



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA (PPGBP)

MONALISA SILVA DE SOUZA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E EFEITO SINÉRGICO ENTRE O
DERIVADO SINTÉTICO 4-HIDROXICUMARINA E ANFOTERICINA B
FRENTE CEPAS DE *Candida albicans***

NATAL/RN

2022

MONALISA SILVA DE SOUZA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E EFEITO SINÉRGICO ENTRE O
DERIVADO SINTÉTICO 4-HIDROXICUMARINA E ANFOTERICINA B
FRENTE CEPAS DE *Candida albicans***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, do Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos parciais necessários para a obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária.

Área de Concentração: **Microbiologia**

Orientador(a): Profa Dra Vânia Sousa Andrade

Coorientador: Dr Jefferson Duarte

NATAL/RN

2022

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson - -Centro de Biociências - CB

Souza, Monalisa Silva de.

Atividade antimicrobiana e efeito sinérgico entre o derivado sintético 4-hidroxicumarina e anfotericina B frente cepas de *Candida albicans* / Monalisa Silva de Souza. - 2022.
88 f.: il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária. Natal/RN, 2022.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Sousa Andrade.

Coorientador: Prof. Dr. Jefferson Duarte.

1. *Candida albicans* - Dissertação. 2. Cumarinas - Dissertação. 3. 4-Hidroxicumarina - Dissertação. 4. Atividade antifúngica - Dissertação. 5. Sinergismo - Dissertação. I. Andrade, Vânia Sousa. II. Duarte, Jefferson. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BSCB

CDU 616.934

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora por interceder sempre pela minha vida em todos os momentos, principalmente em minha trajetória acadêmica, para que eu nunca desista de lutar por dias melhores, levando-me a crê que o impossível é só questão de escolha e a fé que habita em mim suportará todas as dificuldades que venham a surgir.

A toda minha família, principalmente a minha mãe, minha avó e meu tio, Carmem Célia, Maria do Socorro e Rinaldo, pela dedicação incondicional à minha educação, formação dos meus valores e caráter, bem como o amor e carinho em toda minha vida, devo tudo a vocês.

À professora Vânia Sousa Andrade, minha orientadora, por todo acolhimento, atenção, segurança e respeito transmitida a mim desde a graduação, como aluna de iniciação científica, e atualmente como mestranda. Serei eternamente grata por todos os ensinamentos e conselhos diante dessa trajetória, que me tornou capaz de conseguir finalizar etapas importantes, e romper as dificuldades ao longo do mestrado, minha eterna gratidão.

Ao meu coorientador Jefferson Duarte pela parceria diante da pesquisa, abordagens sobre a substância, sendo de grande importância para a realização desse trabalho.

Aos amigos e parceiros do LEAN, Joama e Fábio, por toda contribuição para a realização desse trabalho, amizade e companheirismo de vocês ao longo de todas as etapas de experimentos, vocês são incríveis e especiais.

À UFRN e todos os professores do Programa de Pós graduação em Biologia Parasitária, por todos os conhecimentos, oportunidades e aprendizados adquiridos nesse período. Aos meus amigos da turma de mestrado, em especial Rayane, minha parceira dessa grande e desafiadora jornada, cheia de experiências. Obrigada pelo incentivo, pelos momentos de descontração, e pelo acolhimento nos dias difíceis ao longo desses dois anos de pós graduação.

Ao meu noivo Deyvison, por todo companheirismo e incentivo diante dos momentos difíceis, me transmitindo força e coragem para todos os desafios diários ao durante esses anos.

Por fim, à todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

RESUMO

As infecções fúngicas tornaram-se um grande desafio diante do impacto da resistência aos antifúngicos usuais na conduta terapêutica, além da falta de implementação de técnicas de diagnóstico mais avançadas nas unidades públicas de saúde. Concomitantemente, observa-se um maior número de casos, refletindo em aumento da incidência das doenças fúngicas, tanto em condições de imunossupressão como em pacientes imunologicamente hígidos em processos infecciosos adquiridos por via exógena. As espécies do gênero *Candida* continuam sendo as mais implicadas nas infecções fúngicas invasivas, as quais notoriamente desencadeiam altos índices de mortalidade. Diante desse cenário, houve um aumento na busca pelo desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, assim como a implementação de estratégias para prevenir a candidemia. Estudos com produtos bioativos derivados de plantas, que historicamente apresentam propriedades biológicas bem consolidadas e que demonstram segurança quanto a toxicidade, vêm sendo avaliados para uma aplicação mais concreta. Dentre os compostos em estudo, ressalta-se as cumarinas e seus derivados, como a 4-Hidroxicumarina, o qual possui atributos importantes, incluindo propriedades antiviral, antitumoral e anticoagulante. Diante desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica do composto fenólico sintético 4-Hidroxicumarina sobre cepas de *Candida albicans*, bem como analisar os efeitos sinérgicos entre esse composto e o antifúngico anfotericina B. A atividade biológica da 4-Hidroxicumarina foi averiguada em 17 cepas de *Candida albicans*, a partir da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela técnica de microdiluição em caldo e pelo método da Concentração Fungicida Mínima (CFM). Para a verificar o efeito sinérgico, através do método de *Checkerboard*, foram selecionadas 5 cepas da espécie *C. albicans*, considerando critérios de patogenicidade entre as 17 cepas e os valores de CIM encontrados. Constatou-se atividade antifúngica, para 15 das 17 cepas testadas com CIM variando entre 5,0 e 0,625 mg/mL, e CFM variando entre 5,0 a 1,25 mg/mL. Com relação a avaliação do efeito sinérgico entre o composto sintético e o antifúngico, observou-se que essa combinação apresentou caráter aditivo e indiferente frente algumas cepas. Concluiu-se que a 4 - Hidroxicumarina apresenta potencial antifúngico, em sua maioria de natureza fungistática, ou seja, reduz a carga leveduriforme, porém mostrou-se pouco eficaz com relação ao efeito sinérgico quando associada a Anfotericina B, um antifúngico reconhecido como fungicida, sugerindo que a 4 - Hidroxicumarina poderá constituir uma estratégia promissora na terapêutica antifúngica.

Palavras-chave: *Candida albicans*; Cumarinas; 4-Hidroxicumarina; Atividade antifúngica; Sinergismo.

ABSTRACT

Fungal infections have become a major challenge in view of the impact of resistance to usual antifungal agents on therapeutic management, in addition to the lack of implementation of more advanced diagnostic techniques in public health units. Concomitantly, a greater number of cases is observed, reflecting an increase in the incidence of fungal diseases, both in immunosuppression conditions and in immunologically healthy patients in exogenously acquired infectious processes. Species of the genus *Candida* continue to be the most implicated in invasive fungal infections, which notoriously trigger high mortality rates. Given this scenario, there was an increase in the search for the development of new antifungal agents, as well as the implementation of strategies to prevent candidemia. Studies with bioactive products derived from plants, which historically have well-established biological properties and which demonstrate safety in terms of toxicity, have been evaluated for a more concrete application. Among the compounds under study, coumarins and their derivatives, such as 4-Hydroxycoumarin, stand out, which has important attributes, including antiviral, antitumor and anticoagulant properties. In this context, the present study aimed to evaluate the antifungal activity of the synthetic phenolic compound 4-Hydroxycoumarin on *Candida albicans* strains, as well as to analyze the synergistic effects between this compound and the antifungal Amphotericin B. The biological activity of 4-hydroxycoumarin was investigated in 17 strains of *Candida albicans*, from the determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by the broth microdilution technique and by the Minimum Fungicide Concentration (MFC) method. To verify the synergistic effect, through the Checkerboard method, 5 strains of the *C. albicans* species were selected, considering pathogenicity criteria among the 17 strains and the MIC values found. Antifungal activity was found for 15 of the 17 strains tested with MIC ranging from 5.0 to 0.625 mg/mL, and CFM ranging from 5.0 to 1.25 mg/mL. Regarding the evaluation of the synergistic effect between the synthetic compound and the antifungal, it was observed that this combination presented an additive and indifferent character against some strains. It was concluded that 4-Hydroxycoumarin has antifungal potential, mostly of a fungistatic nature, that is, it reduces the yeast load, but it was not very effective in relation to the synergistic effect when associated with amphotericin B, an antifungal recognized as a fungicide, suggesting that 4-Hydroxycoumarin may be a promising strategy in antifungal therapy.

Keywords: *Candida albicans*; Coumarins; 4 – Hydroxycoumarin; Antifungal activity; Synergism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo dos principais fatores de virulência do gênero <i>Candida</i>	12
Figura 2. Principais antifúngicos e seus mecanismos de ação	16
Figura 3. Estruturas molecular da 1,2 benzopirona.....	21
Figura 4. Rota de biossíntese da cumarina.....	22
Figura 5. Estrutura molecular da 4 – Hidroxicumarina.....	26
Figura 6. Fórmula da Concentração Inibitória Fracionada.....	29
Figura 7. Representação esquemática das microdiluições da 4 - Hidroxicumarina e Anfotericina B para a determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM.....	35
Figura 8. Reação da oxi-redução da Rezasurina.....	36
Figura 9. Representação esquemática determinação da Concentração Fungicida Mínima – CFM da 4 - Hidroxicumarina e Anfotericina B pelo método de semeadura “spot”.....	36
Figura 10. Representação esquemática das diluições da 4 - Hidroxicumarina e Anfotericina B para obtenção das CIM e das concentrações sub-inibitórias.....	37
Figura 11. Representação esquemática da associação entre a 4-Hidroxicumarina e Anfotericina B pelo Método de <i>Checkerboard</i>	38
Figura 12. Representação esquemática da cinética de crescimento da <i>C.albicans</i>	40
Figura 13. Concentração inibitória mínima (CIM) para o derivado cumarínico 4 – Hidroxicumarina frente a cepas de <i>C. albicans</i>	43
Figura 14. Concentração fungicida mínima (CFM) para o derivado cumarínico 4 – Hidroxicumarina frente a cepas de <i>C. albicans</i>	43
Figura 15. Cinética de crescimento da <i>C. albicans</i> (CFP00107) diante das concentrações inibitórias e sub-inibitórias combinadas da 4-Hidroxicumarina e Anfotericina B (*p<0,05).....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes tipos de cumarinas	23
Tabela 2. Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FICI) e tipos de interações.....	29
Tabela 3. Descrição das amostras de leveduras (Fiocruz-RJ) usados nos ensaios experimentais.....	34
Tabela 4. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Inibitória Máxima da 4-Hidroxicumarina frente a cepas de <i>C. albicans</i>	42
Tabela 5. Cepas de <i>C. albicans</i> selecionadas para o estudo de associação entre a 4-Hidroxicumarina e Anfotericina B – Método de <i>Checkerboard</i>	44
Tabela 6. Determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FIC) – Método <i>Checkerboard</i>	45

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REFERENCIAL TEÓRICO	04
2.1 GÊNERO <i>Candida</i> E A CANDIDÍASE.....	04
2.2 FATORES DE VIRULÊNCIA ASSOCIADOS ÀS ESPÉCIES DE <i>Candida</i>	07
2.3 TERAPÊUTICA E RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA.....	13
2.4 POTENCIAL TERAPÊUTICO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS.....	18
2.4.1 Cumarinas.....	20
2.4.2 Ações farmacológicas das Cumarinas.....	23
2.4.3 Derivados sintéticos hidroxycumarínicos	25
2.5 TERAPÊUTICA ANTIFÚNGICA COMBINADA	27
3. JUSTIFICATIVA	30
4. OBJETIVOS.....	32
4.1 OBJETIVO GERAL	32
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
5.1 TIPO DE PESQUISA	33
5.2 ORIGEM DA 4-HIDROXICUMARINA E PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE USO	33
5.3 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	33
5.3.1 Microrganismos testes.....	33
5.3.2 Meios de Cultura	33
5.3.3 Cepas fúngicas e preparação do inóculo	33
5.3.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima - CIM	34
5.3.5 Determinação da Concentração Fungicida Mínima – CFM.....	36
5.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE A 4-HIDROXICUMARINA E ANFOTERICINA B – MÉTODO CHECKERBOARD.....	37
5.4.1 Efeito da 4-Hidroxycumarina isolada e associada a Anfotericina B sobre a cinética de crescimento da <i>C.albicans</i>	39
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
6. RESULTADOS	42
7. DISCUSSÃO	47
8. CONCLUSÃO.....	55
9. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	56

1. INTRODUÇÃO

A microbiota humana, principalmente das superfícies de mucosas e da pele, como a cavidade oral, vaginal e a do trato gastrointestinal, abrigam leveduras do gênero *Candida*. Em condições de deficiência imunológica do hospedeiro ou pela aquisição de infecções exógenas, estes microrganismos podem expressar sua patogenicidade, resultando em diferentes formas clínicas, que variam de doenças superficiais às infecções sistêmicas graves, denominadas de candidíase (MACÊDO et al., 2009; DA SILVA et al., 2014).

As infecções fúngicas causadas por *Candida* spp. nos últimos anos vêm sendo predominantemente relatadas no ambiente hospitalar, nas quais decorrem de internações e de procedimentos invasivos. As infecções de corrente sanguínea, denominadas de candidemia, é umas das mais frequentes em Unidade de Terapia Intensiva (SARDI et al., 2013; VARANO et al., 2019). Em sua maioria, as candidemias são causadas pela espécie *Candida albicans*, entretanto a epidemiologia da candidíase sofreu mudanças nos últimos tempos e a prevalência das ditas espécies de *Candida* diferentes de *Candida albicans*, vêm sendo citadas com frequência na literatura (GUINEA et al., 2014; BADIEE et al., 2017).

A expressão de patogenicidade das espécies de *Candida* está relacionada a seus fatores de virulência, já muito bem elucidados diante das suas alterações fenotípicas e morfológicas que resultam no êxito do processo infeccioso (RORIG; COLACITE; ABEGG, 2009). Estes são compreendidos em sua habilidade de aderir às células epiteliais e células endoteliais, a capacidade de realizar o processo de morfogênese através da transição levedura-hifa, a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares (proteinasas, hemolisinas e fosfolipases) que facilitam a entrada da levedura no epitélio do hospedeiro e além disso são capazes de estabelecer a formação de biofilme. O biofilme formado é caracterizado pela colonização microbiana de forma conjunta, presentes em superfícies bióticas e abióticas, sendo envolvidas por uma matriz extracelular, de constituição estrutural densa e complexa que os tornam resistentes aos mecanismos de defesa celular do sistema imunológico (DE ROSSI et al., 2011; LOHSE et al., 2018).

Diante do surgimento de infecções microbianas emergentes, há relatos do emprego de plantas medicinais, muitas vezes, citadas como único recurso terapêutico para algumas

comunidades e grupos étnicos, os quais não possuem acesso a medicina moderna (GASPI, 2011; KAUR et al., 2012; PALUMBO, 2016).

Contudo, houve uma crescente preocupação em relação à segurança de seu uso (EKOR, 2014), pois embora a prevenção, tratamento ou cura sejam promissores, determinados produtos naturais não apresentam testes toxicológicos ou avaliações insuficientes, o que restringe o conhecimento dos efeitos adversos e o seu uso racional (CUNHA, 2005). Diversos produtos derivados de plantas têm sido usados como matéria-prima para a síntese de substâncias bioativas e contribuído para a obtenção de novos agentes terapêuticos, que por muitas vezes, podem ser obtidos com facilidade e menores custos (CHIARADIA, 2006; SILVA, 2015).

Dentre as substâncias bioativas sintetizadas através de plantas, podem-se referenciar as cumarinas, que são encontradas em diferentes concentrações, sendo distribuídas nos frutos, raízes, caules, cascas, folhas e flores (PANCHE et al., 2016). Apesar de serem metabolizadas por plantas, também podem ser encontradas em fungos e bactérias (CAMILLERI & MURRAY, 2015; PATIL et al., 2015). As cumarinas podem ser classificadas como heterosídeos, estruturalmente lactonas do ácido o-hidroxicinâmico, tendo como principal representante mais simples o 1,2-benzopirona denominado de cumarina, que é o esqueleto básico de todos os outros derivados cumarínicos (WITAICENIS et al., 2014).

Logo, nessa perspectiva, dentre os compostos cumarínicos, farmacologicamente ativos, o derivado sintético 4-Hidroxycumarina (YASARAWAN; THIPYAPONG; RUANGPORNVISUTI, 2014) desperta um grande interesse da comunidade científica, por estarem presentes em muitos compostos naturais e pela constatação de uma ampla atividade biológica, incluindo ação anti-HIV (THAISRIVONGS et al., 1996), anticancerígena (STANCHEV et al., 2009), anticoagulante, e ainda, como precursor sintético direto dos anticoagulantes orais (como exemplo, a Varfarina) comumente usados na prática médica (ABDELHAFEZ et al., 2010).

Além disso, estudos também relatam a atividade antimicrobiana da 4-Hidroxycumarina através da sua atividade inibitória para a bactéria *Staphylococcus aureus* (MOURA, 2019). Em um estudo anterior, uma cumarina isolada da fração acetona de *Ageratum conyzoides* L., mostrou efeito fungicida através de mecanismo de ação frente a parede celular da *Candida albicans*, confirmado a partir de microscopia eletrônica, tanto de transmissão como de varredura (WIDODO et al., 2012).

Contudo, a literatura ainda carece de dados complementares que relatem detalhadamente a atividade antimicrobiana da 4-Hidroxicumarina frente a uma maior diversidade de amostras microbianas, incluindo isolados clínicos, bem como estudos que busquem comprovar a segurança medicinal das cumarinas e seus respectivos derivados. Nesse contexto, a motivação principal do presente trabalho foi avaliar a atividade antifúngica do derivado sintético 4-Hidroxicumarina frente a diferentes isolados clínicos de *Candida albicans*, bem como analisar a associação entre o derivado e a Anfotericina B, um dos antifúngicos utilizado no tratamento das candidemias.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 GÊNERO *Candida* E A CANDIDÍASE

O gênero *Candida* é caracterizado por sua abrangente distribuição em diferentes ambientes, compreendendo desde a sua presença na natureza quanto em superfícies abióticas. No que se refere a sua taxonomia, pertence ao Reino Fungi, Divisão Eumycota, Subdivisão Deuteromycotina, Classe Hemiascomycetes, Ordem *Saccharomycetales*, Família *Saccharomycetaceae* (SILVA et al., 2007; ELENA et al., 2015; HOOG et al., 2019).

As espécies desse fungo são descritas morfológicamente como microrganismos leveduriformes, eucarióticos livres de pigmentos fotossintetizantes, possuindo uma parede celular composta por quitina e membrana plasmática fosfolipídica caracterizada pelo predomínio do ergosterol. Possuem características bioquímicas de assimilação de carbono, capacidade fermentativa, bem como a formação de tubo germinativo, sendo seu crescimento favorecido em temperaturas variando entre 20°C a 38°C. Além disso, são considerados constituintes da microbiota normal, através de uma relação comensal na população humana saudável (SIDRIM; ROCHA, 2004; ROJAS-MORALES et al., 2013).

Diante do comensalismo promovido pela *C. albicans*, o corpo humano se torna capaz de ser colonizado por essa levedura, mantendo uma relação de equilíbrio e assim não produz sinais de doença. Isso é decorrente da manutenção da integridade estabelecida pelas barreiras teciduais, além da harmonia entre microbiota autóctone e o bom desempenho do sistema imunológico do indivíduo, perante a expressão de forma equilibrada na relação entre parasito e hospedeiro (NAVES et al., 2013; DA ROCHA et al., 2021).

Em contrapartida, apesar desse estabelecimento de relação comensal, as leveduras do gênero *Candida* podem se tornar infectantes diante de um ambiente que sobreponha o mecanismo de colonização endógena, como em situações de imunocomprometimento orgânico do hospedeiro, seja pela instalação de patologias (doenças infecciosas, endócrinas/diabetes, neoplasias, hemopatias, grandes queimaduras, dentre outras) ou aspectos nutricionais, bem como pela utilização de medicamentos imunossupressores (corticoides) e terapias que diminuem diretamente o efeito da barreira microbiana (antimicrobianos) e ainda, em casos de variações de pH do sítio alvo da infecção (PEREIRA et al, 2018; LOHSE et al., 2018; MARTINS et al., 2019).

Além disso, as leveduras do gênero *Candida* são capazes de promover infecções diante da associação com fatores extrínsecos, em que podem acometer pacientes em diferentes situações, como rupturas de tecidos e traumatismos em geral, inserção de cateteres, procedimentos invasivos, podendo atingir populações como neonatos, gestantes e pessoas com idade mais avançada. Tais fatores propiciam o surgimento da infecção denominada de candidíase (MENEZES et al., 2018; BESSA, 2020; SANTOS, 2020).

Candidíase é um termo amplo que se refere a infecções cutâneas, mucosas e sistêmicas causadas por fungos do gênero *Candida*, que podem ocorrer em qualquer idade e geralmente ocorrem no contexto de fatores de risco, alguns já citados acima, facilmente identificáveis ou predisponentes para infecção. A sua forma invasiva refere-se a infecções da corrente sanguínea por *Candida* spp., ou seja, candidemia, e infecções profundas - como abscesso intra-abdominal, peritonite, osteomielite, e candidíase esofágica (PAPPAS et al., 2018; PRISTOV; GHANNOUM, 2019).

O patógeno mais envolvido em infecções fúngicas de caráter superficial e profunda é a espécie *Candida albicans*, devido ao fato de que sua patogenicidade está associada à sua flexibilidade morfológica, ou seja, a sua plasticidade está diretamente relacionada aos processos de adesão e infecção no hospedeiro. Essa espécie se torna responsável por 50% a 70% dos casos; no entanto, a epidemiologia da infecção por *Candida* mudou nos últimos anos, com estudos longitudinais relatando que uma proporção considerável de pacientes se encontra atualmente infectada com outras espécies de *Candida*, infectada com espécies de *Candida* de importância clínica, nas quais incluem *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* que, juntamente com *C. albicans*, são responsáveis por mais de 90% dos casos de candidíase invasiva. Outras espécies de *Candida* relatadas como emergentes incluem *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. rugosa*, *C. Dubliniensis*, *C. Norvegensis* (PARAMYTHIOTOU et al., 2014; PAPPAS et al., 2018; TALAPKO et al., 2021) e mais recentemente, *C. auris*, descrita na Nota Técnica GVIMS/GGTES/ANVISA Nº 11/2020.

Além disso, a distribuição dessas espécies de *Candida*, bem como a *C. albicans* mostrou dados variáveis em estudos populacionais realizados em diferentes regiões geográficas. Em um estudo de revisão sistemática foi mostrado a distribuição geográfica de espécies de *Candida* em amostras de sangue de pacientes internados em várias partes do mundo, verificando que *C. albicans* foi o patógeno mais frequentemente isolado no norte e centro da Europa e nos Estados Unidos, enquanto as espécies, predominaram na Ásia, sul da Europa e América do Sul (GONCALVES et al., 2016).

As infecções mucocutâneas provocadas por *Candida* são geralmente leves ou autolimitadas, como candidíase, aftas orais e vaginais. No entanto, essas infecções superficiais podem estar associadas a morbidade significativa, como na candidíase mucocutânea crônica (CMC) e na candidíase vaginal recorrente. Além disso, as espécies de *Candida* podem causar infecção sistêmica que é potencialmente fatal, dado que as taxas de mortalidade relatadas variam entre 40% a 60% (GIOLO, 2010). Elas também estão associadas às doenças inflamatórias intestinais e à asma, embora a ligação não seja diretamente causal e provavelmente seja um efeito secundário (MODRZEWSKA; KURNATOWSKI, 2013).

Em situações de manifestações cutâneas ocasionadas por espécies de *Candida*, como as onicomicoses, o tratamento sofre variação entre o uso de antifúngicos tópicos e/ou oral, dependendo do acometimento da lâmina ungueal, podendo chegar a 10% a incidência mundial desta patologia e relacionada a fatores como hábitos de higiene, idade, gênero sexual e mudanças climáticas (FINCH; WARSHAW, 2007; MARTINS, et al. 2007).

