



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

POLLYANA MYRELLA CAPELA DOS SANTOS

**EFEITO ANTIFÚNGICO DA CASCA DE *POINCIANELLA*
PLUVIOSA E FLUCONAZOL SOBRE CÉLULAS
PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS DE *CANDIDA SPP***

Londrina
2018

POLLYANA MYRELLA CAPELA DOS SANTOS

**EFEITO ANTIFÚNGICO DA CASCA DE *POINCIANELLA*
PLUVIOSA E FLUCONAZOL SOBRE CÉLULAS
PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS DE *CANDIDA SPP***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Santos, Pollyana Myrella Capela dos.

Efeito antifúngico da casca de *Poincianella pluviosa* e fluconazol sobre células planctônicas e sésseis de *Candida* spp / Pollyana Myrella Capela dos Santos. - Londrina, 2018.

79 f. : il.

Orientador: Lucy Megumi Yamauchi Lioni.

Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2018.

Inclui bibliografia.

1. *Candida* - Tese. 2. Fungos patogênicos - Tese. I. Lioni, Lucy Megumi Yamauchi. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

POLLYANA MYRELLA CAPELA DOS SANTOS

**EFEITO ANTIFÚNGICO DA CASCA DE *POINCIANELLA PLUVIOSA* E
FLUCONAZOL SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS DE
*CANDIDA SPP***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Lucy Megumi Yamauchi
Lioni
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Natalia de Souza Botelho
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Renata K.T. Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Alexandre Tadachi Morey
Instituto Federal do Rio Grande do Sul – IFRS

Prof. Dr. Eliandro Reis Tavares
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 08 de outubro de 2018.

Ao meu avô, cujos pequenos gestos
sempre significaram mais que qualquer
imensidão infinita.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa. Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni, pela disposição e confiança em me orientar e permitir que eu desenvolvesse este trabalho.

À Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada-Ogatta, que atuou como uma segunda orientadora, pela constante ajuda na busca de soluções e melhores resultados.

À Profa. Dra. Renata K.T. Kobayashi e à Profa. Dra. Natalia de Souza Botelho, por aceitarem fazer parte da comissão examinadora.

Ao Prof. Dr. Alexandre Tadachi Morey e ao Prof. Dr. Eliandro Reis Tavares, por todo o conhecimento, pela constante disposição em ajudar e melhorar este trabalho e também por aceitarem fazer parte da comissão avaliadora.

À Gabriella Maria Andriai, cuja ajuda prática, teórica e pessoal foi essencial para este trabalho e para a realização desse Doutorado. Obrigada pela dedicação, pelos momentos de descontração, pelas conversas e risadas e pela amizade cultivada dentro e fora do laboratório. Esses momentos foram essenciais para que eu pudesse completar essa jornada.

Aos meus amigos de laboratório, Ana Elisa Belotto, Caroline Azevedo, Renata Perugini Biasi Garbin, Danielle Kian e Lucas Fernando da Silva. A amizade, a troca de experiência, as palavras de encorajamento e toda a alegria nunca permitiram que eu desistisse.

À Jussevania Pereira Santos, pela ajuda na realização dos experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, por fornecer a bolsa que permitiu que eu concluísse esse trabalho.

Aos meus avós, que sempre acreditaram em mim, vendo muito mais do que eu mesma consigo ver.

Aos meus pais, José e Ilda, por toda a dedicação e trabalho, e por estarem ao meu lado em todas as minhas escolhas. Sem vocês, nada disso seria possível.

Ao Douglas, pelo amor, companheirismo, amizade, paciência, dedicação, carinho, encorajamento e presença em todos os momentos. Obrigada por me ouvir, me entender e me ajudar a enfrentar as batalhas e os momentos mais difíceis. Obrigada por fazer parte da minha vida, sem você eu não teria forças para concluir esse trabalho.

A Deus, por me dar a luz, a calma, a confiança e a Sua presença em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis. Obrigada por tudo o que eu jamais serei capaz de agradecer o suficiente!

SANTOS, P. M. C. **Efeito antifúngico da casca de *Poincianella pluviosa* e fluconazol sobre células planctônicas e sésseis de *Candida* spp.** 2018. 79 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Candida spp. são leveduras comensais que em situações de imunossupressão podem causar desde infecções superficiais até quadros sistêmicos graves. O fluconazol age inibindo a via de biossíntese do ergosterol e é considerado o fármaco de escolha para o tratamento de candidíases, entretanto, a frequente seleção de cepas dose-dependentes ou resistentes é uma limitação que necessita ainda ser superada. Nesse sentido, estudos de compostos obtidos a partir de plantas apresentam-se promissores devido à sua ampla disponibilidade e fácil acesso. *Poincianella pluviosa* são leguminosas amplamente distribuídas na Caatinga e detentoras de inúmeras propriedades terapêuticas, como atividade anti-inflamatória e antioxidante. Tendo em vista a urgência na busca de novas substâncias antimicrobianas, atrelada à necessidade de redução da probabilidade de seleção de cepas resistentes, esse trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antifúngico do extrato da casca de *P. pluviosa* (sibipiruna), isolado e em combinação com fluconazol, sobre células planctônicas e sésseis de diferentes espécies de *Candida* spp. Inicialmente, os perfis de sensibilidade de diferentes frações do extrato foram determinados para as células planctônicas de 5 cepas ATCC e 16 isolados clínicos obtidos a partir de múltiplos sítios anatômicos. A concentração inibitória mínima foi determinada pelo teste de microdiluição em caldo e variou entre <1,9 e >1000 µg/mL para o extrato bruto e entre <1,9 a 500 µg/mL para a fração acetato de etila (FAE), que, por exibir melhor perfil de sensibilidade, foi selecionada para as análises subsequentes. O extrato exibiu ação fungistática para todas as espécies, alterando a curva de crescimento das células planctônicas em comparação ao grupo controle nas concentrações de CIM e 2X CIM durante 24 horas de tratamento. Para o ensaio de adesão, as leveduras foram cultivadas na presença do extrato nos valores de ½ CIM, CIM e 2X CIM, e a biomassa das células aderidas determinada através da coloração com cristal violeta. O tratamento promoveu a redução na capacidade de adesão de todos isolados com valores que variaram entre 14 e 64,7%, sendo estatisticamente significantes em todas as concentrações para as espécies *C. albicans* e *C. parapsilosis*. O efeito sobre as células sésseis foi avaliado durante a fase de formação e sobre o biofilme maduro. A porcentagem de redução das células metabolicamente ativas variou entre 33,7 e 84,7% para a fase inicial de formação, e entre 2,1 e 79% para o biofilme formado, sendo os melhores resultados observados para *C. krusei* e *C. albicans*, respectivamente. O efeito da combinação entre a FAE e o fluconazol foi realizado pelo método de *checkerboard* e mostrou efeito sinérgico para células planctônicas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. O mesmo tratamento resultou em efeito sinérgico sobre a fase de formação do biofilme das espécies *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*, mas apenas sobre *C. glabrata* quando analisada sobre o biofilme já formado. Esses resultados indicam o potencial antifúngico da fração acetato do extrato da casca de *P. pluviosa* e da sua combinação com o fluconazol, apresentam-se como uma promissora fonte de pesquisa para novas moléculas e tratamentos alternativos de candidíases.

Palavras-chave: *Candida*. Fluconazol. *Poincianella pluviosa*. Sinergismo.

SANTOS, P. M. C. **Antifungal effect of the bark extract of *Poincianella pluviosa* and fluconazole against *Candida* spp.** 2018. 79 p. Thesis (Doctor Degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Candida spp. are commensal yeasts of the human microbiota responsible from superficial thrushes to systemic infections in immunocompromised patients. Fluconazole, the drug of choice for the treatment of candidiasis, acts by inhibiting ergosterol biosynthesis, however, the dose-dependent or resistant strains selection must yet to be overcome. In this context, plants bioproducts are a promising source of researches due to its wide availability and easy access. The flowering plant *Poincianella pluviosa* is widely distributed throughout the Caatinga and exhibits several therapeutic properties, such as anti-inflammatory and antioxidant activities. In order to search for new natural substances with antifungal potential, associated with the imperativeness of reducing the development of drug resistance, this study aimed to evaluate the antifungal properties of *P. pluviosa* (sibipiruna) bark extract, alone and in combination with fluconazole, against planktonic and sessile cells of *Candida* spp. Initially, the sensitivity profiles of 2 fractions of the extract were determined against 5 ATCC strains and 16 clinical isolates obtained from multiple anatomic sites. The minimal inhibitory concentrations varied from <1.9 to >1000 µg/mL for the crude extract and <1.9 to 500 µg/mL for the ethyl acetate fraction (EAF). Due to its best sensitivity profile, EAF was selected for the subsequent analyses. The extract exhibited fungistatic activity against all species, altering the growth kinetics of planktonic cells when compared to the control group at MIC and 2X MIC values during 24 hours of treatment. For the adhesion assay, yeasts were treated with ½ MIC, MIC and 2X MIC values for 2 hours, and the biomass of the adhered cells determined by the violet crystal method. Treatment resulted in the reduction of the adhesion ability of all strains with values ranging from 14% to 64.7%, however, statistically significant results for all concentrations were only observed for *C. albicans* and *C. parapsilosis*. The effect of the extract on sessile cells was assessed during the first 24 hours of formation and against mature biofilm. Inhibition rates ranged from 33.7% to 84.7% for the initial formation phase and 2.1% to 79% for the mature biofilm, with the best reduction values observed for *C. krusei* and *C. albicans*, respectively. The effect of the combination between FEA and fluconazole was performed by the checkerboard method and revealed a synergistic effect against planktonic cells of *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* and *C. parapsilosis*. The same treatment also exhibited synergistic activity against growing biofilms of *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei*, but only against *C. glabrata* regarding mature biofilm. These results highlight the antifungal potential of sibipiruna bark extracts, alone or in combination with fluconazole, as a promising source of research for new molecules and alternative candidiasis treatments.

Keywords: *Candida*. Fluconazole. *Poincianella pluviosa*. Synergistic effect.

LISTA DE ABREVIATURAS

µL	microlitro
°C	grau Celsius
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CIM	concentração inibitória mínima
CIMS	concentração inibitória mínima séssil
CFM	concentração fungicida mínima
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
FICI	índice de concentração Inibitória Fracionária
FLU	fluconazol
G	grama
H	hora
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HSC	hidrofobicidade da superfície celular
Mg	miligrama
MEC	matriz polimérica extracelular
mL	mililitro
MOPS	<i>3-(n-morpholino)propanesulfonic acid</i>
Nm	nanômetro
PCR	reação em cadeia da polimerase
Rpm	rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
DAS	sabouraud dextrose ágar
SDB	sabouraud dextrose caldo
SIB	sibipiruna
UTI	unidade de terapia intensiva
V	volume
XTT	<i>2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	O GÊNERO <i>CANDIDA</i>	12
2.2	TRATAMENTO DE CANDIDÍASES E RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS.....	23
2.3	ANTIFÚNGICOS NATURAIS E <i>POINCIANELLA PLUVIOSA</i>	28
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4	DESENVOLVIMENTO	36
4.1	ARTIGO: INIBIÇÃO SINÉRGICA DO CRESCIMENTO DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS DE <i>CANDIDA</i> SPP. PELA ASSOCIAÇÃO DA FRAÇÃO DE ACETATO DE ETILA DE <i>POINCIANELLA PLUVIOSA</i> COM FLUCONAZOL.....	36
5	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

Fungos são micro-organismos ubíquos que se encontram amplamente distribuídos no solo, plantas e substratos orgânicos, mas embora componham cerca de aproximadamente 7% de todas as espécies eucarióticas da Terra, apenas cerca de 600 são consideradas patógenos humanos (BADIEE; HASHEMIZADEH, 2014). Desde o início dos anos 80, o número de infecções fúngicas tem aumentado significativamente, afetando mais de 1 bilhão de pessoas e resultando em milhões de mortes anualmente. Fatores como o uso crescente de antibióticos de amplo espectro, maior acesso a tratamentos quimioterápicos citotóxicos, expansão do número de transplantes de órgãos e crescente aumento da expectativa de vida, ainda que responsáveis pela melhora da qualidade de vida e prognóstico clínico, acarretam também em alto risco de aquisição de infecções fúngicas (NOËL, 2012; ORTEGA et al., 2011; PU et al., 2017; YAPAR, 2014). Além disso, apesar dos enormes avanços em técnicas de diagnóstico e no desenvolvimento de fármacos antifúngicos, esses micro-organismos são ainda constantemente negligenciados por comunidades políticas e sociais (TUDELA; DENNING, 2017).

Dentre a lista de fungos patogênicos responsáveis por doenças em humanos, sem dúvida a causa mais importante de micoses oportunistas em todo o mundo é ainda o gênero *Candida* (PFALLER; DIEKEMA, 2007). Essas leveduras, integrantes da microbiota da população, utilizam de um desequilíbrio no estado imunológico do indivíduo para transitar do estado comensal para o patogênico, causando, desta forma, desde infecções cutâneas e mucosas superficiais até doenças sistêmicas (PFALLER et al., 2007). Embora estudos epidemiológicos mostrem que *C. albicans* seja ainda responsável pela maioria das infecções invasivas ao redor do mundo, o número de isolados pertencentes a espécies não-*albicans* vem crescendo significativamente nas duas últimas décadas (RODRIGUES; SILVA; HENRIQUES, 2014). *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. dubliniensis* têm sido frequentemente relatados, podendo chegar a 66% dos isolados (CHOWDHARY; SHARMA; MEIS, 2017; DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014).

A transição de comensal para patógeno, assim como a etiologia da candidíase, dependem não somente da situação imunológica do hospedeiro, mas também de elementos inatos à levedura (TSUI; KONG; JABRA-RIZK, 2016; TAMURA et al., 2007). Dentre os fatores atribuídos à virulência do gênero *Candida*

spp. estão: adesão às células epiteliais do hospedeiro, secreção de enzimas hidrolíticas, hidrofobicidade da superfície celular, produção de hifas e formação de biofilme (HÖFS; MOGAVERO; HUBE, 2016). De fato, a principal causa de quadros sistêmicos associados a essas leveduras está relacionada à formação de biofilmes, comunidades organizadas envoltas em uma matriz extracelular e aderidas a superfícies bióticas e abióticas e com características fisiológicas, como taxa de crescimento, metabolismo e transcrição gênica, alterados em relação às células planctônicas (RAMAGE et al., 2012; TSUI; KONG; JABRA-RIZK, 2016; UPPULURI et al., 2009). A presença de biofilmes está constantemente associada a infecções altamente resistentes e de elevadas taxas de mortalidade que frequentemente só podem ser tratadas por remoção do dispositivo médico ou cirurgias (ANDES; SAFDAR; BADDLEY, 2012).

Atualmente, o tratamento de candidíases faz uso de diferentes classes de antifúngicos para eliminar ou inibir o crescimento das leveduras (PFALLER, 2012). Esses antifúngicos têm como mecanismos de ação principalmente a inibição da biossíntese dos esteróis que compõe a membrana plasmática da célula, como os azóis, alilaminas e morfolinas; a interação direta com a membrana celular, como os polienos; ou o bloqueio da formação da parede celular, como as equinocandinas (PRASAD; SHAH; RAWAL, 2016). Entretanto, a emergência de leveduras resistentes, associada à frequência de infecções relacionadas a biofilmes, assim como à alta toxicidade e elevado custo dos antifúngicos disponíveis, são limitações que têm tornado o tratamento dessas infecções de extrema complexidade (NOËL, 2012; HULL et al., 2012; SAMARANAYAKE et al., 2012). Nesse contexto, plantas e seus compostos secundários apresentam-se como alternativas econômicas, acessíveis e promissoras no tratamento de diferentes infecções fúngicas (SARDI et al., 2011).

As leguminosas do gênero *Poincianella* spp. apresentam múltiplas propriedades terapêuticas, incluindo atividades antivirais (CHIANG et al., 2003; JIANG et al., 2001; LIU et al., 2009), antibacterianas (ARIF et al., 2009), antifúngicas (SAMPAIO et al., 2009) e anti-inflamatórias (RAO; FANG; TZENG, 2005; YODSAOUE et al., 2010), e suas folhas, frutos e casca são utilizados na forma de infusões, xaropes e bochechos em diferentes regiões do mundo, como forma de tratamento alternativo para as mais diversas patologias (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). A análise fitoquímica da planta mostrou a presença de alcalóides, flavonóides, lactonas, saponinas, açúcares, sesquiterpenos, triterpenos e taninos, muitos dos quais já analisados sobre seus efeitos sobre células sésseis e planctônicas de *Candida* spp., (SOUZA et al., 2006).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O GÊNERO *CANDIDA*

Nas últimas décadas, a natureza das doenças infecciosas tem passado por profundas mudanças. Micro-organismos com papel patogênico desconhecido emergiram como importantes causas de morbidade e mortalidade no mundo todo (DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014). Dentre esses, estima-se que as doenças fúngicas afetem aproximadamente 1,2 bilhões de indivíduos ao redor do mundo, com pelo menos 1,5 milhões de mortes a cada ano (CAMPOY; ADRIO, 2017; CHANG et al., 2017). E, apesar da diversidade de fungos responsáveis por esse problema, sem dúvida, a mais importante causa de micoses em todo o mundo continua sendo o gênero *Candida* (PFALLER; DIEKEMA, 2007).

Esse grupo compreende mais de 150 espécies de leveduras fenotípica e genotipicamente heterogêneas entre si e ubíquas na natureza (DEORUKHKA; SAINI, 2015). As células apresentam formas arredondadas, ovais, de hifas ou pseudo-hifas e com tamanho variando de 2 a 4 µm, realizam reprodução por brotamento e apresentam colônias de aspecto cremoso e cor creme em meio de cultura solidificado (DEORUKHKAR; SAINI, 2015; SIDRIM; ROCHA, 2004). Cerca de 65% dessas leveduras mostram-se incapazes de crescer à temperatura corporal de 37°C, e dentre a porcentagem restante, apenas 15 são verdadeiramente reconhecidas como agentes etiológicas de infecções humanas: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. pelliculosa*, *C. kefyr*, *C. lipolytica*, *C. famata*, *C. inconspícua*, *C. rugosa* e *C. norvegensis* (BERTHOLOM, 2012; DADAR et al., 2018; YAPAR, 2014).

Essas leveduras participam como comensais da microbiota de múltiplos sítios anatômicos, como pele, cavidade bucal, ouvido externo, trato respiratório, conjuntiva, trato urogenital e gastrointestinal, de aproximadamente 31-55% da população (SARDI et al., 2013; SILVA et al., 2012). No entanto, em situações de predisposição relacionadas primariamente às características do hospedeiro, podem atuar como patógenos oportunistas, acarretando desde infecções superficiais cutâneas, vulvovaginais e orofaríngeas, até quadros sistêmicos e invasivos graves (EGGIMAN et al., 2003; PFALLER et al., 2012; WILLIAMS et al., 2011). Fatores de predisposição locais e sistêmicos para infecções por *Candida* incluem, entre outros, o uso de

antibióticos de amplo espectro, nutrição parenteral, interrupção das barreiras mucosas devido a cirurgias, tratamento quimioterápico e radioterápico contra o câncer, transplantes de órgãos, internamento em unidades de tratamento intensivo, extremos de idade, uso de dentaduras, xerostomia, disfunções endócrinas, desnutrição, uso de fármacos imunomoduladores sistêmicos, uso de corticosteroides inalatórios, tratamento de reposição hormonal e estados de imunossupressão, como no caso da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (BEDAIR; DARWAZEH; AL-ABOOSI, 2012; DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014; MILLSOP; FAZEL, 2016; NETT; ANDES, 2006; PIERCE et al., 2015).

Fatores de predisposição, associados à transmissão exógena através de profissionais e de dispositivos médicos assim como ao aumento da expectativa de vida da população imunocomprometida, têm, nos últimos anos, acentuado a ocorrência de infecções por esses micro-organismos (BUTTS; KRYSAN, 2012; DA MATTA et al., 2010; TEODORO et al., 2015). *C. albicans* é a espécie mais frequentemente isolada a partir de infecções humanas, sendo responsável por 40-87% dos casos de candidíases (FU et al., 2017; SCOCOZZA et al., 2018) e uma fonte constante de preocupação pública devido às altas taxas de internação e custos hospitalares (CHITNIS et al., 2012; LAI et al., 2012). Nos EUA, essa espécie é considerada a quarta maior causa de infecções sanguíneas associadas aos cuidados de saúde (LEWIS, 2009), gerando uma internação média de 20 dias, com um custo de mais de 52 mil dólares por paciente e taxa de mortalidade de 43,6% (MORAN et al., 2010). Entretanto, apesar da importância de *C. albicans*, tem sido observada, nos últimos anos, uma mudança na epidemiologia dessas infecções, com distribuições cada vez maiores de espécies como *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* (COLOMBO et al., 2007; DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014; FALAGAS; ROUSSOS; VARDAKAS, 2010; HORN et al., 2009; LEWIS, 2009; SARDI et al., 2013; SILVA et al., 2012).

Comumente associado a pacientes com neutropenia e malignidades, *C. tropicalis* resulta, em geral, em infecções mais persistentes e necessárias de terapia intensiva que *C. albicans* (COLOMBO, 2007; FERNANDEZ-RUIZ et al., 2015; KONTOYIANNIS et al., 2001; NUCCI; COLOMBO, 2007). No Brasil, é a terceira espécie mais frequentemente associada a pacientes com candidemia, respondendo por 15,3% de todos os relatos (DOI et al., 2016). Já na França e Espanha é a terceira mais isolada a partir de infecções urinárias, sendo responsável por 6,5% e 36% dos casos, respectivamente (KAUFFMAN et al., 2000; ÁLVAREZ-LERMA et al., 2003). A

espécie *C. krusei*, por outro lado, tem sido relacionada principalmente a infecções disseminadas em receptores de medula óssea submetidos à profilaxia com fluconazol, e apesar de possuir uma baixa prevalência, cerca de 2%, está associada a altas taxas de mortalidade (MUNOZ et al., 2005; PFALLER et al., 2011).

Uma vez considerada não-patogênica, a espécie *C. glabrata* foi rapidamente responsabilizada por inúmeros casos de candidíases paralelos à introdução e disseminação do uso de triazóis e imidazóis sem receita médica no início dos anos 90 (HAJJEH et al., 2004; RODRIGUES; SILVA; HENRIQUES, 2014). Fatores de predisposição incluem idade avançada, diabetes, câncer, transplante de medula óssea e profilaxia antifúngica (KRCMERY; BARNES, 2002; PFALLER et al., 2005). Essa levedura exibe altas taxas de mortalidade e sua distribuição global é de cerca de 11%, sendo a segunda espécie mais isolada, atrás apenas de *C. albicans* (PFALLER et al., 2011). Além disso, a relação entre essas duas espécies mostra-se clara em pacientes com candidíase bucal, em que a infecção mista é encontrada em até 70% dos casos (REDDING et al., 2002).

Infecções sistêmicas por *C. parapsilosis* mostram-se relacionadas principalmente a neonatos, receptores de órgãos, pacientes em UTI e em uso de dispositivos médicos (FALAGAS; ROUSSOS; VARDAKAS, 2010; SILVA et al., 2012). Entre 2009 e 2014, verificou-se uma redução na distribuição dessa espécie, que passou de 23,4% dos isolados para 20,7% (XIAO et al., 2018). Entretanto, esses valores tendem a exibir variações de acordo com o local ou forma da doença analisados. Em países europeus, por exemplo, a taxa de prevalência de candidemias causadas por essa espécie é de 14% (TORTORANO et al., 2006), enquanto no Brasil, de acordo com a Programa Nacional de Vigilância, essa porcentagem pode chegar 24,1% (DOI et al., 2016). Entretanto, apesar de frequentemente isolada e amplamente distribuída, *C. parapsilosis* apresenta, em geral, menor taxa de mortalidade quando comparada a *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* (LAGUNES et al., 2016).

