



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

ANTONIO CARLOS VITAL JÚNIOR

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME DA FRAÇÃO Ag2
DO EXTRATO DE *Agelas dispar* FRENTE ESPÉCIES DE *Candida*

NATAL – RN

2020

ANTONIO CARLOS VITAL JÚNIOR

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME DA FRAÇÃO Ag2
DO EXTRATO DE *Agelas dispar* FRENTE ESPÉCIES DE *Candida***

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): Prof^ª Dr^ª Vânia Sousa Andrade

NATAL – RN

2020

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

Vital Júnior, Antonio Carlos.

Atividade antifúngica e antibiofilme da fração Ag2 do extrato de Agelas dispar frente espécies de Candida / Antonio Carlos Vital Júnior. - Natal, 2020.

113 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária.

Orientadora: Profa. Dra. Vânia Sousa Andrade.

1. Candidíase - Dissertação. 2. Leveduras - Dissertação. 3. Produtos naturais - Dissertação. 4. Alcaloides - Dissertação. 5. Microscopia Eletrônica de Varredura - Dissertação. I. Andrade, Vânia Sousa. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 616.934

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me guiar, iluminar, abençoar e me dar tranquilidade para enfrentar todos os desafios vivenciados durante esse mestrado. Agradeço a Ele também, por manter a calma em um coração ansioso e permitir seguir com meus objetivos.

Aos meus pais (Antonio Carlos e Neide Martins), meu irmão (Neto), minha vó (Dona Nina), meu primo e tia (Paulo e Lucineide Martins), que sempre me motivaram, apoiaram e nunca me deixaram desistir. Apesar das perdas, dores, doenças, conflitos, dentre outros... sem eles e sem a base familiar a mim depositada, eu não seria capaz de concluir essa etapa em minha vida. Os meus sinceros agradecimentos e um eu te amo para cada um!

Agradeço também a todos meus amigos que caminharam comigo durante toda minha vida, em especial, as minhas amigas, Karol Cardozo e Cibelly Alves, por todo carinho, amor, confiança e forças a mim depositadas.

Agradeço imensamente a minha orientadora de mestrado, Prof^a Dr^a. Vânia Sousa Andrade, por todo ensinamento, sabedoria, tranquilidade, profissionalismo, companheirismo, e acima de tudo, pela confiança a mim depositada. Sem a senhora, eu não conseguiria. Um exemplo de pessoa, na qual levarei para sempre em meu coração e na minha vida.

Aos meus amigos e colegas do LEAC (Laboratório de Ensaio Antimicrobianos e Citotoxicidade), em especial para Camila, Monalisa, Rayra e Thales, meu muitíssimo obrigado pela amizade, companheirismo e experiências passadas. Vocês são pessoas incríveis e admiráveis! Juntamente a eles, também agradeço aos meus colegas de turma do mestrado (Francilene, Ana Beatriz, Jorge, Nathan, Henrique e Wilo), a outras pessoas que também me acompanharam (Fábio e Francisco) nessa jornada, pelos incentivos, lutas diárias e momentos de descontrações.

Em especial, agradeço à Daniele de Figuerêdo Silva, que além de ter sido uma inspiração na carreira acadêmica, foi minha orientadora e professora na especialização, amiga, dentre outras... só a senhora sabe o quão árduo batalhei para estar aqui, para ter essa oportunidade, e essa conquista também é sua. Agradeço grandemente por toda sabedoria a mim passada, por ser uma pessoa de braços abertos a todo tempo, por me acalmar em tempestades acadêmicas, é isto. Muito Obrigado!

Aos meus vizinhos (Lucyanne, Aurélio e Leidiane), por serem os mais amigos, companheiros, confidentes e psicólogos de todos os tempos. Meus mais sinceros agradecimentos por todos os momentos felizes vividos na cidade de Natal - RN, na vida e nessa minha fase.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária, aos professores do curso de mestrado, aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, ao Centro de

Biociências, à Universidade Federal do Rio Grande do Norte e à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), que proporcionaram o aperfeiçoamento profissional na Pós-graduação.

A Janaina Priscila Barbosa, pela disponibilização, atenção e colaboração com os experimentos deste trabalho.

A Marcela de Castro Nogueira Diniz Pontes e Prof^a Dr^a Renata Mendonça Araújo pela parceria e a disponibilização do material usado nesta pesquisa.

Aos professores da banca de qualificação, Prof^a Dr^a. Maria Celeste Nunes de Melo e a Prof^a Dr^a. Katia Castanho Scortecchi pelas correções com o trabalho e os ensinamentos passados.

Aos professores da banca de defesa, Prof^a Dr^a Maria Aparecida de Resende Stoianoff e ao Prof Dr. José Veríssimo Fernandes pelas adequações e correções finais realizadas no trabalho, bem como as sugestões para o engradecimento do estudo.

As demais pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta neste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Os biofilmes microbianos constituem-se especialmente de uma barreira estrutural que dificulta a terapêutica antimicrobiana, possuindo um papel relevante nas enfermidades humanas. Para as leveduras do gênero *Candida*, os biofilmes caracterizam-se como um arranjo tridimensional complexo, constituídos por diferentes formas celulares incorporadas a uma matriz de substância polimérica extracelular. Nas últimas décadas se tornou crescente a busca por compostos naturais para o tratamento de infecções microbianas com o intuito de obter novas alternativas frente aos mecanismos de resistência aos antimicrobianos, incluindo aqueles induzidos por biofilmes. A esponja marinha, *Agelas dispar* (Família Agelasidae) vem sendo mencionada como uma fonte bioativa, em virtude dos seus metabólitos secundários, os derivados alcaloides, que apresentam atividade farmacológica significativa. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi determinar a atividade antifúngica e antibiofilme da fração Ag2 do extrato metanólico de *A. dispar* sobre cepas de leveduras do gênero *Candida* produtoras de biofilme. A atividade biológica de Ag2 foi averiguada em 13 espécies de *Candida*, avaliando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela técnica de microdiluição em caldo e pelo método da Concentração Fungicida Mínima (CFM). A quantificação da formação do biofilme e atividade antibiofilme do extrato foi realizada com o cristal violeta e mensurada as densidades ópticas obtidas. Foi encontrada atividade antifúngica para 13 cepas, com CIM variando entre 2,5 mg/mL e 0,1562 mg/mL e CFM apresentou valores oscilando de 5,0 mg/mL a 0,3125 mg/mL frente espécies de *Candida*. Os resultados da formação do biofilme indicaram que todas as estirpes foram produtoras de biofilme, sendo 10 (77%) cepas fracas produtoras e 3 (23%) moderadas produtoras. Sendo, 10 (77%) cepas fracas produtoras e 3 (23%) moderadas produtoras. As espécies *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* foram utilizadas no teste da atividade antibiofilme (em formação e maduro), resultando em inibição da viabilidade celular (IC_{50%}) variando entre 49,6% a 57,6%, 70,5% a 76,3% (biofilme em formação) e 42,8% a 67,2%, 63,3% a 78,8% (biofilme maduro) quando as referidas cepas foram pós-tratadas, respectivamente, com as concentrações de 1,25 mg/mL e 2,5 mg/mL da fração Ag2. A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), permitiu a visualização da atividade antibiofilme, diminuição quantitativa da comunidade microbiana, alteração estrutural e destruição a nível celular tanto no biofilme em formação quanto no maduro. Concluiu-se que a fração Ag2 do extrato metanólico de *A. dispar* apresentou atividade antifúngica e natureza do tipo fungicida, reduzindo a carga microbiana, além de mostrar eficiência em induzir modificações na morfologia estrutural das leveduras envolvidas no biofilme, conforme observados no MEV. Os resultados sugerem que, a Ag2 atua a nível de membrana plasmática e/ou parede celular das leveduras e pode ser uma estratégia terapêutica antifúngica e antibiofilme promissora frente as diferentes espécies de *Candida*.

Palavras-chave: Candidíase. Leveduras. Produtos naturais. Alcaloides. Microscopia Eletrônica de Varredura.

ABSTRACT

Microbial biofilms are especially a structural barrier that hinders antimicrobial therapy, having a relevant role in human diseases. For yeasts of the genus *Candida*, biofilms are characterized as a complex three-dimensional arrangement, consisting of different cellular forms incorporated into a matrix of extracellular polymeric substance. In the last decades, the search for natural compounds for the treatment of microbial infections has grown in order to obtain new alternatives to the mechanisms of resistance to antimicrobials, including those induced by biofilms. The marine sponge, *Agelas dispar* (Family Agelasidae) has been mentioned as a bioactive source, due to its secondary metabolites, the alkaloid derivatives, which have significant pharmacological activity. In this context, the objective of this study was to determine the antifungal and antibiofilm activity of the Ag2 fraction of the *A. dispar* methanolic extract on biofilm-producing strains of the genus *Candida*. The biological activity of Ag2 was investigated in 13 species of *Candida*, evaluating the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by the broth microdilution technique and by the Minimum Fungicide Concentration (CFM) method. The quantification of the biofilm formation and antibiofilm activity of the extract was performed with the violet crystal and the obtained optical densities were measured. Antifungal activity was found for 13 strains, with MIC ranging between 2.5 mg/mL and 0.1562 mg/mL and CFM values ranging from 5.0 mg/mL to 0.3125 mg/mL against *Candida* species. The results of biofilm formation indicated that all strains were biofilm producers, with 10 (77%) weak producing strains and 3 (23%) moderate producing strains. 10 (77%) weak producing strains and 3 (23%) moderate producing strains. The species *C. krusei*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis* were used to test the antibiofilm activity (in formation and mature), resulting in inhibition of cell viability (IC₅₀) ranging from 49.6% to 57.6%, 70, 5% to 76.3% (biofilm in formation) and 42.8% to 67.2%, 63.3% to 78.8% (mature biofilm) when these strains were post-treated, respectively, with the concentrations of 1.25 mg/mL and 2.5 mg/mL of the Ag2 fraction. The Scanning Electron Microscopy (SEM), allowed the visualization of the antibiofilm activity, quantitative decrease of the microbial community, structural alteration and destruction at the cellular level in both the forming and mature biofilms. It was concluded that the Ag2 fraction of *A. dispar* methanolic extract showed antifungal activity and fungicide-like nature, reducing the microbial load, in addition to showing efficiency in inducing changes in the structural morphology of the yeasts involved in the biofilm, as observed in the SEM. The results suggest that Ag2 acts at the level of the plasma membrane and/or yeast cell wall and can be a promising antifungal and antibiofilm therapeutic strategy against the different species of *Candida*.

Keywords: Candidiasis. Yeasts. Natural products. Alkaloids. Scanning Electron Microscopy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Transições de tipo de célula de <i>Candida albicans</i>	28
Figura 2. Formação de biofilmes de <i>Candida albicans</i>	31
Figura 3. Foto da espécie <i>Agelas dispar</i>	42
Figura 4. Estrutura química dos compostos isolados de esponjas marinhas do gênero <i>Agelas</i>	43
Figura 5. Representação das diluições da fração Ag2 do extrato metanólico de <i>A. dispar</i> para a determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM.....	52
Figura 6. Representação do ensaio para avaliação de natureza bioativa da substância pelo método da Concentração Fungicida Mínima – CFM.....	53
Figura 7. Caracterização dos compostos presentes em Ag2 com base nas fragmentações disponíveis nos espectros HPLC/MS e MS/MS de cada pico do cromatograma.....	58
Figura 8. Substâncias identificadas por HPLC-MS-MS, modo negativo, a partir da fração acetato da partição do extrato metanólico de <i>A. dispar</i> – Ag2.....	59
Figura 9. Formação de biofilmes das espécies de <i>Candida</i>	62
Figura 10. Inibição da viabilidade celular (%) do biofilme em formação pós-tratados com a fração Ag2 do extrato de <i>Agelas dispar</i>	64
Figura 11. Inibição da viabilidade celular (%) do biofilme formado (maduro) pós-tratados com a fração Ag2 do extrato de <i>Agelas dispar</i>	65
Figura 12. Micrografias MEV mostrando células do biofilme em formação de <i>C. krusei</i> (ATCC 6258) exposto a fração Ag2 do extrato de <i>A. dispar</i>	67
Figura 13. Micrografias MEV mostrando células do biofilme em formação de <i>C. glabrata</i> (ATCC 2001) exposto a fração Ag2 do extrato de <i>A. dispar</i>	68
Figura 14. Micrografias MEV mostrando células do biofilme em formação de <i>C. parapsilosis</i> (amostra 50) exposto a fração Ag2 do extrato de <i>A. dispar</i>	69
Figura 15. Micrografias MEV mostrando células do biofilme maduro de <i>C. krusei</i> (ATCC 6258) exposto a fração Ag2 do extrato de <i>A. dispar</i>	71

Figura 16. Micrografias MEV mostrando células do biofilme maduro de *C. glabrata* (ATCC 2001) exposto a fração Ag2 do extrato de *A. dispar*.....72

Figura 17. Micrografias MEV mostrando células do biofilme maduro de de *C. parapsilosis* (amostra 50) exposto a fração Ag2 do extrato de *A. dispar*.....73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados da avaliação da CIM (mg/mL) e da CFM (mg/mL) da fração Ag2 sobre espécies de <i>Candida</i>	60
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Cepas de *Candida* identificadas por sequenciamento e dispostas no GenBank.....50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5FC: 5-Fluorocitosina

ALS: “Agglutinin-like sequence” / Sequência Semelhante à Aglutinina

AMB: Anfotericina B

ASD: Ágar Sabouraud Dextrose

ATCC: “American Type Culture Collection” / Coleção de Cultura Americana

BCR 1: “Biofilm and Cell wall Regulator” / Regulador de Biofilme e Parede celular

CDR: “Candida Drug Resistance” / Resistência às drogas por Candida

CFM: Concentração Fungicida Mínima

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLSI: “Clinical and Laboratory Standards Institute”/Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais

CO₂: Gás carbônico

Cph1: “Transcriptional regulator involved in morphogenesis” / Regulador transcricional envolvido na morfogênese

CSD: Caldo Sabouraud Dextrose

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DO: Densidade óptica

ECE1: “Extent of cell elongation protein” / Extensão da proteína de alongamento celular

ECM: “Extracellular matrix” / Matriz extracelular

EDTA: Ácido etileno diaminotetracético

EFG: “Enhanced filamentous growth” / Crescimento filamentosso aprimorado

EPA: “Epithelial Adesin” / Adesina epitelial

ERG: “Ergosterol Biosynthetic Enzymes” / Enzimas Biosintéticas de Ergosterol

FKS: “Glucan synthase” / Glucano sintase

Flb: Fosfolipase tipo B

FLU: Fluconazol

Fps: Fosfolipases

g/L: Grama por litro

g: Grama

h: Hora

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

Hwp1: “Hyphal wall protein 1”/ Proteína de parede de hifa 1

IL-1 β : Interleucina-1 beta

KCl: Cloreto de Sódio

KH₂PO₄: Fosfato de potássio monobásico

M: Molar

MAPK: “Mitogen-activated protein kinase” / Proteína quinase ativada por mitogênio

MDR: “Multidrug Resistance Gene” / Gene de resistências a múltiplas drogas

mg/mL: miligrama por mililitro

MgCl₂: Cloreto de magnésio

min: minuto

mL/L: mililitro por litro

μ g/mL: micrograma por mililitro

μ L: microlitro

μ M: micromolar

mL: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

MNN1: “Putative alpha-1,3-mannosyltransferase” / Alfa-1,3-manosiltransferase putativa

N: Nitrogênio

NaCl: Cloreto de sódio

NGY: “Neopeptone – yeast extract – glucose”

nm: nanômetro

Nº: número

Nrg1: “Transcriptional regulator” / Regulador transcricional

PBS: “Phosphate Buffered Saline” / Salina tamponada com fosfato

PCR: “Polymerase Chain Reaction” / Reação em Cadeia da Polimerase

pH: Potencial hidrogeniônico

Rfg1: “Repressor of filamentous growth” / Repressor do crescimento filamentosos

RNA: Ácido ribonucléico

rpm: Rotações por minuto

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

s: segundos

SAPs: Aspartil proteinases secretadas

SDD: Susceptibilidade dose – dependente

SISGEN: Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

spp.: Espécies

T.A.: Temperatura ambiente

TEC1: “Transcription activator” / Ativador de transcrição

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

Tup1: “Transcriptional repressor” / Repressor transcricional

UFC: Unidade formadora de colônia

UFRN: Universidade Federal do Rio Grande do Norte

UME6: “Transcriptional regulatory protein” / Proteína reguladora da transcrição

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

Wor1: “White-opaque regulator” / Regulador branco-opaco

YNB: Yeast Nitrogen Base

YPD: Yeast Peptone Dextrose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 GÊNERO <i>Candida</i> E CANDIDÍASE.....	19
2.2 FATORES DE VIRULÊNCIA ASSOCIADOS A <i>Candida</i> spp.....	23
2.2.1 Competência de aderência em <i>Candida</i> spp.....	24
2.2.2 Morfogênese.....	25
2.2.3 Capacidade de formação de biofilmes em <i>Candida</i> spp.....	28
2.2.4 Secreção de enzimas hidrolíticas.....	33
2.3 TERAPÊUTICA ANTIFÚNGICA.....	35
2.4 RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA.....	38
2.5 PESQUISA DE NOVOS COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS.....	39
2.6 <i>Agelas díspar</i>	41
3. JUSTIFICATIVA.....	45
4. OBJETIVOS	47
4.1 OBJETIVO GERAL	47
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
5.1 TIPO DE PESQUISA.....	48
5.2 ENSAIOS DE TEOR QUÍMICO.....	48
5.2.1 Coleta, Processamento e Caracterização química da amostra Ag2.....	48
5.3 ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	49
5.3.1 Meios de Cultura.....	49
5.3.2 Cepas fúngicas e Preparação do Inóculo.....	50
5.3.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM.....	51
5.3.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima – CFM.....	52
5.3.5 Formação do Biofilme.....	53
5.3.6 Quantificação do biofilme.....	54
5.3.7 Avaliação da atividade antibiofilme da subfração Ag2 sobre a formação do biofilme de <i>Candida</i> spp.....	55
5.3.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	56
5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57

6. RESULTADOS	58
7. DISCUSSÃO.....	74
8. CONCLUSÃO.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

1. INTRODUÇÃO

As leveduras do gênero *Candida* vêm se destacando pelo crescente número de infecções em seres humanos, relatadas principalmente durante as últimas décadas (SILVA et al., 2012). De forma intrínseca, essas leveduras frequentemente encontram-se associadas a infecções em indivíduos com deficiência imunológica, ocasionando micoses oportunistas denominadas de candidíases. As formas mais comuns de micoses causadas por espécies de *Candida*, são a candidíase vulvovaginal (CVV), candidíase oral e a candidíase invasiva, sendo esta última responsável por uma taxa de 40% de mortalidade em pacientes hospitalizados, mesmo após a implantação de terapia antifúngica (HOLANDA et al., 2007; GARCIA-SOLACHE; CASADEVALL, 2010; KULLBERG; ARENDRUP, 2015).

As espécies de *Candida*, assim como outros fungos, desenvolveram mecanismos de virulência que conferem ao microrganismo a capacidade de sobreviver, aumentar a patogênese, bem como a manutenção do quadro infeccioso no hospedeiro humano. Além disso, têm apresentado mecanismos de resistência à maioria dos antifúngicos empregados frequentemente na terapia convencional. A resistência mais comum descrita para *Candida albicans* e outras espécies não-*albicans*, como *Candida glabrata*, é a capacidade de superexpressar bombas de efluxo, permitindo minimizar intrinsecamente a suscetibilidade aos compostos farmacológicos presentes nas drogas antifúngicos (THAKUR et al., 2008; MEZIANE-CHERIF; COURVALIN, 2014).

Dentre os fatores de virulência, ressalta-se a capacidade que os fungos leveduriformes apresentam para a produção de biofilme, que conseqüentemente contribui para esses microrganismos permanecerem em um ambiente propício ao seu desenvolvimento (ALVES et al., 2016). Os biofilmes das espécies de *Candida* decorrem da capacidade de proliferação e adesão das leveduras, com produção de pseudo-hifas e hifas em superfície biótica ou abiótica envolvidas por uma matriz extrapolimérica. De acordo com Figueira et al. (2017) os biofilmes fúngicos estão, predominantemente, relacionados com a ocorrência de infecções crônicas associadas ao uso de biomateriais, como cateteres e próteses. Nesses locais, o biofilme, é composto por um aglomerado de microrganismos, permitindo que os mesmos possam trocar informações genéticas, genes de resistência, favorecendo o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos e diminuindo as respostas imunológicas do hospedeiro (BRAGA et al., 2015; ZENG et al., 2017).

Tendo em vista o perfil de resistência aos antifúngicos, o maior desafio para o controle eficiente das infecções fúngicas, é a abrangência das pesquisas farmacológicas em busca de novos compostos, que sejam potencialmente fortes candidatos para o possível uso terapêutico, aumentando o arsenal de drogas com ação antifúngica disponíveis. O número atual de antifúngicos

disponíveis no mercado ainda é reduzido e bastante limitado para o tratamento das candidíases, especialmente, as infecções sistêmicas causadas por leveduras multirresistentes, como no caso das espécies do gênero *Candida* (KIRAZ; YASEMIN, 2011; KHAN et al., 2012).

Neste contexto, devido a diversidade química e bioatividade, os produtos naturais, vegetais ou marinhos mostram-se promissores como fontes alternativas para driblar as questões relacionadas à resistência fúngica aos medicamentos e a diminuição da toxicidade (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; SILVA, 2016). Estudos prévios mostram que ambientes marinhos são pouco explorados em comparação com outros ambientes, ou seja, a diversidade de organismos presentes no ecossistema marinho, poderá fornecer uma variedade de compostos determinando um novo caminho em busca por fármacos antimicrobianos (BLUNT et al., 2013; ZANINI; SOUZA; MARTINS, 2014; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015). Desta maneira, animais unicamente aquáticos como esponjas marinhas presentes na maioria dos habitats bentônicos apresentam uma biodiversidade de metabólitos secundários que podem atuar como antimicrobianos, sobretudo contra fungos de interesse médico (MEHBUB et al., 2014).

As esponjas da família Agelasidae, são abundantemente distribuídas em todo ecossistema marinho, totalizando 19 espécies já descritas na literatura, incluindo a *Agelas dispar*, que apresenta uma diversidade de metabólitos secundários bioativos, como os alcalóides pirrólicos (BICKMEYER et al., 2004; ZHANG et al., 2017). Pesquisas que retratam isoladamente a atividade biológica das espécies de *Agelas* ainda são escassas, porém essas esponjas já despertam interesse da comunidade científica, uma vez que produzem muitos compostos bioativos. Foram reportadas as ações de anti-incrustação biológica, antiviral, antiprotozoário como antimalárico, anticoagulante, anti-histamínico, anticancerígeno bem como o perfil anti-inflamatório (BRECKLE; POLBORN; LINDEL, 2003; SCALA et al., 2010; CHOI et al., 2018). Alguns estudos também já evidenciaram a atividade antimicrobiana das substâncias bioativas encontradas nas espécies de *Agelas*, como exemplo, o extrato de *A. nakamurai* que demonstrou ação inibitória para a bactéria *Staphylococcus epidermidis* (HERTIANI et al., 2010) e compostos puros da mesma espécie apresentaram atividade antifúngica para *Candida albicans* (CHU et al., 2017).

Nesse contexto atual e a possibilidade de elucidar informações que possam contribuir com a valorização e aplicabilidade dos organismos marinhos para obtenção de compostos antifúngicos, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica e antibiofilme da fração Ag2 do extrato metanólico obtido da esponja marinha, *Agelas dispar*, frente espécies do gênero *Candida* formadoras de biofilme.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 GÊNERO *Candida* E CANDIDÍASE

As espécies de *Candida* se encontram amplamente distribuídos em diversos ambientes, desde o solo, ambientes aquáticos, plantas, animais e materiais abióticos. No total o gênero é composto de 200 espécies já relatadas na literatura, descritas taxonomicamente por pertencerem ao Reino *Fungi*, sub-reino *Dikarya*, filo *Ascomycota*, classe *Saccharomycetes*, Ordem *Saccharomycetales* e gênero *Candida* (DIEZMANN et al., 2004; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010). São fungos leveduriformes e unicelulares, que assimilam carboidratos, proteínas para captação de carbono e outros nutrientes para a sua sobrevivência. Caracterizados por apresentarem perfil oportunista, além de participantes da microbiota normal, mantendo uma relação de comensalismo com os indivíduos humanos saudáveis (SIDRIM; ROCHA, 2004).

As leveduras do gênero *Candida* são seres eucariotos que apresentam estruturas arredondadas ou ovais (blastoconídios), medindo cerca de 2 a 6 μm , e apresentam reprodução por brotamento. Duas fases sexuais são encontradas nesse gênero, predominantemente a fase assexuada ou anamorfa, responsável pela formação dos blastoconídios por meio do brotamento parenteral, e a fase sexuada ou telomorfa (menos frequente) por esporos sexuais (ascósporos) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; KASHEM et al., 2015).

Apesar da relação de comensalismo com o hospedeiro humano, as leveduras do gênero *Candida* podem facilmente infectar pacientes com fatores de riscos predispostos a uma sobreposição de colonização em pacientes imunocomprometidos. Alterações do estado nutricional, variações de pH, temperatura e nos níveis de oxigênio, a utilização de antibióticos, entre outros fatores, favorecem ao desenvolvimento de patologias (POULAIN, 2013; SARDI et al., 2013; LOHSE et al., 2018).

De acordo com NG et al. (2015) cerca de 20 espécies de interesse médico estão associadas às infecções em humanos. Dentre as principais espécies comumente isoladas, temos a *C. albicans*, *C. tropicalis*, complexo *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, complexo *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis* e *C. lusitaniae*. Porém, outras espécies emergentes como, *Candida viswanathii*, *Candida inconspicua*, *Candida fermentati*, *Candida famata*, *Candida haemulonii*, *Candida ciferrii*, *Candida lipolytica*, *Candida auris*, dentre outras podem também ser agentes causadores de infecções humanas (LÓPEZ- MARTÍNEZ, 2010; CÓRDOBA et al., 2011; EMARA et al., 2015; RAMOS; BRANQUINHA; SANTOS, 2017).

Mundialmente as infecções fúngicas estão associadas a uma taxa de 1,5 milhões de mortes por ano (BONGOMIN et al., 2017). As infecções ocasionadas por espécies de *Candida* apresentam riscos eminentes a saúde pública, onde são classificadas como uma das principais causas de mortalidade e morbidade em todo mundo, sendo responsável por cerca de 15% do quadro de sepse hospitalar (PFALLER et al., 2014; MATTHAIYOU; CHRISTODOULOPOULOU; DIMOPOULOS, 2015; NOBILE; JOHNSON, 2015; PAPPAS et al., 2016).

A candidíase é o processo patogênico causado pelas leveduras do gênero *Candida*, nas quais as espécies de *Candida* causam vaginite, candidíase oral, candidíase cutânea, candidemia e infecções sistêmicas; de acordo com intensidade da disseminação da levedura, podendo ocorrer manifestações clínicas de forma isolada ou em conjunto (WÄCHTLER et al., 2012; PEIXOTO et al., 2014).

A *Candida albicans* apresenta-se como o patógeno mais envolvido em diversas infecções fúngicas superficiais e profundas, devido ao seu alto grau de plasticidade (PARAMYTHIOTOU et al., 2014). Desta maneira, essa flexibilidade morfológica está diretamente relacionada com sua patogenicidade. Entretanto, apesar da *C. albicans* ser a mais isolada, estudos recentes relatam que ao decorrer dos anos pode-se perceber um aumento na incidência relacionada com as candidíases ocasionadas pelas espécies de *Candida* não-*albicans*, das quais epidemiologicamente apresentam de 14 a 21% para *C. glabrata*, 15 a 23% para *C. parapsilosis*, 20 a 45% para *C. tropicalis*, 2,7% para *C. krusei* e 0,6 a 3,7% para *C. guilliermondii* (SAVINI et al., 2011; PFALLER; JONES; CASTANHEIRA, 2014; RODRIGUES; SILVA; HENRIQUES, 2014).

A candidíase cutânea, como as onicomicoses ocasionadas por espécies de *Candida* são frequentemente relatadas com terapia longa pelos pacientes acometidos; caracterizada por ser uma infecção da matriz ungueal, de leito ou até mesmo da placa (FENG et al., 2015; QADIR et al., 2019). Globalmente apresenta uma prevalência de 2 a 13% de acometimento em qualquer faixa etária (COLEMAN; FLECKMAN; HUANG, 2014).

Outro quadro patológico das espécies de *Candida* é a candidíase oral, condição infecciosa da região bucal, que envolve as leveduras do gênero *Candida* e são relacionadas as principais manifestações do perfil oportunista das leveduras. Geralmente, esta doença manifesta-se com lesões leves da mucosa da membrana oral, contudo pode ser resistente ao tratamento e até transformar-se em recorrente ou reincidente, sendo a espécie *C. albicans* envolvida em 95% dos casos de ocorrência da infecção (QUINDÓS et al., 2019).

Para um processo infeccioso se instalar na cavidade oral, é necessário alguns fatores predisponentes do hospedeiro, como o uso da antibioticoterapia de amplo espectro, xerostomia, disfunção imunológica, prótese ou prótese removível e em sua maioria os pacientes portadores do

Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), que apresentam 90% de ocorrência da patologia fúngica (OWOTADE; PATEL, 2014; SHARMA, 2019).

Em um trabalho realizado no Brasil na cidade de Natal e no Paraná, com pacientes HIV positivos transplantados renais, que apresentaram lesões bucais sugestivas da ocorrência de *Candida*, os autores relataram que *C. albicans* foi a espécie mais prevalente em ambos locais estudados, seguido de *C. tropicalis* (DA SILVA ROCHA et al., 2014). Ainda reportaram um dado bastante relevante, que foi o isolamento de múltiplas espécies em um único paciente, sendo essas, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Curiosamente, Ribeiro e colaboradores (2015), elaboraram um estudo em Belém do Pará, Brasil, com pacientes HIV positivos que não apresentavam lesões bucais aparentemente, sem características de candidíase oral e com o uso da alta atividade da terapia antiviral. Os achados indicam que *C. albicans* foi predominante (32,52%), seguida de *C. tropicalis* (4,88%), *C. parapsilosis* (2,85%), *C. dubliniensis* (0,81%) e *C. famata* (0,81%). Deste modo, é possível que as leveduras do gênero *Candida* poderão servir como marcador para a verificação da imunossupressão e/ou agravamento da doença, sendo que para os indivíduos em uso da terapia antiviral a colonização desses microrganismos é controlada e assim não apresentando lesões orais.

Já a candidíase vulvovaginal (CVV) é a segunda maior e mais comum causa de vaginose perdendo apenas para a vaginite bacteriana, correspondendo a uma taxa de 75% em mulheres em idade reprodutiva (BITEW; ABEBAW, 2018). Atualmente a ocorrência da patologia é avaliada em torno de 138 milhões de mulheres, na qual estima-se que ao longo de toda vida desenvolvam cerca de 492 milhões de vezes da doença (SOBEL, 2016; DENNING et al., 2018).

Esse quadro infeccioso caracteriza-se por acometimento dos órgãos femininos gerando lesões que podem se expandir e atingir regiões como, áreas perianal e inguinal (SILVA, D. et al., 2014). As pacientes acometidas com a candidíase vulvovaginal apresentam sinais e sintomas característicos, como o prurido vulvar intenso, ardência, corrimento vaginal (leucorreia), dispareunia, disúria, edema, eritema vulvovaginal e fissuras vulvovaginais (FELIX; DE BRITO RÖDER, 2019). Dentre as principais leveduras relacionadas com o quadro da doença, estima-se que a *Candida albicans* corresponde a 85% a 90% dos casos confirmados para CVV, seguida das outras espécies *C. tropicalis* (8%) , *C. krusei*, complexo *C. parapsilosis* (5.9%) e *C. glabrata* (14.3%) (FEUERSCHUETTE et al., 2010; FULE et al., 2015; LOPEZ, 2015; ZAHEDI et al., 2016).

A candidemia ou candidíase invasiva, é a forma mais comum do quadro infeccioso ocasionado pela disseminação das leveduras do gênero *Candida*, na qual estima-se que estão relacionadas com 80% dos casos da enfermidade em todo mundo (PEIXOTO et al., 2014). Dados

recentes demonstram que, as infecções fúngicas invasivas representam cerca de 250.000 casos e mais de 50.000 mortes por ano, sendo as espécies de *Candida* classificadas entre os três ou quatro dos agentes etiológicos responsáveis por infecções da corrente sanguínea (KULLBERG; ARENDRUP, 2015; MCCARTY; PAPPAS, 2016).

