



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MARIANA MASSAKO SHIBAYAMA FERRANTE FERNANDES

**ATIVIDADE DO FLAVONÓIDE BAICALEÍNA E  
FLUCONAZOL SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS,  
CÉLULAS PRÉ-ADERIDAS E BIOFILME DE ISOLADOS DE  
*CANDIDA PARAPSILOSIS* STRICTO SENSU**

---

Londrina  
2017

MARIANA MASSAKO SHIBAYAMA FERRANTE FERNANDES

**ATIVIDADE DO FLAVONÓIDE BAICALEÍNA E  
FLUCONAZOL SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS,  
CÉLULAS PRÉ-ADERIDAS E BIOFILME DE ISOLADOS DE  
*CANDIDA PARAPSILOSIS* STRICTO SENSU**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito final a obtenção do título de mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Cristina Furlaneto.

Londrina  
2017

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

Fernandes, Mariana Massako Shibayama Ferrante .

Atividade do flavonóide baicaleína e fluconazol sobre células planctônicas, células pré-aderidas e de biofilme de isolados de *Candida parapsilosis* stricto sensu / Mariana Massako Shibayama Ferrante Fernandes. - Londrina, 2017.  
61 f. : il.

Orientador: Marcia Cristina Furlaneto.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, , 2017.

Inclui bibliografia.

1. Candida - Tese. 2. Agente antifúngico - Tese. 3. Flavonóide - Tese. I. Furlaneto, Marcia Cristina. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. . III. Título.

MARIANA MASSAKO SHIBAYAMA FERRANTE FERNANDES

**ATIVIDADE DO FLAVONÓIDE BAICALEÍNA E  
FLUCONAZOL SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS,  
CÉLULAS PRÉ-ADERIDAS E BIOFILME DE ISOLADOS DE  
*CANDIDA PARAPSILOSIS* STRICTO SENSU**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito final a obtenção do título de mestre em Microbiologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Cristina Furlaneto.  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Dr<sup>a</sup> Alane Tatiana Pereira Moralez  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –  
UTFPR

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciana Furlaneto-Maia  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –  
UTFPR

Londrina, 25 de abril de 2017.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Márcia Cristina Furlaneto, pela orientação desde a iniciação científica. Agradeço pela oportunidade de fazer parte de sua equipe de pesquisa, por ter acreditado e confiado em meu trabalho. Agradeço por toda dedicação, paciência e carinho que recebi ao longo desses anos. Agradeço por todo ensinamento que adquiri e que levarei comigo para a vida pessoal e profissional.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Luciana Furlaneto Maia e a Prof<sup>a</sup>. Dra. Ivete Conchon Costa, por toda colaboração no processo de planejamento deste trabalho e por todo incentivo que recebi para sua realização.

À Dra Alane Tatiana Pereira Moralez e ao Prof. Dr. Luciano Aparecido Panagio por todos as sugestões para melhorar este trabalho no processo de qualificação.

Ao Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Júnior por colaborar com seus conhecimentos com atenção e paciência, e por disponibilizar os equipamentos e recursos do Laboratório de Microscopia Eletrônica.

A todos professores da Pós Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina por partilharem seus conhecimentos com firmeza e carinho.

À Universidade Estadual de Londrina.

À CAPES, ao CNPq e à Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

Aos colegas de turma de mestrado por partilhar o peso da caminhada, tornando o trajeto mais leve para todos.

Aos amigos de laboratório com quem convivi durante minha passagem, agradeço pelo apoio. Em especial à Alane, ao Hugo, à Kátia e a Lennara pela amizade e pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Muito obrigada a todos.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.

George Bernard Shaw

FERNANDES, Mariana Massako Shibayama Ferrante. **Atividade do flavonóide baicaleína e fluconazol sobre células planctônicas, células pré-aderidas e biofilme de isolados de *Candida parapsilosis* stricto sensu.** 2017. 62 f. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR, 2017.

## RESUMO

*Candida parapsilosis* é um dos principais agentes etiológicos fúngicos relacionados a infecções noscomiais. Diante da capacidade desta espécie em formar biofilme e a ocorrência de resistência adquirida ao fluconazol, o interesse por novos antifúngicos tem sido observada. Os objetivos do presente estudo foram avaliar a atividade antifúngica do flavonóide baicaleína e do fluconazol de forma isolada e combinada, frente a células planctônicas de isolados sanguíneos de *C. parapsilosis* stricto sensu, analisar as possíveis alterações morfológicas ao nível ultraestrutural resultantes do efeito da baicaleína, do fluconazol e da combinação sinérgica entre eles e avaliar a atividade do fluconazol e da baicaleína em células pré-aderidas e biofilme. Os valores de CIM<sub>50</sub> de baicaleína foram de 8 µg mL<sup>-1</sup> para células planctônicas de isolados fluconazol-resistentes e de 4-8 µg mL<sup>-1</sup> para isolados suscetíveis ao fluconazol. O uso combinado do fluconazol com a baicaleína resultou em sinergismo para o isolado fluconazol-resistente 357 e para o isolado fluconazol-sensível 551 em termos de CIM<sub>50</sub>. Houve redução na concentração de CIM<sub>50</sub> para pelo menos um dos compostos testados para a maioria dos isolados avaliados. A análise ultraestrutural revelou que para o isolado em que ocorreu sinergismo entre fluconazol e baicaleína, a morfogênese foi afetada em todos os tratamentos, com presença de matriz extracelular. No tratamento combinado foi observada grande quantidade de matriz interligando as células. Para o isolado em que a ação combinada foi indiferente a morfogênese não foi afetada, sendo que no tratamento com baicaleína resultou em grande quantidade de matriz extracelular, além disso, no tratamento combinado foi observada alterações celulares indicativas de danos na membrana celular. Para células pré-aderidas os resultados obtidos demonstraram que a maioria dos isolados apresentaram menor suscetibilidade ao fluconazol, onde 25% dos isolados fluconazol-sensível, e 83% dos isolados fluconazol-resistentes apresentam valores de CIMA<sub>50</sub> >200 µg mL<sup>-1</sup>. Para biofilme os compostos não apresentaram ação inibitória para maioria dos isolados, ou seja, 75% e 86% dos isolados apresentaram concentrações de CIMB<sub>50</sub> de >800 µg mL<sup>-1</sup> para fluconazol e para baicaleína, respectivamente. Os dados obtidos demonstram o potencial da baicaleína como agente antifúngico em células planctônicas de isolados de *C. parapsilosis*, independentemente do perfil de suscetibilidade ao fluconazol. Este estudo mostrou que biofilmes em estágio inicial apresentam menor suscetibilidade aos compostos avaliados comparativamente a células planctônicas.

**Palavras-chave:** *Candida parapsilosis*; biofilme; atividade antifúngica; fluconazol; flavonóides; baicaleína.

FERNANDES, Mariana Massako Shibayama Ferrante. **Activity of THE flavonoid baicalein and fluconazole against planktonic cells, pre-adhered cells and biofilm of *Candida parapsilosis* stricto sensu isolates.** 2017. 62 p. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR, 2017.

## ABSTRACT

*Candida parapsilosis* is one of the main fungal agent responsible for nosocomial human infections. Considering the capability of this species to form biofilm and the occurrence of acquired resistance to fluconazole, the search for new antifungal therapies is in course. The aims of this study were to evaluate the antifungal activity of the flavonoid baicalein and fluconazole alone and combined against planktonic cells of blood isolates of *C. parapsilosis* stricto sensu, to analyse morphological alterations at ultrastructural level conferred by baicalein, fluconazole and the combined compounds and to evaluate the activity of fluconazole and baicalein against pre-adhered cells and biofilm. The CIM<sub>50</sub> value for baicalein was 8 µg mL<sup>-1</sup> against planktonic cells of fluconazole-resistant isolates and 4-8 µg mL<sup>-1</sup> against fluconazole-susceptible isolates. The combined fluconazole and baicalein resulted in synergism for the fluconazole-resistant isolate 357 e for the fluconazole-susceptible isolate 551 considering CIM<sub>50</sub>. There was reduction in the concentration of CIM<sub>50</sub> for at least one of the compounds for the majority of tested isolates. The ultrastructural analyses revealed that for the isolate where synergism between fluconazole and baicalein occurred the morphogenesis was affected with the presence of extracellular matrix, including matrix interconnecting cells following exposure to combined compounds. For the isolate where the combined action of compounds was indifferent the morphogenesis was not affected, with presence of large amounts of matrix following treatment with baicalein, besides, the exposure to both compounds resulted in cellular alterations indicative of cell membrane damage. Considering pre-adhered cells the majority of the isolates exhibited lower susceptibility to fluconazole where 25% of the fluconazole-susceptible isolates and 83% of fluconazole-resistant isolates showed CIMA<sub>50</sub> >200 µg mL<sup>-1</sup>. The compounds did not showed inhibitory effect against biofilm of the majority of the isolates tested, e.g., 75% and 86% of the isolates showed CIMB<sub>50</sub> de >800 µg mL<sup>-1</sup> for fluconazole and baicalein, respectively. The data show the potential of baicalein as antifungal agent against planktonic cells of *C. parapsilosis* isolates, independent of their susceptibility to fluconazole. This study showed that early biofilm stage exhibited lower susceptibility to both fluconazole and baicalein compared to planktonic cells.

**Key words:** *candida parapsilosis*; biofilm; antifungal activity; fluconazole; flavonoids; baicalein.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Microscopia eletrônica de varredura de isolados representativos de células planctônicas expostas ao fluconazol e à baicaleína isoladamente e em combinação, bem como o controle sem tratamento. Isolado 357 (a – d) , isolado 65 (e – h). As imagens (a) e (e) representam células sem tratamento, (b) e (f) células expostas ao fluconazol, (c) e (g) células expostas à baicaleína, (d) e (h) células expostas à baicaleína e ao fluconazol. As setas na imagem (h) indicam danos na membrana. Escala da barra: 5 µm. ....42
- Figura 2** - Atividade metabólica de células pré-aderidas de isolados de *C. parapsilosis* stricto sensu após 90 minutos de adesão em superfície de poliestireno.....44
- Figura 3** - Atividade metabólica de biofilme (72 h) de isolados de *C. parapsilosis* stricto sensu em superfície de poliestireno.....44
- Figura 4** - Níveis de adesão de células de *C. parapsilosis* stricto sensu por microscopia invertida. Imagem representativa de isolado classificado com (a) alta, (b) média e (c) baixa atividade metabólica após 90 minutos de adesão em superfície de poliestireno. ....45

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de células planctônicas para fluconazol e baialeína (isolados e em combinação) sobre isolados clínicos de *C. parapsilosis* e a cepa padrão 22019. ....40
- Tabela 2** – Classificação dos isolados de *C. parapsilosis* stricto sensu quanto a atividade metabólica de células pré-aderidas e de biofilme .....45
- Tabela 3** – Valores de Concentração Inibitória Mínima de células pré aderidas (CIMA) e de biofilme (CIMB) para fluconazol e baicaleína para isolados clínicos de *C. parapsilosis* e a cepa padrão 22019 .....47

## LISTA DE SIGLAS

AFST	EUCAST – Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
ATCC	American Type Culture Collection
BE	Baicaleína
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIMA	Concentração Inibitória Mínima na Adesão
CIMB	Concentração Inibitória Mínima no Biofilme
CLSI	The Clinical & Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimetilsulfóxido
FICI	Fractional Inhibitory Concentration Index
FLC	Fluconazol
HMDS	Hexamethyldisilazane
MOPS	(3-(N-morpholino)propanesulfonic acid)
PBS	Phosphate Buffer Saline
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
UFC	Unidade Formadora de Colônia
XTT	(2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2 <i>H</i> -Tetrazolium-5-Carboxanilide)
YPD	Yeast-extract-Peptone-Dextrose

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	13
2.1	OBJETIVO GERAL .....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
3.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DE <i>CANDIDA PARAPSILOSIS</i> .....	14
3.2	EPIDEMIOLOGIA DE CANDIDEMIA .....	16
3.3	BIOFILME DE <i>CANDIDA PARAPSILOSIS</i> .....	20
3.4	RESISTÊNCIA DE <i>CANDIDA PARAPSILOSIS</i> A ANTIFÚNGICOS .....	24
3.4.1	Baicaleína .....	26
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	29
4.2	PREPARO DO FLUCONAZOL E DA BAICALEÍNA .....	29
4.3	ANÁLISE DA ATIVIDADE DO FLUCONAZOL E DA BAICALEÍNA EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS .....	30
4.4	ANÁLISE DA ATIVIDADE DO FLUCONAZOL E DA BAICALEÍNA EM COMBINAÇÃO SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS .....	31
4.5	ANÁLISE DA ATIVIDADE DE FLUCONAZOL E BAICALEÍNA SOBRE CÉLULAS PRÉ-ADERIDAS E BIOFILME.....	32
4.5.1	Formação De Biofilme <i>In Vitro</i> .....	32
4.5.2	Análise Da Atividade Metabólica De Células Pré-Aderidas E Biofilme .....	33
4.5.3	Análise Da Atividade Do Fluconazol De Da Baicaleína Em Células Pré-Aderidas.....	34
4.5.4	Análise Da Atividade Do Fluconazol E Da Baicaleína Em Biofilme .....	35
4.6	ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS EM PRESENÇA DE FLUCONAZOL E BAICALEÍNA NAS CONCENTRAÇÕES DE CIM <sub>50</sub> .....	36
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	38

5.1	AÇÃO ANTIFÚNGICA DO FLUCONAZOL E DA BAICALEÍNA EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS .....	38
5.2	AÇÃO ANTIFÚNGICA COMBINADA DE BAICALEÍNA COM FLUCONAZOL EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS .....	40
5.3	ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS EM PRESENÇA DE FLUCONAZOL E BAICALEÍNA NAS CONCENTRAÇÕES DE CIM <sub>50</sub> .....	42
5.4	ATIVIDADE METABÓLICA DE CÉLULAS PRÉ-ADERIDAS E DE BIOFILME .....	44
5.5	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO FLUCONAZOL E DA BAICALEÍNA SOBRE CÉLULAS PRÉ-ADERIDAS .....	46
5.6	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO FLUCONAZOL E DA BAICALEÍNA EM BIOFILME.....	49
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>52</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>53</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Leveduras do gênero *Candida* são os agentes etiológicos fúngicos mais frequentes em infecções nosocomiais. Espécies de *Candida* são comensais e oportunistas, que podem se tornar patogênicas quando há alterações fisiológicas ou na capacidade imunológica do hospedeiro.

