



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GISLAINE DA SILVA RODRIGUES

**GERANIOL POTENCIALIZA O EFEITO DO FLUCONAZOL
EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS DE *Candida
tropicalis* RESISTENTE A AZOL: ANÁLISES *in vitro* e *in vivo***

Londrina

2025

GISLAINE DA SILVA RODRIGUES

**GERANIOL POTENCIALIZA O EFEITO DO FLUCONAZOL
EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS DE *Candida
tropicalis* RESISTENTE A AZOL: ANÁLISES *in vitro* e *in vivo***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Sueli Fumie Yamada Ogatta

Londrina

2025

GISLAINE DA SILVA RODRIGUES

**GERANIOL POTENCIALIZA O EFEITO DO FLUCONAZOL
EM CÉLULAS PLANCTÔNICAS E SÉSSEIS DE *Candida
tropicalis* RESISTENTE A AZOL: ANÁLISES *in vitro* e *in vivo***

BANCA EXAMINADORA

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Prof^ª. Dr^ª. Sueli Fumie Yamada Ogatta
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^ª. Dr^ª. Kelly Ishida
Universidade de São Paulo - USP

Prof. Dr^º. Cássio Ilan Soares Medeiros
Faculdades Integradas de Patos (UniFIP)/Medicina

Londrina, 18 de março de 2025

DEDICATÓRIA

Dedico esta conquista às pessoas mais importantes e preciosas da minha vida:

A meu noivo, Paulo Henrique Guilherme Borges, por todo amor, dedicação, apoio e compreensão que foram essenciais para que eu conquistasse esta grande vitória.

A minha mãe, Márcia Amaral da Silva, por sempre me incentivar a seguir forte e ser um grande exemplo em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente a minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Sueli Fumie Yamada Ogatta, por ter confiado em mim desde o início, aceitando-me enquanto eu ainda estava na residência e abrindo as portas do laboratório para mim. A experiência que eu tive no laboratório foi a base para o meu desenvolvimento profissional e pessoal, e graças a isso sinto-me preparada para enfrentar novos desafios e traçar novos caminhos. Durante esses três anos e meio de convivência, eu aprendi muito mais do que metodologias científicas. Aprendi sobre ética, comprometimento e o verdadeiro valor de ser uma profissional dedicada e competente. A senhora sempre foi um exemplo de excelência e profissionalismo, não apenas por seu trabalho admirável, mas também por sua postura. A sua maneira de ser me inspira profundamente: de fora, uma figura respeitável e digamos que até intimidadora, mas que, ao conhecê-la, revela-se uma pessoa atenciosa e de grande coração. Admiro a forma de como é respeitada, pelo nome que construiu e pelo impacto do seu trabalho. Levarei essa inspiração comigo ao longo de toda minha caminhada e quero me tornar uma pesquisadora que, como a senhora, une profissionalismo, paixão e humanidade. É engraçado que, por mais que eu tente, eu nunca vou conseguir expressar nesse papel a minha eterna gratidão e admiração pela senhora, por mais que não pareça por eu ser um pouco mais quieta, quero que saiba que foi uma honra ter sido sua orientanda.

Ao meu noivo, Me. Paulo, que foi essencial e indispensável durante toda minha jornada, sou imensamente grata pelo apoio incondicional que você me deu desde o momento em que escolhi fazer pesquisa ainda durante a residência. Sei que minha caminhada é motivo de orgulho para nós dois, mas tenho consciência de que, sem seu apoio, eu não teria conquistado metade do que conquistei. Agradeço especialmente por ter sido meu porto seguro nos momentos mais desafiadores da minha jornada, sua presença me deu a coragem necessária para superar um período sombrio e seguir em frente. Agradeço também por ser minha inspiração, mesmo que as vezes você não perceba, sua dedicação ao seu trabalho e a vontade de ajudar o próximo, são exemplos que me motivam todos os dias. Agradeço a pessoa excepcional em todos os papéis que desempenha: como cientista, como noivo e como amigo. Sou grata por tudo que somos e por tudo que ainda construiremos juntos.

Aos meus amigos, Isabela Castro, Guilherme Correia e Helena Tiemi Suzukawa, minha eterna gratidão. Agraço por estarem sempre comigo, por tornarem meus dias mais leves e por me darem forças sempre quando eu preciso. Além de amigos incríveis, vocês são exemplos de profissionais que admiro profundamente e nos quais me inspiro. Por mais que este

espaço seja destinado a agradecimentos, gostaria de aproveitar para dizer que o trabalho de vocês é excelente e que a insegurança nunca deve servir como barreira, mas sim como um impulso para acreditar ainda mais em seu potencial e ir além em tudo na vida. Vocês são ótimos em tudo que fazem, e tenho absoluta certeza de que alcançarão tudo que desejarem. Independente de eu finalizar meu ciclo no laboratório, vocês serão pessoas que levarei comigo para sempre.

Ao meu amigo e professor Cássio Illan Soares Medeiros, minha mais sincera gratidão. Nossa parceria começou com uma dúvida, e logo se transformou em uma amizade e colaboração que fizeram toda a diferença na minha jornada. Obrigada por estar sempre disposto a ajudar, por me guiar nos primeiros passos dos experimentos e por responder sempre que precisei. Sua generosidade e prontidão em compartilhar seu conhecimento foram fundamentais para o meu crescimento profissional, sou imensamente grata por essa parceria que nasceu de forma tão espontânea e se tornou tão valiosa.

Aos alunos de Iniciação Científica, Luana Carolina Azevedo Ferreira, Lucas Calado Mota, Renata de Cássia Benetti Zanoni, Jéssica Mai Onishi, Gabriela Francisquini, Bruna Araújo e Sofia Marcelino de Santana, meu sincero agradecimento. Foi um prazer acompanhar o desenvolvimento de cada um de vocês desde que cheguei ao laboratório. Agradeço o tempo que compartilhamos e a oportunidade de auxiliar vocês com o que aprendi durante minha caminhada. Ajudar vocês, foi sem dúvidas uma das partes mais gratificantes de todo meu desenvolvimento profissional na pesquisa. Além dos alunos citados acima, gostaria de agradecer a ajuda fornecida por todos os IC's do laboratório, em especial ao Davi Tavares e Camila Antunes, que apesar de suas correrias, sempre estiveram dispostos a me ajudar no que podiam.

A todos os integrantes do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos (BiomMMLab), em especial ao professor Dr^o Eliandro Tavares, cuja presença foi fundamental em toda essa jornada. Sua capacidade de equilibrar os papéis de professor e amigo é algo que me inspira profundamente, esse equilíbrio é natural em sua postura, e é uma das qualidades que mais admiro e que levarei comigo sempre.

À Prof^a. Dr^a Marsileni Pelisson e ao Hospital Universitário de Londrina, por fornecerem as amostras para a realização desse trabalho.

À prof^a Dr^a Lucy Megumi Yamauchi Lioni que fez de minhas manhãs mais animadas com trocas de experiências, receitas e conhecimentos, além disso, agradeço pelas manhãs saborosas com deliciosos bolos e cookies.

À Coordenadora, Prof^a Dr^a Lucy Megumi Yamauchi Lioni pelo apoio e experiências

compartilhadas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa e do auxílio financeiro.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da UEL, pelas imagens de microscopia eletrônica.

Agradeço a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, mesmo que seus nomes não estejam mencionados aqui. Cada gesto de apoio, cada conversa inspiradora e cada contribuição, por menor que tenha parecido, fez uma diferença significativa nessa jornada. Minha gratidão a todos que, direta ou indiretamente, estiveram presentes e me ajudaram a chegar até aqui.

“Que minhas ações silenciosas ressoem mais alto que palavras e que minhas conquistas falem por si mesma!”

Silva-Rodrigues, G.

RESUMO

SILVA-RODRIGUES, GISLAINE. **Geraniol potencializa o efeito do fluconazol em células planctônicas e sésseis de *Candida tropicalis* resistente a azol: análises *in vitro* e *in vivo*.** 2025. 106 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2025.

Candida tropicalis é considerada um patógeno oportunista, causando doenças que variam de infecções superficiais a infecções disseminadas com risco de vida. A capacidade desta levedura de formar biofilmes e desenvolver resistência a antifúngicos representa um desafio terapêutico significativo. Neste estudo, foi avaliado o efeito do geraniol (GER), isolado e em combinação com fluconazol (FLZ), em células planctônicas e sésseis de *C. tropicalis* resistente aos azóis. GER apresentou um efeito fungicida dependente do tempo nas células planctônicas, comprometendo a integridade da membrana celular. Além disso, o GER inibiu o efluxo da proteína Cdr1 e as análises de docking molecular indicaram afinidade de ligação do GER à proteína Cdr1 de *C. tropicalis*. O GER apresentou sinergismo com FLZ contra as células planctônicas e sésseis, inibindo a adesão das células da levedura e a viabilidade dos biofilmes formados em superfícies abióticas durante 48 h. Biofilmes de *C. tropicalis* tratados com GER, isolado ou combinado com FLZ, exibiram alterações morfológicas e ultraestruturais, incluindo redução das camadas de células bem como a presença de células murchas. Além disso, GER isolado e combinado com FLZ não causaram toxicidade, e ambos os tratamentos prolongaram a sobrevivência das larvas de *Galleria mellonella* infectadas com *C. tropicalis* resistente aos azóis. Esses achados indicam que a combinação de GER e FLZ pode ser uma estratégia promissora para controlar infecções por *C. tropicalis* resistentes aos azóis.

Palavras-chave: atividade antibiofilme; atividade da bomba de efluxo; modelo de infecção; análises de toxicidade *in silico*; encaixe molecular; sinergismo.

ABSTRACT

SILVA-RODRIGUES, GISLAINE. **Geraniol potentiates the effect of fluconazole planktonic and sessile cells of azole-resistant *Candida tropicalis*: *in vitro* and *in vivo* analyses.** 2025. 106 p. Dissertation (Master's Degree in Microbiology) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2025.

Candida tropicalis is considered an opportunistic pathogen, causing diseases ranging from superficial infections to life-threatening disseminated infections. The ability of this yeast to form biofilms and develop antifungal resistance poses a significant therapeutic challenge. In this study, the effect of geraniol (GER), both alone and in combination with fluconazole (FLZ), was evaluated on planktonic and sessile cells of azole-resistant *C. tropicalis*. GER exhibited a time-dependent fungicidal effect on planktonic cells, compromising cell membrane integrity. Additionally, GER inhibited rhodamine 6G efflux, and molecular docking analyses indicated GER's binding affinity to the *C. tropicalis* Cdr1 protein. GER demonstrated synergy with FLZ against both planktonic and sessile cells, inhibiting yeast adhesion and reducing biofilm viability on abiotic surfaces over 48 hours. Biofilms treated with GER, alone or in combination with FLZ, exhibited morphological and ultrastructural alterations, including a reduction in cell layers and the presence of shriveled cells. Furthermore, neither GER alone nor in combination with FLZ caused toxicity, and both treatments prolonged the survival of *Galleria mellonella* larvae infected with azole-resistant *C. tropicalis*. These findings suggest that the combination of GER and FLZ may be a promising strategy for controlling infections caused by azole-resistant *C. tropicalis*.