Uma outra condição patológica muito frequente causada por espécies de *Candida* é a candidíase vulvovaginal (CVV), na qual cerca de 90% das mulheres que apresentam esse quadro clínico têm como agente etiológico, microrganismos da própria microbiota vaginal (FEBRASGO, 2010). Em um estudo feito por Li et al. (2019), os autores relataram que a hipótese dessa constância estava ligada a um mecanismo imunopatogênico, no qual esquemas terapêuticos que induzissem o sistema imunológico a agir contra infecções por *Candida* poderiam diminuir a colonização por essas leveduras. A principal origem desse fungo é o trato gastrointestinal, através de um processo chamado transmissão endógena, no qual espécies de *Candida* se translocam para a região vaginal e sofrem desenvolvimento e adaptação. Outra forma de transmissão é a sexual, em que a partir da ação de enzimas proteolíticas, as leveduras penetram o epitélio superficial da vagina e conseguem realizar seu processo de colonização e/ou constituir reservatório para reinfecções posteriores (ÁLVARES et al., 2007).

Na ocorrência de perturbações da microbiota da mucosa e/ou enfraquecimento da imunidade do hospedeiro, a *Candida* spp. passa pela transição do comensalismo para oportunismo, que está associado à indução de fatores-chave de virulência. Existem condições que predispõem à infecção invasiva humana, sendo um deles o uso prolongado e/ou repetido de antibióticos de amplo espectro, que possibilitam o aumento desses microrganismos na colonização intestinal. Isso ocorre devido os antibióticos conferirem

a essas leveduras uma vantagem seletiva sobre as bactérias, através da destruição de fatores protetores da mucosa gastrointestinal que permitem que a proliferação das espécies de *Candida* (WHIBLEY; GAFFEN, 2015; PAPPAS et al., 2018).

Um outro fator predisponente é o rompimento das barreiras gastrointestinal e cutânea induzida por quimioterapia, cirurgia gastrointestinal ou perfuração e/ou cateteres venosos centrais, que possibilitam coletivamente a *Candida* spp. translocar de sítios mucocutâneos para a corrente sanguínea, tornando-se candidíase sistêmica (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ et al., 2014). Em um estudo sobre infecções associadas a cuidados em saúde realizado por Maródi e colaboradores (2012), foi visto que a prevalência das infecções estava relacionada a um processo de coinfeções como pneumonia e infecções associadas ao local da cirurgia, seguidos por infecções do trato gastrointestinal, trato urinário, sendo as espécies do gênero *Candida* os agentes etiológicos mais frequentes, além de representarem os principais agentes causadores de infecções sanguíneas.

As formas sistêmicas da candidíase são conhecidas pelo acometimento visceral, devido a sua propagação hematogênica, principalmente em pacientes imunocomprometidos, além de casos em que essa levedura é relatada como causa de morte em pacientes portadores de leucemia aguda, bem como pacientes que realizaram transplante de medula e outras condições clínicas graves. A colonização da orofaringe por *Candida* spp. também é vista como um fator de risco para infecções sistêmicas, diante de situações de neutropenia em processos infecciosos ulcerativos, bem como em pacientes diagnosticados com câncer e submetidos a tratamentos com quimioterápicos que apresentam o sistema imunológico comprometido e assim fornecem condições para que os fatores de virulência das leveduras sejam expressos pelo microrganismo, sendo estes submetidos a condições que favorecem seu desenvolvimento que podem variar de maneira intra e interespecificamente (PLAS, 2016; MENDES, 2019; BRAECHER et al., 2019).

2.2 FATORES DE VIRULÊNCIA ASSOCIADOS ÀS ESPÉCIES DE *Candida*

Existem mecanismos expressos pelos microrganismos que os tornam capazes de estabelecer o seu processo de infecção no hospedeiro. Logo, nesse contexto, leveduras do gênero *Candida* desenvolveram várias estratégias de forma específica com o intuito de aumentar a eficácia do progresso de uma infecção, seja ela localizada em mucosas ou sistêmicas. De forma geral, esses processos infecciosos se tornam acessíveis pelo desequilíbrio na relação comensal desses fungos, levando a fatores como aderência,

polimorfismo, variabilidade fenotípica, produção de enzimas extracelulares e toxinas, além da capacidade de produzir biofilmes. Os biofilmes são descritos como os principais fatores de virulência deste fungo, que são capazes de lhe conferir a habilidade de colonizar e causar a infecção (CALDERONE, FONZI, 2001; NAGLIK, CHALLACOMBE, HUBE, 2003; HASAN, 2009).

Em um contexto amplo, a capacidade de um agente etiológico de iniciar processo, infeccioso ou de colonização, parte do princípio da sua competência de adesão às células epiteliais. O primeiro contato entre a célula fúngica e o hospedeiro se realiza através da parede celular da levedura, a qual é composta por uma camada interna de polissacarídeos de quitina e β -1,3-glucana e uma camada externa de mananas covalentemente associadas a proteínas. Muitos dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) conhecidos de *Candida* spp. derivam da parede celular, e permitem o reconhecimento de diferentes tipos de carboidratos e receptores para a fração C3b do sistema complemento, e por parte das células epiteliais do hospedeiro, os receptores de adesinas dentre eles, a fibronectina, fibrina e laminina, destacando a importância dessa estrutura na defesa contra esse microrganismo (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ et al., 2014; WHIBLEY; GAFFEN, 2015).

A análise de ultraestrutura das paredes celulares de *C. glabrata* versus *C. albicans* revelou a existência de cerca de 50% a mais de proteínas, maiores quantidades de manana e níveis mais baixos de glucano total nas paredes celulares de *C. glabrata*. Por outro lado, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* contêm maior teor de quitina do que *C. glabrata* e *C. krusei*. Ainda não foi determinado se essas diferenças na parede celular entre as espécies de *Candida* afetam a imunidade, nem o seu papel na infecção (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ et al., 2014).

As leveduras do gênero *Candida* realizam a adesão através de proteínas específicas presentes na parede celular fúngica. Essas biomoléculas são conhecidas como adesinas, na qual apresentam agrupamentos que as diferem diante da sua expressão gênica, sendo as mais descritas diante de suas funções, a ALS, a EPAP, e a HWP1. Uma adesina bem caracterizada para a espécie *C. albicans* é a proteína HWP1, uma proteína da superfície celular expressa apenas nas estruturas das hifas, sendo importante para a aderência às células epiteliais orais. Estudos mostram que a inativação do gene que codifica a HWPI, é capaz de gerar células leveduriformes incapazes de formar complexos estáveis com as células epiteliais bucais do hospedeiro, além de causar danos na célula fúngica que inviabilizam sua capacidade de gerar no hospedeiro um processo sistêmico. Além disso, a adesina HWP1 é relatada como a primeira proteína exigida no processo de formação de

biofilme (STAAB et al. 1999; GERALDINO et al., 2012; MODRZEWSK; KURNATOWSKI, 2015).

Outras adesinas presentes na superfície celular são as proteínas ligadas às β -1,6-glucanas, as quais são codificadas pelo gene da família da proteína ALS. Dentre este grupo, os genes ALS1, ALS3 e ALS5 são os mais frequentemente descritos por estarem envolvidos na adesão de *C. albicans*, devido sua capacidade de aderir a uma ampla variedade de substratos e se ligar com as glicoproteínas, de forma que haja a endocitose do patógeno. Com relação a outras espécies de *Candida*, foi relatado que a *C. glabrata* apresenta adesinas codificadas por genes da família EPA, dentre os quais, os genes que apresentam maior importância são EPA1, EPA6 e EPA7 e são responsáveis por processos específicos de interações entre a lectina presente nas células leveduriformes e os hidratos de carbono da célula hospedeira (MURCIANO et al., 2012; EL-KIRAT-CHATEL et al., 2015; MODRZEWSKA & KURNATOWSKI, 2015).

De fato, as diferenças na composição da parede celular no reconhecimento de *Candida* spp. são conhecidas por impactar a resposta imune. Um exemplo disso está nas variações das proteínas antigênicas associadas à parede celular que foram detectadas entre *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*, sendo visto em um estudo que identificou uma nova proteína antigênica associada à parede celular de *C. tropicalis*, a KGD2P. Isso indica que a presença de proteínas antigênicas espécie-específicas entre as leveduras são capazes de promover respostas imunes distintas ao entrarem em contato com o sistema imunológico (WHIBLEY; GAFFEN, 2015).

No estágio de invasão das células do hospedeiro, existe uma variação polimórfica característica das leveduras, em *C. albicans*, a qual esse é considerada o maior fator de virulência dessa espécie. Essa flexibilidade está associada a capacidade dessas células de assumirem a forma leveduriformes (blastoconídeos) e a forma filamentosa com a presença de pseudohifas e/ou hifas verdadeiras, sendo a formação de hifas diretamente associada a invasão no tecido do hospedeiro e a forma leveduriforme relacionada a adesão à parede celular (SUDBERY, 2011; THOMPSON et al., 2011; MAYER et al., 2013).

A formação de micélios pela *Candida albicans* tem sido associada com a ampliação da variabilidade antigênica da superfície, sendo que a união de hifas aumenta a virulência fúngica no sentido de uma maior aderência à célula criando uma barreira que dificulta o processo de fagocitose extra e intracelular pelo sistema imunológico (KHAN et al., 2010).

A variabilidade fenotípica expressa pelas espécies de *Candida*, é associada ao fenômeno denominado de *Switching* (Figura 1), no qual ocorre uma alteração nas colônias

fúngicas de forma a ocorrer uma transição celular da fase leveduriforme para uma célula alongada e opaca, que por consequência, leva à modificação na aderência às células epiteliais, na suscetibilidade antifúngica e na atividade fungicida dos leucócitos. Foi demonstrado *in vitro* a ocorrência de uma mudança nas colônias que assumem formas variáveis, incluindo o aspecto liso, enrugado, áspero, além desse fenômeno ser responsável atributos bioquímicos e moleculares importantes que torna o fungo mais virulento e eficaz durante a infecção (KULETA et al., 2009; NAVES et al., 2013; DA ROCHA et al., 2021).

Um outro fenômeno observado no processo de morfogênese das leveduras do gênero *Candida* é o tigmotropismo, o qual é caracterizado por um processo ocorrido na fase filamentosa capaz de intensificar a invasão, e, como consequência a disseminação do patógeno na célula. Deste modo, a sistemática desse evento ocorre por meio de formações de junções epiteliais que se agregam e internalizam a célula fúngica e as protegem da fagocitose do sistema imunológico. Essa alteração morfológica acontece geralmente devido fatores ligados ao hospedeiro, como, temperatura, pH, e confere à levedura uma vantagem biológica devido a esse fator de virulência quando comparado a sua fase leveduriforme (BRAND et al. 2008; DE ROSSI et al., 2011).

Entre as espécies, diferentes de *Candida albicans*, como *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* esse processo de plasticidade pode ser descrito similarmente, embora em muitos estudos não tenha sido capaz de ser visto na condição *in vitro*. (PORMAN et al., 2013; O’KANE et al., 2020). Por outro lado, a *Candida auris*, uma espécie descrita recente, e que ainda está em processo de elucidação de seus reais mecanismos de virulência, demonstrou, em estudos realizados por Wang et al, 2018, sua capacidade de formação de células alongadas similares a estrutura de pseudohifa na condição *in vitro*. Além disso, no mesmo período outro estudo realizado por Yue et al, 2018, no qual esses pesquisadores constataram a infecção sistêmica no modelo camundongos, a formação de três fenótipos diferentes: células leveduriformes, pseudohifas e células filamentosas, sendo esse fato um dos fatores de virulência importante, tendo em vista seu histórico de multirresistência aos antifúngicos convencionais.

Um dos fatores de virulência mais estudados para o gênero *Candida* é expressão de enzimas hidrolíticas extracelulares, dentre as quais destacam-se: as proteases aspárticas secretadas (SAPS), responsáveis pela hidrólise de ligações peptídicas, e as fosfolipases (Plbs) que atingem os fosfolípidos pertencentes a célula hospedeira. Essas moléculas favorecem o mecanismo de adesão e a penetração aos tecidos hospedeiros a

fim de gerar uma deformação em estruturas da superfície celular e assim evitar o efeito microbicida do sistema imunológico (TELLAPRAGADA et al., 2014; PANDEY; GUPTA; TILAK, 2018).

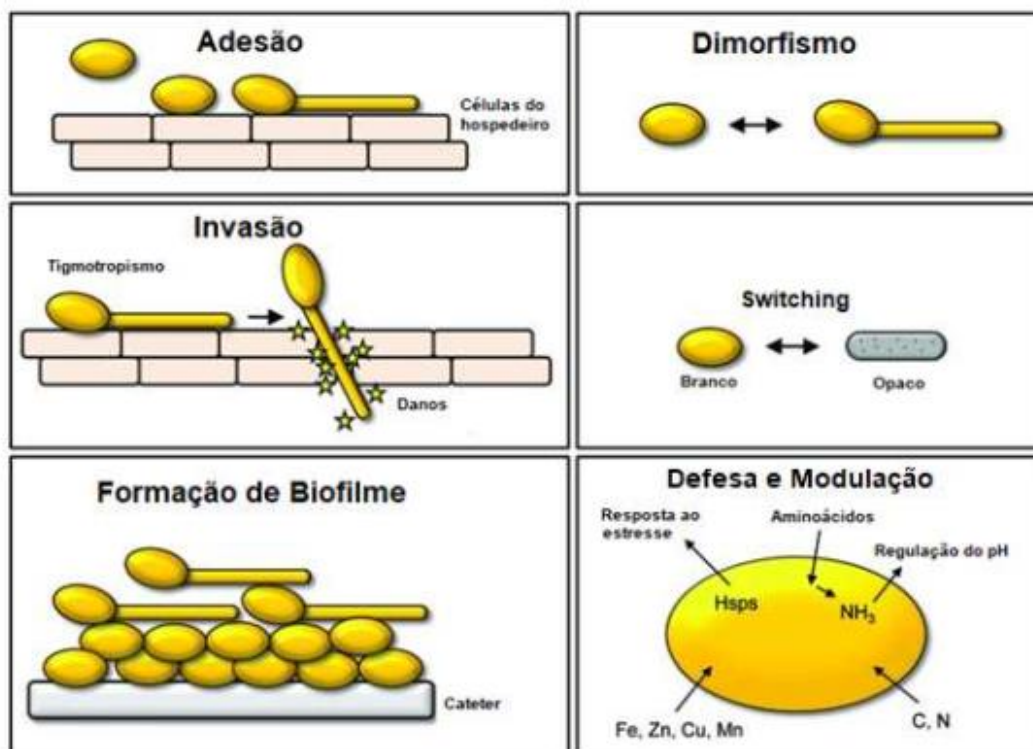
As SAPS são conhecidas pelo seu papel importante na degradação de uma variedade de proteínas humanas, possuindo uma ampla especificidade de substrato para moléculas como a albumina, hemoglobina, queratina, colágeno, laminina, fibronectina, mucinas, bem como a imunoglobulinas. Além disso, essas proteinases estão associadas à obtenção de elementos necessários para nutrição e sobrevivência da célula fúngica, como a aquisição de fontes de nitrogênio (SILVA et al., 2014). As enzimas SAPS, são formadas a partir de uma codificação gênica de uma família de 10 componentes (SAP1-SAP10), no qual seu papel sob a virulência fúngica é estudado, sendo encontrada maior associação com a espécie *C. albicans* (TAVARES; BÜRGE; BOCCA, 2015).

A produção de fosfolipase é considerada um fator importante para o processo de infecção da candidíase. Estruturalmente, essa enzima está posicionada na superfície da levedura e na extremidade do tubo germinativo, participando do processo de hidrólise de ligações éster em glicerolfosfolipídeos o que resulta na formação de ácidos graxos, gerando danos à membrana celular do hospedeiro. Além do mais, também exibem receptores epiteliais que facilitam a aderência do fungo (MOHANDAS; BALLAL, 2011; SILVA et al., 2012).

Dentre as fosfolipases elucidadas foram identificados quatro tipos de enzimas desse grupo (A, B, C e D) que apresentam papel importante na virulência fúngica, sendo estes, produtos dos genes PLB1 e PLB2. Estudos mostraram que a presença do gene PLB1 é necessário para o desenvolvimento da virulência em modelos de animais, sendo observada uma redução desse processo de hidrólise em cerca de 60% em organismos que sofreram deleção deste gene. A expressão genética da PLB1 está associada à ação de hidrolase e lisofosfolipase transacilase, em que sua secreção ocorre na extremidade das hifas durante a invasão tecidual (CALDERONE; FONZI, 2001; ACHKAR; FRIES, 2010; SILVA, 2011).

Além dessas, outras enzimas agem de forma importante na patogenicidade desses microrganismos, as chamadas hemolisinas, que atuam na liberação da hemoglobina constituintes das hemácias e assim podem utilizar o ferro como fonte de nutriente (SILVA et al., 2012; CANELA et al., 2018).

Figura 1. Esquema representativo dos principais fatores de virulência do gênero *Candida*.



Fonte: Adaptado de Mayer, Wilson e Hube (2013).

Outro mecanismo de virulência desta levedura refere-se à sua versatilidade de adaptação, bem como a capacidade de adesão em sítios variados, perante a formação de comunidades microbianas, denominados biofilmes, fortemente aderidas a uma superfície sólida biótica ou abiótica (SUZUKI, 2009; NAVES et al., 2013)

Biofilmes produzidos pelo gênero *Candida* são definidos por estruturas complexas, constituídas por diferentes formas leveduriformes, hifas e pseudo-hifas, envolvidas em uma matriz de substância polimérica extracelular (EPS), aderidas a uma superfície sólida cujas células possuem taxas de crescimento e fenótipos alterados. Esta matriz é composta por polissacarídeos pertencentes à parede celular fúngica e pode ser constituída a partir do desenvolvimento de única espécie ou pode ser derivada de um crescimento polimicrobiano. Os biofilmes são fatores reconhecidos diante do seu envolvimento em enfermidades humanas, no qual estão associados a fontes de infecções do trato geniturinário, lesões expostas, pneumonia, bem como a superfícies de biomateriais abióticos (MELO, 2016; SILVA et al., 2017; LOHSE et al., 2018; GABRILSKA et al., 2015; MCCALL et al., 2019)

Do ponto vista genético, um importante regulador da formação de biofilme *in vitro* em espécies de *Candida*, é o fator de transcrição BCR1 (“biofilm and cell wall

regulator”), cujos principais alvos para os quais são direcionados são genes que codificam as proteínas de adesão da parede celular, como as ALS e HWP, bem como o gene RBT5, que está envolvido no processo de filamentação das espécies de *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Todos esses genes estão envolvidos nas fases de formação do biofilme (DING et al., 2015; RODRÍGUEZ-CERDEIRA et al., 2020).

Além disso, durante a formação do biofilme acontece um controle do mecanismo de comunicação microbiano denominado “*quórum sensing*” (QS), em que ocorre a liberação de forma contínua de moléculas que se assemelham a hormônios que regulam a concentração da população microbiana em desenvolvimento e, ao alcançar sua estabilização, ocorre uma resposta reguladora sob os genes QS-dependentes. (ALBUQUERQUE; CASADEVALL, 2012; BORAL et al., 2018).

A competência da célula leveduriforme de formar o biofilme é considerada um fator de virulência significativo diante da sua capacidade de estabelecer proteção e persistência no mecanismo de adesão do fungo e, dessa forma, criar uma barreira contra a ação de antimicrobianos utilizados na terapia antifúngica, gerando a ampliação dos fatores de resistência desses microrganismos (BARBOSA, 2019). A habilidade das espécies de *Candida* no desenvolvimento de biofilmes não é direcionada apenas a geração de condições patológicas ao hospedeiro, mas também pelo seu efeito diante da sua influência protetora da célula fúngica frente às drogas, de forma que as leveduras envolvidas na EPS se tornam menos susceptíveis aos antifúngicos, bem como a defesa imunológica e condições ambientais do hospedeiro (LARA et al., 2018; GLAZIER; KRYSAN, 2020).

2.3 TERAPÊUTICA E RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA

Com o aumento da incidência de patologias associadas a fungos, a busca por antimicrobianos que estabelecessem o controle e eliminação desses microrganismos tornou-se preponderante desde meados da década de 80, principalmente associado a um diagnóstico prematuro e preciso que direcionasse para o tratamento antifúngico adequado. Atualmente, os antimicrobianos disponíveis para essa terapêutica são classificados em quatro classes, que se baseiam no seu mecanismo de ação na célula fúngica, sendo eles os modificadores da integridade da membrana, como os polienos, que interagem com os esteróis da membrana; os azóis que realizam a inibição da biossíntese do ergosterol; as equinocandinas que atuam na síntese da parede celular e os antimetabólitos que inibem a síntese dos ácidos nucleicos (LEWIS, 2011; CHANG et al., 2017; PEIXOTO et al., 2014).

Os azóis são classificados como fungistáticos, no qual atuam como inibidores da enzima lanosterol 14- α -demetilase, correspondendo a maior família antifúngica. Eles são capazes de romper a membrana celular inibindo a atividade dessa enzima envolvida na biossíntese do ergosterol que é o principal componente responsável pela fluidez, permeabilidade e integridade da membrana celular. O ergosterol atua análogo ao colesterol em células animais, sendo maior componente esterol da membrana celular fúngica, entretanto o ergosterol e o colesterol apresentam diferenças estruturais que são capazes de direcionar os agentes antifúngicos à ligação ou biossíntese do ergosterol e, com isso, não reage de forma cruzada com as células hospedeiras. A classe dos azóis dispõe de representantes como imidazóis, os triazólicos e posaconazol (PRISTOV; GHANNOUM, 2019; SANGUINETTI et al., 2015).

Em situações de infecções invasivas, o azólico comumente utilizado é o fluconazol, um triazol que apresenta uma boa penetração nos tecidos, devido sua característica hidrossolúvel, sendo administrado desde em casos de micoses superficiais causadas por *Candida* spp., bem como casos de candidemia, e meningite por *Criptococcus* spp. (VIEIRA; SANTOS, 2017).

Apesar do seu amplo espectro, o uso do fluconazol sofreu limitações devido a ascensão dos mecanismos de resistência adquiridos pelos fungos nos últimos tempos. Com uso indiscriminado associando às limitações de antifúngicos disponíveis no mercado, o perfil de resistência fúngica se elevou, devido a eventos multifatoriais que envolvem modificações moleculares e superexpressão de genes no fungo, o que afeta a eficácia farmacodinâmica da droga. A falha do tratamento pode estar relacionada ao hospedeiro, principalmente associado ao seu estado imunológico, bem como relacionado aos fatores de virulência do fungo envolvido. Na última década, os papéis fundamentais dos fatores de transcrição e da plasticidade do genoma do patógeno foram destacados como responsáveis pelos processos de resistência aos antifúngicos (COWEN et al., 2015 PARRAS; CARDENAS, 2020)

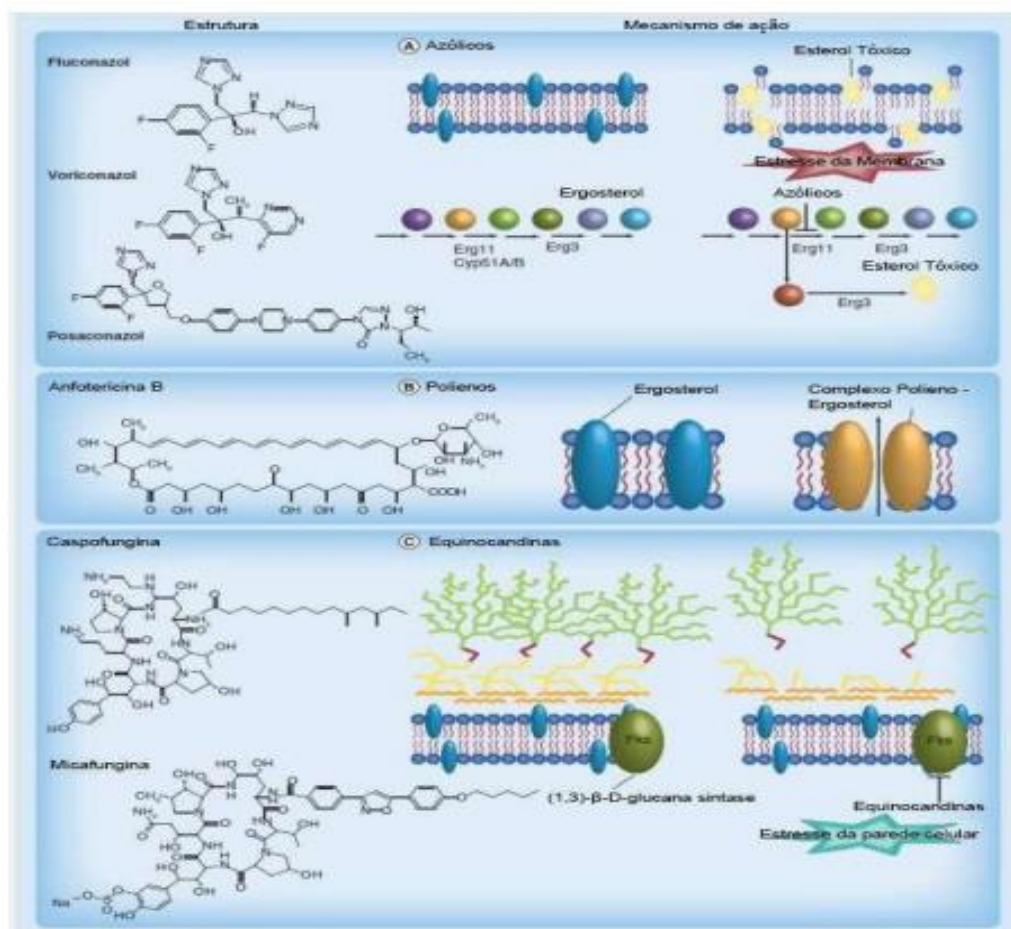
Os mecanismos relacionados a resistência aos azóis correspondem a vários fatores, sendo os principais a ativação de bombas de efluxo por meio de genes específicos, bem como mutações pontuais nos genes ERG11 e ERG3 que realizam a indução de alterações na via de biossíntese do ergosterol, bem como o aumento nas concentrações de lanosterol 14- α - demetilase e diminuição de afinidade com as ligações dessa enzima pela droga (PFALLER, 2012; PFALLER et al. 2014). Em um estudo de Mojtaba Nabili et al, 2016, sobre substituições de aminoácidos na proteína ERG11P, foram observadas em isolados

de *Candida glabrata* resistente ao fluconazol. Com isso, foi identificado que houve substituição do aminoácido G236V no sítio de ligação da enzima ao fluconazol, o que diminuiu consideravelmente a afinidade do fármaco pelo seu alvo biológico.