As infecções causadas por *Candida* spp abrangem um amplo espectro amplo de doenças superficiais à invasivas, destacando-se os casos de candidemia. Candidemias têm aumentado notadamente nas últimas décadas. Levantamentos epidemiológicos indicam que o padrão de ocorrência de infecções por espécies do gênero *Candida* vem se modificando, em contraponto a diminuição da frequência de *Candida albicans*, a ocorrência das espécies de não-*Candida albicans* vem aumentando. Neste contexto, *Candida parapsilosis* tem sido a segunda ou terceira espécie mais comumente associada à candidemias em diversas partes do mundo.

Dentre os grandes obstáculos apresentados pelas infecções causadas por *C. parapsilosis*, encontra-se o aumento da ocorrência de resistência desta espécie aos antifúngicos comumente utilizados, e a formação de biofilme que pode tornar esse microrganismo até mil vezes menos suscetível aos tratamentos quando comparados às células planctônicas.

A busca por novos compostos com atividade antifúngica vem sendo avaliada criteriosamente. O uso de compostos naturais, fonte do metabolismo secundário de plantas, têm sido alvo da atenção dos pesquisadores, devido sua bioatividade capaz de inibir o crescimento fúngico por mecanismos diferentes dos utilizados pelas drogas convencionais. Estudos *in vitro* sugerem a baicaleína, um

flavonóide de origem natural, como uma opção promissora.

Considerando que suscetibilidade a antifúngicos por células livres e biofilme tem características diferenciadas, estudos pormenorizados na busca de novos compostos são essenciais com vistas a um tratamento rápido e com efeitos colaterais mínimos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente trabalho compreendeu a avaliação da atividade do flavonóide baicaleína e do antifúngico fluconazol sobre células planctônicas, células pré-aderidas e biofilme de isolados sanguíneos de *Candida parapsilosis* stricto sensu.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar da atividade do fluconazol e da baicaleína em células planctônicas de isolados sanguíneos de *Candida parapsilosis* stricto sensu;
- Análisar da atividade do fluconazol e da baicaleína em combinação, em células planctônicas de *Candida parapsilosis* stricto sensu;
- Avaliar da atividade do fluconazol e da baicaleína sobre células pré-aderidas e biofilme de isolados sanguíneos de *Candida parapsilosis* stricto sensu;
- Análise ultraestrutural de células planctônicas em presença de fluconazol e baicaleína nas concentrações de CIM<sub>50</sub>.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DE *CANDIDA PARAPSILOSIS*

A espécie *C. parapsilosis* foi descrita pela primeira vez como *Monilia parapsilosis*, devido semelhanças encontradas com *Monilia psilosis*, atualmente *C. albicans*. Sendo então relatada como agente etiológico de um distúrbio gastrointestinal, que poderia estar relacionada a diarreia tropical em Porto Rico. A expressão inglesa *psilosis* era um termo técnico para diarreia tropical (ASHFORD, 1928).

*C. parapsilosis* stricto sensu é parte de um complexo de três espécies intimamente relacionadas, denominado complexo *C. parapsilosis*. Lin e colaboradores (1995) dividiram inicialmente os isolados de *C. parapsilosis* em grupos I, II e III, com base em padrões de perfil eletroforético de isoenzimas e sequências de DNA ribossomal (rDNA). Posteriormente Tavanti e colaboradores (2005) reclassificaram os grupos I, II, e III, como *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis*, respectivamente, por considerarem as características genéticas apresentadas serem o suficiente para lhes conferirem o status de espécie. A análise da sequência polimórfica dos genes *COX 3* (citocromo oxidase), *SADH* (secondary alcohol dehydrogenase) e *SYA 1* (putative alanyl tRNA synthetase) determinou três grupos distintos entre os isolados clínicos avaliados. Com o propósito de manter as espécies do complexo relacionadas, devido a altíssima similaridade entre elas, os autores usaram conceitos da química orgânica para nomenclatura de compostos. Escolheram os prefixos “orto”, “meta” e “para”, por indicarem as posições do carbono em um anel benzênico, e mantiveram a

denominação *psilosis* (TAVANTI *et al.*, 2005).

Espécies do complexo *C. parapsilosis*, também denominadas *C. parapsilosis* lato sensu, formam colônias brancas e cremosas, podendo apresentar morfologia variável, apresentando-se brilhante, lisa ou rugosa. Estas espécies não formam hifas verdadeiras, mas são capazes de diferenciação em pseudohifas (revisado por NOSEK *et al.*, 2009). A identificação das espécies do complexo *C. parapsilosis* é dependente do emprego de métodos moleculares, uma vez que os testes fenotípicos não são capazes de diferenciá-las (ABI-CHACRA *et al.*, 2013).

Dentre as três espécies, *C. parapsilosis* stricto sensu é responsável pela maioria das infecções. Esta espécie apresenta distribuição geográfica mais ampla, além de ser mais facilmente transmitida comparativamente as outras duas espécies do complexo *C. parapsilosis*. *C. orthopsilosis* é menos frequente embora seja capaz de colonizar e causar infecções em diferentes sítios anatômicos, já a incidência de *C. metapsilosis* é rara entre isolados clínicos (THIERRY *et al.*, 2011).

Estudos relacionados às espécies do complexo *C. parapsilosis* demonstram que apesar do alto grau de similaridades entre elas, estas espécies apresentam diferenças nos perfis de virulência, bem como nas taxas de frequências em estudos epidemiológicos (revisado por CANTÓN *et al.*, 2011).

Segundo Németh e colaboradores (2013), diferenças significativas foram encontradas entre as espécies do complexo *C. parapsilosis* quanto a produção de protease, lipase e na habilidade de formar pseudohifas, importantes fatores de virulência durante a patogênese.

Variações no potencial de virulência também têm sido observadas entre as espécies do complexo *C. parapsilosis*. Um estudo *in vitro* usando células

microgliais demonstrou que *C. metapsilosis* foi a menos virulenta comparativamente as outras duas espécies do complexo (ORSI *et al.*, 2010). Gácsér *et al.* (2007) também descreveram *C. metapsilosis* como menos patogênica empregando tecidos epiteliais reconstituídos. A caracterização de *C. metapsilosis* como menos patogênica foi confirmada empregando o modelo invertebrado de *Galleria mellonella* (GAGO *et al.*, 2014). Segundo estes autores, não foi observada diferença na virulência entre *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis* neste modelo.

De acordo com Cantón e colaboradores (2011) as diferenças na distribuição das espécies do complexo *C. parapsilosis* nos casos de candidemia confirmam a importância do complexo nas infecções sanguíneas. Enquanto *C. parapsilosis* stricto sensu foi a espécie mais comumente isolada em todas as unidades médicas estudadas, não houve casos de candidemia em pacientes pediátricos ou na UTI (Unidade de terapia intensiva) neonatal associados a *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis*, apesar de terem sido mais frequentes em UTIs.

### 3.2 EPIDEMIOLOGIA DE CANDIDEMIA

A distribuição epidemiológica das candidemias geralmente está relacionada a localização geográfica, e características do hospital, assim como fatores intrínsecos a condição de cada paciente (PFALLER *et al.*, 2011; revisado por GUINEA, 2014).

Infecções hematogênicas por *C. parapsilosis* stricto sensu vem se destacando por sua incidência principalmente em unidades de terapia intensiva (UTIs), sendo frequentemente associadas ao uso de dispositivos médicos, que são vitais para os cuidados com o paciente, porém ao romperem a barreira anatômica

atuam também como fator de risco para infecções (HOFFMAN-SANTOS *et al.*, 2013).

As candidemias são frequentemente relacionadas com altas taxas de mortalidade, de 50 a 85% em pacientes de UTI (DOI *et al.*, 2016; NUCCI *et al.*, 2013), com altos impactos para os sistemas de saúde em decorrência da dificuldade de identificação principalmente das espécies de não-*Candida albicans*, consequentemente tornando o tratamento dificultado dada a responsividade diferenciada de algumas espécies a determinados antifúngicos.

*C. albicans* é a espécie mais prevalente em candidemias. No entanto, nas últimas décadas sua incidência vem diminuindo, em contraponto a emergência dentre as espécies de *Candida* não-*albicans*. A mudança neste padrão de distribuição das espécies pode estar relacionada com o uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro (AQUINO *et al.*, 2005), o tratamento profilático com fluconazol (LEE *et al.*, 2016), o aumento do número de pacientes com doenças hematogênicas e outras doenças imunossupressoras, bem como o avanço das técnicas de identificação destas espécies que acabam por evidenciar a frequência das mesmas (DIEKEMA *et al.*, 2012; PFALLER, 2012).

Segundo registros do estudo de vigilância antifúngica global (ARTEMIS DISK), abrangendo 127 centros médicos de 39 países, foram identificadas cinco espécies como responsáveis por 92% dos casos de candidemia. *C. albicans* correspondeu a 62% dos casos, sendo 30% distribuídos entre *C. parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, e *Candida krusei* (revisado por GUINEA, 2014).

Segundo revisado por Yapar (2014) a incidência de *C. albicans* nos Estados Unidos na década de 90 era de 48,9%. Esta proporção diminuiu para 38%, no período de 2008-2011, ocorrendo um aumento gradual da proporção de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*. Países da América Latina demonstram também a espécie *C. albicans* como a mais frequente nas candidíases invasivas, porém nota-se que a *C. glabrata* não é tão comum como na América do Norte, onde o tratamento profilático com fluconazol não é usual como na América Latina.

O maior levantamento de dados realizados a respeito de infecções fúngicas oportunistas na América Latina, revisado por Nucci e colaboradores (2010), evidenciou que dentre as espécies não-*C. albicans*, os agentes etiológicos mais frequentes são *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, em contraste a maior incidência de *C. glabrata* nos Estados Unidos.

Estudo epidemiológico realizado no Brasil por Doi e colaboradores (2016) apontam espécies de *Candida* como sétima causa de infecções sanguíneas dentre todos patógenos avaliados, *C. parapsilosis* se destaca em primeiro lugar dentre as espécies não-*C. albicans*.

Dados epidemiológicos de candidemia no Brasil, ranqueiam *C. albicans* com 40,9% dos casos, seguido pela *C. tropicalis* (20,9%) e *C. parapsilosis* (20,4%), tendo *C. glabrata* em 4,9% dos casos (COLOMBO *et al.*, 2006). Segundo revisado por Yapar (2014), esse padrão de distribuição das espécies parece se manter na América do Sul.

Dentre as espécies do complexo *C. parapsilosis*, a espécie *C. parapsilosis* stricto sensu vem sendo descrita como a mais prevalente em

candidemias (LOCKHART *et al.*, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2010; BONFIETTI, *et al.* 2012; PINHATI *et al.*, 2016).

No Brasil em um estudo multicêntrico foi demonstrado que do total de 141 isolados sanguíneos do complexo *C. parapsilosis* reidentificados, 88% compreendeu *C. parapsilosis* stricto sensu, 9% *C. orthopsilosis* e 3% *C. metapsilosis* (GONÇALVES *et al.*, 2010).

Em Pernambuco, nordeste brasileiro, Hinrichsen e colaboradores (2009) identificaram 1.279 isolados, no período de 2003 a 2006, originários de dois hospitais terciários. Houve o predomínio da espécie *C. albicans*, seguida pelas espécies *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *Candida guilliermondii*. Dentre as infecções sanguíneas, a espécie *C. parapsilosis* foi a mais frequente em um dos hospitais avaliados, e segunda mais frequente no outro.