A candidemia é a infecção responsável por 10 a 40% dos casos associados a sepse ou choque séptico e quando comparados com infecções bacterianas, as leveduras do gênero *Candida* são responsáveis por cerca de 5% do número total de casos notificados (GUERY et al., 2009). Esse número pode estar relacionado com a dificuldade encontrada por diversos laboratórios hospitalares para o isolamento e identificação de fungos patogênicos associados a sepse ou ao choque séptico.

Dentre as principais espécies relacionadas com o quadro de candidíase invasiva humana, destaca-se a *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, complexo *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Evidencia-se a *C. albicans* por sua capacidade de filamentar, ou seja, a troca de morfotipo, porém mesmo sem a capacidade de plasticidade morfológica a *C. glabrata* é uma importante causa emergente de candidemia, considerada a segunda maior causa de infecções sanguíneas em alguns países da Ásia, Europa e nos Estados Unidos, associada muitas vezes ao transplante de órgãos (SILVA et al., 2012; GUINEA, 2014).

Magill et al. (2014) relataram que para os Estados Unidos da América (EUA) 22% das infecções sanguíneas anuais são causadas por espécies de *Candida*. Para o Brasil, a candidemia representa alto risco a saúde pública, sendo sua incidência de 2,49 casos por 1.000 internações hospitalares, equiparando-se a uma taxa de 2 ou 15 vezes maior que diversos países, incluindo os EUA, França, Suíça e Hungria (NAKAMURA; CALDEIRA; AVILA, 2013).

Para a América latina incluindo o território brasileiro, alguns autores descrevem que a *C. albicans* é o primeiro patógeno fúngico isolado relacionado com as infecções sanguíneas seguida pelo complexo *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, podendo atribuir 80% dos casos de candidemia por essas espécies de leveduras (ORTEGA et al., 2011; COLOMBO et al., 2013; NUCCI et al., 2013; DING et al., 2015). Curiosamente, em um estudo brasileiro, os autores descrevem a espécie *C. krusei* na ocorrência de três casos de candidíase invasiva humana em neonatos (AMARAL-LOPES; MOURA, 2012). Porém, para Guinéa (2014), a *C. krusei* está principalmente associada a pacientes com faixas etárias avançadas, portadores de patologias hematológicas e/ou sujeitos a transplante de medula óssea. Assim, pode-se estabelecer que a elucidação de espécies não-*albicans* envolvidas nas candidemias ainda não está totalmente esclarecida.

A transmissão da candidemia está relacionado com o meio endógeno, ou seja, as condições do hospedeiro/alvo. Desta forma, fatores como, imunossupressão em pacientes portadores de

HIV/AIDS, quimioterapia, cirurgia gastrointestinal ou perfuração, uso de cateteres venosos centrais e/ou próteses, transplante de órgãos, hemodiálise, nutrição parenteral e cateteres venosos centrais, contribuem para invasão e colonização fúngica (MIKULSKA et al., 2012; TERÇAS et al., 2017).

Além disso, o uso prolongado de antibióticos de espectro estendido, permitem o aumento da colonização de espécies de *Candida* no intestino, facilitando sua disseminação para os demais órgãos. Esse fato, pode ser explicado pela competição natural dos microrganismos ali presentes. As bactérias residentes que funcionavam como “anti-*Candida*” impedindo a proliferação exacerbada da levedura, perdem essa capacidade quando expostas a longo prazo aos antimicrobianos e assim surge a vantagem das espécies de *Candida* sobre as bactérias residentes da microbiota normal (FAN et al., 2015; KULLBERG; ARENDRUP, 2015; MCCARTY; PAPPAS, 2016).

2.2 FATORES DE VIRULÊNCIA ASSOCIADOS A *Candida* spp.

Clinicamente, os fatores de riscos ligados as condições variadas dos pacientes são predominantes e utilizadas para a maioria das avaliações patológicas ocasionadas por qualquer microrganismo, porém as condições intrínsecas do patógeno deverá ser levado em consideração. A patogenicidade do agente infeccioso é definida como a capacidade de causar a infecção e/ou através das mediações pelos múltiplos fatores de virulência. A expressão de fatores de virulência colabora para ocasionar a doença, bem como o estabelecimento do quadro infeccioso. Para as espécies de *Candida*, a expressão de fatores de virulência pode variar de espécie para espécie, do sítio da infecção, a resposta do hospedeiro, do tipo de infecção e por fim a procedência da cepa, sendo esses fatores contribuintes para a adaptação ao hospedeiro humano (DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014; SHARMA et al., 2019).

Os fatores de virulência na infecção por espécies de *Candida* e no agravamento da patologia são: a plasticidade morfológica (morfogênese), ou seja uma célula leveduriforme se transformar em filamentosa, troca fenotípica conhecida como “*switching*”, a expressão de adesinas (adesão à superfície celular) e invasinas na superfície celular, secreção de enzimas hidrolíticas extracelulares (ex. fosfolipases, hemolisinas e proteinases), a formação de biofilmes e sensoriamento de contato (tigmotropismo) contribuem para a patogênese das candidíases (MAYER; WILSON; HUBE, 2013; SARDI et al., 2013).

2.2.1 Competência de aderência em *Candida* spp.

A capacidade do microrganismo para causar a doença é dependente de diversas condições, dentre elas, os fatores ligados ao próprio agente etiológico, estabelecendo a conexão entre o processo infeccioso e a sobrevivência do patógeno no hospedeiro. O primeiro contato da célula fúngica com o hospedeiro humano ou o meio ambiente, acontece através da parede celular da levedura, constituída basicamente por β -glucano, mananas, galactomananas e quitina, que também é responsável pela morfologia do microrganismo (COSTA, 2009). Dentro das particularidades de virulência das espécies de *Candida*, destaca-se a adesão, primeiro estágio de contato com a superfície das células e tecidos do hospedeiro alvo é considerada como fator determinante para a patogênese no homem.

A aderência das leveduras do gênero *Candida* é mediada por proteínas e polissacarídeos encontrados principalmente na parede celular do fungo. Essas adesinas como a família ALS (Sequência Semelhante à Aglutinina), especificamente a ALS3, SSA1 (integrante da família da proteína de choque 70 - Hsp 70), EPAP (membro da família de genes de adesina epitelial) e HWP1 (“*Hyphal wall protein 1*”) (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; MAYER; WILSON; HUBE, 2013; MELO, 2016). Adicionalmente, outra adesina fúngica como a proteína glicosilfosfatidilinositol (GPI) possui um papel determinante, sendo responsável pela interação com as células do hospedeiro com a própria microbiota residente e também com superfícies abióticas (GROOT et al., 2013).

Dentre as proteínas da família ALS, a proteína mais importante na adesão é ALS3 que está envolvida no processo infeccioso e encontra-se positivamente regulada, durante a patogênese, sendo responsável pela competência das leveduras de ligar com as caderinas (glicoproteínas de adesão) das células do hospedeiro, induzindo a endocitose do patógeno (MURCIANO et al., 2012). A expressão genica dos fatores determinantes para célula fúngica aderir a superfície celular do hospedeiro, irá depender da predisposição de cada espécie.

Segundo Hoyer e colaboradores (2008) as proteínas ALS são bem descritas em *C. albicans*, onde incluem cerca de oito genes encarregado de codificar glicoproteínas de superfície celular. Em contrapartida, para o complexo *C. parapsilosis* pouco se tem conhecimento a respeito das proteínas ALS, porém algumas espécies como *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis* possuem propriedades de aderência comparáveis, mas *C. metapsilosis* é descrita como a espécie com a menor capacidade adesiva do complexo (BERTINI et al., 2013). Desta forma, o grau de aderência é dependente do tropismo tissular, do hospedeiro, da composição da parede celular e das proteínas

presentes, e por fim das superfícies abióticas, como por exemplo, o perfil hidrofóbico (WILLIAMS et al., 2013).

Na mesma linha de raciocínio, Modrzewska e Kurnatowski (2015) descrevem que para *C. albicans* os genes ALS1, ALS3 e ALS5 são os mais frequentemente isolados, responsáveis pela capacidade de aderência desta espécie em diversos substratos; por outro lado, em *C. glabrata* as principais adesinas encontradas são da família EPA (EPA1, EPA6 e EPA7) da qual a proteína codificada é semelhante as proteínas ALS vistas em *C. albicans*.

Em alguns estudos, os autores relatam que as maiores capacidades de adesão em epitélios como, o da mucosa oral, é predominantemente encontrado as espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. Porém o mesmo não é identificado para *C. glabrata*, tendo em vista as menores expressões gênicas de adesinas em comparação com as demais espécies (LIMA NETO et al., 2009; CHAVES et al., 2013; O'DONNELL, 2015). Ressalta-se que, a *C. tropicalis* é o segundo patógeno mais envolvido nas infecções do gênero, onde alguns estudos mostram que esse agente infeccioso quando comparado com outras espécies não-*albicans* como, a *C. krusei* e *C. guilliermondii*, possui maior eficiência na adesão de células epiteliais, demonstrando um alto potencial virulento e infeccioso, quando comparado com *C. albicans* (DA COSTA et al., 2012). Assim, o maior potencial de adesão visto na espécie de *C. albicans* provavelmente pode ser explicado, por ser o patógeno envolvido em diversas infecções fúngicas nas mais variadas formas, isolado e identificado rotineiramente nos laboratórios clínicos e hospitalares.

Desta maneira, a capacidade de adesão está associada a ocorrência das patologias causadas por *Candida* spp. facilitando a proliferação e disseminação do microrganismo, colaborando com o desenvolvimento da levedura, de uma matriz extrapolimérica, intitulada, de biofilme, consequentemente proporcionando resistência aos antifúngicos convencionas prescritos (AULER et al., 2010; EL KIRAT CHATEL et al., 2015).

2.2.2 Morfogênese

A flexibilidade morfológica (levedura-hifa), denominada “branco a opaco” é um processo caracterizado por transições celulares complexas, sendo considerado o mais importante fator de virulência observado em *C. albicans* e que está ausente em *C. glabrata* (BISWAS; VAN DIJCK; DATTA, 2007; TSCHERNER; SCHWARZMÜLLER; KUCHLER, 2011).

O *switching* é a transição celular da fase leveduriforme para uma célula alongada e opaca, relatada como um dos principais mecanismos de virulência apresentados na espécie de *C. albicans*, além de corroborarem com a formação do biofilme fúngico (MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

Essa alteração da célula “branca” para uma “opaca” ocorre por meio de alterações epigenéticas, sem alterar a sequência primária do DNA genômico. Adicionalmente, para a ocorrência da troca é necessário um regulador mestre, como a proteína de ligação ao DNA, a WOR1 (*White-opaque regulator 1*), cuja expressão estimula a transição para célula opaca e bloquear o tipo celular branco (HERNDAY et al., 2016). Complementarmente, o gás carbônico (CO₂) e o pH também auxiliam na regulação da transição da célula branca a opaca; em algumas condições como, níveis elevados CO₂ e um pH ácido contribuem para a formação do fenótipo opaco (SUN et al., 2015; ZHENG et al., 2017).

Em *C. albicans* é observado a capacidade da transição de levedura, pseudo-hifa e hifa verdadeira, fator este determinante para a patogênese de algumas infecções como, candidíase oral, candidíase vulvovaginal e candidemia (DESAI, 2018). Para as espécies não-*albicans* como *C. tropicalis* e *C. dubliniensis* também são observados o mesmo processo de plasticidade (MARTINS et al., 2007; PORMAN et al., 2013). Recentemente, foi visto que deleção do gene da chaperona *HSP90*, resultou no desenvolvimento da forma filamentosa por *C. auris*, um agente que representa grande risco a saúde pública, tendo em vista a sua resistência aos antifúngicos convencionais (KIM et al., 2019).

Por conseguinte, a formação da hifa acontece como uma protuberância do tubo germinativo da célula filha em intermédio com uma célula mãe, formando ramificações divididas por septos em unidades fúngicas separadas (O'DONNELL; ROBERTSON; RAMAGE, 2015). Para as pseudo-hifas a formação também pode se dar por meio do brotamento, porém sem conseguir se distender da célula original, podendo formar hifas verdadeiras. Condições estas, que depende da imersão do seu crescimento em meio rico e a uma temperatura base de 30°C. A presença da hifa colabora com a invasão, colonização profunda no tecido alvo, aumenta as condições para a formação de outro fator de virulência, o biofilme, bem como funciona como escape dos macrófagos do hospedeiro humano (SUDBERY, 2011).

Desta maneira, a plasticidade fenotípica representa um mecanismo de defesa contra o hospedeiro humano, responsável por aumentar a disseminação e agravamento do quadro patológico (BARDEBO; SGARBI, 2010; MAYER; WILSON; HUBE, 2013). Outro papel da presença da hifa, é a secreção de candidalisina, um produto da clivagem da proteína ECE1 (*Extent of cell elongation protein 1*), mediada pelo gene *Ece1*; toxina responsável por causar dano as células epiteliais, além de estimular a sinalização entre as células do hospedeiro (MOYES et al., 2016). Assim, a possibilidade de formação do morfotipo hifálico está ligado as condições patogênicas e oportunistas da espécie, enquanto a forma de levedura está relacionada com a

resistência; sendo está última encontrada em diversos sítios anatômicos humanos de forma comensal como, no intestino e vagina (CASSONE, 2015; SAILER; COLLI; REGIDOR, 2019).

Para ocorrer a transição para a fase filamentosa, necessita-se da expressão de alguns genes responsáveis pela morfogênese, por meio de sinalizações e fatores de transcrição. Deste modo, a expressão genética específica para a formação da hifa, pode ser regulada negativamente, através do co-repressor (inibe a expressão de genes) transcricional TUP1 (“*Transcriptional repressor*”) em associação com NRG1 (“*Transcriptional regulator*”) ou regulador equivalente ao ROX1p do crescimento hifálico (“*Repressor of filamentous growth 1*”, RFG1). Por outro lado, a regulação positiva acontece por intermédio da expressão de genes que codificam componentes de superfície celular como, proteína de parede de hifa (HWP1), ALS3 (Sequência Semelhante à Aglutinina), proteases aspárticas secretadas (SAP4, SAP5 e SAP6), além de proteínas associadas a hifa, como EFG1 (“*Enhanced filamentous growth 1*”) e CPH1 (“*Transcription factor*”) (SUDBERY, 2011; MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

Os genes pertencentes à família SAP, contribuem para colonização e infecção, onde são expressos em diversas fases da patogênese no homem, desempenhando um fator crítico e determinante na invasão tecidual do hospedeiro (ARDEHALI et al., 2019). HWP1 e ALS estão envolvidos no fenômeno da adesão fúngica, mais também na invasão tecidual, proporcionando maiores danos a superfície celular acometida, além de estarem relacionados em todo processo de formação do biofilme (INCI et al., 2013). Sendo assim, para esses genes de plasticidade serem expressos e seus múltiplos moderadores transcricionais, exigem um controle transcricional que muitas vezes pode ser feito por UME6 (“*Transcriptional regulatory protein*”, UME6), um regulador específico para fase filamentosa (MENDELSON et al., 2017).

Partindo do contexto anterior, fenômeno como o tigmotropismo também é observado na morfogênese. Alguns autores como, Brand et al. (2008) relatam que a ocorrência da fase filamentosa por meio do tigmotropismo, apresenta como um intensificador do processo de invasão, facilitando a patogênese e o acometimento de diversos locais do hospedeiro. Desta forma, ocorre por meio da formação de junções epiteliais, levando a internalização celular como defesa da fagocitose atípica, normalmente vista contra os blastoconídios da forma leveduriforme; sendo esta alteração de forma, o resultado da resposta das condições biológicas adversas encontradas no hospedeiro, como pH e temperatura (ÁLVARES; SVLDZLNSKI; CONSOLARO, 2007; DE ROSSI et al., 2011). Outros autores evidenciam que o tigmotropismo é a competência da espécie em expressar genes de formação hifálica e invasão tecidual em locais celulares determinados (COTTIER; MÜHLSCHLEGEL, 2009).

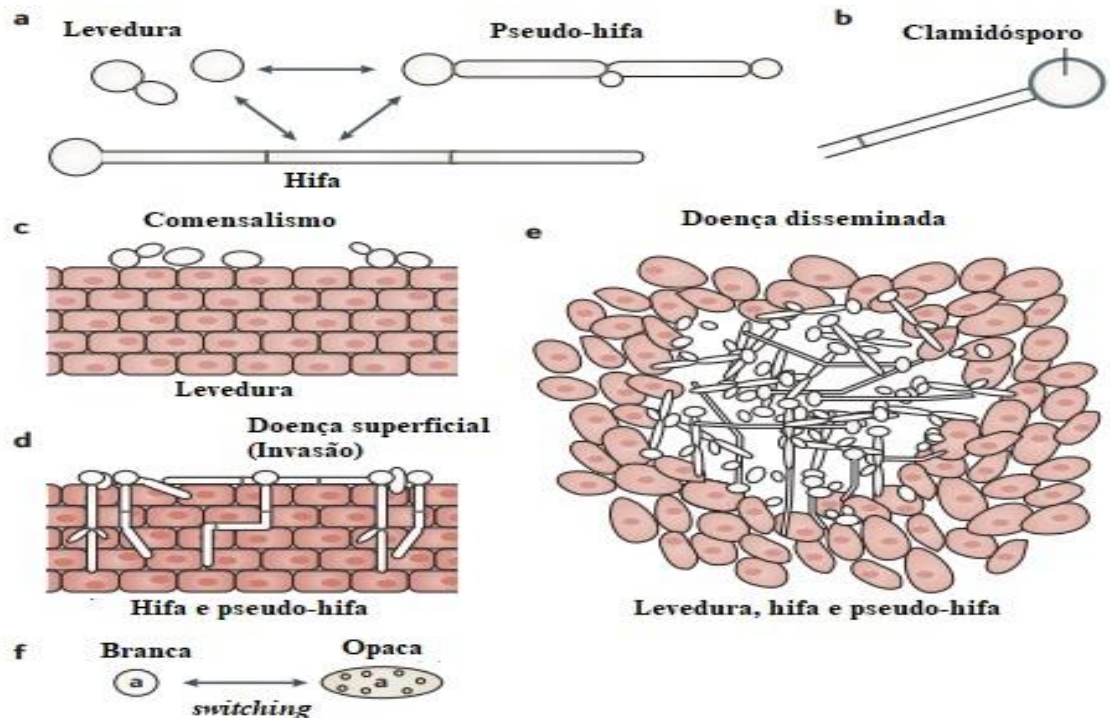


Figura 1. Transições de tipo de célula de *Candida albicans*. (a) Transições de *Candida albicans* reversivelmente entre levedura e tipos de células hifas e pseudo-hifas em condições ambientais diferentes. (b) Os clamidósporos são produzidos pelo terminal (suspensores) de micélios (hifas multicelulares ou pseudo-hifas) sob condições adversas condições de crescimento. (c, d) Nos modelos de infecção mucocutânea, as leveduras estão associadas ao comensalismo (parte c), enquanto as filamentosas as formas (hifas e pseudo-hifas) estão associadas à invasão e dano tecidual (parte d). (e) Leveduras, hifas e pseudo-hifas parecem ter papéis na disseminação doença - por exemplo, em abscessos dentro de órgãos internos do hospedeiro. (f) *switching*, troca de fenótipos brancos para forma opaca. Fonte: Esquema adaptado de NOBLE; GIANETTI; WITCHLEY, 2017.

2.2.3 Capacidade de formação de biofilmes em *Candida* spp.

Os biofilmes são uma condição de crescimento relatados em diversos microrganismos envolvidos em enfermidades humanas. Define-se os biofilmes microbianos, como a capacidade das células livres em agrupar-se e formar a comunidade de células, nas quais estão aderidas fortemente a uma superfície sólida biótica ou abiótica (NOBILE; JOHNSON, 2015).

Para as leveduras do gênero *Candida*, os biofilmes caracterizam-se como um arranjo tridimensional complexo, constituídos por diferentes formas celulares como, leveduriformes, hifas e pseudo-hifas, incorporadas a uma matriz de substância polimérica extracelular protetora autoproduzida. Ela é composta principalmente por polissacarídeos (como: α -manana, β -1,6 glucano e β -1,3 glucano), na qual esta matriz pode ser gerada por uma única espécie ou por diferentes espécies de microrganismos, denominado de biofilme polimicrobiano (TAFF et al.,

2013; MELO, 2016; SILVA et al., 2017; LOHSE et al., 2018). Relata-se que, o acometimento por biofilmes polimicrobianos está acondicionado principalmente a alguns locais como, o trato geniturinário, feridas expostas, pulmão, ouvido interno, mucosa da cavidade oral e biomateriais abióticos (KOLENBRANDER et al., 2010; GABRILSKA et al., 2015).

A formação do biofilme proporciona as células uma estrutura de proteção, persistência e sobrevivência no local colonizado, demonstrando um perfil fenotípico diferente das células planctônicas (células livres). Isso dificulta a terapia antimicrobiana ocasionando frequente resistência do microrganismo aos antifúngicos, além de interferir na defesa imunológica do hospedeiro contra o patógeno (BARBOSA, 2019). Assim, o biofilme fúngico permite que os microrganismos estabeleçam uma proliferação e disseminação de seus agentes para novos locais ou pela ajuda da corrente sanguínea, resultando na doença sanguínea disseminada, tornando-os difíceis de serem eliminados (TIMMERMANS et al., 2018; UPPULURI et al., 2018).

Os biofilmes de *Candida* spp. vêm sendo estudados desde a época de 1990 (COSTA-ORLANDI et al., 2017). Além da importância deste fator de virulência para as leveduras deste gênero, a capacidade de formação do biofilme também é relatada em fungos filamentosos, porém estudos de biofilmes fúngicos filamentosos são ainda escassos, quando comparado com as leveduras (HARDING et al., 2009). Para o referido autor, essa deficiência na identificação da formação da comunidade de células fúngicas em filamentosos está relacionada às definições antigas de biofilmes elencados para as bactérias.

Esta capacidade de formação de biofilmes em fungos filamentosos já foi descrita em alguns estudos, Ramage et al. (2011), encontraram a formação de biofilmes em espécies de *Aspergillus* com significância clínica e industrial. Para Costa-Orlandi e colaboradores (2014), a formação de biofilmes de fungos filamentosos *in vitro* foi vista em espécies de dermatófitos como, *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*. Adicionalmente, também foi identificado biofilmes em isolados clínicos de micose superficiais, onde os autores constataram a formação deste fator de virulência na espécie de *Malassezia pachydermatis* (CANNIZZO et al., 2007).

Atualmente, a presença de biofilmes fúngicos e bacterianos apresentam um alto grau de preocupação e importância para a saúde pública. De acordo com Institutos Nacionais de Saúde, os biofilmes fúngicos estão associados direto ou indiretamente a 80% de todas as enfermidades microbianas, podendo variar de sítio anatômico. Cerca de 75% dos casos está relacionado com infecções por leveduras na mucosa vaginal, infecções de pele e infecções sanguíneas disseminadas com elevados índices de 47% de mortalidade (FOX et al., 2015; GULATI; NOBILE, 2016).

Segundo Dongari-Bagtzoglou (2008), os biofilmes crescidos na mucosa humana apresentam perfis semelhantes aos expressos em superfícies abióticas, como o crescimento séssil,

acesso flexivo aos nutrientes e proteção contra fatores ambientais. Portanto, os processos das superfícies biológicas e abiológicas pode ser entendida de maneira correlata, no qual será capaz de facilitar no combate e eliminação dos microrganismos implicados na formação deste fator de virulência, permitindo a diminuição da resistência antifúngica.

Cada levedura do gênero *Candida* apresenta diferenças morfológicas na confecção do biofilme, ocorrendo a nível estrutural, na matriz polimérica extracelular (biomassa), na competência deste fator de virulência em proporcionar resistência aos antifúngicos, além das grandes variedades na atividade metabólica de cada espécie (SENEVIRATNE; JIN; SAMARANAYAKE, 2008; BRILHANTE et al., 2018). Desta forma, a versatilidade morfológica deste gênero possibilita a confirmação da ameaça do biofilme para a saúde humana, apresentando dificuldades de encontrar uma solução viável para o combate das diversas formas estruturais das espécies de *Candida*, as tornando como seres únicos e de valor hospitalar preocupante.

O desenvolvimento do biofilme das espécies de *Candida* é descrito em fases contínuas, sendo a adsorção das células planctônicas e adesão ao substrato/superfície nas primeiras horas, entre 1 à 3 horas (1); seguido da fase intermediária ou iniciação, relacionado ao desenvolvimento do biofilme 11 à 14 horas (2); fase de maturação (3), a camada referente a matriz da substância polimérica extracelular absorve todas as formas celulares (leveduras, hifas e pseudo-hifas) contidas na estrutura tridimensional, englobando canais de água responsáveis pelo transporte de nutrientes entre as células (20- 48 horas), no final a dispersão (4) das células mais superficiais que deixam o biofilme para colonizar outras áreas em torno da superfície acometida, após 24 horas (CHANDRA et al., 2001; HARDING et al., 2009; SHAPIRO et al., 2011). Na figura 2, encontra-se um esquema da formação do biofilme na espécie de *Candida albicans*, corriqueiramente utilizado para demonstrar o modelo de desenvolvimento do biofilme.

Certas características comuns do biofilme fúngico são encontradas nas principais espécies leveduriformes patogênicas para o homem. Em biofilmes de *C. albicans* é detectado uma camada basal de blastosporos com uma matriz densa abundantemente composta por exopolissacarídeos e hifas. A *C. dubliniensis*, forma aglomerados de célula e matriz extrapolimérica fina; em *C. krusei*, é visto uma multicamada encorpada de biofilme contendo formas de pseudo-hifas anexadas a matriz. Para o complexo *C. parapsilosis* é identificado um biofilme com blastosporos em menor volume, quantidades de carboidratos maiores que as proteínas, apresentando fenotípico variável de acordo com os isolados clínicos. A *C. tropicalis* formam células leveduriformes em quantidade baixas, porém matriz extracelular tem grande volume, também se encontra menores quantidades de proteínas e carboidratos; não menos importante. A *C. glabrata*, produz uma alta concentração de carboidratos e proteínas, não formadoras de hifas, e formam menos biofilme em comparação

com a espécie de *C. albicans* (UPPULURI et al., 2010; TAFF; NETT; ANDES, 2012; TUMBARELLO et al., 2012; PANNANUSORN; FERNANDEZ; RÖMLING, 2013).

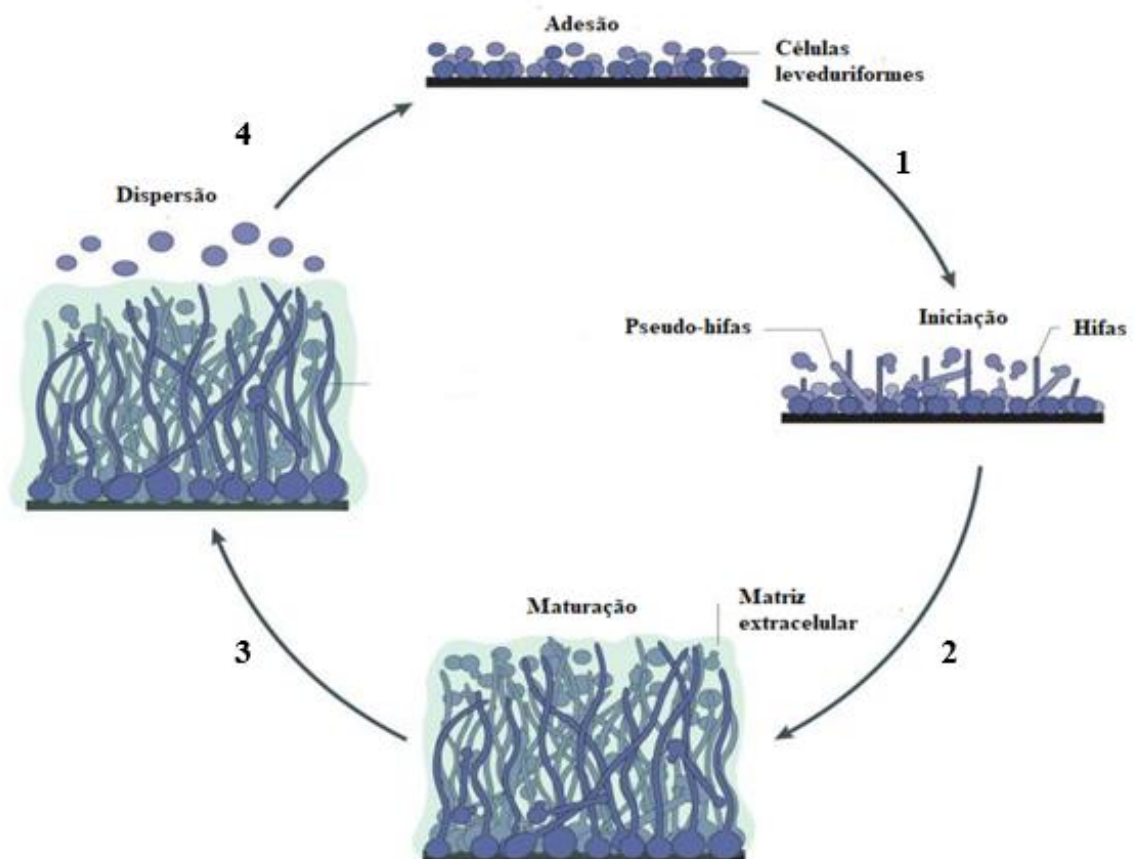


Figura 2. Formação de biofilmes de *Candida albicans*. A aderência de células redondas de levedura a uma superfície (1); iniciação da formação de biofilme, durante a qual as células aderidas à superfície formam uma camada basal que contém células da forma leveduriforme, pseudo-hifas e hifas também conhecidas como estágio de proliferação (2); maturação em um biofilme complexo e estruturado, no qual as células envolvidas na matriz extracelular (3); e dispersão de células da forma de levedura do biofilme para colonizar novos locais (4). Fonte: Esquema adaptado (LOHSE et al., 2018).

O progresso do crescimento do biofilme é monitorado pelo mecanismo de comunicação celular microbiana, o “quórum sensing”, responsável pela dispersão constante e monitoramento de moléculas similares a hormônios auto indutores ou moléculas *quórum sensing*. A intensidade de crescimento dessas moléculas é equivalente ao desenvolvimento da comunidade microbiana, e ao se estabilizar, uma resposta reguladora é acionada. Este reflexo é orientado pela expressão ou contenção da expressão dos genes de *quórum sensing* dependentes (MELO, 2016; BORAL et al., 2018). Duas moléculas estão envolvidas neste evento, o farnesol e o tirosol, sendo este último

associado à inibição da adesão fúngica (MONTEIRO et al., 2015). Assim, essa regulação gênica da comunidade microbiana, proporciona proteção contra o meio externo, estresses químicos e físicos, e cooperação metabólica (RAMAGE et al., 2012).

Em conciliação com a formação do biofilme, outros fatores estão envolvidos na proteção contra a resposta imunológica do hospedeiro e contribuição para a patogenicidade do microrganismo, como, a defesa e modulação do meio. A modulação é o processo implicado nas mudanças de pH, captação de aminoácido e traços de metais, além do mais, no sequestro de compostos de carbono (C) e nitrogênio (N). Para a defesa, as formas celulares produzem proteínas de choque (Hsps) em condições de estresse na qual são expostas (MAYER; WILSON; HUBE, 2013; SILVA, 2016).

Geneticamente, a expressão do biofilme das espécies de *Candida in vitro* é feita pelo fator de transcrição BCR1 (“*biofilm and cell wall regulator*”). Os fatores que desempenham papéis cruciais na formação dos biofilmes são os envolvidos no primeiro estágio, a adesão, assim as adesinas da família ALS, como a ALS3, os componentes da parede celular HWP1, além de outras proteínas da família HWP, como HWP2, RBT1, YWP1 e EAP1 (DING et al., 2011; DE GROOT et al., 2013). Sendo, a adesina HWP1 a primeira proteína exigida no processo de formação de biofilme (MODRZEWSKA & KURNATOWSKI, 2015).