Já o grupo dos polienos, apresenta como alvo o ergosterol da membrana plasmática, sendo considerados de ação fungicida. Esses fármacos, como a nistatina e anfotericina B se ligam a esse componente lipídico e o destroem, resultando na produção de poros aquosos, que desencadeiam o extravazamento de íons e constituintes do citoplasma celular, ocorrendo a morte da levedura (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013; MORACE et al., 2014; CHUDZIK et al., 2015). A nistatina é usada principalmente de forma tópica ou oral, devido sua ação sistêmica ser limitada, em contrapartida, a anfotericina B apresenta é usada direcionada para o tratamento de candidemias, sendo utilizada geralmente em associação com outro fármaco, visto seu mecanismos sinérgico ou antagônico permite a diminuição dos seus efeitos colaterais e danos tóxicos, como a nefrotoxicidade (SCHLOTTFELDT et al., 2015; KANZAKI,2019).

No que se refere a resistência a esses fármacos, mutações pontuais nos genes ERG2, ERG3, ERG6 e ERG11 (**Figura 2**) estão associados ao perfil de resistência das espécies de *Candida* aos polienos, visto que ocorre uma diminuição da expressão do alvo de ação dessas drogas, e com isso as leveduras apresentam um teor mais baixo de ergosterol e tendem a ser resistentes a esses antifúngicos, quando se compara o teor desse componente lipídico em fungos susceptíveis a esses antimicrobianos. Há relatos na literatura de que existe uma correlação da resistência aos polienos com a resistência aos agentes azóis, através de relação entre as modificações nos genes responsáveis pela síntese de ergosterol, principalmente a ERG3, a diminuição de ergosterol, bem como seu acúmulo de forma alternativa (EDDOUZI et al., 2013; PRASAD et al., 2016; DA ROCHA et al., 2021).

Figura 2: Principais antifúngicos e seus mecanismos de ação.



Fonte: Reproduzido de Xie, Polvi, Shekhar-Guturja e Cowen (2014).

A parede celular também é alvo de algumas classes de antifúngicos, em que os fármacos têm como alvo estruturas pertencentes a esse componente celular, como β -glucano e quitina. As equinocandinas atuam como inibidores da síntese de glucano em que os medicamentos dessa classe (caspofungina, micafungina e anidulafungina) são agentes antifúngicos lipopeptídicos que inibem a síntese da parede fúngica por bloqueio não competitivo da (1,3)- β -D-glucano sintase. Essa inibição enzimática leva à formação de paredes celulares fúngicas com integridade estrutural prejudicada, o que resulta em vulnerabilidade celular e consequente lise osmótica. Essa família que possui ação fungicida geralmente é a última classe de antifúngicos a ser utilizada na prática clínica (SANGUINETTI et al., 2015; PRASAD; SHAH; RAWAL, 2016).

O perfil de resistência relacionado a esse grupo de antifúngicos é baseado em alguns mecanismos elucidados, sendo um deles por mutação no gene que codifica a enzima alvo do antifúngico, a β -1,3-glucano sintase. A resistência às equinocandinas ocorre na

subunidade catalítica dessa enzima, que é codificada pelos genes FKS1, FKS2 e FKS3, no qual ocorrem mutações nas regiões denominadas “*hot spots*” de FKS1, ou em regiões homólogas de FKS2, resultando em substituições de aminoácidos em espécies de *Candida*. As mutações nos genes FKS surgem em configurações específicas, de forma que as taxas de resistência às equinocandinas são mais altas do que na população geral acometida por candidíase invasiva, e se torna notável nas espécies, *C. glabrata* e *C. albicans*, sendo essas mutações descritas quase que exclusivamente em pacientes com exposição prévia ao grupo de antifúngicos (SHIELDS, 2014; BERTO et al., 2018)

Outros fármacos também são incluídos nas classes de antifúngicos, tais como os análogos de nucleosídeos que atuam como inibidores da síntese de DNA/RNA. Eles são transportados para as células fúngicas por permeases de citosina e em seguida, são desaminados em 5-fluorouracil e fosforilado em monofosfato de 5-fluorodesoxiuridina. Este nucleotídeo fluorado inibe a timidilato sintase e, portanto, interfere na síntese de DNA. O monofosfato de 5-fluorodesoxiuridina pode ser ainda fosforilado e incorporado ao RNA, afetando assim a síntese de RNA e proteína fúngica (DE OLIVEIRA SANTOS et al., 2018; O’KANE et al., 2020).

Além desses, outros agentes antifúngicos são aplicados na prática clínica, tais como alilaminas e tiocarbamato, no qual agem causando o rompimento da membrana celular e inibem a esqualeno-epoxidase, enzima envolvida na biossíntese do ergosterol. A griseofulvina, uma espirodicetona tricíclica, primeiro isolada de *Penicillium griseofulvum*, atua através da interação com fuso dos microtúbulos, em que esse antifúngico desfaz fuso mitótico inibindo a multiplicação, além disso apresenta afinidade por tecidos queratinizados, atuando nos queratinócitos (SEGATO; MARTINEZ-ROSSI, 2008; DA SILVA, 2019).

Com o aumento da incidência das infecções fúngicas, o cenário das terapias antifúngicas disponíveis ainda é preocupante, principalmente devido os fármacos disponíveis não satisfazerem completamente a necessidade da prática médica, devido a aspectos relacionados ao espectro de ação, potência e propriedades farmacocinéticas. Outro fato é que, embora novas drogas antifúngicas tenham sido introduzidas na prática clínica, como os novos azólicos, voriconazol e posaconazol, que apresentam maior potência e espectro de ação do que os demais representantes da classe, os mecanismos de resistência aos antimicrobianos convencionais ainda persiste, gerando uma restrição para o tratamento seguro e eficaz de infecções fúngicas (PFALLER, 2012; CARMONA; LIMPER, 2017; CHANG et al., 2017).

2.4 POTENCIAL TERAPÊUTICO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

A utilização de substâncias naturais ou seus derivados sintéticos com a finalidade medicinal se iniciou desde os primórdios da humanidade, bem como o seu uso como fontes inesgotáveis de alimento, de matéria-prima para vestuários e habitações (BOSQUEIRO, 1995; ROSA et al., 2011; PIGATTO et al., 2019; LEITE e SANTOS, 2021). No Brasil, a utilização de produtos naturais parte da cultura popular advinda dos indígenas ou dos povos mais antigos que habitaram a região, sendo atualmente, o uso dessas substâncias o foco de inúmeras pesquisas existentes, que visam a comprovação do conhecimento empírico aplicado a terapêutica, para o tratamento de comorbidades e infecções (SOLORZANO et al., 2009; FONSECA et al., 2019).

No período do século XVIII, foi iniciado a caracterização das primeiras substâncias puras, no qual esses atributos se tornaram instrumentos de estudos científicos de forma que fossem identificados seus princípios ativos para o uso no tratamento de doença. Logo, partindo desse princípio, a procura por novas substâncias que apresentem caráter medicinal cientificamente comprovado tornou-se crescente, a fim de que haja a elucidação de mecanismos relacionados à produção de substâncias bioativas, também conhecidas como metabólitos secundários, e o seu uso como possível fármaco na prática clínica (PHILLIPSON, 2001; PINTO et al., 2002; TAIZ et al., 2015; ROCHA et al., 2015).

Com relação aos metabólitos secundários, estes são caracterizados por serem pouco abundantes, e por não estarem ligados diretamente no processo de biossíntese das plantas, sendo sua importância voltada para uma fonte de substâncias farmacologicamente ativas para fins terapêuticos, embora, além disso esteja voltado para a função de adaptação das plantas aos seus ambientes e colaboram para que elas possuam uma eficaz interação com os diferentes ecossistemas (PEREIRA; CARDOSO, 2012; DE REZENDE et al., 2016).

Esses metabólitos podem ser classificados em três grandes classes que se distinguem de acordo com a sua rota biosintética e segundo suas características químicas, sendo eles os nitrogenados, terpenóides e fenólicos. Dentre os nitrogenados, os alcalóides apresentam uma extensa atividade biológica caracterizada, dentre elas atividades antitumoral e antimicrobiana. Já os terpenóides são formados a partir do isopentenilpirofosfato, na qual dão origem aos monoterpenos, sendo conhecidos por serem substâncias voláteis envolvidas principalmente com o uso em repelentes, bem como fazem parte da constituição de óleos essenciais. Os fenólicos são compostos

comumente usados para atração no processo de polinização, formados estruturalmente por um anel aromático, em que um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila, gerando os subtipos flavonóides, taninos, isoflavonóides e cumarinas (COLPO et al., 2014; MARMMIT et al., 2015; CUNHA et al., 2016; REMPEL et al., 2019)

Diante desse contexto, vários estudos com substâncias bioativas estão sendo direcionados para a discriminação das suas características farmacológicas, dentre os quais se destacam as cumarinas, encontradas em cerca de 30 famílias de plantas diferentes e que para alguns dos seus derivados cumarínicos já apresentam atividade biológica como antitrombótica, anticancerígena, antimicrobiana elucidada em estudos. Com isso, esses compostos apresentam potencial para a indústria farmacêutica na busca de novos protótipos úteis para a fabricação de fármacos direcionados ao tratamento de diversas doenças, e com requisitos de baixa toxicidade celular. Logo, esse conjunto de benefícios mantém as cumarinas como alvo de investigação nas pesquisas atuais e fomenta o interesse farmacêutico em um nível mais abrangente (VENUGOPALA et al., 2013; HUSSAIN et al., 2018; FRANCO et al., 2021)

As circunstâncias das infecções fúngicas oportunistas emergentes, aliadas a restrita variabilidade de agentes antifúngicos, o aumento da resistência aos antimicrobianos disponíveis e os fatores de virulência associados aos altos índices de patologias sistêmicas, tem sido base para o incentivo à procura de novas substâncias bioativas que induzam uma significativa aplicação clínica (SOLIMAN et al., 2017). Alguns estudos, como o realizado por Al-Amiery e colaboradores (2012), relataram o êxito de dois compostos cumarínicos com relação a atividade antifúngica quando comparada ao fluconazol. Essas substâncias foram sintetizadas e testadas contra as espécies de *Candida albicans* e de *Aspergillus niger*. Além disso, foi visto que a relação entre a estrutura química e a atividade biológica dos derivados cumarínicos é caracterizada pela ação farmacológica promovida pela presença de derivados amino-substituídos.

Outra cumarina isolada e avaliada frente a fungos foi obtida da planta *Kielmeyera elata*, em que a concentração inibitória mínima determinada foi de 0,512 mg/mL, para as espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. A atividade inibitória foi equivalente quando comparada com os resultados obtidos pelo tratamento com fluconazol utilizado como controle positivo (MARCONDES et al., 2015).

Logo, nesse contexto de atividade antimicrobiana, bem como outras atividades biológicas como seu potencial anticâncer, as cumarinas se apresentam como alvo de

investigação nas pesquisas atuais como foco de interesse farmacêutico na busca por novos fármacos em um efeito mais abrangente (SILVA et al., 2020).

2.4.1 Cumarinas

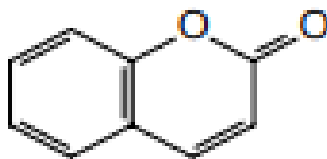
As cumarinas constituem uma classe de metabólitos secundários derivados do metabolismo da fenilalanina isolada pela primeira vez em 1820 por Vogel, membro da Royal Academy of Science of Munich, (MURRAY, 1978; MONTAGNER, 2007). O primeiro representante é a cumarina derivada da espécie *Coumarouna odorata* (popularmente conhecida como fava tonca). Esses metabólitos encontram-se distribuídos nas raízes, flores e frutos de algumas famílias de Angiospermae como Apiaceae, Rutaceae, Asteraceae, Graminae e Orquidaceae (monocotiledônias) bem como em Fabaceae, Oleaceae, Moraceae e Thymeleaceae, (JAIN ; JOSHI, 2012; PETRUL'OVÁ-PORACKÁ et al., 2013).

A exposição humana às cumarinas tem sido cada vez maior, pois elas apresentam diversas bioatividades e têm tido grande a aplicabilidade comercial, sendo estes compostos presentes na indústria alimentar e encontrados em vários alimentos, como o chá verde, a canela, cenoura, vinho (FELTER et al., 2006; SPROLL et al., 2008). No entanto, com base nos dados sobre toxicidade hepática verificada em ratos, a agência United States Food and Drug Administration (FDA) a classificou como substância tóxica, sendo então proibida a sua adição em alimentos para o ser humano e a sua importação foi restringida. Posteriormente, o Conselho Europeu estabeleceu o limite geral permitido para o uso de cumarinas em alimentos e bebidas (COUNCIL DIRECTIVE, 1988; ARAUJO et al. 2004).

As cumarinas podem ser classificadas como heterosídeos, estruturalmente lactonas do ácido o-hidroxicinâmico, tendo como mais simples e principal representante o 1,2-benzopirona (Figura 3), que representa o esqueleto básico de todos os outros derivados cumarínicos.

A maioria das cumarinas é sintetizada através do metabolismo da fenilalanina amonialiase no qual a desaminação enzimática da fenilalanina origina o ácido cinâmico, em que, por sua vez sofre hidroxilação da sua cadeia lateral, catalisada pela enzima trans-cinamato-4-hidroxilase e forma o composto ácido o-cumárico. Logo, a cumarina, resulta do processo de lactonização do ácido o-cumárico através de ação enzimática e na presença de calor (WITAICENIS et al., 2014; CZELUSNIAK et al., 2012).

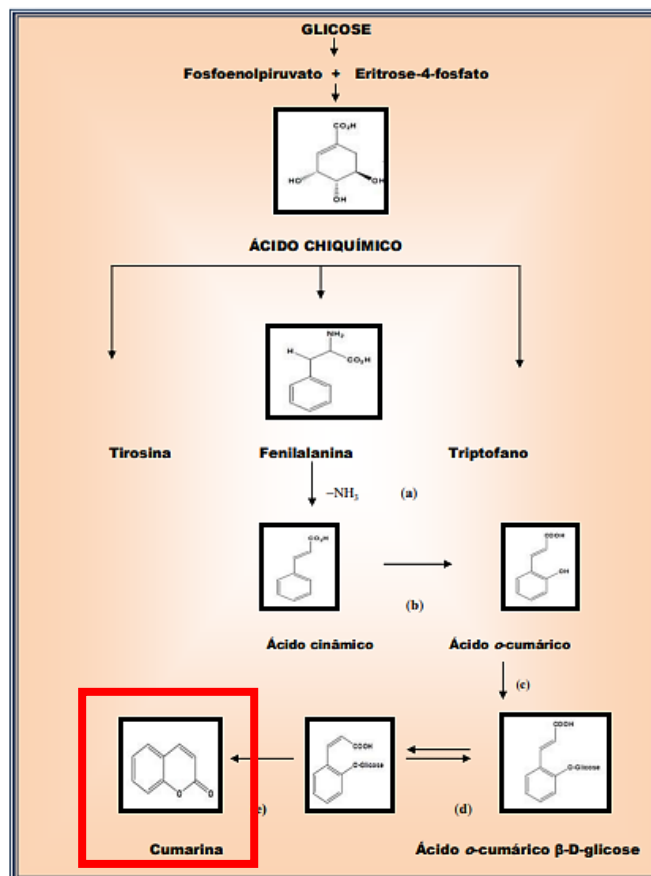
Figura 3: Estrutura molecular da 1,2 benzopirona.



Fonte: <http://www.chemsoc.org>

A biossíntese das cumarinas acontece a partir do metabolismo da glicose através do ácido chiquímico, no qual é um dos dois principais intermediários. O ácido chiquímico se forma através da condensação de dois metabólitos da glicose, o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato. A partir disso, a via do ácido chiquímico é capaz de formar três aminoácidos aromáticos importantes, a fenilalanina, triptofano e tirosina, no qual são os precursores dos metabólitos secundários das plantas como as cumarinas, flavonóides, alcaloides (Figura 4) (CZELUSNIAK et al., 2012; OLIVEIRA, 2016). De acordo com Simões, 2010, esse processo de biossíntese pode ocorrer a partir de uma diminuição de nutrientes, alterações dos hormônios, bem como algum dano provocado por pragas aos vegetais, como é o caso da espécie *Helianthus annuus*, que é capaz de armazenar em seus tecidos a cumarina escopoletina diante da ação de insetos.

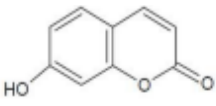
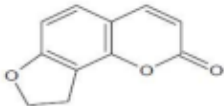
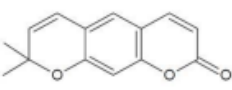
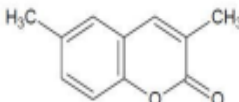
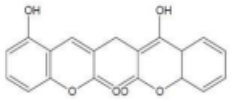
Figura 4: Rota de biossíntese da cumarina. (a) Desaminação da fenilalanina pela enzima fenilalanina amonialiase; (b) Hidroxilação pela enzima transcinamato-4-hidroxilase da cadeia lateral do ácido o-cumárico; (c) Glicosilação do ácido o-cumárico; (d) Isomerização cis/trans da dupla ligação; (e) Lactonização do produto – Cumarina sintetizada.



Fonte: Adaptado de Oliveira, 2016; Czelusniak et al., 2012

As cumarinas podem ser classificadas de acordo com sua estrutura química, sendo elas as cumarinas simples, as furanocumarinas, as piranocumarinas, as cumarinas com substituintes no anel pirona e as cumarinas miscelâneas (Tabela 1). De forma geral, as cumarinas simples são derivados que contém os radicais alquil, hidroxí e alcoxi, as furanocumarinas são compostos que possuem um anel furano condensado ao núcleo cumarínico, em que possuem analogia com as piranocumarinas, possuindo o anel pirano. Já as cumarinas com substituintes no anel pirona sofrem modificações na posição 3 e 4 da estrutura, e as cumarinas miscelâneas, admitem o átomo de oxigênio ligado ao oxigênio por dupla ligação em posições invertidas da estrutura da cumarina, correspondendo a biscumarinas (MURRAY, 1978; DIGHE et al., 2010; VENUGOPALA et al., 2013)

Tabela 1. Diferentes tipos de cumarinas

TIPOS DE CUMARINA	ESTRUTURA QUÍMICA GERAL	AÇÃO FARMACOLÓGICA	REFERÊNCIAS
Cumarina simples		Anticancerígena, Antibacteriana	REHMAN et al., 2013
Furanocumarinas		Antiinflamatória Anticonvulsivante	LIMA et al, 2009 BELÉM et al, 2022
Piranocumarinas		Antiinflamatória Imunossupressora Antiviral	MARTIN et al, 2018
Cumarinas com substituintes no anel pirona		Anticancerígena	SILVA, 2020
Cumarinas miscelâneas		Anticoagulante	DE OLIVEIRA MENDOÇA, 2019

2.4.2 Ações farmacológicas das Cumarinas

As cumarinas correspondem a um grupo muito amplo de substâncias com diversas atividades farmacológicas, sejam elas sintetizadas ou isoladas de plantas. Para a indústria farmacêutica as cumarinas e seus derivados sintéticos apresentam grande importância, pois interagem com diversas enzimas e receptores que são muito utilizados na prática clínica como agentes anticoagulantes, vasodilatadores, sedativos e analgésicos (BAIRAGI et al., 2012).

Na literatura, em relação a atividade antimicrobiana alguns estudos relataram a ação desses derivados cumarínicos *in vitro* frente a diferentes bactérias, como *Bacillus subtilis*, *B. dysenteriae*, *B. cereus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*, tanto em testes usando a microdiluição em caldo, como a metodologia de disco de difusão (REHMAN et

al. 2005; BRENZAN et al. 2008; SMYTH et al. 2009; KALKHAMBKAR et al. 2011; SUN et al. 2011).

De maneira mais específica, derivados de cumarinas como a 4-hidroxi, 7-hidroxi e 3-carboxicumarinas, demonstraram uma resposta mais eficiente em relação a bactérias Gram positivas do que para o grupo das Gram negativas, principalmente, para a bactéria *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (LIN et al., 2012). Outro estudo realizado por Côrrea (2012), verificou atividade antimicrobiana ativa através de testes de disco difusão usando derivados cumarínicos isolados de *Asteraceas* frente *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *Micobacterium smegmatis*. Além disso, esse mesmo estudo obteve êxito em relação a atividade inibitória desses isolados frente a espécie *Candida albicans*, com a característica de um halo de inibição elevado quando comparado com o antifúngico cetaconazol usado como controle positivo.

Ainda sobre a atividade antifúngica, alguns autores determinaram a ação desses compostos frente a fungos tanto de caráter leveduriforme, quanto filamentosos. Foi descrito que as cumarinas isoladas de *Baccharis darwinii*, de plantas do gênero *Pterocaulon*, assim como derivados sintetizados a partir de *malononitrila* e *salicilaldeído*, apresentaram ação frente a fungos do gênero *Aspergillus flavus*, *A. níger*, *A. fumigatus*, *A. alliaceus*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *Fusarium solani*, *Microsporum gypseum*, *M. canis*, *Trichophyton rubrum*, bem como as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, (STEIN et al. 2006; KURDELAS et al. 2010; FLÔRES, 2011).

A atividade anti-inflamatória também é um aspecto importante a ser relatado na literatura para avaliar as cumarinas sintetizadas. Esses compostos demonstraram possuir alto níveis de expressão de proteínas que medeiam processos inflamatórios, sendo isso observado em modelos tradicionais como edema de orelha e pata induzido por formalina, além de analisar linhagens de células de carcinoma humano, e estudos envolvendo casos de periodontite, a fim de determinar o mecanismo de ação desses derivados diante de uma inflamação (MENGHINI et al., 2010; KALKHAMBKAR et al. 2011; TAVARES, 2021).

Além disso, averiguou-se que as cumarinas são um grupo de substâncias que exibem importância em relação a sua atividade de proteção antioxidante, sendo demonstrado em estudos que avaliaram a ação antioxidante *in vitro* através do método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) de cinco 4-hidroxi-bis-cumarinas, no qual os compostos apresentaram resultados favoráveis devido a ação catalisadora do radical DPPH, quando comparado às outras substâncias (RIBEIRO et al., 2005; SANTOS et al.,

2014). Além disso, Sun et al. (2011) realizaram a síntese e avaliação da redução do DPPH diante de derivados do composto 4-arilcumarina, que mostraram atividade antioxidante promissora para estas moléculas.