Key-words: antibiofilm activity; Cdr1p; efflux pump activity; *Galleria mellonella*; infection model; itraconazole resistance; *in silico* toxicity analyses; molecular docking; monoterpenoid; synergism.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Representação das diferentes morfologias de <i>Candida</i> spp. | 16 |
| Figura 2. Distribuição global e epidemiologia de espécies de <i>Candida</i> não- <i>albicans</i> , evidenciando a prevalência (%) de <i>Candida glabrata</i> (<i>Nakaseomyces glabrata</i>), <i>Candida parapsilosis</i> e <i>Candida tropicalis</i> em diferentes países e períodos específicos. | 17 |
| Figura 3. Representação das diferentes morfologias de <i>Candida</i> spp. Epidemiologia da candidemia global entre 2002 e 2015, com destaque para a prevalência de <i>Candida glabrata</i> (<i>Nakaseomyces glabrata</i>), <i>Candida parapsilosis</i> e <i>Candida tropicalis</i> em regiões específicas. | 18 |
| Figura 4. Cultivo de <i>C. tropicalis</i> em dois meios de cultura. | 20 |
| Figura 5. Patogênese de <i>Candida</i> spp. | 22 |
| Figura 6. Ultraestrutura e morfologia de biofilmes de <i>C. tropicalis</i> ATCC 28707..... | 28 |
| Figura 7. Estrutura química da pneumocandina B0 (a) e equinocandina B (b). | 33 |
| Figura 8. Mecanismo de ação das equinocandinas. | 34 |
| Figura 9. Mecanismos que os fungos se adaptam a equinocandinas. | 35 |
| Figura 10. Estrutura química da anfotericina B e do mecanismo de ação | 38 |
| Figura 11. Rota de biossíntese do ergosterol evidenciando os pontos de bloqueio dos antifúngicos. | 40 |
| Figura 12. Estruturas química dos azóis..... | 41 |
| Figura 13. Mecanismos de resistência aos azóis. | 43 |
| Figura 14. Estrutura química da flucitosina e seu mecanismo de ação | 45 |
| Figura 15. Estrutura química do geraniol | 47 |
| Figura 16. Padrão de expressão de CDR1 (barras pretas) e ERG3 (barras brancas) em <i>C. tropicalis</i> resistentes a azóis. | 63 |
| Figura 27. Atividade antifúngica do geraniol (GER) em <i>C. tropicalis</i> | 65 |
| Figura 18. Análise da integridade da membrana plasmática. | 66 |
| Figura 19. Análise da viabilidade celular e integridade da membrana plasmática de <i>C. tropicalis</i> ATCC 28707 após marcação diferencial com FUN-1™ e Calcofluor White™ MR2. | 67 |
| Figura 20. Efeito do geraniol no efluxo de rodamina 6G por células planctônicas de <i>C. tropicalis</i> | 69 |
| Figura 21. Processo de resolução e validação da estrutura 3D da proteína Cdr1 de <i>C. tropicalis</i> | 71 |

| | |
|---|----|
| Figura 22. Interações moleculares de geraniol (GER), curcumina (CUR) e farnesol (FAR) com a proteína de resistência de <i>Candida tropicalis</i> (CtCdr1). | 73 |
| Figura 23. Atividade antifúngica do geraniol combinado com fluconazol (FLZ) contra células planctônicas de <i>C. tropicalis</i> | 75 |
| Figura 24. Efeito de GER sozinho ou combinado com FLZ na adesão de células de <i>C. tropicalis</i> à superfície de poliestireno. | 76 |
| Figura 25. Cinética de formação do biofilme por <i>C. tropicalis</i> resistentes aos azóis na superfície de poliestireno monitorada pela atividade metabólica de células sésseis usando o ensaio de redução do MTT (550 nm). | 77 |
| Figura 26. Efeito de GER sozinho ou combinado com FLZ no biofilme maduros de <i>C. tropicalis</i> formados na superfície de poliestireno. | 78 |
| Figura 27. Efeito do geraniol (GER) sozinho ou combinado com fluconazol (FLZ) na morfologia e ultraestrutura de biofilmes de <i>Candida tropicalis</i> ATCC 28707. | 81 |
| Figura 28. Viabilidade das células sésseis de <i>Candida tropicalis</i> | 82 |
| Figura 29. Curva de sobrevivência de larvas de <i>G. mellonella</i> | 85 |
| Figura 30. Curva de sobrevivência de larvas de <i>G. mellonella</i> | 86 |
| Figura 31. Carga fúngica na hemolinfa de larvas de <i>G. mellonella</i> | 87 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----|
| Tabela 1. Composição da matriz extracelular extraído de biofilmes de <i>C. albicans</i> GDH 2346 e <i>C. tropicalis</i> AAHB 73..... | 299 |
| Tabela 2. Características dos oligonucleotídicos iniciadores utilizados no presente estudo... | 53 |
| Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) de fluconazol, itraconazol, anfotericina B e geraniol para <i>C. tropicalis</i> | 60 |
| Tabela 4. Energia de ligação de CtCdr1 com geraniol, curcumina e farnesol. | 70 |
| Tabela 5. Interação antifúngica entre geraniol e itraconazol e geraniol e fluconazol em células planctônicas de <i>C. tropicalis</i> | 72 |
| Tabela 6. Propriedades toxicológicas do geraniol e parâmetros de Lipinski (explorador da propriedade Osiris) determinadas <i>in silico</i> | 83 |
| Tabela 7. Parâmetros farmacocinéticos <i>in silico</i> pkSCM do geraniol | 84 |

LISTA DE QUADRO

Quadro 1. Alvos celulares e mecanismos de ação de diferentes classes de antifúngicos.292

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. Introdução | 14 |
| 2. Revisão Bibliográfica | 16 |
| 2.1 Gênero <i>Candida</i> | 16 |
| 2.2 <i>Candida tropicalis</i> | 19 |
| 2.3 Patogênese das infecções por <i>Candida</i> spp. | 21 |
| 2.3.1 Fatores de virulência de <i>Candida</i> spp. | 23 |
| 2.3.1.1 Enzimas hidrolíticas extracelulares | 23 |
| 2.3.1.2 Capacidade de adesão em <i>C. tropicalis</i> | 25 |
| 2.3.1.3 Formação de biofilme em <i>Candida tropicalis</i> | 27 |
| 2.4 Infecções causadas por <i>Candida tropicalis</i> | 30 |
| 2.5 Diagnóstico das infecções por <i>Candida</i> spp. | 30 |
| 2.6 Antifúngicos e mecanismos de resistência | 32 |
| 2.6.1 Equinocandinas..... | 33 |
| 2.6.2 Triterpenoides (Ibrexafungerp) | 36 |
| 2.6.3 Polienos | 36 |
| 2.6.4 Azóis..... | 39 |
| 2.6.5 Alilaminas..... | 44 |
| 2.6.6 Amorolfina..... | 44 |
| 2.6.7 Flucitosina | 44 |
| 2.6.8 Griseofulvina | 46 |
| 2.6.9 Limitações dos antifúngicos | 46 |
| 2.7 Geraniol..... | 47 |
| 3. Objetivos | 51 |
| 3.1 Objetivos Gerais | 51 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 51 |
| 4. Material e métodos | 52 |
| 4.1 Substâncias | 52 |
| 4.2 Microrganismos..... | 52 |
| 4.3 Efeito antifúngico do geraniol e geraniol/fluconazol sobre células planctônicas de <i>C. tropicalis</i> | 53 |
| 4.3.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)..... | 53 |
| 4.3.2 Efeito antifúngico combinado entre geraniol e fluconazol..... | 53 |
| 4.3.3 Efeito sobre a cinética de crescimento | 54 |
| 4.3.4 Extração de RNA e avaliação da expressão gênica..... | 54 |
| 4.4 Mecanismo de ação de geraniol sobre células planctônicas..... | 56 |
| 4.4.1 Avaliação da inibição de <i>cdr1</i> em <i>C. tropicalis</i> | 56 |
| 4.4.2 Previsão da estrutura 3d para <i>cdr1</i> de <i>C. tropicalis</i> | 56 |
| 4.4.2.1 Detecção do sítio de ligação e formação da grid box | 56 |
| 4.4.2.2 Preparação dos ligantes e moléculas de proteínas e docking molecular de geraniol ao sítio ativo da enzima | 57 |
| 4.4.3 Efeito de geraniol na permeabilidade da membrana celular..... | 57 |
| 4.4.4 Exposição prolongada de <i>c. tropicalis</i> ao geraniol..... | 58 |
| 4.5 Efeito antifúngico de geraniol e geraniol/fluconazol sobre células sésseis de <i>C. tropicalis</i> | 58 |
| 4.5.1 Efeito de geraniol e geraniol/fluconazol sobre adesão de <i>C. tropicalis</i> em poliestireno..... | 58 |
| 4.5.2 Efeito de geraniol e geraniol/fluconazol sobre biofilme maduro de <i>C. tropicalis</i> | 59 |
| 4.5.3 Efeito de geraniol e geraniol/fluconazol sobre a morfologia e ultraestrutura de biofilme maduro de <i>C. tropicalis</i> | 60 |
| 4.6 Toxicidade <i>in silico</i> e <i>in vivo</i> de geraniol e geraniol/fluconazol | 60 |

| | |
|---|------------|
| 4.6.1 ADMET | 60 |
| 4.6.2 Toxicidade de geraniol e geraniol/fluconazol <i>in vivo</i> em <i>Galleria mellonella</i> | 61 |
| 4.7 Avaliação da atividade antifúngica de geraniol e geraniol/fluconazol no tratamento de infecção por <i>C. tropicalis</i> em <i>Galleria mellonella</i> | 61 |
| 4.8 Análises Estatísticas | 61 |
| 5. Resultados e Discussão | 62 |
| 5.1 <i>Candida tropicalis</i> são resistentes a FLZ e ITR e o mecanismo de resistência pode estar associado a superexpressão dos genes <i>ERG3</i> e <i>CDR1</i> | 62 |
| 5.2 Geraniol apresenta atividade fungicida contra células planctônicas de <i>C. tropicalis</i> resistentes aos azóis, prejudicando a permeabilidade da membrana celular e a exposição prolongada ao monoterpeno não seleciona mutantes resistentes..... | 63 |
| 5.3 Geraniol pode inibir a atividade da bomba de efluxo de <i>c. tropicalis</i> ligando-se à proteína <i>CDR1</i> | 68 |
| 5.4 Geraniol apresenta interação sinérgica com fluconazol em células planctônicas de <i>C. tropicalis</i> resistentes aos azóis..... | 73 |
| 5.5 o geraniol sozinho ou combinado com fluconazol inibe o biofilme maduro de <i>C. tropicalis</i> resistentes aos azóis formados em superfícies abióticas | 75 |
| 5.6 Análises <i>in silico</i> , <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> mostram que o geraniol apresenta propriedades farmacocinéticas e de similaridade de fármaco de um candidato seguro para o desenvolvimento de um novo fármaco | 83 |
| 6. Conclusão | 88 |
| REFERÊNCIAS | 89 |
| APÊNDICE A | 107 |

1. INTRODUÇÃO

Um dos desafios enfrentados atualmente no tratamento de infecções por leveduras do gênero *Candida* é a resistência aos antifúngicos, em especial aos azóis, como o fluconazol. Esta classe de antifúngico é comumente utilizada no tratamento de candidíase, pois apresenta boa eficácia, baixa toxicidade e facilidade de administração oral. Entretanto, seu uso excessivo e prolongado tem levado à seleção de *Candida* spp. resistentes, resultando em um problema de saúde pública. A resistência aos azóis é extremamente preocupante, visto que compromete a eficácia do tratamento ocasionando falhas terapêuticas, prolongando tempo de hospitalização e contribuindo para o aumento da mortalidade (Yang; Cheng; Shao, 2023).

Candida tropicalis é uma levedura oportunista pertencente à microbiota humana, podendo ser encontrada na pele e trato gastrointestinal. Entretanto, em condições que comprometam a saúde, como ocorre em indivíduos imunossuprimidos, pacientes hospitalizados ou submetidos a procedimentos invasivos, essa levedura pode causar infecções invasivas (Chai *et al.* 2010). Em muitos casos, as infecções por *C. tropicalis* podem ser fatais, especialmente em pacientes que apresentem fatores de risco como por exemplo aqueles portadores da imunodeficiência humana (Yenişehirli; Alici; Yenişehirli, 2023).