A patogênese do biofilme das espécies de *Candida* está correlacionada com a fase da adesão e colonização dos microrganismos, por isso os estudos procuram identificar os fatores relacionados com a capacidade do agente infeccioso em aderir nas superfícies alvos. Outro dado importante referente a capacidade patogênica do biofilme, é a sua dependência da matriz de uma substância polimérica extracelular, responsável por hidratar o biofilme, manter a integridade da estrutura, defender da fagocitose da células de defesa do hospedeiro e a prevenção da disseminação das drogas antifúngicas para seus sítios de ação (FLEMMING; WINGENDER, 2010; CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018).

Além do BCR1, outros cinco fatores reguladores essenciais da formação normal do biofilme também são encontrados, o EFG1, BRG1 (“*Biofilm regulator*”), NDT80 (“*Transcription fator*”), TEC1 (“*Transcription activator*”) e ROB1; sendo EFG1 e TEC1 envolvidos na plasticidade morfológica, NDT80 na formação do biofilme da maioria das espécies, enquanto BRG1 e ROB1 estão relacionadas estreitamente com *C. albicans* (CHONG et al., 2018). Porém, outros reguladores são encontrados em diferentes situações como, GSC1 e MNN1 (“*Putative alpha-1,3-mannosyltransferase*”) na produção da matriz polimérica extracelular, CDR1 e MDR1 relacionados com resistência aos antifúngicos. UME6, NRG1 e PES1 (também são conhecidos por Nop7) estão ligados à dispersão das células planctônicas (UPPULURI et al., 2010; NOBILE et al.,

2012). Adicionalmente, a chaperona molecular Hsp90, também já foi estudada na dispersão das células livres do biofilme formado em *C. albicans* (SHAPIRO et al., 2009; ROBBINS et al., 2011).

Por conseguinte, ao correlacionar com o perfil epidemiológico da candidíase associada com a formação do biofilme, dados demonstram um aumento nas taxas de mortalidade anualmente apresentando uma percentagem de 50% nos adultos e até 30% nas crianças (NEGRI et al., 2012). Entre as doenças causadas pelas espécies de *Candida*, a candidíase oral é a mais descrita e definida na literatura pela sua relação com a formação do biofilme fúngico. Complementarmente é reconhecida pelos seus biofilmes complexos, nos quais possuem interação com o hospedeiro e as bactérias da microbiota residente (RAUTEMAA; RAMAGE, 2011; O'DONNELL et al., 2015).

2.2.4 Secreção de enzimas hidrolíticas

A produção de enzimas hidrolíticas extracelulares caracteriza-se como um arsenal indispensável para sobrevivência, disseminação e manutenção das leveduras no hospedeiro, proporcionando um aumento da sua patogenicidade. As espécies de *Candida* são responsáveis pela secreção de enzimas hidrolíticas como, esterases, lipases, e as principais, fosfolipases, proteases (proteinases) e hemolisinas (TELLAPRAGADA et al., 2014). Tais enzimas, possuem a capacidade de intensificar outros fatores de virulência, como, a adesão, a invasão tecidual, formação de biofilmes e a própria defesa contra o sistema imunológico do hospedeiro humano (PANDEY; GUPTA; TILAK, 2018). A produção de exoenzimas irá depender de cada espécie, da procedência e do local da infecção (PAKSHIR et al., 2013).

O processo de evasão da levedura sobre as células de defesa do organismo humano é visto principalmente pelas proteinases aspárticas secretadas (SAPS), sendo as mesmas classificadas de acordo com seu perfil catalítico, progressão e manutenção da infecção. Desta forma, para as espécies de *Candida* a enzima desempenha diversas funções, como, degradação de ligações peptídicas, degradação de proteínas superficiais, invasão de tecidos epiteliais e órgãos, respostas inflamatórias, além da formação de hifas (SCHULZE; SONNENBORN, 2009; TELLAPRAGADA et al., 2014). A formação das proteínas SAPS, é dada pela codificação de uma família de 10 genes SAP (SAP1-SAP10), sendo extensivamente estudados e associados ao perfil virulento de *C. albicans* (TAVARES; BÜRGE; BOCCA, 2015).

De acordo com alguns estudos, a expressão de SAP1, SAP2 e SAP6 demonstram serem competentes em induzir diferentes citocinas pró-inflamatórias produzidas por monócitos humanos, principalmente quando associadas ao perfil patológico da candidíase vulvovaginal. Citocinas como a interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IL-6, conduzem a uma

resposta inflamatória mediada pela ativação do inflamassoma NLRP3 pelo sistema imunológico inato do hospedeiro. No decorrer da resposta inflamatória impulsionada por SAP, ainda há o recrutamento de neutrófilos para a vagina (PIETRELLA et al., 2010; BRUNO et al., 2015; PERICOLINI et al., 2015). Em adição, NLRP3 também é responsável pela regulação positiva de IL-1 β e IL-18 (SCHRODER; ZHOU; TSCHOPP, 2010). Para a Silva e colaboradores (2014), os genes SAP9 e SAP10 podem estar relacionados com a manutenção da integridade da célula fúngica leveduriforme, aderência a superfície biótica e abiótica, bem como a desagregação da levedura no brotamento celular.

Outras enzimas como as fosfolipases do tipo B (FLB) possuem a capacidade de degradar componentes glicerofosfolipídios da membrana celular em ácidos graxos, através da quebra de uma ou mais ligações ésteres, ocasionando danos aos componentes intracelulares e consequentemente a lise, contribuindo para a virulência microbiana, facilitando a adesão celular e a disseminação da levedura para os vasos sanguíneos (MOHANDAS; BALLAL, 2011; PANDEY; GUPTA; TILAK, 2018). Além das fosfolipases do tipo B são encontrados outros três tipos (A, C e D), produtos dos genes PLB1 e PLB2; no caso dos tipos A e B estão relacionadas com a destruição da membrana dos eritrócitos através de um produto tóxico. As outras, têm mostrado perfil virulento em modelos murinos de candidíases; em complemento, o lipídio natural envolvido nesta classificação é a fosfatidilcolina (lectina) (ACHKAR; FRIES, 2010; SILVA, 2011; BORAL et al., 2018).

A hemolisina é a enzima responsável pelo rompimento das ligações da hemoglobina, ou seja, a degradação dos glóbulos vermelhos (hemácias) do hospedeiro humano, como resultado desta quebra, o ferro liberado é absorvido pelas células leveduriformes (SILVA et al., 2012; CANELA et al., 2018). Desta maneira, a captação do ferro pela levedura aumenta a sobrevivência do microrganismo no ser humano e acentua o perfil patogênico da infecção no hospedeiro, eventualmente a candidemia. Contudo, a produção da atividade hemolítica é dependente de diversos fatores, como: a temperatura, glicose, certos íons, incluindo o ferro ou até certos compostos alcoólicos (exemplo: etanol, *n*-butanol ou *n*-pentanol vapor) (SHUSTER; OSHEROV; ROSENBERG, 2004; RONSANI et al., 2011). Segundo Boral e colaboradores (2018), em exemplo, para a espécie de *C. albicans* o ferro proporciona a formação hifálica, penetração (tigmotropismo), invasão tecidual e desenvolvimento de infecções disseminadas invasivas (sistêmicas).

2.3 TERAPÊUTICA ANTIFÚNGICA

A utilização de substâncias antifúngicas para o combate de infecções fúngicas vem sendo descritas desde a década de cinquenta, com a incidência dessas patologias, necessitou a procura de novos compostos para o controle e eliminação dos microrganismos envolvidos na maioria das enfermidades fúngicas. Durante a década de 80 e 90 foi intensificado a pesquisa de novas substâncias, porém ainda são limitadas e seus mecanismos de ação ainda não foram totalmente elucidados quando comparado com os antibióticos para as infecções bacterianas, talvez pelo fato das leveduras apresentarem estrutura celular semelhante as do hospedeiro (PARAMYTHIOTOU et al., 2014; NGO; GARNEAU-TSODIKOVA; GREEN, 2016).

Atualmente, os antifúngicos comercializados e disponíveis para a terapêutica são classificados de acordo com o seu sítio de ação na célula fúngica, os alvos principais são os componentes da membrana plasmática e da parede celular (MURRAY, 2014). Estudos recentes, evidenciam a procura de novos compostos para o combate de fatores de virulência encontrados principalmente em cepas isoladas no ambiente hospitalar e aquelas envolvidos com as infecções fúngicas invasivas. Dentre os antifúngicos convencionais temos, os azóis, alilaminas, polienos, equinocandinas, flucitosina, tiocarbamatos e morfolinas (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013; SILVA, 2016).

Os principais constituintes celulares alvos das drogas antifúngicas são: componentes do ergosterol (como, as 14- α -desmetilases), β -1,3-D-glucano sintase, *N*-myristoyltransferase, aminoacil-RNAt sintase, quitina sintetase, protease aspártica segregada e o fator de alongamento celular (NGO; GARNEAU-TSODIKOVA; GREEN, 2016; SANTOS et al., 2018). Assim, os mecanismos de ação envolvidos nos agentes antifúngicos são, de caráter fungicida (eliminação/morte do microrganismo) e/ou fungistático, relacionado com a inibição do crescimento fúngico.

Os azóis são um dos principais grupos de drogas antifúngicas utilizadas no âmbito clínico, classificam-se como fungistáticos, e possuem moléculas orgânicas cíclicas, nas quais contém de 2 (imidazóis) ou 3 átomos (triazóis) de nitrogênio conectados por uma ligação complexa na cadeia lateral; essas drogas atuam inibindo a biossíntese do ergosterol (principal componente responsável pela integridade, fluidez e permeabilidade da membrana celular), precisamente pela enzima 14- α desmetilase (codificada pelo gene ERG11) do citocromo P450, responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol (KATHIRAVAN et al., 2012; SONG et al., 2016; WHALEY et al., 2017).

Dentre os fármacos descritos, o fluconazol demonstrou ser o antifúngico padrão ouro durante a década de 1990, devido a sua boa farmacocinética, grande espectro de ação e perfil

hidrossolúvel; ainda apresenta-se como droga de primeira escolha nos tempos atuais, sendo utilizada para o tratamento de micoses superficiais e cutâneas ocasionadas por espécies de *Candida*, candidemia, candidíase oral e vulvovaginal, meningite criptocócica e coccidioomicose (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2011; KATHIRAVAN et al., 2012; PATIL et al., 2015).

Outras classes de antimicóticos que agem na inibição da síntese do ergosterol, são as alilaminas (terbinafina e naftifina) e tiocarbamatos, responsáveis pela inibição da enzima esqualeno-epoxidase (codificada pelo gene ERG1), atuando nas fases iniciais da formação do ergosterol pela via do esqualeno, impedindo a formação dos outros derivados do esterol (MURRAY et al., 2014; SANTOS et al., 2018). De acordo com Ngo, Garneau-Tsodikova e Green (2016), a utilização de alilaminas é destacada nas micoses da pele e unhas, atribuídas possivelmente ao seu perfil lipossolúvel, quando comparadas com seu uso para infecções sanguíneas (candidemia).

Os polienos que são fármacos anfipáticos como, nistatina, natamicina e anfotericina B, também atuam na membrana plasmática dos fungos. Ligam-se ao ergosterol e destroem esse principal componente de membrana ocasionando a formação de poros, desencadeiam o vazamento de íons (como, potássio e magnésio) e constituintes citoplasmáticos, levando a morte celular (perfil fungicida). Outro mecanismo visto para esta classe, são as reações de oxidação e interação com lipoproteínas celulares, que por meio da liberação de radicais livres impedem a permeabilidade celular fúngica (TSCHERNER; SCHWARZMÜLLER; KUCHLER, 2011; MESA ARANGO; SCORZONI; ZARAGOZA, 2012; MESA ARANGO et al., 2014).

Nistatina e natamicina são principalmente de uso tópico ou oral, pois estes apresentam atividade sistêmica limitada, em contrapartida, a anfotericina B pode ser administrada sistemicamente. Por este motivo a anfotericina B é o fármaco desta classe que está mais relacionada com a prática clínica, particularmente no tratamento de infecções sanguíneas invasivas causadas por *Candida* spp. (CEVHER et al., 2008; VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2011). Todavia, devido a neurotoxicidade e nefrotoxicidade apresentadas principalmente na anfotericina B, a sua utilização em combinação com outro fármaco. O sinergismo ou antagonismo permite diminuir os efeitos colaterais e adversos da anfotericina B e conseqüentemente a diminuição do seu perfil tóxico.

Além da membrana plasmática dos fungos, a parede celular também é alvo de algumas classes de antifúngicos. Sabe-se que, esse envoltório extracelular é constituído por glucanas, mananas, galactomananas e glicoproteínas, o mesmo participa como fator de virulência como, adesão, plasticidade fenotípica e conseqüentemente formação de biofilme, no qual contribui para a patogênese fúngica e impedem a passagem de substâncias e moléculas pela membrana celular

(VAN DER WEERDEN; BLEACKLEY; ANDERSON, 2013; MURRAY, 2014). Desta maneira, os principais alvos dos antifúngicos são dirigidos para essa estrutura celular é através da inibição da formação de β -glucano e de quitina.

As equinocandinas (casporfungina, micafungina e anidulafungina) são os antifúngicos que atualmente demonstram ação fungicida em todas as espécies de *Candida*; a sua utilização foi aderida e recomendada após casos de resistência aos antifúngicos mais comuns e de maiores números, os azólicos (PARAMYTHIOTOU et al., 2014; NETT; ANDES, 2016). O mecanismo de ação visto nesta classe, é a inibição da enzima β - (1,3) - D-glucano sintase (codificada pelos genes FKS1 e FKS2) através de um bloqueio não competitivo, na qual é responsável pela biossíntese do β -1,3 glucano (componente de parede celular) (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013; PERLIN, 2015).

Conseqüentemente, essa inibição enzimática bloqueando a integração de monômeros de glicose (β -1,3 e β -1,6 glucanos) conduz um estresse osmótico na parede fúngica. Assim, com a integridade morfológica prejudicada, a parede celular fúngica se apresenta vulnerável e posteriormente sofrerá a lise celular (SINGH et al., 2009; GROVER, 2010; SONG; STEVENS, 2016). Outras classes de agentes antifúngicos como as polimixinas e nikromicina (em estudo), também agem a nível de parede celular, onde atuam na inibição da enzima quitina sintase, encarregada pelo alongamento da cadeia de quitina (KATHIRAVAN et al., 2012).

Por conseguinte, algumas drogas antifúngicas demonstram perfil inibitório na síntese de ácidos nucleicos como a flucitosina (5-flucitosina, 5-FC), fármaco fungistático que após se transformar em metabólito ativo, atua na inibição da enzima timidilato sintase e conduz ao impedimento da síntese do DNA, através da citosina permeasse. Outro mecanismo visto para esta classe, é a conversão para 5-fluorouracil pela enzima citosina desaminase e posteriormente fosforilado em ácido 5-fluorodesoxiuridílico, os mesmos podem ser introduzidos em moléculas de RNA e interferir na tradução de proteínas (CUENCA ESTRELLA et al., 2010; KATHIRAVAN et al., 2012; MURRAY, 2014). A Flucitosina é frequentemente administrada em associação com a anfotericina B, uma vez que a 5-FC sozinha pode causar efeitos colaterais fortes e toxicidade acentuada, como: comprometimento hepático, deficiências nas funções da medula óssea, entre outras, além de está correlacionada com o perfil rápido de resistência nas leveduras do gênero *Candida* (NETT; ANDES, 2016; PRASAD; SHAH; RAWAL, 2016).

Estudos recentes apontam novas classes de antifúngicos e novos mecanismos de ação, como por exemplo, a orotomida (inibidor da di-hidroorotato desidrogenase), APX001 (impede a fixação de manose a proteínas na parede celular externa), AR-12 (bloqueia acetil-CoA sintetase 1), ASP2397 (atua no metabolismo fúngico), entre outros, que irão proporcionar esperanças

futuras no combate dos organismos fúngicos e do seu perfil de resistência, principalmente frente as leveduras do gênero *Candida* (PERFECT, 2017; VAN DAELE et al., 2019).

2.4 RESISTÊNCIA ANTIFÚNGICA

O uso indiscriminado associado ao restrito arsenal de antifúngicos disponíveis comercialmente, podem explicar o perfil de resistência fúngica, principalmente encontradas em doenças oportunistas ocasionadas por leveduras. A resistência é descrita como, intrínseca, desenvolvida antes da exposição ao agente antifúngico; resistência adquirida, na qual ocorre após a administração da droga e pode ser reversível, ou transitória quando relacionadas a exposição prolongada e ao perfil irreversível por diversas alterações gênicas sofridas no processo (GOFFEAU, 2008; MURRAY, 2014; COWEN et al., 2015).

Os mecanismos de resistência acontecem a nível celular e molecular. Desta maneira, caracteriza-se como resistência fúngica celular, a diminuição na concentração intracelular da droga; ou diminuição da afinidade do sitio alvo do fármaco ou por alterações do metabolismo para combater e balancear as concentrações do fármaco no interior da célula do fungo (PEMÁN; CANTÓN; ESPINEL INGROFF, 2009; VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2011; SANGLARD, 2016). A resistência fúngica molecular, exibe-se através da superexpressão/ativação de bombas de fluxo, alterações moleculares (qualitativas) nas enzimas alvos do fármaco, alterações quantitativas relacionadas ao aumento da expressão gênica (como, genes codificados por ERG11, CDR e entre outros) e modificações nas constituições dos componentes de parede e membrana celular (SANGLARD, 2016; SCORZONI et al., 2017).

Os agentes antifúngicos como os azólicos, apresentam diversos mecanismos de resistência. Essa resistência pode ser apresentada pela, regulação positiva de transportadores de drogas, ativação de bombas de efluxo por meio de genes como CDR (*Candida* Resistente a Drogas) e MDR (Multidrogas Resistentes), mutações pontuais nos genes ERG11 e ERG3 que induzem alterações na via de biossíntese do ergosterol, aumento nas concentrações de lanosterol 14- α - dimetilase, diminuição de afinidade com as ligações de 14- α - dimetilase a droga e a regulação positiva de CDR1, CDR2, MDR1 e ERG11 (KANAFANI; PERFECT, 2008; PEMÁN; CANTÓN; ESPINEL INGROFF, 2009; PFALLER, 2012; SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLORL, 2015). Para as alilaminas, o mecanismo de resistência ainda não está bem elucidado.

Seguindo o contexto anterior, a resistência aos polienos é relatada por meio de mutações gênicas pontuais, precisamente nos genes ERG3 e ERG6, levando a diminuição do ergosterol da

membrana celular fúngica (PEMÁN; CANTÓN; ESPINEL INGROFF, 2009; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013). Os mecanismos encontrados na flucitosina induzem a alteração enzima citosina permease (codificada pelo gene FCY2) por mudanças na citosina desaminase (codificada pelo gene FCY1) e a deficiência ou falta de enzimas relacionadas com a metabolização da 5-FC (VANDEPUTTE et al., 2011; PFALLER, 2012; BONDARYK; KURZĄTKOWSKI; STANISZEWSKA, 2013).

As equinocandinas são os agentes antifúngicos mais atuais no combate das infecções fúngicas, desta forma apenas dois possíveis perfis de resistência foram relatados até o presente momento. Sendo eles, mutações pontuais nos genes FKS1 (codifica o complexo de β -1,3-D-glucano sintase) em regiões como “*hot-spot*” (HS1: 640–650 e HS2: 1345–1365) e Fks2 (região HS1) em menor proporção, descritas principalmente nas espécies *Candida albicans* e *Candida glabrata*, respectivamente. Outro mecanismo está relacionado com a resposta ao estresse da adaptação à exposição ao fármaco, contribuindo para um contrabalanceamento após a diminuição de algum componente de parede celular. Isso ocorre quando há inibição de algum composto celular da parede, a célula fúngica é capaz de aumentar o desenvolvimento de outro constituinte celular em resposta as concentrações do fármaco na célula fúngica (TSCHERNER; SCHWARZMÜLLER; KUCHLER, 2011; PERLIN, 2015; GONÇALVES et al., 2016).

Além dos fatores celulares e moleculares descritos acima, as comunidades celulares formadoras do biofilme, também participam como mecanismos de resistência antifúngica. O biofilme confere a resistência a maioria dos fármacos, demonstrando os maiores perfis de resistência significativa descrita para os fungos.

A estrutura tridimensional do biofilme induz diversos mecanismos de resistência, dentre os quais, impede a penetração da droga antifúngica, por meio de sua matriz polimérica extracelular, bloqueando a entrada da droga e assim as células envolvidas pela camada, conseguem crescer sem nenhuma interferência do fármaco. A matriz extrapolimérica, através dos sequestros das drogas consegue diminuir os níveis da concentração dos antifúngicos e assim prolongar a viabilidade celular; mantendo a presença de células persistentes e a regulação positiva de bombas de efluxo (TARASZKIEWICZ et al., 2012; SILVA, 2017; WUYTS; VAN DIJCK; HOLTAPPELS, 2018).

2.5 PESQUISA DE NOVOS COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS

Desde os tempos mais primitivos, os relatos históricos demonstram que a população humana já se utilizava de plantas medicinais, principalmente para tratar doenças infecciosas. A análise das pesquisas existentes, pode comprovar o conhecimento empírico aplicado a terapêutica

(SHARMA et al., 2017). Na atualidade, diversas plantas medicinais são usadas para tratar diferentes morbidades acometidas ao homem e o uso popular é caracterizado pelo acúmulo de informações repassadas por gerações (ZARDO et al., 2016).

Nas últimas décadas houve um grande crescimento científico sobre as pesquisas farmacológicas de plantas medicinais, surgindo assim numerosas alternativas terapêuticas através da utilização de extratos e óleos essenciais com atividade antimicrobiana (COUTINHO et al., 2008; CALO et al., 2015). O Brasil possui uma grande biodiversidade, com cerca de 20% da sua totalidade de espécies de plantas catalogadas e relacionadas ao mundo inteiro, fornecendo compostos com ação terapêutica substancial que talvez possam complementar a terapia tradicional (RODRIGUES, 2016). Similarmente às plantas, fármacos obtidos de organismos marinhos possuem atividades significativas e às vezes maiores que quando comparados aos produtos naturais de origem vegetal (GLASER; MAYER, 2009).

Os produtos naturais provenientes de ambientes marinhos apresentam metabólitos secundários com atividade promissora e uma diversidade de moléculas com ação farmacêutica e terapêutica para humano. Cerca de 70% de metabolitos, podem ser obtidos de esponjas marinhas, microrganismos e corais, em comparação com algas, moluscos e ascídias que apresentam apenas 30% (ALVES, 2014). O pequeno arsenal de agentes antifúngicos, a resistência antifúngica e os fatores de virulência associados principalmente aos quadros de óbitos provenientes das infecções fúngicas oportunistas, tem motivado a procura de novos compostos bioativos de origens vegetais ou não vegetais clinicamente significativos (SOLIMAN et al., 2017).

Assim, alguns estudos já demonstraram que produtos naturais vegetais e marinhos, desempenhando função benéfica e sendo um forte candidato para implementação do uso terapêutico. Batista et al. (2013), verificaram que o óleo essencial e extrato hidroalcoólico de folhas *Lippia sidoides* Cham, apresentaram-se satisfatoriamente resultados contra espécies de *Candida*, porém o óleo demonstrou maior atividade antifúngica que o extrato.

Para Silva (2016), o β -citronelol, fitoconstituente encontrado em óleos essenciais de diversas plantas medicinais, apresentou atividade antifúngica significativa contra estirpes de *C. albicans*, exibindo uma CIM de 128 $\mu\text{g/mL}$. Adicionalmente a esse estudo, Vital Júnior e colaboradores (2019), mostraram que o mesmo fitoconstituente apresentou atividade forte para cepas de *C. tropicalis* (CIM= 64 $\mu\text{g/mL}$), inclusive demonstrando possuir efeito sinérgico quando associadas ao fármaco anfotericina B.

Em produtos naturais marinhos, como a esponja *Haliclona* sp. foram vistas atividades antifúngicas de extrato metanólico e extrato etéreo contra isolados clínicos de *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, porém o extrato metanólico da esponja foi o que apresentou maior

atividade, exibindo CIM de 0,75 mg/mL e 2 mg/mL, respectivamente para as duas espécies (NAZEMI et al., 2014).

Desta maneira, a utilização de produtos naturais vegetais, marinhos, sintéticos ou semissintéticos mostram-se eficientes contra os microrganismos, bem como proporcionam menores custos, menor toxicidade, menores efeitos adversos e apresenta também, maiores disponibilidades substanciais a respeito da matéria-prima (SILVA, 2012).

2.6 *Agelas dispar*

O ecossistema marinho apresenta-se como uma abundante variedade de compostos químicos com atividade biológica significativa, e devido a este fator, a pesquisa por produtos naturais neste âmbito têm ganhado grande destaque científico (BLUNT et al., 2011). Como por exemplo, as esponjas marinhas que exibem diversos metabólitos secundários com atividade antimicrobiana promissora, onde estima-se que tenham surgidas a mais de 600 milhões de anos e que existem mais de 20.000 espécies já descritas (DOSHI et al., 2011; LHULLIER et al., 2019).

As esponjas marinhas apresentam grande distribuição em todos os oceanos, sendo os mais abundantes organismos aquáticos (DOBSON et al., 2015). No Brasil, a diversidade de esponjas marinhas constitui a principal fonte de pesquisa de produtos naturais nesse ecossistema, quando comparado com microrganismos marinhos, corais e algas. A explicação mais plausível é o fato de as esponjas fornecer compostos bioativos únicos. Deste modo, o país demonstra um potencial para a obtenção de novas substâncias marinhas com atividade biológica (BLUNT et al., 2017).

As esponjas marinhas (filo Porifera) pertencentes a classe Demospongiae, ordem Agelasida, família Agelasidae e gênero *Agelas*, apresentam-se como fornecedores de produtos naturais importantes de interesse farmacológico, contendo em sua composição compostos bioativos relevantes, principalmente aqueles de potencial antimicrobiano (CYCHON; LICHTER; KÖCK, 2015).

Na biodiversidade marinha, o gênero *Agelas* apresenta 19 espécies, sendo elas: *A. axifera*, *A. cerebrum*, *A. ceylonica*, *A. citrina*, *A. clathrodes*, *A. conífera*, *A. dendromorpha*, *A. gracilis*, *A. Linnaei*, *A. longíssima*, *A. mauritiana*, *A. nakamurai*, *A. nemoechinata*, *A. oroides*, *A. sceptrum*, *A. schmidtii*, *A. sventres*, *A. wiedenmayeri* e a *A. dispar* (ZHANG et al., 2017).



Figura 3. Foto da espécie *Agelas dispar*. Fonte: Adaptado de ZHANG et al. (2017).

Os metabólitos secundários representam 50% dos produtos naturais dos organismos invertebrados, nos quais 98% são decorrentes de vias metabólicas derivadas de isoprenoides, polipeptídios e aminoácidos (BLUNT et al., 2015; SOUZA, 2018). Dentre os metabólitos secundários bioativos das espécies de *Agelas*, incluem os mais comuns representantes: os alcalóides (principalmente o bromopirrol e seus derivados), seguidos de alcaloides diterpênicos, terpenóides, meroterpenóides, glicoesfingolipídeos, carotenóides, ácidos graxos, peptídeos, esteróis e ceramidas (FATTORUSSO; TAGLIALATELA SCAFATI, 2008; AL MOURABIT et al., 2011; SINGH; MAJIK, 2019).

Os alcaloides bromopirrólicos são compostos encontrados apenas em organismos marinhos invertebrados, nos quais são exemplos de metabólitos secundários sintetizados por esses seres (LEI; ZHOU, 2002; BLUNT et al., 2017). Segundo Rane e colaboradores (2014), as esponjas apresentam uma fonte rica de compostos alcaloides e derivados dessa classe, dentre os quais são destacados pela originalidade estrutural e diversidade de atividades farmacológicas.

Dentre as atividades farmacológicas dos alcaloides pirrólicos e seus derivados já descritas na literatura, pode-se citar o efeito citotóxico, analgésico, anti-inflamatório, antiserotonérgico, anti-incrustante, antibacteriano, antifúngico, antibiofilme, anticancerígeno, imunomodulador, imunossupressor, antiangiogênica, inibidor de quitinase, ativador de ATPase actomiosina e atividades anti-histamínicas (RICHARDS; REED; MELANDER, 2008; KUMAR; RAWAT, 2011; RANE et al., 2014; TANAKA et al., 2016).

Essa classe representa o maior grupo de compostos químicos com atividade biológica encontradas nas *A. dispar*, bem como em outras espécies de *Agelas*, onde demonstra ser quimicamente uma família de estrutura única, na qual é composta de anéis aromáticos, núcleo de ácidos carboxílicos (como o bromopirrol-2-carboxamida), derivados halogenados (especialmente

em formas bromadas) e outros padrões estruturais (TANAKA et al., 2013b; ABDJUL et al., 2015; CYCHON; LICHTER; KÖCK, 2015; SINGH; MAJIK, 2019).

Metabólitos secundários como os alcaloides pirrol-imidazol (PIAS) (Figura 3), são encontrados exclusivamente em esponjas marinhas. As PIAS, podem sofrer variações decorrentes do perfil oxidativo, hidratação e mudanças estruturais a nível de pirrol-carboxamida, sendo este último, relacionado com a presença ou ausência de átomos de bromo em seu núcleo pirrol (FORTE, 2009). Sua classificação está associada ao número de oroidina, porção de pirrol dos alcaloides ou a presença de anéis envolvendo o anel imidazólico em sua constituição química (AIELLO et al., 2008).

A oroidina, reconhecida como um alcaloide marinho bromopirrólico de ampla abundância, foi o primeiro membro do grupo a ser isolado da espécie *Agelas oroides* em 1971. A oroidina é considerada como precursor genético dos demais alcaloides desta classe, sugerindo que, os precursores da oroidina seja a prolina e a lisina (GARCIA; BENJAMIN; FRYER, 1973; GENTA-JOUVE et al., 2011; LACERDA, 2014).

Estes produtos naturais, apresentam estruturalmente complexos, foram descobertos através de ensaios químicos a partir de extratos das esponjas do gênero *Agelas*; do qual foi possível identificar a oroidina (Figura 4. 1), o ácido 4,5-dibromopirrol-2-carboxílico (Figura 4.2), seu metil éster 4,5-dibromopirrole-2-carbonitrila (Figura 4.3) e 4,5-dibromopirrole-2-carboxamida (Figura 4.4), sendo ambos responsáveis pela regulação da alimentação química em peixes (CHANAS et al., 1997; KÖNIG; WRIGHT; LINDEN, 1998). Posteriormente, no trabalho de Assmann et al. (2000), identificaram a sceptrina como o principal metabólito das espécies *A. conféra*. Os escritores relataram que átomos de bromo presentes a este metabólito eram responsáveis por aumentar dissuasão alimentar.

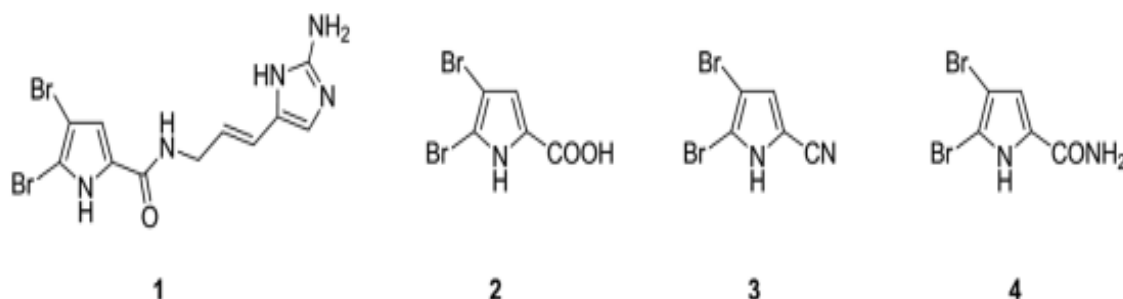


Figura 4. Estrutura química dos compostos isolados de esponjas marinhas do gênero *Agelas*. Fonte: Adaptado de Sauleau, Moriou e Al Mourabit (2017).

Neste contexto, a investigação de alcaloides bioativos vem apresentando grande relevância nas últimas décadas. Alguns estudos demonstram que a diversidade química e farmacológica de alcaloides bromopirrólicos oroidínicos, precursores ou modificações químicas sintéticas na oroidina (como: amidas reversas e isômeros de amida), possuem atividade antimicrobiana e são reconhecidas inibidores da formação de biofilmes microbianos, como por exemplo contra a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (HUIGENS et al., 2007; BALLARD et al., 2008; ROBERT et al., 2008; RICHARDS et al., 2009; TAKALE et al., 2014).