As cumarinas também têm se destacado devido outras atividades biológicas, tais como: antialérgica, antiviral, hepatoprotetora (MUSA et al., 2011; OLMEDO et al., 2012; BUBOLS et al., 2013; SLAPSYTE et al., 2013), antiasmática, antiviral (KAUR et al., 2012; ANAND et al., 2012; SLAPSYTE et al., 2013), anticoagulante, antigenotóxica (MUSA et al., 2011), antidepressiva, antidiabética (SASHIDHARA et al., 2011), antinociceptiva (BARROS et al., 2010), antitumoral (HUANG et al., 2011; MUSA et al., 2011; GACCH; JADHAV, 2012; BUBOLS et al., 2013).

2.4.3 Derivados sintéticos hidroxicumarínicos

Na perspectiva do uso terapêutico dos compostos cumarínicos farmacologicamente ativos, temos as Hidroxicumarinas, em que representam uma classe de derivados cumarínicos com diversas propriedades farmacológicas e bioquímicas com alto potencial de interesse na indústria farmacêutica (YASARAWAN; THIPYAPONG; RUANGPORNVISUTI, 2014).

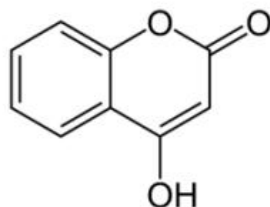
Essa classe compreende os derivados da cumarina simples, nas quais correspondem aos radicais hidróxi, alcóxi, alquil bem como as formas glicosídicas. Nesses derivados ocorre a oxigenação em um ou mais das seis posições do núcleo das cumarinas, bem como sofrem a substituição de um grupo hidroxila em determinadas posições de sua molécula. Um exemplo disso é a *7-hidroxicumarina*, também conhecida como umbeliferona, no qual é a precursora das cumarinas 6,7-dihidroxiladas e 6,7,8-trihidroxiladas. Esses grupos hidroxilas podem estar metilados ou com ligação glicosídica (MONTAGNER et al., 2007; SOUZA et al., 2005).

Com relação a 7-hidroxicumarina, esse derivado está presente em plantas, frutas e raízes comestíveis, como a laranja amarga, cenoura, coentro, sendo caracterizada por um sólido cristalino branco-amarelado, com alta solubilidade em etanol. Em relação a sua atividade biológica, apresenta significativa atividade antioxidante e anti-inflamatória, antimicrobiana, antiviral, e anticoagulante. (SILVA et al., 2019; ALVES et al., 2020)

Outro derivado cumarínicos que vem despertando interesse entre estudos sobre diferentes atividades farmacológicas é a 4-Hidroxicumarina, o qual é usado como um intermediário na síntese de diversos produtos farmacêuticos extremamente comuns, tais

como a warfarina, que é utilizado como um anticoagulante (Figura 5) (STANCHEV et al., 2009; CATERINA et al., 2017).

Figura 5: Estrutura molecular da 4 – hidroxicumarina.



Fonte: <http://www.chemsoc.org>

Derivados cumarínicos formados a partir dessa molécula mostraram atividade contra bactérias patogênicas importantes. Todos os compostos sintetizados a partir dessa molécula foram ativos contra o *Bacillus atrophaeus* e *Bacillus subtilis*, alguns deles apresentaram atividade moderada contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (REHMAN et al., 2013). Além disso, outro estudo realizado com uma série de derivados de 4-Hidroxicumarina mostraram atividade antimicrobiana de caráter fungicida *in vitro* contra espécies fúngicas como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Penicillium marneffe* (SIDDIQUI et al., 2011)

Diante dessa ação antifúngica, a literatura mostra trabalhos como o realizado por Thati et al (2007), em que derivados da 4-Hidroxicumarina, bem como outras hidroxicumarinas complexadas a substâncias como a prata são capazes de potencializar o mecanismo fungicida desses compostos na espécie *Candida albicans*, uma vez que foi descrito que houve uma redução do conteúdo de ergosterol das células, e com isso o aumento do vazamento transmembranar de aminoácidos. Além disso, o estudo mostra que vários dos complexos interromperam a síntese de citocromo C na célula e induziram o aparecimento de características morfológicas consistentes com a morte celular por apoptose. Logo, esses compostos pareceram afetar diretamente a capacidade de respiração da célula e com isso uma depleção na biossíntese de ergosterol e uma consequente ruptura da integridade da membrana celular.

Outro estudo realizado por Rehman et al. (2005), os pesquisadores também observaram esse fenômeno, a partir dos derivados cumarínicos complexados com metais (cobalto, cobre, níquel e zinco) e realizados ensaios frente as espécies *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Microsporum canis*, *Fusarium solani* e *Candida glabrata*. Logo, foi não complexadas, sendo isso justificado pelos autores por um provável processo de

aumento da natureza lipofílica do átomo central metálico, o que favoreceu a sua permeabilidade na membrana lipídica desses fungos.

Em relação aos últimos anos, a literatura tem abordado, em sua maioria, estudos sobre a atividade de síntese de novos derivados das Hidroxicumarinas, especificamente a 4-Hidroxicumarina, no que se refere a sua capacidade citotóxica, mutagênica, antioxidante, anticoagulante, bem como atividade hemolítica e antiparasitária de efeito leishmanicida (DE OLIVEIRA MENDONÇA, et al 2019; DE MACÊDO ROCHA et al., 2021; DA CRUZ et al., 2021; NETO et al. 2022), o que evidencia tanto em termos estruturais como no que se refere a alvos terapêuticos, a importância do núcleo cumarínico para a química medicinal, tomando como destaque atividade biológicas nos últimos anos, a fim de gerar uma contribuição no desenvolvimento racional de novos projetos, através da utilização da cumarinas para o tratamento de doenças emergentes (FRANCO et al, 2021).

2.5 TERAPÊUTICA ANTIFÚNGICA COMBINADA

Os estudos sobre os efeitos de interação entre moléculas vêm sendo elucidado ao longo do tempo, visto que o uso de substâncias antimicrobianas associadas tem início com sua verificação de forma *in vitro* em que se tornam capazes de indicar se as suas interações moleculares agem de forma positiva no que diz respeito à inibição de microrganismos (CASTRO et al., 2010).

A combinação de dois agentes antimicrobianos diferentes é capaz de ampliar seu espectro de atividade através de diferentes mecanismos de ação que cada droga exerce, principalmente em relação ao início do tratamento, pois a carga elevada de microrganismo é capaz de induzir à seleção de organismos resistentes, e assim criar um ambiente propício a sua proliferação exacerbada. O antifúngico anfotericina B, por exemplo, é capaz de induzir a uma permeabilidade da membrana celular fúngica, de forma a facilitar a penetração de outro antifúngico, como a flucitosina que atua como inibidor da síntese de DNA/RNA, e com isso sua associação permite níveis intracelulares mais elevados deste fármaco. Logo, isso possibilitará um aumento no sucesso terapêutico nos casos de infecções causadas por espécies consideradas menos susceptíveis a uma determinada substância (KIBBLER, 2012; CHUDZIK et al., 2015; O'KANE et al., 2020).

Mecanismos envolvendo a atividade sinérgica entre o grupo dos antifúngicos estão associados a uma série de outros fatores que justificam a combinação, como a inibição de diferentes estágios nas vias bioquímicas intracelulares fúngicas em que são essenciais a

sobrevivência celular. Além disso, favorecem a inibição de proteínas carreadoras em situações em que o grupo dos polienos inibe a ação de proteínas plasmáticas que teriam a função de expulsão do grupo análogos de nucleosídeos, e que por sua vez consegue permanecer e exercer seu efeito no interior da célula, bem como casos em que pode ser observado o efeito da droga na parede celular em simultânea ação com outra de efeito sobre a membrana plasmática (CASTRO et al., 2010; ANDRADE et al., 2019).

Dentre outras combinações antifúngicas já relatadas, estão a equinocandinas com azólicos ou poliênicos, em que a maioria desses trabalhos resultou em uma interação *in vitro* diante de fungos como *Aspergillus* spp, *Candida* spp., e *Cryptococcus neoformans*. Um dos principais benefícios oferecidos pela combinação de antimicrobianos se referem à redução de doses dos medicamentos em sua forma individual, visando minimizar seus efeitos de toxicidade, bem como surgimento de resistências fúngicas e assim, a redução da duração da terapia (OSTROSKY-ZEICHNER, 2008; VAZQUEZ, 2008; CHATURVEDI et al., 2011; KIBBLER, 2012).

Existem metodologias ativas que mensuram os efeitos de combinação entre drogas. Uma das formas mais conhecidas é o método de *Checkerboard*, em que se baseia inicialmente nas concentrações inibitórias mínima de forma isoladas e em associação, sendo cada substância analisada, de maneira a avaliar a evolução da CIM individualmente e diante da presença de uma segunda droga (BASSOLÉ; JULIANI, 2012; DE PAULA et al., 2021).

De forma detalhada, o *Checkerboard* é categorizado em grupos diante dos resultados interpretados através da determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada- FICI (Figura 6), em que para se estabelecer o critério de efeito sinérgico, o resultado esperado entre as associações deve corresponder a um índice $\leq 0,5$, bem como se uma associação entre duas ou mais drogas resulta em uma FICI $> 0,5$ e ≤ 1 em relação ao resultado da Concentração Inibitória Mínima de cada droga separadamente, pode-se dizer que essa associação tem um efeito aditivo. Quando se tem um resultado em associação que não é diferente de quando as drogas são testadas isoladamente, sendo a sua FICI correspondente a >1 e < 4 , diz-se que a associação é indiferente. Já em relação ao antagonismo, esse fenômeno é observado quando o resultado da associação é capaz de aumentar o FICI em um valor ≥ 4 (Tabela 2) (ODDS, 2003; YAN et al., 2012; MULYANINGSIH et al., 2010).

Figura 6. Fórmula da Concentração Inibitória Fracionada- FICI. CIMa e CIMb: Concentração de diferentes compostos testados.

$$FICI = (CIMa \text{ em combinação} / CIMa \text{ isolado}) + (CIMb \text{ em combinação} / CIMb \text{ isolado})$$

Fonte: Oliveira et al (2014)

Tabela 2. Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FICI) e tipos de interações.

TIPOS DE INTERAÇÕES	FICI
Sinérgica	$\leq 0,5$
Aditismo	$> 0,5 \text{ e } \leq 1$
Indiferente	$> 1 \text{ e } < 4$
Antagonismo	≥ 4

Fonte: Adaptado de Mulyaningsih et al (2010)

3. JUSTIFICATIVA

No cenário epidemiológico atual, no qual observa-se a elevada prevalência de micoses oportunistas e o papel dos fungos emergentes nas formas disseminadas, é natural que ocorra a busca incessante por novas substâncias bioativas com o intuito de debelar processos infecciosos ocasionados, inclusive por microrganismos resistentes aos antifúngicos tradicionais.

O histórico de resistência se correlaciona com o uso indiscriminado dos antifúngicos, seja na profilaxia ou de forma empírica, normalmente administrados em pacientes hospitalizados, refletindo na seleção de cepas resistentes aos fármacos, como constatado para *Candida* spp. frente ao fluconazol. Tal fato dificulta o tratamento e como consequência, geralmente ocorre falha na terapêutica das micoses. Corroborando com essas informações, estudos demonstraram uma considerável relação entre resistência fúngica e fatores de virulência desses microrganismos que frequentemente fazem parte da etiologia de infecções sistêmicas (NAVES et al., 2013; VIEIRA e SANTOS, 2017).

As pesquisas destinadas à avaliação do uso de novos compostos, sejam eles naturais ou sintéticos, como alternativa terapêutica aceleraram nos últimos anos em virtude dos avanços de técnicas destinadas ao diagnóstico laboratorial, que possibilitou uma maior notificação de casos de infecção fúngica, e conseqüentemente, do maior interesse da indústria química farmacêutica em desenvolver novos fármacos.

Para isso, na maioria das vezes, o apoio da comunidade científica é crucial para novas propostas, nas quais empregam-se diversas metodologias, além da expertise dos pesquisadores na área. A corrida pela procura de substâncias que possuam atividade antimicrobiana aliada a uma segurança em suas vias de administração, estimulam a comunidade científica a traçarem linhas de pesquisas com o objetivo de proporcionar informações à população sobre o perfil fitoquímico, farmacológico e toxicológico dos compostos mais promissores (SPONCHIADO, et al., 2016; DUTRA et al., 2016).

As cumarinas, que são substâncias bioativas extraídas em diferentes concentrações nos segmentos das plantas, vem tomando destaque em estudos devido sua ampla atividade biológica reportada na literatura (SLAPSYTE et al., 2013). Nesse contexto, com base na revisão da literatura e a partir de uma parceria entre laboratórios de pesquisa dos Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT) e Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DMP) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, esse estudo foi motivado pela possibilidade de investigar o potencial antimicrobiano do

derivado sintético 4-Hidroxicumarina, considerando que a literatura carece de informações mais detalhadas, abrangendo o estudo da atividade antifúngica desse derivado cumarínico frente às cepas com potencial de maior virulência, no caso, isolados de *Candida* provenientes de amostras clínicas.

Somado a isso, há necessidade de avançar na avaliação do efeito sinérgico do derivado sintético 4-Hidroxicumarina quando combinado com antifúngicos utilizados, frequentemente, na terapêutica de fungemias, no presente estudo foi testada a anfotericina B (um polieno) com o intuito de buscar uma futura estratégia no tratamento das infecções fúngicas ocasionadas por leveduras do gênero *Candida*.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antifúngica do composto fenólico sintético 4-Hidroxicumarina sobre amostras de *Candida albicans*, bem como analisar os efeitos sinérgicos entre esse composto e o antifúngico anfotericina B.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do composto fenólico sintético 4-Hidroxicumarina frente a diferentes amostras de *Candida albicans*;
- Avaliar o efeito sinérgico entre a 4-Hidroxicumarina e a anfotericina B frente a amostras de *Candida albicans*;
- Classificar a atividade sinérgica em aditiva, indiferente ou antagônica;
- Determinar a cinética microbiana promovida pela 4-Hidroxicumarina de forma isolada e associada a anfotericina B.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 TIPO DE PESQUISA

A presente pesquisa apresenta caráter exploratório, experimental, com uma abordagem quantitativa e de natureza básica, com o intuito de gerar conhecimentos sobre os fatos verdadeiros e úteis, aqui dissertados.

5.2 ORIGEM DA 4-HIDROXICUMARINA E PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE USO

O derivado sintético cumarínico 4-Hidroxicumarina (CAS: 1076-38-6) foi adquirido de forma comercial através da Sigma-Aldrich Corporation (San Luís, Missouri, United States of America), gentilmente cedido pelo Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Para a preparação da solução de uso destinada aos testes, foi realizada a diluição da 4-Hidroxicumarina usando 1% de Tween-80, 3% de etanol e água destilada (OLIVEIRA et al., 2013)

5.3 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.3.1 Microrganismos testes

As cepas de leveduras são procedentes da Coleção de Fungos Patogênicos (CFP) e Fungos de Referência em Vigilância Sanitária (CFRVS) do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS), as quais são descritas detalhadamente quanto ao seu registro e origem patogênica, de acordo com a Tabela 3.

5.3.2 Meios de Cultura

A manutenção das cepas e ensaios da atividade antifúngica foram feitos através da utilização do Ágar Sabouraud Dextrose – ASD (KASVI, Brasil), Caldo Sabouraud Dextrose – CSD (KASVI, Brasil), RPMI 1640 com L-glutamina sem Bicarbonato de sódio (INLAB/Brasil), sendo os mesmos preparados de acordo com as instruções do fabricante.

5.3.3 Cepas fúngicas e preparação do inóculo

A preparação do inóculo de cada uma das cepas descritas na Tabela 3, foi feita a partir das colônias obtidas de culturas das cepas em ASD (KASVI, Brasil), em que foram suspensas em solução de NaCl 0,85% (VETEC Química, Rio De Janeiro, Brasil) estéril

e ajustadas de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland, para obter um inóculo de 10^6 UFC/ML (CLSI, 2020).

Tabela 3. Descrição das amostras de leveduras (Fiocruz-RJ) usados nos ensaios experimentais

ESPÉCIE	CÓDIGOS	ORIGEM
<i>Candida albicans</i>	CFP00107	Pele
<i>Candida albicans</i>	CFP00137	Hemocultura
<i>Candida albicans</i>	CFP00195	Catéter
<i>Candida albicans</i>	CFP00265	Swab oral
<i>Candida albicans</i>	CFP00266	Swab oral
<i>Candida albicans</i>	CFP00267	Swab oral
<i>Candida albicans</i>	CFP00895	Unha
<i>Candida albicans</i>	INCQS 72003	Escarro
<i>Candida albicans</i>	INCQS 72005	Escarro
<i>Candida albicans</i>	INCQS 72006	Urina
<i>Candida albicans</i>	INCQS 72007	Escarro
<i>Candida albicans</i>	INCQS 72008	Mucosa jugal
<i>Candida albicans</i>	INCQS 72010	Escarro
<i>Candida albicans</i>	INCQS 72013	Escarro
<i>Candida albicans</i>	INCQS 72016	Urina
<i>Candida albicans</i>	INCQS 72017	Inguino crural
<i>Candida albicans</i>	INCQS 72020	Mucosa oral

Coleção de Fungos Patogênicos (CFP) e Fungos de Referência em Vigilância Sanitária (CFRVS) quanto a sua origem patogênica. Fiocruz-RJ.

5.3.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima - CIM

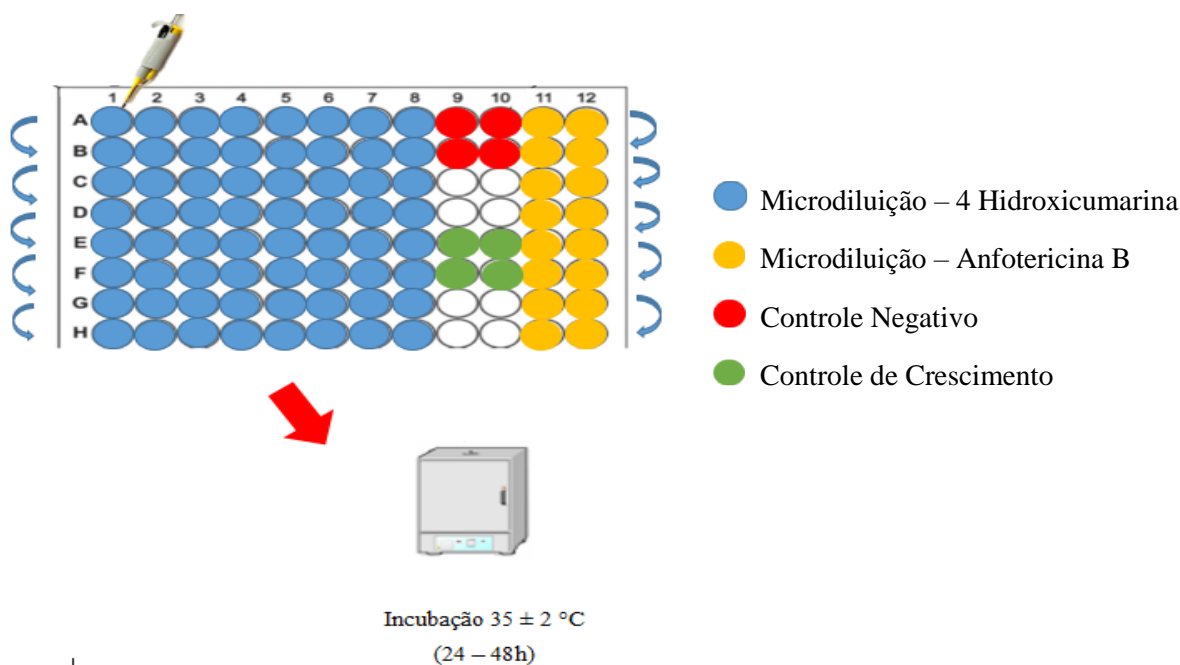
Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) seguiu-se a metodologia baseada no método de microdiluição em caldo, de acordo padronização sugerida pelo CLSI (2020).

Foram realizadas diluições seriadas da 4-Hidroxycumarina obtendo as concentrações de 5 mg/mL (máxima); 2,5 mg/mL; 1,25 mg/mL; 0,625mg/mL; 0,3125 mg/mL; 0,1562 mg/mL; 0,078 mg/mL e 0,039 mg/mL (mínima), em caldo RPMI 1640 com L-Glutamina sem Bicarbonato de Sódio (INLAB, Brasil), em microplacas de 96

poços de fundo chato. Nas colunas de 1 a 12 foram colocados 100 μL do meio RPMI 1640 (INLAB, Brasil); posteriormente, realizadas diluições seriadas transferindo 100 μL do composto da coluna 1 até a coluna 8, sendo descartado 100 μL do último poço (Figura 7).

Diante das diluições realizadas, foram acrescentados 10 μL do inóculos nos poços das colunas 1 ao 8. Na coluna 9 e 10 foram colocados 200 μL do meio RPMI 1640 (INLAB, Brasil) como controle negativo (controle da esterilidade); na coluna 11 e 12, 100 μL do meio RPMI 1640 (INLAB, Brasil) e realizadas diluições seriadas transferindo 100 μL de anfotericina B do primeiro poço até o último e com o acréscimo de 10 μL do inóculo, como controle positivo (controle do antifúngico), bem como a determinação na CIM para ser utilizada em ensaio de sinergismo; continuando, na coluna 9 e 10, nos poços das linha E e F foi alíquotado 100 μL do meio RPMI 1640 (INLAB, Brasil) e 10 μL do inóculo para o controle de viabilidade da célula fúngica (controle do crescimento). O teste foi realizado em duplicata e as placas foram preparadas, assepticamente fechadas e submetidas à incubação numa temperatura de $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 - 48 horas.

Figura 7. Representação esquemática das microdiluições da 4 - Hidroxicumarina e Anfotericina B para a determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM.



Seguido este período de incubação, foram adicionados em cada orifício, 30 μL de solução de resazurina a 0,01% em solução aquosa estéril para análise dos resultados do crescimento fúngico. A utilização desse reagente baseia-se no princípio de que produtos oriundos da respiração celular do microrganismo, sofrem uma reação de oxi-redução,

converte-se em resorufina e com isso a cor da resazurina originalmente azul, passa à rosa, indicando crescimento microbiano (Figura 8) (LEONG et al., 2017; MONTEIRO et al., 2012).

Figura 8. Reação da oxi-redução da Resazurina.

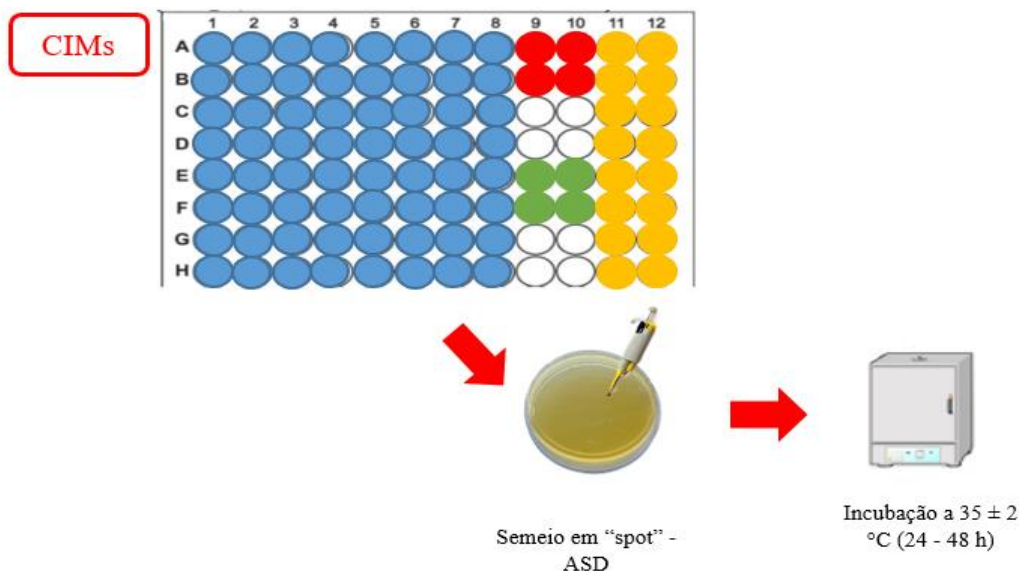


Fonte: Araújo et al (2019)

5.3.5 Determinação da Concentração Fungida Mínima – CFM

Após a determinação da CIM, foi alíquotado 10 μ L da suspensão das cavidades a partir daquele poço em que foi observado a completa inibição do crescimento fúngico após a adição de resazurina, ou seja, o poço até onde não houve alteração na cor de azul para a cor rosa. Sendo assim, foram transferidos para placas contendo o meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD, KASVI, Brasil), através da semeadura em “spot” (SAKITA et al., 2019), sendo então as placas incubadas a 35 ± 2 °C por 24 - 48 horas (Figura 9). A CFM foi determinada como a menor concentração para inibir o crescimento visível das leveduras em meio sólido. Logo, para a classificação do perfil fungicida ou fungistático das concentrações da 4-Hidroxycumarina, foi considerado que a relação de CIM = CFM ou CFM = 1 a 3 concentrações acima da CIM, é classificada como fungicida (BALOURI et al., 2016).