Devido a sua crescente incidência em infecções hospitalares e da comunidade ao longo dos anos, *C. tropicalis* tem se tornado objeto de interesse para pesquisadores e profissionais da saúde. Fatores de virulência que auxiliam na invasão (adesão e produção de enzimas), resistência das defesas do hospedeiro (biofilmes) e resistência aos fármacos convencionais, são os principais alvos de estudos para fornecer descobertas sobre a patogênese e mecanismos de resistência antifúngica, bem como possibilitar a identificação de novos medicamentos e terapias combinadas que possam ser utilizadas de forma eficaz no tratamento de infecções causadas por esse microrganismo (Yang *et al.*, 2023).

Nesse contexto, os metabólitos de plantas, como óleos essenciais, são substâncias com diversos compostos bioativos, tornando-os versáteis em termos de funções biológicas, mostrando ser um grupo interessante para explorar (Lopez-Romero, *et al.*, 2015). Dentre os produtos naturais, o geraniol é um composto orgânico que pertence à classe terpenos e tem apresentado diversas atividades biológicas como antioxidante, antifúngica e antitumoral. Além dos estudos realizados com microrganismos, o geraniol já foi utilizado para tratamento da síndrome do intestino irritável em humanos, demonstrando sua segurança (Ricci *et al.*, 2022). Com isso, neste trabalho o efeito antifúngico *in vitro* e *in vivo* de uma combinação entre geraniol

1 e fluconazol, foi analisado em *C. tropicalis* resistentes aos azóis, visando contribuir para o
2 desenvolvimento de novas estratégias de controle para infecções causadas por essa levedura.

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

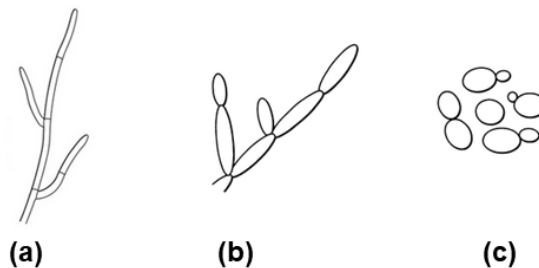
30

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gênero *Candida*

O gênero *Candida*, pertence ao filo Ascomycota, classe Saccharomycetes, da ordem Saccharomycetales e família *Saccharomycetaceae*. *Candida* deriva-se da palavra latina *Candidus*, que significa “branco”, devido as colônias terem aspecto esbranquiçado, e foi descrito pela primeira vez em 1923 pela microbiologista dinamarquesa Christine Berkhout. Este gênero é composto por aproximadamente 200 espécies, porém cerca de 40 espécies têm sido frequentemente isoladas em infecções humanas (Pereira *et al.*, 2022).

Morfológicamente as leveduras são ovais, elipsoidais ou alongadas, com tamanhos que variam de 2 a 7 μm . Microscopicamente, podem se apresentar como células únicas, pseudo-hifas ou como hifas verdadeiras (Figura 1), sendo que somente *C. albicans* e *C. dublinensis*, são capazes de produzir tubo germinativo. As leveduras que se reproduzem pela formação de hifas além do brotamento, são classificadas como dimórficas (Silva *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2022). É importante ressaltar que apesar de *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*) e *C. glabrata* (*Nakaseomyces glabrata*) não serem mais consideradas membros do gênero *Candida*, na presente revisão será utilizado o nome antigo devido ao uso comum na clínica (Kidd; Abdolrasouli; Hagen, 2023).



Fonte: o próprio autor.

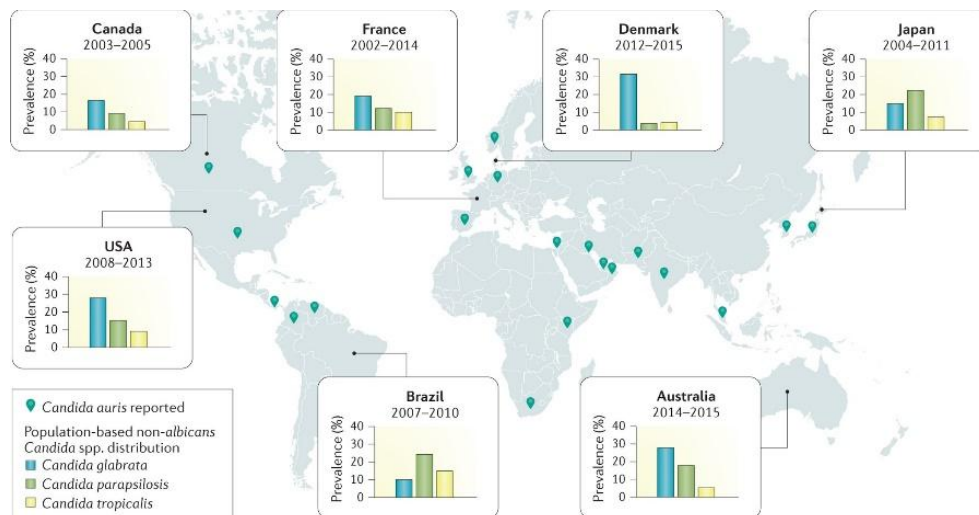
Figura 1. Representação das diferentes morfologias de *Candida* spp. Hifas: estrutura tubular alongada (a); pseudo-hifa: formada por células alongadas de leveduras que permanecem unidas após a divisão (b) e levedura: células arredondadas ou ovais típicas de fungos unicelulares que se reproduzem por brotamento (c).

Candida é um grupo heterogêneo que compreende microrganismos com diferentes características fisiológicas e metabólicas e isso reflete em versatilidade na utilização de nutrientes, o que pode contribuir para resistência a fatores de estresse. Essa diversidade metabólica pode ser observada na variação em relação ao uso de fontes de carbonos. Cerca de 71% das espécies utilizam xilose, 29% alcanos, 27% amido e 7% podem usar metanol como fonte de carbono. Esse perfil metabólico reflete os diferentes ambientes nos quais espécies de *Candida* podem ser encontradas, tais como plantas, biomassa em decomposição, insetos e

1 alimentos, além da microbiota humana. Quanto a temperatura, a maioria das espécies se
 2 multiplicam entre 20 °C e 25 °C, com temperaturas ideais que variam entre 25 °C e 35 °C e pH
 3 ideal variando de 4,0 a 6,0 (Pereira *et al.*, 2022).

4 A distribuição das infecções de *Candida* ao redor do mundo têm sido frequentemente
 5 relatadas. Dentre *C. não albicans* (CNA), *C. glabrata* (*Nakaseomyces glabrata*) tem sido a
 6 segunda espécie mais frequente em pacientes idosos (> 60 anos) e em pacientes transplantados
 7 de órgãos sólidos, nos Estados Unidos e Nordeste da Europa. Na América Latina, sul da Europa,
 8 Índia e Paquistão, *C. parapsilosis* ou *C. tropicalis* são identificadas com mais frequência
 9 (Figura 2) (Pappas *et al.*, 2018).

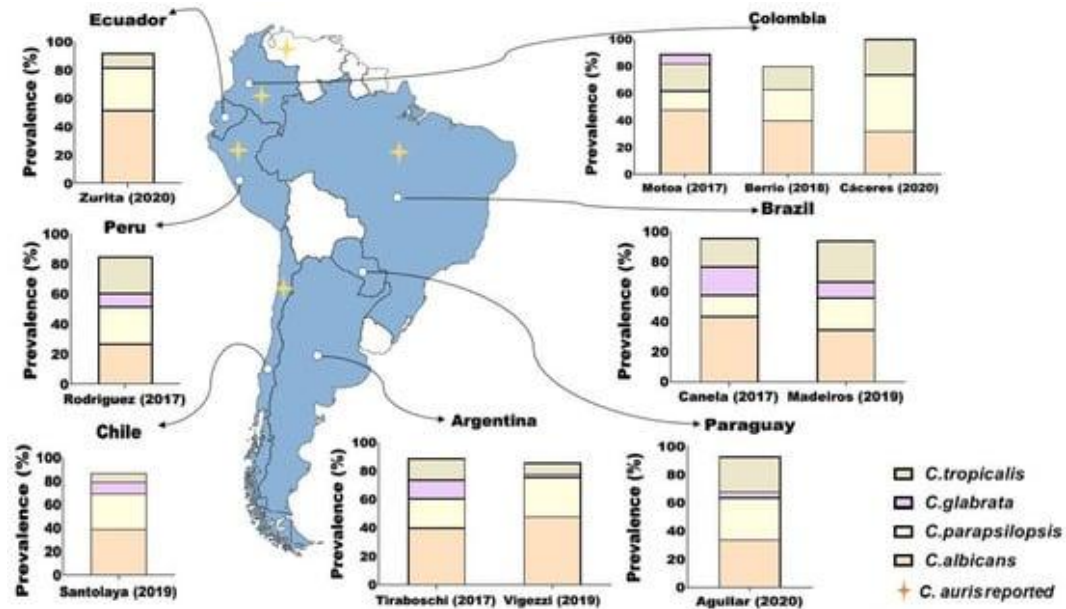
10 Recentemente, Keighley e colaboradores (2024) em sua revisão sistemática, relataram
 11 a limitação de dados referentes a prevalência de *C. tropicalis* em diferentes regiões, porém
 12 relataram a incidência dessa espécie na Austrália, Espanha e Taiwan.
 13



14 **Fonte:** Pappas *et al.*, 2018.

15 **Figura 2.** Distribuição global e epidemiologia de espécies de *Candida* não-albicans, evidenciando a prevalência
 16 (%) de *Candida glabrata* (*Nakaseomyces glabrata*), *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* em diferentes
 17 países e períodos específicos.
 18

19
 20 A epidemiologia das infecções por CNA no Brasil, particularmente os casos de
 21 candidemia, tem variado ao longo do tempo, por exemplo de *C. parapsilosis* (2007 – 2010)
 22 para *C. tropicalis* (2017 – 2019) (Figura 3). No nordeste brasileiro, a espécie mais prevalente é
 23 *C. tropicalis* enquanto na região norte, *C. glabrata*, (*N. glabrata*) predomina. Na região sudeste
 24 no país, *C. parapsilosis* se destaca sendo a CNA mais isolada do gênero (Pappas *et al.*, 2018;
 25 Rieira *et al.*, 2022).



2 **Fonte:** Rieira *et al.*, 2022).

3 **Figura 3.** Epidemiologia da candidemia global entre 2002 e 2015, com destaque para a prevalência de *Candida*
 4 *glabrata* (*Nakaseomyces glabrata*), *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* em regiões específicas.

5
 6 Em humanos, a colonização por *Candida* spp, é considerada um dos fatores de risco
 7 para infecção subsequente, visto que essas leveduras são encontradas como comensais da pele,
 8 do trato gastrointestinal, respiratório e geniturinário. Espécies deste gênero estão presentes em
 9 até 60% dos indivíduos saudáveis, o que pode explicar sua alta prevalência em relação a outros
 10 patógenos oportunistas (Safavieh *et al.*, 2017; Pappas *et al.*, 2018).

11 Os principais fatores de risco para infecções por *Candida* incluem doenças
 12 imunossupressivas, transplantes de células-tronco ou órgãos sólidos, uso de antibióticos e
 13 corticoides de amplo espectro, intervenções invasivas, diabetes mellitus, quimioterapia,
 14 alimentação parenteral, próteses internas, hospitalização prolongada e hemodiálise (Antinori *et*
 15 *al.*, 2016; Czechowicz; Nowicka; Gościński, 2022). Além desses fatores de risco gerais, *C.*
 16 *glabrata* (*N. glabrata*) é comumente identificada em pessoas vivendo com o vírus da
 17 imunodeficiência humana (PVHIV), pacientes com tuberculose, naqueles em Unidade de
 18 Terapia Intensiva (UTI), portadores de diabetes, terapia antibiótica e hospitalização prolongada.
 19 Além disso, essa espécie é frequentemente isolada em pacientes com faixa etária acima de 50
 20 anos, quando comparada com outras faixas etárias (Hassan, Chew, Than, 2021; Beardsley *et*
 21 *al.*, 2024).