Outros compostos alcaloides como o bindindol hyrtimomine D e E (metabólitos secundários), isolados da esponja marinha *Hyrtios* sp. coletada em Okinawa no Japão; demonstraram potencial antimicrobiano significativo. Ambos compostos foram testados frente *Candida albicans* (IC_{50%}, 4 e 8 µg/mL) e *Cryptococcus neoformans* (IC_{50%}, 4 e 8 µg/mL).

Adicionalmente, hyrtimomine D apresentou perfil inibitório para as cepas de *Staphylococcus aureus* (CIM, 4 µg / mL) e *Trichophyton mentagrófitos* (CIM, 16 µg / mL) (TANAKA et al., 2013a). O alcaloide ageloxime B, isolado de *Agelas mauritiana*, espécie de esponja marinha coletada no mar da China meridional, apresentou atividade antifúngica *in vitro* contra *Cryptococcus neoformans* e atividade antileishmanial frente a *Leishmania donovani* (YANG et al., 2012). Além da atividade antifúngica, o perfil inibitório contra bactérias também foi visto no mesmo estudo, o ageloxime B demonstrou atividade antibacteriana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). Para Hertiani et al. (2010), extratos de *A. nakamurai*, contendo compostos alcaloides como o derivado de bromopirrol, (-) - ageloxime D, demonstrou ação inibitória contra *S. epidermidis* (CIM < 0.0877 µM).

Um ponto crítico evidenciado nos estudos de atividade biológica e química é a quantidade e concentração do material isolado das esponjas marinhas. A síntese química é necessária para a descoberta da sua função e ação farmacológica detalhada, que pode trazer como consequências o fornecimento de dados suficientes para a disponibilidade do uso em seres humanos (ZIDAR et al., 2014).

Assim, metabólitos secundários como oroidina e derivados de bromopirrol isolados de esponjas marinhas, especialmente em espécies de *Agelas*, demonstram que esses seres possam ser a chave na descoberta de compostos quimicamente bioativos para o tratamento de diversas enfermidades, principalmente contra infecções fúngicas.

3. JUSTIFICATIVA

A busca por novos compostos bioativos tornou-se uma necessidade em decorrência das dificuldades para debelar as infecções, uma vez que os microrganismos, rapidamente, vêm se mostrando resistentes a uma variedade de antimicrobianos. O perfil de resistência está correlacionado com o uso indiscriminado e exacerbado das drogas antimicrobianas nos tempos atuais. No caso da resistência dos fungos às drogas empregadas na prática clínica, as pesquisas revelam que frequentemente a resistência se encontra associada a capacidade de formação de biofilme, um fator de virulência observado para as espécies do gênero *Candida*, implicadas também em infecções sistêmicas e no uso de defensores agrícolas.

As principais classes de antifúngicos (azólicos, polienos, equinocandinas e os análogos de nucleosídeos) já demonstram serem ineficazes contra o biofilme fúngico, que apresenta particularmente resistência ao grupo dos azóis. Diante dessa situação, atualmente, a escolha da terapêutica antifúngica alternativa para controlar os fungos produtores de biofilme, se dá por meio da administração de equinocandinas, formulações lipossômicas da anfotericina B ou associações farmacológicas, porém, surpreendentemente, já existem relatos de resistência para estas classes (RAMAGE et al., 2013; SUN et al., 2016). Salienta-se que a situação é bem crítica, no caso das classes antifúngicas, uma vez que se encontram disponíveis no mercado um arsenal bem reduzido de drogas destinadas ao tratamento das infecções fúngicas. Tendo em vista a dificuldade em contornar a toxicidade seletiva, considerando a similaridade entre a célula fúngica e às células do hospedeiro humano (ambas eucarióticas), os pesquisadores e a indústria farmacêutica têm poucas estratégias para desenvolvimento de novos antifúngicos.

Assim, a busca incessante por compostos naturais, sintéticos ou semissintéticos promissores, que demonstrem atividade antimicrobiana e antibiofilme e que possam ser administrados com segurança para controle de infecções, vem motivando áreas da pesquisa científica, principalmente a tentativa de elucidação de compostos antifúngicos.

Neste sentido, dentre os compostos naturais bioativos, a *Agelas dispar*, uma espécie de esponja marinha, encontrada em diversos locais do mundo, vem sendo reportada por apresentar atividades farmacológicas, tais como, desempenho antimicrobiano, antibiofilme, atividade anticancerígenas e imunossupressoras (SINGH; MAJIK, 2019). A *Agelas dispar* apresenta em sua composição diversos metabolitos, principalmente alcalóides, como os derivados de bromopirrole (oroidina, agelasidina, entre outros) comprovadamente bioativas. Entretanto, há uma escassez de trabalhos científicos, mais abrangentes, relatando a atividade antifúngica e antibiofilme de extratos não vegetais, especificamente componentes da esponja marinha de *Agelas dispar*, como uma

estratégia no tratamento das infecções fúngicas, especialmente aquelas ocasionadas por leveduras do gênero *Candida*. Nesse contexto, esse estudo foi motivado pela possibilidade da *Agelas dispar* apresentar potencial antifúngico frente às espécies de *Candida* reconhecidas como formadoras de biofilmes.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar a atividade antifúngica e antibiofilme da fração Ag2 do extrato metanólico de *Agelas dispar* sobre as amostras de *Candida albicans* e não-*albicans*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Estabelecer a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) da fração Ag2 do extrato de *Agelas dispar* frente as diferentes espécies de *Candida*;
- ✓ Avaliar e quantificar a formação do biofilme fúngico;
- ✓ Avaliar fenotipicamente a capacidade da fração Ag2 de inibir o biofilme em formação e o biofilme maduro;
- ✓ Verificar por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) a interação morfológica da ação antibiofilme da fração Ag2 do extrato de *A. dispar* com o biofilme em formação e o biofilme maduro de cepas de *Candida*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 TIPO DE PESQUISA

Esta pesquisa apresenta caráter exploratório, experimental, com abordagem quantitativa e de natureza básica, tendo como intuito gerar conhecimentos sobre os fatos verdadeiros e úteis, aqui dissertados.

5.2 ENSAIOS DE TEOR QUÍMICO

5.2.1 Coleta, processamento e caracterização química da amostra Ag2

Os procedimentos experimentais de fundamentação química foram todos realizados pela doutoranda Marcela de Castro Nogueira Diniz Pontes e supervisionados pela Prof^ª Dr^ª Renata Mendonça Araújo no Laboratório de Isolamento e Síntese de Compostos orgânicos (LISCO) da UFRN. Todos os solventes utilizados (*n*-hexano, clorofórmio, acetato de etila, *n*-butanol e metanol) foram de grau P. A., da marca Synth[®]. A secagem sob pressão reduzida foi realizada em rotoevaporador da marca Fisatom[®].

Exemplar de *Agelas dispar* foi coletado na região do Batente das Agulhas, no litoral do estado do Rio Grande do Norte, com coordenadas geográficas iguais a 5° 33' 50.47 ''S- 35° 4' 22.02 ''. Foi identificado *in situ*, pelo professor Eduardo Hajdu, etiquetado com o código MNRJ18267 e imerso em metanol puro para encaminhamento para o laboratório. O material da esponja foi cadastrado com o número A12E895 e autorizado seu uso para fins científicos pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN).

No laboratório da química, o material marinho foi então examinado, triturado e colocado no metanol, cujo volume foi acertado em quantidade suficiente para a esponja permanecer coberta pelo solvente. Desta forma, a esponja foi mantida durante três dias no metanol, e então a solução remanescente foi filtrada, concentrada sob pressão reduzida à temperatura de até 40 °C. O procedimento foi repetido três vezes, com a mesma massa da esponja já extraída, e os três extratos foram reunidos, resultando no extrato metanólico Ag. O extrato Ag foi suspenso em MeOH:H₂O (metanol) 6:1 (v/v) e submetido a partição líquido/líquido com os solventes de polaridade crescente *n*-hexano, clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol. Cada uma destas frações, incluindo a fração hidroalcoólica restante, foi evaporada sob pressão reduzida e estocada para partição e/ou fracionamento cromatográfico. O extrato metanólico então foi separado em duas partes, uma que

foi fracionada em coluna e outra fracionada por partição, gerando as frações Ag0, Ag1, Ag2, Ag3 e Ag4.

Para avaliação e identificação dos compostos químicos da Ag2 e das demais frações do extrato metanólico de *Agelas dispar*, foram realizadas análises por cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas (HPLC-MS-MS) no NUPPRAR-UFRN, por meio do sistema que inclui cromatógrafo líquido Dionex Ultimate 3000. Desta forma, os constituintes foram separados em uma coluna Phenomenex Hydro C-18 column (2.0 x 50 mm, 4 µm), com uma pré coluna equivalente, em um fluxo de 600 µL/ min. A fase móvel foi um gradiente da mistura de 0.1% ácido fórmico em água (A) e 0.1% ácido fórmico em metanol (B). As análises espectrométricas foram realizadas por ionização em modo negativo e ocorreram no NUPPRAR, através de um espectrômetro da AB Sciex, com triplo quadrupolo linear com captura de íons (3200 QTRAP® LC-MS/MS), fonte iônica do tipo (TurboIonSpray® da AB Sciex). Para a aquisição dos cromatogramas e espectros de massas EMS e MS-MS foi utilizado o software PeakView® versão 2.2.

Apenas a fração Ag2 semibruta do extrato metanólico de *Agelas dispar* foi o produto requerido para o objeto dessa pesquisa, devido os achados químicos encontrados no composto serem semelhantes com os relatados por alguns autores na literatura disponível (NAKAMURA et al., 1983; MEDEIROS et al., 2006; ZHANG et al., 2017). Deste modo, nos ensaios biológicos a Ag2 foi solubilizada em dimetil-sulfóxido-DMSO (Labsynth produtos para Laboratório LTDA), em uma proporção de até 10% e diluídos com água destilada estéril (CLEENLAND; SQUIRES, 1991; HOOD; WILKINSON; CAVANAGH, 2003).

5.3 ENSAIOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

5.3.1 Meios de Cultura

Para a manutenção das cepas e ensaios da atividade antifúngica, foram utilizados o Ágar Sabouraud Dextrose – ASD com Cloranfenicol (KASVI, Brasil), Caldo Sabouraud Dextrose – CSD (KASVI, Brasil), RPMI 1640 com L-glutamina sem Bicarbonato de sódio (INLAB/Brasil), caldo Yeast Nitrogen Base (“YNB”; HiMedias, Mumbai, India) e caldo Yeast Peptone Dextrose (“YPD”; extrato de levedura 10 g/L; dextrose 20g/L; peptona 20 g/L), os quais foram preparados segundo as descrições dos fabricantes.

5.3.2 Cepas fúngicas e Preparação do inóculo

Foram utilizados 13 (treze) cepas de leveduras do gênero *Candida* adquiridas da coleção de microrganismos do Laboratório de Ensaios Antimicrobianos e Citotoxicidade (LEAC), do Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DMP) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN). Nos experimentos, foram empregadas as cepas padrão da American Type Culture Collection (ATCC®): *Candida albicans* (ATCC 90028), e as não-*albicans*: *Candida tropicalis* (ATCC 13803), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida glabrata* (ATCC 2001), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e cepas identificadas por sequenciamento provenientes do trabalho de Campos (2019) e oriundas de leite *in natura*, listadas no quadro 1. Todas as estirpes foram armazenadas a -70°C em meio YPD acrescido de Glicerol a 15%.

Espécies - Amostras	Número de acesso no GenBank	Principais resultados da pesquisa BLAST [Número de acesso ao GenBank]
<i>Candida orthopsilosis</i> - 15	MN450868	LC389313.1
<i>Candida parapsilosis</i> - 21	MN450870	LC389138.1
<i>Candida parapsilosis</i> - 28	MN450872	KU200443.1
<i>Candida parapsilosis</i> - 31	MN450873	KY178309.1
<i>Candida parapsilosis</i> - 33	MN450875	LC389750.1
<i>Candida tropicalis</i> - 40	MN450880	KX664582.1
<i>Candida parapsilosis</i> - 50	MN450881	LC390144.1
<i>Candida parapsilosis</i> - 58	MN450883	KX652405.1

Quadro 1. Cepas de *Candida* identificadas por sequenciamento e dispostas no GenBank.

Para preparação do inóculo, as colônias obtidas de culturas das cepas em ASD (KASVI, Brasil), foram suspensas em solução de NaCl 0,85% (VETEC Química, Rio De Janeiro, Brasil) estéril e ajustadas de acordo com o padrão 0,5 de McFarland, para obter um inóculo de 10⁶ UFC/mL (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000; CLSI, 2017).

5.3.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima - CIM

Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) seguiu a metodologia baseada no método de microdiluição em caldo disposta no documento M27-A4, CLSI, 2017. Foram realizadas diluições seriadas da fração Ag2 do extrato metanólico de *Agelas díspar* 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) destes em caldo RPMI 1640 com L-Glutamina sem Bicarbonato de Sódio (INLAB, Brasil), em microplacas de 96 poços de fundo chato. Nas colunas 1 a 10 foram colocados 100 µL do meio RPMI 1640 (INLAB, Brasil); posteriormente, realizadas diluições seriadas transferindo 100 µL do extrato da coluna 1 até a coluna 10, sendo descartado 100 µL do último poço (Figura 5).

Após as diluições estarem completas, foram acrescentados 10 µL do inóculo (preparado de acordo com o item 5.3.2) nos poços das colunas 1 ao 9. Na coluna 10 foram colocados 200 µL do meio RPMI 1640 (INLAB, Brasil) como controle negativo (controle da esterilidade); na coluna 11, 100 µL do meio RPMI 1640 (INLAB, Brasil) mais 100 µL da Anfotericina B (Antifúngico padrão) e 20 µL do inóculo como controle positivo (controle do antifúngico); por fim, na coluna 12 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). As placas foram preparadas, assepticamente fechadas e submetidas à incubação numa temperatura de 35 ± 2 °C por 24 - 48 horas.

Como relatado na literatura, a CIM foi avaliada como a menor concentração da substância capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento fúngico verificado nos orifícios, quando em comparação com seu controle positivo (controle do antifúngico). O resultado foi expresso pela média aritmética das CIM's obtidas no ensaio realizado em triplicata.

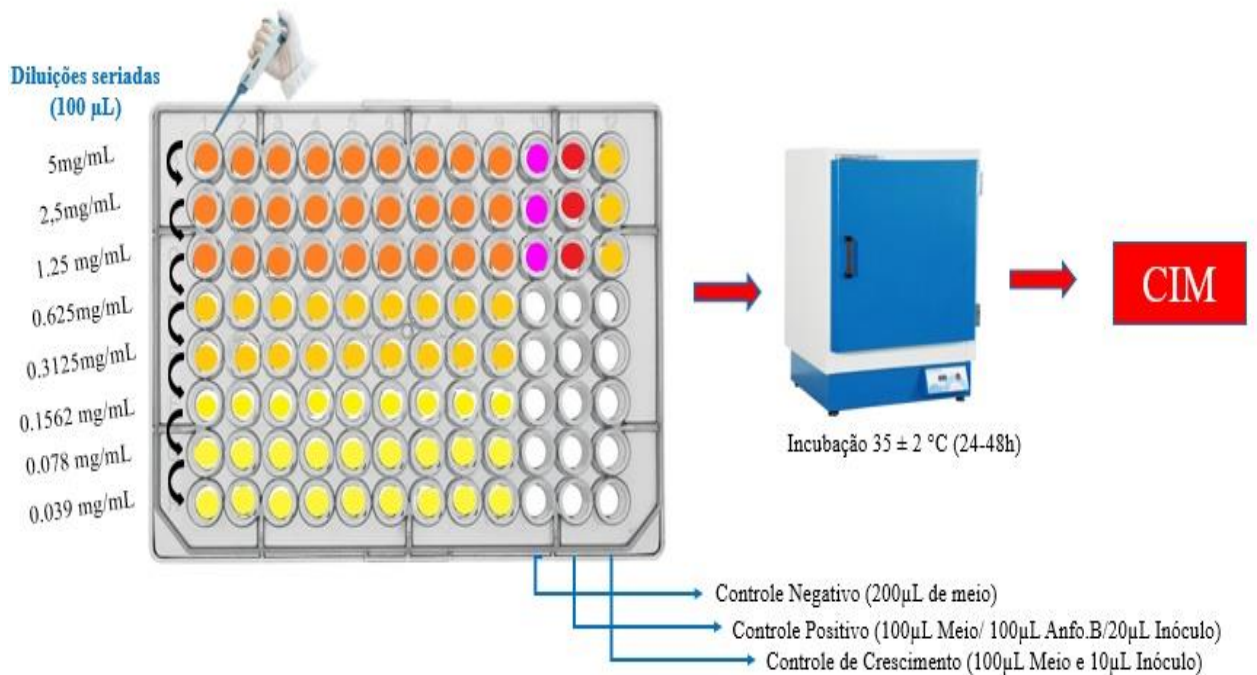


Figura 5. Representação das diluições da fração Ag2 do extrato metanólico de *A. dispar* para a determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM.

5.3.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima – CFM

Após a determinação da CIM, foi alíquotado 10 µL da suspensão das cavidades a partir daquele em que foi observado a completa inibição do crescimento fúngico e foram transferidos para placas contendo o meio Agar Sabouraud Dextrose com Cloranfenicol (ASD, KASVI, Brasil), através da semeadura em “spot” (SAKITA et al., 2019). Posteriormente, as placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 - 48 horas. A CFM foi constatada na visualização da concentração em que não houve crescimento (eliminou) de leveduras no meio de cultura (Figura 6). Desta forma, para a classificação do perfil fungicida ou fungistático das concentrações da substância Ag2 foi considerado uma relação em que $CIM = CFM$ ou $CFM = 1, 2$ ou 3 diluições acima da CIM, a atividade é considerada fungicida, seguindo os critérios descritos por Isenberg (1992).

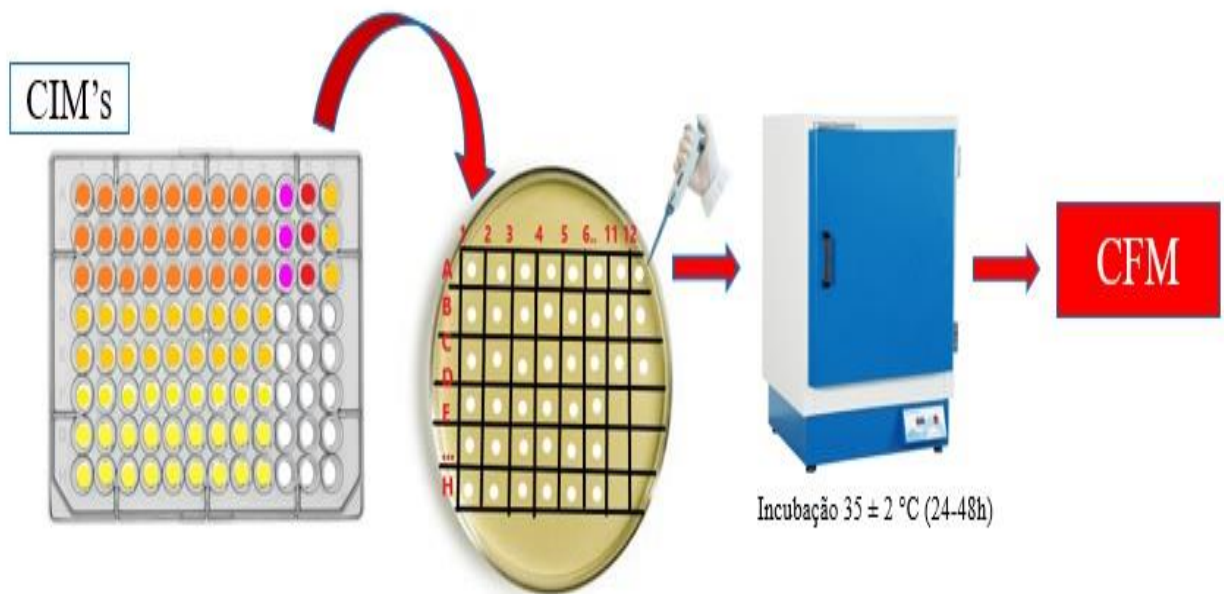


Figura 6. Representação do ensaio para a avaliação da natureza bioativa da substância pelo método da Concentração Fungicida Mínima – CFM.

5.3.5 Formação do Biofilme

A formação do biofilme foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Jin et al. (2003) e adaptada por Melo et al. (2007). As células leveduriformes foram semeadas em ASD (KASVI, Brasil) a 35 °C por 18 horas para a obtenção das colônias. As cepas fúngicas foram inoculados em tubos tipo falcon contendo 5 mL em caldo Yeast Nitrogen Base (“YNB”; Himedia) implementado com 50 mM de glicose (Difco, USA), em seguida incubados em uma temperatura de 37 °C durante 18 horas a 200 rpm (Tecnal Shaker, Tecnal, Piracicaba, Brasil).

Após este período, os tubos do tipo falcon foram centrifugados em uma velocidade de 5.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, o pellet obtido foi lavado duas vezes em 5 mL de PBS (Solução salina de tampão fosfato, pH 7,2, Ca²⁺ e Mg²⁺ livres) estéril. Para reajustar a concentração celular em 10⁷ células/mL, o pellet formado foi suspenso novamente em 5 mL de PBS e a suspensão do inóculo ajustada para uma densidade óptica (DO) de 0,38 de absorbância mensurados em espectrofotômetro no comprimento de onda de 520 nm. Posteriormente, para avaliação da fase de adesão, a suspensão celular padronizada foi transferida para placas de microdiluição de poliestireno de 96 poços (TPP®, EUA). Em cada poço foram adicionados 100 µL da suspensão do inóculo e subsequentemente incubadas por 1,5 h em uma temperatura de 37 °C sob agitação de 75 rpm.

Para a validação dos testes e a confiabilidade da técnica, utilizou como controle negativo 8 poços tratados igualmente aos dos testes, a fim de averiguar a possibilidade dos conteúdos celulares interferirem no teste. Por conseguinte, após a fase de adesão, as células que não ficaram aderidas à placa foram removidas e a placa foi lavada duas vezes com 150 μ L de PBS estéril. Seguidamente, 100 μ L de meio YNB (Himedia, Índia) acrescido com 50 mM de glicose (Difco) foi adicionado em cada um dos poços testes e controles e a placa foi incubada novamente por 66 horas a 37 °C perante uma agitação de 75 rpm. Todos os testes foram feitos em triplicatas.

5.3.6 Quantificação do biofilme

Para o ensaio da quantificação, utilizou-se da metodologia da solução de cristal violeta a 0,4% de Djordjevic et al. (2002) com pequenas modificações. Assim, antecipadamente, foi removido o meio YNB (Himedia, Índia) implementado com 50 mM de glicose (Difco, USA) da microplaca (item 5.3.5), a placa foi lavada duas vezes com 150 μ L de PBS, e seca em temperatura ambiente por 45 min. Em seguida, para cada poço foi acrescentado 110 μ L de solução aquosa de cristal violeta a 0,4% por 45 min.

Posteriormente, o cristal violeta foi removido e os poços foram lavados 3 vezes com 300 μ L de água milli-Q estéril e imediatamente descorados com 200 μ L de etanol a 95% (álcool absoluto), por 45 min. Após este procedimento, 100 μ L da solução descorada foi transferida para um poço de uma nova microplaca de 96 poços e a quantidade do cristal violeta foi mensurada a 570 nm no leitor de Elisa (BioTek® Epoch Microplate Spectrophotometer, California, CA, USA). Por fim, foi estabelecido um ponto de corte (*cut off*) pela média dos valores de absorbância baseado na densidade óptica dos isolados/cepas (D.O.i), tomando como base a do controle negativo (D.O.c). A metodologia empregada permitiu a classificação da formação do biofilme das cepas nas seguintes categorias (STEPANOVIC et al., 2007):

$D.O.c = A \text{ média da D.O do controle negativo} + (3x \text{ Desvio Padrão da média})$

- Não-Produtor: $D.O.i < D.O.c$;
- Fraco Produtor: $D.O.c < D.O.i \leq (2X D.O.c)$;
- Moderado Produtor: $(2X D.O.c) < D.O.i \leq (4X D.O.c)$;
- Forte Produtor: $(4X D.O.c) < D.O.i$.

5.3.7 Avaliação da atividade antibiofilme da fração Ag2 em *Candida* spp.

A fração foi testada nas concentrações de 2,5 mg/mL e 1,25 mg/mL para a atividade antibiofilme. Na avaliação foi considerado o perfil da fração Ag2 do extrato metanólico frente a inibição do biofilme em formação e biofilme formado (maduro), estes foram testados também em microplaca de 96 poços de fundo chato. Neste teste, foi incluído a concentração de Anfotericina B (fungicida) como teste controle para inibição completa do crescimento do microrganismo.

Para a fase de adesão do biofilme, foram depositados 100 µL do inóculo em uma microplaca estéril de 96 poços de fundo chato, a qual foi incubada por 90 minutos sob agitação de 75 rpm a 37 °C; Em seguida, para os ensaios antibiofilme, a microplaca foi lavada 2x (duas vezes) com 150 µL de PBS (segundo o preparo no item 5.3.5).

Para a análise da atividade antibiofilme utilizou-se da metodologia de Barbosa et al. (2019), com modificações. Assim, para o biofilme em formação, foi adicionado 100 µL do meio YNB (Himedia, Índia) mais 100 µL de Ag2 no dobro das concentrações (5 mg/mL e 2,5 mg/mL) para obtenção das concentrações de interesse (2,5 mg/mL e 1,25 mg/mL) e incubadas por 24 h sob agitação de 75 rpm a 37 °C. Paralelamente, para o biofilme maduro, na microplaca de 96 poços de fundo chato, foram colocados 100 µL do meio YNB (Himedia, Índia) e incubados também por 24h sob agitação de 75 rpm a 37 °C. Posteriormente, a placa foi lavada 2x com 150 µL PBS e foram adicionados 100 µL das concentrações diluídas da fração Ag2 em 100 µL do meio YNB (2,5 mg/mL e 1,25 mg/mL), por fim, incubadas por 24 h sob agitação de 75 rpm a 37 °C. Ressalta-se que nesse experimento usou-se apenas as cepas que foram moderadas produtoras de biofilme de acordo com a metodologia do item 5.3.6, sendo assim, não necessitou de um controle específico para inferir a produção do biofilme das amostras. Em seguida, o biofilme pós-tratado foi quantificado segundo o item 5.3.6.

Para a análise da inibição da viabilidade celular do biofilme (pós-tratado), a porcentagem de inibição seguiu a fórmula de Jadhav et al. (2013) com adaptações para a substância estudada, a fim de retirar a interferência colorimétrica das concentrações utilizadas das densidades ópticas do teste. Assim, essas foram medidas pelos poços que continham apenas o meio e a substância (controle da substância). Desta maneira, temos:

$$\% \text{ de inibição do biofilme} = 100 - \frac{\text{D.O da amostra tratada}}{\text{D.o poço controle da substância}} \times 100$$

A porcentagem de inibição foi considerada aquela concentração da substância que demonstrou 50% ($IC_{50\%}$) ou mais de inibição do biofilme em formação e consolidado (maduro). Todos ensaios foram feitos em triplicata para uma maior confiabilidade.

5.3.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para analisar a interação da fração Ag2 do extrato metanólico da *Agelas dispar* com o biofilme das cepas de *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida glabrata* (ATCC 2001) e *Candida parapsilosis* (especificamente, a amostra 50) utilizou-se da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os inóculos das leveduras foram ajustados igualmente ao ensaio da formação do biofilme, assim, a suspensão dos inóculos, procedimentos de adesão celular à placa de poliestireno e a lavagem foram realizadas conforme descrito no tópico 5.3.5. Por conseguinte, o tratamento com as concentrações, 1,25 mg/mL e 2,5 mg/mL, no biofilme em formação e maduro seguiram a metodologia descrita no item 5.3.7.

Desta maneira, utilizando-se da metodologia adaptada por Barbosa e colaboradores (2019), as suspensões obtidas foram fixadas com 300 μ L de glutaraldeído a 2% em microplacas de poliestireno de 24 poços (JET BIOFIL®, China) contendo lamínulas para a montagem do biofilme, em seguida, a placa foi colocada em repouso por 30 min em temperatura ambiente para a secagem do material. Posteriormente, o glutaraldeído foi retirado completamente dos poços e os mesmos foram submetidos a 300 μ L de etanol a 30% durante 15 min, iniciando o processo de desidratação. Em seguida, a placa foi lavada com concentrações progressivas de álcool (50%, 70%, 90% e 100%) em intervalos de 15min para cada concentração e por fim, após retirar o etanol a 100%, a placa foi incubada em estufa à 37 °C por 24 h para a secagem. Prosseguindo, foram realizados os mesmos processos de lavagem, fixação e desidratação na placa do biofilme por mais 24 h à 37 °C. Seguidamente, as lamínulas foram retiradas, secas, coladas em lâminas de microscopia e metalizadas com ouro 24k, e posteriormente submetidas a visualização no aparelho do MEV (JEOL, JSM 5600LV, Japão). Para o controle dos espécimes, utilizou-se apenas das leveduras analisadas.

Os ensaios de MEV foram realizados em colaboração com o Departamento de Diagnóstico Oral - Laboratório de Microbiologia e Imunologia pertencente a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP - SP). Todos os experimentos foram realizados em duplicata, pela doutoranda Janaina Priscila Barbosa, com a supervisão do Prof. Dr. José Francisco Höfling.

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos ensaios de CIM e CFM foram analisados por meio de estatística descritiva e inferencial. Para a formação do biofilme e a atividade antibiofilme da fração Ag2 do extrato metanólico da *A. dispar*, foram realizadas avaliações comparativas, utilizando a análise estatística de variância (ANOVA) com variação Dunnett, bilateral ($p < 0,05$) ($p < 0,01$) ($p < 0,0001$). Nesta pesquisa, os dados obtidos foram plotados em tabelas e gráficos, utilizando o Microsoft excel® versão 2010 e o programa GraphPad Prism versão 7.0.

6. RESULTADOS

6.1 Identificação dos metabólitos secundários da fração Ag2

Os metabólitos da esponja foram identificados por técnicas cromatográficas clássicas, de modo que o metabólito secundário encontrado na fração Ag2 na maior quantidade foi o ácido 4,5-dibromopirrol-2-carboxílico (Figura 7), considerado o principal composto para a amostra estudada. Além destes, agelasidina A, oroidina, manzacidina A, Bromohimemialsidina, entre outros, também foram indicados de acordo com a avaliação química. As estruturas químicas dos compostos encontrados são mostradas na figura 8.