Inicialmente considerada uma levedura apenas saprófita, a distribuição global de infecções por *C. guilliermondii* é baixa, cerca de 0,7% (PFALLER et al., 2011). Raramente isolada a partir de pacientes HIV positivos e neonatos, essa espécie está principalmente relacionada a infecções sanguíneas em pacientes com câncer (DEORUKHKAR; SAINI, 2015; SAVINI et al., 2011), um fator de risco evidenciado ao serem analisados apenas dados relacionados a candidemias, nos quais a prevalência

da levedura pode variar de 11,7% a 64,5% dos isolados, com uma taxa de mortalidade de 24,1% (CHANG et al., 2017; GIRMENIA et al., 2006).

C. orthopsilosis e *C. metapsilosis*, anteriormente designadas como *C. parapsilosis* grupo II e III, respectivamente, são espécies raramente isoladas a partir de infecções em humanos (TAVANTI et al., 2005). E apesar de exibirem distribuições globais baixas, 6,1% para *C. orthopsilosis* e 1,8% para *C. metapsilosis*, esses valores podem variar de acordo com a região e espécime clínico estudado, podendo chegar a 10,9% dos isolados na América do Sul (LOCKHART et al., 2008). Morfologicamente idêntica a *C. glabrata*, *C. bracarensis* foi descrito primeiramente em 2006 a partir de dois casos de candidíase vulvovaginal em Portugal e de infecções sanguíneas no Reino Unido (CORREIA et al., 2006). Poucos relatos de isolados obtidos a partir de exsudado de cateter (CUENCA-ESTRELLA et al. 2011), abscesso pélvico (BISHOP et al., 2008) e, mais recentemente, de esfregaço vaginal (TREVIÑO-RANGEL et al., 2017) indicam sua baixa distribuição global, cerca de apenas 0,2% (LOCKHART et al., 2009). Já a espécie *C. lusitaniae*, apesar de raramente descrita devido à sua baixa prevalência, cerca de 0,3% (PFALLER et al., 2011), tem sido principalmente relatada como agente causadora de infecções sanguíneas em pacientes imunocomprometidos (ASNER et al., 2015; VIUDES et al., 2002). Fatores de risco para essa levedura incluem neutropenia, doenças malignas sanguíneas, tumores sólidos, doenças renais e transplantes de órgãos (ASNER et al., 2015; HAWKINS; BADDOUR, 2003; MINARI; HACHEM; RAAD, 2001; MISHRA et al., 2017), sendo que a taxa de mortalidade pode chegar a 38% (ATKINSON; LEWIS; KONTOYIANNIS, 2008).

O estado fisiológico do hospedeiro é o principal fator que governa a etiologia das infecções por *Candida* (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003). Deficiências no estado imunológico, interrupções nas barreiras epiteliais ou mucosas e alterações na composição da microbiota local são capazes de levar a mudanças no crescimento e fisiologia da levedura e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de um quadro de candidíase (JABRA-RIZK et al., 2016; LIU; FILLER, 2011). Entretanto, a observação de que apenas pequenas alterações no hospedeiro são suficientes para permitir a instalação e progressão da infecção aponta também para o papel essencial do potencial patogênico da levedura na patogenia da doença. De fato, a transição de comensal a patógeno é atribuível a um extenso repertório de fatores de virulência intimamente associados às condições adequadas de predisposição do hospedeiro (NAGLIK; CHALLACOMBE; HUBE, 2003; SWEET, 1997).

Fatores de virulência podem ser definidos como quaisquer moléculas ou atributos microbianos capazes de diretamente danificar as células do hospedeiro permitindo o desfecho da colonização ou infecção (BRUNKE et al., 2016). Em *Candida*, os principais fatores que contribuem para a sobrevivência e persistência da levedura no hospedeiro são a adesão ao tecido, a evasão do sistema imune, a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, a hidrofobicidade da superfície celular (HSC) e a formação de biofilme (DA SILVA DANTAS et al, 2016; DONLAN; CONSTERTON, 2002; HAZEN et al., 1990; HEBECKER et al., 2014; SILVA et al., 2011).

A adesão da levedura ao tecido epitelial do hospedeiro é o primeiro estágio e pré-requisito essencial para um processo de colonização e invasão efetivos (NAGLIK et al., 2011). Interações ligante-receptor específicas, mediadas por adesinas, e também não específicas, como aquelas mediadas pela HSC, permitem a ligação da levedura a uma ampla gama de moléculas do hospedeiro, como fibronectina, laminina, entactina, colágeno, proteínas séricas, integrinas e caderinas, propiciando um nicho seguro para sua persistência e impedindo a completa eliminação pelo sistema imune (CALDERONE; FONZI, 2001; CHAFFIN, 2008; CHIN et al, 2016; DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014; HEBECKER et al., 2014). Em *C. albicans*, as principais moléculas responsáveis por esse processo pertencem a dois grupos de glicoproteínas ancoradas ao GPI (glicofosfatidilinositol), as famílias Als (*Agglutinin-like sequence*) e Hwp (*Hyphal wall protein*) (CHIN et al, 2016). A proteína Als3, em particular, além de essencial na interação com células epiteliais e endoteliais, tem a capacidade de atuar como invasina ativando os mecanismos de endocitose da célula hospedeira, além de indiretamente levar à liberação de citocinas e conseqüentemente a danos celulares (HEBECKER et al., 2014; HOYER et al., 2008; LIU; FILLER, 2011; MURCIANO et al., 2012; NAGLIK et al., 2017; PHAN et al., 2007). Além disso, a interação com outros micro-organismos da microbiota, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus gordonii*, e mediada por essas adesinas, impede ou pelo menos reduz a extensão da liberação dos mecanismos de defesa do hospedeiro (NOBBS; VICKERMAN; JENKINSON, 2010; PETERS, 2012; DE GROOT et al., 2013; NAGLIK et al., 2011). Genes homólogos a *ALS* foram encontrados também em *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondi* (DE GROOT et al., 2013; YANG, 2003), já em *C. glabrata* as adesinas responsáveis por esse processo pertencem principalmente à família *EPA* (*Epithelial adhesin*) de galectinas ligantes de carboidratos (DRANGINIS; RAUCEO; CORONADO, 2007).

Apesar do papel das adesinas na etapa inicial de colonização e infecção pela levedura, a efetiva lesão e invasão do tecido hospedeiro dependem também da produção de enzimas hidrolíticas no ambiente local (DE BERNARDIS, 1999). As Saps (*Secreted aspartyl proteinases*) pertencem a uma família de aspartil proteases codificadas por 10 genes distintos em *C. albicans* e que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas de proteínas, podendo, assim, alterar a hidrofobicidade da superfície ou levar a mudanças conformacionais e permitir a melhor adesão do fungo e a obtenção de nutrientes (MONOD; BORG-VON ZEPELIN, 2002; SILVA et al., 2012). Essas enzimas são capazes de degradar moléculas da matriz extracelular, como queratina, colágeno e vimentina, elementos do muco e proteínas salivares, como a mucina, além de componentes do sistema imune, como imunoglobulina A (IgA) e moléculas do sistema complemento (CALDERONE; FONZI, 2001; DA SILVA et al., 2016; DE REPENTIGNY et al., 2000; RAPALA-KOZIK et al., 2018). De fato, mutantes de *C. albicans* para deleções dos genes SAP1-3 não são capazes de causar infecções vaginais em ratos, além de perderem a habilidade, *in vitro*, de danificar o epitélio vaginal humano (SCHALLER, 2005).

As fosfolipases hidrolisam as ligações ésteres dos glicerofosfolipídeos presentes na membrana das células hospedeiras, levando à sua desestabilização e consequente ruptura (MAVOR; THEWES; HUBE, 2005). A importância dessas enzimas durante o processo de invasão tecidual foi mostrado por Mukherjee e colaboradores (2001) que, através de microscopia de fluorescência, observaram que a liberação de fosfolipases tende a concentrar-se principalmente na zona de extensão da hifa em formação, durante a penetração da mucosa gastrointestinal de camundongos. Além disso, a quantidade de enzima produzida pode variar de acordo com o sítio de isolamento, leveduras obtidas a partir de material sanguíneo, por exemplo, produzem níveis mais altos de fosfolipase quando comparadas a isolados comensais (YANG, 2003). No entanto, em relação às diferenças entre espécies, *C. albicans*, em geral, parece exibir maior perfil de produção enzimática que espécies não-*albicans* (GHANNOUM, 2000).

Enzimas hemolíticas têm sido também reconhecidas como fatores de virulência de *Candida* ao permitirem a obtenção de ferro a partir da lise dos eritrócitos (PEREIRA et al., 2015). Entretanto, apesar de contribuírem para a invasão tecidual pelas hifas e a disseminação através da corrente sanguínea, seu mecanismo de ação é ainda mal compreendido (NEGRI et al., 2012), podendo ser resultado não de uma única

enzima, mas da ação sequencial de diferentes fatores (LUO; SAMARANAYAKE; YAU, 2001), além de depender da concentração de glicose no sangue (TSANG et al., 2007).

Além de fosfolipases, proteases e hemolisinas, moléculas não hidrolíticas têm sido também consideradas fatores de contribuição para a virulência de *Candida* por auxiliarem na instalação de uma infecção efetiva. A enzima coagulase liga-se ao fibrinogênio plasmático ativando uma cascata de reações que induzem a coagulação do plasma. Essa enzima parece ser produzida em diferentes taxas dentro do gênero, sendo *C. albicans* e *C. glabrata* maiores produtores quando comparados a outras espécies (DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014). Mais recentemente, foi demonstrado que a primeira toxina peptídica citolítica isolada a partir de um fungo pode também ser classificada na definição de um fator de virulência (SELLAM; WHITEWAY, 2016). A candidalisina auxilia no processo de dano tecidual ao alterar a permeabilidade de íons de Ca^+ através de danos à membrana plasmática das células hospedeiras, além de desencadear uma via de sinalização de respostas ao perigo e ativar a resposta imune epitelial (MOYES et al, 2016).

A hidrofobicidade da superfície celular é uma importante propriedade de virulência conferida por proteínas manosiladas localizadas na superfície das células fúngicas (GLEE; SUNDSTROM; HAZEN, 1995). Essas proteínas têm sido correlacionadas a diferentes etapas durante os processos de instalação e progressão da infecção, resistência à fagocitose por macrófagos e estabelecimento de lesões crônicas (GLEE et al., 2001; MASUOKA; HAZEN, 1997; SILVA et al., 2012). Entretanto, o principal foco de inúmeros estudos sobre a HSC tem sido a relação entre esse fator e a adesão de *Candida* ao tecido e/ou dispositivos médicos. De fato, essa relação pôde ser observada para diferentes espécies, células e superfícies (HAZEN; HAZEN, 1988; HAZEN, 1989; JABRA-RIZK et al., 2001; PANAGODA; ELLEPOLA; SAMARANAYAKE, 2001; SAMARANAYAKE, WU, SAMARANAYAKE, 1995), no entanto, resultados contrários também têm sido relatados. Camacho e colaboradores (2007), por exemplo, não encontraram uma correlação entre a HSC e adesão a cateteres de látex siliconados. Além disso, variações inter e intraespécies também foram relatadas, indicando que a HSC não pode sozinha ser considerada um indicativo para os níveis de adesão (SILVA-DIAS et al., 2015; PAULA et al., 2015).

Os fungos do gênero *Candida* são micro-organismos polimórficos que, à exceção de *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, são capazes de transitar entre as formas

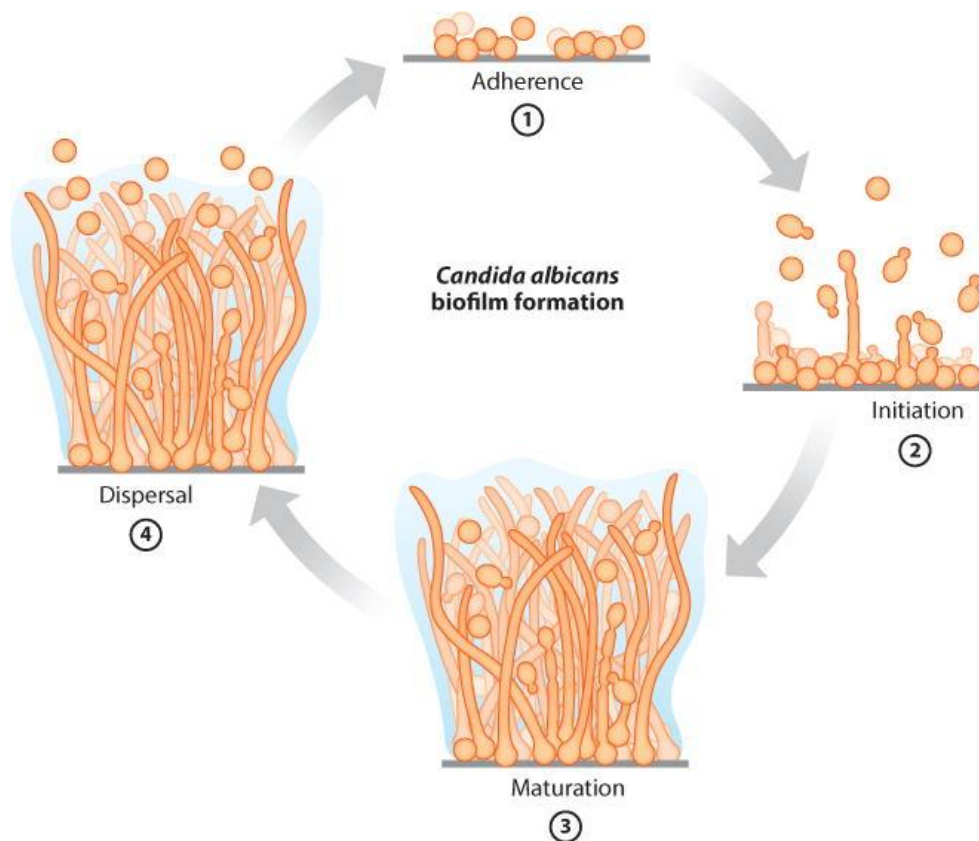
de leveduras, hifas verdadeiras e pseudohifas (DEORUKHKAR; SAINI, 2015). A alteração entre essas formas de crescimento é um evento rápido em resposta a sinais externos, como temperatura, quantidade de nutrientes, pH, densidade celular, produção de espécies reativas de oxigênio e hipóxia (GOW et al., 2012; WHITEWAY; BACHEWICH, 2007), e também internos, como a cascata de eventos desencadeada pela adesão ao epitélio (NAGLIK et al., 2017). Apesar de diferentes formas de *C. albicans* serem observadas no tecido durante a infecção, acredita-se que, enquanto as células leveduriformes têm um papel essencial na colonização, as hifas contribuem para o estabelecimento da infecção no tecido, causando danos celulares e a morte de macrófagos (CHIN et al., 2016). Enquanto formas de leveduras podem ser encontradas em diferentes sítios anatômicos sem causar dano aparente ao hospedeiro, as hifas estão fortemente aderidas e infiltradas na mucosa durante a infecção vaginal e bucal (HEBECKER et al., 2014; HÖFS; MOGAVERO; HUBE, 2016), além de exibirem menor capacidade de infecção quando desprovidas de mecanismos de controle de alterações morfológicas (HEBECKER et al., 2014). Além disso, a mudança entre essas formas pode ser o passo inicial para formação e o estabelecimento de comunidades persistentes denominadas biofilmes (CHIN et al., 2016).

Biofilmes são comunidades microbianas altamente estruturadas e complexas, associadas a uma superfície e embutidas em uma matriz polimérica extracelular (MEC) (PIERCE et al., 2017). De acordo com os Institutos Nacionais de Saúde americanos (*National Institutes of Health, NIH*), biofilmes são, diretamente ou não, responsáveis por 80% de todas as infecções registradas nos Estados Unidos, gerando despesas que superam os US\$ 6,5 bilhões (FOX, 2012). Infecções por *Candida*, mais especificamente, têm frequente origem a partir de biofilmes em dispositivos médicos, com taxas de mortalidade chegando a 45% e duração média de internação de 65 dias (LI et al., 2018).

A formação do biofilme ocorre a partir de um processo sequencial, que inclui a adesão de células planctônicas a um substrato apropriado, colonização, produção de MEC, maturação e dispersão (FANNING, 2012) (Figura 1). A etapa de adesão, que pode ocorrer tanto em superfícies bióticas quanto abióticas, leva à formação de uma camada de células leveduriformes basais, permitindo a proliferação celular local, em seguida, o crescimento de hifas, pseudo-hifas e hifas, concomitante à produção de matriz extracelular à medida que o biofilme amadurece, leva à formação uma estrutura tridimensional complexa com extensa heterogeneidade espacial. Na

última etapa, células não aderidas sofrem dispersão e retornam a um modo de crescimento planctônico, permitindo a subsequente colonização de novas superfícies (NETT; ANDES 2006; FINKEL; MITCHELL, 2011; NOBILE et al. 2015; SERNEELS; TOURNU; VAN DIJCK 2012). Essa etapa, por sinal, possui importante significado clínico, já que as células liberadas podem levar à formação de novos biofilmes ou disseminarem-se nos tecidos do hospedeiro, causando quadros de candidemia e de doença invasiva disseminada (UPPULURI et al. 2010; TSUI et al, 2016).

Figura 1: Estágios da formação do biofilme de *Candida albicans*. (1) Adesão das células leveduriformes a uma superfície biótica ou abiótica. (2) Início da proliferação celular, formando uma camada basal de células de ancoragem. (3) Maturação, com o crescimento de hifas concomitante à produção de material de matriz extracelular. (4) Dispersão de células na forma de levedura



Fonte: NOBILE; JOHNSON, 2015)

Variações fisiológicas, funcionais e de composição mostram que biofilmes, apesar de exibirem uma estrutura tridimensional comum, são organizações complexas com características interespecies específicas. A MEC de *C. albicans* é

predominantemente composta por proteínas e glicoproteínas (55%) identificadas principalmente como enzimas, sugerindo um papel ativo desempenhado pela MEC na quebra de biopolímeros na resposta protetora e obtenção de nutrientes. Polissacarídeos, formados principalmente de complexos de manana-glucana, compõem a segunda maior porção da matriz, cerca de 25%, seguidos de lipídeos (15%) e ácidos nucleicos (5%) (ZARNOWSKI et al., 2014). A matriz de *C. tropicalis* possui baixos níveis de carboidratos e proteínas, mas maior capacidade de formação de biofilme em comparação com *C. albicans* (DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014; SILVA et al., 2012). Já *C. glabrata* aparenta exibir quantidades relativamente maiores de proteínas e carboidratos, mas menor atividade metabólica em comparação com outras espécies não-*albicans* (JAYATILAKE et al., 2006; SILVA et al., 2010; SILVA et al., 2012).

O arranjo espacial do biofilme representa uma adaptação ideal que permite a absorção de nutrientes essenciais, a excreção de produtos tóxicos e a comunicação entre as células e o meio ambiente, além de fornecer proteção contra substâncias antifúngicas e contra os mecanismos de defesa imunológicos do hospedeiro (UPPULURI et al., 2010; RAMAGE et al., 2005; TAFF, 2013). Porque os biofilmes fúngicos são amplamente resistentes, altas doses de antifúngicos são necessárias para um tratamento eficiente (O'TOOLE, 2003). Com efeito, a falha da terapia pode levar a infecções persistentes e crônicas e que, em geral, resultam na necessidade de remoção do dispositivo médico (ANDES; SAFDAR; BADDLEY, 2012; GULATI; NOBILE, 2016)

A resistência dos biofilmes de *Candida* aos antifúngicos parece depender simultaneamente de múltiplos elementos celulares e/ou ambientais, como desenvolvimento temporal, fluxo de nutrientes, densidade celular e tipo de superfície (RAMAGE et al., 2012), apresentando-se entre 30 a 2000 vezes mais resistentes aos antifúngicos fluconazol, anfotericina B, flucitosina, itraconazol e cetoconazol (HAWSER; DOUGLAS, 1995; BIZERRA et al., 2008; NETT, 2014).

Apesar dessa resistência geral aos antifúngicos, a resistência dos biofilmes está relacionada a diferentes fatores celulares e locais. A pouca suscetibilidade aos azóis e à flucitosina, por exemplo, mostra-se semelhante à das células planctônicas quando analisada em biofilmes de baixa densidade celular, diminuindo progressivamente com o aumento do número de células (PERUMAL; MEKALA; CHAFFIN 2007; SENEVIRATNE; JIN; SAMARANAYAKE, 2008). A ligação entre esses fatores parece estar relacionada à presença de mecanismos de cooperação

dependentes de densidade populacional, o chamado *quorum sensing*, que, ao permitir a comunicação local, coordenam o comportamento celular através da secreção de moléculas sinalizadoras (NOBILE; JOHSON, 2015). Além disso, a resistência dessa forma de crescimento parece estar também relacionada à presença subpopulações celulares dormentes localizadas em partes profundas de biofilmes maduros e densos e tolerantes a múltiplas classes de fármacos, incluindo anfotericina B, azóis e clorexidina (TAFF et al., 2013). As chamadas células persistentes possuem pouco ou nenhum metabolismo, incluindo uma baixa síntese de parede celular, o que resulta em antifúngicos que, apesar de ligarem-se às moléculas alvo, são incapazes de promover a morte da célula (LAFLEUR; KUMAMOTO; LEWIS, 2006; LEWIS, 2007; TAFF, 2013).

Mais notoriamente, o papel da MEC vem sendo considerado essencial na resistência de biofilmes de diferentes espécies de *Candida* através do impedimento estérico ou da ligação direta do antifúngico aos componentes exopoliméricos (PIERCE et al, 2015; TAFF et al., 2013). O polissacarídeo β -1,3 glucano, por exemplo, é responsável por sequestrar azóis, equinocandinas, pirimidinas e polienos, conferindo resistência aos biofilmes de *C. albicans* e espécies não-*albicans*, e bloqueando fisicamente a sua chegada ao sítio alvo (MITCHELL et al., 2013; NETT et al., 2007). De fato, Nett e colaboradores (2010) usando fluconazol marcado radioativamente, verificaram que esse mesmo polissacarídeo é responsável por sequestrar o antifúngico e levar ao seu acúmulo na matriz. Além disso, essa mesma técnica mostrou que biofilmes com remoção parcial de matriz extracelular exibem cerca de 30% mais de fluconazol intracelular que comunidades intactas, mostrando novamente o papel da MEC no sequestro desses antifúngicos (ZARNOWSKI et al., 2014). Além disso, a correlação entre MEC e resistência pode também ser evidenciada através de alterações nas condições de crescimento que resultem em diferentes padrões de produção de matriz. Dessa forma, biofilmes de *C. albicans* cultivados sob fluxo contínuo, condição que mais se assemelha às condições *in vivo*, exibem maior quantidade de MEC e consequente menor sensibilidade à anfotericina B, fluconazol e flucitosina, relação observada também para biofilmes de *C. tropicalis* (BAILLIE; DOUGLAS, 2000; AL-FATTANI; DOUGLAS, 2006).

A reduzida sensibilidade aos antifúngicos exibida pelas células sésseis parece estar também diretamente relacionada ao seu desenvolvimento temporal. Biofilmes em períodos iniciais de formação mostram-se menos resistentes ao

fluconazol, anfotericina B e nistatina quando comparados àqueles em estágios iniciais de desenvolvimento (CHANDRA et al., 2001). Enquanto essa resistência inicial parece estar ligada principalmente à expressão de bombas de efluxo, (MUKHERJEE et al., 2003), a menor sensibilidade de biofilmes maduros pode estar associada à presença de células com reduzido conteúdo de ergosterol, limitando, portanto, a eficácia de antifúngicos como azóis e polienos (RAMAGE et al., 2005; UPPULURI et al., 2010)

Atualmente, nenhum medicamento direcionado especificamente ao tratamento de biofilmes foi descrito. Clinicamente, resultados favoráveis em pacientes com candidíase invasiva ligadas a biofilmes dependem da remoção do dispositivo infectado, indicando que a terapia antifúngica apenas não é suficiente para o prognóstico positivo (ANDES; SAFDAR; BADDLEY, 2012).