22 Pacientes cirúrgicos (particularmente os submetidos à cirurgia do trato
 23 gastrointestinal), PVHIV, pacientes com uso prolongado de cateter venoso central e outros
 24 dispositivos permanentes, apresentam riscos de infecção por *C. parapsilosis* (Branco *et al.*,

2023). A presença de *C. krusei* (*P. kudriavzevii*) é frequentemente documentada em pacientes pediátricos, doenças gastrointestinais, exposição prévia a carbapenêmicos, pacientes com malignidades hematológicas, neutropenia e uso prévio de azóis (Nguyen *et al.*, 2024).

Além dos fatores predisponentes de risco no hospedeiro, *Candida* spp. codificam fatores de virulência, essenciais para o estabelecimento da infecção. Esses fatores incluem adesinas, que auxiliam na adesão; enzimas hidrolíticas, que quebram moléculas para obtenção de nutrientes e a invasão tecidual; e o dimorfismo, caracterizado pela transição morfológica. Além disso, esses fungos têm a capacidade de formar biofilmes, estruturas que protegem contra agentes antimicrobianos e a ação do sistema imunológico (Czechowicz; Nowicka; Gościński, 2022). Assim, o funcionamento adequado do sistema imunológico é vital para a manutenção da homeostase. Entretanto, a expressão dos fatores de virulência, aliada ao enfraquecimento do sistema imunológico, permite que as leveduras se proliferem e desencadeiem infecções (Pappas *et al.*, 2018).

2.2 *Candida tropicalis*

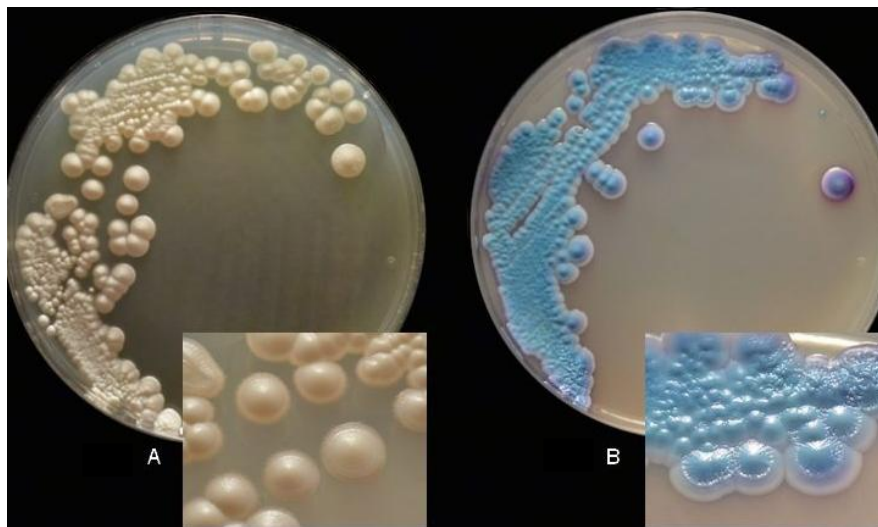
C. tropicalis originalmente isolada de um paciente com bronquite fúngica, foi descrita pela primeira vez em 1910 pelo patologista e bacteriologista Aldo Castellani, que a nomeou como *Oidium tropicale*, e posteriormente renomeada para *C. tropicalis* (Negri *et al.*, 2012; Zuza-Alvez; Silva-Rocha; Chaves., 2017).

C. tropicalis pode colonizar diferentes locais do corpo humano incluindo pele, trato gastrointestinal e geniturinário, estendendo também ao trato respiratório (Pereira *et al.*, 2022). Entretanto pode causar infecção, com alta incidência na corrente sanguínea em pacientes com malignidade hematológica, neutropenia, exposição antifúngica prévia, admissão na UTI, ventilação mecânica, uso de cateter ou quimioterapia e cirurgia prévia. (Ye *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2023).

Adicionalmente, Keighley e colaboradores (2024) evidenciaram por meio de uma revisão sistemática que os riscos para o desenvolvimento de infecção invasiva por *C. tropicalis* incluíram leucemia (*Odds ratio* 4,77) e doença pulmonar crônica (*Odds ratio* 2,62). Ademais, a insuficiência renal também foi associada a candidemia por *C. tropicalis*. Além disso, os autores relataram que pacientes internados na unidade de terapia intensiva pediátrica com infecção invasiva por *C. tropicalis* tiveram maior probabilidade de apresentar neutropenia prolongada em comparação com infecções causadas por outras espécies de *Candida* (42% versus 7,5%).

1 Macroscopicamente, em ágar Sabouraud dextrose, as colônias de *C. tropicalis* podem
2 apresentar colorações que variam de branco a creme, com texturas lisas ou rugosas. Esta espécie
3 é capaz de realizar *switching* fenotípico, crescendo como colônias branca/creme lisa ou
4 branca/creme rugosa (Perini *et al.*, 2019). Além disso, em meio cromogênio *C. tropicalis*
5 apresenta coloração característica (azul) (Figura 4). Microscopicamente, as leveduras aparecem
6 como blastoconídeos esféricos ou ovoides em brotamento, ou na forma de pseudo-hifas,
7 medindo aproximadamente 4–8 µm. Esta levedura possui um genoma de cerca de 14,5 Mb,
8 contendo aproximadamente 6.258 genes que codificam proteínas e um conteúdo de guanina-
9 citosina (G-C) de 33,1%. *C. tropicalis* é capaz de fermentar galactose, sacarose, maltose e
10 trealose (Zuza-Alvez; Silva-Rocha, Chaves 2017).

11



12

13 **Fonte:** Kasvi.14 **Figura 4.** Cultivo de *C. tropicalis* em dois meios de cultura. *C. tropicalis* em ágar Sabouraud (a) e *C. tropicalis*
15 em ágar Chromagar KASVI, exibindo uma coloração azul característica (b).

16

17 Existem divergências na literatura sobre a capacidade de *C. tropicalis* produzir hifas
18 verdadeiras. Embora alguns relatos indiquem essa habilidade, a maioria dos isolados apresenta
19 resultados negativos no ensaio de tubo germinativo em presença de soro. Estudos sugerem que
20 substâncias encontradas no sítio biológico são necessárias para que *C. tropicalis* produza tubos
21 germinativos. Além disso, isolados provenientes de áreas ricas em secreções e mucosas podem
22 conter substratos que estimulam a formação de tubos germinativos nesta espécie. Técnicas de
23 conservação, como a liofilização, realizadas com isolados de *C. tropicalis* positivos para tubo
24 germinativo, não conseguiram induzir a formação dessas estruturas quando foram reidratados
25 e cultivados (Martin, 1979; Negri *et al.*, 2012).

1 Em relação ao seu habitat, *C. tropicalis* já foi identificada em diversos nichos
2 ecológicos, incluindo superfícies de frutas em supermercados, bebidas e alimentos fermentados,
3 lodo de esgoto (Wang *et al.*, 2012), água de catifeiro de mamíferos aquáticos e fezes de aves
4 em áreas urbanas (Takahashi *et al.*, 2010). Em animais não humanos, essa levedura foi descrita
5 como parte da microbiota do trato digestivo de diferentes insetos, camarões da Amazônia,
6 répteis, aves de rapina, calopsitas, mamíferos aquáticos em catifeiro, intestino de pandas,
7 mucosas e peles de mamíferos, rúmen de cabras, conjuntivas de cavalos, além da pele, mucosas
8 e trato genital de cães (Brito *et al.*, 2007; Brito *et al.*, 2009; Sidrim *et al.*, 2010; Brillhante *et al.*,
9 2012; Priji *et al.*, 2013; Hamad *et al.*, 2014).

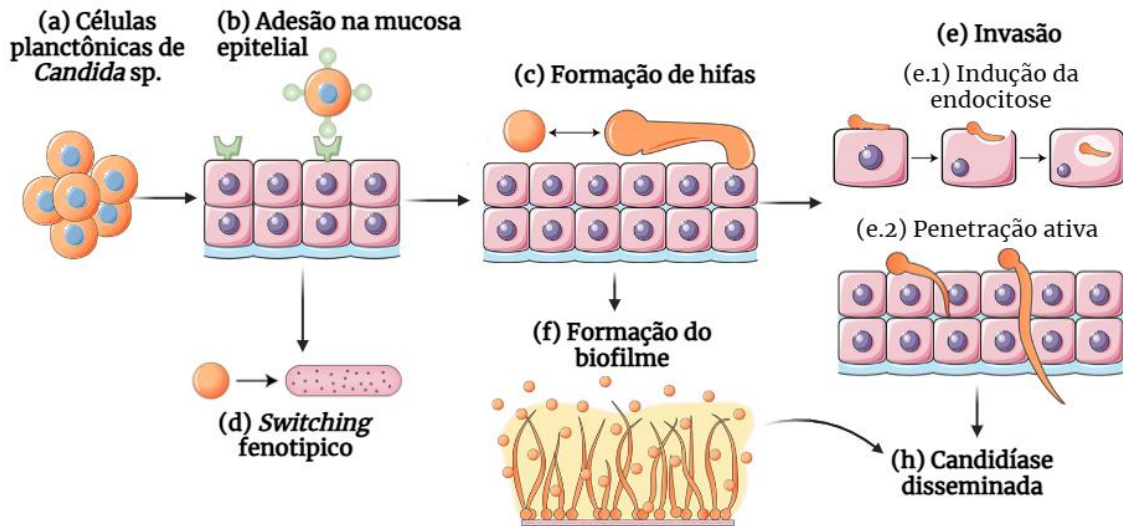
10 **2.3 Patogênese das infecções por *Candida* spp.**

11 A patogênese por *Candida* spp (Figura 5) começa em torno de quatro horas após o
12 contato da levedura com as células epiteliais do hospedeiro, por meio de interações
13 inespecíficas (hidrofobicidade da superfície celular) e específicas (adesinas). Dentro dos
14 macrófagos, as aspartil proteases secretadas (SAP – *Secreted Aspartil Proteases*) pelas
15 leveduras ajudam na evasão do sistema imune e aumentam a capacidade de penetração na
16 mucosa (Kothavade *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2014; May, Casadevall, 2018).

17 Entretanto, devido à estrutura do epitélio da mucosa oral (epitélio pavimentoso
18 estratificado queratinizado e não queratinizado) e vaginal (epitélio pavimentoso estratificado
19 não queratinizado) a probabilidade de invasão por endocitose induzida é reduzida. Como
20 alternativa, as espécies de *Candida* utilizam a penetração ativa (Figura 5 e.2), que é mediada
21 pela formação de hifas, essenciais para a invasão (Figura 5.c). Em resumo, a patogênese começa
22 com a adesão às células epiteliais (Figura 5.a), seguida pela colonização da levedura na região,
23 penetração epitelial por hifas, disseminação vascular e penetração endotelial (Mba, Nweze,
24 2020).

25 Na candidíase disseminada (Figura 5.h), a levedura penetra os tecidos vasculares do
26 endotélio e atinge a corrente sanguínea. A entrada da levedura pode ocorrer de duas formas,
27 entrada natural (através da penetração das células epiteliais nas superfícies celulares da mucosa)
28 e entrada artificial (por meio da implantação de dispositivos médicos, cirurgia ou esgotamento
29 da microbiota natural por tratamento com antibióticos (Deorukhkar, Roushani, 2017).

30



1
2 **Fonte:** Adaptada de Ahmed *et al.*, 2022.