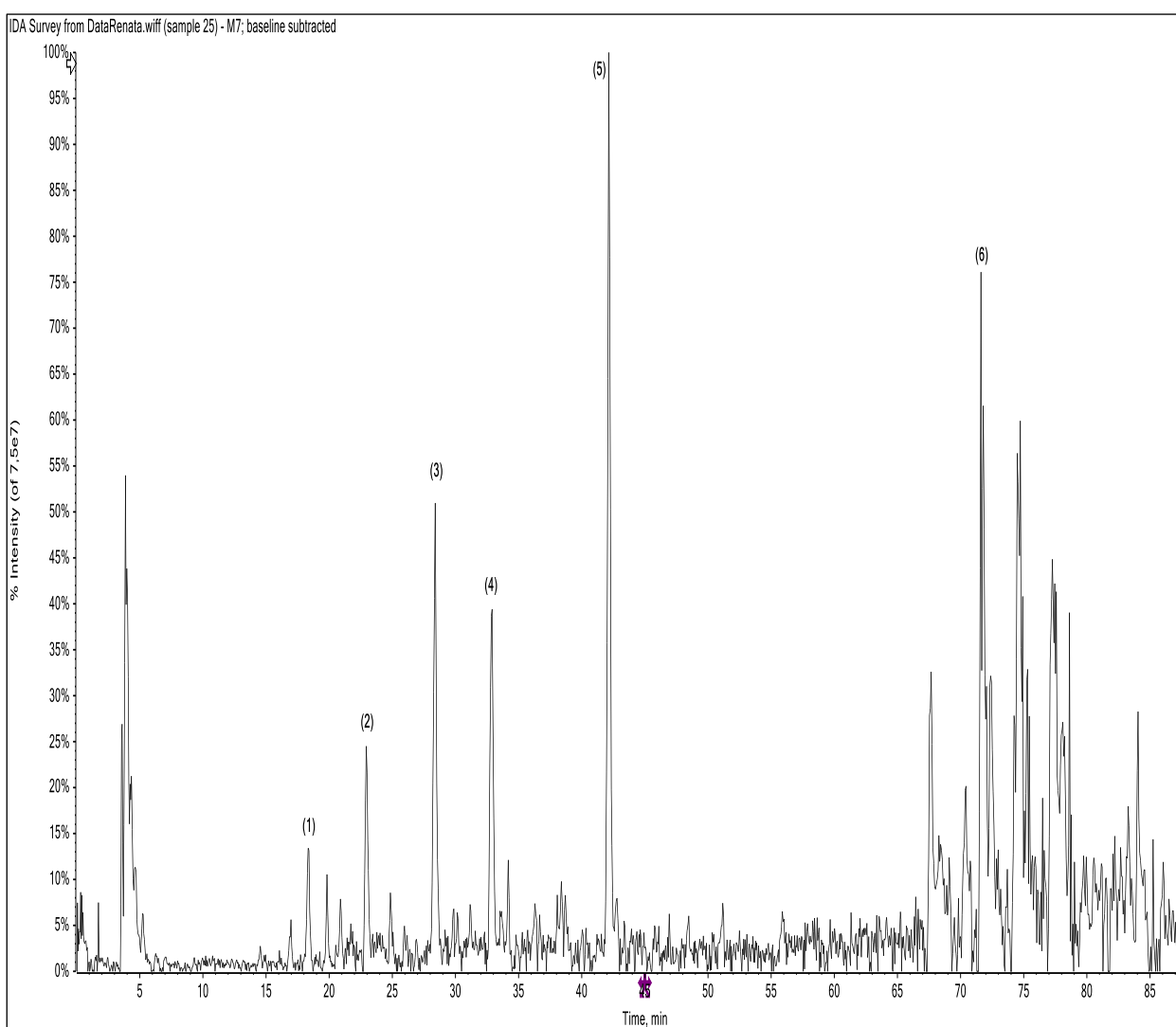


Figura 7. Caracterização dos compostos presentes em Ag2 com base nas fragmentações disponíveis nos espectros HPLC/MS e MS/MS de cada pico do cromatograma.

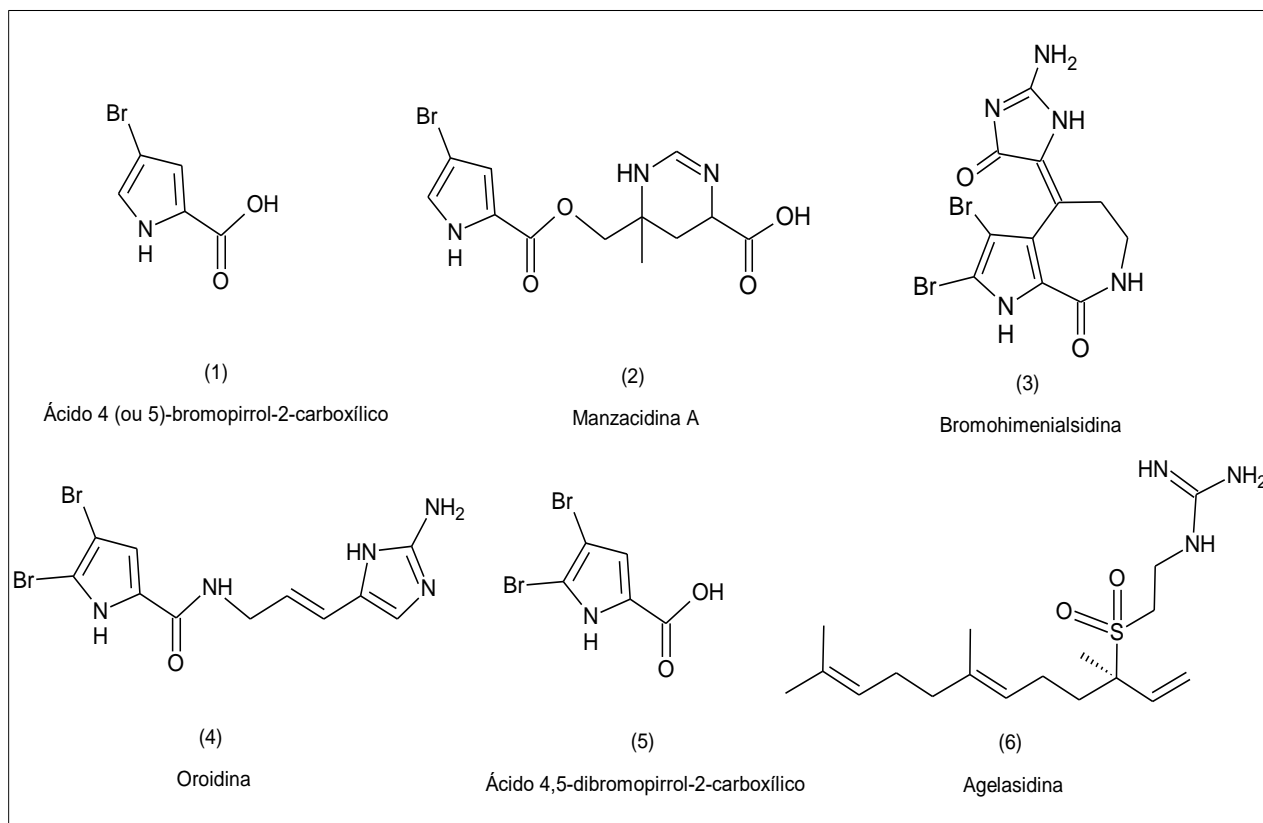


Figura 8. Substâncias químicas identificadas por HPLC-MS-MS, modo negativo, a partir da fração Ag2 da partição do extrato metanólico de *A. dispar*.

6.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Os resultados do ensaio da avaliação da atividade antifúngica da fração Ag2 frente a cepas de *Candida* spp. estão expressos na tabela 1. A CIM foi considerada aquela capaz de inibir 90% do crescimento fúngico. Os valores da CIM encontrados para o composto mostraram ser variáveis, sendo que 5 cepas (38%) das 13 estirpes de espécies de *Candida* apresentaram sensibilidade em 0,625 mg/mL. A CIM para as outras espécies foram de 2,5 mg/mL (7,7 %), 1,25 mg/mL (23,1 %), 0,3125 mg/mL (15,4 %), 0,1562 mg/mL (15,4 %). Todas as 13 cepas de leveduras apresentaram-se sensíveis na faixa de concentração de 2,5 mg/mL e 5,0 mg/mL da fração Ag2 do extrato de *Agelas dispar*, sendo capazes de inibir por completo o crescimento dos microrganismos.

Posteriormente, a fim de avaliar a natureza bioativa da substância, foi realizado o ensaio de Concentração Fungicida Mínima – CFM. Com o objetivo de comprovar que os resultados

evidenciados na CIM foram pertinentes ao perfil fungicida da substância. No qual os resultados estão dispostos na tabela 1.

Tabela 1. Resultados da avaliação da CIM (mg/mL) e da CFM (mg/mL) da fração Ag2 sobre espécies de *Candida*.

Cepas fúngicas	Ag2- CIM (10mg/mL)	Ag2-CFM (10mg/mL)	Anfotericina B (16µg/mL)	Controle leveduras
<i>C. albicans</i> ATCC90028	1,25	5,0	-	+
<i>C. tropicalis</i> ATCC13803	0,3125	0,3125	-	+
<i>C. krusei</i> ATCC6258	0,3125	1,25	-	+
<i>C. glabrata</i> ATCC2001	0,15625	0,625	-	+
<i>C. parapsilosis</i> ATCC22019	2,5	2,5	-	+
<i>C. orthopsilosis</i> – 15	0,625	2,5	-	+
<i>C. parapsilosis</i> – 21	0,15625	0,3125	-	+
<i>C. parapsilosis</i> – 28	0,625	2,5	-	+
<i>C. parapsilosis</i> – 31	1,25	5,0	-	+
<i>C. parapsilosis</i> – 33	1,25	5,0	-	+
<i>C. tropicalis</i> – 40	0,625	1,25	-	+
<i>C. parapsilosis</i> – 50	0,625	1,25	-	+
<i>C. parapsilosis</i> – 58	0,625	2,5	-	+

CIM- Concentração Inibitória Mínima. CFM- Concentração Fungicida Mínima. (+) presença do crescimento de leveduras. (-) ausência do crescimento de leveduras. Fonte: Pesquisa Direta, 2019.

A CFM da fração Ag2 do extrato metanólico de *Agelas dispar* sobre às cepas de *Candida* spp., mostrou-se variável entre 0,3125 mg/mL a 5,0 mg/mL. Foi observado que a CFM do composto estudado correspondeu a 5,0 mg/mL em 23,1 %, 2,5 mg/mL (30,7 %), 1,25 mg/mL (23,1 %), 0,625 mg/mL (7,7 %) e 0,3125 mg/mL (15,4 %) das cepas de *Candida* spp. estudadas.

Para a classificação do composto estudado, como fungicida ou fungistático, utilizou-se da metodologia de Siddiqui e colaboradores (2013), o qual determina que quando calcularmos a razão entre CFM/CIM podemos encontrar o caráter de sua ação. Assim, quando a razão é um valor ≤ 4 (menor ou igual a 4) o efeito é caracterizado como fungicida, entretanto se for > 4 (maior que 4) a substância apresentará um perfil fungistático. Desta forma, para a classificação no perfil fungicida ou fungistático das concentrações da fração do extrato, foi demonstrado que sua natureza é fungicida, já que a razão obtida entre CFM/CIM foi menor ou igual a 4.

Outros critérios como, o de Isenberg (1992), relata que a natureza fungicida da substância é estabelecida pela relação CIM = CFM ou CFM = 1, 2 ou 3 diluições acima da CIM, sendo atribuída a atividade fungicida, assim resultados de CFM com diluições maiores que 3 serão consideradas com um perfil fungistático. Para tanto, utilizando-se deste outro parâmetro os resultados aqui relatados também se mostraram com perfil fungicida, visto que as CFM foram iguais ou até 3 diluições acima da CIM.

Adicionalmente, os controles dos testes (CIM e CFM) foram utilizados para a validação do caráter e da ação do composto Ag2. Desta forma, o controle positivo foi aplicado (Anfotericina B) para a inibição do crescimento fúngico. O controle de crescimento da levedura aplicado nos ensaios, evidenciou a viabilidade das cepas e a adição do diluente (DMSO), demonstrou que a atividade antifúngica vista no composto ocorreu apenas pela ação dos constituintes da fração Ag2 do extrato de *Agelas dispar*.

6.3 Avaliação da capacidade de formação de Biofilme nas cepas de *Candida* spp.

Os resultados dos testes indicaram que, as 13 cepas (100%) foram produtoras de biofilme. Dez (77%) foram fracas produtoras de biofilmes e 3 (23%) demonstraram uma produção moderada. Ao detalhar o tipo de produção, as cepas *C. albicans* (ATCC 90028) apresentou DO_{570nm} de $0,092 \pm 0,002$, *C. tropicalis* (ATCC 13803) DO_{570nm} $0,07 \pm 0$, *C. parapsilosis* (ATCC 22019) DO_{570nm} $0,064 \pm 0,002$, as amostras 15, 21, 28, 31, 33, 40 e 58 apresentaram D.O variando entre 0,062 e 0,078, todas as cepas foram fracas produtoras de biofilme. Por conseguinte, as produtoras moderadas foram as espécies de *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida glabrata* (ATCC 2001) e a *C. parapsilosis* (amostra 50). Destacou-se a notável formação do biofilme na amostra 50 (*C. parapsilosis*), que ao comparar as outras cepas, apresentou valores de produção superiores e relevantes (DO_{570nm} $0,186 \pm 0,013$). Todos os resultados foram comparados com o controle tratado da mesma forma, porém sem o inóculo e estão dispostos na Figura 9 (A e B).

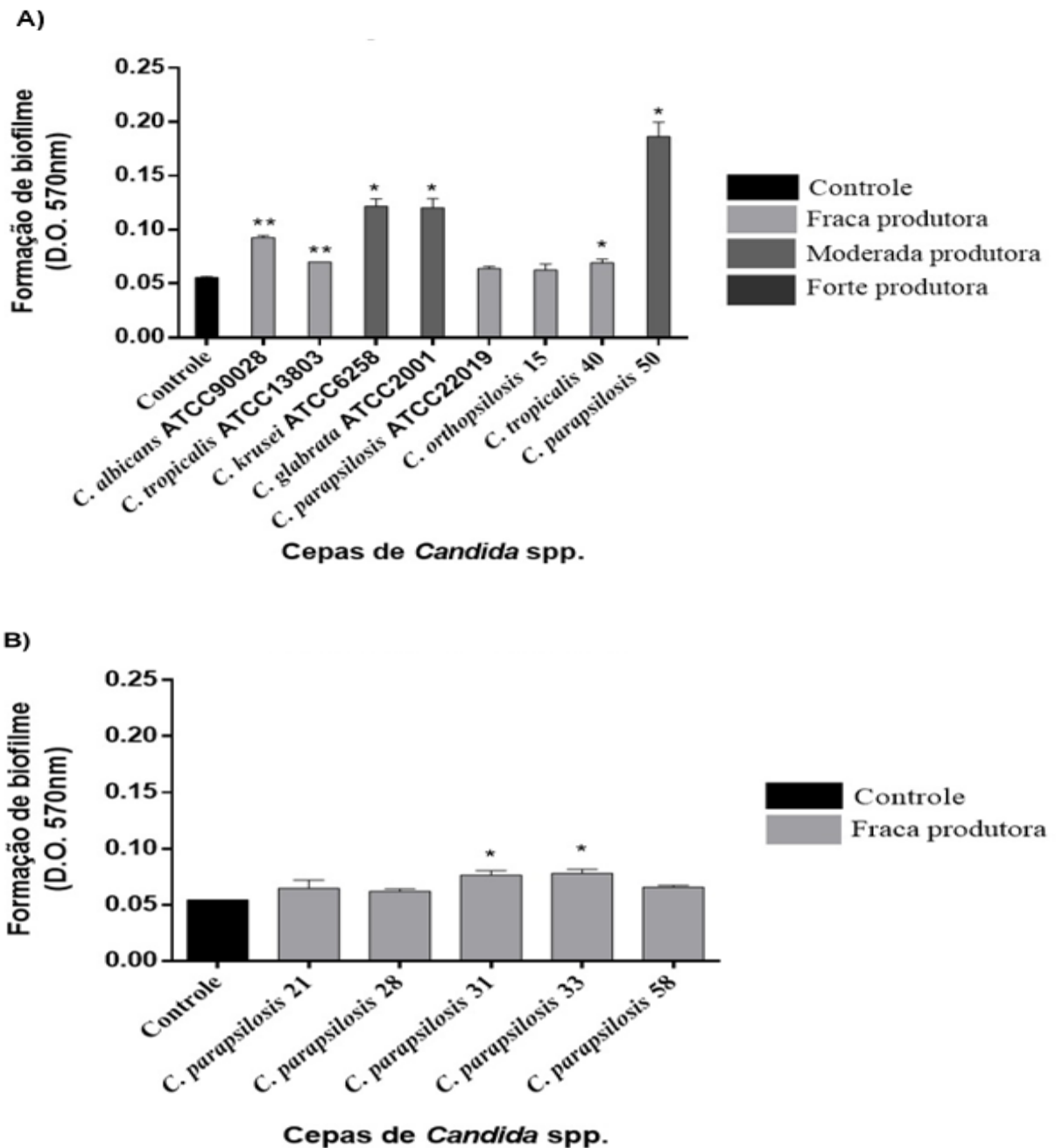


Figura 9. Formação de biofilmes das espécies de *Candida* expressas pelos valores médios da leitura da absorbância em 570nm do cristal violeta usado na coloração. **A e B:** Gráficos da formação do biofilme quantitativamente das cepas: 15, 21, 28, 31, 33, 40, 50, 58 e as cepas de referência *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida tropicalis* (ATCC 13803), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida glabrata* (ATCC 2001) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019). Significância estatística *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$. Teste ANOVA 1 com critério, variação de Dunnett.

6.4 Determinação da atividade antibiofilme da fração Ag2 do extrato metanólico de *Agelas dispar*

As cepas de *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida glabrata* (ATCC 2001) e *Candida parapsilosis* (Amostra 50) que apresentaram formação moderada do biofilme, foram submetidas ao tratamento com a fração Ag2 do extrato metanólico de *Agelas dispar*. O composto foi testado nas concentrações de 1,25 mg/mL e 2,5 mg/mL contra o biofilme em formação e maduro das espécies avaliadas. As concentrações escolhidas foram aquelas com ação intermediária na CIM, para que não houvesse a eliminação completa do microrganismo durante os testes da atividade antibiofilme. A quantificação foi feita pela leitura da densidade óptica (DO_{570nm}) obtida após a coloração com o cristal violeta e a porcentagem da inibição da viabilidade celular da estrutura microbiana seguiu a fórmula avaliativa de Jadhav et al. (2013) com adaptações.

Desta maneira, quando comparado ao grupo controle (tratado com anfotericina B) e utilizando o critério da capacidade da porcentagem de inibição em 50% (IC_{50%}), o biofilme de *Candida krusei* em formação pós-tratado com o composto na concentração de 1,25 mg/mL não demonstrou ser bioativo em inibir a formação do biofilme, obtendo um valor de 49,6% ± 1,69 de inibição da viabilidade celular e o crescimento fúngico em 50,4%. Quando utilizado o composto na concentração de 2,5 mg/mL, a *C. krusei* apresentou baixa atividade metabólica com 23,7% de viabilidade celular do biofilme, sendo o composto com atividade de inibição do crescimento fúngico em 76,3% ± 1,31 (Figura 10).

Para a *Candida glabrata*, em 1,25 mg/mL o composto conseguiu inibir 57,6 % ± 1,20 da formação da comunidade fúngica, em 2,5mg/mL cerca de 73,2% ± 1,68. O mesmo perfil inibitório das diferentes concentrações utilizadas também foi visto na formação do biofilme para *Candida parapsilosis* (amostra 50), apontando valores de 57,1% ± 2,16 e 70,5% ± 1,42, respectivamente nas concentrações de 1,25 mg/mL e 2,5 mg/mL. Os resultados da atividade antibiofilme das concentrações (1,25 mg/mL e 2,5 mg/mL) da fração Ag2 do extrato metanólico da *A. dispar* avaliadas frente ao biofilme em formação de *Candida* spp. (p<0,001) estão dispostas na figura 10. Todos os testes foram comparados com o controle.

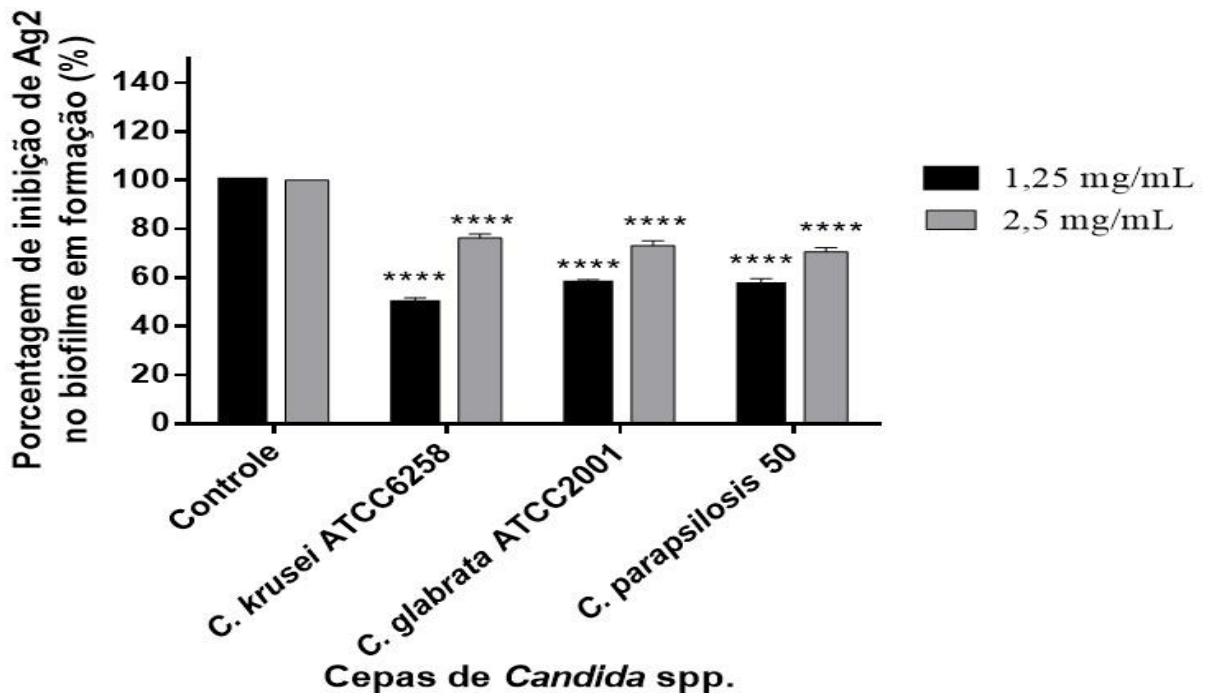


Figura 10. Inibição da viabilidade celular (%) dos biofilmes em formação. Biofilme em formação de *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida glabrata* (ATCC 2001) e a amostra 50 (*C. parapsilosis*) pós-tratados com a fração Ag2 do extrato metanólico de *Agelas dispar* (1,25 mg/mL e 2,5 mg/mL). ****Significância estatística $p < 0,0001$. Teste ANOVA 1 com critério, variação de Dunnett.

Posteriormente ao avaliar a capacidade inibitória das concentrações da fração Ag2 do extrato de *Agelas dispar* sobre o biofilme maduro (consolidado), observou-se que a concentração de 1,25 mg/mL não foi capaz de inibir 50% do biofilme formado em *C. parapsilosis* 50 ($42,8\% \pm 5,63$), assim a comunidade microbiana se manteve em $57,2\%$. Para as demais cepas, a mesma concentração obteve ótimos resultados, em *Candida krusei* ATCC 6258 ($67,2\% \pm 0,88$) e *Candida glabrata* ATCC 2001 ($65,4\% \pm 0,92$) indicando diminuição na biomassa do biofilme formado das leveduras.

Na concentração de 2,5 mg/mL todas as cepas apresentaram biofilmes maduros suscetíveis a fração Ag2, perfazendo a porcentagem de inibição da viabilidade celular em: $78,8\% \pm 0,84$, $76,2\% \pm 1,26$ e $63,3\% \pm 2,77$, respectivamente em *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* 50. Todas as concentrações testadas da fração do extrato da esponja tiveram diferença estatística quando comparadas ao controle ($p < 0,001$) (Figura 11). Todos os testes foram comparados com o controle.

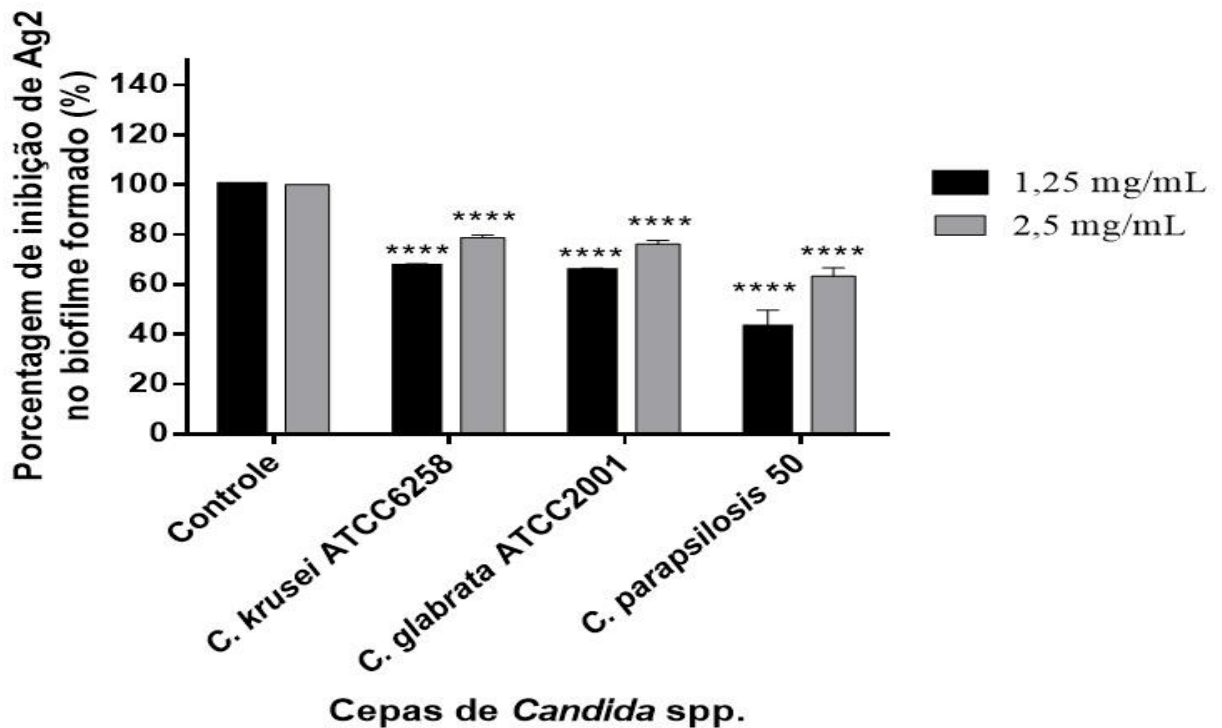


Figura 11. Inibição da viabilidade celular (%) dos biofilmes formados (maduros). Biofilmes maduros de *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida glabrata* (ATCC 2001) e a amostra 50 (*C. parapsilosis*) pós-tratados com a fração Ag2 do extrato metanólico de *Agelas dispar* (1,25 mg/mL e 2,5 mg/mL). ****Significância estatística $p < 0,0001$. Teste ANOVA 1 com critério, variação de Dunnett.

6.5 Análise morfológica da formação do biofilme por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

6.5.1 Biofilme em formação exposto a fração Ag2 do extrato de *Agelas dispar*

A fim de confirmar os resultados encontrados na formação e na atividade antibiofilme das cepas produtoras moderadas foram realizadas as análises pela microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens obtidas pelo MEV mostrando o crescimento do biofilme em formação das cepas: *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida glabrata* (ATCC 2001) e *Candida parapsilosis* (Amostra 50), bem como aqueles associados aos pós-tratamentos com as concentrações de 1,25 mg/mL e 2,5 mg/mL da fração Ag2 do extrato metanólico de *Agelas dispar* estão dispostas nas figuras 12, 13 e 14.

Os resultados dos controles demonstraram que o biofilme em formação da *C. krusei* apresentou aglomerados de blastoconídios em sua camada basal, um fino revestimento extrapolimérico e poucas formações de pseudo-hifas (Figura 12 a, b). Para a *C. glabrata*

mostraram-se células com morfologias intactas (Figura 13 a, b) e para a *C. parapsilosis* uma menor quantidade de blastosporos, em contrapartida a espécie produziu pseudo-hifas agrupadas em quantidades substanciais do biofilme em formação (Figuras 14 a, b).

Quando tratadas com a fração do extrato de *A. dispar* na concentração de 1,25 mg/mL observou-se a diminuição quantitativa das estruturas leveduriformes em todas as cepas submetidas ao composto. Sendo possível identificar as alterações morfológicas de algumas células da *C. krusei*, apresentando deformidades e extravasamentos celulares, perdendo sua forma original (Figura 12 c, d). Para a *C. glabrata*, a concentração de 1,25 mg/mL conseguiu diminuir a quantidade de células viáveis e seus agrupamentos celulares, obtendo blastosporos livres e uma superfície homogênea (Figura 13 c, d). Este perfil de atividade antibiofilme foi acentuado para a estirpe de *C. parapsilosis*, na qual constatou-se a destruição das estruturas hifálicas e agrupamentos dos blastosporos com deformidades, rugosidades e extravasamentos do seu material intracelular (Figura 14 c, d).

Por conseguinte, a concentração de 2,5 mg/mL proporcionou uma maior visualização da interação do composto com as estruturas fúngicas. Desta forma, para a *C. krusei* a substância conseguiu aderir a superfície celular da levedura, proporcionando a separação da comunidade microbiana e conseqüentemente a perda celular (Figura 12 e, f). Ao avaliar o efeito da concentração na cepa de *C. glabrata*, notou-se que o composto apenas atuou na diminuição dos agrupamentos do biofilme, gerando uma maior quantidade células livres e sem alterações morfológicas aparentes (Figura 13 e, f). Para a *C. parapsilosis* (amostra 50), a sua densidade celular apresentou uma maior suscetibilidade para a concentração empregada quando comparada com as outras espécies de *Candida* utilizadas no estudo, assim, detectou-se a destruição da membrana plasmática, deformidades morfológicas, extravasamento celular acentuado, eliminação dos agregados celulares e conseqüentemente a diminuição da formação do biofilme (Figura 14 e, f). Como já previsto, todas as amostras tratadas foram comparadas com seus respectivos controles.

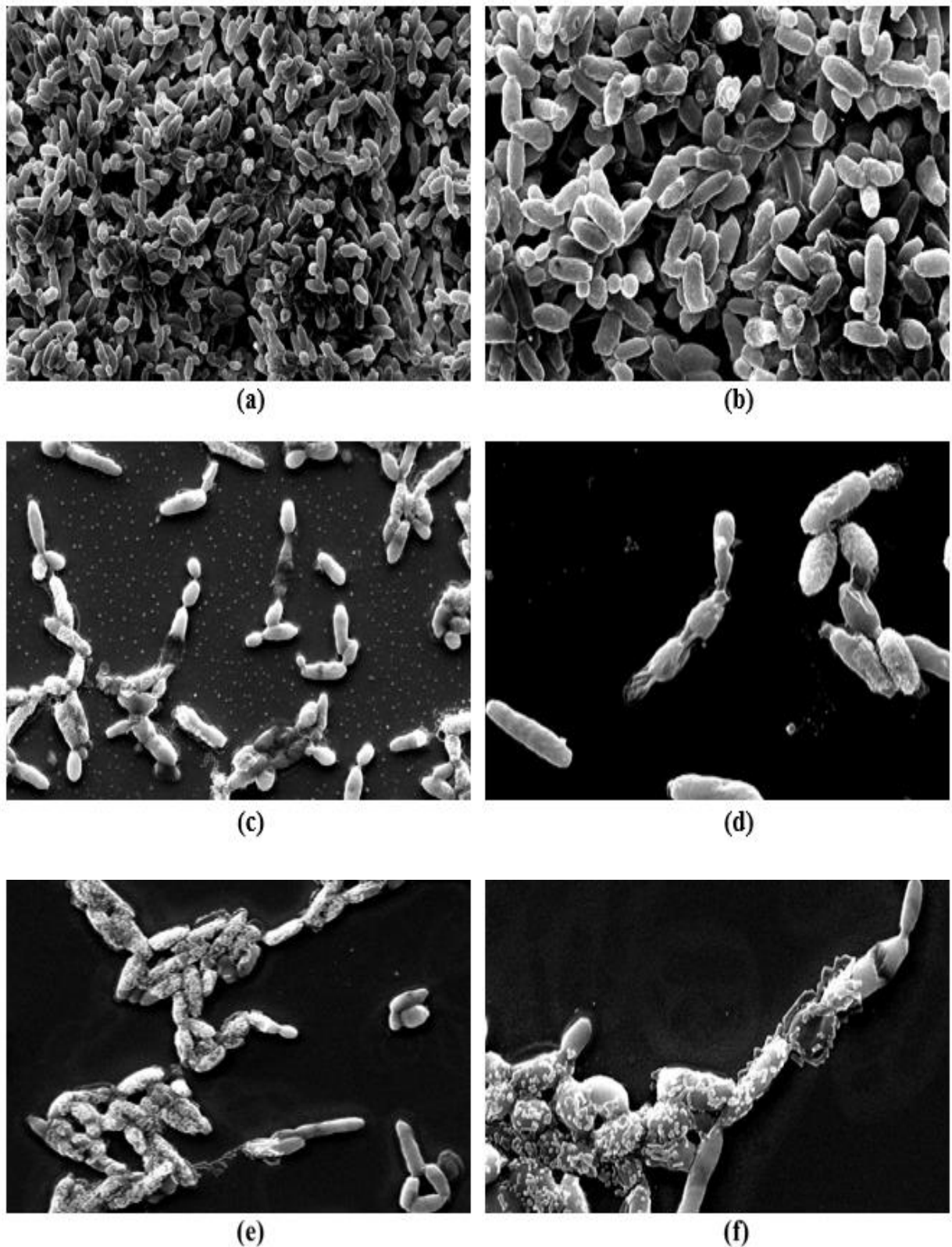


Figura 12. Micrografias MEV mostrando células do biofilme em formação de *C. krusei* (ATCC 6258) exposto a fração Ag2 do extrato de *A. dispar*. (a) e (b) Controle do biofilme em formação de *C. krusei* sem o tratamento. (c) e (d) Biofilme em formação de *C. krusei* exposto a fração Ag2 a 1,25 mg/mL. (e) e (f) Biofilme em formação de *C. krusei* exposto a fração Ag2 a 2,5 mg/mL. Ampliações originais: 1.500x, 2.500x e 3.000x.