2.2 TRATAMENTO DE CANDIDÍASES E RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS

Até a década de 40, relativamente poucos agentes estavam disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. Terapias estavam limitadas a fármacos inespecíficos, como iodeto, mercúrio, ácido benzoico, ácido salicílico, derivados de fenol, ácido undecilênico, violeta de metila, derivados de sulfonamida e outros agentes tóxicos, incluindo bromo, permanganato de potássio e óleo de terebintina com azeite (DAVIES; SEXTON, 1946; HOPKINS et al., 1946; LAMB, 1954). O desenvolvimento dos antifúngicos de polienos representou um grande avanço na micologia médica. Embora a anfotericina B rapidamente tenha se tornado a base da terapia para infecções graves, seu uso foi associado a efeitos colaterais limitantes de dose. A busca contínua por antifúngicos novos e menos tóxicos levou à descoberta dos azóis várias décadas depois. O cetoconazol, o primeiro composto disponível para o tratamento oral de infecções fúngicas sistêmicas, foi lançado no início dos anos 80. A introdução dos triazóis de primeira geração representou um segundo grande avanço no tratamento de infecções fúngicas. Quando comparados aos imidazóis, tanto o fluconazol quanto o itraconazol apresentaram um espectro de atividade antifúngica mais amplo, além de exibirem um perfil de segurança acentuadamente melhorado em comparação com a anfotericina B e o cetoconazol (MAERTENS, 2004).

Os principais fármacos utilizados no tratamento de candidíases são divididos em quatro classes de acordo com seu alvo molecular e mecanismo de ação:

azóis, polienos, equinocandinas e análogos de pirimidina (FUENTEFRÍA et al., 2017). Os azóis são antifúngicos cuja estrutura heterocíclica é formada por 5 carbonos e denominada de anel azol. De acordo com o número de nitrogênios ligados ao anel, os azóis podem ser classificados em imidazóis, como o miconazol, clotrimazol e cetoconazol, ou triazóis, como o fluconazol e itraconazol (CASALINUOVO; FRANCESCO; GARACI, 2004). O mecanismo de ação dos azóis envolve a inibição da biossíntese do ergosterol através da inibição competitiva no sítio catalítico da enzima 14- α desmetilase (lanosterol desmetilase) do citocromo P450 e responsável pela conversão de lanosterol em ergosterol (KATHIRAVAN et al., 2012). Ao impedir a oxidação do substrato lanosterol, a ligação do fármaco à enzima leva à deficiência da produção de ergosterol e um acúmulo de esteróis metilados, como lanosterol, 4,14-dimetilzimosterol e 24-metilenedihidrolanosterol, tóxicos para a levedura (GHANNOUM et al., 2016). A redução do ergosterol na membrana plasmática resulta na alteração da sua fluidez e permeabilidade e no funcionamento defeituoso de proteínas da membrana plasmática e funções de compartimentalização de membrana e endocitose, levando, assim, a alterações na morfologia da célula e à inibição do seu crescimento (ODDS; BROWN; GOW, 2003).

Amplamente reconhecidos como fármaco de escolha no tratamento de candidíases, o fluconazol foi descrito pela primeira vez em 1985, tornando-se o antifúngico mais prescrito alguns anos após ser utilizado pela primeira vez (NIM et al., 2018; SALCI et al., 2013). Em contraste com os imidazóis, o fluconazol é altamente solúvel em água e pode ser administrado por via intravenosa a pacientes gravemente doentes (MAERTENS, 2004), entretanto, assim como outros triazóis, seus principais efeitos colaterais estão associados a distúrbios gastrointestinais, hepáticos e endocrinológicos devido à semelhança entre o ergosterol e o colesterol presente na membrana plasmática dos mamíferos e à interferência no metabolismo da via oxidativa no fígado (KYRIAKIDIS et al., 2017; PAPPAS et al., 2004).

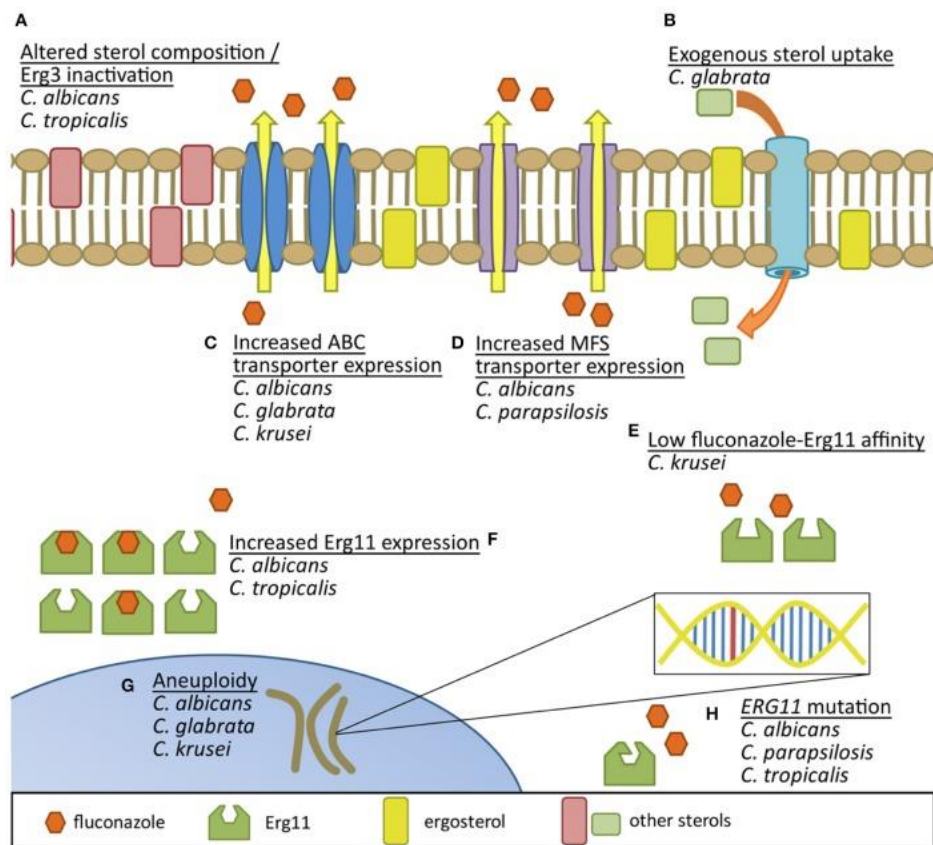
A resistência refere-se à não susceptibilidade de um micro-organismo a um agente antimicrobiano definida através de testes de *in vitro*, e pode ser classificada como intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca ou primária é naturalmente encontrada entre micro-organismos específicos que não tenham sido previamente expostos ao fármaco (KANAFANI; PERFECT, 2008; LEWIS; GRAYBILL, 2008; OROZCO et al., 1998), enquanto a adquirida ou secundária desenvolve-se entre cepas

anteriormente suscetíveis após a exposição ao antifúngico, e depende da expressão gênica alterada (KANAFANI; PERFECT, 2008).

O tratamento inadequado, como a administração de dosagens sub-inibitórias ou o uso de fluconazol para espécies naturalmente menos sensíveis contribui para a seleção de isolados resistentes (NOËL, 2012). Diferentes pesquisas relatam que as taxas de resistência ao fluconazol variam entre 10% a 25% dos isolados clínicos (ARENDRUP; DZAJIC; JENSEN, 2013), e estão normalmente associados ao uso a longo prazo, como, por exemplo, em pacientes com HIV/AIDS em tratamento profilático para candidíase oral ou esofágica na era pré-HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*) (LAW et al., 1994). Os mecanismos responsáveis por esse evento incluem a redução da concentração intracelular do fármaco através da expressão de bombas de efluxo, a alteração do sítio de ligação na enzima alvo, a superexpressão da enzima lanosterol desmetilase e a alteração na composição do esterol da membrana plasmática (KANAFANI; PERFECT, 2008; PRASAD et al., 2015) (Figura 2).

Algumas espécies como *C. krusei* e *C. glabrata* podem naturalmente apresentar sensibilidade reduzida ao fluconazol (PFALLER et al., 2011). A resistência de *C. krusei* parece estar principalmente relacionada a mutações no gene ERG11, levando à expressão de enzimas com reduzida afinidade ou incapacidade de ligação fluconazol. Já *C. glabrata* apresenta a capacidade de utilizar esteróis de alterada estrutura em sua membrana celular, permitindo a evasão do tratamento com o azol, além de, também, ser capaz de utilizar esteróis exógenos, bloqueando, assim, a via de biossíntese do ergosterol (NAKAYAMA et al., 2000; OROZCO et al., 1998; PRASAD et al., 2015).

Figura 2: Mecanismos de resistência ao fluconazol em espécies de *Candida*. (A) A inativação de Erg3 resulta na utilização de esteróis alternativos na membrana da levedura. (B) A absorção de esteróis exógenos ajuda a contornar a inibição da produção de esterol endógeno pelo fluconazol. (C e D) O aumento da produção de bombas de efluxo. (E) A inerente baixa afinidade do fluconazol ao Erg11 em algumas espécies. (F) O aumento da expressão da proteína Erg11. (G) Aneuploidia resultando na adaptação genética à exposição ao azol. (H) Mutações no ERG11 resultando em proteínas com afinidade reduzida ao fluconazol.



Fonte: WHALEY et al., 2017

Os antifúngicos da classe dos polienos, como a nistatina e a anfotericina B, foram descobertos no início da década de 50. Esses compostos exibem atividade fungicida primariamente pela interação com o ergosterol da membrana plasmática, resultando, assim, na formação de canais que levam ao extravasamento de íons monovalentes bem como de outros conteúdos citoplasmáticos (BAGINSKI; CZUB, 2009; ODDS; BROWN; GOW, 2003). Entretanto, espécies como *C. glabrata*, capazes de substituir ou reorientar o ergosterol na membrana, mostram-se resistentes a essa ação (MARTINS; REX, 1996; SOKOL-ANDERSON et al., 1988). Dessa forma, um segundo mecanismo de atividade dos polienos envolve uma cascata de reações de oxidação e interação com lipoproteínas que resultam na liberação de radicais livres e na

consequente alteração da permeabilidade seletiva da membrana (SANGALLI-LEITE et al., 2011; MESA-ARANGO; SCORZONI; ZARAGOZA, 2012). Apesar da maior afinidade pelo ergosterol, esses fármacos têm a capacidade de se ligar também ao colesterol presente na membrana de células de mamíferos, resultando em alta toxicidade renal (HULL et al., 2012; ODDS; BROWN; GOW, 2003). Esse problema vem sendo reduzido através do uso de novas formulação, como a suspensão coloidal, complexo lipídico e anfotericina B lipossomal que apresentam capacidade reduzida de nefrotoxicidade, acarretando, entretanto, em um aumento da toxicidade hepática (WANG et al., 2010).

A classe das equinocandinas, representada por caspofungina, micafungina e anidulafungina, foram inicialmente desenvolvidas na década de 80 e representam a mais nova classe de antifúngicos disponíveis comercialmente (BALKOVEC et al., 2014). Esses compostos são lipopeptídeos anfifílicos formados durante a fermentação de alguns fungos, e têm como alvo o complexo proteico responsável pela síntese de β -1,3 glucano, componente da parede celular de *Candida* spp. O bloqueio da enzima glucano sintase leva à diminuição na incorporação de monômeros de glicose que fazem a ligação entre β -1,3 e β -1,6 glucano, resultando no enfraquecimento da parede celular e na consequente lise da célula fúngica (ODDS et al., 2003; ODDS; BROWN; GOW, 2003; SONG; STEVENS, 2016). Esses fármacos têm sido utilizados no tratamento de candidíase esofágica e invasiva, e possuem como vantagens a baixa toxicidade e a atividade tanto sobre células planctônicas quanto sésseis (DERESINSKI; STEVENS, 2003; GROVER, 2010). Casos de resistência às equinocandinas são incomuns, entretanto o seu uso é limitado devido à necessidade de administração por via endovenosa, além do alto custo em relação as outras classes de antifúngicos (GROVER, 2010).

A flucitosina é um análogo fluorado de citosina que penetra a célula fúngica através de canais de ATP dependentes de citosina (DIASIO; BENNETT; MYERS, 1978). Inicialmente estudada como um agente antitumoral, esse antifúngico é convertido em metabólitos tóxicos que agem tanto na inibição da síntese proteica através da incorporação ao RNA, quanto na alteração da síntese de DNA e divisão celular por meio da ligação à enzima timidilato sintase (ODDS; BROWN; GOW, 2003; VERMES; GUCHELAR; DANKERT, 2000). O uso da flucitosina é normalmente realizado em associação a outros fármacos, como a anfotericina B, devido à frequente seleção de cepas resistentes e existência de espécies naturalmente menos susceptíveis

(ODDS; BROWN; GOW, 2003; VERMES; GUCHELAR; DANKERT, 2000). De fato, aproximadamente 10% dos isolados clínicos de *C. albicans* mostram-se intrinsecamente resistentes a esse antifúngico e outros 30% desenvolvem resistência secundária ao serem expostos ao fármaco (VANDEN et al., 1994).

O aumento significativo no número de classes, e a consequente disponibilidade e facilidade na compra das diferentes classes de antifúngicos a partir da década de 90, levou ao seu uso insidioso e em larga escala, mesmo no tratamento de doenças não infecciosas. Esse uso indiscriminado acabou resultando na exposição da microbiota e na seleção de micro-organismos resistentes (RODRIGUEZ-TUDELA et al., 2007), situação comprovada pela presença de isolados de *C. albicans* resistentes ao fluconazol na cavidade bucal de até um terço dos pacientes com AIDS avançada (LAW et al., 1994). Além disso, outras limitações, como espectro inadequado de atividade, baixa biodisponibilidade, pequeno índice de tolerância, interações com outros fármacos, perfil farmacocinético inadequado e efeitos tóxicos consideráveis são fatores de preocupação constante na prática clínica (JIANG et al., 2013; PFALLER et al., 2011).

2.3 ANTIFÚNGICOS NATURAIS E *POINCIANELLA PLUVIOSA*

A descoberta de novos fármacos é majoritariamente atingida através do rastreio de compostos químicos naturais ou sintéticos/semissintéticos por meio de diferentes abordagens (FUENTEFRÍA et al., 2018). A triagem de alto rendimento (*HTS - high-throughput screening*) baseia-se na análise de uma ampla gama de compostos desenvolvidos em laboratório com o objetivo de identificar aqueles que possuem ou não atividade biológica (SALCI et al., 2018). Já a abordagem baseada em evidências utiliza de revisões e testes sistemáticos com o objetivo de confirmar a eficácia de plantas medicinais popularmente conhecidas, bem como a sua superioridade sobre moléculas sintéticas (COLALTO, 2017). Em ambas metodologias, classificadas no conceito de “farmacologia tradicional”, nem o alvo da droga nem o mecanismo de ação são necessariamente conhecidos, situação que se opõe à chamada “farmacologia reversa”, em que, através do uso de altas tecnologias, o desenvolvimento de novos fármacos parte do estudo da molécula alvo em uma abordagem baseada em destino (SWINNEY; ANTHONY, 2011).

O estudo de substâncias e extratos isolados a partir de origens naturais tem sido reconhecido como uma rica fonte, não somente para o desenvolvimento de fármacos comerciais, como também para a criação de tratamentos alternativos seguros, particularmente em países em desenvolvimento (ASHCROFT; PO, 1999; MOGHADAMTOUSI et al., 2014). Entretanto, apesar da estimativa de que mais de 50% dos fármacos liberados para uso clínico tenham, de alguma forma, origem a partir de plantas, e do reconhecimento pela Organização Mundial da Saúde da importância da biodiversidade como uma fonte terapêutica econômica e acessível, recursos financeiros para este campo ainda são restritos, limitando a expansão de pesquisas e a descoberta de novos compostos (DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2015; SANGLARD; SANGLARD, 2016; SEWELL; RAFIEIAN-KOPAEI, 2014).

Extratos naturais são, em sua maioria, compostos de complexas misturas e interações intermoleculares resultantes de milhões de anos de evolução de organismos terrestres e marinhos para a adaptação a diferentes situações de estresse biótico e abiótico (FUENTEFRIA et al., 2018; LAMOTTKE; RIPOLL; WALCZAK, 2011). Os metabólitos secundários farmacologicamente ativos produzidos por esses organismos podem ser divididos, de acordo com seus princípios biossintéticos, em 3 grupos principais: (1) terpenos, tais como mono, di, tri, sesqui e tetraterpenos, saponinas, esteróides, glicosídeos cardíacos e esteróis; (2) compostos fenólicos como os ácidos fenólicos, cumarinas, lignanas, estilbenos, flavonóides, taninos e ligninas; (3) e moléculas contendo nitrogênio, como alcalóides e glucosinolatos (AGOSTINI-COSTA et al., 2012). As diferentes características químicas e físicas observadas para esses compostos, como estrutura, liberação de constituintes ativos, solubilidade, estabilidade e potencial de absorção e dissolução, são responsáveis pelas principais vantagens de extratos naturais sobre moléculas com alvos específicos, como variados mecanismos de ação e elevada atividade antimicrobiana contra fungos e outros micro-organismos (FREIESLEBEN; KJÄGER, 2014; NAZZARO et al., 2017; NEGRI et al., 2014; WANG et al., 2012).

Quando comparada ao estudo de substâncias sintéticas, a determinação da atividade antifúngica de um produto natural através da “farmacologia tradicional” deve seguir diferentes parâmetros microbiológicos e químicos. Apesar das vantagens observadas para o uso desses compostos, variados estágios de crescimento e porções da planta, assim como mudanças ambientais na área geográfica de origem, podem resultar em atividades biológicas não reproduzíveis experimentalmente devido à

variação dos constituintes químicos obtidos. Além disso, a utilização de diferentes solventes e métodos de extração para a obtenção do extrato podem resultar na perda de moléculas ativas e na obtenção de resultados contrastantes, principalmente quando obtidos a partir de extratos não purificados (BINNS; ARNASON; BAUM, 2002; NAZZARO et al., 2017; ZHAO et al., 2013). Entretanto, o uso de técnicas corretas de processamento físicos e químicos podem reduzir esses efeitos, permitindo que pesquisas sobre extratos brutos possam oferecer o primeiro passo para a descoberta de um novo composto promissor, seguido da identificação dos compostos químicos responsáveis pela atividade antifúngica (NEGRI et al., 2014).

Poincianella, também conhecido como *Caesalpinia* L., engloba leguminosas distribuídas mundialmente em zonas tropicais e subtropicais pertencentes à família Fabaceae. Esse gênero inclui cerca de 500 espécies que podem ser encontradas como árvores lenhosas de pequeno a grande porte, ou como arbustos, detentoras de folhas alternadas, flores em cachos terminais na coloração amarela ou alaranjada, frutos alongados e vagens achatadas (NC STATE UNIVERSITY, 2018), em sua grande maioria, ainda não investigadas em relação às suas composições químicas e propriedades biológicas (ZANIN et al., 2015).

Poincianella pluviosa (DC.) L.P. Queiroz tem como sinônimo *Caesalpinia pluviosa* DC. e apresenta diferentes subespécies e variações, como *Poincianella pluviosa* var. *peltophoroides* (Benth.) G.P. Lewis, *Poincianella pluviosa* var. *cabralina* (Benth.) G.P. Lewis, *Poincianella pluviosa* var. *intermedia* (Benth.) G.P. Lewis, *Poincianella pluviosa* var. *sanfranciscana* (Benth.) G.P. Lewis e *Poincianella pluviosa* var. *paraensis* (Benth.) G.P. Lewis (TROPICOS). Essa espécie pode atingir até 16 metros de altura e encontra-se distribuída de forma endêmica no Brasil (DE SOUZA et al., 2018; ZANIN et al., 2012), sendo encontrada principalmente na região da Mata Atlântica e Pantanal (PONTES et al., 2006). Devido ao seu rápido crescimento e alto número de sementes viáveis, é frequentemente utilizada no reflorestamento de áreas degradadas, bem como no paisagismo urbano (BUENO et al, 2014; DE SOUZA et al., 2018).

A ampla distribuição e grande variação entre espécies fazem com que essa planta consista em uma rica fonte de metabólitos bioativos há muito usados como formas alternativas no tratamento de inúmeras patologias, como asma, gastrite, febre, diarreia, dores de estômago e tosse (BUENO et al, 2014; SANTOS et al., 2014). Na medicina tradicional indígena, por exemplo, membros do gênero *Poincianella* são

usados no tratamento e cicatrização de feridas (BUENO et al, 2016), mais especificamente, índios da tribo Tacaná, que habitam a floresta amazônica boliviana, utilizam a casca do caule de *P. pluviosa* cozida no tratamento de diarreias e disenterias (DE SOUZA et al., 2018). Já a espécie *C. pulcherrima*, nativa da América Central, é popularmente conhecida devido à sua ação emenagoga e abortiva (ZANIN et al. 2012), enquanto *P. microphylla*, conhecida na região Nordeste do Brasil como catingueira, é usada como sedativo e digestivo (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007).

Múltiplos estudos têm indicado os efeitos farmacológicos de extratos obtidos a partir de diferentes partes de *Poincianella*. A espécie *C. ferrea* Martius, amplamente distribuída no norte e nordeste do Brasil e conhecida como “Jucá” ou “Pau-Ferro”, exibe ação antiulcerogênica, anti-inflamatória, analgésica, antibacteriana, antioxidante, anti-hipertensiva, antidiabética e quimiopreventiva contra câncer (GALLÃO et al., 2013; HASSAN et al., 2015; LIMA et al., 2012; MENEZES et al., 2007; SAMPAIO et al., 2009), com suas folhas, frutos e casca previamente embebidos em álcool podendo ser utilizados na forma de infusões, xaropes e bochechos (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002). Além disso, o extrato aquoso obtido a partir de suas frutas desta espécie exibiu propriedade anti-inflamatória e ações antifúngica, antiúlceraogênica e anti-inflamatória (ZANIN et al. 2012).

Extratos brutos e semipurificados de diferentes porções dessa árvore foram avaliados quanto ao seu efeito antibacteriano. A análise da atividade antibacteriana de múltiplas partes de *C. pulcherrima* mostrou amplo espectro de ação por frações etanólicas dos frutos da planta contra *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*, além dos fungos *C. albicans*, *Aspergillus niger* e *Rhizopus oligosporus* (SUDHAKAR et al., 2006). A partir dessa mesma espécie, nove homoisoflavonóides isolados de partes aéreas da planta exibiram atividade antimicrobiana contra *Klebsiella aerogenes* e *Chromobacterium violaceum* e *B. sphaericus*, mas não *P. aeruginosa* (DAS et al., 2009). Já a espécie *C. sappan*, comumente encontrada no Sudeste da Ásia e popularmente utilizada no tratamento de diabetes, infecções na pele, anemias e artrite (BADAMI et al., 2003), exibiu atividade antibacteriana contra a espécie *Clostridium perfringens* (LIM et al., 2006), além de possuir ação anticonvulsivante (BAEK et al., 2002), antioxidante (JAVANMARDI et al., 2003), anticarcinogênica (BENABADJI et al., 2004) e hepatoprotetora (SRILLAKSHMI et al., 2010).

Chaves e colaboradores (2016) analisaram o efeito do extrato da casca de *P. pyramidalis* contra diferentes cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. Apesar de não exibir atividade antimicrobiana contra nenhum dos isolados (CIM>1000 µg/mL), a associação a uma concentração fixa do extrato (128 µg/mL) foi capaz de reduzir a concentração inibitória mínima de gentamicina, mas não de ampicilina, para todos os isolados. De acordo com os autores, um possível mecanismo para esse efeito sinérgico estaria relacionado à indução da internalização das substâncias na célula bacteriana pelos componentes do extrato, principalmente o ácido gálico. Esse composto fenólico levaria a alterações irreversíveis na permeabilidade extracelular através de mudanças na HSC e diminuição da carga negativa da superfície bacteriana, favorecendo, assim, a formação de poros com consequente perda de componentes intracelulares essenciais. Entretanto, curiosamente, quando purificado e adicionado ao antibacteriano na mesma concentração que o extrato, o ácido gálico exibiu resultados inferiores para a maioria das cepas testadas.