Figura 9. Representação esquemática determinação da Concentração Fungida Mínima – CFM da 4 - Hidroxycumarina e Anfotericina B pelo método de semeio em “spot”.

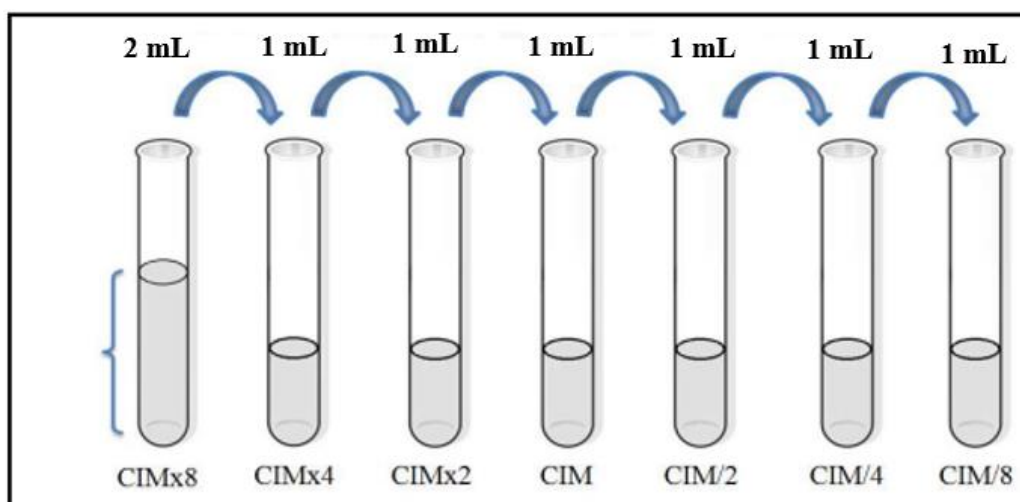


5.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE A 4-HIDROXICUMARINA E ANFOTERICINA B – MÉTODO *CHECKERBOARD*

Após a definição da CIM de cada cepa, frente ao derivado cumarínico 4 – Hidroxicumarina e a anfotericina B isoladamente, foram realizadas as combinações. O estudo de associação entre as duas substâncias foi conduzido utilizando a técnica de microdiluição por *Checkerboard* proposta por Lorian (2005) com adaptações. Inicialmente, foram preparadas diluições da 4 – Hidroxicumarina em concentrações diferentes, a fim de se obter a CIM já previamente estabelecida e suas concentrações subinibitórias (CIMx8, CIMx4, CIMx2, CIM, CIM/2, CIM/4, CIM/8), bem como diluições da anfotericina B (CIM/64, CIM/32, CIM/ 16, CIM/8, CIM/4, CIM/2, CIM, CIMx2, CIMx4 e CIMx8) (Figura 10).

A partir disso, 100 μ L meio RPMI 1640 (INLAB, Brasil) foram distribuídos nos 96 poços da placa de microdiluição, e em seguida, iniciou-se a montagem da placa pelo estabelecimento de controles das substâncias nas linhas 1 e H nos sentidos vertical e horizontal, respectivamente, a fim demonstrar a CIM de ambos os compostos frente as cepas testadas. Foram admitidos como controles de crescimento, os poços 1H, 12D e 12E, e 12A, 12B e 12H como controles de esterilidade (controle negativo).

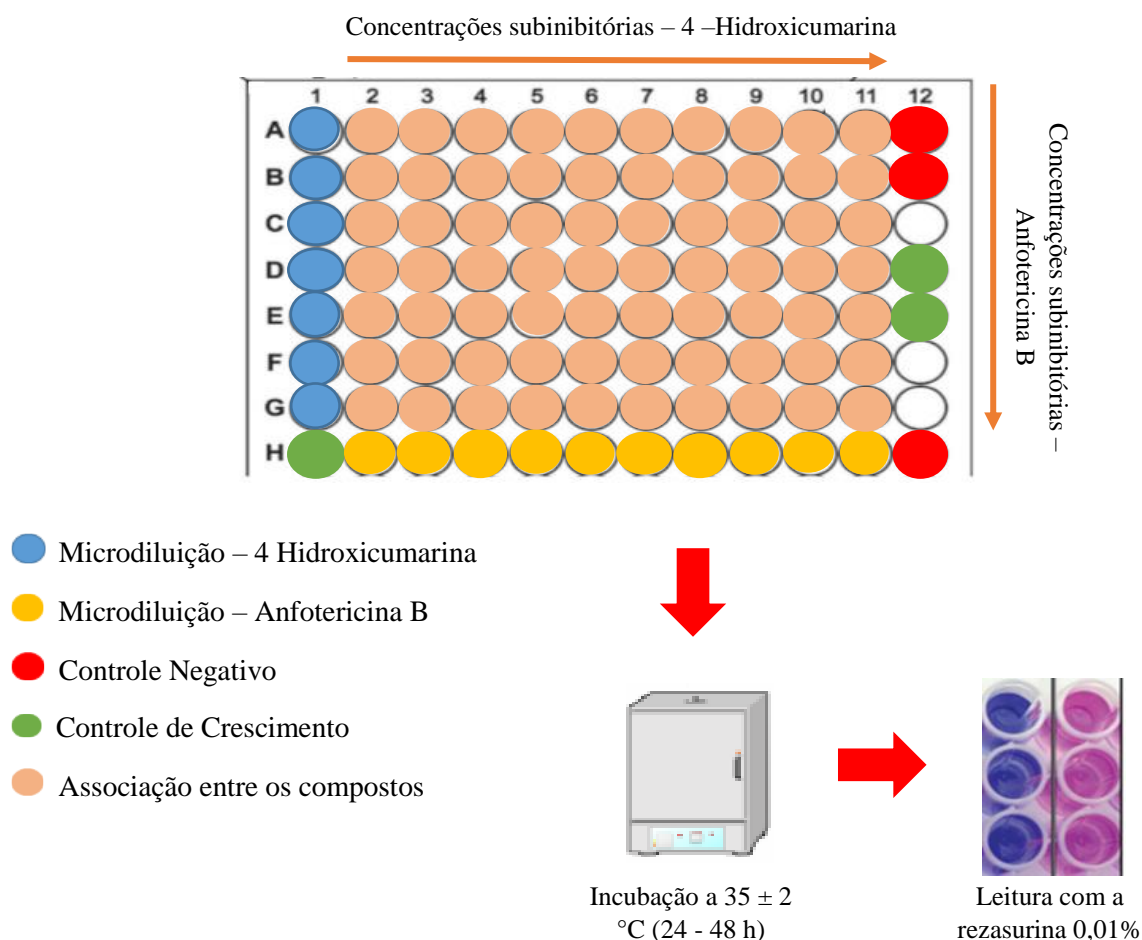
Figura 10. Representação esquemática das diluições da 4 - Hidroxicumarina e Anfotericina B para obtenção das CIM e das concentrações subinibitórias.



Logo, feito isso, 50 μ L das concentrações subinibitórias do antifúngico foram adicionados no sentido vertical, iniciando pela linha 11 e finalizando na linha 2, e 50 μ L das concentrações subinibitórias do derivado cumarínico foram adicionados no sentido

horizontal da microplaca, desta maneira as duas subconcentrações foram testadas em associação. Por último, foram acrescentados 10 μL do inóculo de 5 cepas selecionadas entre as 17 espécies de *C. albicans* testadas na CIM em cada placa correspondente, de acordo com critérios de patogenicidade entre as cepas e os valores de CIM encontrados, sendo previamente ajustadas a fim de obter a escala 0,5 de McFarland. As placas foram incubadas a 37°C em um período de 24 - 48 horas, em que seguido isto, foram adicionados em cada orifício, 30 μL de solução de resazurina a 0,01% em solução aquosa estéril para análise dos resultados, a fim de observar a presença ou ausência do crescimento fúngico e determinar a FICI (Figura 11).

Figura 11. Representação esquemática da associação entre a 4-Hidroxicumarina e Anfotericina B pelo Método de *Checkerboard*.

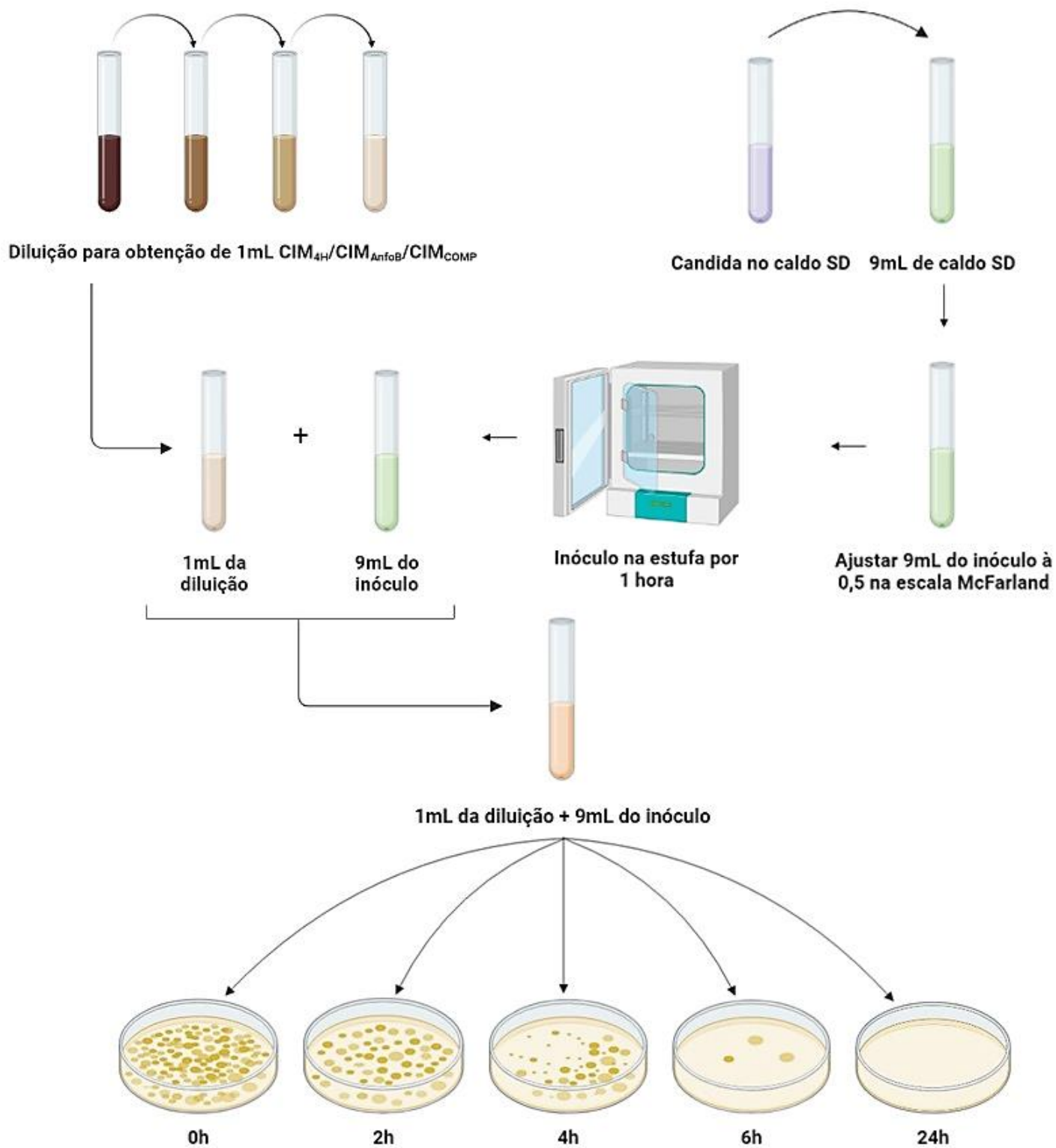


5.4.1 Efeito da 4-Hidroxicumarina isolada e associada a Anfotericina B sobre a cinética de crescimento da *C.albicans*

O estudo da interferência do derivado sintético 4-Hidroxicumarina isolado ou associado à anfotericina B sobre a viabilidade das cepas fúngicas foi realizado através do método de contagem de células viáveis segundo a metodologia proposta por Peyret et al. (1990) com modificações. O ensaio foi feito a partir dos resultados referentes a etapa anterior correspondente ao método de *Checkerboard*, em que foi selecionada a cepa fúngica com maior resultado significativo, sendo esta inoculada em Caldo Sabouraud Dextrose – CSD (KASVI, Brasil), a 37°C, por 18-24 h e, posteriormente foi retirada uma amostra deste inóculo e subcultivado a 37°C novamente em CSD por 01h, obtendo-se um inóculo ajustado a 0,5 na escala de McFarland.

A partir disso, com o uso de tubos de hemólise, 1mL das concentrações correspondentes a cada diluição do composto 4-Hidroxicumarina, da anfotericina B, e a associação entre as substâncias selecionadas (CIM_{AnfoB} , CIM_{4H} , CIM_{comb} e Controle de Crescimento) foi acrescentado à 9mL do subcultivo microbiano de forma a estabelecer uma diluição de 1:10 e fornecer um inóculo inicial de cerca de 10^5 UFC/mL. Os tubos foram mantidos na estufa a 37°C, por 24h e alíquotas de 100 μ L após o período de incubação, foram plaqueadas em placas de Petri. Decorrido o período de incubação, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram avaliadas para cada concentração e tempo de análise entre o período de 0, 2h, 4h, 6h e 24h (Figura 12). O experimento foi realizado em duplicata e a curva construída sob forma de gráfico, sendo plotado a contagem média de colônias ($\log_{10}UFC/mL$) em função do tempo (horas).

Figura 12. Representação esquemática da cinética de crescimento da *C.albicans*



5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos ensaios de CIM, CFM e associação entre a 4 – Hidroxicumarina e a anfotericina B foram analisados por meio de estatística descritiva e inferencial. Para o estudo da cinética de crescimento da *C.albicans*, os dados foram plotados em tabelas e gráficos, utilizando o Microsoft Excel® versão 2013, bem como a análise de estatística com o uso do programa GraphPad Prism versão 9.0, através do estudo de variância (one way – ANOVA) com o teste de múltiplas comparações de Dunnett ($p < 0,05$).

6. RESULTADOS

6.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA – CIM E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA – CFM

De modo geral, os resultados referentes aos ensaios da avaliação da atividade antifúngica do derivado sintético 4-Hidroxicumarina frente a cepas de *Candida albicans*, estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima da 4-Hidroxicumarina frente a cepas de *C. albicans*.

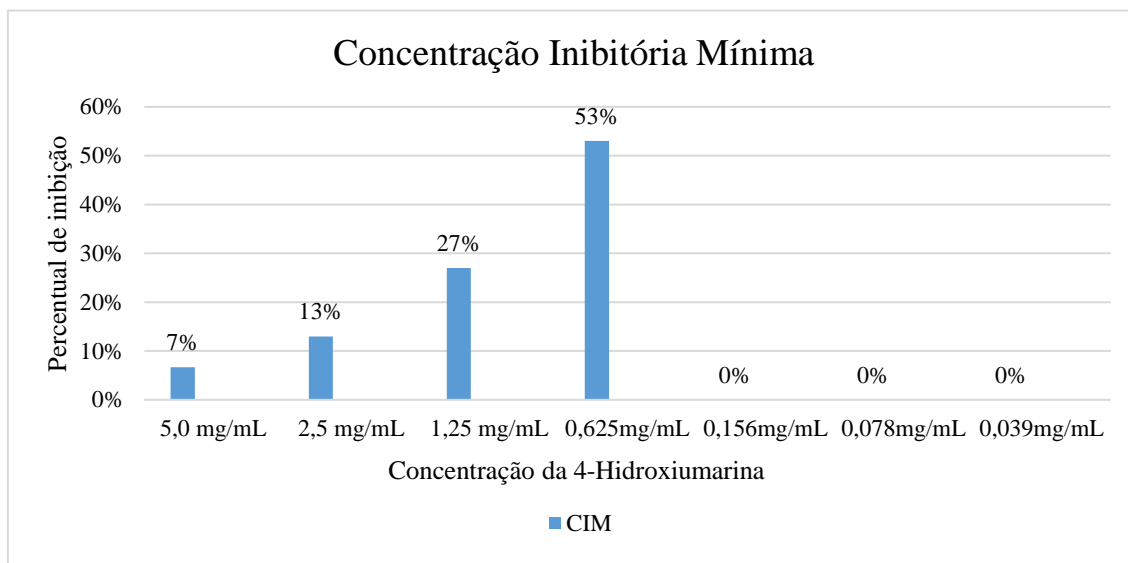
Cepas	4 - Hidroxicumarina		Natureza de Atividade	Anfotericina B	Controles	
	CIM	CFM		CIM	**MO	***EST
CFP00107	1,25	1,25	Fungicida	1	+	-
CFP00137	2,5	2,5	Fungicida	2	+	-
CFP00195	5	5	Fungicida	4	+	-
CFP00265	0,625	2,5	Fungistática	8	+	-
CFP00266	0,625	5	Fungistática	4	+	-
CFP00267	1,25	5	Fungistática	1	+	-
CFP00895	0,625	2,5	Fungistática	4	+	-
INCQS72003	0,625	2,5	Fungistática	8	+	-
INCQS72005	0,625	1,25	Fungistática	1	+	-
INCQS72006	2,5	5	Fungistática	1	+	-
INCQS72007	0,625	1,25	Fungistática	1	+	-
INCQS72008	0,625	2,5	Fungistática	2	+	-
INCQS72010	1,25	5	Fungistática	1	+	-
INCQS72013	ND	ND	ND	0,125	+	-
INCQS72016	ND	ND	ND	0,25	+	-
INCQS72017	1,25	5	Fungistática	1	+	-
INCQS72020	0,625	2,5	Fungistática	0,5	+	-

CC, controle de crescimento; *CE, controle de esterilidade; (+), presença de crescimento microbiano em todas as concentrações testadas; (-), ausência de crescimento em todas as concentrações testadas; ND, ação não detectada.

Fonte: Dados da pesquisa (2022).

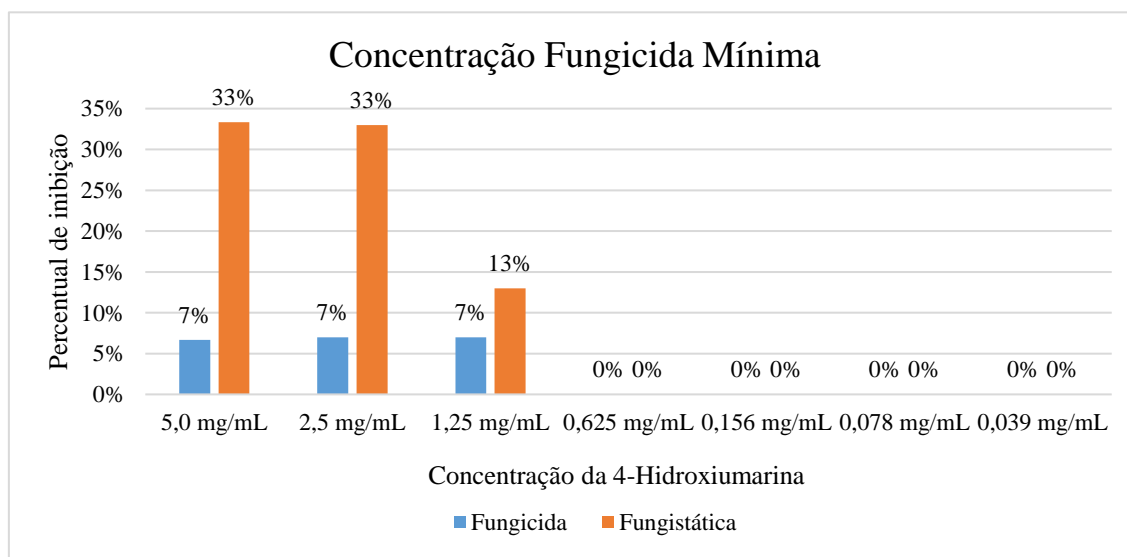
O derivado sintético 4-Hidroxicumarina apresentou ação inibitória do crescimento *in vitro* para a maioria das cepas de *C. albicans*, 15 das 17 testadas, apresentando valores das CIMs que variaram de 0,625 mg/mL a 2,5 mg/mL, frente as diferentes cepas da levedura. Das 15 cepas que tiveram o crescimento inibido, 8 ocorreu na concentração 0,625 mg/mL (53%), 4 na concentração de 1,25 mg/mL (27%), 2 na concentração de 2,5 mg/mL (13%) e uma cepa na concentração de 5,0 mg/mL (7%) (Figura 13).

Figura 13. Concentração inibitória mínima (CIM) para o derivado cumarínico 4 – Hidroxicumarina frente a cepas de *C. albicans*.



Para avaliar a capacidade de inibição completa do crescimento das cepas fúngicas e determinação da CIM, os resultados da CFM foram obtidos, de maneira que a atividade do derivado cumarínico 4-Hidroxicumarina frente as cepas de *C. albicans*, se mostrou pouco variável, visto que dentre as 15 cepas que tiveram o crescimento inibido *in vitro*, três sofreram ação dessa substância de forma fungicida sob uma variação entre 5,0 mg/mL, 2,5 mg/mL e 1,25 mg/mL e para as demais cepas, o composto apresentou caráter fungistático para 80% das dos microrganismos testados, como mostra a Figura 14.

Figura 14. Concentração fungicida mínima (CFM) para o derivado cumarínico 4 – Hidroxicumarina frente a cepas de *C. albicans*.



A classificação do composto estudado, como fungicida ou fungistático foi realizada seguindo os critérios de Balouiri (2016), em que foi determinada pela menor concentração em que ocorreu a inibição completa do crescimento fúngico no meio sólido, sendo considerada fungicida quando essa inibição for $CIM = CFM$ ou $CFM = 1$ a 3 concentrações acima da CIM e, fungistática quando for visualizado crescimento fúngico na CIM e nas suas concentrações mais altas. Para a maioria das cepas testadas, obteve-se resultados de característica fungistática, no qual as leveduras em meio ASD apresentaram crescimento a partir da sua CIM frente ao composto e/ou concentrações acima, e as 3 cepas de caráter fungicida mostraram ação de $CIM=CFM$.

Para validar o ensaio de CIM e CFM, foram realizados controles frente cada cepa de *C. albicans*, utilizando a Anfotericina B como controle positivo, bem como a realização da microdiluição em caldo desse antifúngico para a determinação da CIM frente a cada estirpe testada. O controle de crescimento da levedura aplicado nos ensaios, mostrou a viabilidade das cepas, e o controle negativo evidenciou a esterilidade do meio RPMI utilizado como base para o crescimento fúngico, demonstrado também na Tabela 4.

6.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE A 4-HIDROXICUMARINA E ANFOTERICINA B – MÉTODO DE *CHECKERBOARD*.

A combinação entre a 4-Hidroxicumarina e a Anfotericina B, pelo método de *Checkerboard* foi inicialmente determinada pela seleção das cepas a serem testadas, sendo estabelecida pelo critério de origem patogênica das cepas, bem como a sua CIM, sendo selecionadas 5 cepas dentre as 15 amostras que tiveram o crescimento inibido frente ao derivado sintético cumarínico (Tabela 5).

Tabela 5. Cepas de *C. albicans* selecionadas para o estudo de associação entre a 4-Hidroxicumarina e Anfotericina B – Método de *Checkerboard*.

