telômero de levedura Cdc13 OB4 é formado por uma interação hidrofóbica com Pro 723B e quatro ligações de hidrogênio fortes envolvendo os resíduos Ser 606B (2,05 Å), Thr 607B (2,43 Å), Arg 711B (2,70 Å), Cys 726B (2,71 Å).

O complexo MGF/ Superóxido dismutase 5 (SOD5) é formado por uma ligação de hidrogênio forte com o resíduo Tyr 97A (2,48 Å). O complexo MGF/Mep2 é formado por duas interações hidrofóbicas com Val 111A, três ligações de hidrogênio fortes envolvendo os resíduos Asp 180A (1,83 e 2,87 Å), Tyr 303A (2,27 Å), duas ligações de hidrogênio fracas com os resíduos Val 111A (3,77 Å), Trp 167A (3,64 Å) e uma interação *Unfavorable Donor-Donor* com Lys 112A.

O complexo MGF/Timidilato Quinase é formado por três ligações de hidrogênio fortes envolvendo os resíduos Arg 92A (2,05 Å), Tyr 100A (2,60 Å), Gln 167A (2,72 Å), quatro interações  $\pi$ -Anion com os resíduos Asp 13A, ADP 302A, duas interações  $\pi$ -Cation com MG 303A e uma interação *Metal-Acceptor* com MG 304A.

### 6.5.2 Interação da Mangiferina com o resíduo ALS3 de *C. albicans*

Seguindo a técnica de encaixe molecular padrão, os valores de RMSD e energia de afinidade foram selecionados para definir as melhores conformações de encaixe, sendo RMSD de até 2 Å (YUSUF et al., 2008) e energia de afinidade inferior a -6,0 kcal/mol (SHITYAKOV; FÖRSTER, 2014). Os valores obtidos de RMSD e energia de afinidade de MGF foi de 1,631 Å e -7,3 kcal/mol com ALS3 de *C. albicans*. Já os valores de RMSD e energia de afinidade do FLC foi de 1,704 Å e -6,0 kcal/mol com ALS3.

A MGF apresentou 7 interações com resíduos de aminoácido da ALS3 (Tabela 4), sendo uma ligação hidrofóbica com Arg171 (4,79 Å), uma ligação  $\pi$ - $\pi$  *T-shaped* com Tyr21 (5,42 Å) e 5 ligações de hidrogênio convencionais com Tyr23A, Gly27, Thr168, Tyr226 e Lys59 (2,67 Å, 2,36 Å, 2,94 Å, 2,79 Å, 2,82 Å, respectivamente). O FLC foi utilizado como controle, uma vez que não apresenta atividade contra biofilme. O FLC apresentou 4 ligações com resíduos de aminoácido da ALS3, sendo 1 hidrofóbica com Val161 (3,72 Å) e 3 ligações de hidrogênio convencionais com Asn22, Tyr23 e Asp169 (2,03 Å, 2,17 Å, 3,45 Å, respectivamente). Não houve interação com resíduos de interesse da ALS3 (Figura 15).

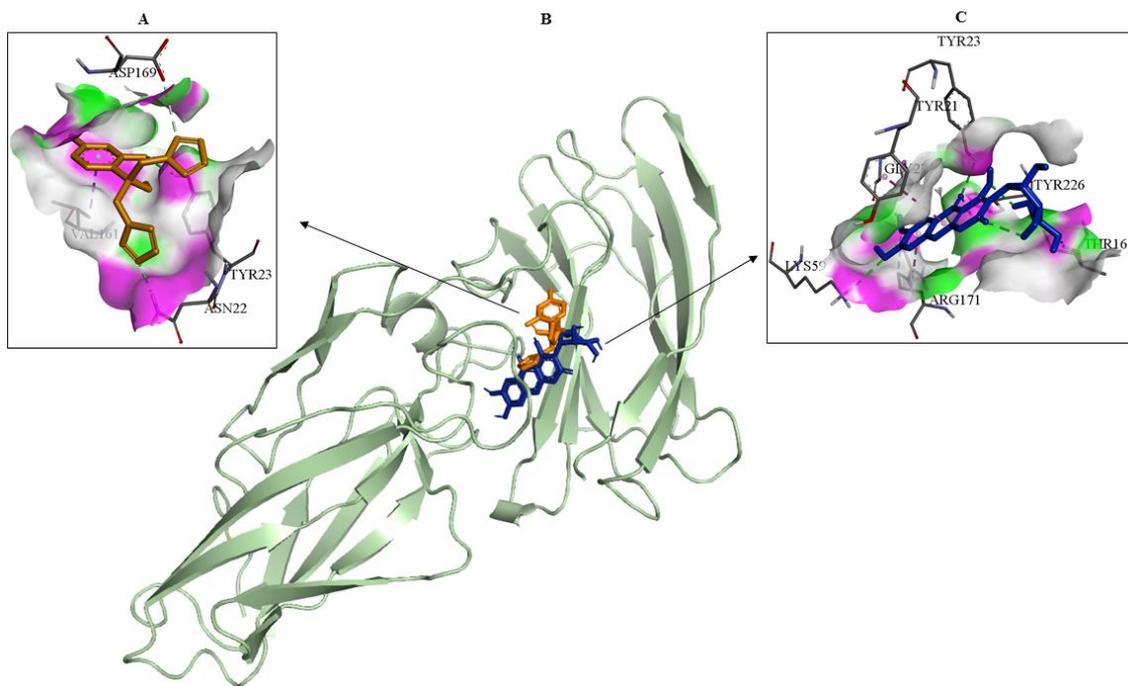
Tabela 4 - Tipos de interações e distâncias (Å) entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos de *Candida albicans* ALS3

Ligante	Receptor	Interação	Distância (Å)
Mangiferina	ARG171A	Hidrofóbica	4,79
	TYR23A	Ligação de Hidrogênio	2,67
	GLY27A	Ligação de Hidrogênio	2,36
	*LYS59A	Ligação de Hidrogênio	2,82
	THR168A	Ligação de Hidrogênio	2,94
	TYR226A	Ligação de Hidrogênio	2,79
	TYR21A	$\pi$ - $\pi$ <i>T-shaped</i>	5,42
Fluconazol	VAL161A	Hidrofóbica	3,72

ASN22A	Ligação de Hidrogênio	2,03
TYR23A	Ligação de Hidrogênio	2,17
ASP169A	Ligação de Hidrogênio	3,45

\*Resíduo do sítio ativo da ALS3.

Figura 15 - Visualização tridimensional dos resultados das simulações de docking para *C. albicans* ALS3 com a Mangiferina e o fluconazol