O efeito antiviral do gênero foi descrito contra diferentes vírus. Os extratos aquosos obtidos a partir da casca, folhas, sementes e frutos de *C. pulcherrima* foram avaliados contra herpes-vírus e adeno-vírus, não exibindo, entretanto, forte atividade antimicrobiana (CHIANG et al., 2003). Diferentes diterpenóides isolados a partir da fração etanólica de sementes de *C. minax* mostraram baixa atividade antiproliferativa contra o vírus parainfluenza tipo 1 e 3 e o vírus sincicial respiratório (RSV) (JIANG et al., 2001; JIANG et al., 2002), enquanto seis compostos obtidos a partir do alburno do caule de *C. sappan* mostraram alto poder de inibição de neuroaminidase contra o vírus influenza H3N2 quando comparados ao oseltamivir e ribavirina (LIU et al., 2009).

A importância do biofilme na epidemiologia das doenças microbianas, a sua resistência aos antimicrobianos comerciais e a possibilidade do seu manejo através da utilização de compostos naturais leva cada vez mais autores a tornarem a o efeito de compostos naturais foco de seus trabalhos, sendo bactérias da microbiota bucal e causadores de biofilme periodontal a principal base dos estudos. Dentre as árvores analisadas, o extrato das folhas de *P. pyramidalis* exibiu forte ação antimicrobiana contra o biofilme misto formado por *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *S. mutans* e *Lactobacillus casei*, reduzindo cerca de 72% do número de células viáveis (ALVIANO et al., 2008). Sampaio e colaboradores (2009) avaliaram o efeito de *C. ferrea* Martius sobre um modelo de biofilme polimicrobiano de *C. albicans*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. oralis* e *Lactobacillus casei* cultivado na presença de saliva. O tratamento com o extrato metanólico das sementes da planta foi capaz de inibir o crescimento celular do biofilme, entretanto, o resultado foi inferior ao observado para o controle com clorexidina e

mostrou-se dependente do número de células presentes na cultura. Além disso, a casca dessa mesma espécie, utilizada popularmente na Indonésia no tratamento da malária, sífilis e tétano exibiu atividade antibiofilme contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*, com IC50 de 0,125 mg/mL para ambas as espécies (PRATIWI et al, 2015).

A atividade contra leveduras e fungos filamentosos foi avaliada principalmente para a espécie *P. pyramidalis*, conhecida popularmente na caatinga como "pau-de-rato". O extrato bruto das folhas da árvore exibiu atividade antifúngica contra *C. neoformans* após ser submetido a um processo de autoclavagem durante 10 minutos, resultado não observado para o composto não autoclavado (JÚNIOR et al., 2015). Além disso, Cruz e colaboradores (2007), ao entrevistarem moradores da região de Canindé do São Francisco, no estado de Sergipe, sobre métodos terapêuticos caseiros, obtiveram como resultado o uso da infusão de folhas de *P. pyramidalis* no tratamento de candidíase bucal. A partir dessa informação, os autores avaliaram o efeito desse extrato sobre *Candida*, observando significativa atividade antifúngica contra *C. guilliermondii* (CIM = 25 µg/mL), *C. albicans* (CIM = 12.5 µg/mL) e também *Trichophyton rubrum* (CIM = 6.25 µg/mL) e *Fonsecaea pedrosoi* (CIM = 200 µg/mL), mostrando, assim, a importância do uso caseiro de plantas no tratamento de micoses, principalmente em regiões de difícil acesso à medicina moderna, e corroborando com a importância de levantamentos etnofarmacológicos na seleção de plantas para triagem de atividade biológica (CRUZ et al., 2007).

O efeito antimicrobiano de *Poincianella* pode ser resultado de sua complexa composição fitoquímica. De fato, diferentes estudos levaram ao isolamento de vários compostos complexos, como os diterpenos (DAS et al., 2010, WU et al., 1999), flavonóides (RAO; FANG; TZENG, 2005) e glicosídeos (ANANDHI et al. al., 2014). Em relação à casca de *P. pluviosa*, a análise química revelou compostos fenólicos, como ácido gálico e pirogalol; bichalôconas; esteróis, como estigmasterol; triterpenóides, como o lupeol e o ácido betulínico; taninos como o ácido malotínico e a tellimagrandin; flavonóides e polifenóis, como a quercetina (BUENO et al., 2014; FLORES; VILA; ALMANZA, 2006; KAYANO et al., 2011; RODRIGO et al., 2010). Essas leguminosas, altamente ricas em compostos bioativos, têm se mostrado também fontes de moléculas previamente desconhecidas. Um novo biflavonóide, denominado caesalpinioflavona, foi recentemente isolado a partir da casca do caule de *P. pluviosa*. Esse composto reduziu a viabilidade celular das linhagens tumorais como consequência da parada do ciclo celular e atividade citotóxica, indicando promissora atividade antitumoral (ZANIN et al., 2015). Entretanto, diferenças de sazonalidade e também entre as partes da planta estudadas tendem a resultar em amplas variações na diversidade e quantidade desses fitoquímicos, uma vez que frutos e

folhas possuem maior teor de umidade e menos componentes fibrosos do que a casca (AGU; OKOLIE, 2017).

Vários desses compostos tiveram sua ação anti-*Candida* analisada e exibiram mecanismos distintos. Os polifenóis, por exemplo, foram associados à inativação da produção de enzimas essenciais em células planctônicas e à alteração do metabolismo do ácido fólico e síntese de ergosterol em biofilmes de *C. albicans* (EVENSEN; BRAUN, 2009; NAVARRO-MARTÍNEZ; GARCÍA-CÁNOVAS; RODRÍGUES-LÓPES, 2006; SHAHZAD et al., 2014). A quercetina mostrou-se capaz de induz fortemente a morte celular por apoptose mediada por fluconazol através da modulação da sinalização do *quorum sensing*, além de atuar sobre diferentes fatores de virulência, tais como formação de biofilme, desenvolvimento de hifas e produção de enzimas hidrolíticas (SINGH et al., 2015).

A espécie *P. pluviosa*, especificamente, está amplamente distribuída na América do Sul com distintas variedades sendo encontradas na Argentina, Bolívia, Paraguai e Brasil, onde é considerada endêmica na região central da Bahia e norte de Minas Gerais (LEWIS et al., 1999). Apesar de poucos estudos relatarem as propriedades terapêuticas e composição dessa planta, diferentes frações obtidas a partir do extrato da casca do caule mostram que os principais componentes fitoquímicos dessa região da planta são ácido gálico, éster etílico de ácido gálico, rhuschalcone VI, lupeol, ácido betulínico e estigmasterol, e que o uso dessa formulação é capaz de estimular a formação de fibras de colágeno e a reepitelização, resultando na aceleração da cicatrização de feridas (BUENO et al., 2016; FLORES; VILA; ALMANZA, 2006). Com relação ao seu efeito antimicrobiano, o extrato bruto da casca apresentou atividade *in vitro* e *in vivo* sobre cepas de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium chabaudi* resistentes à cloroquina, inibindo significativamente a parasitemia em camundongos (KAYANO et al., 2011).

O desenvolvimento de um antifúngico ideal é ainda uma meta de difícil alcance, já que, por definição, esse antimicrobiano deve possuir um amplo espectro de atividade, não ser susceptível ao desenvolvimento de resistência, ter perfis de farmacocinética e farmacodinâmica ideais e não causar toxicidade ou efeitos adversos (WONG; SAMARANAYAKE; SENEVIRATNE, 2014). Dessa forma, a descoberta de novos fármacos resulta de um longo processo, estimado em cerca de 14 anos, e que pode ter início a partir da triagem de composto bioativos de fácil acesso e amplamente distribuídos na natureza (PAYNE et al., 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da fração acetato de etila do extrato da casca de *Poincianella pluviosa* sozinha e em combinação com o fluconazol sobre *Candida* spp.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil de sensibilidade das células planctônicas de *Candida* spp. ao extrato e ao fluconazol;
- Determinar o efeito do extrato sobre a cinética de crescimento das leveduras;
- Determinar o efeito da fração acetato sobre a capacidade de adesão de *Candida* spp.;
- Avaliar o efeito do extrato sobre a fase inicial de formação e sobre o biofilme formado;
- Determinar o efeito da associação entre o extrato e o fluconazol sobre células planctônicas;
- Avaliar a atividade da combinação sobre a fase de formação e sobre o biofilme maduro;

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 ARTIGO: INIBIÇÃO SINÉRGICA DO CRESCIMENTO DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS DE *CANDIDA* SPP. PELA ASSOCIAÇÃO DA FRAÇÃO DE ACETATO DE ETILA DE *POINCIANELLA PLUVIOSA* COM FLUCONAZOL.

Pollyana Myrella Capela dos Santos^a, Lucy Megumi Yamauchi^a, João Carlos Palazzo de Mello^b

^aDepartamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid s/n, km 380 PR445 Campus Universitário, BR 86057-970, Londrina, PR, Brazil.

^bDepartamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, Jd. Universitário, 87020-900, Maringá, PR, Brazil

RESUMO

Infecções por *Candida* são consideradas de grande importância em pacientes imunossuprimidos. A presença de resistência primária e secundária aos azóis exige a busca por novas abordagens terapêuticas. Neste contexto, os extratos naturais podem fornecer uma fonte extensa, valiosa e facilmente acessível de moléculas. Aqui, avaliamos pela primeira vez o efeito de extratos de casca do caule de *Poincianella pluviosa* isoladamente ou em combinação com fluconazol (FCL) contra células planctônicas e sésseis de *Candida* spp. A fração acetato de etila (FAE) apresentou atividade fungistática contra todas as cepas testadas, incluindo aquelas resistentes aos FCL, com concentração inibitória mínima (CIM) variando de 31,2 a 500 µg/mL. A EAF inibiu também a adesão celular à superfície abiótica e apresentou atividade antifúngica contra a fase de crescimento e contra o biofilme maduro, alterando sua atividade metabólica. A combinação entre FAE e FCL resultou em efeito sinérgico contra as células planctônicas e sésseis da maioria das cepas testadas, reduzindo os valores de CIM de ambos os compostos. Nenhuma atividade hemolítica ou citotoxicidade foi detectada para a combinação da FAE e FLC. Estes resultados destacam a potencial atividade anticandida do extrato de casca de caule de *P. pluviosa*, isoladamente ou em

combinação com FLC, para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas alternativas para o controle de infecções fúngicas.

Keywords: *Poincianella pluviosa*, fluconazol, efeito fungistático, sinergismo

Introdução

Recentemente, o número crescente de pacientes imunocomprometidos levou ao aumento de infecções por *Candida* em humanos (Rodrigues et al, 2014; Scorzoni et al, 2016). *Candida albicans* e outras espécies são fungos oportunistas que causam desde infecções orofaríngeas superficiais a quadros disseminados na corrente sanguínea e nos tecidos profundos (Whaley et al, 2017).

Os azóis, como o fluconazol (FLC), são os agentes antifúngicos mais frequentes usados no tratamento de infecções por *Candida*. Como droga fungistática, a FLC inibe o crescimento celular e, associado ao uso difundido tanto na profilaxia como no tratamento, proporciona a oportunidade para a seleção de cepas resistentes (Kåhrström, 2015; Morschhäuser, 2016; Whaley et al, 2017). Além disso, como indicado por epidemiológicos recentes, a resistência intrínseca, como a reduzida suscetibilidade reduzida de espécies, como *C. krusei* e *C. glabrata*, tendem a limitar o uso desses antifúngicos, tornando-se cada vez mais um problema crítico na prática clínica (Allen et al, 2015; Castelli, Derita e Lopez, 2017; Whaley et al, 2017).

Os metabólitos secundários naturais com alta importância farmacêutica são o principal objetivo dos pesquisadores (Ji, Li e Zhang, 2009). Extrato vegetal é um termo genérico para um produto natural sem componentes químicos completamente elucidados, mas essencial na triagem de novos agentes antimicrobianos (Negri et al, 2014). Neste contexto, a triagem de compostos naturais pode oferecer o primeiro passo para a descoberta de novos antifúngicos com o objetivo de ampliar o espectro de atividade e combater a resistência a *Candida* (Fuentefria et al, 2018; Oro et al, 2015).

Poincianella pluviosa pertence ao gênero *Caesalpinia* e é comumente conhecida como sibipiruna, uma árvore nativa do Brasil (Tropicós). Este gênero compreende mais de 500 espécies espalhadas principalmente em zonas tropicais e subtropicais em todo o mundo, e tem sido frequentemente correlacionado a estudos etnofarmacológicos devido às suas atividades biológicas, entre elas suas propriedades

antimicrobianas, como os efeitos antimalárico (Kayano et al. 2011), antibacteriano (Kim, Shim e Kim, 2016; Mobin et al. 2017) e antifúngico (Kaur et al. 2016). Além disso, extratos dessas plantas foram capazes de interferir na etapa de formação de biofilmes bacterianos (Trentin et al. 2011) e em modelos multiespecies maduros (Sampaio et al. 2009).

A atividade antifúngica de *Caesalpinia* spp. pode ser resultado de sua complexa composição fitoquímica. De fato, estudos anteriores levaram ao isolamento de inúmeros compostos, como os diterpenos (Das et al., 2010, Wu et al., 2010), flavonóides (Hao, Fang e Tzeng, 2005) e glicosídeos (Anandhi et al. al., 2014). Em relação à casca do caule de *P. pluviosa*, a análise química exibiu compostos fenólicos, como o ácido gálico e pirogalol, bichalôlas, esteróis, como estigmasterol, triterpenóides, como o lupeol e o ácido betulínico, taninos como o ácido mallotínico e a tellimagrandin II. flavonóides e polifenóis, como a quercetina (Bueno et al., 2014; Flores, Vila e Almanza, 2006; Kayano et al., 2011; Rodrigo et al., 2010). Vários desses compostos possuem mecanismos anticandida distintos. Os polifenóis têm sido associados à inativação da produção de enzimas essenciais e ao efeito antibiofilme por perturbação do metabolismo do ácido fólico e síntese de ergosterol em *C. albicans* (Evensen e Braun, 2009; Navarro-Martínez, García-Cánovas e Rodrigues-Lópes, 2006; Shahrazad et al ., 2014). Além disso, a quercetina aumentou potencialmente a morte celular por apoptose mediada por FLC através da modulação da sinalização do *quorum sensing*, além de suprimir fatores de virulência, tais como formação de biofilme, desenvolvimento de hifas e produção de enzimas hidrolíticas. Aqui, o efeito antimicrobiano de extratos de casca do caule de *P. pluviosa*, isolado ou em combinação com fluconazol, foi analisado contra células planctônicas e sésseis de diferentes espécies de *Candida*.

Materiais e Métodos

Extratos naturais e fluconazol

O extrato bruto de casca do caule de *Poincianella pluviosa* (EB) e fração acetato de etila (FAE) foram fornecidos pelo Dr. João C. P. de Mello da Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil (Bueno et al, 2014). Ambos os extratos foram solubilizados em DMSO 10% o e fluconazol (Sigma, EUA) (FCL) em

água ultrapura. Para todos os ensaios de susceptibilidade antifúngica, o meio de teste utilizado foi RPMI 1640 tamponado com 0,165 M de ácido 3- (N-morfolino) propanossulfônico (MOPS).

Microrganismos e condições de cultivo

As cepas de referência *Candida albicans* ATCC 26790, *C. krusei* ATCC MYA2876, *C. tropicalis* ATCC 28707, *C. glabrata* ATCC 2001 e *C. parapsilosis* ATCC 22019, e 16 isolados clínicos de diferentes espécies (*C. orthopsilosis* PT2259, *C. metapsilosis* PT2263, *C. guilliermondii* PT822, *C. lusitanae* PT1007, *C. bracarensis* PT1217 e outros 11 isolados de *C. albicans* resistentes a FLC) foram subcultivados mensalmente em ágar Sabouraud dextrose (SD) (Himedia, Índia) e armazenados a -80 °C em caldo SD com 10% de glicerol. Para os experimentos, as leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose (SDA) por 16 horas a 37 °C e 150 rpm, centrifugadas e lavadas duas vezes em salina (0,85% NaCl).

Teste de susceptibilidade antifúngica em células planctônicas

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos extratos de *P. pluviosa* e FLC foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo de acordo com as diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), com pequenas modificações. Diluições seriadas (1:2) para os extratos de *P. pluviosa* variaram de 1,95 até 1000 µg/mL e de 0,25 a 128 µg/mL para o FCL. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento visual após 24 h de incubação a 37 °C em comparação com células planctônicas não tratadas. Em seguida, 10 µl dos poços sem crescimento visível foram semeados em SDA para a determinação da concentração fungicida mínima (CFM). *C. parapsilosis* ATCC 22019 tratado apenas com FLC foi também incluído como controle do experimento. Os ensaios foram realizados em duplicatas em duas ocasiões diferentes. A fração acetato de etila (FAE) da casca do caule de *P. pluviosa* apresentou as menores concentrações de CIM sendo, portanto, a selecionada para os ensaios seguintes.

A curva de morte dos fungos na presença de FAE sozinha foi analisada através da cinética de crescimento em tempos específicos de acordo com Endo et al. (2010). Para isso, $2,5 \times 10^3$ leveduras de todas as cepas de referência foram incubadas com a FAE nas concentrações de CIM e $2 \times$ CIM em RPMI-MOPS. Em pontos

de tempo específicos (0, 8, 12, 16 e 24 h), alíquotas de 10 µL foram removidas da cultura e diluídas dez vezes em solução salina (NaCl a 0,85%). Uma alíquota de 10 µl de cada diluição foi semeada em SDA e as unidades formadoras de colônia (UFC) determinadas após incubação a 37 °C por 24 h. Dados médios foram plotados como log₁₀ UFC/mL versus tempo. Os ensaios foram realizados em duplicatas em duas ocasiões diferentes.

Adesão à superfície abiótica e inibição de biofilme

O efeito do extrato sobre a adesão a placas de 96 poços de fundo chato (Techno Plastic Products, Suíça) foi determinado de acordo com Bizerra et al. (2008), com pequenas modificações. Uma suspensão de 6×10^5 células/mL em RPMI-MOPS foi adicionada a cada poço com a FAE nas concentrações de 1/2CIM, CIM e 2xCIM. Após 2 h de incubação a 37 °C e 75 rpm, o meio foi aspirado e cada poço foi lavado três vezes com solução salina. A análise foi feita por quantificação de biomassa por cristal violeta a 595 nm como descrito por Jin et al. (2003).

O efeito inibitório das substâncias durante a formação e sobre o biofilme maduro foi analisado em placas de poliestireno de 96 poços de fundo plano (Techno Plastic Products, Suíça) de acordo com Bizerra et al. (2008), com pequenas modificações. Adicionou-se uma alíquota de 200 µl de uma suspensão de 6×10^5 células/mL a cada poço e as placas foram incubadas a 37 °C durante 2 ou 24 h a 75 rpm. O meio foi então aspirado e cada poço lavado duas vezes com solução salina. Alíquota de 200 µL de RPMI-MOPS contendo diferentes concentrações de FAE (CIM, 2xCIM e 4xCIM) foi adicionada e a cultura incubada por mais 24 h a 37 °C. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução de XTT de acordo com Melo, Colombo e Arthington-Skaggs (2007). Resumidamente, uma alíquota de 200 µl de XTT-menadiona (0,1 mg/mL de XTT e 1 µM de menadiona (Sigma Chemical Co, USA) em solução salina foi adicionada a cada poço e a placa incubada durante 1 h a 37 °C em câmara escura. A leitura foi realizada a 490 nm em leitor de placas Synergy™ HT (Biotek®). Os valores de absorbância para o controle positivo e tratamento foram subtraídos dos valores dos controles negativos para eliminar a interferência de fundo. Todos os ensaios foram realizados em duplicata em duas ocasiões diferentes.

Interação de EAF e fluconazol

A avaliação da combinação entre FAE e FLC em células planctônicas foi realizada de acordo com Scott, Tariq e McCrory (1995) através do método *checkerboard*. Resumidamente, as leveduras foram estabelecidas de acordo com os protocolos padrão (CLSI, 2012), e a diluição de cada composto, EAF (500-0,061 µg/mL) e FLC (128-0,25 µg/mL), colocada em poços de placa de microtitulação fornecendo 140 combinações. Além disso, CIM dos compostos sozinhos foram também avaliadas. Os resultados foram determinados visualmente após 24 h de incubação e definidos como a concentração mais baixa capaz de resultar na diminuição visível da turbidez em comparação com o controle não tratado. Os resultados foram interpretados de acordo com o índice de concentração inibitória fracionada (FICI), através do cálculo: $FICI = FIC_{FAE} + FIC_{FLC} = CIM_{FAE}$ em combinação/ CIM_{SIB} sozinho + CIM_{FLC} em combinação/ CIM_{FLC} sozinho. Os valores resultantes foram utilizados para classificar as combinações em: sinérgicas $\leq 0,5$, antagônicas ≥ 4 ou indiferentes $> 0,5$ a 4 (Odds, 2003).

Para avaliar o efeito da combinação dos compostos durante a formação e sobre o biofilme maduro de *Candida* spp, o biofilme foi formado como descrito anteriormente, seguido por tratamento com diluição dupla da FAE (2000-0,24 µg) isolada ou combinada ao FLC (256-0.007 µg/mL) em 224 concentrações diferentes para cada isolado. As placas foram incubadas por mais 24 h a 37 °C, e a viabilidade celular avaliada pelo ensaio de redução do XTT. A concentração inibitória mínima séssil (CIMS) foi definida como os menores valores da combinação capazes de inibir 50% da atividade metabólica dos biofilmes (CIMS50), e o FICI calculado e analisado de forma semelhante às células planctônicas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em duas ocasiões diferentes.

Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade de células planctônicas tratadas somente com FAE e FLC e também combinados foi analisada utilizando-se o kit de viabilidade de leveduras LIVE / DEAD (Molecular Probes, EUA), de acordo com a recomendação do fabricante, com pequenas modificações. Uma suspensão de 1×10^6 leveduras/mL em RPMI-MOPS foi incubada com cada composto (CIM sozinho e CIM da combinação) durante 24 h, lavada com PBS e homogeneizada cuidadosamente em microtubo contendo 1 mL de tampão HEPES-Na (10 mM, pH 7,2) suplementado com glicose 2% e contendo

CALCOFLUOR M2R (10 μ M) e corante FUN-1 (5 μ M). Cada suspensão foi colocada em lâminas de vidro e examinada por microscopia de fluorescência (Leica, DM2000) utilizando os filtros DAPI e fluoresceína, com excitação de 480 nm e emissão \geq 530 nm. Todos os ensaios foram realizados em duplicata em duas ocasiões diferentes.

Ensaio de hemólise

A toxicidade da FAE sozinha ou em combinação com o fluconazol foi analisada em eritrócitos humanos de acordo com Izumi et al. (2012). Sangue de doador saudável foi recolhido, desfibrinado e preparado em solução salina glicosilada a 5%. O sangue foi incubado com diferentes concentrações da FAE (1000-1,95 μ g/mL) e FLC (256-0,5 μ g/mL) isoladamente ou em combinação (EAF = 31,25-0,06; FLC = 128-0,25 μ g/mL) por 3 h a 37 °C. As placas foram centrifugadas a 1.000 xg por 10 min e os sobrenadantes transferidos para novas microplacas. Controles negativos e positivos sem compostos e contendo 1% de Triton X-100, respectivamente, foram incluídos. A leitura foi realizada a 550 nm e a porcentagem de hemólise nos poços testes calculada por comparação com o controlo positivo.

Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade da FAE sozinha (500-0,09 μ g/mL) ou em combinação com FLC (128-1 μ g/mL), diluições duplas foi determinada como descrito por Longhi et al. (2015), exceto que a linhagem celular Vero foi utilizada. Resumidamente, as células foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços (Techno Plastic Products, Suíça) durante 48 h a 37 °C e 5% de CO₂. Após, adicionou-se meio contendo FAE sozinha ou em combinação com FLC, e as células foram incubadas durante 24 h. A viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT [dimetiltiliazol difenil tetrazólio (Sigma Chemical Co., EUA)] de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração dos compostos necessárias para inibir as células viáveis até 50%, por análise de regressão, corresponderam à concentração citotóxica de 50%.

Análise estatística

Os resultados foram analisados por ANOVA unidirecional utilizando-se o software Graphpad Prism versão 6.0 (Graphpad Software). A análise comparativa foi realizada usando-se o teste de comparação múltipla de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

Extratos da casca do caule de Poincianella pluviosa exibem atividade fungistática contra células planctônicas de Candida spp.

Como triagem inicial, os valores da CIM e CFM foram determinados para o EB e para a FAE contra cepas de referência de *Candida* e outros 16 isolados clínicos (Tabela 1). Considerou-se que cada composto exibiu atividade antifúngica quando o valor da CIM mostrou-se inferior ou igual a 1000 µg/mL. Os valores de CIM variaram entre 1000 e 31,2 µg/mL. O EB apresentou atividade contra *C. krusei* (250 µg/mL), *C. glabrata* (62,5 µg/mL) e *C. parapsilosis* (62,5 µg/mL), mas os valores de CIM foram superiores a 1000 µg/mL para *C. tropicalis* e *C. albicans*. A FAE exibiu atividade antifúngica contra todas as cepas testadas com CIM variando de 500 a 31,2 µg/mL. *C. krusei*, uma espécie naturalmente resistente ao fluconazol (Fukuoka et al., 2003), apresentou a menor CIM (31,2 µg/mL). Os valores da CFM para ambos os compostos foram > 1000 µg/mL, indicando que ambos apresentam uma atividade fungistática contra *Candida* (dados não mostrados). Para confirmar a atividade anticandida de ambos os compostos, seus perfis antimicrobianos foram avaliados em 16 isolados clínicos. Os valores de CIM variaram de 500 a <1,9 µg/mL (Tabela 1) e, curiosamente, foram menores para os isolados clínicos de *C. albicans* que para a cepa de referência da mesma espécie.

Tabela 1 - Efeito de distintas frações d extrato da casca de *P. pluviosa* sobre *Candida spp.*

Micro-organismos	Concentração inibitória mínima (µg/mL)	
	EB ¹	FAE ²
<i>C. albicans</i> ATCC 26790	>1000	500
<i>C. tropicalis</i> ATCC 28707	>1000	125
<i>C. krusei</i> ATCC 34135	250,0	31,2
<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	62,5	125
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	62,5	62,5
<i>C. orthopsilosis</i> PT2259	31,2	250
<i>C. metapsilosis</i> PT2263	7,8	125
<i>C. guilliermondii</i> PT822	7,8	125
<i>C. lusitanae</i> PT1007	31,2	62,5
<i>C. bracarensis</i> PT1217	<1,9	62,5
<i>C. albicans</i> E	62,5	125
<i>C. albicans</i> O	15,6	15,6
<i>C. albicans</i> 12	31,2	31,2
<i>C. albicans</i> 18	3,9	<1,9
<i>C. albicans</i> 27	62,5	62,5
<i>C. albicans</i> 29	62,5	62,5
<i>C. albicans</i> 82	125	500

<i>C. albicans</i> 122	250	250
<i>C. albicans</i> 134	62,5	15,6
<i>C. albicans</i> 179	62,5	125
<i>C. albicans</i> 191	31,2	15,6

¹Extrato bruto, ²Fração acetate de etila

Para avaliar a cinética da FAE, células planctônicas de cepas de referência de *Candida* foram cultivadas na presença da CIM e concentrações de 2xCIM. CFUs foram determinadas em diferentes intervalos de tempo por 24 h (Fig. 1). Todas as cepas apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nas contagens de UFC/mL em relação às leveduras não tratadas. Às 12 h de tratamento, *C. glabrata* apresentou três log10 menor que o controle positivo nem ambos os tratamentos, ($p < 0,05$), e após 24 h a diferença aumentou para quatro log10 ($p < 0,05$). *C. albicans* e *C. krusei*, após 16 h e 24 h, apresentaram redução de dois log10 para a CIM e 2xCIM. *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* apresentaram resultados significativos apenas após 24 h de tratamento. Nenhuma morte celular foi observada em nenhum dos grupos tratados, confirmando a atividade fungistática da FAE.

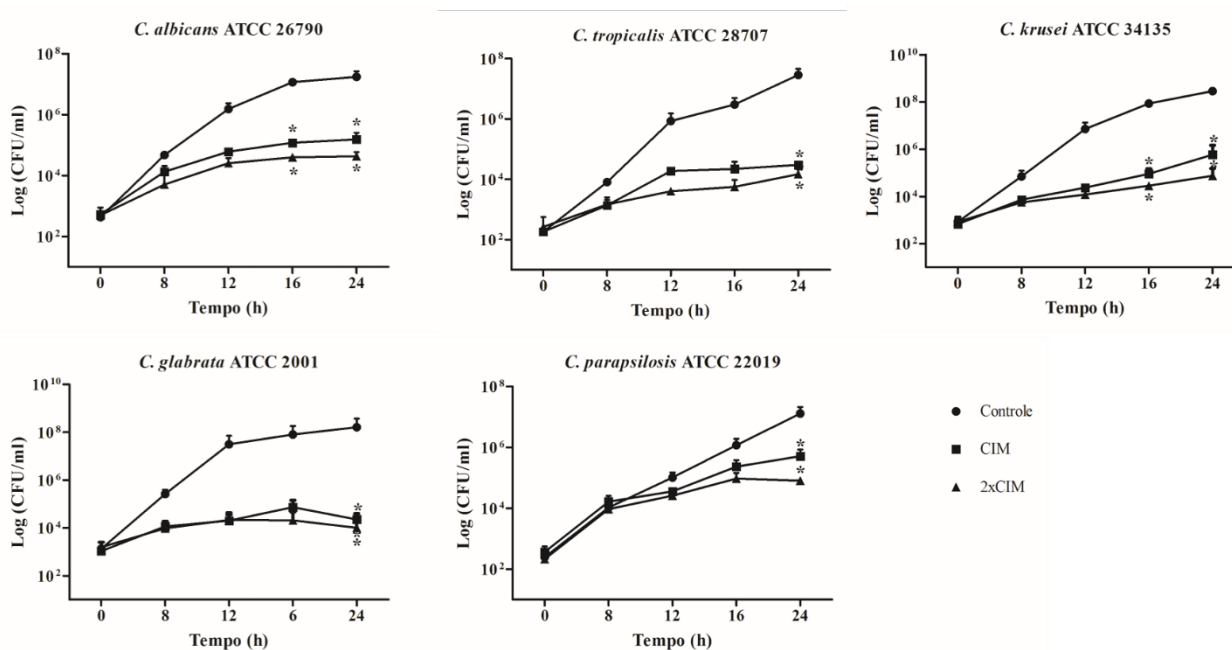
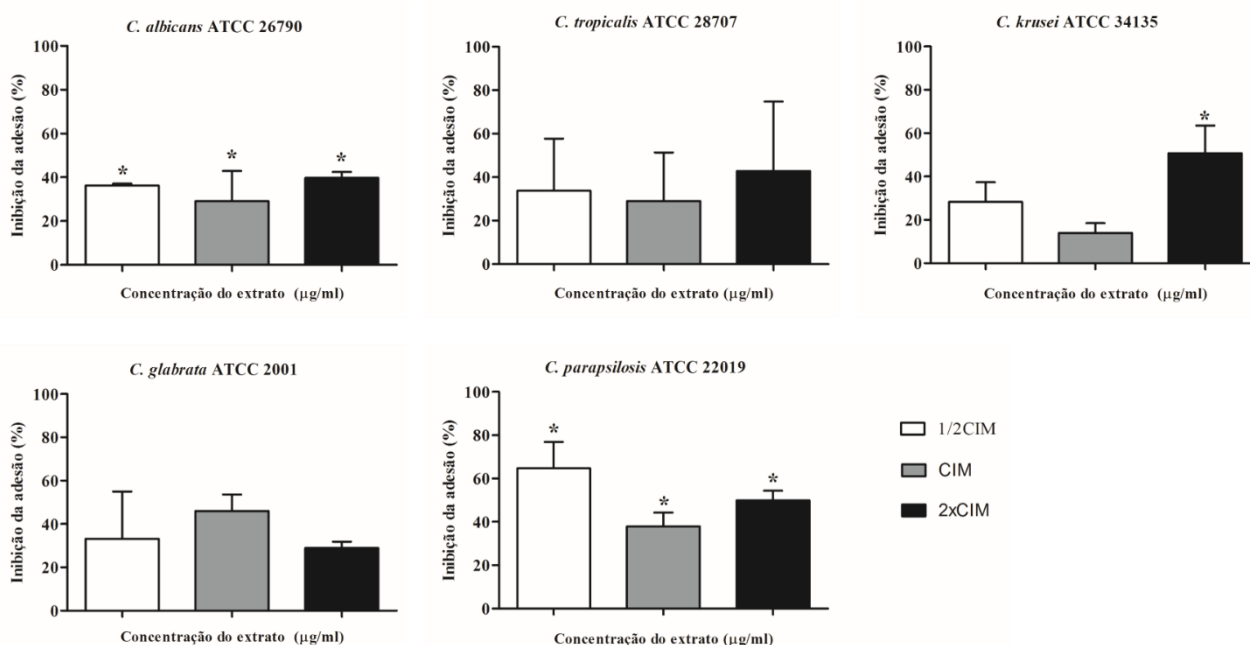


Fig. 1 - Efeito de diferentes concentrações da fração acetato de etila de *Poincianella pluviosa* contra *Candida* spp. 2×10^3 leveduras de todas as cepas de *Candida* foram incubadas a 37 °C com FAE nas concentrações de CIM e 2xCIM, e nos tempos 0, 8, 12, 16, 24 h, alíquotas foram semeadas em SDA. Valores são resultados da média \pm DP representativa de dois experimentos independentes. * $p < 0,05$

Efeito antiadesão da fração acetato de etila de P. pluviosa contra Candida spp.

Para avaliar a atividade da FAE, a biomassa celular foi avaliada após 2 horas de adesão ao poliestireno na presença de concentrações de 1/2CIM, CIM e 2xCIM. O tratamento reduziu a biomassa celular de todos os isolados quando comparado ao controle não tratado, com valores variando de 14 a 64,7%. No entanto, resultados estatisticamente significativos foram observados apenas para *C. albicans* e *C. parapsilosis* em todas as concentrações testadas, e para *C. krusei* tratados apenas com

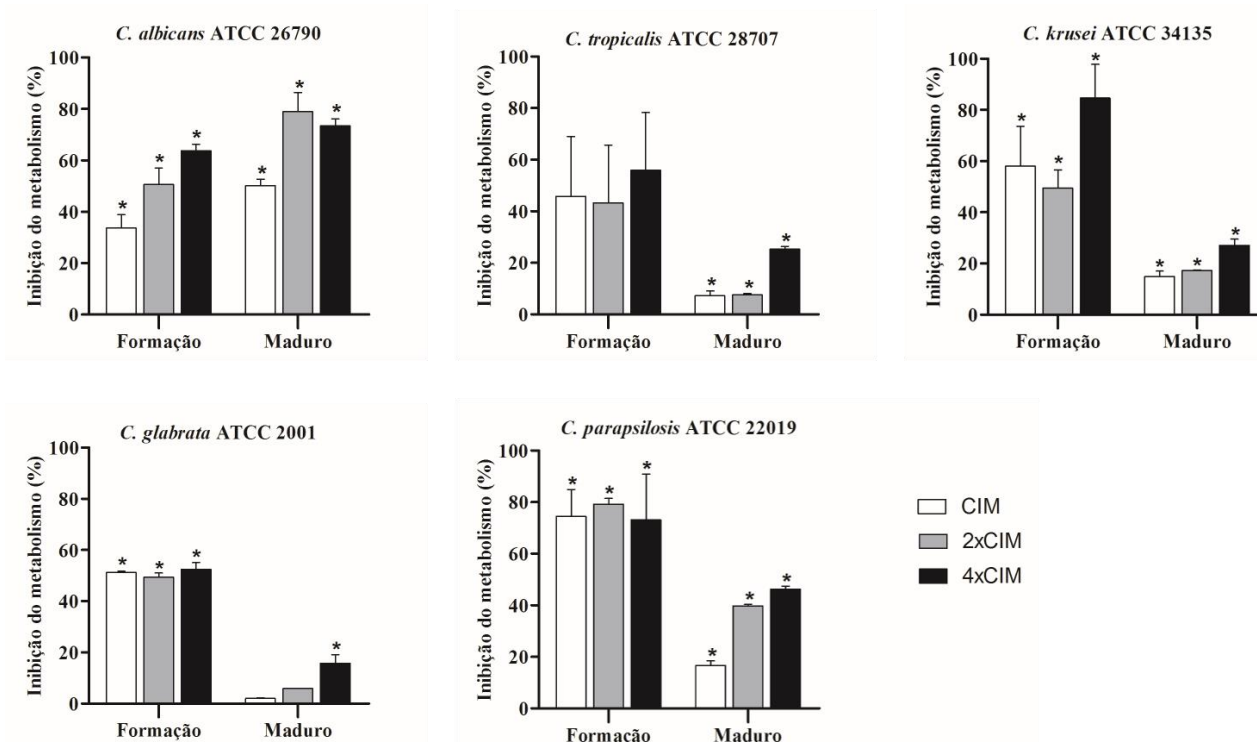


2xCIM ($p < 0,05$) (Fig. 2). O maior percentual de redução foi verificado para o tratamento com 1/2CIM em *C. parapsilosis* (redução de 64,7% em comparação ao controle), seguido por 2xCIM para *C. krusei* (50,8%)

Fig. 2 - Efeito antiadesão da fração acetato de etila de *Poincianella pluviosa* contra *Candida* spp. A adesão da levedura ao poliestireno após 2 h de incubação a 37 °C com a FAE (1/2CIM, CIM e 2xCIM) foi quantificada utilizando-se o ensaio baseado em cristal violeta. Valores são média \pm DP de dois experimentos. Os asteriscos indicam uma redução significativa da biomassa das células quando tratadas com o extrato em comparação com as células não tratadas (* $p < 0,05$).

O efeito da FAE foi avaliado durante as primeiras 24 h de formação de biofilme e os resultados expressos como a redução percentual da atividade metabólica em comparação com as células não tratadas. Para a maioria das amostras, foi observada redução significativa ($p < 0,05$) já para as menores concentrações do extrato

(Fig. 3), com *C. parapsilosis* exibindo 74,4% de inibição da formação de biofilme quando tratadas com o valor da CIM. A maior porcentagem de redução foi detectada



para *C. krusei* na concentração de 4xCIM (84,7%) e a menor para *C. albicans* na CIM (33,7%). Apesar do menor valor de todos os grupos testados, *C. albicans* foi o único a demonstrar um padrão dose-dependente, com os valores aumentando juntamente com a contração do extrato, 33,7% de inibição na CIM, 50,6% na 2xCIM e 63,7% na 4xCIM.

Fig. 3 - Efeito da fração acetato de etila de *Poincianella pluviosa* sobre biofilmes maduros e em crescimento de *Candida* spp. A atividade celular do biofilme foi avaliada pela redução do XTT após 24 h de incubação a 37 °C com diferentes concentrações da FAE (CIM, 2xCIM e 4xCIM). Valores são média \pm DP de dois experimentos. Os asteriscos indicam uma redução significativa de células sésseis metabolicamente ativas tratadas com o extrato em comparação com células não tratadas (* p < 0,05).

A taxa de inibição do biofilme maduro variou de 2,1 a 79% (Fig.3). A maioria das cepas mostrou uma diminuição significativa (p < 0,05) em seu metabolismo quando comparadas aos grupos controle não tratados, e, de maneira oposta à adesão e ao estágio de formação, os resultados aqui exibiram um padrão dose-dependente. *C. albicans*, apesar de apresentar a maior CIM para células planctônicas (500 μ g/mL), apresentou a melhor redução percentual de biofilme (p < 0,05) entre todas as cepas (50,1 na CIM, 79,0 na 2xCIM e 73,4% na 4xCIM). Curiosamente, o resultado oposto foi

observado para *C. glabrata* e *C. krusei*, onde as células planctônicas foram mais sensíveis à FAE, no entanto, o tratamento mostrou reduções modestas dos biofilmes maduros.

Atividade sinérgica da FAE e FLC contra Candida spp.

Inicialmente, os valores da CIM para o FLC sozinho contra células planctônicas foram determinados para todas as cepas de referência (Tabela 2). Os valores da CIM concordaram com os encontrados na literatura, onde cepas referência de *C. albicans* e *C. tropicalis* são consideradas resistentes ($> 128 \mu\text{g/mL}$) (Cruciani e Serpelloni, 2008) e, além disso, a CIM para *C. parapsilosis* ($2 \mu\text{g/mL}$) está de acordo com as diretrizes do CLSI (CLSI, 2012), validando o teste. Posteriormente, o efeito da interação entre a FAE e FCL foi avaliado pelo método *checkerboard* e os valores de FICI usados para determinar a natureza da associação. O tratamento com ambos os compostos resultou em interações positivas para a maioria das cepas. O melhor resultado foi observado para *C. albicans*, cuja associação resultou em uma interação sinérgica com valor de FICI de 0,07, reduzindo as concentrações inibitórias em 128 vezes para FLC e 263 vezes para FAE. Infelizmente, *C. tropicalis* mostrou uma interação indiferente (FICI = 1,5) devido à redução apenas da CIM da FAE (redução de 2 vezes), permanecendo a concentração de FCL inalterada e, assim, excluindo esta cepa dos ensaios subsequentes. *C. krusei* e *C. parapsilosis* exibiram taxas de decréscimo iguais para ambas as substâncias, uma redução de 156,25 vezes para FAE e duas vezes para FCL, classificando ambas as interações como sinérgicas.

Tabela 2 - Efeito da combinação entre a fração acetate de etila de *Poincianella pluviosa* e fluconazol sobre *Candida spp.*

Micro-organismos	FAE ^a	FLC ^a	FAE/FLC ^b	FICI ^c	Interação
Planktonic					
<i>C. albicans</i> ATCC 26790	500,0	128,0	1,9/1,0	0,01	Sinergismo
<i>C. tropicalis</i> ATCC 28707	125,0	128,0	62,5/128	1,5	Indiferente
<i>C. krusei</i> ATCC 34135	31,25	64,0	0,2/32,0	0,5	Sinergismo
<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	125,0	32,0	0,4/8,0	0,2	Sinergismo
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	62,5	2,0	0,4/1,0	0,5	Sinergismo
Growing biofilm					
<i>C. albicans</i> ATCC 26790	>500,0	256,0	7,8/16,0	0,08	Sinergismo
<i>C. tropicalis</i> ATCC 28707	-	-	-	-	-
<i>C. krusei</i> ATCC 34135	>31,2	32,0	3,9/8,0	0,37	Sinergismo
<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	>125,0	>256,0	0,4/2,0	0,01	Sinergismo
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	250,0	0,5	15,6/0,25	0,56	Indiferente

Mature biofilm

<i>C. albicans</i> ATCC 26790	500,0	128,0	250,0/256,0	2,5	Indiferente
<i>C. tropicalis</i> ATCC 28707	-	-	-	-	-
<i>C. krusei</i> ATCC 34135	>125,0	>256,0	15,6/256,0	1,1	Indiferente
<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	>125,0	>256,0	31,25/8,0	0,3	Sinergismo
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	62,0	16,0	0,9/8,0	0,5	Indiferente

Valores da concentração inibitória mínima dos compostos, expressos em µg/mL, foram analisados visualmente após 24 horas de incubação. ^aCIM da fração acetato de etila de *Poncianella pluviosa* e fluconazol testados isoladamente. ^bFração de acetato de etila de *Poncianella pluviosa* e fluconazol testados em combinação. Índice da concentração inibitória fracionária (FICI) interpretado de acordo com: sinergismo FICI ≤ 0,5; 0,5 indiferente <FICI <4,0; antagonismo FICI > 4.0 (Odds, 2003).

A fim de verificar se os efeitos inibitórios observados para as células planctônicas extrapolariam para as células sésseis, a fase de formação e o biofilme maduro também foram submetidos ao tratamento com a combinação entre a FAE e FCL. A combinação dos dois compostos foi capaz de reduzir o biofilme em pelo menos 50% para todas as quatro cepas de referência testadas. Para *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*, a combinação resultou em uma interação sinérgica, com valores de FICI de 0,08 (Tabela 2), com a concentração da FAE necessária para inibir a formação de biofilme de *C. glabrata* reduzindo em 312,5 vezes. *C. parapsilosis* foi o único isolado a exibir uma interação indiferente (ICF = 0,56). No entanto, é possível observar que a concentração da FAE capaz de inibir pelo menos 50% da atividade metabólica foi 16 vezes menor quando combinada com FCL, sugerindo que o efeito resultante foi apenas um resultado da redução menor, apenas 2 vezes, nos valores da CIM do FCL.

Em relação ao tratamento sobre o biofilme maduro, a única interação sinérgica entre os compostos foi detectada em *C. glabrata*, onde a combinação resultou em valores de FICI de 0,3 (Tabela 2). CIM50 da FAE foi menor no tratamento combinado contra *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, entretanto, devido a concentrações inalteradas de FCL, nenhuma interação positiva foi observada.

O efeito da FAE e/ou FCL na integridade da membrana celular de leveduras foi avaliado por microscopia após marcação diferencial de células por corantes fluorescentes. Imagens mostraram que leveduras não tratadas exibiram estruturas fluorescentes vermelhas cilíndricas em seus vacúolos, indicando células metabolicamente ativas com membrana celular intacta (Fig. 5). Entretanto, as células tratadas com o EAF e/ou FCL durante 24 h exibiram coloração verde-fluorescente, sugerindo células com pouca ou nenhuma atividade metabólica.