3 **Figura 5.** Patogênese de *Candida* spp. Células planctônicas de *Candida* spp. expressam adesinas (a) que auxiliam
4 na fixação às superfícies das células hospedeiras (b). Estímulos ambientais induzem genes associados à morfologia
5 e estimulam a transição de levedura para hifa (c). Algumas *Candida* spp. exibem *switching* fenotípico, ou seja,
6 células brancas para opacas (d). As duas rotas de invasão (e) de *Candida* spp. são as seguintes: endocitose induzida
7 (e.1), onde as células fúngicas são engolfadas pela célula hospedeira, e penetração ativa (e.2), onde as enzimas
8 fúngicas medeiam a penetração no tecido hospedeiro. Algumas *Candida* spp. formam biofilmes após a fixação a
9 superfícies bióticas e abióticas (f) e quando entram na corrente sanguínea são disseminadas (h) para órgãos vitais,
10 causando candidíase disseminada.

11
12 Alguns autores sugerem que CNA são menos patogênicas do que *C. albicans*, uma vez
13 que algumas espécies não produzem filamentos de forma tão robusta e rápida quanto *C.*
14 *albicans* (Mba, Nweze, 2020). Um estudo conduzido por Luckey e colaboradores (2013)
15 mostrou que eventos transcricionais importantes associados à filimentação de *C. albicans*
16 parecem ser parcialmente conservados em CNA. Por exemplo, a expressão do gene *UME6*, um
17 ativador transcricional, é fortemente induzida durante a filimentação de *C. albicans*, e foi
18 observado um padrão de expressão semelhante em *C. tropicalis*, indicando conservação do gene
19 e sua função em ambas as espécies. O gene *NRG1* mantém sua função como repressor da
20 filimentação em *C. albicans*; no entanto, quando *C. tropicalis* foi exposta a condições indutoras
21 e não indutoras de filimentação, não houve diferença significativa na expressão desse gene
22 repressor (Mba, Nweze, 2020).

23 Para entender melhor a relação entre transição levedura-filamento e patogenicidade
24 das espécies de CNA, Banerjee e colaboradores (2019) realizaram um estudo *in vivo* em
25 camundongos utilizando cepas geneticamente modificadas de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*
26 (*tetO-UME6*) para expressão constitutiva de *UME6*, resultando em filimentação.
27 Supreendentemente, para ambas as espécies a expressão de *UME6* resultou em redução na carga
28 fúngica nos órgãos de camundongo. As evidências desse estudo, sugere que o aumento na

1 filamentação em *C. tropicalis* está relacionado a patogenicidade reduzida, em vez de
2 aumentada.

3 Isso indica que existem diferenças fundamentais na patogênese das infecções de
4 diferentes espécies de *Candida*. Esses resultados contrastam com a visão tradicional de que
5 CNA são menos patogênicas do que *C. albicans*, devido à sua menor capacidade de
6 filamentação. Outras características de virulência, além da filamentação, podem ter um papel
7 mais significativo na patogenicidade de determinadas espécies de CNA.

8 **2.3.1 Fatores de virulência de *Candida* spp.**

9 A patogenicidade se refere à habilidade intrínseca de um microrganismo induzir danos
10 em um hospedeiro, enquanto a virulência é caracterizada pelo grau do dano provocado por esse
11 microrganismo. Este dano ocorre pela perturbação da função normal do hospedeiro em diversos
12 níveis, levando a manifestação clínica, conhecida como doença. A virulência, por sua vez, pode
13 originar-se diretamente da ação do microrganismo. Os fatores de virulência são definidos como
14 as propriedades do agente patogênico que, quando removidas, comprometem seu potencial de
15 causar danos no hospedeiro, sem afetar sua viabilidade (Siscar-Lewin, Hube, Brunke, 2019).

16 As espécies de *Candida* apresentam diversos fatores de virulência que desempenham
17 papel crucial na instauração da patologia no hospedeiro. Dentre esses fatores, podemos citar:
18 habilidade de crescer a 37 °C, secreção de enzimas hidrolíticas, expressão de adesinas,
19 formação de biofilme etc. (Deorukhkar, Roushani, 2017).

20 **2.3.1.1 Enzimas hidrolíticas extracelulares de *Candida tropicalis***

21 Entre as enzimas encontradas no gênero *Candida*, destacam-se as fosfolipases, lipases,
22 proteases e o fator hemolítico. As fosfolipases atuam na hidrólise de fosfolipídios, convertendo-
23 os em ácidos graxos e causando danos à membrana celular do hospedeiro. Esse processo de
24 hidrólise expõe receptores na membrana das células hospedeiras, facilitando a aderência das
25 leveduras (Schaller *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2012). Cada fosfolipase catalisa a hidrólise em
26 posições específicas de uma molécula de fosfolipídio e é classificada de acordo com a ligação
27 éster que cada enzima tem como alvo. As fosfolipases (PL) são divididas em PLA1, PLA2,
28 PLB, PLC e PLD, cada uma desempenhando um papel crucial na digestão e na dinâmica
29 estrutural da membrana celular (Stahelin, 2016; Calder, 2015; Deorukhkar, Roushani, 2017).

30 Em *C. tropicalis*, a literatura indica uma baixa produção dessa enzima, embora essa
31 variabilidade possa estar relacionada à cepa utilizada e ao local de isolamento da levedura
32 (Galan-Ladero *et al.*, 2010; Negri *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2012; Sharma; Chumber; Kaur,

1 2017). Chin e colaboradores (2013) avaliaram isolados de hemocultura e observaram que
2 apenas três dos oito isolados de *C. tropicalis* foram capazes de produzir PL. Deorukhkar, Saini
3 e Mathew (2014) relataram maior produção de PL em *C. tropicalis* isoladas da vagina. Sharma
4 e colaboradores (2017) analisaram 17 isolados de diferentes espécimes clínicos e 30% (5
5 espécimes clínicos) apresentaram atividade desta enzima. Em contrapartida, Atalay *et al.* (2015)
6 não identificaram atividade enzimática da PL em isolados provenientes de hemoculturas.
7 Outros estudos indicam que cepas ambientais e isolados de diversas espécies de animais
8 apresentam uma capacidade reduzida de produzir PL *in vitro* (Cordeiro *et al.*, 2015a; Zuzá-
9 Alves *et al.*, 2016). A inconsistência nos relatos sobre a produção desta enzima por *C. tropicalis*
10 ressalta a necessidade de investigações mais aprofundadas para esclarecer de forma conclusiva
11 o perfil e o papel de PL nesta espécie.

12 Diferentemente das PL, as lipases produzidas por *Candida* quebram lipídios em ácidos
13 graxos e glicerol, desempenhando um papel importante na digestão de gorduras e contribuindo
14 para a sobrevivência da levedura em ambientes ricos em lipídios, bem como na interação com
15 macrófagos e na modulação da resposta inflamatória do hospedeiro. Em *C. albicans*, dez genes
16 codificam lipases (LIPs), enquanto *C. tropicalis* possui cinco genes responsáveis pela
17 codificação dessas enzimas (Butler *et al.*, 2009; Deorukhkar e Roushani, 2017).

18 Dentre as enzimas extracelulares, as proteinases são as mais relevantes devido à sua
19 capacidade de degradar uma ampla variedade de proteínas (Deorukhkar e Roushani, 2017;
20 Pappas *et al.*, 2018). As proteinases desempenham um papel fundamental na aquisição de
21 nutrientes, fornecendo fontes essenciais de nitrogênio para as células fúngicas. Elas são
22 classificadas em quatro categorias: serina proteinase, aspartil proteinase, cisteína proteinase e
23 metaloproteinase. No gênero *Candida* as aspartil proteinases secretadas (SAP, *Secreted*
24 *aspartyl proteinase*) hidrolisam ligações peptídicas e atuam em conjunto com as PL nas células
25 do hospedeiro. As SAP são divididas em exopeptidases e endopeptidases (Mba e Nweze, 2020).
26 As Saps em *Candida* são codificadas por uma família de dez genes, inicialmente identificados
27 em *C. albicans*, e posteriormente descritos em outras espécies, como *C. tropicalis*, que possui
28 cerca de quatro genes específicos. Estudos *in vitro* mostraram níveis elevados de Saps em *C.*
29 *tropicalis* cultivada em meio com soro bovino, ressaltando sua importância na resposta
30 adaptativa do fungo a ambientes específicos (França *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2012;
31 Deorukhkar, Saini e Mathew, 2014).

32 As hemolisinas desempenham um papel crucial na aquisição de ferro, fundamental
33 para a adaptação e sobrevivência de *Candida* spp. As hemolisinas são classificadas em três
34 tipos: beta (hemólise completa), alfa (hemólise incompleta) e gama (sem hemólise). Luo,

1 Samaranayake e Yau (2001) avaliaram a atividade hemolítica de diversas espécies de *Candida*,
2 incluindo, *C. tropicalis* recuperadas de diferentes espécimes clínicos e evidenciaram que os
3 cinco espécimes clínicos. Os resultados mostraram que todo os isolados de *C. tropicalis*,
4 produzindo hemólise beta. De acordo com Deorukhkar, Saini e Mathew (2014), isolados
5 clínicos de *C. tropicalis* demonstraram variações significativas na atividade hemolítica,
6 especialmente cepas isoladas da mucosa vaginal. Favero *et al.* (2011) mostraram que a
7 concentração de CO₂ não afeta a atividade hemolítica, mas que baixas concentrações de glicose
8 podem diminuir essa atividade. Além disso, *C. tropicalis* apresenta uma taxa de hemólise *in*
9 *vitro* superior à de *C. albicans* (Favero *et al.*, 2014; Riceto *et al.*, 2015). Em contraste, Anil *et*
10 *al.* (2014) observaram que *C. albicans* e *C. tropicalis* exibem padrões de hemólise semelhantes.
11 A produção de hemolisina aumenta na presença de eritrócitos humanos (Furlaneto *et al.*, 2015)
12 e diminui significativamente sob condições de limitação de ferro (França, Furlaneto-Maia e
13 Furlaneto, 2017).

14 A variação na produção e atividade de hemolisinas entre diferentes cepas e condições
15 reforça a necessidade de estudos mais detalhados para compreender completamente seus papéis
16 na virulência e adaptação das espécies de *Candida*.

17 **2.3.1.2 Capacidade de adesão em *C. tropicalis***

18 A adesão das leveduras às células do hospedeiro é o primeiro passo na patogênese de
19 *Candida* (Figura 5b), essencial para a sobrevivência fúngica. Além disso, permite que esses
20 locais atuem como reservatórios de infecção. Em ambientes nutritivos, as leveduras aderidas
21 podem crescer e formar biofilmes, facilitando a disseminação da infecção (Mba, Nweze, 2020).

22 A família genica *ALS* (Sequência semelhante à aglutinina - *agglutinin-like sequence*),
23 associada à adesão a superfícies do hospedeiro, foi primeiramente descrita em *C. albicans* por
24 Hoyer *et al.* (2001), mas também está ligada a adesão em CNA. Uma análise filogenética
25 identificou 16 genes *ALS* em *C. tropicalis* (Butler *et al.*, 2009), e a expressão desses genes varia
26 conforme o hospedeiro e as condições ambientais (Zuza-Alvez, Silva-Rocha, Chaves, 2017).

27 O processo de adesão ocorre em duas etapas: adesão reversível e adesão irreversível.
28 Na primeira etapa, interações eletrostáticas fracas (como as de van der Waals) ocorrem entre as
29 leveduras e o substrato, podendo ser removidas por métodos físicos, como enxágue. Na segunda
30 etapa, interações como ligações de hidrogênio, ligações covalentes e forças hidrofóbicas
31 consolidam a adesão. Após esse processo, apenas métodos físicos e químicos mais intensos
32 conseguem desfazer a adesão (Dos Santos; Ishida, 2023).