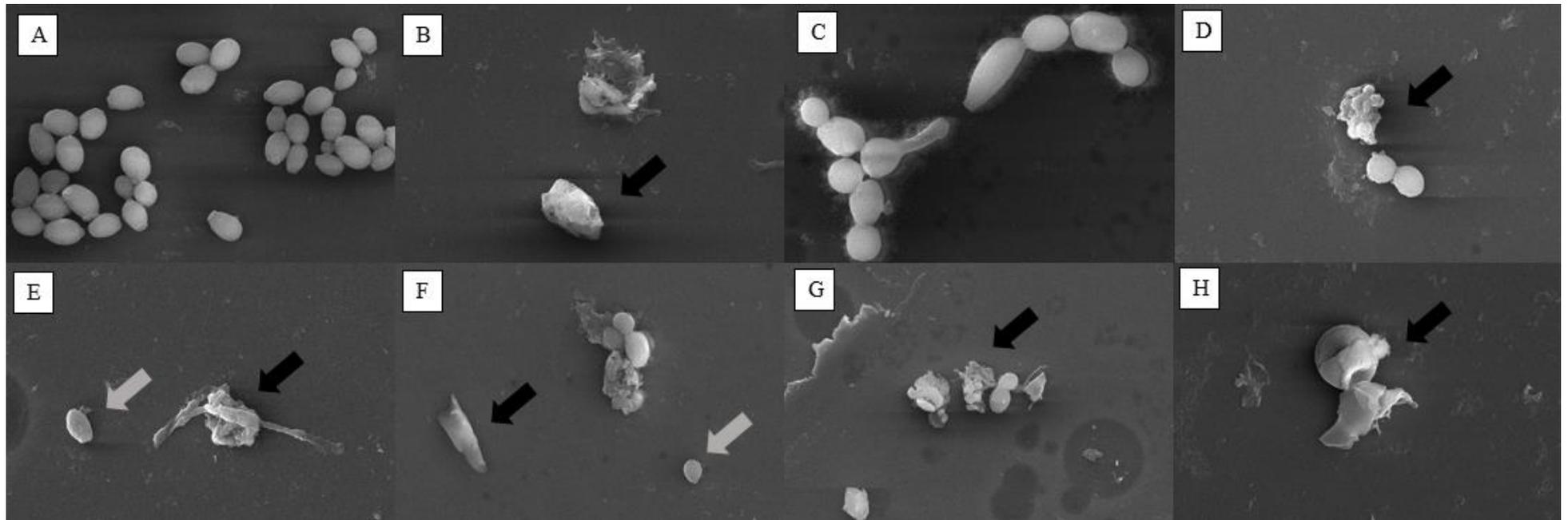


Mapa de ligação de hidrogênio do inibidor Fluconazol (A) e do ligante Mangiferina (C); Complexo de interação do receptor ALS3 com os ligantes (B).

## 6.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens obtidas por MEV (Figura 16) mostraram que após o tratamento de *C. albicans* 3 com MGF, ITR, Ampho B isolados nos valores de CIM, bem como nas combinações da MGF com FLC, ITR e Ampho B nos valores do CIM da combinação para esta cepa, as leveduras apresentaram forma celular distorcida, com a superfície da parede celular enrugada (seta preta) e encolhimento das células (seta cinza) comparado ao controle (células não tratadas), no qual pode-se observar células de superfície lisa e homogênea. Como a cepa utilizada é resistente ao FLC, não houve alterações estruturais nos blastoconídeos tratados com FLC isolado.

Figura 16 - Células planctônicas de *C. albicans* tratadas com Mangiferina e antifúngicos isolados e combinados visualizadas por microscopia eletrônica de varredura



A imagem A mostra o controle (células planctônicas não tratadas). As imagens de B a E mostram células planctônicas tratadas com a Mangiferina (341,3  $\mu\text{g/mL}$ ), Fluconazol (32  $\mu\text{g/mL}$ ), Itraconazol (0,7  $\mu\text{g/mL}$ ) e Anfotericina B (2  $\mu\text{g/mL}$ ) isolados, respectivamente. Já as imagens de F a H mostram as células planctônicas tratadas Mangiferina + Fluconazol (71,1  $\mu\text{g/mL}$  + 6,7  $\mu\text{g/mL}$ ), Mangiferina + Itraconazol (170,6  $\mu\text{g/mL}$  + 0,3  $\mu\text{g/mL}$ ) e Mangiferina + Anfotericina B (71,1  $\mu\text{g/mL}$  + 0,4  $\mu\text{g/mL}$ ), respectivamente. Setas pretas mostram células distorcidas e setas cinzas mostram células com tamanho reduzido.

### **6.7 Ensaio de citotoxicidade e hemolítico da Mangiferina**

Em relação a citotoxicidade, MGF apresentou  $CI_{50} > 150 \mu\text{g/mL}$  após 24h de incubação com células MRC-5. Além disso, o teste de hemólise mostrou que, após a incubação de eritrócitos com a MGF por 3 horas, não houve indução de hemólise nas concentrações de 100 e 300  $\mu\text{g/mL}$  de MGF, comparado ao controle Triton X-100.

## 7 DISCUSSÃO

O aumento de cepas de *Candida* spp. resistentes ao FLC encontradas na clínica, aliado ao baixo arsenal de antifúngicos disponíveis contra cepas resistentes a antifúngicos, faz necessária a busca por novos antimicrobianos, bem como drogas sinérgicas que possam melhorar a atividade dos antifúngicos (LI et al., 2017, LU et al., 2021, TORTORANO et al., 2021).

Estudos anteriores já demonstraram que MGF apresenta atividade antimicrobiana frente a cepas de *C. albicans* sensíveis a antifúngicos obtendo valores de CIM entre 30 e 40 µg/mL (ŠAVIKIN et al., 2009; ŠILER et al., 2014; SINGH et al., 2009). Outro estudo demonstrou que MGF apresentou valores de CIM variando entre 1,95 a 31,25 µg/mL para *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (YEHA; ALTWAIM, 2023). Além disso, o estudo de Shen et al. (2021) demonstrou que cepas de *C. albicans* sensíveis e resistentes a caspofungica e cepas clínicas de *C. parapsilosis* e *C. krusei* apresentaram CIM > 64 µg/mL para MGF. Esses dados corroboram com os encontrados no presente estudo, no qual também foi demonstrado que MGF apresenta atividade antifúngica em *Candida* spp., mesmo diante de cepas resistentes ao FLC.

Quanto aos diferentes valores de CIM observados em nosso estudo, acredita-se que isso possa estar relacionado a plasticidade do genoma de *Candida* spp., como variações genéticas entre as espécies e na expressão de genes, que podem variar tanto entre as diferentes espécies como entre cepas de uma mesma espécie. Além disso, a presença de diferentes fatores de virulência e mecanismos de resistência, a adaptação as condições ambientais e a resposta a múltiplos estresses também podem influenciar na sensibilidade das diferentes espécies e cepas de *Candida* a uma determinada droga (MBA; NWEZE, 2020; MORAN; COLEMAN; SULLIVAN, 2011)

Além disso, a atividade antibacteriana da MGF, bem como de seus compostos análogos sintéticos, já foi demonstrada contra *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *P. aeruginosa*, com valores de CIM variando de 30 a 500 µg/mL (ISHAQUE et al., 2022; ŠAVIKIN et al., 2009; SINGH et al., 2009; TCHINDA et al., 2019). O estudo de Tchinda et al. (2019) também demonstrou que MGF apresentou

atividade antibacteriana com bactérias Gram-negativas multirresistentes, obtendo valores de CIM de 64 µg/mL para *E. coli* e de 128 µg/mL para *E. aerogenes* e *Klebsiella pneumoniae*.

Tais dados mostram, de modo geral, que MGF apresenta atividade antibacteriana diante de uma ampla variedade de bactérias, além de mostrar que atualmente sua atividade antibacteriana é mais explorada e relatada na literatura do que sua atividade antifúngica. Isso mostra que há um gap na literatura sobre o conhecimento da atividade antifúngica de MGF, especialmente em relação às cepas que apresentam resistência aos antifúngicos.

Nosso estudo também se propôs a avaliar a interação resultante da combinação da MGF com o FLC, ITR e Ampho B. Vale ressaltar que, até então, não há relatos na literatura mostrando a interação da MGF com azóis e polienos, o que destaca a importância dos resultados encontrados em nosso estudo. Por outro lado, o estudo de Shen et al. (2021) demonstrou que MGF apresentou atividade sinérgica com a caspofungina, resultando em redução considerável dos valores de CIM nas cepas analisadas.

O mesmo ocorreu em nosso estudo com as cepas em que houve atividade sinérgica e aditiva, o que mostra que MGF, quando combinada a um antifúngico, pode reduzir a concentração necessária do antimicrobiano para inibir *in vitro* o crescimento de cepas resistentes a antifúngicos, além de possivelmente melhorar a atividade antifúngica desses.