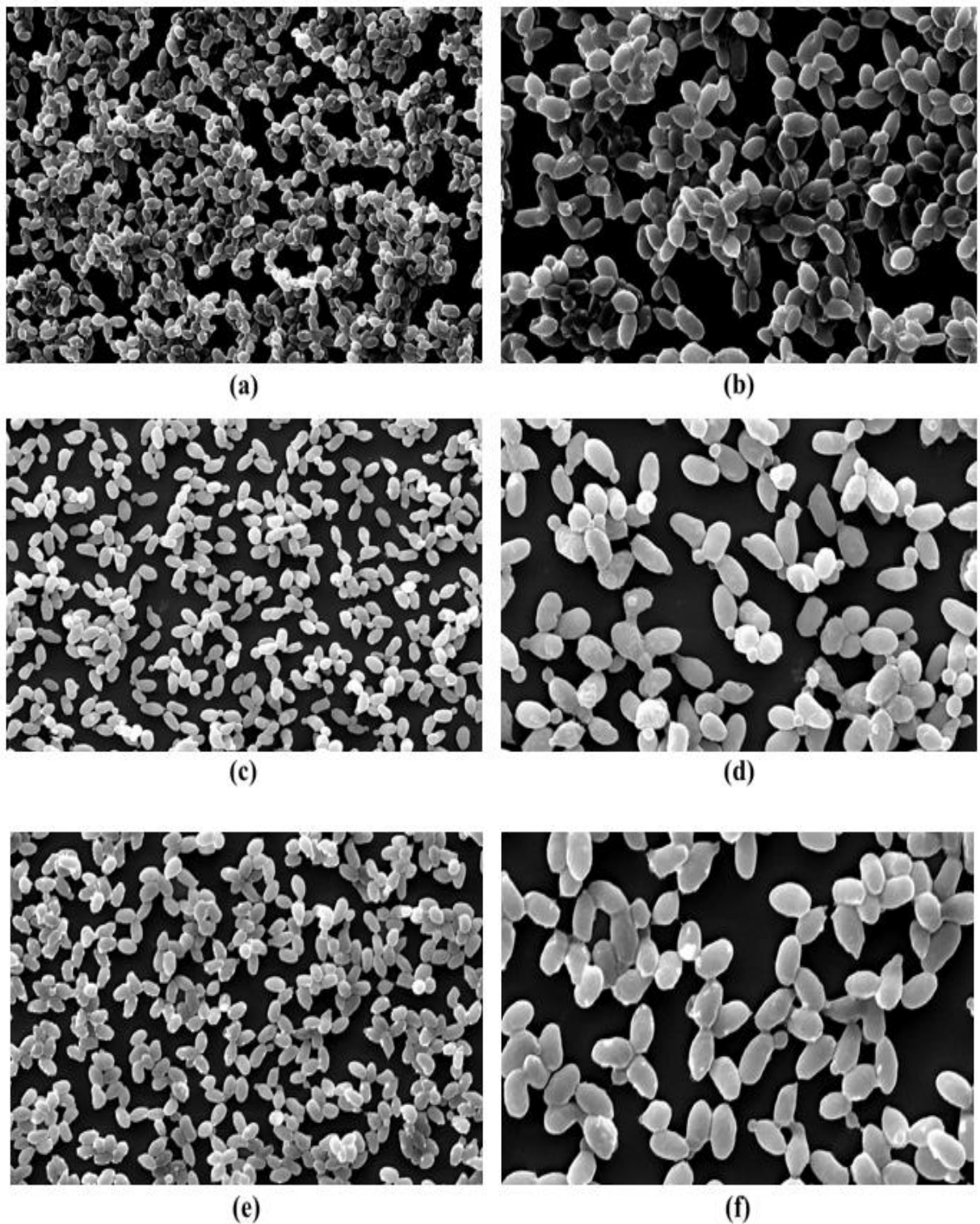


Figura 13. Micrografias MEV mostrando células do biofilme em formação de *C. glabrata* (ATCC 2001) exposto a fração Ag2 do extrato de *A. dispar*. (a) e (b) Controle do biofilme em formação de *C. glabrata* sem o tratamento. (c) e (d) Biofilme em formação de *C. glabrata* exposto a fração Ag2 a 1,25 mg/mL. (e) e (f) Biofilme em formação de *C. glabrata* exposto a fração Ag2 a 2,5 mg/mL. Ampliações originais: 1.500x, 2.500x e 3.000x.

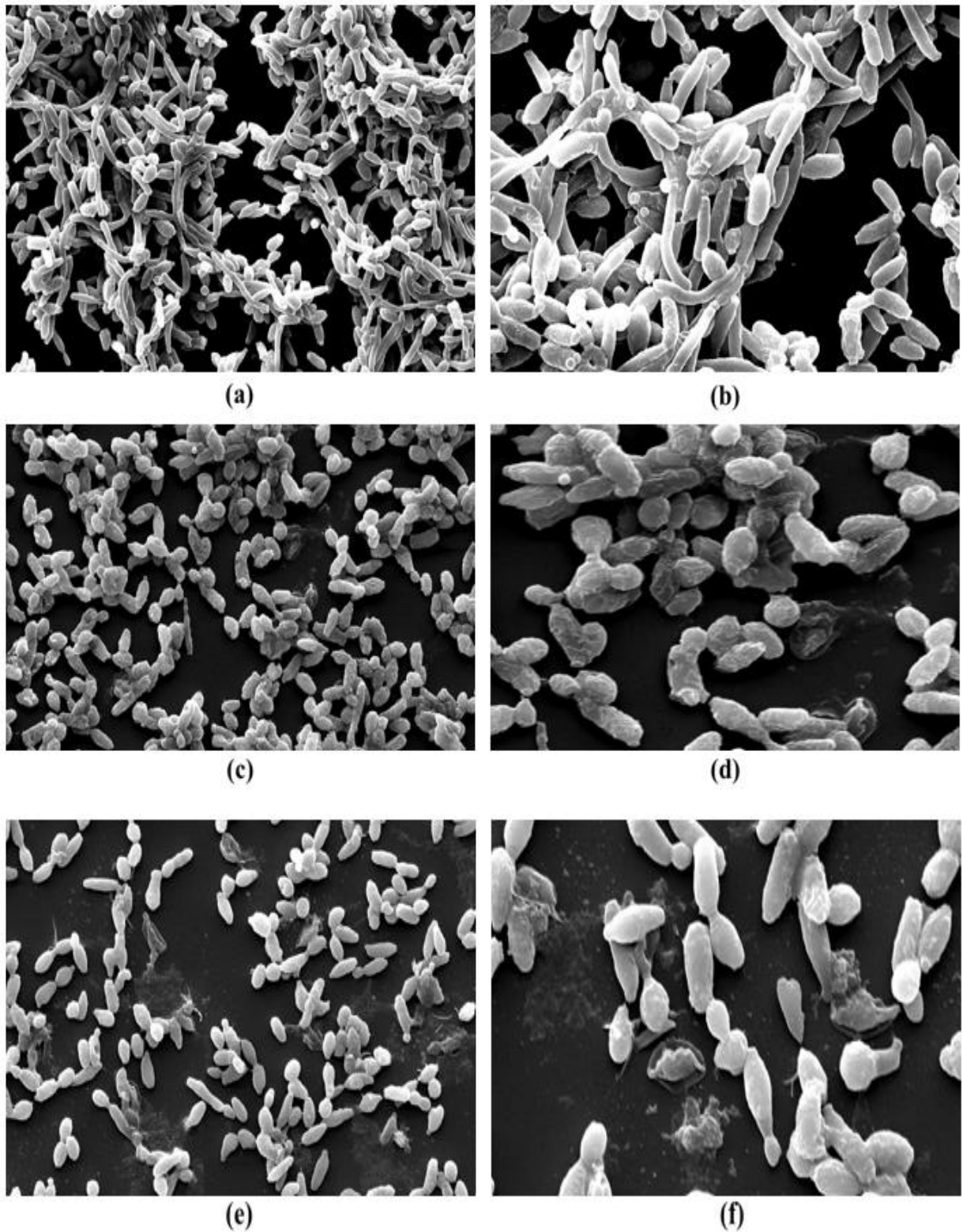


Figura 14. Micrografias MEV mostrando células do biofilme em formação de *C. parapsilosis* (Amostra 50) exposto a fração Ag2 do extrato de *A. dispar*. (a) e (b) Controle do biofilme em formação de *C. parapsilosis* sem o tratamento. (c) e (d) Biofilme em formação de *C. parapsilosis* exposto a fração Ag2 a 1,25 mg/mL. (e) e (f) Biofilme em formação de *C. parapsilosis* exposto a fração Ag2 a 2,5 mg/mL. Ampliações originais: 1.500x, 2.500x e 3.000x.

6.5.2 Biofilme maduro exposto a fração Ag2 do extrato de *Agelas dispar*

As análises de microscopia eletrônica de varredura no biofilme maduro das cepas de *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida glabrata* (ATCC 2001) e *Candida parapsilosis* (Amostra 50) e seus respectivos tratamentos (1,25 mg/mL e 2,5 mg/mL) empregados no estudo estão apresentadas nas figuras 15, 16 e 17. As ultraestruturas maduras dos espécimes de *C. krusei* e *C. parapsilosis* apontaram uma densa rede de células com variedade morfológica (blastocónidios e pseudo-hifas) cobrindo toda a superfície avaliada apresentadas respectivamente nas figuras 15 (a, b) e 17 (a, b). O biofilme maduro da *C. glabrata* se mostrou apenas com brotamentos e blastocónidios, na qual proporcionou um biofilme espesso e de multicamada compacta com células co-agregadas (Figura 16 a, b).

Nas imagens do tratamento com a fração Ag2 do extrato metanólico da *A. dispar* na concentração de 1,25 mg/mL, em *C. krusei* constatou-se a diminuição do volume das células e pequenas deformidades com extravasamento celular (Figura 15 c, d). A diminuição quantitativa dos agregados celulares foi intensificada para *C. glabrata* reduzindo a comunidade microbiana formada (Figura 16 c, d). Para a cepa 50 (*C. parapsilosis*) foram observados apenas diminuição da biomassa celular da estrutura tridimensional (Figura 17 c, d).

Após o tratamento com 2,5 mg/mL, os brotamentos, blastocónidios e pseudo-hifas aglomeradas da cepa de *C. krusei* foram interferidas, rompidas, parcialmente destruídas e com extravasamentos celulares, na qual a fração Ag2 do extrato de *A. dispar* demonstrou possuir uma predisposição na eliminação da plasticidade morfológica da espécie. Ainda foi possível observar a agregação do composto na superfície da levedura envolvendo as células do biofilme maduro (Figura 15 e, f). Para *C. glabrata* notou-se poucos agrupamentos celulares, células leveduriformes livres na camada basal da superfície e alguns extravasamentos, proporcionando a diminuição do volume celular da biomassa do biofilme maduro quando exposto a concentração de 2,5 mg/mL (Figura 16 e, f). Em *C. parapsilosis* a quantidade de pseudo-hifas diminuiu consideravelmente, em comparação com seu controle. Ademais, extravasamentos e deformidades celulares também foram vistas no biofilme tratado (Figura 17 e, f). Todas as amostras tratadas foram comparadas com seus respectivos controles.

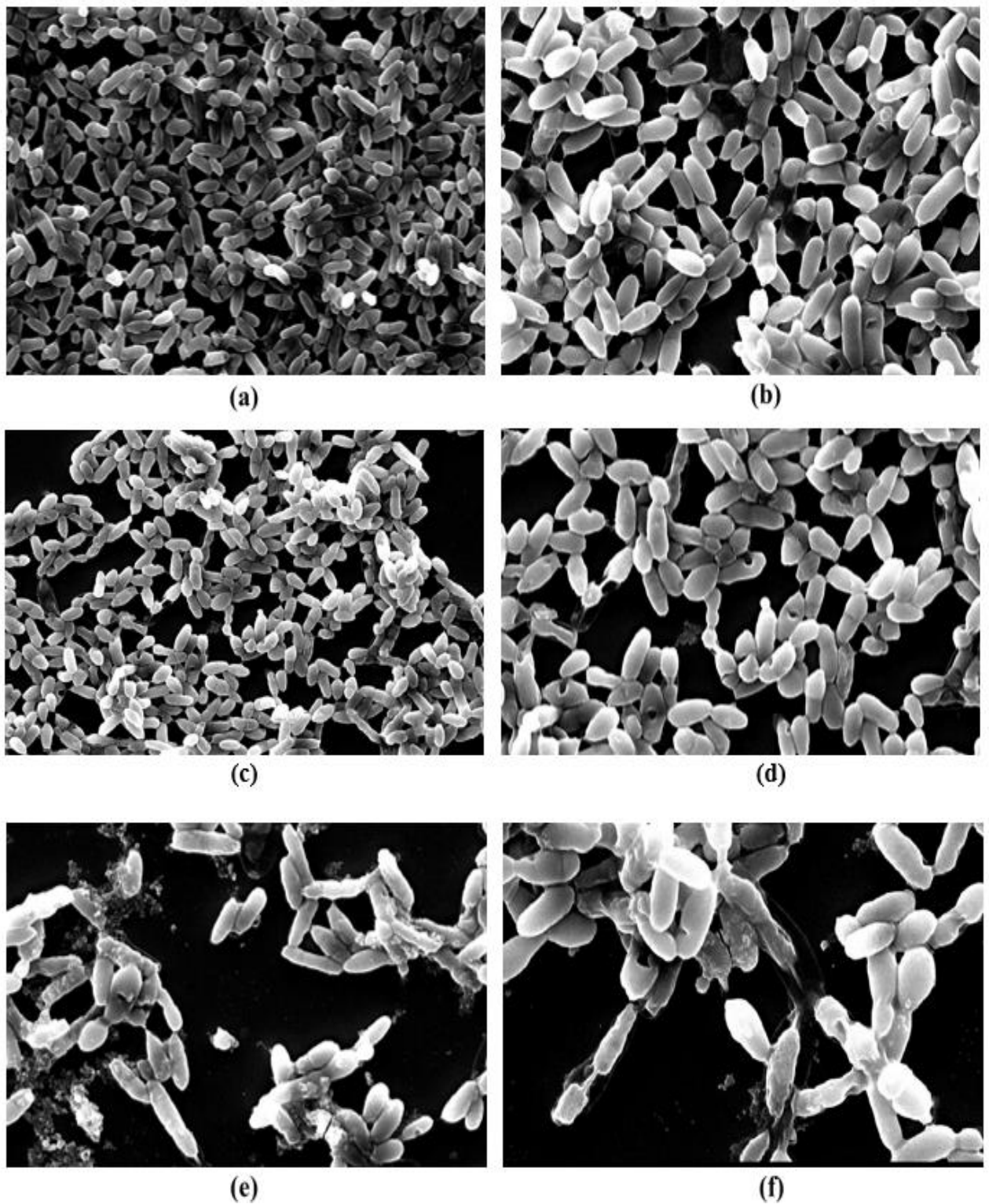


Figura 15. Micrografias MEV mostrando células do biofilme maduro de *C. krusei* (ATCC 6258) exposto a fração Ag2 do extrato de *A. dispar*. (a) e (b) Controle do biofilme maduro de *C. krusei* sem o tratamento. (c) e (d) Biofilme maduro de *C. krusei* exposto a fração Ag2 a 1,25 mg/mL. (e) e (f) Biofilme maduro de *C. krusei* exposto a fração Ag2 a 2,5 mg/mL. Ampliações originais: 1.500x, 2.500x e 3.000x.

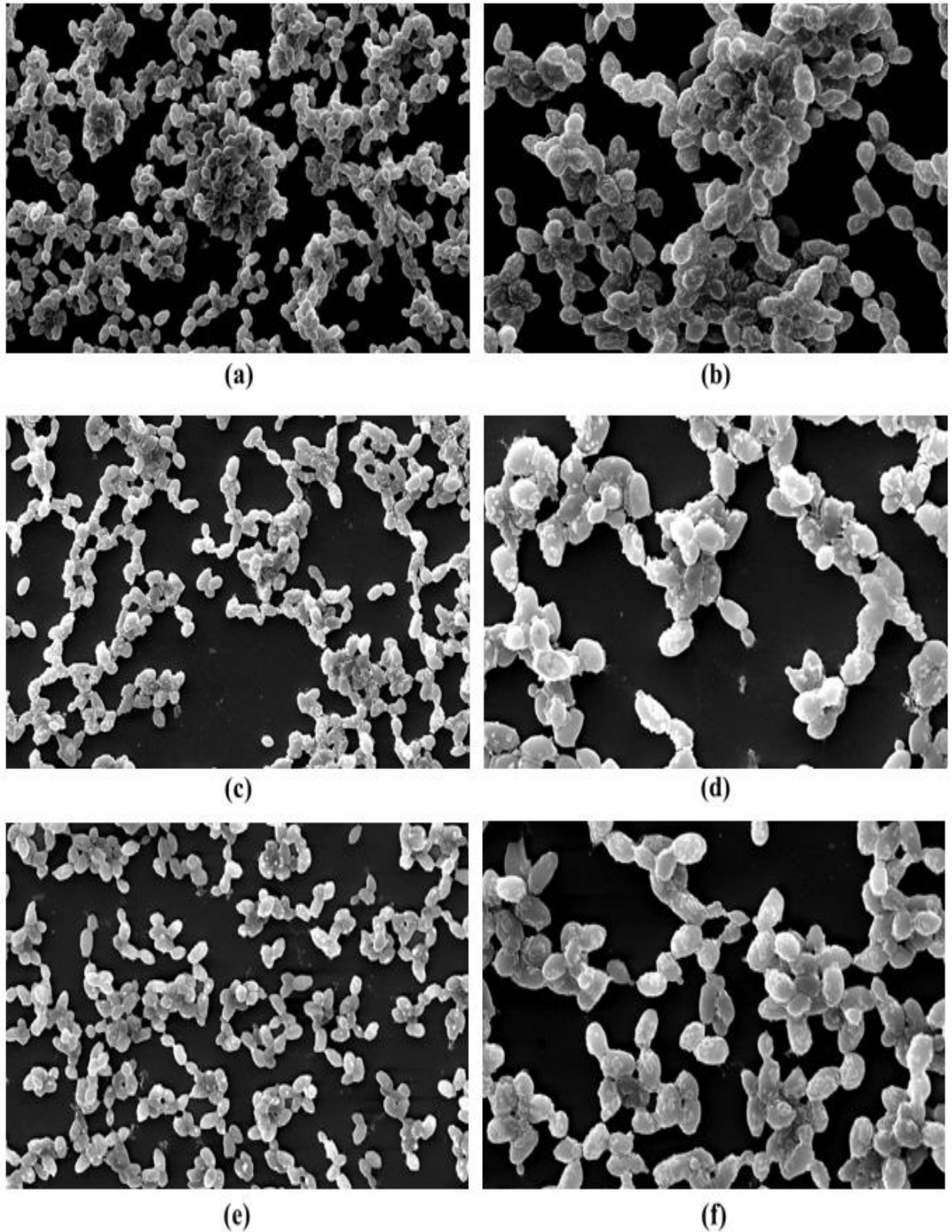


Figura 16. Micrografias MEV mostrando células do biofilme maduro de *C. glabrata* (ATCC 2001) exposto a fração Ag2 do extrato de *A. dispar*. (a) e (b) Controle do biofilme maduro de *C. glabrata* sem o tratamento. (c) e (d) Biofilme maduro de *C. glabrata* exposto a fração Ag2 a 1,25 mg/mL. (e) e (f) Biofilme maduro de *C. glabrata* exposto a fração Ag2 a 2,5 mg/mL. Ampliações originais: 1.500x, 2.500x e 3.000x.

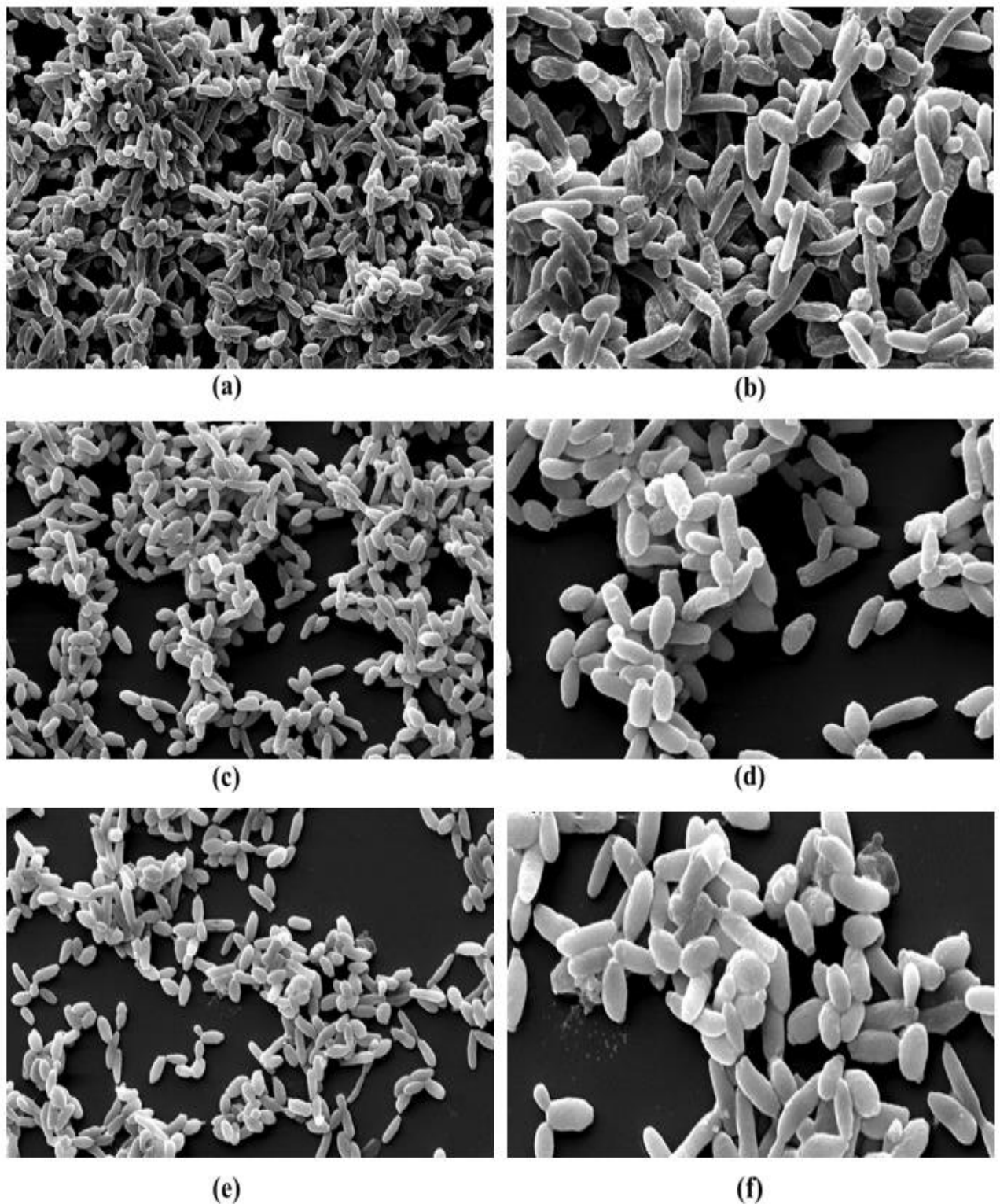


Figura 17. Micrografias MEV mostrando células do biofilme maduro de *C. parapsilosis* (Amostra 50) exposto a fração Ag2 do extrato de *A. dispar*. (a) e (b) Controle do biofilme maduro de *C. parapsilosis* sem o tratamento. (c) e (d) Biofilme maduro de *C. parapsilosis* exposto a fração Ag2 a 1,25 mg/mL. (e) e (f) Biofilme maduro de *C. parapsilosis* exposto a fração Ag2 a 2,5 mg/mL. Ampliações originais: 1.500x, 2.500x e 3.000x.

7. DISCUSSÃO

A busca incessante por compostos naturais, sintéticos ou semissintéticos promissores, que demonstrem atividade antimicrobiana e antibiofilme e que possam ser administrados com segurança para controle de infecções, vem motivando a realização de pesquisa científica, principalmente a tentativa de identificação de compostos antifúngicos. Uma vez que os microrganismos, rapidamente, vêm se mostrando resistentes a uma variedade de antimicrobianos empregados na prática clínica. A literatura vem reportando que, os produtos naturais de origem aquática fornecem uma variedade de compostos quimicamente bioativos, destacando-se as substâncias de ação antifúngica (BLUNT et al., 2017; EL-HOSSARY et al., 2017).

Dentre esses organismos aquáticos, as esponjas marinhas apresentam um arsenal de metabólitos secundários aos quais são atribuídos a atividade antimicrobiana, uma vez que apresentam ação citotóxica frente os microrganismos (TOUATI et al., 2007; BLUNT et al., 2016). Tal ação citotóxica, está diretamente relacionada com os subprodutos advindos dos metabólitos secundários, como pela quantidade de alcaloides esteroides insaturados e triterpenos pentacíclicos que estão presentes nas esponjas marinhas (RAMOS et al., 2015).

Neste estudo, avaliou-se a atividade antifúngica da fração Ag2 do extrato metanólico da esponja marinha *Agelas dispar*. Ressalta-se que, a espécie foi coletada no nordeste do Brasil e a escassez de trabalhos a respeito da *Agelas dispar* motivou a investigação da ação antifúngica e antibiofilme da substância avaliada. Assim, foi possível identificar um potencial antifúngico significativo na inibição e eliminação de diferentes espécies de *Candida*. O fato de as concentrações inibitórias mínimas mostrarem-se variáveis, entre 0,15625 mg/mL à 2,5 mg/mL, provavelmente se deve às grandes variações relacionadas com as particularidades fenotípicas e genotípicas de cada espécie de *Candida*, testada conforme mostrado na tabela 1. Resultados semelhantes foram relatados por Nazemi et al. (2014), que também encontraram variações nas CIM's, quando avaliaram a atividade antifúngica do extrato metanólico da esponja *Haliclona* sp. frente a isolados clínicos de *Candida albicans* (0.75 mg/mL) e *Aspergillus fumigatus* (2 mg/mL).

No presente estudo e considerando o perfil de resistência pela relação CFM/CIM, uma cepa de *C. albicans* (ATCC 90028) e duas de *C. parapsilosis* (Amostras 31 e 33) apresentaram sensibilidade apenas nas maiores concentrações para a completa eliminação do patógeno, ambas as espécies com CFM= 5,0 mg/mL (Tabela 1). Em um estudo realizado por Galeano e Martinez (2007), foi avaliado o potencial antifúngico de 24 extratos de esponjas marinhas, dentre os quais, apenas 14 compostos demonstraram atividade inibitória contra *C. albicans*. Neste mesmo estudo,

ressaltou-se que espécies de esponjas marinhas *Leucetta aff. floridana* e *Cinachyrella* apresentaram maior atividade anti-*Candida*.

Cristancho et al. (2008) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos de 15 esponjas do mar do caribe contra a cepa de *C. albicans*, dos quais apenas quatro apresentaram a capacidade de inibir o crescimento da levedura. No presente estudo, foi demonstrado que a fração Ag2 do extrato de *A. dispar* apresentou atividade biológica relevante, com capacidade para inibir o crescimento 100% das leveduras de *C. albicans* e as não-*albicans*.

Recentemente, Dogan et al. (2018), testaram o extrato metanólico da espécie de *Agelas oroides* contra leveduras como *Candida glabrata*, *C. neoformans* e *C. gattii* nas concentrações entre 256 e 0,5 µg/mL, encontrando CIM's nos valores de 16, 16 e 32 µg/mL, respectivamente. Com base nos resultados por Dogan e colaboradores (2018) é possível inferir que extratos de esponjas marinhas são mais efetivos contra as leveduras do gênero *Candida*, principalmente a espécie de *C. glabrata*. Similarmente em nosso estudo esta espécie também se mostrou mais sensível as menores concentrações da fração Ag2 do extrato de *A. dispar* avaliadas (Tabela 1). Diante disso, é possível observar o potencial antimicrobiano que esta fração possui, do qual revelou ótimas CIM's contra diferentes espécies de *Candida*. Esses resultados, levam a crer que os extratos metanólicos de esponjas marinhas poderão dar origem a produtos antifúngicos, especificamente frente a espécie de *C. glabrata*, dado que a mesma já apresenta perfil de resistência inata a classe dos azólicos (GLÖCKNER; CORNELLY, 2015).

Diferentemente da técnica de microdiluição aplicada neste estudo, Kasitowati e colaboradores (2019), utilizaram discos embebidos com extratos de acetado de etila das esponjas de *Fascaplysinopsis* sp. (200 µg/disco) e *Haliclona* sp. (400 µg/disco), concluindo que o extrato de *Fascaplysinopsis* sp. apresenta maior atividade inibitória para *C. albicans* (22,71 ± 0,44 mm) na concentração testada do que quando comparada com o extrato de *Haliclona* sp. que demonstrou um halo de inibição de 10,76 ± 0,84 mm. Para o *Aspergillus flavus* os halos de inibição foram 10,50 ± 0,52 e 8,71 ± 0,53 mm respectivamente, para *Fascaplysinopsis* sp. e *Haliclona* sp.

Por outro lado, compostos puros isolados das esponjas *Agelas* sp. também se destacam por sua atividade antifúngica, como visto por Kusama et al. (2014), que avaliaram a mukanadina A, isolada de espécies de *Agelas*, a qual apresentou atividade antifúngica considerável para as estirpes de *C. albicans* (CIM = 16 µg/mL) e *C. neoformans* (CIM = 8,0 µg/mL). Pettit e colaboradores (2013) mostraram em seu estudo que, a agelasina F, isolada da espécie de *Agelas axifera*, inibiu o crescimento das cepas de *Cryptococcus neoformans* (ATCC 90112) e *C. albicans* (ATCC 90028), apresentando atividade antifúngica de amplo espectro, com CIM's de 2 e 4 µg/mL, respectivamente.

Outros compostos puros isolados de espécies de *Agelas*, também apresentaram atividades antimicrobianas promissoras, comprovadas pelas pesquisas de Araki et al. (2009). Esses pesquisadores avaliaram, derivados de bromopirrol (Nagelamides Q1 e R2), os quais apresentaram potencial antifúngico, para os fungos filamentosos *Trichophyton mentagrophytes* (CIM's= 6 µg/mL) e *Aspergillus niger* (CIM= 13 µg/mL) e também para as leveduras, *C. albicans* (CIM= 13 µg/mL) e *C. neoformans* (CIM= 13 µg/mL e CIM >25 µg/mL).

A capacidade bioativa da oroidina (figura 8) isolada também em outras espécies de *Agelas*, foi avaliada por Zidar et al. (2014) contra leveduras, que verificaram a atividade do derivado alcaloide frente a *Candida albicans* (ATCC 90028), demonstrando atividade inibitória com CIM= 50 µM. Adicionalmente, o potencial antifúngico da agelasidina já havia sido relatado na literatura por Stout, Yu e Molinski (2012). Os pesquisadores isolaram a agelasidina da espécie de *Agelas citrina* e testaram frente *Cryptococcus grubii*, *Cryptococcus var gattii* e cepas de *Candida*, que tiveram seu crescimento inibido por este metabólito. Adicionalmente, Hammami e colaboradores (2010), reportaram a atividade antifúngica da oroidina para o fungo filamentoso, *Alternaria solani*, para qual o composto exibiu uma atividade inibitória satisfatória na concentração de 16 µg.