Em estudo realizado no Ceará, ainda na região nordeste, Medrano e colaboradores (2006) avaliaram 50 hemoculturas de um hospital terciário no período de 2000 a 2002. A espécie *C. parapsilosis* foi a mais frequente, e os fatores predisponentes apontados pelos autores foram: antibióticoterapia prévia, uso de cateter venoso central, nutrição parenteral, sonda gástrica ventilação mecânica e procedimento cirúrgico. Dentre os casos que cumpriram os pré-requisitos do estudo, a taxa de mortalidade chegou a 62%.

Em levantamento epidemiológico de candidemias realizado por Chang e colaboradores (2008) em hospital universitário de cuidados terciários na região centro-oeste brasileiro foi identificado como espécies prevalentes, respectivamente, *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Os autores evidenciaram também, que os extremos de idade, o uso de antibacterianos, e

equipamentos médicos que rompem a barreira anatômica; foram os principais fatores de risco para candidemias.

Aquino e colaboradores (2005) analisaram episódios de candidemia na região sul do Brasil, o padrão de distribuição das espécies se mantém, sendo *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* como mais prevalentes. Os autores ressaltaram a alta proporção de candidemias em pacientes internados em unidades médicas (40%), possivelmente pela escassez de leitos de UTIs em hospitais de cuidados terciários brasileiros, ocorrendo então o redirecionamento para outros setores (não-UTIs) apesar das condições instáveis que esses pacientes se encontravam.

Em estudo realizado no Hospital Universitário de Londrina, por Costa e colaboradores (2014), a espécie *C. tropicalis* (30,5%) prevaleceu como agente etiológico de candidemias, seguidas por *C. albicans* (28,7%) e *C. parapsilosis* stricto sensu (24,1%). Os autores relataram também um alto índice de isolados de *C. parapsilosis* stricto sensu resistentes ao fluconazol (27%), sendo que para as espécies *C. albicans* e *C. tropicalis* tiveram índices de resistência para o mesmo antifúngico de 3,7% e 3,2% respectivamente. Neste estudo realizado no HU de Londrina, 100% dos isolados do complexo *C. parapsilosis* compreendeu *C. parapsilosis* stricto sensu, baseado na avaliação de primer específico para espécie (COSTA *et al.*, 2014).

### 3.3 BIOFILME DE *CANDIDA PARAPSILOSIS*

Para que a infecção por espécies do gênero *Candida* se estabeleça é necessário primeiramente que ocorra a adesão para a colonização inicial no

hospedeiro. Além da capacidade de adesão em superfícies bióticas no hospedeiro, algumas espécies de *Candida* são capazes de formar biofilmes em superfícies abióticas, como equipamentos médicos, sendo um grande obstáculo no tratamento de candidemias (LATIFF *et al.*, 2009; revisado por SILVA *et al.*, 2011; BRILHANTE *et al.*, 2014). Desta forma, biofilmes são considerados um dos principais fatores de virulência em espécies patogênicas de *Candida*.

Biofilmes fúngicos são comunidades celulares fortemente associadas entre si e à um substrato. São estruturalmente formadas por células leveduriformes e pseudohifas envoltas em matriz extracelular polimérica que permite a circulação de nutrientes, a troca de metabólitos, e a sinalização intercelular (*quorum sensing*) (TREVIÑO-RANGEL, 2015). A organização estrutural do biofilme confere resistência intrínseca aos agentes antifúngicos e à defesa imunológica do hospedeiro. Dentre os mecanismos responsáveis pela resistência do biofilme aos antifúngicos estão a densidade celular, superexpressão do alvo da droga, resistência mediada pelas bombas de efluxo, e a presença da matriz extracelular (revisado por RAMAGE *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de biofilme por espécies de *Candida* consiste em diversas fases. A primeira fase compreende a adesão das células fúngicas ao substrato, seguido de uma fase de filamentação e proliferação das células que resultam em múltiplas camadas. Na próxima fase tem-se a maturação que compreende uma rede complexa de células incorporadas a matriz extracelular. Por fim, há a dispersão das células (SENEVIRATNE *et al.*, 2008; TOURNU *et al.*, 2012).

Segundo a literatura, a capacidade de *C. parapsilosis* em produzir biofilme é linhagem-dependente (SILVA *et al.*, 2009; PANNANUSORN *et al.*, 2013);

além disso, *C. parapsilosis* apresenta prevalência de formação de biofilmes em dispositivos médicos e cateteres intravenosos, comparativamente a outras espécies fúngicas (TROFA *et al.*, 2008).

Infecções por *C. parapsilosis* vem sendo associadas com sua capacidade de formar biofilme. Segundo Nosek e colaboradores (2009) a formação de biofilme por isolados de *C. parapsilosis* é favorecida pela presença de alta concentração de glicose e lipídeos, sendo associada a pacientes com infecções sanguíneas que recebem nutrição parenteral. Segundo revisão epidemiológica realizada por Dreesen e colaboradores (2012) dentre as infecções fúngicas relacionadas a pacientes que recebiam nutrição parenteral *C. parapsilosis* foi a mais prevalente, relacionado aos nutrientes que compõe essas fórmulas de nutrição parenteral e ao rompimento da barreira anatômica, pois são administradas via cateteres venosos centrais ou periféricos.

Biofilme de *C. parapsilosis* apresenta-se delgado e pouco estruturado, sendo constituído por agregados de blastoconídeos e pseudohifas e presença de matriz extracelular contendo quantidades elevadas de carboidratos (SILVA *et al.*, 2009).

A adesão das células pode ser mediada por interações não específicas como a hidrofobicidade e forças eletrostáticas entre as células; e também por interações específicas mediadas por adesinas (RAMAGE *et al.*, 2005; SENEVIRATNE *et al.*, 2008). Segundo Panagoda *et al.* (2001), a adesão de *C. parapsilosis* à células epiteliais e superfície acrílica está associada com interação hidrofóbica célula-superfície.

A resistência intrínseca a antifúngicos é uma das principais preocupações de importância clínica que o biofilme representa. Diversos mecanismos, além da organização estrutural do biofilme, estão relacionados com a resistência das espécies de *Candida* ao tratamento e ao sistema imunológico do hospedeiro. Dentre os mecanismos relacionados à resistência do biofilme ao antifúngicos estão a alta densidade celular, a presença de matriz extracelular, superexpressão do alvo da droga e a presença de células persistentes (revisado por RAMAGE *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2017)

A alta densidade celular presente no biofilme é um fator diferencial na resistência a antifúngicos. Perumal *et al.* (2007) demonstraram que células ressuspensas (em concentrações celulares  $10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>) de biofilme de isolados sensíveis ao fluconazol apresentaram a mesma suscetibilidade de células planctônicas, já quando a densidade celular foi avaliada com a concentração celular  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> as células ressuspensas do biofilme apresentaram o mesmo perfil de suscetibilidade do biofilme (PERUMAL *et al.*, 2007).

A presença de matriz extracelular confere proteção contra o sistema imune do hospedeiro e também a agentes antifúngicos. Al-Fattani e colaboradores (2004) descreveram que a matriz extracelular do biofilme atua dificultando a penetração e difusão dos antifúngicos. Estudos recentes tem demonstrado a importância da composição química da matriz na resistência a antifúngicos (TAFF *et al.*, 2012; MITCHELL *et al.*, 2013). O principal carboidrato presente na matriz extracelular o beta-1,3 glucano tem sido relacionado com o sequestro do fluconazol. Nett e colaboradores (2007) demonstraram que células de biofilme apresentam de 4 a 5 vezes mais azóis associados que as células planctônicas (NETT *et al.*, 2007).

Células persistentes são variantes latentes das células regulares do biofilme que apresentam alta tolerância a antifúngicos. Quando há a morte das células regulares em resposta ao tratamento, as células persistentes sobrevivem e tornam-se ativas e são capazes de formar biofilme com uma nova subpopulação a partir dessas células (LAFLEUR *et al.*, 2006; revisado por LEWIS, 2010). Al-Dhaheri e Douglas (2008) descreveram a presença desta subpopulação de células persistentes em biofilme de *C. parapsilosis*.

#### 3.4 RESISTÊNCIA DE *CANDIDA PARAPSILOSIS* A ANTIFÚNGICOS

A resistência microbiana a antifúngicos é considerada quando há menor suscetibilidade do patógeno a determinado antifúngico testado por método *in vitro*. Um dos métodos para a determinação da suscetibilidade compreende a microdiluição em caldo, regulamentado pelo EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, que determina as condições e as concentrações limítrofes para a definição de resistência microbiana para grande parte dos antifúngicos de uso clínico (EUCAST, 2008, 2017).

A classificação dos medicamentos utilizados no tratamento de infecções fúngicas se dá conforme seu sítio de ação sobre as células. Dentre as classes utilizadas estão os polienos, azóis, equinocandinas, e os nucleosídeos análogos (CLSI, 2002; revisado por ANDES, 2003).

Para o tratamento de candidemias o fluconazol está entre os antifúngicos mais utilizados (revisado por ANDES *et al.*, 2012). Os azóis impedem a demetilação do lanosterol pela inibição da enzima 1,4  $\alpha$ -demetilase, do citocromo P-450, interrompendo a via para biossíntese do ergosterol. O ergosterol é um componente

da estrutura da membrana fúngica, com função similar ao colesterol animal de manter a fluidez e a integridade da membrana. A interrupção da biossíntese leva ao esgotamento do ergosterol e o acúmulo de precursores tóxicos, o que resulta na formação de uma membrana com estrutura e funções alteradas. Sendo então classificados como fungistáticos para *Candida* spp. (revisado por GHANNOUM e RICE, 1999; revisado por RUIZ-CAMPS e CUENCA-ESTRELLA, 2009).

A atividade fungistática do fluconazol para *Candida* predispõe à população sobrevivente a evolução para resistência a esse antifúngico (revisado por COWEN, 2008). Alterações no gene responsável pela biossíntese do ergosterol são observadas em espécies resistentes ao fluconazol ocorrendo a superexpressão do alvo da droga ou alteração no alvo da droga (ROSSIGNOL *et al.*, 2009), bem como nos genes relacionados às bombas de efluxo (SILVA *et al.*, 2011), sendo que a superexpressão desse gene diminui a concentração da droga dificultando assim sua ação.

A ocorrência de resistência a antifúngicos tem se apresentado como um grande obstáculo no tratamento de candidemias. Alguns dos mecanismos apresentados por espécies de *Candida* envolvem alterações na via metabólica do ergosterol e a superexpressão do gene *ERG* (Ergosterol biosynthesis) 11 que está relacionado com a síntese da enzima 1,4  $\alpha$ -demetilase. Alterações no gene *ERG* 11 podem resultar em menor afinidade da 1,4  $\alpha$ -demetilase ao fluconazol, diminuindo consequentemente sua atividade. Outro mecanismo também observado é a indução das bombas de efluxo pela superexpressão dos genes *CDR* (*Candida* drug resistance) 1 e *MDR* (Multidrug resistance) 1, que diminui a concentração da droga dentro da célula fúngica diminuindo assim sua ação (revisado por PFALLER, 2012)

(SOUZA *et al.*, 2015).

Há também a ocorrência de resistência primária ou intrínseca, que é considerada quando toda a espécie é resistente a determinado antifúngico, que é observada no caso de *C. krusei* e *C. glabrata* (revisado por MAUBON *et al.*, 2014). Em levantamento epidemiológico realizado por nosso grupo todos os isolados de *C. krusei* e *C. glabrata* foram resistentes ao fluconazol (COSTA *et al.*, 2014).

Já os casos de resistência secundária ou adquirida, são considerados quando espécie anteriormente suscetível apresenta resistência após exposição a determinado antifúngico, como encontrado por Costa e colaboradores (2014) onde 26,9% dos isolados de *C. parapsilosis* foram resistentes ao fluconazol.

Diante deste preocupante cenário de resistência a antifúngicos a busca por novos compostos vem sendo avaliada criteriosamente. O flavonóide baicaleína é um composto natural que tem demonstrado atividade antifúngica promissora (CAO *et al.*, 2008; DAI *et al.*, 2009; SERPA *et al.*, 2012).

#### 3.4.1 Baicaleína

Baicaleína é um dos principais compostos existentes na raiz de *Scutellaria baicalensis*, uma planta utilizada há séculos na medicina tradicional chinesa (SHIMIZU, 2004). Trata-se de um flavonóide que vem sendo alvo de estudos por sua alta bioatividade, tais como, anticancerígeno (revisado por LIU *et al.*, 2016), antibacteriano (JANG, *et al.*, 2014), antiviral (JOHARI *et al.*, 2012) e antifúngico em espécies do gênero *Candida* (CAO *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2008; DAI *et al.*, 2009; KANG *et al.*, 2010, FU *et al.*, 2011; SERPA *et al.*, 2012; KVASNICKOVA *et al.*, 2015).

A atividade antifúngica da baicaleína foi relatada pela primeira vez no gênero *Candida* por Cao e colaboradores (2008) em biofilme formado por *C. albicans*. Os autores relataram inibições superiores a 70% quando comparado ao seu controle, e apontaram também a inibição da formação de hifas verdadeiras, demonstrando uma arquitetura pouco estruturada, com predominância de leveduras e pseudohifas.