Não obstante, também já foi relatado que MGF apresentou atividade sinérgica com o imipenem contra *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenem (VASUDEVAN et al., 2022), assim como apresentou atividade sinérgica com ácido nalidíxico, ampicilina, tetraciclina e sulfametoxazol/trimetoprima contra *S. aureus* (MAZLAN et al., 2019). Dessa forma, acredita-se que MGF possa interagir com o alvo da droga ou interferir em vias relacionadas ao mecanismo de resistência aos antimicrobianos, restaurando a atividade antimicrobiana das drogas associadas a ela, sendo uma alternativa à terapia de combinação de drogas (MAZLAN et al., 2019).

Quanto a atividade frente ao biofilme de *Candida* spp., nossos resultados mostraram que MGF isolada não apresentou atividade antibiofilme, assim como observado por Shen et al. (2021). Contudo, a atividade antibiofilme dos antifúngicos foi melhorada nas combinações com MGF, uma vez que concentrações menores ou iguais as dos antifúngicos isolados reduziram a viabilidade celular de modo mais eficaz, tanto no biofilme em formação quanto no biofilme formado.

Até o momento, não há outros relatos na literatura sobre a atividade antibiofilme de

MGF combinada com FLC, ITR ou Ampho B. Dentre os antifúngicos, há relatos apenas da combinação de MGF com a caspofungina, a qual também teve sua atividade frente ao biofilme de *C. albicans* melhorada por MGF (SHEN et al., 2021). Tais resultados são promissores, pois sugerem que a combinação de MGF com antifúngicos pode ajudar a reduzir a dose necessária desses para matar ou inibir o crescimento fúngico, reduzindo possíveis efeitos citotóxicos relacionados a dose. A combinação de drogas também é capaz de debelar a infecção de modo mais eficaz e minimizar o surgimento de resistência ao tratamento (JAFRI; AHMAD, 2020).

Um outro importante fator de virulência expresso por *C. albicans*, também associado ao biofilme, é a adesina ALS3, responsável pela adesão e invasão do tecido do hospedeiro, o que a torna um alvo de estudo *in silico* para investigar o potencial de novas drogas antimicrobianas (SÁ et al., 2020; SILVA et al., 2022b). Verificamos que MGF apresentou interações de hidrogênio com Lys59, um resíduo de aminoácido promotor de adesão, que faz parte do sítio ativo da ALS3 (SÁ et al., 2020).

Algumas drogas com atividade frente ao biofilme de *Candida* spp. apresentam interações com esse e outros resíduos presentes no sítio ativo da ALS3, sendo capazes de interferir no processo de adesão do biofilme no tecido do hospedeiro (SÁ et al., 2020; KIOSHIMA et al., 2019; NADAF et al., 2018; SILVA et al., 2022a). Considerando os nossos resultados obtidos frente ao biofilme de *Candida* spp., pode-se deduzir que a interação com um único resíduo de aminoácido do sítio ativo de ALS3 não é o suficiente para inibir a enzima e, conseqüentemente, a formação do biofilme.

Por outro lado, outros estudos *in silico* demonstram que MGF se apresenta como um ligante promissor, com capacidade de inibir fatores relacionados a formação do biofilme de *P. aeruginosa* e *Serratia marcescens*, além de relatar que sua combinação com antibióticos poderia apresentar atividade sinérgica e inibir a formação de biofilmes (ANNAPOORANI et al., 2012a; ANNAPOORANI et al., 2012b).

Após determinar a atividade antifúngica da MGF, nosso estudo também investigou o seu possível mecanismo de ação diante das cepas de *Candida* spp. resistentes ao FLC. Apesar de ser conhecida por sua atividade antioxidante, estudos já demonstraram que MGF pode apresentar atividades pró-oxidante e pró-apoptótica contra células cancerígenas (ABDULLAH et al., 2014; ABDULLAH et al., 2015; FERNÁNDEZ-PONCE et al., 2017; YAP et al., 2021). Por se tratar de células eucariontes, acredita-se que o mesmo mecanismo possa estar presente também em *Candida* spp.

Essa atividade pró-oxidante e pró-apoptótica ocorre porque, durante a reação de EROs com MGF, a porção catecol de MGF é oxidada, gerando derivados quinóides, os quais irão oxidar os grupos tióis mitocondriais. Tal fato resulta em disfunção mitocondrial, devido a dissipação do potencial de membrana mitocondrial e liberação de fatores apoptogênicos, levando a morte celular por apoptose induzida por transição de permeabilidade mitocondrial (ANDREU et al., 2005; LO GALBO et al., 2021).

Vale ressaltar que o acúmulo de produtos quinóides, ocasionados por catecóis oxidados de MGF, estaria presente em células sujeitas a uma produção exagerada de EROs, o que explicaria o fato da MGF poder apresentar atividade antioxidante em células saudáveis, mas apresentar atividade pró-oxidante em células sob estresse oxidativo, nas quais a apoptose induzida por transição de permeabilidade mitocondrial ocorre como um mecanismo de defesa contra a superprodução de EROs (ANDREU et al., 2005).

Dessa forma, nossos os resultados também demonstraram uma atividade pró-oxidante da MGF nas três espécies de *Candida*, representado por um aumento da produção de EROs, aumento da despolarização da membrana mitocondrial, possivelmente afetando a cadeia respiratória, diminuindo a viabilidade celular e culminando em morte por apoptose, evidenciada pelo aumento da externalização da fosfatidilserina.

Além disso, esses resultados podem ser intensificados quando MGF é combinada a antifúngicos, uma vez que as combinações obtiveram resultados mais significativos do que as droga isoladas. Apenas a combinação MGF + FLC não foi capaz de promover a despolarização mitocondrial e desencadear um processo apoptótico em *C. albicans*. Contudo, em *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, a combinação MGF + FLC resultou em despolarização mitocondrial e morte por apoptose, ou seja, é possível que o efeito das interações possa variar dependendo da espécie de *Candida* ou até mesmo entre cepas de uma mesma espécie.

Em relação a interação de MGF com os principais alvos relacionados a patogênese de *C. albicans*, a MGF apresentou um complexo mais estável com Exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase, com 3 interações de hidrogênio. Essa enzima é responsável por remodelar a parede celular de *Candida* spp. e alterações em sua estrutura podem conferir resistência aos antifúngicos (CUTFIELD et al., 1999; NETT et al., 2007).

Além disso, a interação com essa enzima poderia explicar a atividade sinérgica que MGF apresentou com a caspofungina no estudo de Shen et al. (2021). Como as células fúngicas diferem de células eucariontes humanas por apresentarem parede celular, a enzima Exo- $\beta$ -(1,3)-

glucanase é um alvo promissor específico para fungos a ser explorado por novos antifúngicos (CUTFIELD et al., 1999; IZGÜ; ALTINBAY; TÜRELI, 2007).

Outra enzima com a qual MGF apresentou um complexo mais estável, representado por 4 interações de hidrogênio, foi com CYP51, uma enzima importante para a via de biossíntese do ergosterol em fungos. A inibição dessa enzima pode resultar na perda de integridade da membrana plasmática fúngica, reduzindo a viabilidade celular (PARKER et al., 2014; RABELO et al., 2017), assim como foi observado em nossos ensaios.

Ademais, como MGF apresentou interações com um sítio da enzima diferente do apresentado por VT1, nossos resultados indicam que a MGF interage com outro sítio da enzima CYP51, o que sugere um possível efeito sinérgico com o inibidor co-cristalizado VT1. Dessa forma, a interação com CYP51 possivelmente tem relação com as atividades aditivas e sinérgicas que MGF apresentou com FLC e ITR. Juntando isso com o fato de MGF ter apresentando majoritariamente interações sinérgicas e aditivas com Ampho B, tais fatos sugerem que um possível mecanismo de ação de MGF seja por causar danos a membrana celular de *Candida* spp.