ESPÉCIE	CÓDIGOS	ORIGEM
<i>Candida albicans</i>	CFP00107	Pele
<i>Candida albicans</i>	CFP00137	Hemocultura
<i>Candida albicans</i>	CFP00195	Catéter
<i>Candida albicans</i>	INCQS 72006	Urina
<i>Candida albicans</i>	INCQS 72010	Escarro

Coleção de Fungos Patogênicos (CFP) e Fungos de Referência em Vigilância Sanitária (CFRVS) quanto a sua origem patogênica. Fiocruz-RJ.

Diante das cepas testadas, foi possível observar neste estudo que a 4-Hidroxicumarina apresentou efeito inibitório *in vitro* no crescimento de cepas de *C. albicans* quando foi testada tanto isoladamente como em combinação com anfotericina B. Como pode ser observado na Tabela 6, a 4-Hidroxicumarina foi capaz de reduzir pela metade a CIM da anfotericina B para a cepa de *C. albicans* (CFP-00107), em relação ao valor observado quando esse antifúngico foi testado isoladamente. Após a combinação com a 4-Hidroxicumarina, a CIM da droga padrão passou de 1 µg/mL para 0,509 µg/mL, ou seja, uma redução em cerca de 50%. Além disso, para a cepa *C. albicans* (INCQS-72010) foi visto uma redução da CIM da Anfotericina de 1 µg/mL para 0,875 µg/mL, quando combinada com o derivado cumarínico. De acordo com a interpretação do FICI, a interação entre as drogas foi aditiva para *C. albicans* CFP-00107 e indiferente para a *C. albicans* (INCQS-72010).

Tabela 6. Determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FIC) – Método *Checkerboard*

	Cepas	CIM das drogas associadas		FIC		FICI	Interação
		4-Hidroxicumarina	Anfotericina B	4-Hidroxicumarina	Anfotericina B		
<i>C. albicans</i>	CFP00107	0,0097	0,5	0,407	0,509	0,917	Aditivo
	INCQS72010	0,625	0,25	0,7	0,875	1,575	Indiferente

CIM: Concentração Inibitória Mínima; FIC: Concentração Inibitória Fracionada; FICI: Índice de Concentração Inibitória Fracionada. Fonte: Dados da pesquisa (2022)

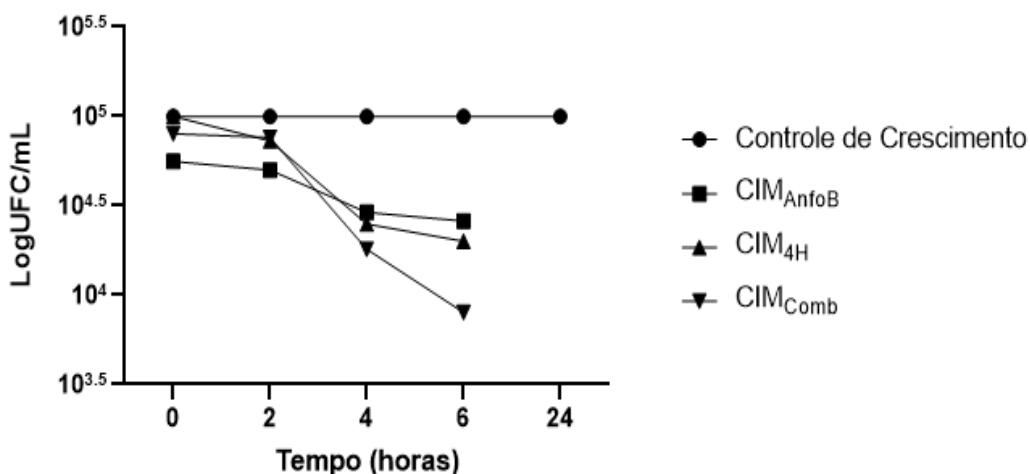
As demais cepas selecionadas para o ensaio, não tiveram o crescimento inibido diante da metodologia proposta, pois houve crescimento em todas as combinações entre as concentrações subinibitórias de ambas as substâncias utilizadas no teste, sendo assim sem efeito sinérgico, aditivo, indiferente e antagônico.

6.3 EFEITO DA 4-HIDROXICUMARINA ISOLADA E ASSOCIADA A ANFOTERICINA B SOBRE A CINÉTICA DE CRESCIMENTO DA *C.albicans*

Nessa etapa experimental, verificou-se o efeito do derivado cumarínico sobre a cinética de crescimento de *C. albicans* tanto de forma isolada, como associado ao antifúngico padrão, avaliando a viabilidade da levedura em diferentes intervalos de tempo.

Para esse ensaio, foi selecionada apenas a amostra *C. albicans* (CFP-00107), tendo em vista que essa cepa foi a única, entre as testadas, que teve o crescimento inibido no ensaio de associação das substâncias de forma aditiva. Logo, essa viabilidade foi determinada através do plaqueamento da concentração inibitória mínima de forma isolada para as drogas e nas suas concentrações subinibitórias em associação. Os resultados da cinética de crescimento foram demonstrados de acordo com número de logUFC/mL nos intervalos de tempo de 0h, 2h, 4h, 6h, 24h para as diferentes concentrações utilizadas sobre a cepa em estudo, sendo plotados na Figura 15.

Figura 15. Cinética de crescimento da *C. albicans* CFP00107 diante das concentrações inibitórias e subinibitórias combinadas da 4-Hidroxycumarina e Anfotericina B (* $p < 0,05$)



Conforme mostrado na Figura 15, foi possível detectar a redução no número de UFC/mL ao longo dos intervalos de tempo do estudo, em todas as concentrações testadas, de forma que a partir do intervalo de 4h, houve a diminuição significativa (* $p < 0,05$) do número de unidades formadoras de colônias, em relação a intervalos iniciais, sendo no tempo de 24h constatado uma inibição total quando comparado ao grupo controle de crescimento, no caso das leveduras.

Além disso, verificou-se que no tempo relacionado a 6h, houve uma redução logarítmica considerável entre 10^{4.5} a 10⁴ UFC/mL em relação a CIM da combinação do 4-Hidroxycumarina e Anfotericina B, correspondente ao caráter aditivo entre as substâncias.

7. DISCUSSÃO

O produto sintético, 4-Hidroxicumarina, eleito para o presente estudo foi testado com êxito e os resultados encontrados corroboram em alguns aspectos e divergem em outros, quando comparados com dados reportados na literatura

A atividade antifúngica do composto fenólico sintético 4-Hidroxicumarina sobre amostras de *Candida albicans* revelou um valor de CIM (0,625mg/mL) para a maioria das cepas testadas. Resultado semelhante foi obtido no estudo realizado por Završnik et al (2008), no qual os pesquisadores avaliaram a atividade antifúngica de aldeídos aromáticos extraídos da 4-Hidroxicumarina frente a uma cepa padrão de *Candida albicans* observando uma concentração inibitória mínima de 0,03125mg/mL para a espécie testada. Para os autores, a possível explicação reside no fato de que a oxigenação do anel benzênico contribui para o aumento da atividade antimicrobiana do composto.

Essa última informação corrobora com o proposto no estudo realizado por Daoubi e colaboradores (2004), que sintetizaram uma série de derivados cumarínicos e testaram a diidrofuranocumarinas e diidropiranocumarinas frente a fungos filamentosos, os quais tiveram o crescimento inibido em 79% e 80%, respectivamente, pelos referidos compostos em uma concentração de 200 mg/L, e a partir de análises afirmaram que o anel furano ligado ao núcleo 1,2-benzopirona parece desempenhar um importante papel no mecanismo de ação para a inibição do crescimento fúngico.

A atividade antifúngica de derivados cumarínicos com presença da cadeia alquila na posição 8 da sua estrutura básica foi analisada em outro estudo (MONTAGNER et al., 2007). Os dados sugerem uma relação com o aumento do caráter lipofílico da molécula, que provavelmente, favorece a passagem pela membrana fosfolipídica dos fungos. Em outros trabalhos em que pesquisadores analisaram a relação entre estrutura e atividade de cumarinas com ação antifúngica (CÉSPEDES et al., 2006) os achados apontaram a ocorrência de um aumento da atividade em cumarinas 7-O-substituídas quando comparadas a 7-OH-cumarinas. Similarmente, dados de outras pesquisas mostraram que cumarinas alquiladas na posição 7-OH, com os grupamentos etila por exemplo, são cinco vezes mais ativas frente a espécie dimórfica *Sporotrix schenckii* (FLÔRES, 2011)

Pesquisas mostram potencial antimicrobiano diferente quando comparada a ação de cumarinas de estrutura mais simples e cumarinas com alteração em anel (6,7-dimetoxicumarina, e 6,7-dimetoxi-4-cumarina) evidenciando que esses compostos promoveram ação inibitória do crescimento de leveduras do gênero *Candida* (FLÔRES, 2011), permitindo a correlação do grupo hidroxila pertencente ao derivado cumarínico 4-

Hidroxicumarina, testado em nosso estudo, que mostrou resultados promissores em relação a ação antifúngica, igualmente, para *Candida albicans*.

Diferentemente da técnica de microdiluição em caldo utilizada no presente estudo, Rehman et al (2013), utilizaram a técnica de disco difusão para avaliação da atividade antimicrobiana de componentes obtidos a partir da 4-Hidroxicumarina para diferentes microrganismos, frente a discos embebidos com as concentrações de 0,5mM das substâncias sintetizadas expostos a diferentes bactérias e a levedura *C. albicans*. A partir disso, concluíram que a maioria dos componentes obtidos apresentaram atividade inibitória moderada para as bactérias, com resultados mais significativos contra a cepa fúngica, com halos de inibição variando entre 20,0 – 30,0 mm, apresentando sensibilidade aos componentes, quando os valores são comparados com os halos referentes ao antifúngico padrão utilizado como controle positivo.

Em relação a determinação da concentração fungicida mínima, no presente estudo foi possível verificar que os resultados mais expressivos foram correspondentes às concentrações mais elevadas, entre 5 mg/mL a 1,25 mg/mL (Tabela 4). A partir da compilação desses dados é possível estabelecer uma comparação com o estudo realizado por Siddiqui et al (2011), no qual os autores mostraram que diante de uma série de derivados de 4-Hidroxicumarina, as substâncias testadas frente as cepas de *Candida albicans*, apresentaram uma concentração inibitória *in vitro*, entre uma faixa de 25-100 mg/mL, sendo constatado que as CFMs dos compostos diante das espécies fúngicas testadas sofreu uma variação de 2 a 4 vezes mais elevada do que o resultados correspondente a CIM. Esses dados apresentam coerência com os encontrados no presente estudo em que as CFM, em sua maioria, foram maiores que os resultados da CIM, confirmando que o derivado sintético 4 – Hidroxicumarina tem ação fungistática frente a maior percentual de cepas testadas.

O conhecimento sobre a natureza da atividade de uma determinada substância assume o caráter importante no que diz respeito a uma terapia direcionada, principalmente em pacientes imunodeprimidos, de forma que clinicamente a atividade fungicida de um composto é mais importante que a fungistática. No entanto, o uso de substâncias de ação fungistática não deve ser desconsiderado, uma vez que o seu uso no tratamento de infecções em indivíduos imunocompetentes, apresenta uma ação eficaz, sendo a essência do tratamento antimicrobiano direcionada para a toxicidade seletiva, ou seja, inibir ou matar o microrganismo sem afetar o hospedeiro (MONK; GOFFEAU, 2008; DANTAS et al., 2017)

O mecanismo de ação relacionado ao potencial de inibição desse derivado cumarínico especificamente ainda é pouco elucidado na literatura. Apesar da escassez de dados, Thati e colaboradores (2007) reportam que esse possível mecanismo de ação antifúngica ocorre através da interrupção da cadeia respiratória que acarreta na depleção do componente ergosterol e, com isso, o aumento da permeabilidade da membrana plasmática, que direciona a levedura à apoptose.

Além disso, estudos como o de Widodo et al (2012) analisaram através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) a ação de uma cumarina isolada da fração acetona do extrato etanólico das folhas de *Ageratum conyzoides* frente a *Candida albicans*, na tentativa de elucidar um possível mecanismo de ação partindo da CIM de 0,125 mg/mL. Os autores do estudo acima referido, constataram que após o tratamento com a cumarina, a maioria das células fúngicas não diferiram em tamanho quando comparado o controle, porém intracelularmente, foi observado um acúmulo de material membranoso ao redor da superfície da parede celular, o que pode ser causado, de acordo com os mesmos autores, pelo extravasamento de aminoácidos da membrana, bem como outros conteúdos citoplasmáticos. Logo, eles concluíram que essa substância é capaz provocar a morte do fungo pela formação de poros em sua parede celular, e conseqüentemente, o aumento de permeabilidade gerar o extravasamento do conteúdo citoplasmático

Outros dados relatados na literatura reiteram os achados referentes ao uso de derivados cumarínicos frente aos fungos reconhecidos como patogênicos, como é o caso do gênero *Aspergillus*, microrganismo alvo do estudo realizado por Guerra (2016), no qual foi determinado que a atividade antifúngica de 12 derivados cumarínicos sintéticos com valores de CIMs significativos correspondentes a variação entre 1024-16µg/mL. Além disso, o mesmo trabalho verificou que a adição de grupos eletronegativos, como substituintes do anel benzopirona, favorece a atividade antifúngica destes compostos, sendo os derivados cumarínicos com melhores CIM (16µg/mL), como o ensaiado 7-hidroxi-6-nitrocumarina e 4-acetóxicumarina foram capazes de favorecer a inibição do crescimento micelial e a germinação dos conídios desse fungo filamentosos, interferindo nos seus fatores de virulência associados a parede celular.

Diante da crescente resistência microbiana evidenciada nas últimas décadas, a busca por novas substâncias que se associem a fármacos antimicrobianos convencionais caminha paralelamente aos estudos que avaliam a identificação dos fatores de virulência de leveduras do gênero *Candida* (CARNEIRO et al., 2014; PEREIRA, et al., 2018), com

a pretensão de estabelecer uma estratégia promissora a fim de aumentar a eficácia dos agentes antimicrobianos no tratamento de infecções por microrganismos multirresistentes (FONSECA, 2020).

No presente estudo, os isolados clínicos de *Candida albicans* não foram inibidos, em sua maioria, quando expostos à combinação de concentrações subinibitórias entre o composto fenólico sintético 4-Hidroxycumarina e a anfotericina B. Isso permite levantar algumas hipóteses; tal observação, pode provavelmente estar associado às grandes variações relacionadas com as particularidades fenotípicas e genotípicas de cada estipe da espécie *Candida albicans* testada, no qual o perfil de sensibilidade aos antifúngicos pode sofrer influência diante da origem do espécime clínico de cada amostra.

Em estudos epidemiológicos, como o realizado por Althaus et al (2015) que coletou dados referentes a susceptibilidade de cepas da espécie *C. albicans* em diferentes tipos de amostras clínicas, como urina, hemocultura, lavado brônquico e secreção de próteses, foi observado que correlacionando com todos os antifúngicos utilizados no tratamento, os resultados variaram entre os espécimes em sensíveis, dose-dependente, ou resistentes. Esses dados podem corroborar com os apresentados neste estudo pois dentre as 5 amostras selecionadas para a metodologia de associação entre o derivado cumarínico e a anfotericina B, as que não obtiveram resultados inibitórios foram obtidas de sítios de infecções diferentes, como mostrado na Tabela 5.

Além disso, essas variações podem ser influenciadas por fatores de virulência expressos pelas diferentes espécies fúngicas, sendo isso reportado nos estudos experimentais realizados por Melo (2018) no qual avaliou os principais fatores de virulência associados em infecções sanguíneas ocasionadas pelo gênero *Candida*, demonstrando que espécies de *Candida albicans* advindas de hemoculturas apresentaram uma maior capacidade de adesão a células epiteliais, bem como sua alta produção de enzimas do tipo hemolisinas, quando comparadas a outras espécies de *Candida* e, portanto, isso pode interferir na resposta ao tratamento antifúngico administrado.

Dentre a 5 amostras selecionadas, obteve-se também resultados de caráter aditivo e indiferente para 2 cepas, diante da combinação entre o derivado cumarínico e o antifúngico padrão, utilizando a metodologia de *Checkerboard* (Tabela 6). Os achados referentes aos efeitos de associação entre a 4-Hidroxycumarina e outros antifúngicos ainda são escassos na literatura, havendo então uma deficiência de dados a respeito dessa substância diante dos resultados do presente estudo.

No entanto, em trabalhos que utilizaram outros derivados cumarínicos em associação com antifúngicos padrões foram visualizadas ações de caráter aditivo em cepas fúngicas do gênero *Aspergillus*, no qual concentrações subinibitórias de 7-hidroxi-6-nitrocumarina foram capazes de potencializar a ação *in vitro* dos antifúngicos da classe dos azólicos, com um valor de FICI igual a 0,63. Além disso, o mesmo estudo constatou que outro derivado sintético testado, a 4-acetóxicumarina relevou um índice de FIC maior que 1,0 diante da sua combinação com a anfotericina B frente a todas as cepas de *Aspergillus* sp. (GUERRA, 2016).

Por outro lado, em um estudo realizado por Florês (2011) utilizando a combinação entre um derivado cumarínico 5-carboxi-6,7-diidroxi-4-metilcumarina e a anfotericina B revelou efeito sinérgico entre a associação das substâncias, em que foi observado a redução da CIM para mais da metade do valor obtido para o composto isolado, frente a cepas do fungo *S. schenckii* e com isso conclui-se que, a redução da concentração desse antifúngico padrão traz à tona um cenário vantajoso para o tratamento de infecções fúngicas no que diz respeito a sua toxicidade, uma vez que esse fármaco é conhecido por sua nefrotoxicidade e desenvolvimento de lesões histológicas de forma permanente nos túbulos renais, mesmo perante uma administração terapêutica de curta duração (FALCI; PASQUALOTTO, 2015)

Outros estudos envolvendo a associação entre a anfotericina B e substâncias bioativas também apontam a grande importância da busca por uma alternativa de intervenção terapêutica que disponha de resultados promissores no desenvolvimento de protocolos assistenciais, destinados a pacientes críticos em uso de medicamentos nefrotóxicos, já que o uso desse antifúngico na terapia de fungemias deve ser monitorado cuidadosamente devido à alta incidência de reações adversas como náusea, vômitos, febre, hipertensão e em casos mais graves, a lesão renal aguda (ARAUJO, 2019). Isso pode ser visto também em trabalhos como o de SCHLOTTFELDT et al (2015), que avaliou a ação dos flavonoides diante da redução da nefrotoxicidade da anfotericina B, através da combinação entre as substâncias e a visualização de forma *in vivo*, de uma proteção antioxidante que refletiu na elevação da taxa de filtração glomerular, atenuação da disfunção tubular e redução na liberação de metabólitos oxidativos na urina.

No estudo da atividade *in vitro* da combinação de antifúngicos, o método de *Checkerboard* corresponde a uma técnica mais frequentemente utilizada de acordo com a literatura, no entanto, a mesma apresenta a limitação de fornecer apenas uma medida relativa da potência para a combinação e oferece poucos dados sobre a dinâmica da

interação antifúngica. Diferentemente da metodologia da curva cinética de crescimento do microrganismo, que avalia a atividade inibitória medindo o efeito da interação antifúngica sobre a taxa e extensão da inibição fúngica ao longo do tempo, entrando em desvantagens como o tamanho do inóculo e as dificuldades de interpretação dos resultados, bem como a dedicação à metodologia por um tempo extenso e dispendioso (LEWIS et al., 2002; MUKHERJEE et al., 2005; TEIXEIRA-SANTOS et al., 2012).

No presente estudo, ambas metodologias citadas acima foram utilizadas de forma conjunta a fim de se complementarem e, principalmente na tentativa de melhor descrever o processo de inibição fúngica provocada tanto pelas CIMs, quanto pela combinação entre a 4 – Hidroxicumarina e a anfotericina B, especialmente a atividade de efeito aditivo referente a cepa CFP00107.

Os valores dos FICIs utilizados para definir a natureza da interação entre as drogas pelo método de *Checkerboard* apresentam diferenças entre as publicações, de forma a tornar complicada a comparação entre os estudos. A maioria dos trabalhos publicados utilizam a definição de efeito sinérgico quando o FICI corresponde a ≤ 0.5 , bem como aditismo com $FICI > 0,5$ e ≤ 1 , indiferença com $FICI > 1$ e < 4 e antagonismo com $FICI \geq 4$. Entretanto, outros estudos apresentam outras interpretações como, por exemplo, Pei et al. (2009) definiram $FICI < 1$ como sinérgico, $FICI = 1$ como aditismo, $FICI > 1$ e ≤ 2 indiferente e $FICI > 4$ como antagonismo. Além disso, Galluci e colaboradores (2009) consideraram como efeito sinérgico o $FICI \leq 0,75$ como aditismo o $FICI > 0,75$ e ≤ 2 e como efeito antagônico o $FICI > 2$. Devido as divergências entre as pesquisas para classificar os tipos de interações pelo método de *Checkboard*, neste estudo adotou-se as definições mais relatadas pela literatura, descritos por MULYANINGSIH et al., (2010), assim como CORREA-ROYERO et al (2010), SEGATORE et al (2012), MENEZES (2014).

De acordo Silva (2014), existe uma concordância geral entre os autores para as definições de sinergismo e antagonismo. No entanto, ainda há muitas discussões acerca dos termos aditismo e indiferente, sendo mencionado na maioria dos trabalhos que a aditividade é observada quando o resultado de uma combinação é igual à soma dos efeitos de cada droga testada isoladamente, por um lado, em relação a indiferença é constatada quando a combinação das moléculas não resulta em efeitos positivos ou negativos (TEIXEIRA-SANTOS et al., 2012; CHAVARRIA; ESPARZA; POZOS, 2019)

Os resultados da combinação da 4-Hidroxicumarina com a anfotericina B não alcançaram os critérios propostos para que a associação entre as duas substâncias fossem

consideradas de efeito sinérgico, porém isso não exclui a afirmação de que não houve benefício em associá-los, visto que houve a inibição do crescimento fúngico em concentrações inferiores tanto para a anfotericina B, quanto para o derivado cumarínico frente a duas cepas das cinco selecionadas para o teste. Junto a isso, foi possível reiterar a esse achado, a completa inibição fúngica visualizada pela curva de cinética de crescimento quando se compara a CIM de cada composto e suas combinações.

Além disso, essa afirmativa pode ser corroborada por estudos feitos por KLIBBER (2012) em que, apesar de considerar ideal uma combinação que apresenta efeito sinérgico, a ausência de sinergismo nem sempre pode significar e anular a presença de nenhum benefício entre as combinações de substâncias, visto que a associação entre duas drogas pode aumentar a taxa de morte microbiana e encurtar a duração do tratamento, assim como permitir que seja utilizado doses mais baixas de cada composto e junto a isso amenizar a toxicidade das drogas utilizadas de forma individual. Concomitante a isso, a combinação entre medicamentos que possuam atuação através de mecanismo de ação diferentes podem interferir no processo de diminuição da aquisição de resistência antimicrobiana (ALVES, 2018)

Em relação a cinética de crescimento, a mesma foi conferida em uma etapa seguinte ao estudo de associações das substâncias para avaliar a viabilidade fúngica perante as diferentes concentrações inibitórias e subinibitórias, sendo essa técnica considerada, para alguns autores, um método complementar ao *Checkerboard*, bem como uma forma mais sensível para a determinação da ação inibitória, em que é possível observar ao longo de um período da intensidade da morte de microrganismos diante de uma concentração fixa de substâncias testadas (LEWIS et al., 2000; BARBOSA et al., 2010).

Desta forma, foi observado neste estudo que a determinação da cinética de crescimento foi interessante para mostrar o efeito fungicida frente a cepa *C. albicans* (CFP00107) ao longo do período analisado, em que nos tempos iniciais de crescimento a cepa foi capaz de crescer de forma viável comparada ao controle de crescimento utilizado, ou seja, sem adição de substâncias interferentes, apenas com a suspensão fúngica ajustada, entretanto, durante os intervalos até o tempo de 24h, sofreu total inibição.

A análise estatística foi capaz de mostrar que o crescimento da cepa foi inibido de forma significativa ($p < 0,005$) tanto pela CIM correspondente a ação da 4-Hidroxycumarina de forma isolada, como pela CIM do antifúngico anfotericina B, a partir do período de 4h, 6h e 24h, no qual crescimento fúngico começou a ser reduzido perante

a formação das suas unidades de colônias, sofrendo um decaimento em proporções semelhantes durante os tempos analisados.