A atividade da baicaleína sobre células planctônicas de *C. albicans* foi relatada por Huang e colaboradores (2008). Isolados fluconazol-resistente foram avaliados, apresentando resultados satisfatórios. Foi encontrada atividade sinérgica da baicaleína com fluconazol, sendo demonstrado pela diminuição dos valores de concentração inibitória mínima (CIM). Os autores descreveram também a ação fungistática do flavonóide baseado em curva de tempo de morte, e a redução da atividade das bombas de efluxo por substrato fluorescente da baicaleína isolada, e maior redução quando combinada com o fluconazol.

Dai e colaboradores (2009) relataram a indução de apoptose em *C. albicans*, pela exposição à baicaleína. Posteriormente Fu e colaboradores (2011) demonstraram que a atividade sinérgica da anfotericina B com a baicaleína acelera a indução de apoptose em células de *C. albicans*. Em contrapartida, Kang e colaboradores (2010) ao avaliar a ação da baicaleína em *C. krusei*, não detectaram a presença de mecanismos indicadores de apoptose, como a presença de espécies reativas de oxigênio e fragmentação de DNA, apesar do flavonóide ter apresentado melhor atividade antifúngica em *C. krusei* em comparação a espécie de *C. albicans*.

Serpa e colaboradores (2012) descreveram pela primeira vez a ação da baicaleína em células planctônicas de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. O perfil de

suscetibilidade variou entre as espécies avaliadas, sendo que os isolados de *C. tropicalis* foram menos suscetíveis comparados a espécies de *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Os autores também relataram atividade sinérgica do fluconazol com a baicaleína sobre *C. parapsilosis*, e reportaram também a diminuição da viabilidade celular das três espécies estudadas quando expostas à baicaleína.

Kvasnickova e colaboradores (2015) descreveram pela primeira vez a ação da baicaleína em células sésseis de *C. parapsilosis* e *C. krusei*. O flavonóide apresentou ação tanto em biofilme formado como na redução de sua adesão em superfície de poliestireno, relatando também que mesmo em concentrações baixas, o composto apresentou alguma atividade em biofilme formado por isolados de *C. parapsilosis* e *C. krusei*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Neste estudo foram avaliados 14 isolados sanguíneos (44, 65, 117, 122, 185, 230, 262, 275, 288, 357, 390, 450, 471 e 551) de *Candida parapsilosis* stricto sensu (COSTA *et al.*, 2014). A cepa padrão *C. parapsilosis* (ATCC 22019) foi incluída em todos os ensaios de suscetibilidade.

Os isolados estão armazenados a -20 °C em Sabouraud dextrose (extrato de levedura 0.25 %, peptona 1 %, dextrose 4 %) de glicerol 20 %, sendo estes integrantes da coleção de isolados de *Candida spp.* do Laboratório de Fisiologia e Biologia Molecular de Fungos da Universidade Estadual de Londrina.

### 4.2 PREPARO DA SOLUÇÃO E MEIO DE CULTURA COM FLUCONAZOL E BAICALEÍNA

Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do fluconazol (Sigma Aldrich) e da baicaleína (Sigma Aldrich) as soluções estoque foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO), esterilizadas por filtração. As concentrações dos respectivos compostos utilizados no presente estudo foram 200 vezes superiores em relação à série de diluição utilizada no ensaio (Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing - AFST - EUCAST, 2008). As soluções estoque foram mantidas a -80 °C até o preparo das placas para microdiluição.

Para a avaliação da atividade de baicaleína e fluconazol sobre células pré-aderidas e de biofilme, foram empregadas as concentrações de 4, 8, 16 e 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 4, 200, 400 e 800  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. A baicaleína e o

fluconazol foram acrescentados em RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 com L – glutamina, sem bicarbonato de sódio e sem adição de vermelho de fenol. A concentração original de 0,2 % de glicose foi alterada para 2 %. O meio foi tamponado com ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS) em concentração final de 0,165 mol/L (EUCAST, 2008). O pH do meio foi ajustado para 7,0 com NaOH 1 M e em seguida foi esterilizado por meio de filtração em membrana 0,2 µm e armazenados a 4 °C. A concentração final do diluente DMSO correspondeu a concentração < 1 % do total do volume testado.

#### 4.3 ANÁLISE DA ATIVIDADE ISOLADA DO FLUCONAZOL E DA BAICALEÍNA EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS

Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do fluconazol e da baicaleína foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo, proposta pelo AFST – EUCAST, 2008.

As diluições seriadas dos compostos foram distribuídas em microplacas de 96 poços e armazenadas a –80 °C. As concentrações utilizadas foram de 0,125 - 64 µg mL<sup>-1</sup> para o fluconazol e de 0,5 - 256 µg mL<sup>-1</sup> para baicaleína.

Os isolados foram cultivados a partir de soluções-estoque, em Sabouraud dextrose ágar por 24 h a 37 °C. A concentração celular de 2,5 x 10<sup>5</sup> UFC mL<sup>-1</sup> foi obtida em solução salina a 0,85 % (p / v), foi adicionada a alíquota de 200 µL por poço, as microplacas de 96 poços foram incubadas por 24 h a 37 °C, sem agitação.

Os ensaios foram realizados em triplicada e as médias da Concentração Inibitória mínima (CIM) foram calculadas, após a mensuração por espectrofotometria em densidade ótica de 450 nm. Para baicaleína foram considerados os valores de CIM<sub>50</sub>, ou seja, a menor concentração da droga capaz de inibir 50 % do crescimento fúngico quando comparado ao controle sem tratamento.

Interpretações dos pontos de corte para o fluconazol foram realizadas segundo recomendações do EUCAST. Resistência ao fluconazol foi considerada aos isolados de *C. parapsilosis* que apresentaram CIM<sub>50</sub> > 4 µg mL<sup>-1</sup> (RODRIGUEZ-TUDELA *et al.*, 2008).

#### 4.4 ANÁLISE DA ATIVIDADE COMBINADA DO FLUCONAZOL E DA BAICALEÍNA SOBRE CÉLULAS PLANCTÔNICAS

A avaliação da ação combinada do fluconazol com a baicaleína foi baseado no teste de checkerboard segundo o método de microdiluição em caldo, proposta pelo EUCAST (AFST - EUCAST, 2008).

O fluconazol e a baicaleína foram adicionados em RPMI 1640, conforme descrito no item 4.2. Os compostos foram preparados em concentração 4 vezes superior a concentração inicial e os ensaios foram realizados em placa de microtitulação. Um total de 50 µL de cada concentração de baicaleína foi adicionado da linha A até H e as concentrações de fluconazol foram adicionadas da coluna 2 até 11. Na coluna 1 referiu-se ao controle de esterilidade onde foram adicionados a cada poço 100 µL de água destilada e 100 µL do meio de cultivo. Na coluna 12 foi

realizado o controle de positivo, contendo apenas o meio de cultivo com o respectivo inóculo.

Após a adição de 100 µL do inóculo padronizado conforme descrito no item 4.3 ( $2,5 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>), as concentrações finais dos compostos foram de 16 µg mL<sup>-1</sup> – 0,031 µg mL<sup>-1</sup> para o fluconazol, e de 16 µg mL<sup>-1</sup> – 0,125 µg mL<sup>-1</sup> para baicaleína. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, e as leituras espectrofotométricas realizadas em 450nm. Os experimentos foram realizados em duplicata, com três repetições de testes independentes e as médias da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram calculadas. Foi considerado o CIM<sub>50</sub> como sendo a menor concentração da droga capaz de inibir em 50 % do crescimento fúngico detectável pela técnica de leitura de densidade ótica com relação ao controle positivo.

A interação dos compostos foi interpretada com base no índice FIC (Fractional Inhibitory Concentration Index), que foi calculado segundo a fórmula  $FICI = (Ac / Ai) + (Bc / Bi)$ , onde Ac e Bc correspondem aos CIMS das drogas A e B em combinação e Ai e Bi referem-se aos CIMS das drogas A e B testadas de forma isolada. A interação dos compostos foi definida como: sinergismo ( $FICI \leq 0,5$ ), indiferente ( $FICI > 0,5 \leq 4$ ) ou antagonista ( $FICI > 4$ ) (ODDS, 2003).

#### 4.5 ANÁLISE DA ATIVIDADE DE FLUCONAZOL E BAICALÉINA SOBRE CÉLULAS PRÉ-ADERIDAS E BIOFILME

##### 4.5.1 Formação de biofilme *in vitro*

A formação de biofilmes pelos isolados de *C. parapsilosis* stricto sensu foi realizada segundo Pierce e colaboradores (2008), com adaptações.

Para o preparo do crescimento fúngico, uma alíquota 100 µL de cada isolado a partir de solução-estoque, foi inoculada em 5 mL de meio YPD (*Yeast Peptone Dextrose* – extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%) caldo, seguido de incubação por 24 h, em 180 rpm a 37 °C. Após este período, as células foram sedimentadas por centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos e ressuspensas com 3 mL de RPMI 1640.

A contagem celular foi realizada em hemocítmetro e a suspensão padronizada em  $1 \times 10^7$  céls mL<sup>-1</sup> de RPMI. Para crescimento do biofilme foram cultivados 200 µL da suspensão padronizada em placa de microtitulação de poliestireno de 96 poços e fundo chato. As placas foram mantidas a 37°C, sem agitação.

A atividade do fluconazol e da baicaleína foram avaliadas em duas etapas do desenvolvimento do biofilme, em células pré-aderidas (90 minutos de adesão) e no biofilme com 48 horas de crescimento, as células pré-aderidas e o biofilme foram expostos aos respectivos tratamentos por 24 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata com três repetições independentes.

#### 4.5.2 Análise da atividade metabólica de células pré-aderidas e biofilme

As células foram obtidas como descrito anteriormente. Para células pré-aderidas, após 90 minutos de incubação os poços foram lavados por duas vezes com PBS 1x (Tampão fosfato salino) para remoção de células não aderidas. A atividade metabólica foi avaliada pelo ensaio semi-quantitativo e colorimétrico da

redução do XTT [2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2-H-tetrazolium-5-carboxanilide]. As reações são catalisadas por desidrogenases mitocondriais das células viáveis presentes (Pierce *et al.*, 2008). Para tanto, o meio de cultivo foi retirado e uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de XTT / menadiona 1 $\mu\text{M}$  foi adicionado a cada poço. A placa foi mantida ao abrigo da luz por 3 h a 37 °C. Após incubação 80  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de reação foi transferido para nova placa e lido por espectrofotometria em densidade ótica a 490 nm.

A atividade metabólica do biofilme foi avaliada após 72h, sob as mesmas condições descritas para as células pré-aderidas.

A categorização da atividade metabólica em alta, intermediária ou baixa para células pré-aderidas e para os biofilmes foram dados por quartis segundo Sherry e colaboradores (2014), onde, valores de absorvância acima do terceiro quartil foram considerados de alta atividade metabólica, entre o primeiro e o terceiro quartil foram os de atividade metabólica intermediária, e valores de absorvância menores que o primeiro quartil para baixa atividade metabólica.

#### 4.5.3 Análise da atividade do fluconazol e baicaleína em células pré-aderidas

As células foram obtidas como descrito no item 4.5.1. Após 90 minutos incubação, os poços passaram por duas lavagens com PBS para remoção das células não aderidas.

As células aderidas foram tratadas com 200  $\mu\text{L}$  das soluções da baicaleína e do fluconazol isoladamente, ambos nas concentrações 4, 8, 16 e 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , a placa foi reincubada por 24 h a 37 °C .

A atividade do fluconazol e da baicaleína em células pré-aderidas foi

determinada pelo ensaio colorimétrico e semiquantitativo da redução de XTT.

Após tratamento, as células pré-aderidas tratadas e não tratadas (controle) foram lavadas duas vezes com PBS para remoção de células não aderidas, e 100 µL de soluções de XTT foram adicionadas aos poços. A placa foi mantida ao abrigo da luz, por 3 h a 37 °C. Uma alíquota de 80 µL do sobrenadante da reação foi transferida para nova placa e lida por espectrofotometria em 490 nm.

#### 4.5.4 Análise da atividade do fluconazol e baicaleína em biofilme

Biofilmes foram obtidos como descrito no item 4.5.1. Após incubação por 24 h a 37 °C, 100 µL do meio de cultura de cada poço foram substituídos pelo mesmo volume do mesmo meio de cultura fresco, e reincubados sob mesmas condições por 24 h, totalizando 48 h de desenvolvimento.

As células não aderidas foram removidas com duas lavagens com PBS antes de serem tratados com 200 µL das soluções de baicaleína, e do fluconazol isoladamente nas concentrações 4, 200, 400 e 800 µg mL<sup>-1</sup> sendo então incubados durante 24 h a 37 °C.

A atividade biofilme foi determinada pelo ensaio semi-quantitativo colorimétrico de redução do XTT conforme descrito no item 4.2.3.