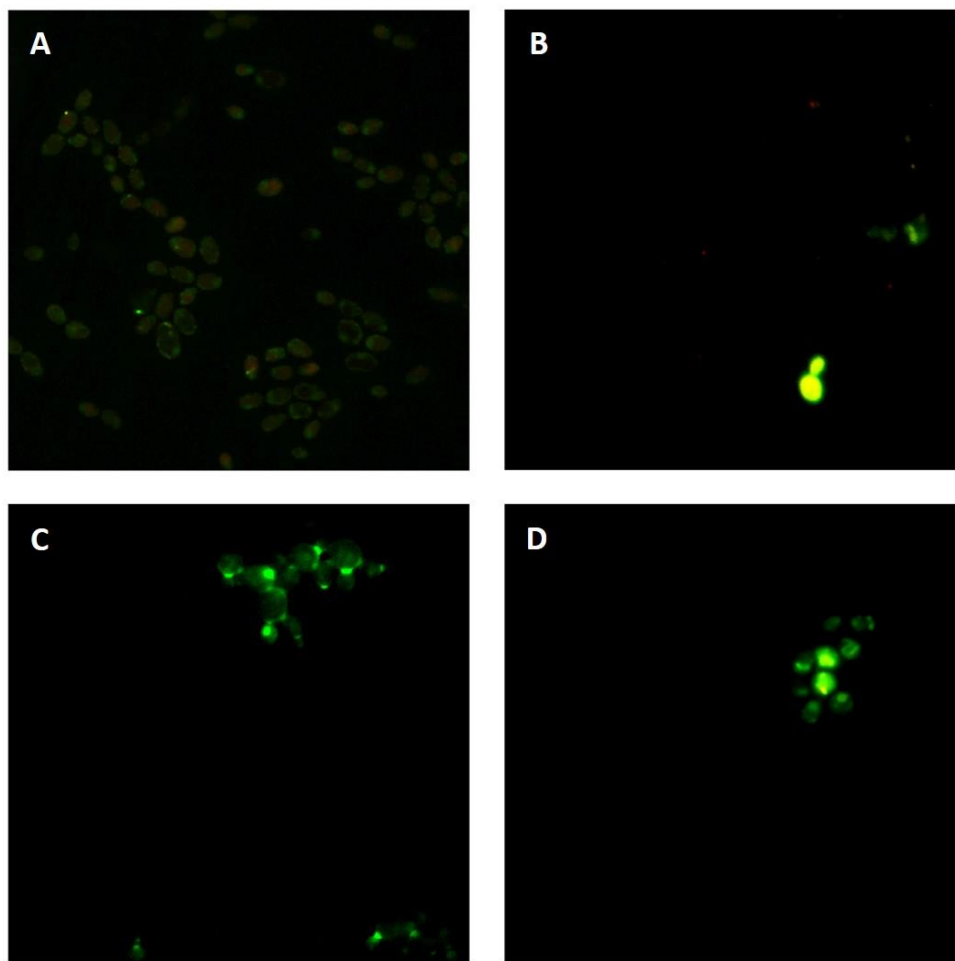


Fig. 5 Efeito da fração acetato de etila de *Poincianella pluviosa* e fluconazol contra *Candida albicans*. Análise de viabilidade por ensaio de microscopia de fluorescência através da coloração de *Candida* com FUN-1. As leveduras de *C. albicans* ATCC 26790 foram incubadas com ou sem os dois compostos, isolados ou em combinação, em valores da CIM durante 24 h, e visualizados por microscopia de fluorescência. Células sombreadas caracterizam células mortas com fluorescência amarelo-verde difusa e células não sombreadas representam leveduras metabolicamente ativas com estruturas fluorescentes vermelhas em seus vacúolos. (A) Células viáveis não tratadas; (B) leveduras tratadas com 128 µg/mL de FCL; (C) tratamento com FAE a 500 µg/mL e (D) grupo tratado com EAF/FCL (1,9/1,0 µg/mL, respectivamente).

A segurança da FAE foi avaliada pelo seu efeito na integridade de eritrócitos humanos, e após 3 h de incubação, exibiu porcentagens de hemólise variando de 6,5 a 0,48% (dados não mostrados). A citotoxicidade de todas as combinações de EAF e FLC em células Vero não mostrou efeito citotóxico, conforme determinado pela viabilidade celular que permaneceu acima de 50% após 24 h (dados não mostrados). Além disso, valores de CIM para células planctônicas das cepas padrão foram menores que as concentrações citotóxicas em células MCF-7 estabelecidas por Kayano et al. (2011).

Discussão

A resistência antimicrobiana é um dos principais desafios da prática clínica, levando a uma terapia profilática inadequada, resultando no uso de medicamentos mais tóxicos e caros e no aumento do tempo de internação (Otaguiri et al., 2017). Atualmente, a falta de novas drogas antifúngicas e as opções terapêuticas limitadas exigem novas estratégias e, portanto, derivados de produtos naturais podem surgir como alternativas para tratamentos complementares ou terapias combinadas (Negri et al, 2014; Ozcelic et al., 2005). Nosso estudo revelou que a fração da casca do caule de *Poincianella pluviosa* (FAE) sozinha apresenta atividade fungistática e antibiofilme contra todas as cepas de *Candida* testadas. Além disso, quando associada ao FLC, gera interações sinérgicas, com valores de CIM reduzidos para ambos os compostos, sobre células planctônicas e sobre o biofilme em formação. Em relação ao tratamento com biofilme maduro de *Candida*, apenas para a espécie *C. glabrata*, a combinação foi capaz de resultar em associação positiva, sendo observada interação indiferente para outras espécies.

Bioativos de *Caesalpinia* spp. bioativos demonstraram efeitos antimicrobianos sobre várias espécies. A 5-hidroxi-1,4-naftoquinona derivada do cerne de *C. sapapan* mostrou efeitos inibitórios *in vitro* contra *Clostridium perfringens* (Lim et al., 2007), enquanto o extrato bruto da casca de *P. pluviosa* apresentou atividade *in vitro* e *in vivo* contra cepas resistentes e sensíveis à cloroquina de *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium chabaudi* (Kayano et al., 2011). Atividades antifúngicas também foram demonstradas pelas espécies *C. pyramidalis* contra *Trichophyton rubrum*, *Cryptococcus neoformans*, *Fonsecaea pedrosoi* e *C. guilliermondii*, e por *C. ferrea* contra *C. albicans* (Cruz et al., 2007, Sampaio et al., 2009). No entanto, a atividade anticandida de *P. pluviosa* isolada ou em associação com FLC permaneceu obscura.

Mostramos que o extrato bruto apresentou menor atividade anticandida que a FAE, que foi capaz de inibir o crescimento planctônico de todas as cepas testadas. Essa triagem inicial revelou que, embora valores mais altos de CIM sejam observados para FAE, ela ainda é considerada válida, uma vez que vários estudos mostram que extratos não purificados podem apresentar atividade antifúngica com valores de CIM de até 1000 µg/mL (Nakamura et al., 2004; Mendes de Toledo et al., 2015). Curiosamente, os isolados de *C. albicans* mostraram-se mais suscetíveis ao

tratamento com extratos de *P. pluviosa* do que a cepa de referência. Assim, concordamos com a afirmação de Kean et al (2018) de que devemos trabalhar com isolados clínicos devido à heterogeneidade desses isolados (Kean et al., 2018). Valores inibitórios mais baixos contra *C. albicans* foram obtidos para o extrato rico em polifenóis de *C. ferrea* Martius e extrato de infusão de folhas de *C. pyramidalis*, 25,0 µg/mL e 12,5 µg/mL, respectivamente (Cruz et al., 2007; Sampaio et al., 2009). Esses achados podem ser resultado da presença de fitoquímicos específicos da espécie, diferenças de sazonalidade ou partes de plantas e suas composições particulares, uma vez que frutos e folhas possuem maior teor de umidade e menos componentes fibrosos do que a casca (Agu e Okolie, 2017).

Outras atividades da FAE de *P. pluviosa* observadas foram a capacidade de reduzir a adesão à superfície abiótica e afetar tanto os biofilmes em crescimento quanto os maduros de *Candida* spp., embora, em geral, o tratamento tenha apresentado melhor resposta durante a fase de crescimento. A capacidade de *Candida* spp. para formar biofilmes resistentes aos azóis (Ramage et al., 2001), juntamente com a produção de enzimas hidrolíticas, filamentação e adesão, são reconhecidas como os principais fatores de virulência que contribuem para a patogênese da candidíase (Calderone e Fonzi, 2001; Cui et al., 2015). Essas características fazem com que os biofilmes representem um dos mais desafiadores problemas da prática clínica e, portanto, uma fonte constante de pesquisa (Colombo e Guimarães, 2003).

Para melhorar o efeito antimicrobiano da FAE, foi testada também a sua associação ao FLC, em que se observou um efeito sinérgico contra as células planctônicas e sésseis. Os resultados mostraram que a quantidade de FAE necessária para inibir a atividade metabólica das células sésseis foi menor durante o tratamento combinado. Mais importante ainda, a CIM do FLC contra as células planctônicas de *C. albicans*, uma cepa resistente, reduziu 128 vezes quando combinada com a FAE. Além disso, *C. glabrata* e *C. krusei*, cepas intrinsecamente resistentes ao FLC (Vazquez et al., 2001), também necessitaram de menores concentrações de FLC para terem suas atividades metabólicas reduzidas durante o tratamento combinado. O efeito da combinação entre *Caesalpinia* spp. e drogas antimicrobianas contra bactérias resistentes foi estudada por Shibata et al. (2005), que mostraram que o galato de etila purificado a partir de vagens secas de *C. spinosa* foi capaz de intensificar a susceptibilidade a β-lactâmicos em cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes ou sensíveis à meticilina.

A terapia combinada para gerenciar infecções causadas por microrganismos resistentes a múltiplas drogas tornou-se uma estratégia potencial para combater isolados fúngicos resistentes (Ghannoum e Elewski, 1999), além disso, a falta de novas classes ou diferentes alvos moleculares fazem combinações de drogas uma estratégia interessante para terapia. Os efeitos sinérgicos entre as drogas podem ser atingidos alcançando diferentes alvos ou interagindo uns com os outros para melhorar suas atividades biológicas (Bollenbach, 2015). As consequências dessas interações podem ser a redução das doses dos medicamentos com o aumento da eficácia do fármaco e, posteriormente, diminuição da sua toxicidade. Além disso, o desenvolvimento de resistência a medicamentos pode ser retardado pela estratégia multi-alvo (Cui et al., 2015).

Por fim, a casca do caule de *C. pluviosa* contém ácido gálico, éster etílico de ácido gálico, rhuschalcone VI, lupeol, ácido betulínico e estigmasterol (Flores; Almanza, 2006). Aqui, mostramos que algumas frações contendo esses bioativos, isoladas ou em combinação, podem exibir potente atividade antifúngica com menos toxicidade, principal razão para a investigação de suas propriedades antimicrobianas. Assim, extratos brutos de plantas, assim como suas frações, podem ser o primeiro passo para a descoberta um novo composto promissor (NEGRI et al, 2014; Ravichandran e Muthuraman, 2016). Em geral, os resultados mostraram que a combinação entre o extrato da casca da sibipiruna com o fluconazol reduziu a atividade metabólica das células planctônicas e sésseis de *Candida* spp. No entanto, a natureza desse efeito variou de acordo com a espécie, padrão de crescimento e estágio de desenvolvimento do biofilme estudado.

Conclusões

No presente estudo, demonstramos que o extrato da casca do caule de *Poincianella pluviosa* é um agente antimicrobiano eficaz, exibindo potente atividade antifúngica contra várias espécies de *Candida*. Além disso, a combinação com o fluconazol mostrou grande atividade, necessitando de menores concentrações para alcançar a inibição das células planctônicas e sésseis e, conseqüentemente, demonstrando um alto efeito sinérgico. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a descrever essa interação, e apesar de exibir resultados promissores, vários

estudos devem ainda ser realizados para elucidar o mecanismo de inibição de levedura e a utilidade deste composto natural na medicina.

Conflito de interesses

Os autores declaram ausência de conflito de interesses.

Agradecimentos

A Dos Santos PMC e Andriani GM foi concedido o apoio financeiro pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e pela Fundação Araucária [Programa de Apoio a Núcleos de Excelência CP02/2016 Grant # 46885].

Referências

- A.C.A. Kayano, S.C. Lopes, F.G. Bueno, E.C. Cabral, W.C. Souza-Neiras, L.M. Yamauchi, M.A. Foglio, M.N. Eberlin, J. Mello, F.T. Costa, *In vitro* and *in vivo* assessment of the anti-malarial activity of *Caesalpinia pluviosa*, *Malar. J.* 10 (2011) 112. doi:10.1186/1475-2875-10-112.
- A.L. Colombo, T. Guimarães, Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36 (2003) 599–607. doi:10.1590/S0037-86822003000500010.
- A.M. Fuentefria, B. Pippi, D.F. Dalla Lana, K.K. Donato, S.F. de Andrade, Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance, *Lett. Appl. Microbiol.* 66 (2018) 2–13. doi:10.1111/lam.12820.
- A.S. Melo, A.L. Colombo, B.A. Arthington-Skaggs, Paradoxical Growth Effect of Caspofungin Observed on Biofilms and Planktonic Cells of Five Different *Candida* Species, *Antimicrob. Agents Chemother.* 51 (2007) 3081–3088. doi:10.1128/AAC.00676-07.
- B. Das, Y. Srinivas, C. Sudhakar, I. Mahender, K. Laxminarayana, P.R. Reddy, T.V. Raju, N.M. Jakka, J.V. Rao, New diterpenoids from *Caesalpinia* species and their cytotoxic activity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 2847–2850. doi:10.1016/J.BMCL.2010.03.048.
- B.N. Singh, D.K. Upreti, B.R. Singh, G. Pandey, S. Verma, S. Roy, A.H. Naqvi, A.K.S. Rawat, Quercetin sensitizes fluconazole-resistant *Candida albicans* to induce apoptotic cell death by modulating quorum sensing., *Antimicrob. Agents Chemother.* 59 (2015) 2153–68. doi:10.1128/AAC.03599-14.

- C. Longhi, J.P. Santos, A.T. Morey, P.D. Marcato, N. Durán, P. Pinge-Filho, G. Nakazato, S.F. Yamada-Ogatta, L.M. Yamauchi, Combination of fluconazole with silver nanoparticles produced by *Fusarium oxysporum* improves antifungal effect against planktonic cells and biofilm of drug-resistant *Candida albicans*, *Med. Mycol.* 54 (2016) 428–432. doi:10.1093/mmy/myv036.
- C. Spampinato, D. Leonardi, *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents., *Biomed Res. Int.* 2013 (2013) 204237. doi:10.1155/2013/204237.
- C.E. Mendes de Toledo, P.R. Santos, J.C. Palazzo de Mello, B.P. Dias Filho, C.V. Nakamura, T. Ueda-Nakamura, Antifungal Properties of Crude Extracts, Fractions, and Purified Compounds from Bark of *Curatella americana* L. (Dilleniaceae) against *Candida* Species, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2015 (2015) 1–9. doi:10.1155/2015/673962.
- C.T. Kåhrström, Resistance is costly for *Candida*, *Nat. Rev. Microbiol.* 13 (2015) 189–189. doi:10.1038/nrmicro3454.
- C.V. Nakamura, K. Ishida, L.C. Faccin, B.P.D. Filho, D.A.G. Cortez, S. Rozental, W. de Souza, T. Ueda-Nakamura, *In vitro* activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L. against four *Candida* species, *Res. Microbiol.* 155 (2004) 579–586. doi:10.1016/j.resmic.2004.04.004.
- D. Allen, D. Wilson, R. Drew, J. Perfect, Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management, *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 13 (2015) 787–798. doi:10.1586/14787210.2015.1032939.
- D. Anandhi, P.T. Srinivasan, G. P. Kumar, S. Jagatheesh. Influence of Flavonoids and Glycosides from *Caesalpinia Coriaria* (Jacq) Wild as Bactericidal Compound. *Asian J Multidiscip St.* 3 (2014) 1043-1051.
- D. da S. Trentin, R.B. Giordani, K.R. Zimmer, A.G. da Silva, M.V. da Silva, M.T. dos S. Correia, I.J.R. Baumvol, A.J. Macedo, Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles, *J. Ethnopharmacol.* 137 (2011) 327–335. doi:10.1016/J.JEP.2011.05.030.
- D. Oro, A. Heissler, E.M. Rossi, D. Scapin, P. da Silva Malheiros, E. Boff, Antifungal activity of natural compounds against *Candida* species isolated from HIV-positive patients, *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 5 (2015) 781–784. doi:10.1016/J.APJT.2015.07.011.
- E. Izumi, T. Ueda-Nakamura, V.F. Veiga, A.C. Pinto, C.V. Nakamura, Terpenes from *Copaifera* Demonstrated *in Vitro* Antiparasitic and Synergic Activity, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 2994–3001. doi:10.1021/jm201451h.
- E.H. Endo, D.A. Garcia Cortez, T. Ueda-Nakamura, C.V. Nakamura, B.P. Dias Filho, Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*, *Res. Microbiol.* 161 (2010) 534–540. doi:10.1016/j.resmic.2010.05.002.

- E.M. Scott, V.N. Tariq, R.M. McCrory, Demonstration of synergy with fluconazole and either ibuprofen, sodium salicylate, or propylparaben against *Candida albicans in vitro.*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 39 (1995) 2610–4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8592988> (accessed July 4, 2018).
- F.C. Bizerra, C.V. Nakamura, C. De Poersch, T.I. Estivalet Svidzinski, R.M. Borsato Quesada, S. Goldenberg, M.A. Krieger, S.F. Yamada-Ogatta, Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance, *FEMS Yeast Res.* 8 (2008) 442–450. doi:10.1111/j.1567-1364.2007.00347.x.
- F.C. Bizerra, C.V. Nakamura, C. De Poersch, T.I. Estivalet Svidzinski, R.M. Borsato Quesada, S. Goldenberg, M.A. Krieger, S.F. Yamada-Ogatta, Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance, *FEMS Yeast Res.* 8 (2008) 442–450. doi:10.1111/j.1567-1364.2007.00347.x.
- F.C. Odds, Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them, *J. Antimicrob. Chemother.* 52 (2003) 1–1. doi:10.1093/jac/dkg301.
- F.C. Sampaio, M. do S. V. Pereira, C.S. Dias, V.C.O. Costa, N.C.O. Conde, M.A.R. Buzalaf, *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens, *J. Ethnopharmacol.* 124 (2009) 289–294. doi:10.1016/J.JEP.2009.04.034.
- F.G. Bueno, G.P. Panizzon, E.V.S. de L. Mello, M. Lechtenberg, F. Petereit, J.C.P. de Mello, A. Hensel, Hydrolyzable tannins from hydroalcoholic extract from *Poincianella pluviosa* stem bark and its wound-healing properties: Phytochemical investigations and influence on *in vitro* cell physiology of human keratinocytes and dermal fibroblasts, *Fitoterapia.* 99 (2014) 252–260. doi:10.1016/j.fitote.2014.10.007.
- F.G. Bueno, M.A.D. Machareth, G.P. Panizzon, G.C. Lopes, J.C.P. Mello, E.V.S. Leite-Mello, Development of a UV/Vis spectrophotometric method for analysis of total polyphenols from *Caesalpinia peltophoroides* Benth, *Quim. Nova.* 35 (2012) 822–826. doi:10.1590/S0100-40422012000400031.
- G. Ramage, K. Vande Walle, B.L. Wickes, J.L. López-Ribot, Standardized method for *in vitro* antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms., *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (2001) 2475–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11502517> (accessed August 9, 2018).
- G.C. Rodrigo, G.R. Almanza, B. Akesson, R.-D. Duan, Antiproliferative activity of extracts of some Bolivian medicinal plants, *J. Med. Plants Res.* 4 (2010) 2204–2210. doi:10.5897/jmpr10.321.
- G.Y. Zuo, Z.Q. Han, X.Y. Hao, J. Han, Z.S. Li, G.C. Wang, Synergy of aminoglycoside antibiotics by 3-Benzylchroman derivatives from the Chinese drug *Caesalpinia sappan* against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Phytomedicine.* 21 (2014) 936–941. doi:10.1016/J.PHYMED.2014.03.004.
- H. Kaur, M.H. Amini, P.K. Prabhakar, A. Singh, A. Suttee, Phytochemical Screening and Antimicrobial and Antimicrobial Activity of *Caesalpinia sappan* L Leaves, *Int J Pharmacogn Phytochem Res.* 8 (2016) 1064–1069.

- H. Shibata, K. Kondo, R. Katsuyama, K. Kawazoe, Y. Sato, K. Murakami, Y. Takaishi, N. Arakaki, T. Higuti, Alkyl gallates, intensifiers of beta-lactam susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus.*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (2005) 549–55. doi:10.1128/AAC.49.2.549-555.2005.
- H.-F. Ji, X.-J. Li, H.-Y. Zhang, Natural products and drug discovery. Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia?, *EMBO Rep.* 10 (2009) 194–200. doi:10.1038/embor.2009.12.
- J. Cui, B. Ren, Y. Tong, H. Dai, L. Zhang, Synergistic combinations of antifungals and anti-virulence agents to fight against *Candida albicans*, *Virulence.* 6 (2015) 362–371. doi:10.1080/21505594.2015.1039885.
- J. Morschhäuser, The development of fluconazole resistance in *Candida albicans* – an example of microevolution of a fungal pathogen, *J. Microbiol.* 54 (2016) 192–201. doi:10.1007/s12275-016-5628-4.
- J. Vila, G.R. Almanza, *Revista boliviana de química.*, [Universidad Mayor de San Andres], 2006. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602006000100001 (accessed July 15, 2018).
- J.A. Vazquez, G. Peng, J.D. Sobel, L. Steele-Moore, P. Schuman, W. Holloway, J.D. Neaton, Evolution of Antifungal Susceptibility among *Candida* Species Isolates Recovered from Human Immunodeficiency Virus–Infected Women Receiving Fluconazole Prophylaxis, *Clin. Infect. Dis.* 33 (2001) 1069–1075. doi:10.1086/322641.
- J.L. Baldim, W. Rosa, M.F.C. Santos, D.A. Chagas-Paula, J.H.G. Lago, M.G. Soares, Homoisoflavonoids from *Caesalpinia* spp.: A Closer Look at Chemical and Biological Aspects, in: *Flavonoids - From Biosynth. to Hum. Heal.*, InTech, 2017. doi:10.5772/67723.
- K.C. Agu, P.N. Okolie, Proximate composition, phytochemical analysis, and *in vitro* antioxidant potentials of extracts of *Annona muricata* (Soursop)., *Food Sci. Nutr.* 5 (2017) 1029–1036. doi:10.1002/fsn3.498.
- L. de P. Pereira, R.O. da Silva, P.H. de S.F. Bringel, K.E.S. da Silva, A.M.S. Assreuy, M.G. Pereira, Polysaccharide fractions of *Caesalpinia ferrea* pods: Potential anti-inflammatory usage, *J. Ethnopharmacol.* 139 (2012) 642–648. doi:10.1016/j.jep.2011.12.012.
- L. Mobin, S.A. Saeed, R. Ali, S.G. Saeed, R. Ahmed, Antibacterial and antifungal activities of the polyphenolic fractions isolated from the seed coat of *Abrus precatorius* and *Caesalpinia crista*, *Nat. Prod. Res.* (2017) 1–5. doi:10.1080/14786419.2017.1378217.
- L. Scorzoni, F. Sangalli-Leite, J. de Lacorte Singulani, A.C.A. de Paula e Silva, C.B. Costa-Orlandi, A.M. Fusco-Almeida, M.J.S. Mendes-Giannini, Searching new antifungals: The use of *in vitro* and *in vivo* methods for evaluation of natural compounds, *J. Microbiol. Methods.* 123 (2016) 68–78. doi:10.1016/J.MIMET.2016.02.005.

- M. Cruciani, G. Serpelloni, Management of *Candida* infections in the adult intensive care unit, *Expert Opin. Pharmacother.* 9 (2008) 175–191. doi:10.1517/14656566.9.2.175.
- M. Negri, T. Salci, C. Shinobu-Mesquita, I. Capoci, T. Svidzinski, E. Kioshima, Early State Research on Antifungal Natural Products, *Molecules.* 19 (2014) 2925–2956. doi:10.3390/molecules19032925.
- M. Shahzad, L. Sherry, R. Rajendran, C.A. Edwards, E. Combet, G. Ramage, Utilising polyphenols for the clinical management of *Candida albicans* biofilms, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 44 (2014) 269–273. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.05.017.
- M. Shahzad, L. Sherry, R. Rajendran, C.A. Edwards, E. Combet, G. Ramage, Utilising polyphenols for the clinical management of *Candida albicans* biofilms, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 44 (2014) 269–273. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.05.017.
- M. Victoria Castelli, M. Gabriel Derita, S. Noelí López, Novel antifungal agents: a patent review (2013 - present), *Expert Opin. Ther. Pat.* 27 (2017) 415–426. doi:10.1080/13543776.2017.1261113.
- M.A. Ghannoum, B. Elewski, Successful treatment of fluconazole-resistant oropharyngeal candidiasis by a combination of fluconazole and terbinafine., *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6 (1999) 921–3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10548586> (accessed July 18, 2018).
- M.B. Azevedo, C. Almeida, F.M. Chaves, I. Rodrigues, H. Bizzo, C. Alviano, D. Alviano, 7-hydroxycalamenene effects on secreted aspartic proteases activity and biofilm formation of *Candida* spp., *Pharmacogn. Mag.* 12 (2016) 36. doi:10.4103/0973-1296.176022.
- M.C.S. Cruz, P.O. Santos, A.M. Barbosa, D.L.F.M. de Mélo, C.S. Alviano, A.R. Antonioli, D.S. Alviano, R.C. Trindade, Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses, *J. Ethnopharmacol.* 111 (2007) 409–412. doi:10.1016/J.JEP.2006.12.005.
- M.D. Navarro-Martinez, F. García-Cánovas, J.N. Rodríguez-López, Tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits ergosterol synthesis by disturbing folic acid metabolism in *Candida albicans*, *J. Antimicrob. Chemother.* 57 (2006) 1083–1092. doi:10.1093/jac/dkl124.
- M.D. Navarro-Martinez, F. García-Cánovas, J.N. Rodríguez-López, Tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits ergosterol synthesis by disturbing folic acid metabolism in *Candida albicans*, *J. Antimicrob. Chemother.* 57 (2006) 1083–1092. doi:10.1093/jac/dkl124.
- M.E. Rodrigues, S. Silva, J. Azeredo, M. Henriques, Novel strategies to fight *Candida* species infection, *Crit. Rev. Microbiol.* (2014) 1–13. doi:10.3109/1040841X.2014.974500.
- M.-Y. Lim, J.-H. Jeon, E.-Y. Jeong, C.-H. Lee, H.-S. Lee, Antimicrobial activity of 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone isolated from *Caesalpinia sappan* toward intestinal bacteria, *Food Chem.* 100 (2007) 1254–1258. doi:10.1016/j.foodchem.2005.12.009.