Substâncias puras encontradas na esponja marinha *Orina* spp., da Nova Caledônia (Melanésia), destaca-se o composto (2,2-Bis (6-Bromo-1H-Indol-3-il) etilamina) que apresentou atividade antifúngica e antibacteriana frente as cepas de *C. albicans* e *Pseudomonas aeruginosa*, ambas com 64 µg/mL, *Escherichia coli* (8 µg/mL), *Staphylococcus aureus* (8 µg/mL), *Klebsiella pneumoniae* (8 µg/mL) e *Enterococcus faecalis* (32 µg / mL) conforme reportado por Campana e colaboradores (2019). Além de esponjas, Hamayeli, Hassanshahian e Hesni (2019), em um estudo utilizando as anêmonas do mar, revelaram que os compostos marinhos extraídos da *Stichodactyla haddoni*, obtiveram atividade antimicrobiana com CIM's variando de 10-20 mg/mL contra cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

A compilação dos dados acima, sugerem que a atividade antifúngica das esponjas do gênero *Agelas* pode estar associada aos seus metabólitos secundários, também encontrados em outros gêneros de esponjas marinhas (CAMPANA et al., 2019). Assim, vale ressaltar que a atividade biológica identificada na fração Ag2 do extrato de *A. dispar*, pode estar relacionada a ação de um dos seus constituintes químicos ou pela combinação de dois ou mais, atuando de forma particular em relação as cepas de *Candida*. Ademais, a ação fungicida observada contra cepas de *Candida*, quando relacionadas a razão CFM/CIM (tabela 1), se mostrou dose dependente nas concentrações empregadas no estudo, apresentando comportamento similar aos antifúngicos convencionais aplicados na terapêutica clínica.

São crescentes os estudos que avaliam a identificação dos fatores de virulência de leveduras do gênero *Candida*, como a capacidade de formar biofilmes e sua eliminação. Se destacam as pesquisas sobre a produção de biofilme nas espécies de *Candida* e na literatura, os dados da maior formação do biofilme são destacados para a espécie de *Candida albicans*. Para as espécies não-*albicans* como *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata* a formação de biofilme apresenta-se variável e pouco relatada (DELALOYE; CALANDRA, 2014).

Ao contrário ao descrito na literatura, este estudo demonstrou que a cepa de *C. albicans* (ATCC 90028) apresentou fraca produção de biofilme, enquanto as cepas ATCC's de *C. krusei* (6258) e *C. glabrata* (2001) apresentaram produção moderada do biofilme. Notavelmente, a amostra 50 (*C. parapsilosis*) relevou-se ser uma potencial estirpe de formação de biofilme demonstrando uma produção moderada e quando comparada com as demais destacou-se estatisticamente (Figura 9A).

Alguns estudos como o de Modrzwska e Kurnatowski (2015), relatam que a capacidade de adesão a superfícies de materiais e às células do hospedeiro humano é variável entre as espécies de *Candida*. Por outro lado, Chaves et al. (2013) evidenciaram que a espécie de *C. parapsilosis* é fortemente aderente a diferentes superfícies comparando-a com a *C. albicans*. A partir da evidência anterior, é possível sugerir que a cepa *C. parapsilosis* (amostra 50) em nosso estudo possuiu uma capacidade maior de adesão à placa de poliestireno em comparação com as demais estirpes utilizadas na identificação do biofilme. Esse fato requer motivando estudos posteriores para a quantificação da expressão de genes associados com adesinas utilizadas na produção do biofilme, embora algumas cepas de *C. parapsilosis* demonstraram fraca produção quando avaliadas no estudo (Figura 9, A e B).

Dados semelhantes aos obtidos neste estudo foram descritos por alguns pesquisadores, nos quais utilizaram isolados clínicos de candidemia e encontraram a espécie de *C. albicans* com as menores expressões de biofilme, quando comparado com as demais espécies relatadas nos estudos (TUMBARELLO et al., 2007; PANNANUSORN; FERNANDEZ; RÖMLING, 2013).

Paralelamente, em um estudo realizado no México, Sánchez Vargas et al. (2013) quantificaram o biofilme produzido pelas espécies de *Candida* provenientes de isolados clínicos de candidíase oral, identificando a produção forte e moderada deste fator de virulência (biofilme) para as espécies de *C. glabrata*, *C. tropicalis* e por último *C. albicans*. Algumas espécies não-*albicans* como a *C. krusei* e um único isolado de *C. lusitaniae* também foram avaliadas como moderados produtores de biofilme. Harakuni et al. (2012), também encontraram a produção de biofilme significativa (moderada ou forte) das espécies não-*albicans*, para as quais avaliaram a capacidade de formação em isolados clínicos de *Candida* spp. provenientes do sangue de neonatos.

Foi constatado que as amostras de *C. glabrata* possuíam as maiores capacidade de formação de biofilme. Esses dois estudos corroboram com os nossos achados, visto que a produção moderada foi observada em espécies não-*albicans*.

Em um trabalho mais recente para identificação de biofilme fúngico, Inácio e colaboradores (2019), relatam que a espécie de *C. tropicalis* com capacidade de formação de biofilmes em um paciente com infecção sanguínea relacionada com o uso de cateter. Em outro estudo, Herek et al. (2019) avaliaram a formação de biofilme em cateter, um biomaterial comumente associado a formação desses agregados de células leveduras e detectaram maiores níveis de biomassa referente ao desenvolvimento de biofilme por *C. parapsilosis*. O valor quantitativo do biofilme pode ser correlacionando com o uso da glicose, visto que na presença da glicose, os mesmos pesquisadores evidenciaram que esse carboidrato favoreceu o crescimento do biofilme *in vitro*. Corroborando com nosso estudo que também, utilizou a glicose como um facilitador na formação do biofilme. No nosso estudo a glicose foi usada na tentativa de mimetizar o que poderia acontecer fisiologicamente nas patologias concomitantes em seres humanos, como por exemplo, as candidíases em pacientes diabéticos, visto que as espécies de *Candida* estão associadas ao controle glicêmico da doença (PALLAVAN et al., 2014).

É possível destacar que as técnicas de formação do biofilme *in vitro* utilizadas são variáveis, considerando a escolha do meio de cultura, o material da microplaca, o tempo de incubação e a coloração empregada na quantificação, assim justificando a variação da formação encontrada na literatura conforme discutido por Melo, 2016. Similarmente, alguns autores descrevem resultados que corroboram com a hipótese de que as metodologias para a detecção de biofilme possam influenciar nos resultados das pesquisas, relatando que para as cepas de *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata*, os achados oscilam de forte para fraca na produção do biofilme devido a metodologia escolhida (ESTIVILL et al., 2011; PANNANUSORN; FERNANDEZ; RÖMLING, 2013; DELALOYE; CALANDRA, 2014).

Embora este estudo não tenha avaliado o perfil genético da virulência, considera-se pertinente destacar pesquisas que retratam a quantificação de genes associados a formação do biofilme. Neste sentido, Short et al. (2019) investigaram a capacidade de *C. auris* (patógeno emergente) no desenvolvimento do biofilme, no qual confirmaram que a formação de agregados celulares coincide com a regulação positiva de genes associados com a produção do biofilme.

Em um estudo realizado na região do Mato Grosso (Brasil), os autores quantificaram molecularmente por PCR, os genes associados à produção de biofilme (ALS1 e HWP1) dos 73 isolados clínicos de *Candida albicans*; provenientes de pacientes positivos para o HIV e assintomáticos para candidíase oral, também em mulheres sintomáticas e assintomáticas para

candidíase vulvovaginal. Os resultados demonstraram que, o gene ALS1 foi detectado em 26,39% de todas as cepas, em contrapartida o gene HWP1 apresentou 56,94%. Os mesmos autores também discutiram que o gene ALS1 foi predominante entre amostras vaginais e HWP1 foi mais predominante nas amostras orais; relatando que a expressão dos genes de virulência é dependente dos sítios de infecção e colonização das leveduras (GOULART et al., 2018).

Considerando que as amostras identificadas por sequenciamento utilizadas neste estudo foram oriundas do leite *in natura*, Mousa, Elmonir e Abdeen (2016), utilizando isolados de amostras de leite coletadas de casos crônicos de mastite bovina, identificaram os genes HWP1 e PLB1 em todos os isolados de *C. albicans* dos casos mastíticos. Curiosamente, os genes ALS1 e SAP4 também foram isolados desses casos. Os mesmos autores ainda reportaram que esses achados foram correlacionados previamente com casos clínicos humanos, evidenciando o perfil zoonótico dos fatores de virulência encontrados nas amostras de leite. Assim, o trabalho citado corrobora com os achados fenotípicos desta pesquisa, tendo em vista que similarmente para este estudo foram avaliadas cepas procedentes do leite de vaca. Ainda, todas essas cepas desse estudo foram produtoras de biofilme, sugerindo a capacidade do produto alimentício, no caso o leite, quando contaminado implicar em agente transmissor de patógenos fúngicos.

Desta maneira, a capacidade de formação de biofilme não está apenas relacionada com isolados clínicos e sim, com a competência da levedura em expressar ou não os genes de virulência, independentemente da localização biótica ou abiótica, evidenciando o potencial infeccioso da levedura ao atingir o ser humano de forma direta ou indireta.

As cepas de *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida glabrata* (ATCC 2001) e *Candida parapsilosis* (Amostra 50) foram tratadas com a fração Ag2 da esponja marinha e apresentaram uma redução na capacidade do biofilme em formação e maduro nas duas concentrações testadas. Quando submetidos aos dois tratamentos, constatou-se a diminuição quantitativa da viabilidade celular para todas as estirpes. A efetividade da maior concentração (2,5 mg/mL) foi demonstrada também no biofilme maduro, indicando que a fração do extrato metanólico continuou sendo bioativa mesmo diante do desenvolvimento completo da comunidade microbiana (Figuras 10 e 11).

A maioria dos estudos que retratam a atividade antibiofilme de produtos naturais marinhos são focados para as bactérias e, raramente, para os fungos patogênicos. Em um estudo realizado por Rane e colaboradores (2015) utilizando compostos isolados de esponjas marinhas, os pesquisadores verificaram uma satisfatória inibição do biofilme nas concentrações 0.39, 0.78 e 3.125 µg/mL do derivado de bromopirrol (2,4-diclorofenil-1,3,4-oxadiazol), frente as cepas de *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (ATCC 35556), *S. aureus* resistente à meticilina

(ATCC 43866), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 35984) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

A oroidina também encontrada na fração Ag2 do extrato de *Agelas dispar* neste estudo, já apresentou atividade antibiofilme relatada na literatura (RICHARDS et al., 2008), na qual foi observado que oroidina apresentou atividade antibiofilme moderada contra duas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* IC_{50%} de 190 e 166 µM/mL. Em contrapartida, no estudo de Campana et al. (2019) o potencial antibiofilme de alcaloides marinhos foi avaliado contra *E. coli* (ATCC 35218) e *S. aureus* (ATCC 43387), utilizando os valores de CIM (8 µg/mL) ou duas vezes a CIM (16 µg/mL) provocaram 68,3 e 82,2% de inibição da formação de biofilme, respectivamente. No mesmo estudo, a menor concentração induziu apenas 40,0% da inibição da formação de biofilme de *K. pneumoniae*, atingindo 83,7% de inibição com a maior concentração (16 µg/mL). Aditivamente, a atividade antibiofilme foi observada para *C. albicans* (ATCC 10231), revelando que o composto (2,2-Bis (6-Bromo-1H-Indol-3-il) etilamina) na concentração de 64 µg/mL, inibiu completamente o crescimento leveduriforme implicado na formação do biofilme.

A concentração mais baixa avaliada neste estudo (1,25 mg/mL), apresentou uma pequena variação da sua efetividade para o biofilme em formação e depois de formado, que pode ser plausivelmente explicado pela menor quantidade de metabólitos secundários bioativos produzidos. Contribuindo com os dados aqui encontrados, os pesquisadores Cepas et al. (2019) relataram que, concentrações maiores de produtos naturais marinhos como extratos e frações, são necessários para inibir os biofilmes formados por *C. parapsilosis* quando comparados com os biofilmes da espécie de *C. albicans*. Desta forma, pode se explicar o menor valor de inibição da viabilidade celular do biofilme maduro da amostra 50 (*C. parapsilosis*) na concentração de 1,25mg/mL quando comparado com a maior concentração (Figura 11).

Com o intuito de averiguar as possíveis alterações na arquitetura do biofilme após o tratamento com a fração Ag2 do extrato metanólico da *A. dispar*, as amostras foram analisadas visualmente por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As imagens obtidas pelo MEV das ultraestruturas observadas nos controles das cepas de *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata* demonstraram concordância com a literatura (SILVA et al., 2009; ANDES, 2012; PANNANUSORN; FERNANDEZ; RÖMLING, 2013).

Investigações de ultraestruturas (biofilme) submetidas ao efeito de produtos naturais marinhos na morfologia de leveduras são escassas. Neste estudo a atuação da fração Ag2 do extrato de *A. dispar* revelaram diferenças estruturais e morfológicas do biofilme em todos os biofilmes das cepas de *Candida* analisadas. Nas duas concentrações empregadas foram vistas deformidades nas pseudo-hifas e blastoconídios, rugosidades, extravasamentos celulares,

desagregação e diminuição do volume das células, comprometendo toda a estrutura do biofilme em formação e maduro, o que sugere uma ação de desestruturação e destruição da membrana plasmática e/ou parede celular (Figuras 12 a 17).

Desta forma, o potencial da atividade antibiofilme evidenciada neste estudo para diferentes espécies de *Candida*, sugere que a fração Ag2 do extrato de *Agelas dispar* pode ser uma poderosa alternativa no controle do principal fator de virulência (biofilme) de múltiplas espécies de fungos. Assim, estima-se que após o fracionamento dos metabólitos secundários encontrados na fração Ag2 da esponja testada, resulte em maiores valores na porcentagem de inibição da viabilidade celular quando testadas frente o biofilme de origem fúngica, além de intensificar as alterações morfológicas observadas no MEV.

Zore e colaboradores (2011), relatam que a atividade antibiofilme de compostos naturais frente as espécies de *Candida* não estão totalmente elucidados, porém alguns compostos químicos presentes em extratos, frações e óleos, como os terpenóides e seus derivados possuem atividade bioativa já conhecida. Dentre essas, destacam-se a ação de desestruturar a integridade da membrana celular e controlar funções relacionadas à membrana fúngica, como a sinalização via *quórum-sensing* e a permeabilidade celular.

As possíveis explicações para a atividade antibiofilme observada e confirmada pelo MEV, pode estar associada a um dos compostos identificados neste estudo, a agelasidina A (Figura 8). Esse metabólito secundário da *Agelas dispar* é considerado um derivado de sesquiterpeno, sendo descrito por sua capacidade de originar o farnesol (molécula sinalizadora *quórum-sensing*), que por sua vez é responsável pela inibição das formas hifálicas (resposta reguladora) e capaz de impedir a formação do biofilme (MONTEIRO et al., 2015; CAI; KLEIJ, 2019).

A superexpressão do farnesol para diminuir a produção de biofilme já foi descrito na literatura, mencionando que além de apresentar inibição sobre metabolismo fúngico, apresenta função antagônica contra outros microrganismos patogênicos ao homem e baixa toxicidade para as células normais humanas (RAMAGE et al., 2002; SEMIGHINI et al., 2006; EGBE et al., 2017; POLKE et al., 2018). Anteriormente, Hornby et al. (2001), observaram que o farnesol obtido e purificado da espécie de *C. albicans* e o adquirido comercialmente, inibiram a formação de hifas em *C. albicans* envolvidas na formação do biofilme.

Outra possível explicação do efeito antibiofilme, seria a própria afinidade dos terpenos, como a agelasidina A, em interagir com a membrana plasmática dos fungos, devido a conformação química. Esta, por sua vez, demonstra cadeia alifática alongada e com algumas insaturações, poucos grupos funcionais polares, apontando um maior perfil de lipossolubilidade e interação com a estrutura fúngica. Além disso, a estrutura química da agelasidina A, assemelha-se em parte com

as cadeias químicas de alguns antifúngicos como, a anfotericina B e a nistatina (TAMPIERI et al., 2005; PADUCH et al., 2007). Adicionalmente, essa ação contra a membrana dos fungos, também observadas no MEV, pode ter sido intensificada pelos outros compostos (como, a oroidina e o ácido 4,5-dibromopirrol-2-carboxílico), encontrados na fração Ag2 do extrato metanólico da *A. dispar* (Figura 8), nos quais são heterocíclicos nitrogenados e ligados a anéis pirrólicos, sendo similares com a estrutura química dos azóis, principalmente os triazólicos (CHANDRASEKHAR et al., 2010; LEWI, 2010; DEHAEN; BAKULEV, 2015).

De modo geral, a atividade biológica da fração Ag2 do extrato metanólico da esponja marinha *Agelas dispar* apresentou atividade anti-*Candida* significativa e promissora, uma vez que os resultados dos experimentos tanto do biofilme em formação quanto o biofilme maduro submetidos aos tratamentos com concentrações específicas, e observados por MEV, sugerem que o composto possui potencial para o controle dos biofilmes e dos patógenos fúngicos de interesse médico. Nossos achados motivam a realização de estudos futuros mais aprofundados, para a confirmação de que a fração Ag2 do extrato apresenta eficácia no tratamento das candidíases.

8. CONCLUSÃO

Neste estudo, constatou-se que a fração Ag2 do extrato metanólico da esponja marinha *Agelas dispar*, um produto natural marinho, apresentou bioatividade significativa frente às espécies de *Candida* avaliadas, por apresentar uma boa atividade antifúngica, bem como, a capacidade de reduzir os biofilmes em formação e maduro.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV), demonstrou ser uma ferramenta essencial para auxiliar na elucidação do possível mecanismo de ação da fração Ag2. O efeito antibiofilme da fração do extrato metanólico sobre as cepas fúngicas estudadas, evidenciou afinidade em atuar a nível de membrana plasmática e/ou em parede celular. Em síntese, foram observadas a inibição do crescimento, a destruição das diferentes formas celulares, extravasamento do material intracelular das leveduras, dentre outras alterações morfológicas.

Embora não tenham sido avaliados de forma isolada neste trabalho, os metabólitos secundários (como a oroidina e agelasidina A) são candidatos em potenciais para estudos posteriores para elucidar seus respectivos papéis como agentes antifúngicos. Desta maneira, os dados desta pesquisa sugerem estudos futuros para a confirmação do mecanismo de ação, averiguação da toxicidade e o estudo da interação sinérgica da fração Ag2 com antifúngicos, atualmente empregados na clínica médica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDJUL, D. B. et al. Structures and biological evaluations of agelasines isolated from the Okinawan marine sponge *Agelas nakamurai*. **Journal of natural products**, v. 78, n. 6, p. 1428-1433, 2015.

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

AIELLO, A. et al. Modern alkaloids: structure, isolation, synthesis and biology. by **Fattorusso E., Tagliatela-Scafati O., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim**, p. 271-304, 2008.

AL-MOURABIT, A. et al. Biosynthesis, asymmetric synthesis, and pharmacology, including cellular targets, of the pyrrole-2-aminoimidazole marine alkaloids. **Natural product reports**, v. 28, n. 7, p. 1229-1260, 2011.

ÁLVARES, C. A.; SVLDZLNSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007.

ALVES, C.F.S. et al. Antimicrobial, antitrypanosomal and antibiofilm activity of *Equisetum hyemale*. **Microbial pathogenesis**, v. 101, p. 119-125, 2016.

AMARAL-LOPES, S.; MOURA, A. Neonatal fungal sepsis by *Candida krusei*: A report of three cases and a literature review. **Medical mycology**, v.1, p. 24-26, 2012.

ARAKI, A. et al. Nagelamides Q and R, novel dimeric bromopyrrole alkaloids from sponges *Agelas* sp. **Organic letters**, v. 11, n. 8, p. 1785-1788, 2009.

ARDEHALI, S. H. et al. Molecular detection of ALS1, ALS3, HWP1 and SAP4 genes in *Candida* Genus isolated from hospitalized patients in Intensive Care Unit, Tehran, Iran. **Cell Mol Biol (Noisy le Grand)**, v. 65, n. 4, 2019.

ASSMANN, M. et al. Chemical defenses of the Caribbean sponges *Agelas wiedenmayeri* and *Agelas conifera*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 207, p. 255-262, 2000.

AULER, M. E. et al. Biofilm formation on intrauterine devices in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. **Medical mycology**, v. 48, n. 1, p. 211-216, 2010.

BALLARD, T. E. et al. Synthesis and Antibiofilm Activity of a Second-Generation Reverse-Amide Oroidin Library: A Structure–Activity Relationship Study. **Chemistry–A European Journal**, v. 14, n. 34, p. 10745-10761, 2008.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidiasis. **DST- Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissível**, v. 22, n. 1, p. 22-28, 2010.

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

BATISTA, R. S. A. et al. Atividade antifúngica de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) sobre *Candida* spp. **Agropecuária técnica**, v. 34, p. 40-49, 2013.

BERTINI, A. et al. Comparison of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* adhesive properties and pathogenicity. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 2, p. 98-103, 2013.

BICKMEYER, U. et al. Brominated pyrrole alkaloids from marine *Agelas sponges* reduce depolarization-induced cellular calcium elevation. **Toxicon**, v. 44, n. 1, p. 45-51, 2004.

BISWAS, S.; VAN DIJCK, P.; DATTA, A. Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 71, n. 2, p. 348-376, 2007.

BITEW, A.; ABEBAW, Y. Vulvovaginal candidiasis: species distribution of *Candida* and their antifungal susceptibility pattern. **BMC women's health**, v. 18, n. 1, p. 94, 2018.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 28, n. 2, p. 196-268, 2011.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 34, n. 3, p. 235-294, 2017.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 2, p. 116-211, 2015.

BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. **Natural product reports**, v. 30, n. 2, p. 237-323, 2013.

BONDARYK, M.; KURZAŃKOWSKI, W.; STANISZEWSKA, M. Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: mode of action and resistance development. **Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii**, v. 30, n. 5, p. 293, 2013.

BONGOMIN, F. et al. Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. **Journal of fungi**, v. 3, n. 4, p. 57, 2017.

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.

BRAGA, M. T.; ROSSETI, I. B.; COSTA, M. S. EFEITO DOS COMPOSTOS ORAGANOCALCOGÊNEOS (PhSe) 2 E (p-Cl-PhSe) 2 SOBRE A VIABILIDADE DO BIOFILME FORMADO POR *Candida albicans*. **Revista Univap**, v. 22, n. 40, p. 899, 2017.

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.

BRAUNER, A. et al. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 320, 2016.

BRECKLE, G.; POLBORN, K.; LINDEL, T. Synthesis of the pyrrole-imidazole alkaloid sventrin from the marine sponge *Agelas sventres*. **Zeitschrift für Naturforschung B**, v. 58, n. 5, p. 451-456, 2003.

BRILHANTE, R. S. N. et al. Exposure of *Candida parapsilosis* complex to agricultural azoles: An overview of the role of environmental determinants for the development of resistance. **Science of The Total Environment**, v. 67, p.903-914, 2018.

BRUNO, V. M. et al. Transcriptomic analysis of vulvovaginal candidiasis identifies a role for the NLRP3 inflammasome. **MBio**, v. 6, n. 2, p. e00182-15, 2015.

CAFIERI, F.; FATTORUSSO, E.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. Novel betaines from the marine sponge *Agelas dispar*. **Journal of natural products**, v. 61, n. 9, p. 1171-1173, 1998.

CAI, A.; KLEIJ, A. W. Regio- and Enantioselective Preparation of Chiral Allylic Sulfones Featuring Elusive Quaternary Stereocenters. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 58, n. 42, p. 14944-14949, 2019.

CALO, J.R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. **Food Control**, v. 54, p. 111-119, 2015.

CAMPANA, R. et al. Marine Alkaloid 2, 2-Bis (6-bromo-3-indolyl) Ethylamine and Its Synthetic Derivatives Inhibit Microbial Biofilms Formation and Disaggregate Developed Biofilms. **Microorganisms**, v. 7, n. 2, p. 28, 2019.

CAMPOS, Jéssica da Silva. **Avaliação fenotípica, genotípica e termorresistência de leveduras isoladas do leite in natura**. 2019. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2019.

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.

CANNIZZO, F. T. et al. Biofilm development by clinical isolates of *Malassezia pachydermatis*. **Medical Mycology**, v. 45, n. 4, p. 357-361, 2007.

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

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

CEPAS, V. et al. Inhibition of Bacterial and Fungal Biofilm Formation by 675 Extracts from Microalgae and Cyanobacteria. **Antibiotics**, v. 8, n. 2, p. 77, 2019.

CEVHER, E. et al. Effect of thiolated polymers to textural and mucoadhesive properties of vaginal gel formulations prepared with polycarbophil and chitosan. **Aaps Pharmscitech**, v. 9, n. 3, p. 953-965, 2008.

CHANAS, B. et al. Chemical defense of the Caribbean sponge *Agelas clathrodes* (Schmidt). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 208, n. 1-2, p. 185-196, 1997.

CHANDRA, J. et al. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5385-5394, 2001.

CHANDRASEKHAR, S. et al. Hydroxyphthalimide allied triazole-pyrrolidine catalyst for asymmetric Michael additions in water. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 21, n. 19, p. 2372-2375, 2010.

CHAVES, G.M. et al. Species distribution and virulence factors of *Candida* spp. isolated from the oral cavity of kidney transplant recipients in Brazil. **Mycopathologia**, v. 175, n. 3-4, p. 255-263, 2013.

CHOI, C. et al. Radiosensitization by marine sponge *Agelas* sp. extracts in hepatocellular carcinoma cells with autophagy induction. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 6317, 2018.

CHONG, P. et al. Transcriptomic and Genomic Approaches for Unravelling *Candida albicans* Biofilm Formation and Drug Resistance—An Update. **Genes**, v. 9, n. 11, p. 540, 2018.

CHU, Mei-Jun et al. Pyrrole derivatives and diterpene alkaloids from the South China Sea sponge *Agelas nakamurai*. **Chemistry & biodiversity**, v. 14, n. 7, p. e1600446, 2017.

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. Reference method for broth dilution antifungal

susceptibility testing of yeasts. Approved standard – Third edition. CLSI document M-27A3. Wayne, Pa. 2008.

CLSI. Clinical and Laboratorial Standards Institute, norma M27-A2. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica. 2002; 22(15), 2ª. ed.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard - Fourth Edition. CLSI document M27-A4. CLSI, Pennsylvania, USA 2017.

COLEMAN, N. W.; FLECKMAN, Philip; HUANG, Jerry I. Fungal nail infections. **Journal of Hand Surgery**, v. 39, n. 5, p. 985-988, 2014.

COLOMBO, A. L. et al. *Candida glabrata*: na emerging pathogen in Brazilian tertiary care hospitals. **Medical Mycology**, v.51, p. 38-44, 2013.

CÓRDOBA, S.; VIVOT, W.; BOSCO-BORGEAT, M. E.; TAVERNA, C.; SZUSZ, W.; MURISENGO, O.; ISLA, G.; DAVEL, G.; RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE MICOLOGIA. Species Distribution and Susceptibility Profile of Yeasts Isolated from Blood Cultures: Results of a Multicenter Active Laboratory-Based Surveillance Study in Argentina. **Revista Argentina De Microbiologia**, v. 43, n. 3, p. 176–185, set. 2011.

CORREA-ROYERO, J. et al. In vitro antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 734-741, set. 2010.

COSTA, C. R. ***Candida* virulence factors of immunocompromised patients. Molecular characterization of *Candida albicans* resistant and susceptible to fluconazole.** 2009. 77 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

COSTA-ORLANDI, C. B. et al. In vitro characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms. **Biofouling**, v. 30, n. 6, p. 719-727, 2014.

COSTA-ORLANDI, C. et al. Fungal biofilms and polymicrobial diseases. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 2, p. 22, 2017.

COTTIER, F.; MÜHLSCHLEGEL, F. A. Sensing the environment: response of *Candida albicans* to the X factor. **FEMS microbiology letters**, v. 295, n. 1, p. 1-9, 2009.

COUTINHO, H.D. M. et al. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. **Chemotherapy**, v.54, p. 328-330, 2008.

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

CUENCA-ESTRELLA, M. Antifungal agents in the treatment of systemic infections: Relevance of mechanism of action, activity profile and resistances. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 23, n. 4, p. 169-176, 2010.

CYCHON, C.; LICHTER, E.; KÖCK, M. The marine sponge *Agelas citrina* as a source of the new pyrrole-imidazole alkaloids citrinamines A–D and N-methylagelongine. **Beilstein journal of organic chemistry**, v. 11, n. 1, p. 2029-2037, 2015.

CRISTANCHO, J.A.M. et al. Evaluación de extractos de esponjas marinas como nuevas fuentes de sustancias antimicrobianas. **Rev Esp Quimioter**, v.21, n.3, p. 179-174,2008.

DA COSTA, K. R. C. et al. Virulence attributes and genetic variability of oral *Candida albicans* and *Candida tropicalis* isolates. **Mycoses**, v. 55, n. 3, p. e97-e105, 2012.

DA SILVA ROCHA, W. P. et al. *Candida* species distribution, genotyping and virulence factors of *Candida albicans* isolated from the oral cavity of kidney transplant recipients of two geographic regions of Brazil. **BMC oral health**, v. 14, n. 1, p. 20, 2014.

DE GROOT, P. W.J. et al. Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. **Eukaryotic cell**, v. 12, n. 4, p. 470-481, 2013.

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.

DE TOLEDO, L. et al. Essential oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: a strategy to combat fungal infections caused by *Candida* species. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 8, p. 1252, 2016.

DEHAEN, W.; BAKULEV, V. A. (Ed.). **Chemistry of 1, 2, 3-triazoles**. Springer International Publishing, 2015.

DELALOYE, J.; CALANDRA, T. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 161-169, 2014.

DENNING, D. W. et al. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p. 339-347, 2018.

DEORUKHKAR, S. C.; SAINI, S.; MATHEW, S. Non-*albicans Candida* infection: an emerging threat. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2014, 2014.

DEORUKHKAR, S. C.; SAINI, S.; MATHEW, S. Virulence factors contributing to pathogenicity of *Candida tropicalis* and its antifungal susceptibility profile. **International journal of microbiology**, v. 2014, 2014.

DESAI, J. *Candida albicans* hyphae: from growth initiation to invasion. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 1, p. 10, 2018.

DIEZMANN, S. et al. Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5624-5635, 2004.

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.

DJORDJEVIC, D.; WIEDMANN, M.; MCLANDSBOROUGH, L. A. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 6, p. 2950-2958, 2002.

DOBSON, A. D.W. et al. Marine sponges—molecular biology and biotechnology. In: **Springer Handbook of Marine Biotechnology**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 219-254, 2015.

DOGAN, E. et al. Screening of the selected marine sponges from the coasts of Turkey for antimicrobial activity. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences**, v. 47, p. 1193-1198, 2018.

DONGARI-BAGTZOGLU, A. Mucosal biofilms: challenges and future directions. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 6, n. 2, p. 141-144, 2008.

DOSHI, G. M. et al. Novel antibiotics from marine sources. **Int. J. Pharm. Sci. Nanotech**, v. 4, p. 1446-1461, 2011.

DUTTA, N. K. et al., 2004. Antimycobacterial activity of the antiinflammatory agent diclofenac sodium, and its synergism with streptomycin. **Brazilian Journal of Microbiology**, 35, p. 316-323.

EGBE, N. E. et al. Farnesol inhibits translation to limit growth and filamentation in *C. albicans* and *S. cerevisiae*. **Microbial Cell**, v. 4, n. 9, p. 294, 2017.

EL-HOSSARY, E. M. et al. Antifungal potential of marine natural products. **European journal of medicinal chemistry**, v. 126, p. 631-651, 2017.

ELIOPOULOS, G. M.; MOELLERING, R. C. **Antimicrobial combinations**. In: Lorian, V. (ed): Antibiotics in Laboratory Medicine. **Baltimore**, MD, p. 434-441. 1991.

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

EMARA, M. et al. *Candida auris* Candidemia in Kuwait, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 6, p. 1091–1092, jun. 2015.

ESTIVILL, D. et al. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, n. 2, p. 238-242, 2011.

FAN, D. et al. Activation of HIF-1 α and LL-37 by commensal bacteria inhibits *Candida albicans* colonization. **Nature medicine**, v. 21, n. 7, p. 808, 2015.

FATTORUSSO, E.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. (Ed.). **Modern alkaloids: structure, isolation, synthesis, and biology**. John Wiley & Sons, 2008.

FELIX, T. C.; DE BRITO RÖDER, D. V. D.; DOS SANTOS PEDROSO, R. Alternative and complementary therapies for vulvovaginal candidiasis. **Folia microbiologica**, v. 64, n. 2, p. 133-141, 2019.