A disfunção mitocondrial também parece ser um dos mecanismos de ação da MGF, devido a sua capacidade de formar um complexo mais estável, apresentando 6 interações de hidrogênio, com o complexo de citocromo BC1 de levedura, o qual desempenha um importante papel na cadeia respiratória mitocondrial. Vale ressaltar que os produtos naturais têm se destacado como importantes inibidores do complexo citocromo BC1, principalmente após a descoberta, na área da agricultura, de uma importante classe de agentes antifúngicos protetores de cultivo, que apresentam esse mecanismo de ação (JOVIĆ; ŠMUC, 2021; MUSSO; FABBRINI; DALLAVALLE, 2020).

Além desses alvos, MGF também apresentou interações de hidrogênio com importantes alvos, como a enzima superóxido dismutase 5, responsável por proteger a levedura do estresse oxidativo (MARTCHENKO et al., 2004), com a DNA polimerase de levedura ETA, proteína de telômero de levedura Cdc13 OB4 e com íntrons do grupo I do loop J4/5, alvos importantes para manter a estabilidade do genoma fúngico e a funcionalidade de seu RNA (GE et al., 2020; PEROUMAL et al., 2019; YU et al., 2012; ZNOSCO et al., 2004).

A MGF pode comprometer a replicação do DNA de *Candida* spp., por meio de suas interações de hidrogênio com a enzima timidilato quinase, a qual é essencial para a biossíntese do nucleotídeo timidina trifosfato (HUANG et al., 2019). Pode também comprometer a

mudança fenotípica de *C. albicans* por suas interações de hidrogênio com o tranceptor de amônio metilamônia permease, Mep2, o qual é responsável pela indução da filamentação de *C. albicans* em ambientes com quantidades limitadas de amônia, sua principal fonte de nitrogênio (MORSCHHÄUSER, 2011; VAN DEN BERG et al., 2016).

Corroborando com os resultados encontrados, as imagens obtidas pelo MEV mostraram que as células planctônicas de *C. albicans* tratadas com MGF, ITR e Ampho B isolados apresentaram redução do tamanho das células e alterações morfológicas, comparado ao controle, indicando que as drogas foram capazes de causar danos nas células planctônicas. Além disso, as imagens também mostraram que as combinações da MGF com FLC, ITR e Ampho B, respectivamente, foram capazes de causar danos estruturais em *C. albicans*, mesmo em concentrações menores do que CIM das drogas isoladas, mostrando que há uma intensificação no efeito das drogas quando são combinadas.

O enrugamento da parede celular observado nas células planctônicas após os tratamentos realizados pode estar relacionado a alterações na função da parede celular fúngica, resultante da perda da rigidez mecânica, o que leva a alterações em sua função fisiológica e torna as células suscetíveis a pressão osmótica (HOLANDA et al., 2021; RUEDA; CUENCA-ESTRELLA; ZARAGOZA, 2014).

Por fim, é sabido que MGF desempenha um papel protetor para os eritrócitos, por eliminar a produção de espécies reativas de oxigênio, preservar a integridade da membrana celular e a funcionalidade dessas células (RODRÍGUEZ et al., 2006), o que corrobora com nossos resultados, devido a ausência de hemólise induzida por MGF.

Ademais, por apresentar  $CI_{50} > 150 \mu\text{g/mL}$ , a atividade antifúngica de MGF ocorreu em concentrações não citotóxicas, o que corrobora com estudos anteriores que demonstraram que MGF não induziu citotoxicidade, genotoxicidade ou mutagenicidade em linfócitos e hepatócitos de ratos em  $200 \mu\text{g/mL}$  (RODEIRO; DELGADO; GARRIDO, 2014).

Apesar de alguns concentrações de MGF utilizadas em nosso estudo serem maiores do que  $150 \mu\text{g/mL}$ , outros estudos já demonstraram que MGF em concentração igual ou maior do que  $1.000 \mu\text{g/mL}$  não apresentou atividade citotóxica em células de linhagem T humanas (C8166 e MT-4), células mononucleares de sangue periférico e em ratos Wistar (REDDEMAN et al., 2019; WANG et al., 2011).

## 8 CONCLUSÃO

Diante dos fatos expostos neste estudo, a MGF apresenta atividade antifúngica diante de cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* resistentes ao FLC, apresentando atividade sinérgica ou aditiva com FLC, ITR e Ampho B. A associação da MGF com antifúngicos melhora a atividade desses frente ao biofilme de *Candida* spp., podendo diminuir a concentração do antifúngico necessária para reduzir significativamente a viabilidade celular. A MGF foi capaz de reduzir o número de células fúngicas viáveis, promover a despolarização da membrana mitocondrial, aumentar a produção interna de espécies reativas de oxigênio e promover a externalização da fosfatidilserina, o que aponta fortemente para morte celular por apoptose. A análise *in silico* da MGF mostrou interações com alvos de *C. albicans* associados a diferentes mecanismos relacionados a sua patogênese, apontando para possíveis alvos responsáveis pelo seu mecanismo de ação frente a essas leveduras. A MGF não apresentou citotoxicidade em células MRC-5, sugerindo exercer um papel antioxidante para células do hospedeiro e pró-oxidante contra possíveis patógenos, sendo necessário mais estudos para explicar tal mecanismo.

## REFERÊNCIAS

ABDULLAH, Al-Shwyeh Hussah et al. Cytotoxic effects of *Mangifera indica* L. kernel extract on human breast cancer (MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines) and bioactive constituents in the crude extract. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2014.

ABDULLAH, Al-Shwyeh Hussah et al. Induction of apoptosis and oxidative stress in estrogen receptor-negative breast cancer, MDA-MB231 cells, by ethanolic mango seed extract. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2015.

AHMAD, Suhail; ALFOUZAN, Wadha. *Candida auris*: Epidemiology, diagnosis, pathogenesis, antifungal susceptibility, and infection control measures to combat the spread of infections in healthcare facilities. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, p. 807, 2021.

ALLEN, David et al. Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 13, n. 6, p. 787-798, 2015.

ALMEIDA JRN, João et al. Axillary digital thermometers uplifted a multidrug-susceptible *Candida auris* outbreak among COVID-19 patients in Brazil. **Mycoses**, v. 64, n. 9, p. 1062-1072, 2021.

ANDREU, Gilberto Lázaro Pardo et al. Mangiferin, a natural occurring glucosyl xanthone, increases susceptibility of rat liver mitochondria to calcium-induced permeability transition. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 439, n. 2, p. 184-193, 2005.

ANNAPOORANI, Angusamy et al. Computational discovery of putative quorum sensing inhibitors against LasR and RhlR receptor proteins of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 26, p. 1067-1077, 2012a.

ANNAPOORANI, Angusamy et al. Methods to determine antipathogenic potential of phenolic and flavonoid compounds against urinary pathogen *Serratia marcescens*. **Journal of microbiological methods**, v. 91, n. 1, p. 208-211, 2012b.

ARENDRUP, Maiken Cavling; PATTERSON, Thomas F. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. **The Journal of infectious diseases**, v. 216, n. suppl\_3, p. S445-S451, 2017

ARMSTRONG-JAMES, Darius et al. Immunotherapeutic approaches to treatment of fungal diseases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 12, p. e393-e402, 2017.

ASIF, Afifa et al. Therapeutic potentials of bioactive compounds from mango fruit wastes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 53, p. 102-112, 2016.

BERKOW, Elizabeth L.; LOCKHART, Shawn R. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. **Infection and drug resistance**, v. 10, p. 237, 2017.

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

BERMAN, Judith; KRYSAN, Damian J. Drug resistance and tolerance in fungi. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 319-331, 2020.

BERNARDIS, Flavia et al. Studies of immune responses in *Candida* vaginitis. **Pathogens**, v. 4, n. 4, p. 697-707, 2015.

BIOVIA, Dassault Systèmes. Dassault Systèmes; San Diego: 2016. **Discovery Studio Modeling Environment, Release**, v. 4, 2017.

BONHOMME, Julie; D'ENFERT, Christophe. *Candida albicans* biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment. **Current opinion in microbiology**, v. 16, n. 4, p. 398-403, 2013.

BRAGA, Paula Rocha et al. Secular trends of candidemia at a Brazilian tertiary care teaching hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, p. 273-277, 2018.