A concentração inibitória mínima do biofilme (CIMB), e a concentração inibitória na adesão (CIMA) foram consideradas como a redução em 50 % na absorbância quando comparados ao biofilme sem tratamento. A CIMB e o CIMA foram determinadas pelos valores de absorbância baseado na fórmula a seguir (RAJASEKHARAN, RAMESH e BAKKIYARAJ, 2014):

$$\text{Inibição do biofilme (\%)} = [(DO_{490\text{nm}} \text{ Controle} - DO_{490\text{nm}} \text{ Tratamento}) / DO_{490\text{nm}}]$$

Controle)] x100.

#### 4.6 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS EM PRESENÇA DE FLUCONAZOL E BAICALEÍNA NAS CONCENTRAÇÕES DE CIM<sub>50</sub>

A avaliação do efeito do fluconazol e da baicaleína na estrutura e no arranjo celular dos isolados de *C. parapsilosis* stricto sensu 65 e 357 foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

As células foram obtidas do cultivo de 24 h. A suspensão celular padronizada em  $2,5 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>, foram expostas aos compostos nas concentrações de CIM<sub>50</sub> para os compostos isolados e em combinação, bem como o controle sem tratamento foram incubados durante 24 h a 37 °C.

As células foram sedimentadas por centrifugação a 2000 rpm durante 5 minutos, sendo ressuspendidas em 50 µL da solução fixadora de glutaraldeído 2% (v / v) em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, sendo aderidas em lamínula revestida com Poli-L-lisina 0,1 % por 1 h em temperatura ambiente, após período de adesão foi adicionado 450 µL da solução fixadora e mantidas em temperatura ambiente durante 18 h. Após fixação as células foram lavadas com tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> e pós fixadas com tetróxido de ósmio 1 % (p / v) em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> por 1 h em temperatura ambiente ao abrigo da luz.

As células foram lavadas novamente com tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, e submetidas a uma série de lavagens em concentrações crescentes de etanol 30 %, 50 %, 70 %, 90 % e 100 %. Após desidratação alcoólica, as células passaram por secagem química com hexamethyldisilazane (HMDS) durante 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foram revestidas com ouro (SputterCoater SDC

050 – BALTEC) e observadas em microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 AÇÃO ANTIFÚNGICA DO FLUCONAZOL E DA BAICALEÍNA EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS

A ação inibitória do fluconazol e da baicaleína sobre os isolados sanguíneos de *C. parapsilosis* stricto sensu e a cepa padrão ATCC 22019 está apresentada na Tabela 1.

Dentre os isolados avaliados, um total de 8 isolados (44, 65, 122, 230, 288, 450, 471 e 551) foram suscetíveis ao fluconazol e 6 isolados (117, 185, 262, 275, 357, 390) foram resistentes ao fluconazol. Os isolados classificados como suscetíveis ao fluconazol apresentaram valores de concentração inibitória mínima (CIM<sub>50</sub>) de 0,5 a 2 µg mL<sup>-1</sup>. Já os isolados classificados como resistentes ao fluconazol apresentaram valores de CIM<sub>50</sub> de 8 a 16 µg mL<sup>-1</sup>. A cepa ATCC 22019 foi classificada como sensível, apresentando valor de MIC<sub>50</sub> dentro da faixa esperada com base na normativa EUCAST.

Estudos epidemiológicos têm revelado a ocorrência de *C. parapsilosis* resistente ao fluconazol, incluindo estudos recentes conduzidos em hospitais brasileiros (CANTÓN *et al.*, 2011; PEMÁN *et al.* 2012; COSTA *et al.*, 2014; PINHATI *et al.*, 2016). Estes dados demonstram uma problemática crescente no tratamento de candidemias associadas a *C. parapsilosis*. Desta forma, no presente estudo foi avaliada a ação do flavonóide baicaleína de forma isolada e combinada com o fluconazol sobre os isolados resistentes e suscetíveis a esta droga.

Os valores de CIM<sub>50</sub> também foram avaliados para baicaleína. Todos os isolados resistentes ao fluconazol apresentaram CIM<sub>50</sub> de 8 µg mL<sup>-1</sup> para a baicaleína. Já dentre os isolados sensíveis ao fluconazol, os valores de CIM<sub>50</sub> para

baicaleína variaram entre 4 - 8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo que a maioria (66,67 %) apresentou  $\text{CIM}_{50}$  de 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Os resultados demonstram atividade antifúngica da baicaleína contra isolados de *C. parapsilosis* stricto sensu testados, tanto os suscetíveis quanto os resistentes ao fluconazol. Serpa e colaboradores (2012) foram os primeiros a avaliar a ação inibitória da baicaleína sobre *C. parapsilosis* e descreveram valor de  $\text{CIM}_{50}$  de 13  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Segundo estes autores, a exposição de *C. parapsilosis* a baicaleína resultou em perda de viabilidade, indicando sua atividade candidacida determinada pela curva de crescimento (Serpa *et al.*, 2012). No presente estudo, o número de isolados avaliados foi ampliado e os dados revelaram suscetibilidade de células planctônicas de *C. parapsilosis* a este flavonóide.

O efeito inibitório de baicaleína também foi relatado para outras espécies de *Candida*. Huang e colaboradores (2008) relataram a atividade antifúngica da baicaleína, quando isolados de *C. albicans* foram expostos à baicaleína com associação de concentrações sub-inibitórias do fluconazol, além da ação fungistática do fluconazol ter aumentado consideravelmente com a adição da baicaleína (HUANG *et al.*, 2008).

Segundo Kang e colaboradores (2010) isolados de *C. krusei*, espécie intrinsecamente resistente ao fluconazol, apresentaram maior suscetibilidade à baicaleína, comparativamente a *C. albicans* fluconazol-suscetível. Os autores sugerem que a baicaleína apresenta mecanismo de ação diferenciado entre as espécies do gênero *Candida* (KANG *et al.*, 2010). O efeito inibitório de baicaleína contra *C. albicans* e *C. tropicalis* também foi observado por Serpa e colaboradores (2012), e observado em *C. glabrata* por Tsang e colaboradores

(2015).

## 5.2 AÇÃO ANTIFÚNGICA COMBINADA DE BAICALEÍNA COM FLUCONAZOL EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS

Neste estudo foi também avaliada a atividade antifúngica dos compostos combinados (fluconazol e baicaleína), como descrito no item 4.4.

Como pode ser observado na Tabela 1, quando testados de forma combinada a maioria dos isolados de *C. parapsilosis* stricto sensu apresentou redução do valor de CIM<sub>50</sub> de 2 a 16 vezes, para pelo menos um dos compostos testados. No entanto, a avaliação da interação destes compostos, segundo o índice FIC (ODDS, 2003), demonstrou que para a maioria dos isolados (86%), a interação do fluconazol com baicaleína na atividade antifúngica foi indiferente ( $FICI > 0,5 - \leq 4,0$ ). Já o sinergismo ocorreu em dois isolados clínicos (14%). Interação de antagonismo não foi observada para os isolados avaliados (Tabela 1).

A interação sinérgica de baicaleína com o fluconazol foi observada para o isolado 551 (fluconazol – sensível), sendo que houve redução do valor de CIM<sub>50</sub> para fluconazol de  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  para  $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; e para baicaleína houve redução do valor de  $8 \mu\text{g mL}^{-1}$  para  $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Dentre os isolados resistentes ao fluconazol ocorreu sinergismo para o isolado 357, sendo que houve redução do valor de CIM<sub>50</sub> para fluconazol de  $8 \mu\text{g mL}^{-1}$  (resistente) para  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  (sensível); e para baicaleína houve redução do valor de  $8 \mu\text{g mL}^{-1}$  para  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Estes dados sugerem que as interações são isolados-dependentes.

**Tabela 1.** Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de células planctônicas para fluconazol e baicaleína (isolados e em combinação) sobre isolados clínicos de *Candida parapsilosis* e a cepa padrão ATCC 22019.

Isolados <sup>a</sup>	CIM <sub>50</sub>				
	Compostos Isolados		Compostos combinados		
	FLC µg ml <sup>-1</sup>	BE µg ml <sup>-1</sup>	FLC µg ml <sup>-1</sup>	BE µg ml <sup>-1</sup>	FICI <sup>b</sup>
Isolados clínicos FLC-S					
44	1	4	0,5	2	1 <sup>d</sup>
65	0,5	4	0,5	2	1,25 <sup>d</sup>
122	2	8	2	8	2 <sup>d</sup>
230	0,5	4	0,5	2	1,5 <sup>d</sup>
288	1	8	2	4	2,5 <sup>d</sup>
450	1	4	1	0,5	1,125 <sup>d</sup>
471	0,5	4	0,5	2	1,5 <sup>d</sup>
551	0,5	8	0,25	0,25	0,53 <sup>c</sup>
Isolados clínicos FLC-R					
117	8	8	4	4	1 <sup>d</sup>
185	16	8	4	8	1,25 <sup>d</sup>
262	16	8	4	8	1,25 <sup>d</sup>
275	8	8	4	2	0,75 <sup>d</sup>
357	8	8	1	0,5	0,187 <sup>c</sup>
390	8	8	8	8	2 <sup>d</sup>
ATCC 22019	1	8	1	2	1,25 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> FLC-S - Isolados sensíveis ao fluconazol (CIM ≤ 2 µg ml<sup>-1</sup>); FLC-R - Isolados resistentes ao fluconazol (CIM > 4 µg ml<sup>-1</sup>). Os valores de resistência são baseados no CIM<sub>50</sub>.

<sup>b</sup>FICI-(Fractional Inhibitory Concentration Index) <sup>c</sup>Sinergismo (FICI ≤ 0,5), <sup>d</sup>Indiferente (FICI > 0,5 - ≤ 4,0).

FLC- fluconazol. BE- baicaleína. CIM- Concentração mínima inibitória.

Atividade sinérgica do flavonóide baicaleína e do antifúngico fluconazol foram observados também por Huang e colaboradores (2008) em *C. albicans*. Segundo estes autores, sinergismo empregando valores de CIM<sub>50</sub> de cada composto foi observado em 27 dos 30 isolados testados (Huang *et al.*, 2008). Em trabalho prévio realizado por nosso grupo, também foi verificada a ocorrência de sinergismo com os mesmos compostos, em isolados de espécies de *Candida* não-*C. albicans*, dentre estes um isolado clínico de *C. parapsilosis* (SERPA *et al.*, 2012).

Os valores baixos de CIMs para baicaleína demonstram o potencial deste flavonóide como agente antifúngico. Estudos complementares são

necessários para determinar o mecanismo de ação da baicaleína de forma isolada e combinada.

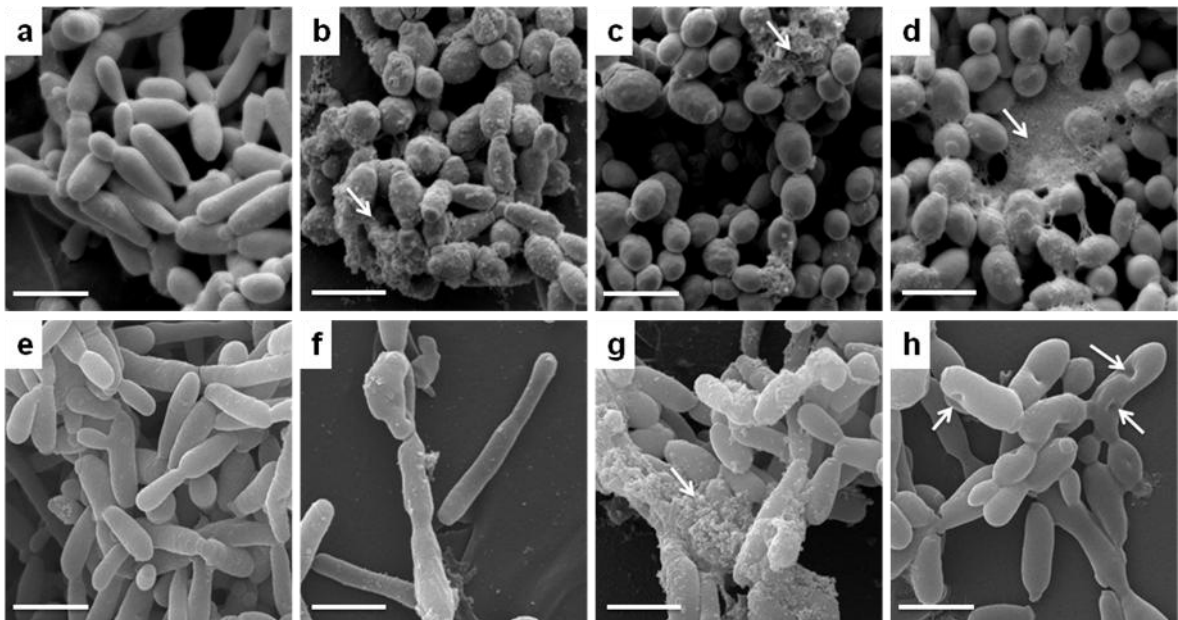
### 5.3 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS EM PRESENÇA DE FLUCONAZOL E BAICALEÍNA NAS CONCENTRAÇÕES DE CIM<sub>50</sub>

No presente estudo foi realizada a avaliação do efeito do fluconazol e baicaleína, separadamente e em combinação, em nível celular empregando microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Fig. 1).