- N.A. Evensen, P.C. Braun, The effects of tea polyphenols on *Candida albicans*: inhibition of biofilm formation and proteasome inactivation., *Can. J. Microbiol.* 55 (2009) 1033–9. doi:10.1139/w09-058.
- R. Kean, C. Delaney, R. Rajendran, L. Sherry, R. Metcalfe, R. Thomas, W. McLean, C. Williams, G. Ramage, Gaining Insights from *Candida* Biofilm Heterogeneity: One Size Does Not Fit All, *J. Fungi.* 4 (2018) 12. doi:10.3390/jof4010012.
- R.A. Calderone, W.A. Fonzi, Virulence factors of *Candida albicans*, *Trends Microbiol.* 9 (2001) 327–335. doi:10.1016/S0966-842X(01)02094-7.
- S. Ravichandran, S. Muthuraman, Examining the anti-candidal activity of 10 selected Indian herbs and investigating the effect of *Lawsonia inermis* extract on germ tube formation, protease, phospholipase, and aspartate dehydrogenase enzyme activity in *Candida albicans*., *Indian J. Pharmacol.* 48 (2016) 47–52. doi:10.4103/0253-7613.174523.
- S. Stollo, M.S. Lionakis, J. Adjemian, C.A. Steiner, D.R. Prevots, Epidemiology of Hospitalizations Associated with Invasive Candidiasis, United States, 2002–2012, *Emerg. Infect. Dis.* 23 (2016) 7–13. doi:10.3201/eid2301.161198.
- S.G. Whaley, E.L. Berkow, J.M. Rybak, A.T. Nishimoto, K.S. Barker, P.D. Rogers, Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans* *Candida* Species, *Front. Microbiol.* 7 (2017) 2173. doi:10.3389/fmicb.2016.02173.
- T. Bollenbach, Antimicrobial interactions: mechanisms and implications for drug discovery and resistance evolution, *Curr. Opin. Microbiol.* 27 (2015) 1–9. doi:10.1016/J.MIB.2015.05.008.
- T. Fukuoka, D.A. Johnston, C.A. Winslow, M.J. de Groot, C. Burt, C.A. Hitchcock, S.G. Filler, Genetic basis for differential activities of fluconazole and voriconazole against *Candida krusei*., *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 (2003) 1213–9. doi:10.1128/AAC.47.4.1213-1219.2003.
- V.P. Kumar, N.S. Chauhan, H. Padh, M. Rajani, Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants, *J. Ethnopharmacol.* 107 (2006) 182–188. doi:10.1016/j.jep.2006.03.013.
- W.S. Alviano, D.S. Alviano, C.G. Diniz, A.R. Antonioli, C.S. Alviano, L.M. Farias, M.A.R. Carvalho, M.M.G. Souza, A.M. Bolognese, In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine, *Arch. Oral Biol.* 53 (2008) 545–552. doi:10.1016/j.archoralbio.2007.12.001.
- Y. Flores, J. Vila, G. R. Almanza. Secondary Metabolites From *Caesalpinia Pluviosa*. *Rev Boliviana de Química.* 23(2006)
- Y. Jin, H.K. Yip, Y.H. Samaranayake, J.Y. Yau, L.P. Samaranayake, Biofilm-forming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection., *J. Clin. Microbiol.* 41 (2003) 2961–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12843027> (accessed July 4, 2018).

Y.K. Rao, S.-H. Fang, Y.-M. Tzeng, Anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Caesalpinia pulcherrima*, J. Ethnopharmacol. 100 (2005) 249–253. doi:10.1016/J.JEP.2005.02.039.

Y.-S. Kim, H.-M. Shim, K.-Y. Kim, Antimicrobial Effect of *Caesalpinia sappan* L. Extract on Foodborne Bacteria, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 45 (2016) 1026–1034. doi:10.3746/jkfn.2016.45.7.1026.

Z.F. Wu, H. Bao, F.-Y. Zhou, J.-X. Liu, F.-C. Meng, L. Feng, J.-J. Lu, Q.-W. Zhang, Y. Ye, L.-G. Lin, Cytotoxic cassane diterpenoids from the seeds of *Caesalpinia sappan*, Chinese Chem. Lett. 28 (2017) 1711–1715. doi:10.1016/J.CCLET.2017.04.023.

5 CONCLUSÕES

No presente estudo, demonstrou-se que a fração acetato do extrato da casca de *Poincianella pluviosa* é um antimicrobiano eficaz, exibindo potente atividade antifúngica *in vitro* contra diferentes espécies de *Candida*, tais como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata*. O composto interferiu em fatores de virulência desta espécie, reduzindo a sua capacidade de adesão a superfícies abióticas e a formação de biofilme. O extrato foi capaz ainda de reduzir o número de células metabolicamente ativas no biofilme maduro de *Candida* spp., quando comparados ao controle não-tratado. Além disso, quando administrado em combinação com o fluconazol, exibiu maior eficácia sobre células planctônicas e sésseis, sendo necessária uma menor concentração para alcançar a inibição de crescimento celular e demonstrando, assim, elevado efeito sinérgico.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. DE F.; FREITAS, P. F. DE; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114–140, mar. 2007.
- AGU, K. C.; OKOLIE, P. N. Proximate composition, phytochemical analysis, and in vitro antioxidant potentials of extracts of *Annona muricata* (Soursop). **Food Science & Nutrition**, v. 5, n. 5, p. 1029–1036, set. 2017.
- AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 999–1008, 1 ago. 2006.
- ÁLVAREZ-LERMA, F. et al. Candiduria in critically ill patients admitted to intensive care medical units. **Intensive Care Medicine**, v. 29, n. 7, p. 1069–1076, 16 jul. 2003.
- ALVIANO, W. S. et al. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. **Archives of Oral Biology**, v. 53, n. 6, p. 545–552, jun. 2008.
- ANANDHI, D.; et al. Influence of Flavonoids and Glycosides from *Caesalpinia coriaria* (Jacq) Wild as Bactericidal Compound. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, p. 1043-1051, 2014.
- ANDES, D. R. et al. Impact of Treatment Strategy on Outcomes in Patients with Candidemia and Other Forms of Invasive Candidiasis: A Patient-Level Quantitative Review of Randomized Trials. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 8, p. 1110–1122, 15 abr. 2012.
- ANNA K JAGER, S. H. F.; JÄGER, A. K. Correlation between Plant Secondary Metabolites and Their Antifungal Mechanisms—A Review. **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 03, n. 02, 18 mar. 2014.
- ARENDRUP, M. C. et al. Epidemiological changes with potential implication for antifungal prescription recommendations for fungaemia: data from a nationwide fungaemia surveillance programme. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 8, p. e343–e353, ago. 2013.
- ARIF, T. et al. In vitro and in vivo antimicrobial activities of seeds of *Caesalpinia bonduc* (Lin.) Roxb. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 1, p. 177–180, 4 maio 2009.
- ASHCROFT, D. M.; PO, A. L. Herbal remedies: issues in licensing and economic evaluation. **PharmacoEconomics**, v. 16, n. 4, p. 321–8, out. 1999.
- ASNER, S. A. et al. Acquired Multidrug Antifungal Resistance in *Candida lusitanae* during Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7715–7722, dez. 2015.

- ATKINSON, B. J.; LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. *Candida lusitanae* fungemia in cancer patients: risk factors for amphotericin B failure and outcome. **Medical Mycology**, v. 46, n. 6, p. 541–546, jan. 2008.
- BADAMI, S. et al. Antioxidant activity of *Caesalpinia sappan* heartwood. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 26, n. 11, p. 1534–7, nov. 2003.
- BADIEE, P.; HASHEMIZADEH, Z. Opportunistic invasive fungal infections: diagnosis & clinical management. **The Indian journal of medical research**, v. 139, n. 2, p. 195–204, fev. 2014.
- BAEK, N. I. et al. Anticonvulsant compounds from the wood of *Caesalpinia sappan* L. **Archives of pharmacal research**, v. 23, n. 4, p. 344–8, ago. 2000.
- BAGINSKI, M.; CZUB, J. Amphotericin B and its new derivatives - mode of action. **Current drug metabolism**, v. 10, n. 5, p. 459–69, jun. 2009.
- BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 397–403, set. 2000.
- BALKOVEC, J. M. et al. Discovery and development of first in class antifungal caspofungin (CANCIDAS®)--a case study. **Natural product reports**, v. 31, n. 1, p. 15–34, jan. 2014.
- BARBOSA JUNIOR, A. M. et al. Estudo comparativo da susceptibilidade de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans* (Sanfelice, 1895) frente a alguns antifúngicos de uso hospitalar e extratos vegetais obtidos de plantas medicinais da região semiárida sergipana. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 120–132, mar. 2015.
- BEDAIR, A. A.; DARWAZEH, A. M. G.; AL-ABOOSI, M. M. Oral *Candida* colonization and candidiasis in patients with psoriasis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 114, n. 5, p. 610–615, nov. 2012.
- BENABADJI, S. H. et al. Anticarcinogenic and antioxidant activity of diindolylmethane derivatives. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 25, n. 5, p. 666–71, maio 2004.
- BINNS, S. E.; ARNASON, J. T.; BAUM, B. R. Phytochemical variation within populations of *Echinacea angustifolia* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 9, p. 837–854, 1 out. 2002.
- BISHOP, J. A. et al. *Candida bracarensis* Detected among Isolates of *Candida glabrata* by Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridization: Susceptibility Data and Documentation of Presumed Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 443–446, 1 fev. 2008.
- BIZERRA, F. C. et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 3, p. 442–450, 31 jan. 2008.

BROWN, E. D.; WRIGHT, G. D. New Targets and Screening Approaches in Antimicrobial Drug Discovery. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 2, p. 759–774, fev. 2005.

BRUNKE, S. et al. Virulence factors in fungal pathogens of man. **Current Opinion in Microbiology**, v. 32, p. 89–95, ago. 2016.

BUENO, F. G. et al. Hydrolyzable tannins from hydroalcoholic extract from *Poincianella pluviosa* stem bark and its wound-healing properties: Phytochemical investigations and influence on in vitro cell physiology of human keratinocytes and dermal fibroblasts. **Fitoterapia**, v. 99, p. 252–260, dez. 2014.

BUENO, F. G. et al. Enhanced Cutaneous Wound Healing In Vivo by Standardized Crude Extract of *Poincianella pluviosa*. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0149223, 3 mar. 2016.

BUTTS, A.; KRYSAN, D. J. Antifungal drug discovery: something old and something new. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 9, p. e1002870, set. 2012.

CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 7, p. 327–35, jul. 2001.

CAMACHO, D. P.; GASPARETTO, A.; SVIDZINSKI, T. I. E. The effect of chlorhexidine and gentian violet on the adherence of *Candida* spp. to urinary catheters. **Mycopathologia**, v. 163, n. 5, p. 261–266, 6 maio 2007.

CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 86–96, 1 jun. 2017.

CANTÓN, E. et al. Prospective Multicenter Study of the Epidemiology, Molecular Identification, and Antifungal Susceptibility of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* Isolated from Patients with Candidemia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 12, p. 5590–5596, dez. 2011.

CASALINUOVO, I. A.; DI FRANCESCO, P.; GARACI, E. Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 8, n. 2, p. 69–77, [s.d.].

CHAFFIN, W. L. *Candida albicans* cell wall proteins. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 72, n. 3, p. 495–544, set. 2008.

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. 5385–94, set. 2001.

CHANG, Y.-L. et al. New facets of antifungal therapy. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 222–236, 17 fev. 2017.

CHAVASCO, J. K. et al. Molecular identification of *Candida dubliniensis* isolated from oral lesions of HIV-positive and HIV-negative patients in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 1, p. 21–26, fev. 2006.

- CHAVES, T. P. et al. Evaluation of the Interaction between the *Poincianella pyramidalis* (Tul.) LP Queiroz Extract and Antimicrobials Using Biological and Analytical Models. **PLOS ONE**, v. 11, n. 5, p. e0155532, 18 maio 2016.
- CHIANG, L. C. et al. In vitro antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 194–198, 1 jul. 2003.
- CHIN, V. et al. Dissecting *Candida albicans* Infection from the Perspective of *C. albicans* Virulence and Omics Approaches on Host–Pathogen Interaction: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1643, 18 out. 2016.
- CHITNIS, A. S. et al. Trends in *Candida* Central Line-Associated Bloodstream Infections Among NICUs, 1999-2009. **PEDIATRICS**, v. 130, n. 1, p. e46–e52, 1 jul. 2012.
- CHOWDHARY, A.; SHARMA, C.; MEIS, J. F. *Candida auris*: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 5, p. e1006290, 18 maio 2017.
- COLALTO, C. What phytotherapy needs: Evidence-based guidelines for better clinical practice. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 3, p. 413–425, mar. 2018.
- COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2816–23, ago. 2006.
- COLOMBO, A. L. et al. Prospective Observational Study of Candidemia in São Paulo, Brazil: Incidence Rate, Epidemiology, and Predictors of Mortality. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 28, n. 05, p. 570–576, 2 maio 2007.
- CORREIA, A. et al. *Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 313–317, 1 jan. 2006.
- CRUZ, M. C. S. et al. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 409–412, 4 maio 2007.
- CUENCA-ESTRELLA, M. et al. Prevalence of *Candida bracarensis* and *Candida nivariensis* in a Spanish collection of yeasts: comparison of results from a reference centre and from a population-based surveillance study of candidemia. **Medical Mycology**, v. 49, n. 5, p. 1–5, 3 jan. 2011.
- DA MATTA, D. A. et al. Candidemia Surveillance in Brazil: Evidence for a Geographical Boundary Defining an Area Exhibiting an Abatement of Infections by *Candida albicans* Group 2 Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3062–3067, 1 set. 2010.
- DA SILVA DANTAS, A. et al. Cell biology of *Candida albicans* –host interactions. **Current Opinion in Microbiology**, v. 34, p. 111–118, dez. 2016.

- DADAR, M. et al. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. **Microbial Pathogenesis**, v. 117, p. 128–138, abr. 2018.
- DAS, B. et al. Isolation, synthesis, and bioactivity of homoisoflavonoids from *Caesalpinia pulcherrima*. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 57, n. 10, p. 1139–41, out. 2009.
- DAVID, B.; WOLFENDER, J.-L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 2, p. 299–315, 3 abr. 2015.
- DAVIES, W. H.; SEXTON, W. A. Chemical constitution and fungistatic action of organic sulphur compounds. **The Biochemical journal**, v. 40, n. 3, p. 331–4, 1946.
- DE BERNARDIS, F. et al. Evidence that Members of the Secretory Aspartyl Proteinase Gene Family, in Particular *SAP2*, Are Virulence Factors for *Candida* Vaginitis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 179, n. 1, p. 201–208, jan. 1999.
- DE BERNARDIS, F. et al. *Candida vaginitis*: virulence, host response and vaccine prospects. **Medical Mycology**, v. 56, n. suppl_1, p. S26–S31, 1 abr. 2018.
- 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, abr. 2013.
- DE MORAES, S. et al. Phytochemical activity and antioxidant activity of hydroethanolic extract and fractions from *Poincianella pyramidalis*(tul.) L.P.Queiroz var. *pyramidalis* stem bark. **BMC Proceedings**, v. 8, n. Suppl 4, p. P257, 2014.
- DE REPENTIGNY, L. et al. Characterization of binding of *Candida albicans* to small intestinal mucin and its role in adherence to mucosal epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3172–9, jun. 2000.
- DE SOUZA, J. et al. Leaves from the Tree *Poincianella pluviosa* as a Renewable Source of Antiplasmodial Compounds against Chloroquine-Resistant *Plasmodium falciparum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 6, p. 1318–1327, 2017.
- DENNING, D. W. et al. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 0, n. 0, 2 ago. 2018.
- DEORUKHKAR, S. .; SAINI, S. Candidiasis: Past, present and future. **International Journal of Infectious and Tropical Diseases**, v. 2, n. 1, p. 12–24, 2015.
- DEORUKHKAR, S. C.; SAINI, S.; MATHEW, S. Non- *albicans* *Candida* Infection: An Emerging Threat. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2014, p. 1–7, 2014.
- DIASIO, R. B.; BENNETT, J. E.; MYERS, C. E. Mode of action of 5-fluorocytosine. **Biochemical pharmacology**, v. 27, n. 5, p. 703–7, 1 mar. 1978.

- DOI, A. M. et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0146909, 25 jan. 2016.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 167–93, abr. 2002.
- DOUGLAS, L. J. Medical importance of biofilms in *Candida* infections. **Revista iberoamericana de micología**, v. 19, n. 3, p. 139–43, set. 2002.
- DRANGINIS, A. M. et al. A Biochemical Guide to Yeast Adhesins: Glycoproteins for Social and Antisocial Occasions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 71, n. 2, p. 282–294, 1 jun. 2007.
- EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 3, n. 11, p. 685–702, nov. 2003.
- ELLEN L LAGENDIJK, S. U. P. et al. Antimicrobial effects of Indonesian Medicinal Plants Extracts on Planktonic and Biofilm Growth of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Horticulture**, v. 02, n. 01, p. 1–14, 26 dez. 2015.
- EVENSEN, N. A.; BRAUN, P. C. The effects of tea polyphenols on *Candida albicans*: inhibition of biofilm formation and proteasome inactivation. **Canadian journal of microbiology**, v. 55, n. 9, p. 1033–9, set. 2009.
- FALAGAS, M. E.; ROUSSOS, N.; VARDAKAS, K. Z. Relative frequency of albicans and the various non-albicans *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 11, p. e954–e966, nov. 2010.
- FANNING, S.; MITCHELL, A. P. Fungal biofilms. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002585, 2012.
- FERNÁNDEZ-RUIZ, M. et al. *Candida tropicalis* bloodstream infection: Incidence, risk factors and outcome in a population-based surveillance. **Journal of Infection**, v. 71, n. 3, p. 385–394, set. 2015.
- FINKEL, J. S.; MITCHELL, A. P. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 109–118, fev. 2011.
- FLORES, Y; VILA, J.; ALMANZA, G.R. Secondary Metabolites From *Caesalpinia pluviosa*. **Revista Boliviana de Química**, v. 23, 2006.
- FOX, E. P.; NOBILE, C. J. A sticky situation. **Transcription**, v. 3, n. 6, p. 315–322, 18 nov. 2012.
- FU, J. et al. Epidemiology of *Candida albicans* and non-*C.albicans* of neonatal candidemia at a tertiary care hospital in western China. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 329, 6 dez. 2017.

- FUENTEFRIA, A. M. et al. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 2–13, jan. 2018.
- GALLÃO, M. I. et al. Morphological, chemical and rheological properties of the main seed polysaccharide from *Caesalpinia ferrea* Mart. **Industrial Crops and Products**, v. 47, p. 58–62, 1 maio 2013.
- GHANNOUM, M. Azole Resistance in Dermatophytes: Prevalence and Mechanism of Action. **Journal of the American Podiatric Medical Association**, p. 14–109.1, 5 out. 2015.
- GIRMENIA, C. et al. *Candida guilliermondii* Fungemia in Patients with Hematologic Malignancies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 7, p. 2458–2464, 1 jul. 2006.
- GLEE, P. M. et al. Inhibition of Hydrophobic Protein-Mediated *Candida albicans* Attachment to Endothelial Cells during Physiologic Shear Flow. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 5, p. 2815–2820, 1 maio 2001.
- GLEE, P. M.; SUNDSTROM, P.; HAZEN, K. C. Expression of surface hydrophobic proteins by *Candida albicans* in vivo. **Infection and immunity**, v. 63, n. 4, p. 1373–9, abr. 1995.
- GOW, N. A. R. et al. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 112–122, 12 fev. 2012.
- GROVER, N. Echinocandins: A ray of hope in antifungal drug therapy. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 42, n. 1, p. 9, fev. 2010.
- GULATI, M.; NOBILE, C. J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 5, p. 310–321, maio 2016.
- HAJJEH, R. A. et al. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1519–27, abr. 2004.
- HASSAN, S. K. et al. Hypoglycemic and antioxidant activities of *Caesalpinia ferrea* Martius leaf extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 6, p. 462–471, 1 jun. 2015.
- HAWKINS, J. L.; BADDOUR, L. M. *Candida lusitanae* Infections in the Era of Fluconazole Availability. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 2, p. e14–e18, 15 jan. 2003.
- HAWSER, S. P.; BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Production of extracellular matrix by *Candida albicans* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 253–256, 1 mar. 1998.

- HAWSER, S. P.; DOUGLAS, L. J. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents in vitro. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 9, p. 2128–31, set. 1995.
- HAZEN, B. W.; HAZEN, K. C. Dynamic expression of cell surface hydrophobicity during initial yeast cell growth and before germ tube formation of *Candida albicans*. **Infection and immunity**, v. 56, n. 9, p. 2521–5, set. 1988.
- HAZEN, K. C. Participation of yeast cell surface hydrophobicity in adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells. **Infection and immunity**, v. 57, n. 7, p. 1894–900, jul. 1989.
- HAZEN, K. C.; GLEE, P. M. Cell surface hydrophobicity and medically important fungi. **Current topics in medical mycology**, v. 6, p. 1–31, 1995.
- HEBECKER, B. et al. Pathogenicity mechanisms and host response during oral *Candida albicans* infections. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 12, n. 7, p. 867–879, 7 jul. 2014.
- HÖFS, S.; MOGAVERO, S.; HUBE, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 149–169, 27 mar. 2016.
- HOPKINS, J. G.; FISHER, J. K. Fungistatic agents for treatment of dermatophytosis. **The Journal of investigative dermatology**, v. 7, n. 5, p. 239–53, out. 1946.
- HORN, D. L. et al. Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 2019 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance Registry. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 12, p. 1695–1703, 15 jun. 2009.
- HULL, C. M. et al. Two clinical isolates of *Candida glabrata* exhibiting reduced sensitivity to amphotericin B both harbor mutations in ERG2. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 12, p. 6417–21, dez. 2012.
- JABRA-RIZK, M. A. et al. Cell surface hydrophobicity-associated adherence of *Candida dubliniensis* to human buccal epithelial cells. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 18, n. 1, p. 17–22, mar. 2001.
- JABRA-RIZK, M. A. et al. *Candida albicans* Pathogenesis: Fitting within the Host-Microbe Damage Response Framework. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 10, p. 2724–2739, out. 2016.
- JAVANMARDI, J. et al. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. **Food Chemistry**, v. 83, n. 4, p. 547–550, 1 dez. 2003.
- JAYATILAKE, J. A. M. S. et al. Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and non-*albicans* *Candida* species in reconstituted human oral epithelium. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 35, n. 8, p. 484–491, set. 2006.