Atrelado a isso, observou-se que a associação entre o derivado cumarínico e o antifúngico padrão potencializou interferência na cinética de crescimento das leveduras pelos dois compostos através de um caráter aditivo e fungicida, como elucidado pelo *Checkerboard*, de forma que a partir do tempo de 6h, a combinação foi capaz de reduzir o crescimento fúngico em uma diferença na escala logarítmica em cerca de $10^{4.5}$ a 10^4 UFC/mL quando comparado com a ação isolada de cada composto.

O somatório desses dados pode ser comparado a um estudo recente realizado por COSTA et al., (2020) em que os autores observaram a partir do uso de um derivado sintético funânico, que leveduras do gênero *Candida* sofreram redução significativa em sua cinética de crescimento nos tempos 4h, 8h e 24h pelo efeito de substâncias nos referidos tempos e nas concentrações testadas, de maneira semelhante ao antifúngico Anfotericina B. Assim, o estudo da cinética de crescimento é capaz de elucidar, em um caráter mais visual e dinâmico, a ação antimicrobiana frente as cepas analisadas, sendo necessário, de acordo com considerações a respeito da técnica feita por Keele et al (2001), uma correlação com estudos em um sistema *in vivo*, visto que as concentrações das substâncias são estáticas, diante da determinação de uma curva de crescimento, não sofrendo o processo de absorção e interações dos fármacos com componentes proteicos do indivíduo, sendo necessário a constante associação entre estudos antimicrobianos *in vitro* com ensaios de interações celulares em modelos *in vivo*.

Por fim, a atividade antimicrobiana do derivado sintético 4-Hidroxicumarina avaliada no presente estudo foi demonstrada com êxito, mostrando um potencial anti-*Candida* significativo e promissor, tendo em vista os resultados conclusivos que revelaram parâmetros de susceptibilidade da *C. albicans* à substância, tanto isoladamente como em associação com um antifúngico de uso tradicional. Nesse sentido, o presente estudo pode auxiliar direcionamento na busca por novas estratégias no que se refere a terapêutica antifúngica.

8. CONCLUSÃO

- O derivado fenólico sintético 4-Hidroxicumarina apresentou atividade antifúngica significativa frente a isolados de leveduras da espécie de *Candida albicans*;
- A maioria dos valores de CIM determinada sofreu variação, sendo a natureza da atividade referente a inibição promovida pela 4-Hidroxicumarina de caráter fungistática em sua maioria, com CFM variando entre concentrações mais elevadas quando comparadas a CIM;
- A avaliação da associação entre 4-Hidroxicumarina e a anfotericina B pelo método de *Checkerboard* demonstrou que a maioria das cepas não tiveram o crescimento inibido pela combinação de concentrações subinibitórias dessas substâncias;
- Entre as amostras de *C. albicans* selecionadas, foi possível classificar a atividade da associação entre o derivado sintético e o antifúngico padrão, em um tipo de interação de efeito indiferente e aditivo;
- A atividade aditiva atrelada a cinética de crescimento da *C.albicans* potencializou de forma significativa a ação antimicrobiana desses compostos, reduzindo a viabilidade das leveduras de forma fungicida;

Ademais, como forma de perspectivas futuras, os dados sugerem a união de outros estudos relacionados a toxicidade, em sua maioria já desenvolvidos por outros grupos de pesquisa em que a substância foi gentilmente cedida, como forma de gerar uma compilação de informações a respeito do potencial biológico da 4-Hidroxicumarina.

9. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ABDELHAFEZ, Omaima M. et al. Synthesis, anticoagulant and PIVKA-II induced by new 4-hydroxycoumarin derivatives. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 18, n. 10, p. 3371-3378, 2010.

ACHKAR, J. M.; FRIES, B. C. *Candida* Infections of the Genitourinary Tract. **Clinical microbiology reviews**, v. 23 n. 2, p. 253-273, 2010.

AGUIAR, Michelle Maria Gonçalves Barão de. **Desenvolvimento de Novos Comprimidos Bucais de Nistatina para o Tratamento de Candidíase Oral**. 2007.146 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

AL-AMIERY, A. A. et al. Antifungal Activities of New Coumarins. *Molecules*, v. 17, p. 5713-5723, 2012.

ALBUQUERQUE, P.; CASADEVALL, A. Quorum sensing in fungi a review. **Medical mycology**, v. 50, n. 4, p. 337-345, 2012.

ALICE, Cecília Ballvé. **Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico**. Editora da ULBRA, 1995.

ALTHAUS, Vanusa Aparecida et al. Espécies de *Candida Spp.* em Isolados Clínicos e Suscetibilidade a Antifúngicos de uso Hospitalar. **Saúde e Pesquisa**, v. 8, n. 1, p. 7-17, 2015.

ÁLVARES, Cassiana Aparecida; SVIDZINSKI, Terezinha Inez Estivalet; CONSOLARO, Márcia Edilaine Lopes. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, p. 319-327, 2007

ALVES, Fernanda Cristina Bergamo. **Mecanismos de ação da atividade antibacteriana da nisina e em combinações com antimicrobianos tradicionais sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa***. 2018. 79 f. (Mestrado em Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, 2018.

ALVES, Quiara Lovatti et al. **7-Hidroxicumarina induz vasodilatação, redução da contratilidade cardíaca e hipotensão: uma molécula promissora para o tratamento de doenças cardiovasculares**. 2020. Tese de Doutorado (Pós-Graduação em Biotecnologia e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, 2020

ANAND, P.; BALDEV, A.; SINGH, A.; SINGH, N. B. A Review on Coumarins as Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 1175–1180, 2012.

ARAUJO, Morgana de Souza et al. **Constituintes Químicos e Investigação do Potencial Citotóxico das cascas e folhas de *Guatteria olivacea* (Annonaceae)**. 2019. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Química) – Universidade Federal do Amazonas, 2019.

ARAUJO, Gessica dos Santos. **Efeito antifúngico de antraquinonas contra *Cryptococcus neoformans in vitro*: Detecção de sinergismo entre Barbaloina e Anfotericina b**. 2019. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, 2019.

ARAUJO, V.F. ECHEVERRIA, R.M.; PASTORE-JUNIOR, F. **Sistema de extração de cumaru. In: Produção não-madeira e desenvolvimento sustentável na Amazônia. Projeto Organização Internacional de Madeiras Tropicais**. Universidade de Brasília. Instituto de Química. Laboratório de Tecnologia Química. 12p. 2004.

BADIEE, P et al. Antifungal susceptibility patterns of colonized *Candida* species isolates from immunocompromised pediatric patients in five university hospitals. **Iranian journal of microbiology**, v. 9, n. 6, p. 363, 2017.

BAIRAGI, S. H.; SALASKAR, P. P.; LOKE, S. D.; SURVE, N. N.; TANDEL, D. V.; DUSARA, M. D. Medicinal significance of coumarins. **International journal of pharmaceutical research**. v. 4, n. 2, p. 16-19, 2012.

BALOUIRI, M., SADIKI, M., & IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 6 (2), 71–79, 2016

BARBOSA, Danilo Batista Martins et al. **Estudo da atividade antifúngica da associação do óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* Jowitt (citronela) com**

antifúngicos sintéticos sobre espécies de *Aspergillus*. 2010. Tese de Doutorado (Pós-Graduação em Odontologia), Universidade Federal da Paraíba, 2010.

BARBOSA, J. P. et al. *Eucalyptus* spp: *Candida albicans* Antibiofilm Activity. **Ec dental science**, v. 18, n. 5, p. 824-840, 2019.

BARROS, T. A. A.; FREITAS, L. A. R.; FILHO, J. M. B.; NUNES, X. P.; GIULIETTI, A.M.; SOUZA, G. E.; SANTOS, R. R.; SOARES, M. B.; VILLARREAL, C. F. J. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-hydroxycoumarin in experimental animal models: potential therapeutic for the control of inflammatory chronic pain. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, p. 205-213, 2010.

BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI H. R. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. **Molecules**, [S. l.], v. 17, n. 4, p. 3989-4006, 2012.

BELÉM, Isabel de Paiva Bastos; MONTEIRO, Beatriz Nascimento; DIAS, Ana Claudia. A desinfecção da água: um estudo usando insumos vegetais que possuem psoraleno em tsa The disinfection of water: a study using plant inputs that contain psoralene in tsa. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 1, p. 4728-4740, 2022.

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

BERTO, Caroline et al. Bases da resistência antifúngica: uma revisão comentada. **Revista Uningá**, v. 55, n. 3, p. 52-71, 2018

BESSA, Meliza Arantes de Souza et al. **Perfil molecular de espécies de *Candida* isoladas em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal de um hospital universitário**. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Uberlândia, 2020.

BORAL, H. et al. Overview of selected virulence attributes in *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum*, and *Exophiala dermatitidis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 111, p. 92-107, 2018.

BOSQUEIRO, Anne Ligia Dokkedal. Metabólitos Secundários em plantas. **Revista ciência e educação**, v. 13, n. 2, p. 91-96, 1995

BRAECHER, Ingrid Rodrigues Sant'Angelo et al. Fármacos empregados para o tratamento de candidíase oral: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 76, p. 05, 2019.

BRAND, A. et al. An Internal Polarity Landmark Is Important for Externally Induced Hyphal Behaviors in *Candida albicans*. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 4, p. 12-20, 2008.

BRENZAN, M.A. et al. Activity of extracts and coumarins from the leaves of *Calophyllum brasiliense* on *Leishmania braziliensis*. **Pharmaceutical Biology**. V. 46, n. 6, p. 380-386. 2008.

BUBOLS, G. B.; VIANNA, D. R.; MEDINA-REMÓN, A.; VON POSER, G.; LAMUELARAVENTOS, R. M.; EIFLER-LIMA, V. L.; GARCIA, S. C. The Antioxidant Activity of Coumarins and Flavonoids. **Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 318-334, 2013.

CALDERONE, Richard A.; FONZI, William A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 7, p. 327-335, 2001.

CAMILLERI, M.; MURRAY, J. A. Diarrhea and Constipation. *Harrison's Principles of Internal Medicine*, v. 19, p. 264-273, 2015.

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

CARMONA EM e LIMPER AH. Overview of treatment approaches for fungal infections. **Clin Chest Med**. 38, 393-402, 2017.

CARNEIRO FM, SILVA MJP, BORGES LL, ALBERNAS LC, COSTA JDP. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Rev Sapiência: soc, saberes e prat educ** 2014;3(2):44-75.

CASTRO, Ricardo Dias de et al. **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (canela) e sua associação com antifúngicos sintéticos sobre espécies de *Candida***. 2010. Tese de Doutorado (Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), Universidade Federal da Paraíba, .2010

CATERINA, R.; RENDA, G.; CARNICELLI, A. P.; NORDIO, F.; TREVISAN, M.; CÉSPEDES, Carlos L. et al. Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 10, p. 3521-3527, 2006.

CHANG, Ya-Lin et al. New facets of antifungal therapy. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 222-236, 2017.

CHATURVEDI, V. et al. Multilaboratory testing of two-drug combinations of antifungals against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida parapsilosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 4, p. 1543-1548, Abr. 2011.

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

CHIARADIA, L. D. **Obtenção de Chalconas Sintéticas com Potencial Atividade Biológica**. 2006. Dissertação de mestrado (Mestrado em Química) - Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

CHUDZIK, B. et al. A new look at the antibiotic amphotericin B effect on *Candida albicans* plasma membrane permeability and cell viability functions. **European Biophysics Journal**, v. 44, n. 1–2, 4 fev. 2015.

CLEELAND, L.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and experimental animal infections. In: Lorian VMD. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1991. p. 739-788.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 2nd ed. CLSI supplement M60**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

COLPO, J. F. et al. Potencial inseticida de óleos de origem vegetal sobre *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 182-188, 2014.

CORRÊA, Allan Jonathan Chernichiarro. **Análise comparativa de atividades antimicrobiana e citotóxica de extratos brutos e frações do rizoma de *Alpinia***

Zerumbet (PERS.) BL BURTT. & RM SM. com três cumarinas sintéticas. 2012. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

COSTA, Paulo César Trindade da et al. **Análise da atividade antifúngica de derivados furânicos contra *Candida spp.*** 2020. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia), Universidade Federal de Campina Grande, 2020.

COUNCIL DIRECTIVE of 22 June 1988 on the laws of the Member States relating to flavourings for use in foodstuffs and to source materials for their production. **Official Journal of the European Communities**, N° L 184/61, 15/07/1988.

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

CUNHA AP. Farmacognosia e Fitoquímica. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa, 2005.

CZELUSNIAK, K.E. et al. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n.2, p. 400-409, 2012.

DA CRUZ, Luisa Ferreira et al. Avaliação toxicológica da 4-hidroxicumarina:(Anti) Mutagenicidade, estudos de toxicidade e antioxidantes. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, p. e7910816948-e7910816948, 2021.

DA ROCHA, Wilma Raianny Vieira et al. Gênero *Candida*-Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e43910414283-e43910414283, 2021.

DA SILVA, A. K. F. et al. Infecções urinárias nosocomiais causada por fungo do gênero *Candida*: Uma Revisão. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT-ALAGOAS**, v. 2, n. 1, p. 45-57, 2014.

DA SILVA, Carolinne Serafim. Etiologia e epidemiologia da tinea capitis: relato de série de casos e revisão da literatura. **RBAC**, v. 51, n. 1, p. 9-16, 2019.

DANTAS, Tassiana Barbosa et al. Avaliação da toxicidade e atividade antifúngica *In Vitro* do Timol sobre linhagens de *Penicillium citrinum*. 2017.

DAOUBI, M.; DURÁN-PATRÓN, R.; HMAMOUCI, M.; HERNANDEZ-GALÁN, R.; BENHARREF, A.; COLLADO, I.G. Screening study for potential lead compounds for natural product-based fungicides: I. Synthesis and in vitro evaluation of coumarins against *Botrytis cinerea*. **Pest Management Science**. v. 60, p. 927-932, 2004

DE ANDRADE JUNIOR, Francisco Patricio et al. STUDY OF THE ASSOCIATION OF TIMOL WITH ANFOTERICIN B AGAINST *Rhizopus orizae*. **Periódico Tchê Química**, v. 16, n. 31, p. 156-163, 2019.

DE MACÊDO ROCHA, Samuel et al. Avaliação da atividade leishmanicida de um novo composto de coordenação de cobalto (II) contendo o grupo 4-Hidroxycumarina. **Anais XXVII Encontro de Química da região Sul**, v. 1, n. 1, p. 176-176, 2021.

DE OLIVEIRA MENDOÇA, Carla Eneida et al. Atividade anticoagulante de cumarinas: Revisão de Literatura. **Mostra Científica da Farmácia**, v. 5, 2019.

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

DE PAULA, Bruno Rafael et al. Reposicionamento do anti-inflamatório diclofenaco de sódio e sua potencial ação sinérgica com antibióticos como resposta no combate a infecções bacterianas. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 13, n. 3, 2021.

DE REZENDE, Fernanda Mendes et al. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. **Laboratório de Ensino de Botânica**, v. 93, 2016.

DE ROSSI, T. et al. Interações entre *Candida albicans* e Hospedeiro. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 1, p. 15-28, 2011.

DIGHE, N. S. et al. Synthetic and pharmacological profiles of coumarins: A review. **Scholars Research Library**, v. 2, n. 2, p. 65-71, 2010.

DING, X. et al. Epidemiology and risk factors for nosocomial non-*Candida albicans* candidemia in adult patients at a tertiary care hospital in North China. **Medical mycology**, v. 00, n. 00, 2015.

DUTRA, Rafael C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

EDDOUZI, Jamel et al. Molecular mechanisms of drug resistance in clinical *Candida* species isolated from Tunisian hospitals. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 3182-3193, 2013.

EKOR, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, 2014.

ELENA, Rusu et al. Identification of species of the genus *Candida* by analysis of 5.8 S rRNA gene. **Rom Biotech Lett**, v. 20, p. 10585-10591, 2015.

EL-KIRAT-CHATEL, S. et al. Force nanoscopy of hydrophobic interactions in the fungal pathogen *Candida glabrata*. **ACSNANO**, v. 9, n. 2, p. 1648–1655, 2015.

Ernst, E. J., Klepser, M. E., Ernst, M. E., Messer, S. A., Pfaller, M. A. Diagn. **Microbiol. Infect. dis.**, [S. l.]. 1999, 33, 3

FALCI, Diego Rodrigues; PASQUALOTTO, Alessandro Comaru. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clinical & Biomedical Research**, v. 35, n. 2, 2015.

Felter, S. P., Vassallo, J. D., Carlton, B. D., e Daston, G. P. (2006). A safety assessment of coumarin taking into account species-specificity of toxicokinetics. **Food and Chemical Toxicology**, 44(4), 462–475.

FINCH, Justin J.; WARSHAW, Erin M. Toenail onychomycosis: current and future treatment options. **Dermatologic therapy**, v. 20, n. 1, p. 31-46, 2007.

FLÔRES, Damiana da Rocha Vianna. **Avaliação in vitro da atividade antifúngica e citotóxica de cumarinas naturais e sintéticas**. 2011. Tese de Doutorado (Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

FONSECA, Aluísio et al. Análise fitoquímica e atividades biológicas do alho. **Enciclopédia Biosfera**, v. 16, n. 29, 2019.

FONSECA, Fauller Henrique da. **Avaliação do efeito sinérgico entre o peptídeo 0WHistatina-5 e antifúngicos comerciais na inibição do crescimento de *Candida***

albicans. 2020. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista. 2020.

FRANCO, Daiana P. et al. A importância das cumarinas para a química medicinal e o desenvolvimento de compostos bioativos nos últimos anos. **Química Nova**, v. 44, p. 180-197, 2021.

FREI, H., WÜRGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from Drosophila assay indicate a positive, negative, or inconclusive result. **Mutation Research**, v. 203, n. 4, p. 297-308, 1988.

GABRILSKA, R. A.; RUMBAUGH, K. P. Biofilm models of polymicrobial infection. **Future microbiology**, v. 10, n. 12, p. 1997-2015, 2015.

GACCHE, R. N.; JADHAV, S. G. Antioxidant Activities and Cytotoxicity of Selected Coumarin Derivatives: Preliminary Results of a Structure–Activity Relationship Study Using Computational Tools. **Journal of Experimental & Clinical Medicine**, v. 4, p. 165-169, 2012.

GASPI, F. O. G.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; SANTOS, G. M. T.; TESTA, M.; PASSARINI JÚNIOR, J. R.; PEDROSO-DE-MORAES, C.; ESQUISATTO, M. A. M.; MENDONÇA, J. S.; MENDONÇA, F. A. S. Effects of the Topical Application of Hydroalcoholic Leaf Extract of *Oncidium flexuosum* Sims. (Orchidaceae) and Microcurrent on the Healing of Wounds Surgically Induced in Wistar Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 20, p. 1-9, 2011.

GERALDINO, Thais Herrero et al. Dimorfismo, produção de enzimas funcionais e adesinas de *Candida albicans*: Mini Revisão. **Biosaúde**, v. 14, n. 1, p. 26-41, 2012.

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.

GLAZIER, Virginia E.; KRYSAN, Damian J. Genetic interaction analysis comes to the diploid human pathogen *Candida albicans*. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 4, p. e1008399, 2020.

GONÇALVES, S. S. et al. Epidemiology and molecular mechanisms of antifungal resistance in *Candida* and *Aspergillus*. **Mycoses**, v. 59, n. 4, p. 198-219, 2016.

GUERRA, Felipe Queiroga Sarmiento et al. **Avaliação da atividade antifúngica dos compostos cumarínicos frente às cepas do gênero *Aspergillus***. 2016. Tese de Doutorado (Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade da Paraíba, 2016.

GUINEA, J. Global trends in *Candida* species distribution. **Clinical Microbiology and Infection**, v.20, suppl.6, p. 5–10, 2014.

GUZMÁN-RINCON, J. (Eds). Biomonitoring and Biomarkers as indicators of 11 Environmental Change: a Handbook. **New York: Plenum Press**, pp. 169-181.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v. 11, n. 3, p. 137-147, 2000.

HASAN, Fahmi et al. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. **Microbes and infection**, v. 11, n. 8-9, p. 753-761, 2009.

HOOG, G. S., GUARRO, J., GENÉ, J., AHMED, S., AL-HATMI, A. M. S., FIGUERAS, M. J., & VITALE, R. G. (2019). **Atlas of Clinical Fungi**, 3rd e-edition. Utrecht / Reus.

HUANG, X. Y.; SHAN, Z. J.; ZHAI, H. L.; SU, L.; ZHANG, X. Y. Study on the Anticancer Activity of Coumarin Derivatives by Molecular Modeling. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 78, p. 651-658, 2011.

HUSSAIN, M. I.; QAMAR ABBAS, S.; REIGOSA, M. J. Atividades e Novas Aplicações das Cumarinas Enquanto Metabólitos Secundários. **Planta Daninha**, v. 36, 2018.

Jain, P. K., e Joshi, H. (2012). Coumarin: Chemical and pharmacological profile. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, 2(6), 236–240.

KALKHAMBKAR, R.G. et al. Synthesis and biological activities of novel ethers of quinolinone linked with coumarins. **Chemical Monthly**, v. 142, n. 3, p. 305-315. 2011.

KANZAKI, Nara. Uso de análises histológicas como forma de avaliar formulações de anfotericina B inovadoras. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade de Brasília, 2019.

KARKOWSKA-KULETA, Justyna; RAPALA-KOZIK, Maria; KOZIK, Andrzej. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 2, 2009.

KAUR, P.; KUMAR, M.; SINGH, B.; KUMAR, S.; KAUR, S. Amelioration of oxidative stress induced by oxidative mutagens and COX-2 inhibitory activity of umbelliferone isolated from *Glycyrrhizaglabra L.* **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, p. 120- 126, 2012.

KEELE, Douglas J. et al. Evaluation of amphotericin B and flucytosine in combination against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* using time-kill methodology. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 41, n. 3, p. 121-126, 2001.

KHAN, Mohd Sajjad Ahmad et al. Virulence and pathogenicity of fungal pathogens with special reference to *Candida albicans*. In: **Combating fungal infections**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2010. p. 21-45.

KIBBLER, C. C. The Pro-debate: How can we improve the outcome of invasive fungal infection? The case for combination therapy. **Infection Revista de la asociación Colombiana de Infectología**, Bogotá, v. 16, n. 3, p. 3-10, 2012.

KULETA, J. K.; KOZIK, M. R.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. **Acta Bioch. Pol.**, Warsaw, v. 56, n. 2, p. 211-224, 2009.

KURDELAS, R.R. et al. Antifungal activity of extracts and prenylated coumarins isolated from *Baccharis darwinii* Hook & Arn. (Asteraceae). **Molecules**, v. 15, n. 7, p. 4898-4907. 2010.

LAMUELARAVENTOS, R. M.; EIFLER-LIMA, V. L.; GARCIA, S. C. The Antioxidant Activity of Coumarins and Flavonoids. **Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 318-334, 2013.

LARA, Humberto H. et al. Synergistic antifungal effect of chitosan-stabilized selenium nanoparticles synthesized by pulsed laser ablation in liquids against *Candida albicans* biofilms. **International journal of nanomedicine**, v. 13, p. 2697, 2018.

LEITE, Alexandre Santos; SANTOS, Jânio Sousa. Potencial antimicrobiano de *Allium sativum* L.: uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, p. e108101421699-e108101421699, 2021.

LEONG, Cheryl et al. Antifungal susceptibility testing of *Malassezia* spp. with an optimized colorimetric broth microdilution method. **Journal of clinical microbiology**, v. 55, n. 6, p. 1883-1893, 2017.

LEWIS, R. E. (2011). Current concepts in antifungal pharmacology. **Mayo Clin Proc**, 86 (8), pp. 805-817.

LEWIS, R. E. *et al.* Comparison of Etest, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida species*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 345-351, 2002.

LI, Ting et al. Evaluation of the vaginal microbiome in clinical diagnosis and management of vaginal infectious diseases. **Chinese medical journal**, v. 132, n. 09, p. 1100-1103, 2019.

LIMA, Sandovânio Ferreira de et al. **Constituintes químicos e avaliação das atividades antioxidante, anticolinesterásica e antiinflamatória cutânea de *Coutarea hexandra* (Jacq.) k. Schum.(Rubiaceae)**. 2009. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas, 2009.