A Figura 4 mostra que tanto o fluconazol quanto a baicaleína afetaram estruturalmente as células dos isolados avaliados. Células sem tratamento (controle) de ambos isolados compreenderam células em divisão, sendo a grande maioria diferenciada em pseudohifas (Fig. 1a,e). Para o isolado em que foi observado sinergismo (isolado 357) a morfogênese foi afetada em todos os tratamentos, o controle sem tratamento apresentou majoritariamente pseudohifas em todos os tratamentos não houve diferenciação das células (Fig. 1 b,c,d), com presença de matriz extracelular associada às células (Fig. 1 b,c). Cabe destacar que na presença de ambos compostos foi observada matriz em grande quantidade interligando células (Fig. 1d).

Já para o isolado em que a interação da ação combinada foi indiferente (isolado 65) não foi observada inibição de diferenciação em pseudohifas (morfogênese) (Fig. 1f,g,h), sendo que a exposição à baicaleína resultou em grande quantidade de matriz (Fig. 1g). Já na presença das drogas combinadas não foi observada a produção de material extracelular. No entanto apresentou alteração

morfológica indicativa de dano na parede celular (Fig. 1h). Serpa e colaboradores (2012) relataram a ocorrência de grande quantidade de material extracelular conectando células, quando expostas a fluconazol em combinação com baicaleína de forma similar ao observado para o isolado 357. Estes dados sugerem que as alterações estruturais promovidas pelo fluconazol e baicaleína em *C. parapsilosis* stricto sensu ocorram de forma isolado-dependente.



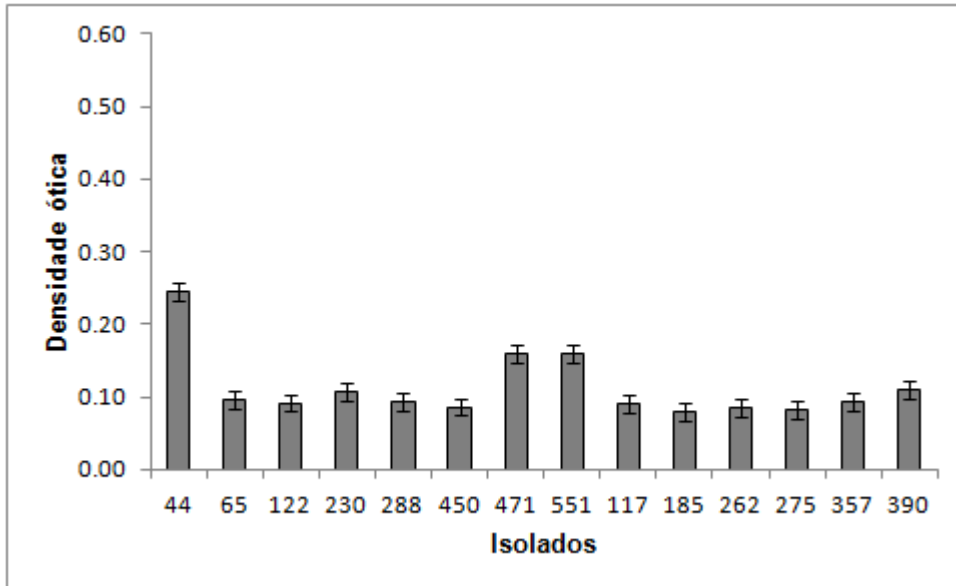
**Figura 1.** Microscopia eletrônica de varredura de isolados representativos de células planctônicas expostas ao fluconazol e à baicaleína isoladamente e em combinação, bem como o controle sem tratamento. Isolado 357 (a – d) , isolado 65 (e – h). As imagens (a) e (e) representam células sem tratamento (controle), (b) e (f) células expostas ao fluconazol, (c) e (g) células expostas à baicaleína, (d) e (h) células expostas à baicaleína e ao fluconazol. As setas na imagem (h) indicam danos na membrana, na imagem (b),(c), (d) e (g) as setas apontam a presença de matriz extracelular. Escala da barra: 5  $\mu$ m.

#### 5.4 ATIVIDADE METABÓLICA DE CÉLULAS PRÉ-ADERIDAS E DE BIOFILME

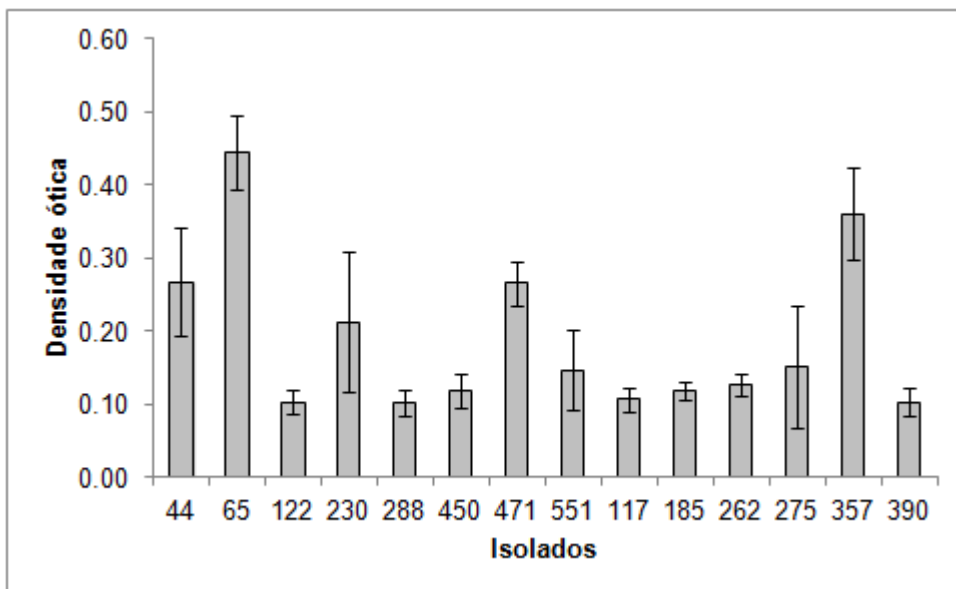
Previamente a análise de atividade antifúngica de fluconazol e baicaleína sobre células pré-aderidas e biofilme de *C. parapsilosis* stricto sensu foi avaliada a capacidade de adesão e formação de biofilme em superfície de poliestireno pelos isolados testados. A adesão e biofilme foram determinados com base na atividade metabólica de células pré-aderidas e de biofilme, respectivamente, empregando o ensaio semi - quantitativo colorimétrico da redução do XTT/menadiona (PIERCE *et al*, 2008).

A capacidade de adesão pelos isolados foi avaliada após 90 minutos de cultivo como descrito no item 4.5.2. A Figura 2 mostra os dados de densidade óptica relativa a atividade metabólica de células pré-aderidas. Já a Fig. 3 mostra os dados relativos a células de biofilmes, formados após 72 h. de cultivo. Os dados foram também avaliados com base em ranqueamento por quartis como descrito por SHERRY e colaboradores (2014) (Tabela 2). A maioria dos isolados apresentaram capacidade mediana de adesão e de formação de biofilme; respectivamente 21% dos isolados foram classificados com alta capacidade de adesão e aproximadamente 29% como altos formadores de biofilme (Tabela 2). Na Figura 4 pode-se observar os três níveis de adesão em superfície de poliestireno em microscopia invertida. Nossos dados diferem dos resultados relatados por Marcos-Zambrano e colaboradores (2014), onde, verificaram que a maioria dos biofilmes formados por *C. parapsilosis* testados apresentaram baixa atividade metabólica (aproximadamente 48%), sendo que 23%, e 30% foram classificados com intermediária e alta atividade metabólica, respectivamente. Até o momento não foram encontrados na literatura dados relacionados a atividade metabólica de

células pré-aderidas de *C. parapsilosis* stricto sensu em poliestireno.



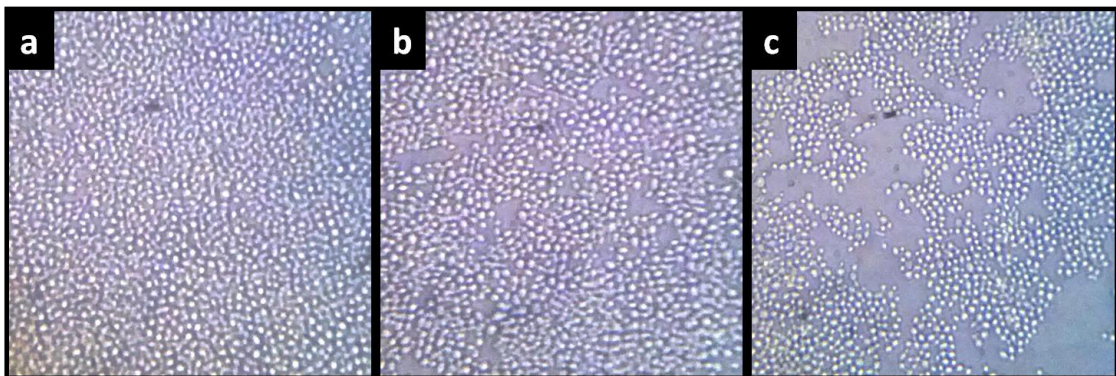
**Figura 2.** Atividade metabólica de células de isolados de *C. parapsilosis* stricto sensu após 90 minutos de adesão. (Média de três experimentos independentes)



**Figura 3.** Atividade metabólica de biofilme (72h) por isolados de *C. parapsilosis* stricto sensu (Média de três experimentos independentes)

**Tabela 2.** Classificação dos isolados de *C. parapsilosis* stricto sensu quanto a atividade metabólica de células pré-aderidas e de biofilme.

Pré-aderidas			Biofilme		
Nº de isolados	Células Viáveis	%	Nº de isolados	Células Viáveis	%
4	Baixa	29	4	Baixa	28.6
7	Intermediária	50	6	Intermediária	42.9
3	Alta	21	4	Alta	28.6



**Figura 4.** Níveis de adesão de células de *C. parapsilosis* stricto sensu por microscopia invertida. Imagem representativa de isolado classificado com (a) alta (isolado 44), (b) intermediária (isolado 230) e (c) baixa (isolado 85) atividade metabólica após 90 minutos de adesão em superfície de poliestireno.

#### 5.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO FLUCONAZOL E DA BAICALEÍNA SOBRE CÉLULAS PRÉ-ADERIDAS

Para determinar a atividade antifúngica do fluconazol e da baicaleína sobre células pré-aderidas de isolados sanguíneos de *C. parapsilosis* stricto sensu,

foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo conforme EUCAST-AFST (2008). As concentrações de baicaleína e fluconazol utilizadas foram 4, 8, 16 e 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A determinação de  $\text{CIMA}_{50}$  foi considerada como sendo a menor concentração capaz de inibir 50 % de células pré-aderidas comparado ao controle sem tratamento (Tabela 3).

A cepa padrão ATCC 22019 foi incluída nos ensaios. Para o antifúngico fluconazol, do total de isolados avaliados, a maioria (57%) apresentou  $\text{CIMA}_{50} > 200 \mu\text{g mL}^{-1}$ , os demais isolados apresentaram valores de  $\text{CIMA}_{50} > 16$  e  $< 4 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Os resultados demonstram diferenças na atividade antifúngica em células pré-aderidas, entre isolados sensíveis e resistentes ao fluconazol, onde, 25 % dos isolados sensíveis, e 83 % dos isolados resistentes apresentaram valor de  $\text{CIMA}_{50} > 200 \mu\text{g mL}^{-1}$  (maior concentração testada). Os resultados obtidos sugerem que células de *C. parapsilosis* com apenas 90 minutos de adesão em superfície de poliestireno já apresentam um perfil de menor suscetibilidade ao fluconazol quando comparado às células planctônicas.

Quanto ao  $\text{CIMA}_{50}$  para o flavonóide baicaleína, os resultados obtidos indicam que o composto tem ação em células pré-aderidas, porém a máxima concentração testada não foi capaz de inibir 50 % das células dos isolados avaliados.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a maioria dos isolados apresentaram perfil de menor suscetibilidade comparativamente ao observado para células planctônicas.

Cocuaud e colaboradores (2005) sugeriram que a atividade antifúngica da caspofungina sobre biofilme de *C. parapsilosis* é dependente do tempo

de formação do cultivo. Os autores relataram que valores de concentração inibitória mínima para células planctônicas foram capazes de inibir 50 % das células de biofilme formado por 2 h, e 25 % das células de biofilme formado por 48 h. Contudo, os estudos relacionados a suscetibilidade de células pré-aderidas aos antifúngicos ainda são escassos.