1 Embora todas as adesinas fúngicas promovam a interação entre células ou superfícies,
2 elas atuam de maneiras distintas, classificando-se em adesão dependente de açúcar e adesão
3 independente de açúcar. Na adesão dependente de açúcar, as adesinas se conectam a resíduos
4 de açúcar na superfície de outras células, possuindo uma região denominada "domínio de
5 ligação a carboidratos", semelhante a uma lectina. Por outro lado, a adesão independente de
6 açúcar é mediada por adesinas que se ligam a peptídeos ou que aumentam a parte "hidrofóbica"
7 da superfície celular, facilitando interações entre as células e certas superfícies abióticas
8 (Verstrepen, Klis, 2006; Núñez-Beltrán *et al.*, 2017).

9 *C. albicans*, apresenta melhor adesão na presença de O₂ (em condições aeróbicas ou
10 microaeróbicas com 5% de O₂), enquanto *C. tropicalis* demonstra boa adesão tanto em
11 condições aeróbicas e microaeróbicas (5% de O₂) quanto em condições anaeróbicas. Além das
12 condições de O₂, a adesão de *C. tropicalis* também pode ser influenciada pela temperatura,
13 apresentando adesão máxima a 37 °C, com um declínio acima dessa temperatura e abaixo de
14 34 °C. Além disso, *C. tropicalis* é a segunda espécie, depois de *C. albicans*, com melhor
15 capacidade em aderir às células epiteliais bucais humanas (Dos Santos; Ishida, 2023; Souza *et*
16 *al.*, 2023).

17 Em contrapartida, Okawa e colaboradores (2008) revelaram que a taxa de adesão de
18 *C. tropicalis* em células HeLa é semelhante à observada em *C. albicans*. Em estudos realizados
19 por Negri e colaboradores (2011), os pesquisadores notaram variações na taxa de adesão de *C.*
20 *tropicalis*, sendo mais aderente em células intestinais (Caco-2) do que em células cervicais
21 (HeLa) e urinárias (TCC-SUP). Souza *et al.* (2020) reportaram que isolados de *C. tropicalis*
22 exibem maior adesão a células HeLa do que à células renais (Vero).

23 A adesão de *C. tropicalis* desempenha um papel significativo em infecções
24 relacionadas a cateteres sanguíneos, correspondendo a 3,8% das infecções em adultos e 1,3%
25 em crianças (Phua *et al.*, 2019). Pesquisas indicam que *C. tropicalis* derivada de infecções
26 sanguíneas associadas a cateteres apresenta uma capacidade aumentada de aderir a microesferas
27 de poliestireno, em comparação com outras superfícies. As infecções urinárias por *C. tropicalis*
28 estão majoritariamente ligadas a cateteres de demora (83%), que requerem um tratamento
29 prolongado e podem resultar em elevadas taxas de mortalidade em relação a outras espécies de
30 *Candida* (Zuo *et al.*, 2021; Aslan e Gülmez, 2016).

31 Próteses e cateteres podem se tornar reservatórios de biofilmes fúngicos, criando um
32 ambiente interno com células infecciosas altamente resistentes a medicamentos. Biomateriais
33 com alta rugosidade, porosidade e hidrofobicidade favorecem a adesão das leveduras. Assim, a

1 capacidade de aderir a superfícies abióticas, como próteses plásticas e cateteres, facilita o acesso
2 à corrente sanguínea (Souza *et al.*, 2023).

3 **2.3.1.3 Formação de biofilme em *Candida tropicalis***

4 O biofilme é uma comunidade de microrganismos que se fixa em superfícies sólidas
5 ou líquidas, envolta em uma matriz extracelular (MEC) produzida por eles mesmos. Essa matriz
6 oferece proteção contra agentes externos e facilita a sobrevivência, permitindo a troca de
7 nutrientes e a comunicação entre as células. Biofilmes são estruturas dinâmicas que podem se
8 formar em diversos ambientes e têm papéis importantes em processos biológicos, como a
9 degradação de poluentes e a colonização de superfícies vivas (Panariello *et al.*, 2017).

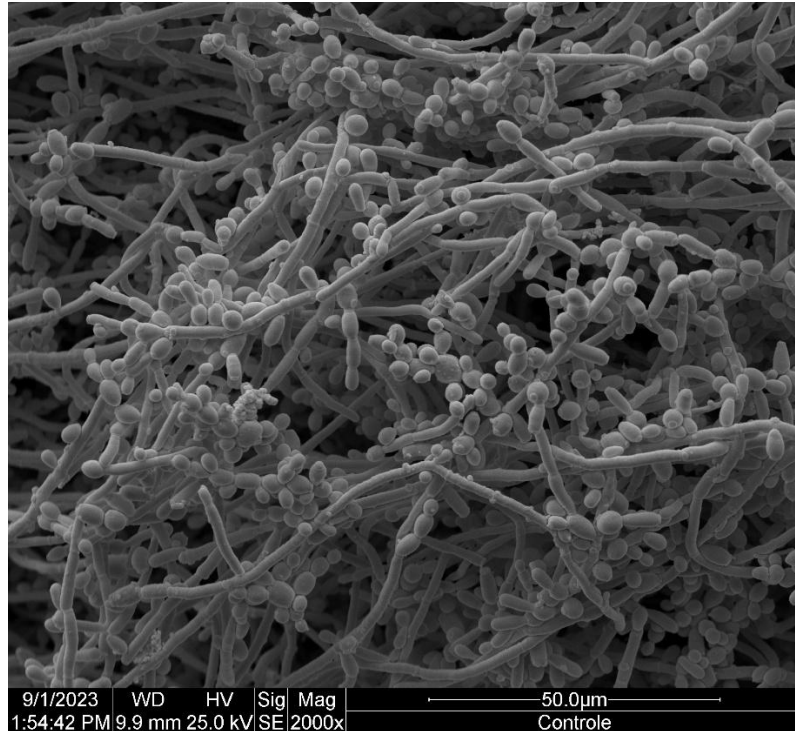
10 *C. tropicalis* é uma das principais espécies produtoras de biofilme em comparação com
11 outras espécies patogênicas de *Candida* (Al-Fattani e Douglas., 2006; Cavalheiro, Teixeira.,
12 2018; Souza *et al.*, 2023). A formação de biofilme *in vitro* por *C. tropicalis* ocorre em quatro
13 etapas principais: primeiro, as células de levedura aderem e colonizam uma superfície; em
14 seguida, elas crescem e proliferam, formando uma camada basal. Depois, desenvolvem-se
15 pseudo-hifas e/ou hifas verdadeiras, junto à secreção de MEC que envolve os microrganismos
16 até que o biofilme atinge sua maturação. Na fase final, chamada de dispersão, células se
17 desprendem do biofilme, migrando para outros locais para formar novos biofilmes (Bizerra *et*
18 *al.*, 2008; Zuza-Alvez, Silva-Rocha, Chaves., 2017; Cavalheiro, Teixeira., 2018).

19 Os biofilmes maduros de *Candida* revelam uma arquitetura tridimensional complexa
20 evidenciando rede densa e heterogênea com estruturas típicas de leveduras, hifas e pseudo-
21 hifas, com rede de canais aquosos, cercados pela MEC. Essa organização estrutural elaborada
22 favorece uma distribuição eficiente de nutrientes, a eliminação de resíduos e a criação de
23 microambientes ao longo do biofilme, promovendo o desenvolvimento dos canais aquosos e
24 das microcolônias (Figura 6) (Bizerra *et al.*, 2008; Silva-Rodrigues *et al.* 2024).

25

26

27



1
2 **Fonte:** o próprio autor.

3 **Figura 6.** Ultraestrutura e morfologia de biofilmes de *Candida tropicalis* ATCC 28707, formados em superfície
4 de poliestireno por 48 h à 37 °C.

5 O *quorum sensing* (QS) desempenha um papel fundamental para a formação e
6 maturação do biofilme, onde moléculas sinalizadoras respondem aos estímulos ambientais. Um
7 exemplo é o farnesol, um sesquiterpeno, que regula a formação de biofilme e influencia a
8 expressão de genes relacionados a sua formação. Estudos exploraram o impacto do farnesol na
9 formação do biofilme de *C. tropicalis*, revelando sua capacidade de inibir a agregação celular
10 e influenciar as células do biofilme maduro, possivelmente afetando sua disseminação pelo
11 organismo (Weber; Schulz; Ruhnke, 2010; Rodrigues; Černáková, 2020).

12 Ferreira e colaboradores (2016) avaliaram a formação de biofilme de *C. tropicalis* de
13 isolados clínicos vaginais, orais e urinários em diferentes pH (3, 4, 7 e 8). Os pesquisadores
14 observaram que em geral *C. tropicalis* teve um aumento na biomassa total em pH 7 e 8 em
15 comparação com pH 3 e 4, sendo que os biofilmes formados por espécimes clínicos urinários,
16 em pH 8 apresentaram maiores valores de biomassa. Esses dados, demonstram a capacidade de
17 adaptação a diferentes nichos, o que é um fator importante relacionado ao seu potencial de
18 virulência, pois as infecções podem ocorrer em lugares com diferentes valores de pH.

19 Uma revisão realizada por Silva e colaboradores (2017), reportou que *C. tropicalis*
20 está associada a formação de biofilme em articulações protéticas, infecção endodôntica e em
21 colite ulcerativa, evidenciando sítios de infecções com valores de pH variados. Adicionalmente,
22 essa espécie é capaz de formar biofilme em diversos materiais utilizados na fabricação de

1 dispositivos médicos, como cateteres de poliuretano, cloreto de polivinila, teflon, silicone,
 2 látex, policarbonato e poliestireno (Bizerra *et al.*, 2008; Estivill *et al.*, 2011; Negri *et al.*, 2011;
 3 Salvatore *et al.*, 2021; Silva-Rodrigues *et al.*, 2024).

4 A MEC de *C. tropicalis* é composta por: hexosaminas (27,4%), carboidratos (3,3%,
 5 incluindo 0,5 % de glicose), proteínas (3,3%), fósforo (0,2%), ácido urônico (1,6%) e ácidos
 6 nucleicos. Além disso, β -1,3-glucano, β -1,6-glucano e α -manana, formam um complexo que
 7 compreende 13,5% da MEC nessa espécie. Apesar de *C. tropicalis* possuir uma MEC com
 8 baixo teor de carboidratos e proteínas em comparação com *C. albicans*, os biofilmes dessa
 9 espécie são mais resistentes ao descolamento do substrato quando comparado à *C. albicans*
 10 (tabela 1).

11
 12 **Tabela 1.** Composição da matriz extracelular extraído de biofilmes de *C. albicans* GDH 2346
 13 e *C. tropicalis* AAHB 73.

14

| Composição | <i>C. albicans</i> (%) | <i>C. tropicalis</i> (%) |
|---------------|------------------------|--------------------------|
| Carboidrato | 39,6 ± 0,3 | 3,3 ± 0,0 |
| Glicose | 32,2 ± 1,5 | 0,5 ± 0,0 |
| Hexosamina | 3,3 ± 0,6 | 27,4 ± 0,2 |
| Fósforo | 0,5 ± 0,0 | 0,2 ± 0,0 |
| Proteína | 5,0 ± 0,1 | 3,3 ± 0,0 |
| Ácido urônico | 0,1 ± 0,0 | 1,6 ± 0,0 |

15 **Fonte:** Adaptado de Al-Fattani e Douglas., 2006.

16

17 Embora ainda não exista uma estratégia definitiva para tratar biofilmes de *Candida*,
 18 algumas abordagens promissoras estão em desenvolvimento. Atualmente, duas estratégias têm
 19 mostrado bons resultados. A primeira, chamada "lock", visa prevenir a formação de biofilme
 20 em cateteres antes do uso clínico, infundindo uma alta concentração de agente antimicrobiano
 21 no lúmen do cateter para atuar por horas ou dias, reduzindo a toxicidade sistêmica ao focar a
 22 ação no cateter. A segunda envolve o revestimento do cateter; embora estudos com
 23 nanomateriais se concentrem mais na eliminação de bactérias, já existem pesquisas explorando
 24 revestimentos modificados para combater biofilmes de *C. albicans* (Cavalheiro e Teixeira,
 25 2018).