BRITO, Ana Sofia et al. Yeast filamentation signaling is connected to a specific substrate translocation mechanism of the Mep2 transceptor. **PLoS genetics**, v. 16, n. 2, p. e1008634, 2020.

BROOKS, Geo F. et al. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg-26**. AMGH Editora, 2014.

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

CASSONE, Antonio. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 122, n. 6, p. 785-794, 2015.

CAVALCANTI, Bruno Coêlho et al. Etomidate is devoid of genotoxicity and mutagenicity in human lymphocytes and in the *Salmonella typhimurium*/microsomal activation test. **Toxicology in Vitro**, v. 68, p. 104946, 2020.

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

CHANDRASEKAR, Pranatharthi. Management of invasive fungal infections: a role for polyenes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 3, p. 457-465, 2011

CHOWDHARY, A. et al. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of systemic phaeohyphomycosis: diseases caused by black fungi. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p. 47-75, 2014.

CHOWDHARY, Anuradha et al. A multicentre study of antifungal susceptibility patterns

among 350 *Candida auris* isolates (2009–17) in India: role of the ERG11 and FKS1 genes in azole and echinocandin resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 4, p. 891-899, 2018.

CLEVELAND, Angela Ahlquist et al. Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008–2013: results from population-based surveillance. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0120452, 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard-third edition M27-A3. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA. 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth informational supplement. CLSI document M27- S4. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA. 2012.

COWEN, Leah E. et al. Mechanisms of antifungal drug resistance. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 7, p. a019752, 2015

CSIZMADIA, Péter. MarvinSketch and MarvinView: molecule applets for the World Wide Web. 1999.

CUI, Jinhui et al. Synergistic combinations of antifungals and anti-virulence agents to fight against *Candida albicans*. **Virulence**, v. 6, n. 4, p. 362-371, 2015.

CUTFIELD, Sue M. et al. The structure of the exo- $\beta$ -(1, 3)-glucanase from *Candida albicans* in native and bound forms: relationship between a pocket and groove in family 5 glycosyl hydrolases. **Journal of molecular biology**, v. 294, n. 3, p. 771-783, 1999.

CUTFIELD, J. F.; SULLIVAN, P. A.; CUTFIELD, S. M. Minor structural consequences of alternative CUG codon usage (Ser for Leu) in *Candida albicans* exoglucanase. **Protein engineering**, v. 13, n. 10, p. 735-738, 2000.

CZECHOWICZ, Paulina; NOWICKA, Joanna; GOŚCINIAK, Grażyna. Virulence Factors of *Candida* spp. and Host Immune Response Important in the Pathogenesis of Vulvovaginal Candidiasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 11, p. 5895, 2022

DANTAS, Kátia Cristina et al. A single-centre, retrospective study of the incidence of invasive fungal infections during 85 years of autopsy service in Brazil. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 3943, 2021.

DeLano W. L., “The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3,” *Schrödinger LLC*. 2020.

DU, Han et al. *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. **PLoS pathogens**, v. 16, n. 10, p. e1008921, 2020.

EDWARDS JR, John E. et al. A fungal immunotherapeutic vaccine (NDV-3A) for treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis—a phase 2 randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Clinical Infectious Diseases**, v. 66, n. 12, p. 1928-1936, 2018.

ENOCH, David A. et al. The changing epidemiology of invasive fungal infections. **Human Fungal Pathogen Identification**, p. 17-65, 2017.

FERNÁNDEZ-PONCE, M. T. et al. Selective antitumoural action of pressurized mango leaf extracts against minimally and highly invasive breast cancer. **Food & function**, v. 8, n. 10, p. 3610-3620, 2017.

FISHER, Matthew C. et al. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**, v. 360, n. 6390, p. 739-742, 2018.

FOMENKO, Ekaterina Vladimirovna; CHI, Yuling. Mangiferin modulation of metabolism and metabolic syndrome. **BioFactors**, v. 42, n. 5, p. 492-503, 2016.

FRIEDMAN, Daniel ZP; SCHWARTZ, Ilan S. Emerging fungal infections: new patients, new patterns, and new pathogens. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 3, p. 67, 2019.

GE, Yunhui et al. Structural insights into telomere protection and homeostasis regulation by yeast CST complex. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 27, n. 8, p. 752-762, 2020.

GIOLO, Muriel Padovani; SVIDZINSKI, Terezinha Inez Estivalet. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, p. 225-234, 2010.

GIRELLI, Kely Marcia; BENEDETTI, Volmir Pitt. Perfil de sensibilidade de *Candida albicans* frente ao fluconazol isolados de diferentes sítios anatômicos. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 22, n. 3, 2018.

GLEASON, Julie E. et al. *Candida albicans* SOD5 represents the prototype of an unprecedented class of Cu-only superoxide dismutases required for pathogen defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 16, p. 5866-5871, 2014.

GOLD-SMITH, Fuchsia; FERNANDEZ, Alyssa; BISHOP, Karen. Mangiferin and cancer: Mechanisms of action. **Nutrients**, v. 8, n. 7, p. 396, 2016.

GONÇALVES, Bruna et al. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n. 6, p. 905-927, 2016.

GUERRA, Thamila Menezes. **Estudos de docking molecular de derivados da tiazolidina como potenciais inibidores da enzima cruzaina de *Trypanosoma cruzi***. BachelorThesis, Brasil, 2019.

HACIOGLU, Mayram et al. Antifungal susceptibilities, in vitro production of virulence factors and activities of ceragenins against *Candida* spp. isolated from vulvovaginal candidiasis. **Medical Mycology**, v. 57, n. 3, p. 291-299, 2019.

HALGREN, Thomas A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **Journal of computational chemistry**, v. 17, n. 5-6, p. 490-519, 1996.

HANWELL, Marcus D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 1-17, 2012.

HARGROVE, Tatiana Y. et al. Structural analyses of *Candida albicans* sterol 14 $\alpha$ -demethylase complexed with azole drugs address the molecular basis of azole-mediated inhibition of fungal sterol biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 16, p. 6728-6743, 2017.

HOHMANN, Fábio Barlem et al. Characteristics, risk factors, and outcomes of bloodstream *Candida* infections in the intensive care unit: a retrospective cohort study. **Journal of International Medical Research**, v. 51, n. 1, p. 03000605221131122, 2023.

HOLANDA, Maria et al. Evaluation of the antifungal activity in vitro of midazolam against fluconazole-resistant *Candida* spp. isolates. **Future Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 71-81, 2021.

HUANG, Chang-Yu et al. The Ca-loop in thymidylate kinase is critical for growth and contributes to pyrimidine drug sensitivity of *Candida albicans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 27, p. 10686-10697, 2019.

HUEY, Ruth; MORRIS, Garrett M.; FORLI, Stefano. Using AutoDock 4 and AutoDock vina with AutoDockTools: a tutorial. **The Scripps Research Institute Molecular Graphics Laboratory**, v. 10550, p. 92037, 2012.

ICHIKAWA, Tomoe et al. Adherence and cytotoxicity of *Candida* spp. to HaCaT and A549 cells. **Medical mycology journal**, v. 60, n. 1, p. 5-10, 2019.

IMBERTY, Anne et al. Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A. **Glycobiology**, v. 1, n. 6, p. 631-642, 1991.

IMRAN, Muhammad et al. Mangiferin: a natural miracle bioactive compound against lifestyle related disorders. **Lipids in health and disease**, v. 16, n. 1, p. 1-17, 2017.

ISHAQUE, Muhammad et al. Xanthone C-glycosides isomers purified from *Dryopteris ramosa* (Hope) C. Chr. with bactericidal and cytotoxic prospects. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 2, p. 1191-1196, 2022.