LIN, P. et al. Synthesis and Antibacterial Activities of Novel 4-Hydroxy-7-hydroxyand 3-Carboxycoumarin Derivatives. **Molecules**, v. 7, p. 10846-10863, 2012.

LIN, P. et al. Synthesis and Antibacterial Activities of Novel 4-Hydroxy-7-hydroxyand 3-Carboxycoumarin Derivatives. **Molecules**, v. 7, p. 10846-10863, 2012.

LOHSE, M. B. et al. Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 19, 2018.

Lorian, V., 2005. Antibiotics in Laboratory Medicine, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins.

MACÊDO, D.P.D. et al. Infecções oportunistas por leveduras e perfil enzimático dos agentes etiológicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42(2), p.188-191, 2009.

MARCONDES, H. C. et al. Antifungal Activity of Coumarin Mammeisin Isolated from Species of the Kielmeyera Genus (Family: Clusiaceae or Guttiferae). **Journal of Chemistry**, v. 2015, 4 páginas, 2015.

MARMITT, Diorge Jônatas et al. As plantas medicinais da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) com potencial antifúngico. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde/Brazilian Journal of Health Research**, v. 17, n. 3, p. 151-162, 2015.

MARÓDI, László et al. Molecular mechanisms of mucocutaneous immunity against *Candida* and *Staphylococcus* species. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [s. l.], v. 130, n. 5, p. 1019–1027, 2012.

MARTIN, Erlon Ferreira et al. **Síntese de 4-aril-4h-cromenos e aril-pirano-cumarinas e avaliação da citotoxicidade e atividade antiprotzoária**. 2018. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2018.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, José A. et al. The immune response against *Candida* spp. and *Sporothrix schenckii*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, n. 1, p. 62-66, 2014.

MARTINS, Alessandra Suriani et al. Atividade do *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão), *Nicotiana tabacum* (Folha de Fumo) e *Achillea millefolium* L. (Mil-Folhas) como inibidor farmacológico natural contra *Candida albicans*. **Ciência ET Praxis**, v. 12, n. 24, p. 07-12, 2019.

MARTINS, Edna Alves et al. Onicomicose: estudo clínico, epidemiológico e micológico no município de São José do Rio Preto. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 596-598, 2007.

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

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.

MELO, Ana Patrícia Vieira de. **Fatores de virulência de *Candida* spp. obtidas de hemoculturas de pacientes com candidemia atendidos em hospitais terciários do**

Nordeste do Brasil. 2016. 150f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

MENDES, Larissa Morgana dos Santos. Obtenção de forma farmacêutica sólida para tratamento da candidíase sistêmica a base de *Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae). 2019.

MENEZES, Ralciane de Paula et al. **Candidíase invasiva em neonatos críticos: etiologia, patogenia e perfil molecular.** 2018. Tese de Doutorado (Pós Graduação em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Uberlândia, 2018.

MENEZES, Talita Gomes Calaça. **Avaliação in vitro da atividade anti-mrsa de vancomicina encapsulada em lipossomas e do sinergismo com ácido úsnico e β -lapachona.** 2014. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, 2014.

MENGHINI, L. et al. Antiinflammatory activity of coumarins from *Ligusticum lucidum* Mill. subsp. cuneifolium (Guss.) Tammara (Apiaceae). **Phytotherapy Research.** v. 24, n. 11, p. 1697-1699. 2010.

MERCURI, M. F.; RUFF, C. T.; ANTMAN, E. M.; BRAUNWALD, E.; GIUGLIANO, R. P. Pacientes convalvulopatías tratados com edoxabán o warfarina em elensayo ENGAGE AFTIMI 48. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 69, n. 11, p. 1372-1382, 2017. **Microbiology**, Washington, v. 50, n. 8, p. 2748-2754, Ago. 2012.

MODRZEWSKA, Barbara; KURNATOWSKI, Piotr. Selected pathogenic characteristics of fungi from the genus *Candida*. **Annals of Parasitology**, v. 59, n. 2, 2013.

MOHANDAS, V.; BALLAL, M. Distribution of *Candida* species in different clinical samples and their virulence: biofilm formation, proteinase and phospholipase production: a study on hospitalized patients in southern India. **Journal of global infectious diseases**, v. 3, n. 1, p. 4, 2011.

MONK, Brian C.; GOFFEAU, Andre. Outwitting multidrug resistance to antifungals. **Science**, v. 321, n. 5887, p. 367-369, 2008.

MONTAGNER, Cristina et al. **Atividades antifúngica, citotóxica (células tumorais humanas) e hemolítica de cumarinas naturais e semi-sintéticas.** 2007. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Biotecnologia), Universidade de Santa Catarina, 2007.

MONTEIRO, Maria Cândida et al. A new approach to drug discovery: high-throughput screening of microbial natural extracts against *Aspergillus fumigatus* using resazurin. **Journal of biomolecular screening**, v. 17, n. 4, p. 542-549, 2012.

MORACE, Giulia; PERDONI, Federica; BORGHI, Elisa. Antifungal drug resistance in *Candida* species. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 2, n. 4, p. 254-259, 2014.

MOURA, Aniele. **Novo ligante derivado cumarínico e seus complexos metálicos com alguns elementos de transição: sínteses verdes, caracterização e investigação da atividade biológica contra *E. coli* e *S. aureus***. 2019. Dissertação de Mestrado (Pós Graduação em Química) – Universidade Estadual Paulista, 2019.

MUKHERJEE, P. K. *et al.* Combination Treatment of Invasive Fungal Infections. **Clinical Microbiology Reviews**. Washington, v. 18 n. 1, p. 163-194, Jan. 2005.

MULYANINGSIH, S. et al. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8 cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. **International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, Oxford, v. 17, n. 13, p.1061- 1066, Nov. 2010.

MURCIANO, C. et al. Evaluation of the role of *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) proteins in human oral epithelial cell interactions. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33362, 2012.

MURRAY, R. D. H. Naturally occurring plant coumarins. In: **Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**. Springer, Vienna, 1978. p. 199-429.

MUSA, M.A; ZHOU, A.; SADIK, O. A. Synthesis and Antiproliferative Activity of New Coumarin-Based Benzopyranone Derivatives Against Human Tumor Cell Lines. **Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 112-120, 2011.

NABILI M. et al. Substituições de aminoácidos em Erg11p de *Candida glabrata* resistente a azol: Possíveis substituições eficazes e modelagem de homologia. **J Glob Antimicrob Resist.** 2016;5:42-6.

NAGLIK, Julian R.; CHALLACOMBE, Stephen J.; HUBE, Bernhard. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 67, n. 3, p. 400-428, 2003.

NAVES, Plínio Lázaro Faleiro et al. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, n. 2, p. 229-233, 2013.

NETO, Humberto de Carvalho Aragão et al. Avaliação da citotoxicidade do ácido 3-cumarino carboxílico em eritrócitos humanos. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 7, p. e31711729965-e31711729965, 2022.

Nota Técnica GVIMS/GGTES/ANVISA Nº 11/2020. Orientações para identificação, prevenção e controle de infecções por *Candida auris* em serviços de saúde.

O'KANE, Callum J.; WEILD, Rachel; M HYLAND, Edel. Chromatin structure and drug resistance in *Candida* spp. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 121, 2020.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in microbiology**, [S. l.], v. 11, n. 6, p. 272-279. Jun. 2003.

OLIVEIRA JUNIOR, L. F. G. et al. Efeito fungitóxico do óleo essencial de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* RADDI) sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, p. 150-157, 2013.

OLIVEIRA, Erwelly Barros de. **Avaliação das atividades biológicas de compostos fenólicos: naturais (cumarina) e derivados comerciais (3-hidroxycumarina e 4-hidroxycumarina)**. 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

OLIVEIRA, Juliana Pantoja et al. **Validação, atividade antifúngica e avaliação sinérgica de nitroestirenos *in vitro***. 2014. Dissertação de Mestrado (Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Pará.

OLMEDO, D.; SANCHO, R.; BEDOYA, L. M.; LÓPEZ-PÉREZ, J. L.; DEL OMO, E.; MUÑOZ, E.; ALCAMÍ J.; GUPTA, M. P.; SAN FELICIANO, A. 3 phenylcoumarins as inhibitors of HIV-1 replication. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 9245-9257, 2012.

- OSTROSKY-ZEICHNER, L. Combination antifungal therapy: a critical review of the evidence. **Clinical Microbiology and Infection**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 65-70, Mai. 2008.
- PALUMBO, C. F. G.; GARDIN, N. E.; NAKAMURA, M. U. Erytrina mulungu Mart.ExBenth e Erytrina velutina Willd. – Aspectos farmacológicos e perspectiva antropológica de plantas brasileiras. **Arte Médica Ampliada**, São Paulo, v.36, n.4, 2016.
- PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, p. e47, 2016.
- PANDEY, N.; GUPTA, M. K.; TILAK, R. Extracellular hydrolytic enzyme activities of the different *Candida* spp. isolated from the blood of the Intensive Care Unit-admitted patients. **Journal of laboratory physicians**, v. 10, n. 4, p. 392, 2018.
- PAPPAS, Peter G. et al. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1-20, 2018.
- PARAMYTHIOTOU, E. et al. Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 1085-1119, 2014.
- PARRA, Leidy Yurani Cárdenas; CARDENAS, Jorge Henrique Perez. Mecanismos de resistência ao fluconazol expressos por *Candida glabrata*: uma situação a considerar na terapêutica. **Pesquisa em Enfermagem: Imagem e Desenvolvimento**, v. 22, 2020.
- PATIL, S. A.; PRABHAKARA, C. T.; HALASANGI, B. M.; TORAGALMATH, S. S.; BADAMI, P. S. DNA cleavage, antibacterial, antifungal and anthelmintic studies of Co (II), Ni (II) and Cu (II) complexes of coumarin Schiff bases: Synthesis and spectral approach. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular Biomolecular Spectroscopy**, v. 137, p. 641–651, 2015.
- PEIXOTO, J. V. et al. CANDIDÍASE - UMA REVISÃO DE LITERATURA. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 8, p. 75–82, 2014.
- PEREIRA, A. P. B. et al. Avaliação do Efeito Inibitório de *Anadenanthera falcata* (Angico) sobre *Candida albicans* através da capacidade inibitória mínima e danos morfológicos/mitocôndria. **CIPEEX**, p. 2636-2639, 2018.
- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4: p. 146-152, 2012.

PEREIRA, Rafael et al. Atividade antifúngica, sinergismo e citotoxicidade do extrato etanólico da casca de *Myroxylon peruiferum* Lf. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 16, n. 1, 2018.

Petrul'ová-Poracká, V., Repčák, M., Vilková, M., e Imrich, J. (2013). Coumarins of *Matricaria chamomilla* L.: Aglycones and glycosides. **Food Chemistry**, 141(1), 54– 59.

PFALLER MA. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **Am Journal Med.** 125, S3-S13, 2012.

PFALLER MA. et al. Frequência de diminuição da suscetibilidade e resistência às equinocandinas entre isolados de *Candida glabrata* resistentes ao fluconazol. **J Clin Microbiol.** 2012;50(4):1199-203.

PFALLER MA. Resistência aos medicamentos antifúngicos: mecanismos, epidemiologia e consequências para o tratamento. **Am J Med.** 2012;125(1 Supl):S3-13

PFALLER, M. A. et al. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004–2008. **PloS one**, v. 9, n. 7, p. e101510, 2014.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 237-243, 2001

PIGATTO, Gabriela; LOVISON, Otávio Von Ameln; CATTANI, Fernanda. Prevalência de infecções fúngicas em um laboratório de análises clínicas da cidade de Veranópolis, Rio Grande do Sul. **Rev. bras. anal. clin.**, p. 202-207, 2019.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

PLAS, Rosana van der. **Candidíase oral: Manifestações clínicas e tratamento.** 2016. Dissertação de Mestrado – Universidade Fernando Pessoa, 2016.

PORMAN, A. M. et al. MTL-independent phenotypic switching in *Candida tropicalis* and a dual role for Wor1 in regulating switching and filamentation. **PLoS genetics**, v. 9, n. 3, p. e1003369, 2013.

- PRASAD, Rajendra; SHAH, Abdul Haseeb; RAWAL, Manpreet Kaur. Antifungals: mechanism of action and drug resistance. **Yeast Membrane Transport**, p. 327-349, 2016.
- PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 792-798, 2019.
- REHMAN, S. et al. Synthesis, characterization, in vitro antimicrobial, and U2OS tumoricidal activities of different coumarin derivatives. **Chemistry Central Journal**, v. 7, p. 68-80, 2013
- REHMAN, S.U. et al. In-vitro antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of some coumarins and their metal complexes. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. v. 40, n. 4, p. 333-340. 2005.
- REMPEL, Claudete et al. Efeito antimicrobiano de plantas medicinais: uma revisão de estudos científicos. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 10, n. 4, p. 57-82, 2019.
- RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.
- ROCHA, FAG da et al. The Therapeutic use of flora in world history. 2015.
- RODRIGUES, C.F., RODRIGUES, M.E., SILVA, S., HENRIQUES, M. *Candida glabrata* biofilms: how far have we come? **Journal of Fungi**, v. 3, p. e11, 2017.
- RODRÍGUEZ-CERDEIRA, Carmen et al. Pathogenesis and clinical relevance of *Candida* biofilms in vulvovaginal candidiasis. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 544480, 2020.
- ROJAS-MORALES, T. et al. Características clínicas y microscópicas de *Candida albicans* en pacientes con diabetes tipo 1. **MedULA**, v. 22, n. 1, p. 6-11, 2013
- RÖRIG, K.C.O; COLACITE, J.; ABEGG, M. A. Produção de fatores de virulência in vitro por espécies patogênicas do gênero *Candida*. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 225-7, 2009.

ROSA, Caroline da; CÂMARA, Sheila Gonçalves; BÉRIA, Jorge Umberto. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciência & saúde coletiva**, v. 16, n. 1, p. 311-318, 2011.

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, A. C. A. et al. Potencial antioxidante de antocianinas em fontes. **Revista Interdisciplinar**, v. 7, n. 3, p. 149-156, 2014.

SANTOS, Rafaela Pulquério Simões. **Colonizações e infecções por *Candida* spp. em situações multifatoriais**. Dissertação de Mestrado – Universidade Beira Interior. 2020.

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

SASHIDHARA, K. V.; KUMAR, A.; CHATTERJEE, M.; RAO, K. B.; SINGH, S.; VERMA, A. K.; PALIT, G.; BIOOR, G. Discovery and synthesis of novel 3-phenylcoumarinderivatives as antidepressant agents. **Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 1937-1941, 2011.

SCHLOTTFELDT, Fábio dos Santos et al. Prevenção da nefrotoxicidade da anfotericina B por meio do uso de fitomedicamentos. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 49, p. 74-79, 2015

SEGATO, Fernando. **Expressão gênica envolvida nos mecanismos de resistência a acriflavina, griseofulvina e terbinafina em fungos filamentosos**. 2008. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, 2008.

SEGATORE, B.; BELLIO, P.; SETACCI, D.; BRISDELLI, F.; PIOVANO, M.; GARBARINO, J.A.; NICOLETTI, M.; AMICOSANTE, G.; PERILLI, M.; CELENZA, G. In vitro interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillinresistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates determined by FICI and ΔE model methods. **Phytomedicine**, v. 19, p. 341– 347, 2012.

SHIELDS, R.K.; NGUYEN, M.H.; PRESS, E.G., et al. Abdominal candidiasis is a hidden reservoir of echinocandin resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2014;58:7601–5.

SIDDIQUI, Zeba N. et al. Synthesis of 4-Hydroxycoumarin Heteroarylhybrids as Potential Antimicrobial Agents. **Archiv der Pharmazie**, v. 344, n. 6, p. 394-401, 2011.

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

SILVA, Bruno Cerqueira et al. **Predição *in silico* e avaliação da atividade antinociceptiva de cumarinas e saponinas obtidas de plantas do semiárido em modelo de artrite induzida por zimosan**. 2019. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, 2019.

SILVA, C. R.; BORGES, F. F.; BERNARDES, A.; PEREZ, C. N.; SILVA, D. M.; CHEN- 12 CHEN, L. Genotoxic, Cytotoxic, antigenotoxic, and Anticytotoxic Effects of Sulfonamide Chalcone Using the Ames Test and the Mouse Bone Marrow Micronucleus Test. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, e0137063, 2015.

SILVA, D. R. et al. A CANDIDIASE NA BIBLIOGRAFIA: UM PANORAMA SINTÉTICO. **Revista Multidisciplinar Do Nordeste Mineiro**, v. 1, n. 1, p. 1-16, 2014.

SILVA, Raquel M. et al. Critical roles for a genetic code alteration in the evolution of the genus *Candida*. **The EMBO journal**, v. 26, n. 21, p. 4555-4565, 2007.

SILVA, S. et al. *Candida* species biofilms' antifungal resistance. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 8, 2017.

SILVA, Simone Lara de Omena. **Efeito anticâncer de derivados sintéticos da cumarina**. 2020. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas, 2020.

SILVEIRA, Elizama Shirley. **Desenvolvimento, avaliação da atividade leishmanicida e toxicológica de nanossistema de cumarina (1, 2-benzopirona)**. 2021. Tese de Doutorado (Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Ceará, 2020.

SIMÕES, CLÁUDIA MARIA OLIVEIRA et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. **6ª Ed. Santa Catarina: Editora UFSC**, 2010. 1104 páginas.

SINGULANI, J. L.; PEDROSO, R. S.; RIBEIRO, A. B.; NICOLELLA, H. D.; FREITAS, K. S.; DAMASCENO, J. L.; VIEIRA, T. M.; CROTTI, A. E.; TAVARES, D. C.; MARTINS, C. H.; MENDES-GIANNINI, M. J.; PIRES, R.H. Geraniol and linalol

anticandidal activity, genotoxic potential and embryotoxic effect on zebrafish. **Future Microbiology**, v. 13, p. 1637-1646, 2018.

SLAPŠYTĖ, G., DEDONYTĖ, V., LAZUTKA, J. R., MIERAUSKIENĖ, J., MORKŪNAS, V., KAZERNAVIČIŪTĖ, R., PUKALSKAS, A. AND VENSKUTONIS, P. R. (2013) Evaluation of the biological activity of naturally occurring 5,8-dihydroxycoumarin. **Molecules**, 4, 4413–4436.

SMYTH, T.; RAMACHANDRAN, V.N.; SMYTH, W.F. A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 33, n. 5, p. 421-426. 2009.

SOLIMAN, S. S. M. et al. Assessment of herbal drugs for promising anti-*Candida* activity. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2017.

SOLÓRZANO, Alexandro; OLIVEIRA, Rogério Ribeiro de; GUEDES-BRUNI, Rejan Rodrigues. Geografia, história e ecologia: criando pontes para a interpretação da paisagem. **Ambiente & Sociedade**, v. 12, n. 1, p. 49-66, 2009.

SOUZA, Simone Machado de et al. **Atividade antibacteriana de cumarinas naturais e derivados**. 2005. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

SPAMPINATO, Claudia; LEONARDI, Darío. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

SPONCHIADO, Graziela et al. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 178, p. 289-296, 2016.

Sproll, C., Ruge, W., Andlauer, C., Godelmann, R., e Lachenmeier, D. W. (2008). HPLC analysis and safety assessment of coumarin in foods. **Food Chemistry**, 109(2), 462–469.

STAAB, Janet F. et al. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. **Science**, v. 283, n. 5407, p. 1535-1538, 1999.

STANCHEV S, et al. Investigation of the antioxidant properties of some new 4-Hydroxycoumarin derivatives. **Eur J Med Chem**. 2009;44(7):3077-82.

STEIN, A.C. et al. Antifungal activity of some coumarins obtained from species of *Pterocaulon* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 107, n. 1, p. 95-98. 2006.

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

SUN, W. Q. et al. Effect of apple polyphenol on oxidative stability of sliced cooked cured beef and pork hams during chilled storage. **Journal of Muscle Foods**, v. 21, n. 4, p. 722-737, 2010.

SUZUKI, Luis Claudio. **Desenvolvimento de biofilme formado por *Candida albicans* in vitro para estudo da terapia fotodinâmica**. 2009. 48f. Tese de Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear - Matérias) - Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

TAIZ, Lincoln et al. **Plant physiology and development**. Sinauer Associates Incorporated, 2015.

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

TAVARES, A. H.; BÜRCEL, P. H.; BOCCA, A. L. Turning up the heat: inflammasome activation by fungal pathogens. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 7, p. e1004948, 2015.

TAVARES. S. J. S. **Efeitos anti-inflamatório e antirreabsortivo ósseo da cumarina e da umbeliferona na periodontite via inibição de IL-1 β em camundongos**. 2021. Dissertação de Mestrado em Odontologia - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

TEIXEIRA-SANTOS, R. et al. Novel Method for Evaluating *In Vitro* Activity of Anidulafungin in Combination with Amphotericin B or Azoles, **Journal of Clinical**

TELLAPRAGADA, C. et al. Antifungal susceptibility patterns, in vitro production of virulence factors, and evaluation of diagnostic modalities for the speciation of pathogenic *Candida* from blood stream infections and vulvovaginal candidiasis. **Journal of pathogens**, v. 2014, 2014.

THAISRIVONGS, S., et al (1996). Structure-Based Design of HIV Protease Inhibitors: 5,6-Dihydro-4-hydroxy-2-pyrones as Effective, Nonpeptidic Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, 39(23), 4630–4642.

THATI, Bhumika et al. Mechanism of action of coumarin and silver (I)–coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*. **Toxicology in vitro**, v. 21, n. 5, p. 801-808, 2007.

THOMPSON, Delma S.; CARLISLE, Patricia L.; KADOSH, David. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 9, p. 1173-1182, 2011.

VARANO, N. et al. Infecções por *Candida* spp em pacientes imunodeprimidos. **Journal of Infection Control**, v. 8, n. 1, p. 17-23, 2019.

VAZQUEZ, J. A. Combination Antifungal Therapy for Mold Infections: Much Ado about Nothing? **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 46, n.12, 2008.

VENUGOPALA, K. N. et al. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. **Biomed Research International**, v. 2013, 14 páginas, 2013.

VIEIRA, Ana Júlia Hoffmann; SANTOS, J. I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **RBAC**, v. 49, n. 3, p. 235-9, 2017.

WANG, Xiaojuan et al. The first isolate of *Candida auris* in China: clinical and biological aspects. **Emerging microbes & infections**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2018.

WHIBLEY, Natasha; GAFFEN, Sarah L. Beyond *Candida albicans*: mechanisms of immunity to non-albicans *Candida* species. **Cytokine**, v. 76, n. 1, p. 42-52, 2015.

WIDODO, G.P. et al. Mechanism of action of coumarin against *C. albicans* by SEM /TEM analysis. **ITB Journal of Math and Fundamental Sciences**. v. 44, n. 2, p. 145-151, 2012.

WITAICENIS, A.; SEITO, L. N.; DA SILVEIRA CHAGAS, A.; DE ALMEIDA, L. D. J.; LUCHINI, A. C.; RODRIGUES-ORSI, P.; CESTARI, S. H.; DI STASI, L. C. Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects os plant-derived coumarin derivatives. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3, p. 240-246, 2014.

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

YAN, Z. et al. Potent Antifungal Activity of Pure Compounds from Traditional Chinese Medicine Extracts against Six Oral *Candida* Species and the Synergy with Fluconazole against Azole-Resistant *Candida albicans*. **Hindawi Publishing Corporation**, Cairo, p. 6, 2012.

YASARAWAN N, THIPYAPONG K, RUANGPORNVISUTI V. Exploring molecular structures, orbital interactions, intramolecular proton-transfer reaction kinetics, electronic transitions and complexation of 3-hydroxycoumarin species using DFT methods. **J Mol Graph Model**. 2014;51:13-26.

YUE, Huizhen et al. Filamentation in *Candida auris*, an emerging fungal pathogen of humans: passage through the mammalian body induces a heritable phenotypic switch. **Emerging microbes & infections**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2018.

ZAVRSNIK D, MURATOVIĆ S, SPIRTOVIĆ S, SOFTIĆ D, MEDIĆ-SARIĆ M. The synthesis and antimicrobial activity of some 4-hydroxycoumarin derivatives. **Bosn J Basic Med Sci**. 2008 Aug;8(3):277-81.