2.4 Infecções causadas por *Candida tropicalis*

As infecções causadas por *C. tropicalis*, podem ser endógenas ou exógenas. Infecções endógenas ocorrem quando as leveduras presentes no hospedeiro encontram um ambiente propício para instalar a infecção, enquanto a infecção exógena, ocorre por meio de pessoas ou instrumentos médicos contaminados ou fômites (Dos Santos; Ishida, 2023).

C. tropicalis já foi descrita causando desde infecções superficiais e localizadas até infecções invasivas e disseminadas. Dentre os quadros clínicos já descritos em humanos, podemos citar: candidemia (Fernández-Ruiz *et al.*, 2015); espondilodiscite (Adelhoefer *et al.*, 2023); onicomicose (Yazdanpanah *et al.*, 2023); bezoares causando obstrução no trato urinário (Alrabadi *at al.*, 2023); candidíase ocular (Sano *et al.*, 2023); endocardite (Bauer *et al.*, 2019); artrite (Sim *et al.*, 2005) e peritonite (Ramirez *et al.*, 2021). Além de infecções humanas, esta levedura já foi descrita em infecções em animais como mastite clínica e sub-clínica (Zaragoz *et al.*, 2011; Morales-Ubaldo *et al.*, 2023); gastroenterite em quelônios (Zwart; Buitelaar, 1980), candidúria em gatos e cachorros (Reagan *et al.*, 2019).

2.5 Diagnóstico das infecções por *Candida spp.*

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado por meio de diversas técnicas, incluindo testes microbiológicos baseados em morfologia, características bioquímicas e moleculares. As características morfológicas desempenham um papel crucial para os esquemas de identificação (Wang *et al.*, 2022). A técnica de microcultivo permite analisar as estruturas fúngicas típicas de cada espécie, sendo que *C. tropicalis* apresenta blastoconídios em cadeias simples ou ramificadas (Milan; Zaror; 2004). O meio CHROmagar *Candida* (Figura 4) é um meio cromogênico amplamente utilizado na rotina clínica para a detecção de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (*P. kudriavzevii*), permitindo diferenciá-las pela coloração do pigmento produzido no meio. A utilização desse meio possibilita um diagnóstico precoce, auxiliando o clínico na escolha do agente antifúngico mais adequado, contribuindo para a redução da morbidade e a mortalidade e a mortalidade dos pacientes (Ghelardi, 2008; Evren *et al.*, 2022).

Metodologias baseadas nas características bioquímicas das espécies também podem ser utilizadas para diferenciar as espécies de *Candida*. As provas de auxonograma (assimilação de carboidratos e nitrogênio) e zimograma (fermentação de determinados açúcares), são realizadas em meio solidificado acrescido da suspensão do microrganismo a ser testado e incubados por sete dias. *C. tropicalis* apresenta assimilação positiva de glicose, galactose, xilose, trealose, maltose e sacarose variável; fermentação positiva para glicose, galactose, trealose e maltose, podendo ou não fermentar a sacarose (Milan; Zaror; 2004; ANVISA 2010).

1 Em laboratórios de grande porte, metodologias manuais não são viáveis devido à alta
2 demanda por resultados rápidos. Nesse contexto, a utilização de metodologias
3 semiautomatizadas ou kits manuais torna-se essencial, pois facilitam a interpretação dos
4 resultados em menos tempo, diferenciando as espécies com base na capacidade de assimilação
5 de substratos. Embora esses kits, como API 20C Aux e API 32C, proporcionem resultados mais
6 rápidos do que as metodologias manuais, ainda levam cerca de 72 a 120 horas para a
7 identificação do isolado (Silva; Cândido, 2005; ANVISA 2010; Hippólito *et al.*, 2015).

8 Sistemas semiautomatizados, como o VITEK (BioMerieux), oferecem interpretação e
9 perfil de sensibilidade em aproximadamente 18 a 24 horas, o que acelera o diagnóstico. No
10 entanto, desvantagens como o alto custo do equipamento e dos cartões, um banco de dados
11 limitado e a incapacidade de detectar amostras mistas ou contaminadas podem comprometer a
12 identificação precisa da levedura por esse método (Oliveira *et al.*, 2006; Higashi *et al.*, 2015).

13 O MALDI-TOF (Espectrometria de Massa por Tempo de Voo com
14 ionização/dessorção a Laser Assistida por Matriz - *Matrix-Assisted Laser*
15 *Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*) permite a identificação rápida e
16 precisa de microrganismos diretamente de culturas, porém sua principal desvantagem é o alto
17 custo inicial de aquisição, manutenção do equipamento, custos operacionais com reagentes e
18 treinamento especializado, sendo um obstáculo para muitos laboratórios, especialmente em
19 países em desenvolvimento (Fal *et al.*, 2015; Evren *et al.*, 2022).

20 Para superar as limitações dos métodos diagnósticos convencionais, é aconselhável
21 considerar ensaios moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a PCR em
22 tempo real (qPCR), para a detecção do DNA da levedura. Atualmente, o painel T2Candida®
23 consegue identificar cinco espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C.*
24 *krusei* (*P. kudriavzevii*) e *C. glabrata* (*N. glabrata*) por meio de ressonância magnética,
25 fornecendo resultados em 3 a 5 horas a partir de amostras de sangue total. Este painel é o único
26 conjunto comercial aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) e apresenta resultados
27 rápidos com um baixo limite de detecção. O teste demonstra um desempenho satisfatório,
28 especialmente em amostras de sangue, com sensibilidade de 91,15% e especificidade de 99,4%
29 (Clancy; Nguyen, 2018; Monday; Parraga Acosta, 2021).

30 No entanto, o alto custo associado a esse ensaio representa uma barreira de acesso para
31 os serviços de saúde em países em desenvolvimento, já que cada teste de amostra individual
32 custa cerca de US\$ 300, além do elevado preço do equipamento. Em resumo, as técnicas
33 moleculares, mostram-se promissoras, mas são necessários estudos adicionais para validar sua

1 aplicação e integração nos procedimentos diagnósticos laboratoriais de rotina e na prática
2 clínica, assim como para a redução de custos (Félix *et al.*, 2023).

3 2.6 Antifúngicos e mecanismos de resistência

4 Atualmente, é amplamente reconhecido que existem quatro categorias principais de
5 antifúngicos disponíveis: equinocandinas, polienos, azóis e análogos de pirimidina. No entanto,
6 há também outros antifúngicos que não se encaixam nessas classes. Para uma apresentação mais
7 detalhada dos antifúngicos, na revisão a seguir, os mesmos serão classificados de acordo com
8 seus respectivos mecanismos de ação (Quadro 1).

9
10 **Quadro 1.** Alvos celulares e mecanismos de ação de diferentes classes de antifúngicos.

| Alvo celular | Mecanismo de ação | Classe | Antifúngicos |
|------------------|--|---------------------------|------------------------------|
| Parede celular | Ação indireta (β -glucano sintase) | Equinocandinas | Micafungina |
| | | | Caspofungina |
| Parede celular | Ação indireta (β -glucano sintase) | Triterpenoides | Anidulafungina |
| | | | Rezafungina* |
| Membrana celular | Ação direta (ergosterol) | Polienos | Anfotericina B |
| | | | Nistatina |
| Membrana celular | Ação indireta (biossíntese do ergosterol) | Azóis | Nitamicina |
| | | | Imidazóis (Ex: miconazol) |
| Núcleo | Ação direta (ácido ribonucleico - RNA) | Análogos de pirimidina | Triazois (Ex: fluconazol) |
| | | | Alilaminas |
| Divisão celular | Ação direta (tubulinas) | | terbinafina |
| | | | Amorolfina |
| | | | Flucitosina |
| | | | Griseofulvina |

11 **Fonte:** o próprio autor.

12 *ECOFFs para algumas espécies de *Candida* foram estabelecidos (incluindo para *C. tropicalis* – 0.03 mg/L);

13 **Ensaio clínico finalizados.

14

1 A resistência microbiana aos antifúngicos é resultado de múltiplos fatores e sugere
 2 uma série de mecanismos moleculares. O termo resistência pode ser definido como uma cepa
 3 que possui uma concentração inibitória mínima acima de um certo limite ou *breakpoint*
 4 específico para determinado antifúngico. A resistência clínica é caracterizada pela incapacidade
 5 de eliminar uma infecção fúngica após a administração de um agente antifúngico que apresenta
 6 atividade *in vitro* contra o microrganismo (Kanafani, Perfect, 2008; Berman, Krysan 2020).

7 2.6.1 Equinocandinas

8 As equinocandinas são recomendadas para tratamento de candidíase invasiva e
 9 esofágica e para aspergilose invasiva (Oliveira *et al.*, 2020). Dentre suas vantagens, está seu
 10 ótimo perfil de segurança, maior seletividade fúngica e menor potencial de interações
 11 medicamentosas. Um aspecto negativo do antifúngico é a administração que ocorre de forma
 12 intravenosa, visto que é pouco absorvido no trato gastrointestinal (< 3%) e não consegue
 13 penetrar no sistema nervoso central ou olhos, devido a isso não são utilizadas em casos de
 14 meningite ou infecções oculares (Lee *et al.*, 2020; Szymański *et al.*, 2022).

15 Os antifúngicos da classe das equinocandinas têm como alvo a parede celular fúngica
 16 e foi criada a partir de diversas modificações das pneumocandinas e pela biossíntese de alguns
 17 microrganismos. Atualmente existem quatro medicamentos nessa classificação, sendo eles:
 18 anidulafungina que deriva da equinocandinas B0 (Figura 7b), (*Aspergillus nidulans* e
 19 *Aspergillus rugulosus*) a caspofungina, da pneumocandina B0 (Figura 7a), (*glarea lozoyensis*),
 20 micafungina (*Coleophoma empetri*) e rezafungina, que foi sintetizado a partir de modificações
 21 estruturais da anidulafungina (Szymański *et al.*, 2022).

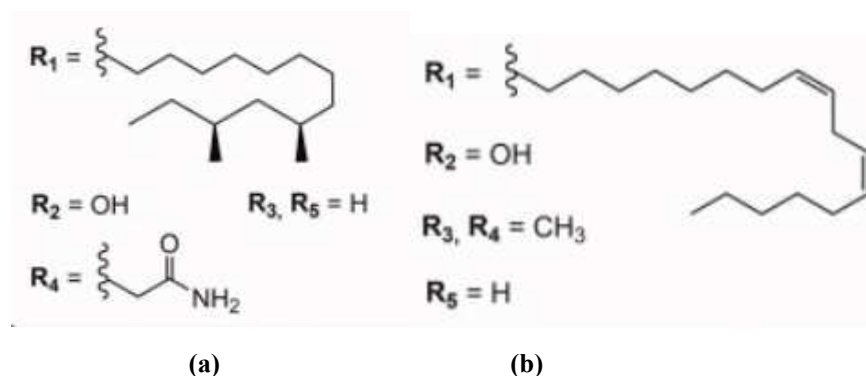
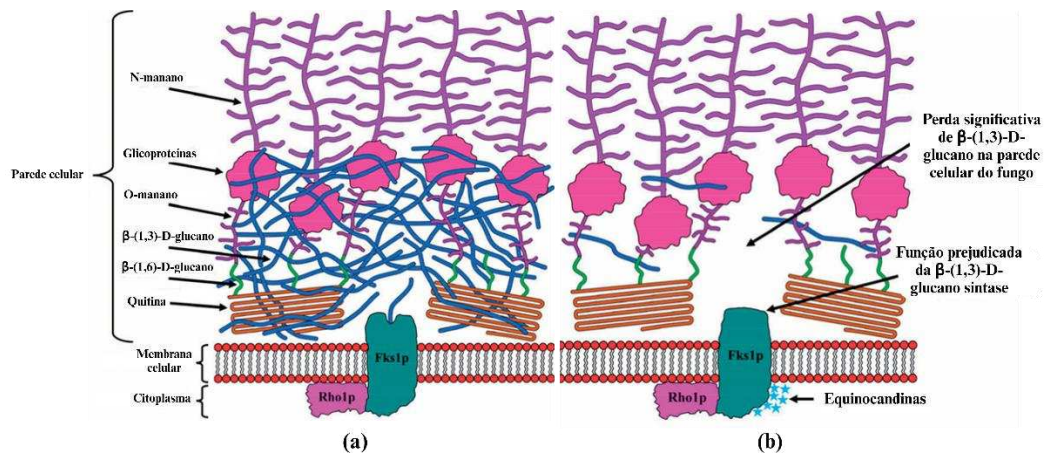


Figura 7. Estruturas químicas da pneumocandina B₀ (a) e equinocandina B (b).