IZGÜ, Fatih; ALTINBAY, Demet; TÜRELI, Akif Emre. In Vitro Susceptibilities of *Candida* spp. to Panomycocin, a Novel Exo- $\beta$ -1, 3-Glucanase Isolated from *Pichia anomala* NCYC 434. **Microbiology and immunology**, v. 51, n. 9, p. 797-803, 2007.

JAFARI, Maryam et al. Exoenzyme activity and possibility identification of *Candida dubliniensis* among *Candida albicans* species isolated from vaginal candidiasis. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 73-77, 2017.

JAFRI, H.; AHMAD, I. Thymus vulgaris essential oil and thymol inhibit biofilms and interact synergistically with antifungal drugs against drug resistant strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Journal de mycologie Medicale**, v. 30, n. 1, p. 100911, 2020.

JORGE, Paula et al. Searching for new strategies against biofilm infections: Colistin-AMP combinations against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* single-and double-species biofilms. **PLoS One**, v. 12, n. 3, p. e0174654, 2017

JOVIĆ, Ozren; ŠMUC, Tomislav. Search for Novel Lead Inhibitors of Yeast Cytochrome bc1, from Drugbank and COCONUT. **Molecules**, v. 26, n. 14, p. 4323, 2021.

KADELA-TOMANEK, Monika et al. Lipophilicity, pharmacokinetic properties, and molecular docking study on SARS-CoV-2 target for betulin triazole derivatives with attached 1, 4-quinone. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 6, p. 781, 2021.

KARYGIANNI, L. et al. Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial

communities. **Trends in Microbiology**, v. 28, n. 8, p. 668-681, 2020.

KHAN, Fazlurrahman et al. Mixed biofilms of pathogenic *Candida*-bacteria: Regulation mechanisms and treatment strategies. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 699-727, 2021.

KIM, Suhyun; WOO, Eun-Rhan; LEE, Dong Gun. Synergistic antifungal activity of isoquercitrin: apoptosis and membrane permeabilization related to reactive oxygen species in *Candida albicans*. **IUBMB life**, v. 71, n. 2, p. 283-292, 2019.

KIM, Jong H. et al. Antifungal drug repurposing. **Antibiotics**, v. 9, n. 11, p. 812, 2020.

KIOSHIMA, Erika Seki et al. Selection of potential anti-adhesion drugs by in silico approaches targeted to ALS3 from *Candida albicans*. **Biotechnology letters**, v. 41, n. 12, p. 1391-1401, 2019.

KUMAR, Manoj et al. Mango (*Mangifera indica* L.) leaves: Nutritional composition, phytochemical profile, and health-promoting bioactivities. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, p. 299, 2021.

LAMOTH, Frederic et al. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. suppl\_1, p. i4-i13, 2018.

LANGE, Christian et al. Specific roles of protein–phospholipid interactions in the yeast cytochrome bc1 complex structure. **The EMBO journal**, v. 20, n. 23, p. 6591-6600, 2001.

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

LI, De-Dong et al. Potent in vitro synergism of fluconazole and osthole against fluconazole-resistant *Candida albicans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 8, 2017.

LI, Wei et al. Insights into the role of extracellular DNA and extracellular proteins in biofilm formation of *Vibrio parahaemolyticus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 813, 2020.

LIN, Jing et al. The peptide-binding cavity is essential for Als3-mediated adhesion of *Candida albicans* to human cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 26, p. 18401-18412, 2014.

LO GALBO, Valentina et al. Redox Imbalance and Mitochondrial Release of Apoptogenic Factors at the Forefront of the Antitumor Action of Mango Peel Extract. **Molecules**, v. 26, n. 14, p. 4328, 2021.

LOCKHART, Shawn R. *Candida auris* and multidrug resistance: defining the new normal. **Fungal Genetics and Biology**, v. 131, p. 103243, 2019.

LOPES, José Pedro; LIONAKIS, Michail S. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Virulence**, v. 13, n. 1, p. 89-121, 2022.

LU, Hui et al. *Candida albicans* targets that potentially synergize with fluconazole. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 323-337, 2021.

LUCIO, Francisco Nithael Melo et al. Methylcytosine alkaloid potentially active against dengue virus: a molecular docking study and electronic structural characterization. **Int J Res**, v. 8, n. 1, p. 221-36, 2020.

MARAK, Munmun B.; DHANASHREE, Biranthabail. Antifungal susceptibility and biofilm production of *Candida* spp. isolated from clinical samples. **International journal of microbiology**, v. 2018, 2018.

MARINHO, Emanuelle Machado et al. Virtual screening based on molecular docking of possible inhibitors of Covid-19 main protease. **Microbial Pathogenesis**, v. 148, p. 104365, 2020.

MARTCHENKO, Mikhail et al. Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional

regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. **Molecular biology of the cell**, v. 15, n. 2, p. 456-467, 2004.

MAYER, François L.; WILSON, Duncan; HUBE, Bernhard. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013

MAZLAN, Nurul Azima et al. Synergistic antibacterial activity of mangiferin with antibiotics against *Staphylococcus aureus*. **Drug Invention Today**, v. 12, p. 14-17, 2019.

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

MCCALL, Andrew D. et al. *Candida albicans* biofilm development is governed by cooperative attachment and adhesion maintenance proteins. **NPJ biofilms and microbiomes**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2019.

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

MEHRA, Tarun et al. Alternative approaches to antifungal therapies. **Experimental dermatology**, v. 21, n. 10, p. 778-782, 2012.

MELO, Camylla Carvalho et al. Colonized patients by *Candida auris*: Third and largest outbreak in Brazil and impact of biofilm formation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 1033707, 2023.

MESA-ARANGO, Ana C.; SCORZONI, Liliana; ZARAGOZA, Oscar. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 286, 2012.

MONTOYA, Marhiah C.; MOYE-ROWLEY, W. Scott; KRYSAN, Damian J. *Candida auris*: the canary in the mine of antifungal drug resistance. **ACS infectious diseases**, v. 5, n. 9, p. 1487-1492, 2019.

MORAN, Gary P.; COLEMAN, David C.; SULLIVAN, Derek J. Comparative genomics and the evolution of pathogenicity in human pathogenic fungi. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 1, p. 34-42, 2011

MORSCHHÄUSER, Joachim. Nitrogen regulation of morphogenesis and protease secretion in *Candida albicans*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 5, p. 390-394, 2011.

MURILLO, Luis A. et al. Genome-wide transcription profiling of the early phase of biofilm formation by *Candida albicans*. **Eukaryotic cell**, v. 4, n. 9, p. 1562-1573, 2005.

MURPHY, Sarah E.; BICANIC, Tihana. Drug resistance and novel therapeutic approaches in invasive candidiasis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 759408, 2021.

MUSSO, Loana; FABBRINI, Andrea; DALLAVALLE, Sabrina. Natural compound-derived cytochrome bc1 complex inhibitors as antifungal agents. **Molecules**, v. 25, n. 19, p. 4582, 2020.

NADAF, Naiem H. et al. Biofilm inhibition mechanism from extract of *Hymenocallis littoralis* leaves. **Journal of ethnopharmacology**, v. 222, p. 121-132, 2018.

NETO, João BA et al. Antifungal activity of naphthoquinoidal compounds in vitro against fluconazole-resistant strains of different *Candida* species: a special emphasis on mechanisms of action on *Candida tropicalis*. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e93698, 2014.

NETO, João Batista de Andrade et al. Anti-MRSA activity of curcumin in planktonic cells and biofilms and determination of possible action mechanisms. **Microbial pathogenesis**, v. 155, p. 104892, 2021.

NETT, Jeniel et al. Putative role of  $\beta$ -1, 3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 510-520, 2007.

NISHIKAWA, Joy L. et al. Inhibiting fungal multidrug resistance by disrupting an activator–mediator interaction. **Nature**, v. 530, n. 7591, p. 485-489, 2016.

NIVOIX, Yasmine; LEDOUX, Marie-Pierre; HERBRECHT, Raoul. Antifungal therapy: new and evolving therapies. In: **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**. Thieme Medical Publishers, 2020. p. 158-174.