**Tabela 3.** Valores de Concentração Inibitória Mínima de células pré-aderidas (CIMA) e de biofilme (CIMB) para fluconazol e baicaleína para isolados clínicos de *Candida parapsilosis* e a cepa padrão 22019.

Isolados <sup>a</sup>	Pré-aderidas		Biofilme	
	FLC $\mu\text{g mL}^{-1}$ CIMA <sub>50</sub>	BE $\mu\text{g mL}^{-1}$ CIMA <sub>50</sub>	FLC $\mu\text{g mL}^{-1}$ CIMB <sub>50</sub>	BE $\mu\text{g mL}^{-1}$ CIMB <sub>50</sub>
Isolados clínicos FLC-S				
44	<4	>200	800	>800
65	<4	>200	>800	800
122	>16	>200	>800	>800
230	<4	>200	4	>800
288	200	>200	>800	>800
450	<4	>200	>800	>800
471	<4	>200	4	800
551	>200	>200	>800	>800
Isolados clínicos FLC-R				
117	>200	>200	>800	>800
185	>200	>200	>800	>800
262	>200	>200	>800	>800
275	>200	>200	>800	>800
357	$\geq 16$	>200	>800	>800
390	>200	>200	>800	>800
ATCC 22019	<4	>200	4	>800

<sup>a</sup> FLC-S - Isolados sensíveis ao fluconazol (CIM  $\leq 2$ ); FLC-R - Isolados resistentes ao fluconazol (CIM  $> 4$ ). Os valores de resistência são baseados no CIM<sub>50</sub>.

FLC – fluconazol, BE – baicaleína, CIMA – Concentração inibitória mínima da adesão, CIMB – Concentração inibitória mínima no biofilme

## 5.6 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO FLUCONAZOL E DA BAICALEÍNA EM BIOFILME

Para determinar a atividade antifúngica do fluconazol e da baicaleína em biofilme foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo conforme EUCAST-AFST (2008), com modificações. As concentrações de baicaleína e fluconazol utilizadas foram 4, 200, 400 e 800  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A determinação de CIMB<sub>50</sub> foi

considerada como sendo a menor concentração capaz de inibir 50 % da formação do biofilme comparado ao controle sem tratamento (Tabela 3).

Para o flavonóide baicaleína não foi observada ação inibitória em biofilme de *C. parapsilosis*, sendo que a maioria apresentou valores de  $CIMB_{50} > 800$ . Da mesma forma, os valores de  $CIM_{50}$  para fluconazol foram  $\geq 800 \mu\text{g mL}^{-1}$  para biofilme da maioria dos isolados avaliados (86%). Interessante destacar que dois isolados suscetíveis ao fluconazol (isolados 230 e 471) apresentaram  $CIMB_{50}$  de  $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ , caracterizando suscetibilidade ao fluconazol; estes mesmos isolados também apresentaram valores de  $CIMA_{50}$  de  $<4 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Kvasnickova e colaboradores (2015) relataram a atividade antifúngica da baicaleína sobre biofilmes de *C. parapsilosis* mesmo nas menores concentrações avaliadas ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os autores observaram que a baicaleína também teve ação na capacidade de adesão em superfície de poliestireno. Segundo os autores, mais que 30% de inibição ocorreu em concentrações de baicaleína menores que a do CIM ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) para *C. parapsilosis* (Kvasnickova *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos revelaram que a capacidade de adesão e de formação de biofilme, determinada pela atividade metabólica, não estão associadas a resposta dos isolados ao fluconazol e à baicaleína nas condições testadas, ou seja, mesmo isolados que apresentaram baixa capacidade de adesão e de formação de biofilme apresentaram altos valores de  $CIMA_{50}$  e  $CIMB_{50}$ . Embora para outras drogas altos valores de concentração inibitória mínima para isolados previamente classificados como fracamente formadores de biofilme também já tenham sido descritas por Marcos-Zambrano e colaboradores (2015) onde descreveram resposta

semelhante em isolados sanguíneos de *C. albicans* onde isolados classificados com baixa atividade metabólica, apresentaram valor de concentração inibitória do biofilme para anidulafungina e caspofungina, superior aos isolados classificados com média e alta atividade metabólica. Aqui apresentamos o primeiro relato de valores concentrações inibitória mínima para fluconazol e baicaleína em células pré-aderidas de isolados sanguíneos de *C. parapsilosis* stricto sensu.

Segundo a literatura, biofilmes de isolados sanguíneos de *C. parapsilosis* stricto sensu apresentaram alta resistência ao fluconazol (Melo *et al.*, 2011), corroborando com os dados obtidos no presente trabalho.

No geral, a resistência à antifúngicos é uma das principais características de biofilme formados por leveduras do gênero *Candida*, devido sua organização estrutural, com alta densidade de células envolvidas em matriz extracelular (revisado por Pierce *et al.*, 2015), reforçando a necessidade de busca de novas alternativas terapêuticas.

## 6 CONCLUSÕES

- Os dados de suscetibilidade de células planctônicas mostram potencial promissor da baicaleína como agente antifúngico, independente dos isolados apresentarem resistência ao fluconazol;
- O sinergismo do fluconazol e baicaleína combinados sobre células planctônicas ocorreu em isolado suscetível e resistente ao fluconazol, sugerindo que o mecanismo de ação da baicaleína difere do fluconazol;
- Os dados da atividade do fluconazol e da baicaleína em células pré-aderidas demonstram que biofilmes em estágio inicial de formação já apresentam menor suscetibilidade aos compostos testados;
- Os dados da atividade do fluconazol demonstram diferenças no perfil de suscetibilidade entre biofilmes de isolados classificados como resistentes ou suscetíveis a essa droga. Alguns isolados fluconazol-suscetíveis apresentaram alta suscetibilidade, enquanto nenhum isolado fluconazol-resistente apresentou este perfil;
- Baicaleína não teve ação sobre biofilme de isolados sanguíneos de *C. parapsilosis* nas concentrações avaliadas;
- A avaliação ultraestrutural das células planctônicas expostas ao fluconazol e à baicaleína permitiu observar que a ação dos compostos foram isolado-dependentes.

## REFERÊNCIAS

- ABI-CHACRA, E. A.; SOUZA, L. O. P.; CRUZ, L. P.; BRAGA-SILVA, L.; GONÇALVES, D. S.; SODRÉ, C. L.; RIBEIRO, M. D.; SEABRA, S. H.; FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G.; BARBEDO, L.S.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; ZICCARDI, M.; SANTOS, A. L.S. Phenotypical properties associated with virulence from clinical isolates belonging to the *Candida parapsilosis* complex. **FEMS Yeast Research**, v. 13, p.831-848, 2013.
- AL-DHAHERI, R. S.; DOUGLAS, L. J. Absence of amphotericin B-tolerant persister cells in biofilms of some *Candida* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 5, pp. 1884 - 1887, 2008.
- AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 9, pp. 3291 - 3297, 2004.
- ANDES, D. In vivo pharmacodynamics of antifungal drugs in treatment of candidiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 4, pp. 1179 - 1186, 2003.
- ANDES, D. R.; SAFDAR, N.; BADDLEY, J. W.; PLAYFORD, G.; REBOLI, A. C.; REX, J. H.; SOBEL, J. D.; PAPPAS, P. G.; KULLBERG, B. J.; Mycoses Study Group. 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**, p.cis 021, 2012.
- AQUINO, V. R.; LUNARDI, L. W.; GOLDANI, L. Z.; BARTH, A. L. Prevalence, Susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in Southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 5, pp. 411 - 418, 2005.
- ARENDRUP, M. C.; MELETIATIDIS, J.; MOUTON, J. W.; LAGROU, K.; HAMAL, P.; GUINEA, J.; Subcommittee On Antifungal Susceptibility Testing (AFST) Of the ESCMID European Committee For Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)\* EUCAST Definitive Document EDef 7.3.1: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts, 2017.
- ASHFORD, B K. Certain Conditions of the Gastro-Intestinal Tract in Porto Rico and their Relation to Tropical Sprue. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 6, pp. 507 - 538, 1928.
- BONFIETTI, L. X.; SZESZS, M. W.; CHANG, M. R.; MARTINS, M. A.; PUKINSKAS, S. R. B. S.; NUNES, M. O.; PEREIRA, G. H.; PANIAGO, A. M. M.; PURISCO, S. U.; MELHEM, M. S. C. Ten-year study of species distribution and antifungal susceptibilities of *Candida* bloodstream isolates at a Brazilian Tertiary Hospital, **Mycopathologia**, [Epub ahead of print], 2012.

BRILHANTE, R. S. N.; RODRIGUES, T. D. J. S.; CASTELO, D. D. S. C. M.; TEIXEIRA, C. E. C.; DE BRITO MACEDO, R.; BANDEIRA, S. P.; DE ALENCAR, L. P., MONTEIRO, A. J.; DE AGUIAR CORDEIRO, R.; BANDEIRA, T. D. J. P. G.; MOREIRA, J. L. B. Antifungal susceptibility and virulence attributes of animal-derived isolates of *Candida parapsilosis* complex. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63 n. 11, pp. 1568 - 1572, 2014.

CANTÓN, E.; PEMÁN, J.; QUINDÓS, G.; ERASO, E.; MIRANDA-ZAPICO, I.; ÁLVAREZ, M.; MERINO, P.; CAMPOS-HERRERO, I.; MARCO, F.; PEDROSA, E. G. G.; YAGUE, G. 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, pp. 5590 - 5596, 2011.

CAO, Y. Y.; DAI, B.; WANG, Y.; HUANG, S.; XU, Y.; CAO, Y.; GAO, P.; ZHU, Z. Y.; JIANG, Y. Y. In vitro activity of baicalein against *Candida albicans* biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, n. 1, p. 73 - 77, 2008.

CHANG, M. R.; CORREIA, F. P.; COSTA, L. C.; XAVIER, P. C.; PALHARES, D. B.; TAIRA, D. L.; PANIAGO, A. M. M.; PONTES, E. R. J.; MACHADO, V. E. *Candida* bloodstream infection: data from a teaching hospital in Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo**, v. 50, n. 5, pp. 265 - 268, 2008.

CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Second Edition*. CLSI document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002.

COCUAUD, C.; RODIER, M.H.; DANIAULT, G.; IMBERT, C. Anti-metabolic activity of caspofungin against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, pp. 507– 512, 2005.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, pp. 2816 – 2823, 2006.

COSTA, V. G.; QUESADA, R. M. B.; ABE, A. T. S.; FURLANETO-MAIA, L.; FURLANETO, M. C. Nosocomial bloodstream *Candida* infections in a tertiary - care hospital in South Brazil: a 4-year survey. **Mycopathologia**, v. 178, n. 3 - 4, pp. 243 - 250, 2014.

DAI, B.; CAO, Y. Y.; HUANG, S.; XU, Y.; GAO, P.; WANG, Y.; JIANG, Y. Baicalein induces programmed cell death in *Candida albicans*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 8, pp. 803 - 809, 2009.

DIEKEMA, D.; ARBEFEVILLE, S.; BOYKEN, L.KROEGER, J.; PFALLER, M. A. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 1, pp. 45 - 48, 2012.

DOI, A. M.; PIGNATARI, A. C. C.; EDMOND, M. B.; MARRA, A. R.; CAMARGO, L. F. A.; SIQUEIRA, R.; A.MOTA, V. P.; COLOMBO, A. L. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. **PlosOne**, v. 11, n. 1, p. e0146909, 2016.

DREESEN, M.; FOULON, V.; SPRIET, I.; GOOSSENS, G. A.; HIELE, M.; DE POURCQ, L.; WILLEMS, L. Epidemiology of catheter-related infections in adult patients receiving home parenteral nutrition: a systematic review. **Clinical Nutrition**, v. 32, n. 1, pp. 16 - 26, 2012.

FU, Z.; LU, H.; ZHU, Z.; YAN, L.; JIANG, Y.; CAO, Y. Combination of baicalein and Amphotericin B accelerates *Candida albicans* apoptosis. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 2, pp. 214 - 218, 2011.

GÁCSEER, A.; SCHÄFER, W.; NOSANCHUK, J. S.; SALOMON, S.; NOSANCHUK, J. D. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, p.1336-1341, 2007.

GAGO, S.; GARCÍA-RODAS, R.; CUESTA, I.; MELLADO, E.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* virulence in the non-conventional host *Galleria mellonella*. **Virulence**, v. 5, p. 278-285, 2014.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, pp. 501 - 517, 1999.

GONÇALVES, S. S.; AMORIM, C. S.; NUCCI, M.; PADOVAN, A. C.; BRIONES, M. R.; MELO, A. S.; COLOMBO, A. L. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: results from a nationwide surveillance of candidaemia in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 7, pp. 885 - 887, 2010.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. s6, pp. 5 - 10, 2014.

HOFFMANN-SANTOS, H. D.; PAULA, C. R.; YAMAMOTO, A. C. A.; TADANO, T.; HAHN, R. C. Six-year trend analysis of nosocomial candidemia and risk factors in two intensive care hospitals in Mato Grosso, midwest region of Brazil. **Mycopathologia**, v. 176, n. 5 - 6, pp. 409 - 415, 2013.