FENG, X. et al. Molecular identification of *Candida* species isolated from onychomycosis in Shanghai, China. **Mycopathologia**, v. 180, n. 5-6, p. 365-371, 2015.

FEUERSCHUETTE, O. H. M. et al. Candidíase vaginal recorrente: manejo clínico. **FEMINA** [periódico na internet], v. 38, n. 2, p. 31-36, 2010.

FIGUEIRA, F. R. et al. AÇÃO ANTIFÚNGICA DE UM JATO DE PLASMA NÃO-TERMICO DE HÉLIO/AR COMPRIMIDO SOBRE BIOFILMES DE *CANDIDA ALBICANS*. **Revista Univap**, v. 22, n. 40, p. 328, 2017.

FLEMMING, Hans-Curt; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature reviews microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623, 2010.

FORTE, B. et al. A submarine journey: The pyrrole-imidazole alkaloids. **Marine drugs**, v. 7, n. 4, p. 705-753, 2009.

FOX, E. P. et al. Antifungals: From Genomics to Resistance and the Development of Novel Agents. 2015.

FULE, S. R. et al. Detection of phospholipase activity of *Candida albicans* and non albicans isolated from women of reproductive age with vulvovaginal candidiasis in rural area. **Indian journal of medical microbiology**, v. 33, n. 1, p. 92, 2015.

FURLETTI, V. F. et al. Ação de extratos, oleos essenciais e frações isoladas de plantas medicinais sobre a formação do biofilme em *Candida* spp. 2009.

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

GALEANO, E.; MARTINEZ, A. Antimicrobial activity of marine sponges from Uraba' Gulf, Colombian Caribbean region. **Journal de Mycologie Medicale**, v.17, p. 21- 24,2007.

GARCIA, E. E.; BENJAMIN, L. E.; FRYER, R. Ian. Reinvestigation into the structure of oroidin, a bromopyrrole derivative from marine sponge. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 3, p. 78-79, 1973.

GARCIA-SOLACHE, M. A.; CASADEVALL, A. Global warming will bring new fungal diseases for mammals. **MBio**, v. 1, n. 1, p. e00061-10, 2010.

GENTA-JOUVE, G. et al. New insight into marine alkaloid metabolic pathways: Revisiting oroidin biosynthesis. **ChemBioChem**, v. 12, n. 15, p. 2298-2301, 2011.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GLASER, K. B.; MAYER, A. M. S. A renaissance in marine pharmacology: From preclinical curiosity to clinical reality. **Biochemical pharmacology**, v. 78, n. 5, p. 440-448, 2009.

GLÖCKNER, A.; CORNELLY, O. A. *Candida glabrata*—unique features and challenges in the clinical management of invasive infections. **Mycoses**, v. 58, n. 8, p. 445-450, 2015.

GOFFEAU, A. Drug resistance: the fight against fungi. **Nature**, v. 452, n. 7187, p. 541, 2008.

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.

GOULART, L. S. et al. Analysis of the ALS1 and HWP1 genes from clinical isolates of *Candida albicans*/Análise de genes ALS1 e HWP1 em isolados clínicos de *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 1, n. 1, p. 112-119, 2018.

GROOT, P. W.J et al. Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. **Eukaryotic cell**, v. 12, n. 4, p. 470-481, 2013.

GROVER, N. D. Echinocandins: A ray of hope in antifungal drug therapy. **Indian journal of pharmacology**, v. 42, n. 1, p. 9, 2010.

GUERY, B. P. et al. Management of invasive candidiasis and candidemia in adult non-neutropenic intensive care unit patients: Part II. Treatment. **Intensive care medicine**, v. 35, n. 2, p. 206, 2009.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

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

GULATI, M.; NOBILE, C. J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 5, p. 310-321, 2016.

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.

HAMAYELI, H.; HASSANSHAHIAN, M.; HESNI, M. A. The antibacterial and antibiofilm activity of sea anemone (*Stichodactyla haddoni*) against antibiotic-resistant bacteria and characterization of bioactive metabolites. **International Aquatic Research**, v. 11, n. 1, p. 85-97, 2019.

HAMMAMI, S. et al. Antifungal effects of secondary metabolites isolated from marine organisms collected from the Tunisian coast. **Comptes Rendus Chimie**, v. 13, n. 11, p. 1397-1400, 2010.

HARAKUNI, S. U.; KARADESAI, S. G.; JAMADAR, N. Biofilm production by *Candida*: comparison of bloodstream isolates with cervical isolates. **Indian journal of microbiology**, v. 52, n. 3, p. 504-506, 2012.

HARDING, M. W. et al. Can filamentous fungi form biofilms? **Trends in microbiology**, v. 17, n. 11, p. 475-480, 2009.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature reviews drug discovery**, v. 14, n. 2, p. 111, 2015.

HEERES, J.; MEERPOEL, L.; LEWI, P. Conazoles. **Molecules**, v. 15, n. 6, p. 4129-4188, 2010.

HEREK, T. C. et al. Biofilm formation by blood isolates of *Candida parapsilosis* sensu stricto in the presence of a hyperglycemic solution at comparable concentrations of total parenteral nutrition. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019.

HERNDAY, A. D. et al. Ssn6 defines a new level of regulation of white-opaque switching in *Candida albicans* and is required for the stochasticity of the switch. **MBio**, v. 7, n. 1, p. e01565-15, 2016.

HERTIANI, T. et al. From anti-fouling to biofilm inhibition: New cytotoxic secondary metabolites from two Indonesian *Agelas* sponges. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 18, n. 3, p. 1297-1311, 2010.

HOLANDA, A. A. R. et al. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. **Rev Bras Ginecol Obstet.**, 29(1): 3-9, 2007.

HOYER, L. L. et al. Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family—a sticky pursuit. **Medical mycology**, v. 46, n. 1, p. 1-15, 2008.

HUIGENS, R. W. et al. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation with bromoageliferin analogues. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 22, p. 6966-6967, 2007.

HOOD, J. R.; WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M. A. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, n. 6, p. 428-433, 2003.

HORNBY, J. M. et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 7, p. 2982-2992, 2001.

INÁCIO, C. P. et al. Invasive *Candida tropicalis* Infection Caused by Catheter Biofilm in a Patient with Tongue Cancer. **Mycopathologia**, v. 184, n. 2, p. 345-346, 2019.

INCI, M. et al. Investigations of ALS1 and HWP1 genes in clinical isolates of *Candida albicans*. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 43, n. 1, p. 125-130, 2013.

ISENBERG, H. D. **Clinical microbiology procedures handbook**. American Society of Microbiology, 1992.

JADHAV, S. et al. Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 125-130, 2013.

JIN, Y. Y. H. K. et al. Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 7, p. 2961-2967, 2003.

KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. 1, p. 120-128, 2008.

KASHEM, S. W. et al. *Candida albicans* morphology and dendritic cell subsets determine T helper cell differentiation. **Immunity**, v. 42, n. 2, p. 356-366, 2015.

KASITOWATI, R. D. et al. Antifungal activity of marine sponges (Class Demospongiae) collected from Biak, Indonesia. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, p. 012102. 2019.

KATHIRAVAN, M. K. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 20, n. 19, p. 5678-5698, 2012.

KHAN, S.M.A.; MALIK, A.; AHMAD, I. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 50, n. 1, p.33-42, 2012.

KIM, S. H. et al. Genetic analysis of *Candida auris* implicates Hsp90 in morphogenesis and azole tolerance and Cdr1 in azole resistance. **MBio**, v. 10, n. 1, p. e02529-18, 2019.

KIRAZ, N. U.; YASEMIN, O. Z. A distribuição das espécies e susceptibilidade in vitro de isolados clínicos de *Candida* de um hospital universitário na Turquia ao longo de um período de 5 anos. **Medical Mycology February**. v. 49, n. 2, p. 126-131, 2011.

KOLENBRANDER, P. E. et al. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 471, 2010.

KÖNIG, G. M.; WRIGHT, Anthony D.; LINDEN, A. Antiplasmodial and Cytotoxic Metabolites from the Maltese Sponge *Agelas oroides* (1). **Planta medica**, v. 64, n. 05, p. 443-447, 1998.

KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, Maiken C. Invasive candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 15, p. 1445-1456, 2015.

KUMAR, D.; RAWAT, D. S. Marine natural alkaloids as anticancer agents. **Opportunity, challenge and scope of natural products in medicinal chemistry**, v. 213, 2011.

KUSAMA, T. et al. Bromopyrrole alkaloids from a marine sponge *Agelas* sp. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 62, n. 5, p. 499-503, 2014.

LACAZ, C.; PORTO, E.; MARTINS, J.; HEINS-VACCARI, E.; MELO, N. Tratado de Micologia Médica. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LACERDA, R. B. Alcaloides Marinhos Bromopirrólicos. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 2, p. 713-729, 2014.

LEI, J.; ZHOU, J. A marine natural product database. **Journal of chemical information and computer sciences**, v. 42, n. 3, p. 742-748, 2002.

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

LHULLIER, C. et al. Clerodane Diterpenes from the Marine Sponge *Raspailia bouryesnaultae* Collected in South Brazil. **Marine drugs**, v. 17, n. 1, p. 57, 2019.

LIMA-NETO, R. G. et al. Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. **Mycoses**, v. 54, p. 23-29, 2009.

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.

LOPEZ, J. E. M. Candidiasis (vulvovaginal). **BMJ clinical evidence**, v. 2015, 2015.

- LÓPEZ-MARTÍNEZ, R. Candidosis, a new challenge. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 2, p. 178–184, 2010.
- MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nov**, Vol. 25, nº 3, 429-438, 2002.
- MAGILL, S. S. et al. Multistate point-prevalence survey of health care–associated infections. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 13, p. 1198-1208, 2014.
- MARTINS, M. et al. Morphogenesis control in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* through signaling molecules produced by planktonic and biofilm cells. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 12, p. 2429-2436, 2007.
- MATTHAIYOU, D. K.; CHRISTODOULOPOULOU, T.; DIMOPOULOS, G. How to treat fungal infections in ICU patients. **BMC infectious diseases**, v. 15, n. 1, p. 205, 2015.
- MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.
- MCCARTY, T. P.; PAPPAS, P. G. Invasive candidiasis. **Infectious Disease Clinics**, v. 30, n. 1, p. 103-124, 2016.
- MEHBUB, M. et al. Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: trends and opportunities for discovery of bioactives. **Marine drugs**, v. 12, n. 8, p. 4539-4577, 2014.
- MELO RICETO, É. B. et al. Enzymatic and hemolytic activity in different *Candida* species. **Revista iberoamericana de micología**, v. 32, n. 2, p. 79-82, 2015.
- MELO, A. S.; COLOMBO, A. L.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A. Paradoxical growth effect of caspofungin observed on biofilms and planktonic cells of five different *Candida* species. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3081-3088, 2007.
- 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.

MENDELSON, S. et al. Regulation of the *Candida albicans* hypha-inducing transcription factor Ume6 by the CDK1 cyclins Cln3 and Hgc1. **mSphere**, v. 2, n. 2, p. e00248-16, 2017.

MENEZES, V. M. et al. Classificação da capacidade de adesão de isolados clínicos de *Candida* spp. em padrões de arranjos celulares distintos. **Revista patologia tropical**, v. 42, n. 3, p. 289-300, 2013.

MESA-ARANGO, A. C. et al. The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 11, p. 6627-6638, 2014.

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

MEZIANE-CHERIF, D.; COURVALIN, P. Antibiotic resistance: to the rescue of old drugs. **Nature**, 2014, 510.7506: 477.

MIKULSKA, M. et al. Occurrence, presentation and treatment of candidemia. **Expert review of clinical immunology**, v. 8, n. 8, p. 755-765, 2012.

MODRZEWSKA, B.; KURNATOWSKI, P. Adherence of *Candida* sp. to host tissues and cells as one of its pathogenicity features. **Annals of Parasitology**, v. 61, n. 1, p. 3–9, 2015.

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.

MONTEIRO, D. R. et al. Effect of tyrosol on adhesion of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to acrylic surfaces. **Medical mycology**, v. 53, n. 7, p. 656-665, 2015.

MOUSA, W.; ELMONIR, W.; ABDEEN, E. Molecular typing, virulence genes and potential public health implications of *Candida albicans* isolated from bovine milk. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. Supplement 2, p. S211-S215, 2016.

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

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, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier Health Sciences, p. 627- 642. 2014.

NAKAMURA, H. et al. Agelasidine-A, a novel sesquiterpene possessing antispasmodic activity from the okinawa sea sponge *Agelas* sp. **Tetrahedron Letters**, v. 24, n. 38, p. 4105-4108, 1983.

NAKAMURA, H. M.; CALDEIRA, S. M.; AVILA, M. A. G. Incidence of fungic infections in surgery patients: a retrospective approach. **Revista Associação Brasileira de Enfermeiros de Centro Cirúrgico-SOBECC**, v. 18, n. 3, p. 49-58, 2013.

NAZEMI, M. et al. Antifungal and antibacterial activity of *Haliclona* sp. from the Persian Gulf, Iran. **Journal de mycologie medicale**, v. 24, n. 3, p. 220-224, 2014.

NCUBE, N. S.; AFOLAYAN A. J.; OKOH A. I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. **African Journal of Biotechnology**, v.7, n. 12, p. 1797-1806, 2008.

NEGRI, M. et al. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 31, n. 7, p. 1399-1412, 2012.

NETT, J. E.; ANDES, D. R. Antifungal agents: spectrum of activity, pharmacology, and clinical indications. **Infectious Disease Clinics**, v. 30, n. 1, p. 51-83, 2016.

NG, K. P. et al. *Candida* species epidemiology 2000–2013: a laboratory-based report. **Tropical Medicine and International Health**, 2015.

NGO, H. X.; GARNEAU-TSODIKOVA, S; GREEN, K.D. A complex game of hide and seek: the search for new antifungals. **MedChemComm**, v. 7, n. 7, p. 1285-1306, 2016.

NOBILE, C. J.; JOHNSON, A. D. *Candida albicans* biofilms and human disease. **Annual review of microbiology**, v. 69, p. 71-92, 2015.

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

NUCCI, M. et al. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. **Plos one**, v. 8, 2013.

O'DONNELL, L. E.; ROBERTSON, D.; RAMAGE, G. *Candida* virulence factors. In: **Oral Candidosis**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 7-19, 2015.

O'DONNELL, L. E. et al. Polymicrobial *Candida* biofilms: friends and foe in the oral cavity. **FEMS Yeast Research**, v. 15, n. 7, 2015.

ORTEGA, M. et al. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. **Journal Hospital Infection**, v.77, p. 157–161, 2011.

OWOTADE, F. J.; PATEL, M. Virulence of oral *Candida* isolated from HIV-positive women with oral candidiasis and asymptomatic carriers. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 118, n. 4, p. 455-460, 2014.

PADUCH, R. et al. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 55, n. 5, p. 315, 2007.

PAKSHIR, K. et al. Phospholipase, esterase and hemolytic activities of *Candida* spp. isolated from onychomycosis and oral lichen planus lesions. **Journal de mycologie medicale**, v. 23, n. 2, p. 113-118, 2013.

PALLAVAN, B. et al. Comparison and correlation of candidal colonization in diabetic patients and normal individuals. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 13, n. 1, p. 66, 2014.

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.

PANNANUSORN, S.; FERNANDEZ, V.; RÖMLING, U. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection. **Mycoses**, v. 56, n. 3, p. 264-272, 2013.

PAPPAS, P. G. et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. e1-e50, 2016.

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.

PATIL, Shankargouda et al. Clinical appearance of oral *Candida* infection and therapeutic strategies. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1391, 2015.

PAUL, V. J.; PUGLISI, M. P. Chemical mediation of interactions among marine organisms. **Natural product reports**, v. 21, n. 1, p. 189-209, 2004.

PAUL, V. J.; PUGLISI, M. P.; RITSON-WILLIAMS, R. Marine chemical ecology. **Natural product reports**, v. 23, n. 2, p. 153-180, 2006.

PEIXOTO, J.V. et al. Candidíase- Uma Revisão de Literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 8, p. 75- 82, 2014.

PEMÁN, Javier; CANTÓN, Emilia; ESPINEL-INGROFF, A. Antifungal drug resistance mechanisms. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 7, n. 4, p. 453-460, 2009.

PERICOLINI, E. et al. Secretory aspartyl proteinases cause vaginitis and can mediate vaginitis caused by *Candida albicans* in mice. **MBio**, v. 6, n. 3, p. e00724-15, 2015.

PERLIN, D. S. Echinocandin resistance in *Candida*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. suppl_6, p. S612-S617, 2015.

PETTIT, G. R. et al. Isolation and structures of axistatins 1–3 from the republic of palau marine sponge *Agelas axifera* hentschel. **Journal of natural products**, v. 76, n. 3, p. 420-424, 2013.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American journal of medicine**, v. 125, n. 1, p. S3-S13, 2012.

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.

PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; CASTANHEIRA, M. Regional data analysis of *Candida non-albicans* strains collected in United States medical sites over a 6-year period, 2006–2011. **Mycoses**, v. 57, n. 10, p. 602-611, 2014.

PIETRELLA, D. et al. The inflammatory response induced by aspartic proteases of *Candida albicans* is independent of proteolytic activity. **Infection and immunity**, v. 78, n. 11, p. 4754-4762, 2010.

POLKE, M. et al. Farnesol signalling in *Candida albicans*—more than just communication. **Critical reviews in microbiology**, v. 44, n. 2, p. 230-243, 2018.

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.

POULAIN, D. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. **Critical reviews in microbiology**, v. 41, n. 2, p. 208-217, 2015.

PRASAD, R.; SHAH, A. H.; RAWAL, M. K. Antifungals: mechanism of action and drug resistance. In: **Yeast Membrane Transport**. Springer, Cham, 2016. p. 327-349.

QADIR, M. I. et al. Perspective of Postgraduate Biology Students About Onychomycosis. **Current Trends On Biotechnology & Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 22-25, 2019.

QUINDÓS, G. et al. Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. **Medicina oral, patologia oral y cirugía bucal**, v. 24, n. 2, p. e172, 2019.

RAMAGE, G. et al. *Aspergillus* biofilms: clinical and industrial significance. **FEMS Microbiology Letters**, v. 324, n. 2, p. 89-97, 2011.

RAMAGE, G. et al. Fungal biofilm resistance. **International journal of microbiology**, v. 2012, 2012.

RAMAGE, G. et al. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 11, p. 5459-5463, 2002.

RAMAGE, G. et al. Liposomal amphotericin B displays rapid dose-dependent activity against *Candida albicans* biofilms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2369-2371, 2013.

RAMOS, L. S.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A. L. S. Different Classes of Hydrolytic Enzymes Produced by Multidrug-Resistant Yeasts Comprising the *Candida haemulonii* Complex. **Medical Mycology**, v. 55, n. 2, p. 228–232, 1 fev. 2017.

RAMOS, R.C. et al. Metabolitos secundarios, letalidad y actividad antimicrobiana de seis esponjas marinas de la Bahía de Mochima, Venezuela. **Cuadernos de Investigación UNED**, v.7, n.2, p.225-232, December, 2015.

RANE, R. A. et al. Novel synthetic organic compounds inspired from antifeedant marine alkaloids as potent bacterial biofilm inhibitors. **Bioorganic chemistry**, v. 61, p. 66-73, 2015.

RANE, R. et al. Marine bromopyrrole alkaloids: Synthesis and diverse medicinal applications. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 14, n. 2, p. 253-273, 2014.

RAUTEMAA, R.; RAMAGE, Gordon. Oral candidosis—clinical challenges of a biofilm disease. **Critical reviews in microbiology**, v. 37, n. 4, p. 328-336, 2011.

RIBEIRO, A. L. R. et al. Oral carriage of *Candida* species in HIV-infected patients during highly active antiretroviral therapy (HAART) in Belém, Brazil. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 120, n. 1, p. 29-33, 2015.

RICHARDS, J. J. et al. Amide isosteres of oroidin: assessment of antibiofilm activity and *C. elegans* toxicity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4582-4585, 2009.

RICHARDS, J. J. et al. Synthesis and screening of an oroidin library against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **ChemBioChem**, v. 9, n. 8, p. 1267-1279, 2008

RICHARDS, J. J.; REED, C. S.; MELANDER, C. Effects of N-pyrrole substitution on the anti-biofilm activities of oroidin derivatives against *Acinetobacter baumannii*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 18, n. 15, p. 4325-4327, 2008.

ROBBINS, N. et al. Hsp90 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 9, p. e1002257, 2011.

ROBERT III, W. et al. Inhibition and dispersion of proteobacterial biofilms. **Chemical Communications**, n. 14, p. 1698-1700, 2008.

RODRIGUES, C. F.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 33, n. 5, p. 673-688, 2014.

RONSANI, M. M. et al. Virulence modulation of *Candida albicans* biofilms by metal ions commonly released from orthodontic devices. **Microbial pathogenesis**, v. 51, n. 6, p. 421-425, 2011.

SAILER, M.; COLLI, E.; REGIDOR, P.A. In vitro evaluation of microbial adhesion to a contraceptive vaginal ring with a new polymer composition. **The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care**, p. 1-4, 2019.

SAKITA, K. M. et al. Copolymeric micelles as efficient inert nanocarrier for hypericin in the photodynamic inactivation of *Candida* species. **Future microbiology**, v. 14, n. 6, p. 519-531, 2019.

SÁNCHEZ-VARGAS, L. O. et al. Biofilm formation by oral clinical isolates of *Candida* species. **Archives of oral biology**, v. 58, p. 1 3 1 8 – 1 3 2 6, 2013.

SANGLARD, D. Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. **Frontiers in medicine**, v. 3, p. 11, 2016.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLORL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, (Suppl. 2), p. 2–13, 2015.

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

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

SAULEAU, P.; MORIOU, C.; AL MOURABIT, A. Metabolomics approach to chemical diversity of the Mediterranean marine sponge *Agelas oroides*. **Natural product research**, v. 31, n. 14, p. 1625-1632, 2017.

SAVINI, V. et al. What do we know about *Candida guilliermondii*? A voyage throughout past and current literature about this emerging yeast. **Mycoses**, v. 54, n. 5, p. 434-441, 2011.

SCALA, F. et al. Bromopyrrole alkaloids as lead compounds against protozoan parasites. **Marine drugs**, v. 8, n. 7, p. 2162-2174, 2010.

SCHRODER, K.; ZHOU, R.; TSCHOPP, J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? **Science**, v. 327, n. 5963, p. 296-300, 2010.

SCHULZE, J.; SONNENBORN, U. Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 106, n. 51-52, p. 837, 2009.

SCORZONI, L. et al. Antifungal therapy: new advances in the understanding and treatment of mycosis. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 36, 2017.

SEMIGHINI, C. P. et al. Farnesol-induced apoptosis in *Aspergillus nidulans* reveals a possible mechanism for antagonistic interactions between fungi. **Molecular microbiology**, v. 59, n. 3, p. 753-764, 2006.

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

SHAPIRO, R. S.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 75, n.2, p.213, 2011.

SHAPIRO, R. S. et al. Hsp90 orchestrates temperature-dependent *Candida albicans* morphogenesis via Ras1-PKA signaling. **Current Biology**, v. 19, n. 8, p. 621-629, 2009.

SHARMA, A. Oral candidiasis: **An opportunistic infection**: A review. 2019.

SHARMA, A. et al. Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. **Journal of ethnopharmacology**, v. 208, p. 264-329, 2017.

SHARMA, J. et al. Linking Cellular Morphogenesis with Antifungal Treatment and Susceptibility in *Candida* Pathogens. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 17, 2019.

SHORT, B. et al. *Candida auris* exhibits resilient biofilm characteristics in vitro: implications for environmental persistence. **Journal of Hospital Infection**, 2019.

SHUSTER, A.; OSHEROV, N.; ROSENBERG, M. Alcohol-mediated haemolysis in yeast. **Yeast**, v. 21, n. 16, p. 1335-1342, 2004.

SIDDIQUI, Z. N. et al. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 237-243, 2013.

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

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, D.F. **Avaliação da atividade biológica de β – citronelol sobre *Candida albicans***.95f Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, área de concentração: Farmacologia) – UFPB, João Pessoa, 2016.

SILVA, H. M. **Characterization and identification of *Candida* species in bone marrow transplant patients**. 2011. 67 f. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

SILVA, L. B. et al. Identification and antifungal susceptibility of fungi isolated from dermatomycoses. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 28, n. 5, p. 633-640, 2014.

SILVA, S. et al. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. **Sabouraudia**, v. 47, n. 7, p. 681-689, 2009.

SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 36, n. 2, p. 288–305, 2012.

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

SINGH, K. S.; MAJIK, M. S. Pyrrole-Derived Alkaloids of Marine Sponges and Their Biological Properties. In: **Studies in Natural Products Chemistry**. Elsevier, 2019. p. 377-409.

SINGH, S. D. et al. Hsp90 governs echinocandin resistance in the pathogenic yeast *Candida albicans* via calcineurin. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 7, p. e1000532, 2009.

SOBEL, J. D. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 214, n. 1, p. 15-21, 2016.

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.

SONG, J. C.; STEVENS, D. A. Caspofungin: pharmacodynamics, pharmacokinetics, clinical uses and treatment outcomes. **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n. 5, p. 813-846, 2016.

SONG, J. et al. The *Aspergillus fumigatus* damage resistance protein family coordinately regulates ergosterol biosynthesis and azole susceptibility. **MBio**, v. 7, n. 1, p. e01919-15, 2016.

SOUZA, R. T. M. P. **Alcaloides bromopirrólicos da Esponja Marinha Dictyonella sp. do Delta do Rio Amazonas**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. 2018.

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

STEPANOVIĆ, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Apmis**, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007.

STOUT, E. P.; YU, L. C.; MOLINSKI, T. F. Antifungal diterpene alkaloids from the Caribbean sponge *Agelas citrina*: Unified configurational assignments of agelasidines and agelasines. **European journal of organic chemistry**, v. 2012, n. 27, p. 5131-5135, 2012.

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

SUN, J. et al. *Candida albicans* amphotericin B-tolerant persister formation is closely related to surface adhesion. **Mycopathologia**, v. 181, n. 1-2, p. 41-49, 2016.

SUN, Y. et al. pH regulates white-opaque switching and sexual mating in *Candida albicans*. **Eukaryotic cell**, v. 14, n. 11, p. 1127-1134, 2015.

TAFF, H. T. et al. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. **Future microbiology**, v. 8, n. 10, p. 1325-1337, 2013.

TAFF, H. T.; NETT, J. E.; ANDES, D. R. Comparative analysis of *Candida* biofilm quantitation assays. **Sabouraudia**, v. 50, n. 2, p. 214-218, 2012.

TAKALE, B. S. et al. Synthesis and biological evaluation of pyrrole-2-carboxamide derivatives: oroidin analogues. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 3, p. 1387-1396, 2014.

TAMPIERI, M. P. et al. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. **Mycopathologia**, v. 159, n. 3, p. 339-345, 2005.

TANAKA, N. et al. Bromopyrrole Alkaloids from Okinawan Marine Sponges *Agelas* spp. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 64, n. 7, p. 691-694, 2016.

TANAKA, N. et al. Hyrtimomines D and E, bisindole alkaloids from a marine sponge *Hyrtios* sp. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 31, p. 4038-4040, 2013a.

TANAKA, N. et al. Nagelamides U–W, bromopyrrole alkaloids from a marine sponge *Agelas* sp. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 29, p. 3794-3796, 2013b.

TARASZKIEWICZ, A. et al. Innovative strategies to overcome biofilm resistance. **BioMed research international**, v. 2013, 2012.

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.

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.

TERÇAS, A. L.G. et al. Antifungal drug susceptibility of candida species isolated from HIV-positive patients recruited at a public hospital in São Luís, Maranhão, Brazil. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 298, 2017.

THAKUR, J. K., et al. A nuclear receptor-like pathway regulating multidrug resistance in fungi. **Nature**, 452.7187: 604, 2008.

TIMMERMANS, B. et al. Adhesins in *Candida glabrata*. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 2, p. 60, 2018.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **MICROBIOLOGIA**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. p. 332.

TOUATI, I. et al. Screening of antimicrobial activity of marine sponge extracts collected from Tunisian coast. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 17, p. 183-187, 2007.

TSCHERNER, M.; SCHWARZMÜLLER, T.; KUCHLER, K. Pathogenesis and antifungal drug resistance of the human fungal pathogen *Candida glabrata*. **Pharmaceuticals**, v. 4, n. 1, p. 169-186, 2011.

TUMBARELLO, M. et al. Biofilm production by *Candida* species and inadequate antifungal therapy as predictors of mortality for patients with candidemia. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1843-1850, 2007.

TUMBARELLO, M. et al. Risk factors and outcomes of candidemia caused by biofilm-forming isolates in a tertiary care hospital. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e33705, 2012.

UPPULURI, P. et al. *Candida albicans* dispersed cells are developmentally distinct from biofilm and planktonic cells. **mBio**, v. 9, n. 4, p. e01338-18, 2018.

UPPULURI, P. et al. The transcriptional regulator Nrg1p controls *Candida albicans* biofilm formation and dispersion. **Eukaryotic cell**, v. 9, n. 10, p. 1531-1537, 2010.

VAN DER WEERDEN, N. L.; BLEACKLEY, M. R.; ANDERSON, M. A. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. **Cellular and molecular life sciences**, v. 70, n. 19, p. 3545-3570, 2013.

VANDEPUTTE, P. et al. Molecular mechanisms of resistance to 5-fluorocytosine in laboratory mutants of *Candida glabrata*. **Mycopathologia**, v. 171, n. 1, p. 11-21, 2011.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International journal of microbiology**, v. 2012, 2011.

VIEIRA, A. J. H.; DOS SANTOS, J. I. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Brazilian Journal of Clinical Analyses**, v. 49, n. 3, p. 235-9, 2017.

VITAL JÚNIOR, A. C. et al. In vitro investigation of B-citronellol biological effect in association with amphotericin B against *Candida tropicalis*. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 38, p. 1784-1787, 2019.

WÄCHTLER, B. et al. *Candida albicans*-epithelial interactions: dissecting the roles of active penetration, induced endocytosis and host factors on the infection process. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e36952, 2012.

WANDERLEY, L. et al. Occurrence and pathogenicity of *Candida* spp. in unpasteurized cheese. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 2, 2013.

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

WILLIAMS, D. W. et al. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. **Journal of oral microbiology**, v. 5, n. 1, p. 22434, 2013.

WUYTS, J.; VAN DIJCK, P.; HOLTAPPELS, M. Fungal persister cells: The basis for recalcitrant infections? **PLoS pathogens**, v. 14, n. 10, p. e1007301, 2018.

YANG, F. et al. Antimicrobial metabolites from the Paracel Islands sponge *Agelas mauritiana*. **Journal of natural products**, v. 75, n. 4, p. 774-778, 2012.

ZAHEDI, N. et al. Is human dectin-1 Y238X gene polymorphism related to susceptibility to recurrent vulvovaginal candidiasis?. **Current Medical Mycology**, v. 2, n. 3, p. 15, 2016.

ZANINI, S. F.; SOUSA, D. R. I.; MARTINS, J. D. L. Capítulo 11-Resistência e adaptação bacteriana aos antimicrobianos. **Bruno Borges Deminicis & Carla Braga Martins**, p. 111, 2014.

ZARDO, A. et al. LEVANTAMENTO DE INFORMAÇÕES ETNOBOTÂNICAS, ETNOFARMACOLÓGICAS E FARMACOLÓGICAS REGISTRADAS NA LITERATURA SOBRE *Tropaeolum majus* L. (CHAGUINHA). **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 20, n. 3, 2016.

ZENG, B. et al. *In vitro* and *in vivo* effects of suloctidil on growth and biofilm formation of the opportunistic fungus *Candida albicans*. **Oncotarget**, v. 8, n. 41, p. 69972, 2017.

ZHANG, H. et al. Bioactive secondary metabolites from the marine sponge genus *Agelas*. **Marine drugs**, v. 15, n. 11, p. 351, 2017.

ZHENG, Q. et al. Environmental and genetic regulation of white-opaque switching in *Candida tropicalis*. **Molecular microbiology**, v. 106, n. 6, p. 999-1017, 2017.

ZIDAR, N. et al. Antimicrobial activity of the marine alkaloids, clathrocin and oroidin, and their synthetic analogues. **Marine drugs**, v. 12, n. 2, p. 940-963, 2014.

ZORE, G. B. et al. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. **Phytomedicine**, v. 18, n. 13, p. 1181– 1190, 2011.