NOBILE, Clarissa J.; JOHNSON, Alexander D. *Candida albicans* biofilms and human disease. **Annual review of microbiology**, v. 69, p. 71, 2015.

NOBLE, Suzanne M.; GIANETTI, Brittany A.; WITCHLEY, Jessica N. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 96-108, 2017.

NOCUA-BÁEZ, Laura Cristina et al. Azoles de antes y ahora: una revisión. **Revista chilena de infectología**, v. 37, n. 3, p. 219-230, 2020.

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

OLIVEIRA, Carla Sakuma de et al. Clinical and epidemiological aspects of Candidemia in eight medical centers in the state of Parana, Brazil: Parana Candidemia Network. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 25, 2021.

PALUCH, E. et al. Prevention of biofilm formation by quorum quenching. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 104, n. 5, p. 1871-1881, 2020.

PARKER, Josie E. et al. Resistance to antifungals that target CYP51. **Journal of Chemical**

**Biology**, v. 7, n. 4, p. 143-161, 2014.

PERFECT, John R.; DURACK, David T. Treatment of experimental cryptococcal meningitis with amphotericin B, 5-fluorocytosine, and ketoconazole. **Journal of Infectious Diseases**, v. 146, n. 3, p. 429-435, 1982.

PERLIN, David S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, Riina; ALASTRUEY-IZQUIERDO, Ana. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet infectious diseases**, v. 17, n. 12, p. e383-e392, 2017

PEROUMAL, Doureradjou et al. Virulence and pathogenicity of a *Candida albicans* mutant with reduced filamentation. **Cellular microbiology**, v. 21, n. 12, p. e13103, 2019.

PETTERSEN, Eric F. et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.

PFALLER, Michael A. et al. Antifungal activity of a new triazole, D0870, compared with four other antifungal agents tested against clinical isolates of *Candida* and *Torulopsis glabrata*. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 19, n. 2, p. 75-80, 1994.

PFALLER, Michael A. et al. Twenty years of the SENTRY antifungal surveillance program: results for *Candida* species from 1997–2016. In: **Open forum infectious diseases**. US: Oxford University Press, 2019. p. S79-S94.

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

PINHATI, Henrique Marconi Sampaio et al. Outbreak of candidemia caused by fluconazole resistant *Candida parapsilosis* strains in an intensive care unit. **BMC infectious diseases**, v. 16, n. 1, p. 1-6, 2016.

PRIYA, Arumugam; PANDIAN, Shunmugiah Karutha. Piperine impedes biofilm formation and hyphal morphogenesis of *Candida albicans*. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 756, 2020.

QUEIROZ-TELLES, Flavio et al. Chromoblastomycosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 30, n. 1, p. 233-276, 2017.

RABELO, Vitor W. et al. Targeting CYP 51 for drug design by the contributions of molecular modeling. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 31, n. 1, p. 37-53, 2017.

READIO, Josephine D.; BITTMAN, Robert. Equilibrium binding of amphotericin B and its methyl ester and borate complex to sterols. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 685, n. 2, p. 219-224, 1982.

REDDEMAN, Robin A. et al. A toxicological evaluation of mango leaf extract (*Mangifera indica*) containing 60% mangiferin. **Journal of Toxicology**, v. 2019, 2019.

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

ROBBINS, Nicole; WRIGHT, Gerard D.; COWEN, Leah E. Antifungal drugs: the current armamentarium and development of new agents. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 5, p. 4.5. 19, 2016

ROBBINS, Nicole; CAPLAN, Tavia; COWEN, Leah E. Molecular evolution of antifungal drug resistance. **Annual review of microbiology**, v. 71, p. 753-775, 2017.

RODEIRO, I.; DELGADO, R.; GARRIDO, G. Effects of a *Mangifera indica* L. stem bark extract and mangiferin on radiation-induced DNA damage in human lymphocytes and lymphoblastoid cells. **Cell proliferation**, v. 47, n. 1, p. 48-55, 2014.

RODRIGUES, Maria Elisa et al. Novel strategies to fight *Candida* species infection. **Critical**

**reviews in microbiology**, v. 42, n. 4, p. 594-606, 2016.

RODRIGUES, Luiza Souza et al. Invasive candidiasis: risk factor for mortality in a pediatric tertiary care hospital in south of Brazil. **Medicine**, v. 98, n. 23, 2019.

RODRIGUES, Maria Elisa; GOMES, Fernanda; RODRIGUES, Célia F. *Candida* spp./bacteria mixed biofilms. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 5, 2020.

RODRIGUES, Luiza S. et al. Genotypic Diversity of *Candida parapsilosis* Complex in Invasive Candidiasis at a Pediatric Tertiary Hospital: A 5-Year Retrospective Study. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 12, p. 1280, 2022.

RODRÍGUEZ, Janet et al. Effects of a natural extract from *Mangifera indica* L, and its active compound, mangiferin, on energy state and lipid peroxidation of red blood cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1760, n. 9, p. 1333-1342, 2006.

RUEDA, Cristina; CUENCA-ESTRELLA, Manuel; ZARAGOZA, Oscar. Paradoxical growth of *Candida albicans* in the presence of caspofungin is associated with multiple cell wall rearrangements and decreased virulence. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 1071-1083, 2014.

SÁ, Livia Gurgel do Amaral Valente et al. Antifungal activity of etomidate against growing biofilms of fluconazole-resistant *Candida* spp. strains, binding to mannoproteins and molecular docking with the ALS3 protein. **Journal of Medical Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 1221-1227, 2020.

SABATELLI, F. et al. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 2009-2015, 2006.

SANGUINETTI, Maurizio; POSTERARO, Brunella; LASS-FLÖRL, Cornelia. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, p. 2-

13, 2015.

SANTOS, Samantha Bertoncello et al. Presence of *Candida* spp. and candidiasis in liver transplant patients. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 93, n. 3, p. 356-361, 2018a.

SANTOS, Giselle C.O. et al. *Candida* infections and therapeutic strategies: mechanisms of action for traditional and alternative agents. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1351, 2018b.

ŠAVIKIN, Katarina et al. Antimicrobial activity of *Gentiana lutea* L. extracts. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 64, n. 5-6, p. 339-342, 2009.

SHEN, Juan et al. Mangiferin enhances the antifungal activities of caspofungin by destroying polyamine accumulation. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 217-230, 2021.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S. A., 2004.

SHITYAKOV, Sergey; FÖRSTER, Carola. In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood–brain barrier choline transporter. **Advances and applications in bioinformatics and chemistry: AABC**, v. 7, p. 23, 2014.

SIKORA, M. et al. Differences in proteolytic activity and gene profiles of fungal strains isolated from the total parenteral nutrition patients. **Folia microbiologica**, v. 56, n. 2, p. 143-148, 2011.

SIKORA, Magdalena et al. Czynniki wirulencji grzybów z rodzaju *Candida* istotne w patogenezie zakażeń występujących u pacjentów żywionych pozajelitowo. **Post. Mikrobiol**, v. 54, n. 3, p. 224-234, 2015.

ŠILER, Branislav et al. Centauries as underestimated food additives: Antioxidant and antimicrobial potential. **Food chemistry**, v. 147, p. 367-376, 2014.

SILVA, Sónia et al. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification,

structure and matrix composition. **Sabouraudia**, v. 47, n. 7, p. 681-689, 2009.

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

SILVA, Sónia et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012

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

SILVA, J. et al. Evaluation of the ADME, toxicological analysis and molecular docking studies of the anacardic acid derivatives with potential antibacterial effects against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Analytical & Pharmaceutical research**, v. 10, n. 5, p. 177-194, 2021.

SILVA, Cecília Rocha et al. Evaluation of the antifungal effect of chlorogenic acid against strains of *Candida* spp. resistant to fluconazole: apoptosis induction and in silico analysis of the possible mechanisms of action. **Journal of Medical Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 001526, 2022a.