HUANG, S.; CAO, Y. Y.; DAI, B. D.; SUN, X. R.; ZHU, Z. Y.; CAO, Y. B.; WANG, Y.; GAO, P. H.; JIANG, Y. Y. In vitro synergism of fluconazole and baicalein against clinical isolates of *Candida albicans* resistant to fluconazole. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 12, pp. 2234 - 2236, 2008.

JANG, E. J.; CHA, S. M.; CHOI, S. M.; CHA, J. D. Combination effects of baicalein with antibiotics against oral pathogens. **Archives of Oral Biology**, v. 59, n. 11, pp.1233 - 1241, 2014.

JOHARI, J.; KIANMEHR, A.; MUSTAFA, M. R.; ABUBAKAR, S.; ZANDI, K. Antiviral activity of baicalein and quercetin against the japanese encephalitis virus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 12, pp. 16785 - 16795, 2012.

KANG, K.; FONG, W.; TSANG, P. W. Antifungal activity of baicalein against *Candida krusei* does not involve apoptosis. **Mycopathologia**, v. 170, n. 6, pp. 391 - 396, 2010.

KVASNICKOVA, E.; MATATKOVA, O.; CEJKOVA, A.; MASAK, J. Evaluation of baicalein, chitosan and usnic acid effect on *Candida parapsilosis* and *Candida krusei* biofilm using a Cellavista device. **Journal of Microbiological Methods**, v. 118, pp.106 - 112, 2015.

LAFLEUR, M. D.; KUMAMOTO, C. A.; LEWIS, K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 11, pp. 3839 - 3846, 2006.

LATTIF, A. A.; MUKHERJEE, P. K.; CHANDRA, J.; SWINDELL, K.; LOCKHART, S. R.; DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A.; GHANNOUM, M. A. Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300 n. 4, pp.265 - 270, 2009.

LEE, J.; KIM, H. S.; SHIN, S. H.; CHOI, C. W.; KIM, E. K.; CHOI, E. H.; KIM, B. I.; CHOI, J. H. Efficacy and safety of fluconazole prophylaxis in extremely low birth weight infants: multicenter pre-post cohort study. **BMC pediatrics**, v. 16, n. 1, p. 1, 2016.

LEWIS, K. Persister cells. **Annual Review of Microbiology**, v. 64, pp. 357 - 372, 2010.

LIN, D.; WU, L-C.; RINALDI, M. G.; LEHMANN, P. F. Three distinct genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 7, pp. 1815 - 1821, 1995.

LIU, H.; DONG, Y.; GAO, Y.; DU, Z.; WANG, Y.; CHENG, P.; CHEN, A.; HUANG, H. The Fascinating Effects of Baicalein on Cancer: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1681, 2016.

LOCKHART, S. R.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. 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, p. 2659-2664, 2008.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J.; ESCRIBANO, P.; BOUZA, E.; GUINEA, J.. Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. **International Journal of Medical Microbiology**, n. 304, v.8, pp.1192-1198, 2014.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J.; ESCRIBANO, P.; BOUZA, E.; GUINEA, J. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms to caspofungin and anidulafungin is not affected by metabolic activity or biomass production. **Medical Mycology**, v. 54, n. 2, pp. 155 - 161, 2016.

MAUBON, D.; GARNAUD, C.; CALANDRA, T.; SANGLARD, D.; CORNET, M. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? **Intensive Care Medicine**, v. 40, n. 9, pp. 1241 - 1255, 2014.

MEDRANO, D. J.; BRILHANTE, R. S.; CORDEIRO R. D. A.; ROCHA, M. F.; RABENHORST, S. H.; SIDRIM, J. J. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 48, p. 17 – 20, 2006.

MELO, A. S.; BIZERRA, F. C.; FREYMÜLLER, E.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; COLOMBO, A. L. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. **Medical Mycology**, v. 49, n. 3, pp. 253 - 262, 2011.

MITCHELL, K. F.; TAFF, H. T.; CUEVAS, M. A.; REINICKE, E. L.; SANCHEZ, H.; ANDES, D. R. Role of matrix  $\beta$ -1, 3 glucan in antifungal resistance of non-*albicans* *Candida* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n.4, pp. 1918 - 1920, 2013.

NÉMETH, T.; TÓTH, A.; SZENZENSTEIN, J.; HORVÁTH, P.; NOSANCHUK, J. D.; GRÓZER, Z.; TÓTH, R.; PAPP, C.; HAMARI, Z.; VÁGVÖLGYI, C.; GÁCSEK, A. Characterization of Virulence Properties in the *C. parapsilosis* Sensus Lato Species. **PlosOne**, v. 8, n. 7, p. e68704, 2013.

NETT, J., LINCOLN, L., MARCHILLO, K.; MASSEY, R.; HOLOYDA, K.; HOFF, B.; VANHANDEL, M.; ANDES, D. Putative role of  $\beta$ -1, 3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n.2, pp. 510 - 520, 2007.

NOSEK, J.; HOLESOVA, Z., KOSA, P.; GACSEK, A.; TOMASKA, L. Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. **Current Genetics**, v. 55, n. 5, pp. 497 - 509, 2009.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN A. M.; RESTREPO, A.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clinical Infectious Disease**, v. 51, n. 5, pp. 561 - 570, 2010.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; ALVARADO-MATUTE, T.; TIRABOSCHI, I. R.; CORTES, J.; ZURITA, J.; GUZMAN-BLANCO, M.; SANTOLAYA, M. E.; THOMPSON, L.; SIFUENTES-OSORNIO, J.; ECHEVARRIA, J. I.; COLOMBO, A. L. Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory-Based Survey. **PlosOne**, v. 8, p. e59373, 2013.

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

ORSI, C. F.; COLOMBARI, B.; BLASI, E. *Candida metapsilosis* as the least virulent member of the 'C. parapsilosis' complex. **Medical Mycology**, v. 48, p. 1024-1033, 2010.

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, p. 29–35, 2001.

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

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, pp. 2454 - 2463, 2007.

PFALLER, M. A.; MESSER, S. A.; MOET, G. J.; JONES, R. N.; CASTANHEIRA, M. *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, pp. 65 - 69, 2011.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 123, n. 1A, pp. s3- s13, 2012.

PIERCE, C G.; UPPULURI, P.; TRISTAN, A. R.; WORMLEY, F. L.; MOWAT, E.; RAMAGE, G.; LOPEZ-RIBOT, J. L. A simple and reproducible 96 - well plate - based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature Protocols**, v. 3, n. 9, pp. 1494 - 1500, 2008.

PIERCE, C. G.; SRINIVASAN, A.; RAMASUBRAMANIAN, A. K.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. From biology to drug development: new approaches to combat the threat of fungal biofilms. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 3, pp. 373 – 388, 2015.

PINHATI, H. M. S.; CASULARI, L. A.; SOUZA, A. C. R.; SIQUEIRA, R. A.; DAMASCENO, C. M. G.; COLOMBO, A. L. Outbreak of candidemia caused by fluconazole resistant *Candida parapsilosis* strains in an intensive care unit. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 433-439, 2016.

RAJASEKHARAN, S. K.; RAMESH, S.; BAKKIYARAJ, D. Synergy of flavonoids with HDAC inhibitor: new approach to target *Candida tropicalis* biofilms. **Journal of Chemotherapy**, v. 27, n. 4, pp. 246 - 249, 2014.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L.; WILLIAMS, C. Fungal biofilm resistance. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S.P.; THOMAS, D. P.; LÓPEZ-RIBOT, J. L. *Candida* Biofilms: an update. **Eukaryotic Cell**, v. 4, p.633-638, 2005.

RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; ARENDRUP, M. C.; BARCHIESI, F.; BILLE, J.; CHRYSSANTHOU, E.; CUENCA-ESTRELLA, M.; DANNAOUI, E.; DENNING, D. W.; DONNELLY, J. P.; DROMER, F.; FEGELER, W.; LASS – FLÖRL, C.; MOORE, C.; RICHARDSON, M.; SANDVEN, P.; VELEGRAKI, A.; VERWEIJ, P. EUCAST Definitive Document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts: Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 4, pp. 398 - 405, 2008.

RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; ARENDRUP, M. C.; CUENCA - ESTRELLA, M.; DONNELLY, J. P.; LASS - FLÖRL, C. EUCAST breakpoints for antifungals. **Drug News & Perspectives**, v. 23, n. 2, pp. 93 - 97, 2010.

ROSSIGNOL, T., DING, C.; GUIDA, A.; d'ENFERT, C.; HIGGINS, D. G.; BUTLER, G. Correlation between biofilm formation and the hypoxic response in *Candida parapsilosis*. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 4, pp. 550 - 559, 2009.

RUIZ-CAMPS, I.; CUENCA-ESTRELLA, M. Antifungals for systemic use. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, n. 6, p. 353, 2009.

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

SERPA, R.; FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO - MAIA, L.; ANDRADE, C. G. T. J.; DINIZ, A.; FURLANETO, M. C. In vitro antifungal activity of the flavonoid baicalein against *Candida* species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 6, pp. 1704 - 1708, 2012.

SHERRY, L.; RAJENDRAN, R.; LAPPIN, D. F.; BORGHI, E.; PERDONI, F.; FALLENI, M.; TOSI, D.; SMITH, K.; WILLIAMS, C.; JONES, B.; NILE, C. J. Biofilms formed by *Candida albicans* bloodstream isolates display phenotypic and

transcriptional heterogeneity that are associated with resistance and pathogenicity. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 182, 2014.

SHIMIZU, I. Sho-Saiko-to. In: PACKER, L.; ONG, C. N.; HALLIWELL, B. eds. **Herbal and Traditional Medicine: Molecular Aspects of Health**. Nova York: CRC Press, 2004, cap 26, pp. 501 - 520.

SILVA, A. P.; MIRANDA, I. M.; GUIDA, A.; SYNNOTT, J.; ROCHA, R.; SILVA, R.; AMORIM, A.; PINA-VAZ, C.; BUTLER, G.; RODRIGUES, A. G. Transcriptional profiling of azole-resistant *Candida parapsilosis* strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, pp. 3546 – 3556, 2011.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAM, D. W.; AZEREDO, J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 5, pp. 241 - 247, 2011.

SILVA, S.; RODRIGUES, C. F.; ARAÚJO, D.; RODRIGUES, M. E.; HENRIQUES, M. *Candida* Species Biofilms' Antifungal Resistance. **Journal of Fungi**, v. 3, n.1, p.8, 2017.

SILVA, S.; HENRIQUES, M.; MARTINS, A.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. **Medical Mycology**, v. 47, p. 681–668, 2009.

SOUZA, A. C. R.; FUCHS, B. B.; PINHATI, H. M.; SIQUEIRA, R. A.; HAGEN, F.; MEIS, J. F.; MYLONAKIS, E.; COLOMBO, A. L. *Candida parapsilosis* resistance to fluconazole: molecular mechanisms and in vivo impact in infected *Galleria mellonella* larvae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, pp. 6581 - 6587, 2015.

TAFF, H. T.; NETT, J. E.; ZARNOWSKI, R.; ROSS, K. M.; SANCHEZ, H.; CAIN, M. T.; HAMAKER, J.; MITCHELL, A. P.; ANDES, D. R. A *Candida* biofilm-induced pathway for matrix glucan delivery: implications for drug resistance. **Plos Pathogens**, v. 8, n. 8, p. e1002848, 2012.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N. A. R.; MAIDEN, M. C. J.; ODDS, F. C. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, pp. 284 - 292, 2005.

THIERRY, G.; MORIO, F.; LE PAPE, P.; GAY-ANDRIEU, F.; BARRE, O.; MIEGEVILLE, M. Prevalence of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* in candidemia over a 5-year period at Nantes hospital and in vitro susceptibility to three echinocandins by E-test. **Pathologie Biologie**, v. 59, n.1, p. 52-56, 2011.

TOURNU, H; VAN DIJCK P. *Candida* biofilms and the host: models and new concepts for eradication. **International Journal of Microbiology**, v. 2012, 2012, Article ID 845352.

TREVIÑO-RANGEL, R. D. J.; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, I. P.; ROSAS-TARACO, A. G.; HERNÁNDEZ-BELLO, R.; GONZÁLEZ, J. G.; GONZÁLEZ, G. M. Biofilm formation and genetic variability of *BCR1* gene in the *Candida parapsilosis* complex. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 32 n. 3, p. 180 - 184, 2015.

TSANG, P. W. K.; CHAU, K. Y., YANG, H. P. Baicalein exhibits inhibitory effect on the energy-dependent efflux pump activity in non-*albicans* *Candida* fungi. **Journal of Chemotherapy**, 27, n.1, p. 61, 2015.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, pp. 95 - 105, 2014.

YU, S. B.; LI, W. G.; LIU, X. S.; CHE, J.; LU, J. X.; WU, Y. The activities of adhesion and biofilm formation by *Candida tropicalis* clinical isolates display significant correlation with its multilocus sequence typing. **Mycopathologia**, pp. 1 - 11, 2017.