- JIANG, C. et al. Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 4, p. 778–785, 1 abr. 2013.
- JIANG, R.-W. et al. Structure and antiviral properties of macrocaesalmin, a novel cassane furanoditerpenoid lactone from the seeds of *Caesalpinia minax* Hance. **Tetrahedron Letters**, v. 43, n. 13, p. 2415–2418, 25 mar. 2002.
- JIANG, R. W. et al. New antiviral cassane furanoditerpenes from *Caesalpinia minax*. **Journal of natural products**, v. 64, n. 10, p. 1266–72, out. 2001.
- KANAFANI, Z. A.; PERFECT, J. R. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 1, p. 120–128, 1 jan. 2008.
- KATHIRAVAN, M. K. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 19, p. 5678–5698, 1 out. 2012.
- KAUFFMAN, C. A. et al. Prospective Multicenter Surveillance Study of Funguria in Hospitalized Patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 1, p. 14–18, 1 jan. 2000.
- KAYANO, A. C. A. et al. In vitro and in vivo assessment of the anti-malarial activity of *Caesalpinia pluviosa*. **Malaria Journal**, v. 10, n. 1, p. 112, 2 maio 2011.
- KAUR, H.; et al. Antifungal activity of Phyto-extracts of *Piper longum*, *Aloe vera* and *Withania somnifera* against human fungal opportunistic pathogen *Candida albicans*. **Journal of Undergraduate Research and Innovation**, 2015.
- KOJIC, E. M.; DAROUICHE, R. O. *Candida* infections of medical devices. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 2, p. 255–67, abr. 2004.
- KONTOYIANNIS, D. P. et al. Risk Factors for *Candida tropicalis* Fungemia in Patients with Cancer. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 10, p. 1676–1681, 15 nov. 2001.
- KOSSOFF, E. H.; BUESCHER, E. S.; KARLOWICZ, M. G. Candidemia in a neonatal intensive care unit: trends during fifteen years and clinical features of 111 cases. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 17, n. 6, p. 504–8, jun. 1998.
- KRCMERY, V.; BARNES, A. J. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **Journal of Hospital Infection**, v. 50, n. 4, p. 243–260, abr. 2002.
- KYRIAKIDIS, I. et al. Clinical hepatotoxicity associated with antifungal agents. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 16, n. 2, p. 1–17, 16 dez. 2016.
- LAFLEUR, M. D.; KUMAMOTO, C. A.; LEWIS, K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 11, p. 3839–46, nov. 2006.

- LAGUNES, L. et al. Association between source control and mortality in 258 patients with intra-abdominal candidiasis: a retrospective multi-centric analysis comparing intensive care versus surgical wards in Spain. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 36, n. 1, p. 95–104, 21 jan. 2017.
- LAI, C.-C. et al. Time to positivity of blood cultures of different *Candida* species causing fungaemia. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. Pt_5, p. 701–704, 1 maio 2012.
- LAMB, J. H. Combined therapy in histoplasmosis and coccidioidomycosis; methyltestosterone and meth-dia-mer-sulfonamides. **A.M.A. archives of dermatology and syphilology**, v. 70, n. 6, p. 695–712, dez. 1954.
- LAW, D. et al. High prevalence of antifungal resistance in *Candida* spp. from patients with AIDS. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 34, n. 5, p. 659–68, nov. 1994.
- LEWIS, G.; GIBBS, P. Reproductive biology of *Caesalpinia calycina* and *C. pluviosa* (Leguminosae) of the caatinga of north-eastern Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, v. 217, n. 1–2, p. 43–53, 1999.
- LEWIS, J. S.; GRAYBILL, J. R. Fungicidal versus Fungistatic: what's in a word? **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 9, n. 6, p. 927–935, abr. 2008.
- LEWIS, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 48–56, 4 jan. 2007.
- LEWIS, R. E. Supplement: Trends in invasive *Candida* infections and their treatment: focus on echinocandins. **Current Medical Research and Opinion**, v. 25, n. 7, p. 1729–1762, 9 jul. 2009.
- LI, W.-S. et al. The Impact of Biofilm Formation on the Persistence of Candidemia. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1196, 4 jun. 2018.
- LIM, M.-Y. et al. Antimicrobial activity of 5-hydroxy-1,4-naphthoquinone isolated from *Caesalpinia sappan* toward intestinal bacteria. **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 1254–1258, 1 jan. 2007.
- LIMA, S. M. A. et al. Anti-inflammatory and analgesic potential of *Caesalpinia ferrea*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 169–175, fev. 2012.
- LIU, A.-L. et al. *In vitro* Anti-Influenza Viral Activities of Constituents from *Caesalpinia sappan*. **Planta Medica**, v. 75, n. 04, p. 337–339, 15 mar. 2009.
- LIU, Y.; FILLER, S. G. *Candida albicans* Als3, a Multifunctional Adhesin and Invasin. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 2, p. 168–173, fev. 2011.
- LOCKHART, S. R. et al. Geographic Distribution and Antifungal Susceptibility of the Newly Described Species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in Comparison to the Closely Related Species *Candida parapsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2659–2664, 1 ago. 2008.

- LOCKHART, S. R. et al. Identification of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a Large Global Collection of *Candida glabrata* Isolates: Comparison to the Literature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 1216–1217, 1 abr. 2009.
- LUO, G.; SAMARANAYAKE, L. P.; YAU, J. Y. Y. *Candida* Species Exhibit Differential In Vitro Hemolytic Activities. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 8, p. 2971–2974, 1 ago. 2001.
- MAERTENS, J. A. History of the development of azole derivatives. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 10 Suppl 1, p. 1–10, mar. 2004.
- MARTINS, M. D.; REX, J. H. Resistance to antifungal agents in the critical care setting: problems and perspectives. **New horizons (Baltimore, Md.)**, v. 4, n. 3, p. 338–44, ago. 1996.
- MASUOKA, J.; HAZEN, K. C. Cell wall protein mannosylation determines *Candida albicans* cell surface hydrophobicity. **Microbiology**, v. 143, n. 9, p. 3015–3021, 1 set. 1997.
- MAVOR, A. L.; THEWES, S.; HUBE, B. Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes. **Current drug targets**, v. 6, n. 8, p. 863–74, dez. 2005.
- MENDES GIANNINI, M. J. S. 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, 1 jan. 2013.
- MENEZES, I. A. C. et al. Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: Involvement of ATP-sensitive potassium channels. **Vascular Pharmacology**, v. 47, n. 1, p. 41–47, jul. 2007.
- 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.
- MILLSOP, J. W.; FAZEL, N. Oral candidiasis. **Clinics in Dermatology**, v. 34, n. 4, p. 487–494, jul. 2016.
- MINARI, A.; HACHEM, R.; RAAD, I. *Candida lusitanae*: A Cause of Breakthrough Fungemia in Cancer Patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 2, p. 186–190, 15 jan. 2001.
- MIRANDA, L. N. et al. *Candida* colonisation as a source for candidaemia. **Journal of Hospital Infection**, v. 72, n. 1, p. 9–16, maio 2009.
- MISHRA, R. et al. Uncommon cause of fungemia in a patient with renal cell cancer. **Medicine**, v. 96, n. 45, p. e8510, nov. 2017.

- MITCHELL, K. F. et al. Role of matrix β -1,3 glucan in antifungal resistance of non-*albicans Candida* biofilms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1918–20, abr. 2013.
- MONOD, M.; BORG-VON ZEPELIN, M. Secreted Proteinases and Other Virulence Mechanisms of *Candida albicans*. In: **Fungal Allergy and Pathogenicity**. Basel: KARGER, 2002. v. 81p. 114–128.
- MORAN, C. et al. Comparison of costs, length of stay, and mortality associated with *Candida glabrata* and *Candida albicans* bloodstream infections. **American Journal of Infection Control**, v. 38, n. 1, p. 78–80, fev. 2010.
- MOYES, D. L. et al. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. **Nature**, v. 532, n. 7597, p. 64–68, 30 mar. 2016.
- MUKHERJEE, P. K. et al. Reintroduction of the PLB1 gene into *Candida albicans* restores virulence in vivo. **Microbiology**, v. 147, n. 9, p. 2585–2597, 1 set. 2001.
- MUKHERJEE, P. K. et al. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. **Infection and immunity**, v. 71, n. 8, p. 4333–40, ago. 2003.
- MUÑOZ, P. et al. *Candida krusei* fungaemia: antifungal susceptibility and clinical presentation of an uncommon entity during 15 years in a single general hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 188–193, 1 fev. 2005.
- 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, 12 mar. 2012.
- NAGLIK, J. R. et al. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 12–13, p. 963–976, nov. 2011.
- NAGLIK, J. R. et al. *Candida albicans* –epithelial interactions and induction of mucosal innate immunity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 40, p. 104–112, dez. 2017.
- NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 67, n. 3, p. 400–28, table of contents, set. 2003.
- NAKAYAMA, H. et al. Depletion of the squalene synthase (ERG9) gene does not impair growth of *Candida glabrata* in mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 9, p. 2411–8, set. 2000.
- NAVARRO-MARTINEZ, M. D.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N. Tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits ergosterol synthesis by disturbing folic acid metabolism in *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 1083–1092, 4 abr. 2006.
- NAZZARO, F. et al. Essential Oils and Antifungal Activity. **Pharmaceuticals**, v. 10, n. 4, p. 86, 2 nov. 2017.

- NEGRI, M. et al. Early State Research on Antifungal Natural Products. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 2925–2956, 7 mar. 2014.
- NETT, J. et al. Putative Role of α -1,3 Glucans in *Candida albicans* Biofilm Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 510–520, 1 fev. 2007.
- NETT, J.; ANDES, D. *Candida albicans* biofilm development, modeling a host–pathogen interaction. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 340–345, ago. 2006.
- NETT, J. E. Future directions for anti-biofilm therapeutics targeting *Candida*. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 12, n. 3, p. 375–382, 9 mar. 2014.
- NIM, S. et al. Make azoles active again: chalcones as potent reversal agents of transporters-mediated resistance in *Candida albicans*. **Future Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 18, p. 2177–2186, 1 set. 2018.
- NOBBS, A. H.; VICKERMAN, M. M.; JENKINSON, H. F. Heterologous Expression of *Candida albicans* Cell Wall-Associated Adhesins in *Saccharomyces cerevisiae* Reveals Differential Specificities in Adherence and Biofilm Formation and in Binding Oral *Streptococcus gordonii*. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 10, p. 1622–1634, out. 2010.
- NOBILE, C. J.; JOHNSON, A. D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Annual review of microbiology**, v. 69, p. 71–92, 2015.
- NOËL, T. The cellular and molecular defense mechanisms of the *Candida* yeasts against azole antifungal drugs. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 22, n. 2, p. 173–178, jun. 2012.
- NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, n. 1, p. 77–82, maio 2007.
- O'TOOLE, G. A. To build a biofilm. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 9, p. 2687–9, maio 2003.
- ODDS, F. C. Antifungal agents: their diversity and increasing sophistication. **Mycologist**, v. 17, n. 2, p. 51–55, 1 maio 2003.
- ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272–9, jun. 2003.
- OROZCO, A. S. et al. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 10, p. 2645–9, out. 1998.
- ORTEGA, M. et al. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. **Journal of Hospital Infection**, v. 77, n. 2, p. 157–161, fev. 2011.

- PANAGODA, G. J.; ELLEPOLA, A. N.; SAMARANAYAKE, L. P. Adhesion of *Candida parapsilosis* to epithelial and acrylic surfaces correlates with cell surface hydrophobicity. **Mycoses**, v. 44, n. 1–2, p. 29–35, 2001.
- PAPPAS, P. G. et al. Guidelines for Treatment of Candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 2, p. 161–189, 15 jan. 2004.
- PAULA, S. B. DE et al. Oral *Candida* colonization in HIV-infected patients in Londrina-PR, Brazil: antifungal susceptibility and virulence factors. **Journal of infection in developing countries**, v. 9, n. 12, p. 1350–9, 30 dez. 2015.
- PAYNE, D. J. et al. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 1, p. 29–40, 8 jan. 2007.
- PEREIRA, C. A. M. et al. **Candida albicans and virulence factors that increases its pathogenicity**. The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs, 2015.
- PERUMAL, P.; MEKALA, S.; CHAFFIN, W. L. Role for Cell Density in Antifungal Drug Resistance in *Candida albicans* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 7, p. 2454–2463, 1 jul. 2007.
- PETERS, B. M. et al. Polymicrobial Interactions: Impact on Pathogenesis and Human Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p. 193–213, 1 jan. 2012.
- PFALLER, M. et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004–2008. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 74, n. 4, p. 323–331, dez. 2012.
- PFALLER, M. A. et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* and other yeast species to fluconazole and voriconazole by standardized disk diffusion testing. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 12, p. 5848–59, dez. 2005.
- PFALLER, M. A. et al. *Candida* bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 1, p. 65–69, jul. 2011.
- PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133–163, 1 jan. 2007.
- PHAN, Q. T. et al. Als3 Is a *Candida albicans* Invasin That Binds to Cadherins and Induces Endocytosis by Host Cells. **PLoS Biology**, v. 5, n. 3, p. e64, 20 fev. 2007.
- PIERCE, C. G. et al. From Biology to Drug Development: New Approaches to Combat the Threat of Fungal Biofilms. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 3, 25 jun. 2015.

- PONTES, C. A. et al. Influência da temperatura de armazenamento na qualidade das sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (sibipiruna). **Revista Árvore**, v. 30, n. 1, p. 43–48, fev. 2006.
- PRASAD, R.; SHAH, A. H.; RAWAL, M. K. Antifungals: Mechanism of Action and Drug Resistance. In: **Advances in experimental medicine and biology**. [s.l: s.n.]. v. 892p. 327–349.
- PU, S. et al. Epidemiology, antifungal susceptibilities, and risk factors for invasive candidiasis from 2011 to 2013 in a teaching hospital in southwest China. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 50, n. 1, p. 97–103, fev. 2017.
- QI, X. et al. Rhizosphere and non-rhizosphere bacterial community composition of the wild medicinal plant *Rumex patientia*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 2257–2265, 9 maio 2012.
- RAMAGE, G. et al. *Candida* Biofilms: an Update: FIG. 1. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 4, p. 633–638, abr. 2005.
- RAMAGE, G. et al. Fungal biofilm resistance. **International journal of microbiology**, v. 2012, p. 528521, 2012.
- RAO, Y. K.; FANG, S.-H.; TZENG, Y.-M. Anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Caesalpinia pulcherrima*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 3, p. 249–253, 14 set. 2005.
- RAPALA-KOZIK, M. et al. Extracellular proteinases of *Candida* species pathogenic yeasts. **Molecular Oral Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 113–124, abr. 2018.
- REDDING, S. W. et al. *Candida glabrata* oropharyngeal candidiasis in patients receiving radiation treatment for head and neck cancer. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 5, p. 1879–81, maio 2002.
- RODRIGO, G.C.; et al. Antiproliferative activity of extracts of some Bolivian medicinal plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, p. 2204–2210, 2010.
- 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, 19 maio 2014.
- RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. et al. Statistical analyses of correlation between fluconazole MICs for *Candida* spp. assessed by standard methods set forth by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (E.Dis. 7.1) and CLSI (M27-A2). **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 1, p. 109–111, 1 jan. 2007.
- S. AGOSTINI-COSTA, T. DA et al. Secondary Metabolites. In: **Chromatography and Its Applications**. [s.l.] InTech, 2012.
- SALCI, T. P. et al. Utilization of fluconazole in an intensive care unit at a university hospital in Brazil. **International Journal of Clinical Pharmacy**, v. 35, n. 2, p. 176–180, 28 abr. 2013.

- SALCI, T. P. et al. Targeting *Candida* spp. to develop antifungal agents. **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 4, p. 802–814, abr. 2018.
- SAMARANAYAKE, Y. H. et al. Relationship between the cell surface hydrophobicity and adherence of *Candida krusei* and *Candida albicans* to epithelial and denture acrylic surfaces. **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 103, n. 10, p. 707–13, out. 1995.
- SAMPAIO, F. C. et al. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea Martius* fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 2, p. 289–294, 15 jul. 2009.
- SANGALLI-LEITE, F. et al. Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 5, p. 457–467, maio 2011.
- SANGLARD, D. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. **Frontiers in medicine**, v. 3, p. 11, 2016.
- SARAVOLATZ, L. D.; DERESINSKI, S. C.; STEVENS, D. A. Caspofungin. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 11, p. 1445–1457, 1 jun. 2003.
- SARDI, J. C. O.; ALMEIDA, A. M. F.; MENDES GIANNINI, M. J. S. New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites—A brief review. **Archives of Oral Biology**, v. 56, n. 10, p. 951–959, out. 2011.
- 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, set. 2011.
- SCHALLER, M. et al. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 48, n. 6, p. 365–377, nov. 2005.
- SCOCOZZA, L. et al. High level of fluconazol resistance in *Candida* spp. isolated from vaginal specimens in adults women in a University Hospital in Buenos Aires, Argentina. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 73, p. 276, 1 ago. 2018.
- SENEVIRATNE, C.; JIN, L.; SAMARANAYAKE, L. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral Diseases**, v. 14, n. 7, p. 582–590, 30 set. 2008.
- SERNEELS, J.; TOURNU, H.; VAN DIJCK, P. Tight Control of Trehalose Content Is Required for Efficient Heat-induced Cell Elongation in *Candida albicans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 44, p. 36873–36882, 26 out. 2012.
- SEWELL, R. D. E.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. The history and ups and downs of herbal medicines usage. 2014.
- SHAHZAD, M. et al. Utilising polyphenols for the clinical management of *Candida albicans* biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 3, p. 269–273, set. 2014.

- SILVA-DIAS, A. et al. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 205, 12 mar. 2015.
- SILVA, S. et al. In Vitro Biofilm Activity of Non-*Candida albicans* *Candida* Species. **Current Microbiology**, v. 61, n. 6, p. 534–540, 17 dez. 2010.
- SINGH, B. N. et al. Quercetin Sensitizes Fluconazole-Resistant *Candida albicans* To Induce Apoptotic Cell Death by Modulating Quorum Sensing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 2153–2168, abr. 2015.
- SOKOL-ANDERSON, M. et al. Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing effect of amphotericin B. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 32, n. 5, p. 702–5, maio 1988.
- 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, 2 set. 2016.
- SRILAKSHMI, V. S. et al. Hepatoprotective properties of *Caesalpinia sappan* Linn. heartwood on carbon tetrachloride induced toxicity. **Indian journal of experimental biology**, v. 48, n. 9, p. 905–10, set. 2010.
- STASI, L. C. DI.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. [s.l.] Editora UNESP, 2002.
- SWEET, S. P. Selection and pathogenicity of *Candida albicans* in HIV infection. **Oral diseases**, v. 3 Suppl 1, p. S88-95, maio 1997.
- SWINNEY, D. C.; ANTHONY, J. How were new medicines discovered? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 7, p. 507–519, 24 jul. 2011.
- TAFF, H. T. et al. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. **Future Microbiology**, v. 8, n. 10, p. 1325–1337, out. 2013.
- TAMURA, T. et al. *In vitro* susceptibility of dermatomycoses agents to six antifungal drugs and evaluation by fractional inhibitory concentration index of combined effects of amorolfine and itraconazole in dermatophytes. **Microbiology and Immunology**, v. 58, n. 1, p. 1–8, jan. 2014.
- TAVANTI, A. et al. *Candida* orthopsilosis and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 1, p. 284–92, jan. 2005.
- TEODORO, G. R. et al. Potential Use of Phenolic Acids as Anti-*Candida* Agents: A Review. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1420, 2015.
- TORTORANO, A. et al. *Candidaemia* in Europe: epidemiology and resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 5, p. 359–366, maio 2006.

TREVIÑO-RANGEL, R. DE J. et al. First report of *Candida bracarensis* in Mexico: hydrolytic enzymes and antifungal susceptibility pattern. **Folia Microbiologica**, v. 63, n. 4, p. 517–523, 27 jul. 2018.

TROPICOS. **Poincianella pluviosa (DC.) L.P. Queiroz**. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/100383047>>. Acesso em: 10 setembro 2018.

TSANG, C. S. P. et al. Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 10, p. 1393–1398, 1 out. 2007.

TSUI, C.; KONG, E. F.; JABRA-RIZK, M. A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 4, p. ftw018, jun. 2016.

TUDELA, J. L. R.; DENNING, D. W. Recovery from serious fungal infections should be realisable for everyone. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 17, n. 11, p. 1111–1113, 1 nov. 2017.

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, 1 jun. 2007.

UPPULURI, P. et al. Dispersion as an Important Step in the *Candida albicans* Biofilm Developmental Cycle. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 3, p. e1000828, 26 mar. 2010.

UPPULURI, P.; PIERCE, C. G.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. *Candida albicans* biofilm formation and its clinical consequences. **Future microbiology**, v. 4, n. 10, p. 1235–7, dez. 2009.

VANDEN BOSSCHE, H. et al. Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance. **Journal of medical and veterinary mycology : bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 32 Suppl 1, p. 189–202, 1994.

VERMES, A.; GUCHELAAR, H. J.; DANKERT, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 171–9, ago. 2000.

VIUDES, A. et al. Two Cases of Fungemia due to *Candida lusitanae* and a Literature Review. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 21, n. 4, p. 294–299, 19 abr. 2002.

WANG, J. L. et al. Systematic Review and Meta-Analysis of the Tolerability and Hepatotoxicity of Antifungals in Empirical and Definitive Therapy for Invasive Fungal Infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2409–2419, 1 jun. 2010.

WHITEWAY, M.; BACHEWICH, C. Morphogenesis in *Candida albicans*. **Annual Review of Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 529–553, out. 2007.

WILLIAMS, D. W. et al. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. **Periodontology 2000**, v. 55, n. 1, p. 250–265, fev. 2011.

WONG, S. S. W.; SAMARANAYAKE, L. P.; SENEVIRATNE, C. J. In pursuit of the ideal antifungal agent for *Candida* infections: high-throughput screening of small molecules. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 11, p. 1721–1730, nov. 2014.

WU, T.; SAMARANAYAKE, L. P. The Expression of Secreted Aspartyl Proteinases of *Candida* Species in Human Whole Saliva. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, n. 8, p. 711–720, 1 ago. 1999.

XIAO, M. et al. Five-Year National Surveillance of Invasive Candidiasis: Species Distribution and Azole Susceptibility from the China Hospital Invasive Fungal Surveillance Net (CHIF-NET) Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 7, 9 maio 2018.

YANG, Y.-L. Virulence factors of *Candida* species. **Journal of microbiology, immunology and infection**, v. 36, n. 4, p. 223–8, dez. 2003.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 10, p. 95–105, 2014.

YODSAOUE, O. et al. Potential anti-inflammatory diterpenoids from the roots of *Caesalpinia mimosoides* Lamk. **Phytochemistry**, v. 71, n. 14–15, p. 1756–1764, out. 2010.

ZANIN, J. L. B. et al. The Genus *Caesalpinia* L. (Caesalpinaceae): Phytochemical and Pharmacological Characteristics. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 7887–7902, 29 jun. 2012.

ZANIN, J. L. B. et al. Caesalpinioflavone, a New Cytotoxic Biflavonoid Isolated from *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 4, p. 804–809, 2015.

ZARNOWSKI, R. et al. Novel Entries in a Fungal Biofilm Matrix Encyclopedia. **mBio**, v. 5, n. 4, p. e01333-14, 5 ago. 2014.

ZHAO, Y.P.; et al. Effects of postharvest processing and geographical source on phytochemical variation of *Corydalis rhizoma*. **Chinese Herbal Medicines**, v. 5, p. 151-157, 2013.

ZOROFCHIAN MOGHADAMTOUSI, S. et al. A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–12, 2014.