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

SINGH, S. K. et al. Antimicrobial evaluation of mangiferin analogues. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, v. 71, n. 3, p. 328, 2009.

SINGH, Shashi Kant et al. Antimicrobial evaluation of mangiferin and its synthesized analogues. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, p. S884-S887, 2012.

SINHA, Kaustubh; RULE, Gordon S. The structure of thymidylate kinase from *Candida albicans* reveals a unique structural element. **Biochemistry**, v. 56, n. 33, p. 4360-4370, 2017.

SOLIMAN, Sameh et al. Plants' natural products as alternative promising anti-*Candida* drugs. **Pharmacognosy reviews**, v. 11, n. 22, p. 104, 2017.

SPITZER, Michaela; ROBBINS, Nicole; WRIGHT, Gerard D. Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 169-185, 2017.

SUDBERY, Peter E. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 737-748, 2011.

TAKASHIMA, Masako; SUGITA, Takashi. Taxonomy of Pathogenic Yeasts *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, and *Trichosporon* Current Status, Future Perspectives, and Proposal for Transfer of Six *Candida* Species to the Genus *Nakaseomyces*. **Medical Mycology Journal**, v. 63, n. 4, p. 119-132, 2022

TALAPKO, Jasminka; ŠKRLEC, Ivana. The principles, mechanisms, and benefits of unconventional agents in the treatment of biofilm infection. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 10, p. 299, 2020.

TALAPKO, Jasminka et al. *Candida albicans*—the virulence factors and clinical manifestations of infection. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 79, 2021

TANG, Yuanting et al. The changes of antifungal susceptibilities caused by the phenotypic switching of *Candida* species in 229 patients with vulvovaginal candidiasis. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 33, n. 1, p. e22644, 2019.

TCHINDA, Cedric F. et al. Antibacterial and antibiotic-modifying activities of fractions and compounds from *Albizia adianthifolia* against MDR Gram-negative enteric bacteria. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 19, n. 1, p. 120, 2019.

TORTORANO, Anna Maria et al. Candidemia: evolution of drug resistance and novel therapeutic approaches. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, p. 5543, 2021.

TRINCAO, Jose et al. Structure of the catalytic core of *S. cerevisiae* DNA polymerase  $\eta$ : implications for translesion DNA synthesis. **Molecular cell**, v. 8, n. 2, p. 417-426, 2001.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

TSUI, Christina; KONG, Eric F.; JABRA-RIZK, Mary Ann. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **Pathogens and disease**, v. 74, n. 4, 2016.

TULASIDAS, Sanyuktha et al. A study on biofilm production and antifungal drug resistance among *Candida* species from vulvovaginal and bloodstream infections. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 2443, 2018.

VAN DEN BERG, Bert et al. Structural basis for Mep2 ammonium transceptor activation by phosphorylation. **Nature communications**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2016.

VASILYEVA, N. V. et al. Etiology of invasive candidosis agents in Russia: a multicenter epidemiological survey. **Frontiers of Medicine**, v. 12, p. 84-91, 2018.

VASUDEVAN, Aparna et al. In Silico and In Vitro Screening of Natural Compounds as Broad-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Inhibitors against *Acinetobacter baumannii* New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase-1 (NDM-1). **BioMed research international**, v. 2022, 2022

VERA-GONZÁLEZ, Noel; SHUKLA, Anita. Advances in biomaterials for the prevention and disruption of *Candida* biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 538602, 2020

VIEIRA, J. N. et al. Evaluation of the frequency of *Candida* spp. in hospitalized and non-hospitalized subjects. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 4, p. 644-652, 2018.

WANG, Rui-Rui et al. Mangiferin, an anti-HIV-1 agent targeting protease and effective against resistant strains. **Molecules**, v. 16, n. 5, p. 4264-4277, 2011.

WHALEY, Sarah G. et al. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans Candida* species. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 2173, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action. In: **WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action**. 2022.

YAP, Kah Min et al. *Mangifera indica* (Mango): A promising medicinal plant for breast cancer therapy and understanding its potential mechanisms of action. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, p. 471-503, 2021.

YAN, Jiakai et al.  $\alpha$ -Glucosidase inhibition by luteolin: Kinetics, interaction and molecular docking. **International journal of biological macromolecules**, v. 64, p. 213-223, 2014.

YEHIA, Ramy S.; ALTWAIM, Sarah A. An Insight into In Vitro Antioxidant, Antimicrobial, Cytotoxic, and Apoptosis Induction Potential of Mangiferin, a Bioactive Compound Derived from *Mangifera indica*. **Plants**, v. 12, n. 7, p. 1539, 2023.

YU, Eun Young et al. Analyses of *Candida* Cdc13 orthologues revealed a novel OB fold dimer arrangement, dimerization-assisted DNA binding, and substantial structural differences between Cdc13 and RPA70. **Molecular and cellular biology**, v. 32, n. 1, p. 186-198, 2012.

YUSUF, Dilmurat et al. An alternative method for the evaluation of docking performance: RSR vs RMSD. **Journal of chemical information and modeling**, v. 48, n. 7, p. 1411-1422, 2008.

ZNOSKO, Brent M. et al. Structural features and thermodynamics of the J4/5 loop from the *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* group I introns. **Biochemistry**, v. 43, n. 50, p. 15822-15837, 2004.

ZONIOS, Dimitrios I.; BENNETT, John E. Update on azole antifungals. In: **Seminars in respiratory and critical care medicine**. Published by Thieme Medical Publishers, 2008. p. 198-210.

ŻYREK, Dawid et al. The antimicrobial activity of omiganan alone and in combination against *Candida* isolated from vulvovaginal candidiasis and bloodstream infections. **Antibiotics**, v. 10, n. 8, p. 1001, 2021.

## ANEXO A – TABELA SUPLEMENTAR (S1)

Tabela S1 - Parâmetros de simulação do receptor de *Candida albicans*

Parâmetros <i>grid</i>	DNA polimerase de levedura ETA <sup>a</sup>	Ítrons do grupo I do Loop J4/5 <sup>b</sup>	Proteína dos telômeros de levedura Cdc13 OB4 <sup>c</sup>	Superóxido dismutase 5 (SOD5) <sup>d</sup>	Exo-β-(1,3)- glucanase <sup>e</sup>	Mep2 <sup>f</sup>	CYP51 <sup>g</sup>	Timidilato quinase <sup>h</sup>	Complexo de citocromo BC1 de levedura <sup>i</sup>
<i>center_x</i>	58,958	-0,294	-15,264	15,104	35,383	-34,684	55,998	22,808	-16,237
<i>center_y</i>	42,694	-0,318	-7,388	-2,367	33,334	38,813	52,119	17,329	68,306
<i>center_z</i>	23,431	16,758	0,583	-15,281	57,288	-16,304	21,812	8,752	2,345
<i>size_x</i>	102	72	92	102	116	84	72	100	100
<i>size_y</i>	112	74	70	84	112	100	90	106	126
<i>size_z</i>	114	110	126	92	124	126	108	102	112

- a. A estrutura cristalina da DNA polimerase de levedura ETA - PDB ID: 1JIH.
- b. A estrutura cristalina dos Ítrons do grupo I do Loop J4/5 - PDB ID: 1TUT.
- c. A estrutura cristalina da proteína dos telômeros de levedura Cdc13 OB4 - PDB ID: 3RMH.
- d. A estrutura cristalina da Superóxido dismutase 5 (SOD5) - PDB ID: 4N3T.
- e. A estrutura cristalina da Exo-β-(1,3)-glucanase - PDB ID: 1EQP.
- f. A estrutura cristalina da Mep2 - PDB ID: 5AEZ.
- g. A estrutura cristalina da CYP51 - PDB ID: 5TZ1.
- h. A estrutura cristalina da Timidilato quinase - PDB ID: 5UIV.
- i. A estrutura cristalina do Complexo de citocromo BC1 de levedura - PDB ID: 1KB9.