A estrutura da parede celular dos fungos compreende uma combinação de β -1,3-glucano, β -1,4-glucano, β -1,6-glucano, α -manana, quitina e diversos glicopeptídeos. Os

1 glucanos, em especial, desempenham um papel crucial na preservação da integridade da parede
 2 celular em *Candida* sp. e *Saccharomyces* sp., representando aproximadamente 50-60% dos seus
 3 constituintes (Figura 8 a). Além de desempenhar uma função estrutural vital, os β -1,3-glucanos
 4 estão ausentes em células animais, tornando-se alvos promissores para agentes antifúngicos
 5 (Gow *et al.*, 2017; Garcia-Rubio *et al.*, 2020).

6 Nesse contexto, as equinocandinas são direcionadas especificamente à enzima β -
 7 glucano sintase responsável pela conversão de uridina difosfato glicose em β -glucano, inibindo
 8 assim esse processo chave (Figura 8 b). Esta enzima consiste em duas subunidades distintas: a
 9 subunidade Fks1p, cuja função é catalítica e é codificada pelos genes *FKS1*, *FKS2* e *FKS3*, e a
 10 subunidade Rho1p, responsável pela regulação. As equinocandinas exercem sua ação de
 11 maneira não competitiva, ligando-se à subunidade Fks1p da enzima e inibindo sua atividade,
 12 que resulta em anormalidades estruturais na parede celular do fungo, levando à ruptura de sua
 13 integridade e conseqüentemente morte por lise osmótica (Aguilar-Zapata, Petraitiene, Petraitis,
 14 2015; Liu, Yuan, Wang, 2020).



16
 17 **Fonte:** Adaptado de Szymanski *et al.*, 2022.

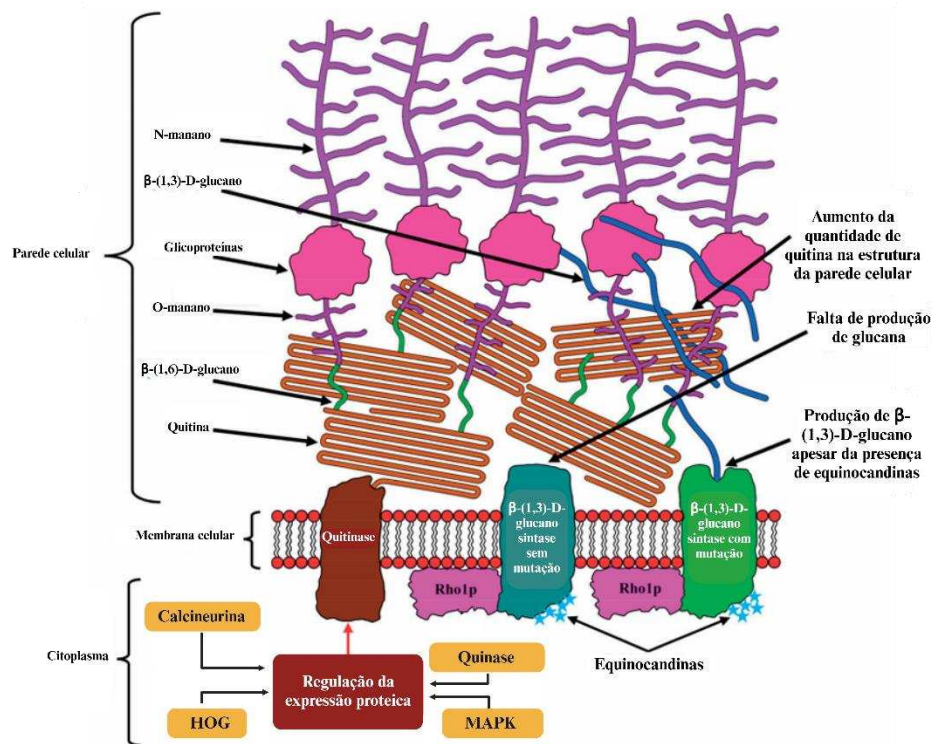
18 **Figura 8.** Mecanismo de ação das equinocandinas. Produção normal de β -(1,3)-D-glucano (a) e equinocandinas
 19 (b) atuando na subunidade FKS1p inibem de forma não competitiva a atividade da glucano sintase, interrompendo
 20 a síntese de β -(1,3)-D-glucano, levando à morte de células fúngicas causada pela instabilidade da parede celular.
 21

22 A ocorrência de *Candida* resistentes às equinocandinas é rara, no entanto, à medida
 23 que o uso desses fármacos se torna mais frequente, é provável que a incidência de resistência
 24 aumente. Para a maioria das espécies de *Candida*, a resistência às equinocandinas é
 25 principalmente mediada por mutações no gene *FKS*, especialmente *FKS1* (Figura 9). No
 26 entanto, há menos conhecimento sobre as contribuições dos genes *FKS2* e *FKS3* para a
 27 resistência as equinocandinas (Khan *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2020). Suwunnakorn e

1 colaboradores (2018) mostraram que a deleção desses genes resulta em níveis mais elevados
2 de transcritos de *FKSI* e em menor sensibilidade à equinocandinas em *C. albicans*.

3 Pasquale *et al.*, (2008), reportaram pela primeira vez a resistência a equinocandinas
4 por *C. tropicalis* em uma paciente com leucemia mieloide aguda, que desenvolveu um quadro
5 de esofagite invasiva. A paciente foi exposta 16 dias a caspofungina e o tratamento não teve
6 efeito. Posteriormente, descobriu-se que houve resistência cruzada com micafungina. Anos
7 depois, o mesmo grupo de pesquisa reportou que a cepa isolada na paciente apresentava
8 mutação no gene *FKSI* (Garcia-Effron *et al.*, 2010).

9



10

11 **Fonte:** Adaptado de Szymanski *et al.*, 2022.

12 **Figura 9.** Mecanismos que os fungos se adaptam a equinocandinas. As vias da proteína quinase, calcineurina,
13 resposta de glicerol de alta osmolaridade (HOG) e quinase ativada por mitógeno (MAPK) induzem a síntese de
14 uma parede celular compensatória composta de quitina. Mutações FKS em regiões específicas da β-(1,3)-D-
15 glucano sintase alteram a sensibilidade da enzima a equinocandinas e permitem a produção de glucano, apesar da
16 presença deste antibiótico.

17

18 Curiosamente, em 2008, foram relatados três casos adicionais de resistência às
19 equinocandinas. O primeiro paciente, do sexo masculino, apresentava leucemia linfocítica
20 aguda e foi submetido a um tratamento com caspofungina por 16 dias. O segundo paciente,
21 diagnosticado com linfoma de células grandes, recebeu tratamento com caspofungina por um
22 período de 44 dias. O terceiro paciente, sofria de linfoma de Hodgkin, foi tratado com
23 caspofungina por 21 dias. Estudos detalhados revelaram que as cepas isoladas desses pacientes

1 exibiam mutações no gene *FKSI* (Garcia-Effron *et al.*, 2008). Outro relato de resistência foi de
2 Grosset *et al.* (2016), que detectaram uma mutação no gene *FKSI* de *C. tropicalis*, isolada 93
3 dias após o início do tratamento com caspofungina em um paciente previamente exposto ao
4 antifúngico por 43 dias. Sprujitenburg e colaboradores (2023) reportaram a resistência a
5 anidulafungina em um isolado clínico de *C. tropicalis*, devido a uma substituição *FKSI* S659P
6 em *HSI*. Esses resultados sugerem que cepas de *C. tropicalis* podem se tornar resistentes à
7 equinocandina após uma exposição breve ou prolongada ao antifúngico.

8 **2.6.2 Triterpenoides (Ibrefungerp)**

9 O antifúngico mais recente, da classe dos Triterpenóides, o Ibrefungerp,
10 recomendado para o tratamento de candidíase vulvovaginal, tem o mesmo alvo das
11 equinocandinas. Está disponível em formulações orais e intravenosas, devido a sua boa
12 penetração tecidual em muitos locais do corpo (Liu *et al.*, 2023; Goje *et al.*, 2023). Ensaio
13 clínicos de fase II e fase III comprovaram a eficácia deste fármaco para um tratamento seguro
14 e eficaz contra candidíase vulvovaginal com dosagem única de 300 mg 2x ao dia (Nyirjesy *et*
15 *al.*, 2022; Schwebke *et al.*, 2022).

16 O ibrefungerp possui uma estrutura química diferente das equinocandinas e é obtido
17 como um composto natural. Em comparação com as equinocandinas, o ibrefungerp oferece
18 vantagens notáveis, como biodisponibilidade oral e um maior volume de distribuição. Além
19 disso, sua interação com a β -glucano sintase parece divergir daquela observada com as
20 equinocandinas, o que resulta na manutenção da atividade contra a maioria dos isolados de
21 *Candida* spp. que apresentam resistência às equinocandinas (Davis, Donnelley, Thompson,
22 2020; Mccarthy, 2022).

23 **2.6.3 Polienos**

24 Atualmente existem cerca de 90 polienos descritos na literatura, porém anfotericina B,
25 nistatina, e natomicina são os mais usados nas terapias antifúngicas (Denning, Hope 2010). A
26 anfotericina B é utilizada principalmente no tratamento de infecções fúngicas invasivas,
27 meningoencefalite criptocócica e leishmaniose, porém mesmo com um amplo espectro de
28 atividade o uso clínico da anfotericina B é limitado devido as propriedades lipofílicas da
29 molécula, tendo baixa solubilidade em água, baixa estabilidade e alta nefrotoxicidade (Wasan
30 *et al.*, 2022; Patricio *et al.*, 2022).

31 O primeiro polieno foi isolado em 1949 a partir de um subproduto da fermentação de
32 *Streptomyces noursei*. No entanto, logo se descobriu que o composto tinha baixa absorção

1 intestinal, limitando seu uso a micoses cutâneas. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa
2 identificou que o caldo de fermentação de *Streptomyces nodosus* apresentava atividade
3 antifúngica, levando ao isolamento de dois compostos antifúngicos: a anfotericina A e
4 anfotericina B. Testes subsequentes demonstraram que a anfotericina B (Figura 10 a) possuía
5 maior atividade antifúngica do que a nistatina e a anfotericina A. Para superar o problema de
6 solubilidade em água da anfotericina B, o instituto ER *Squibb and Sons*, desenvolveu uma
7 formulação em que anfotericina B e o deoxicolato de sódio formavam uma suspensão micelar
8 ao serem reconstituídos em uma solução de glicose, sendo utilizada exclusivamente para
9 administração endovenosa. Em 1965, essa formulação foi licenciada, tornando-se o primeiro
10 agente antifúngico aprovado pela FDA (Groll *et al.*, 2019; Carolus *et al.*, 2020; Cavassin *et al.*,
11 2021).

12 Apesar da resolução do problema de solubilização, a alta nefrotoxicidade do fármaco
13 permaneceu. Para reduzir a nefrotoxicidade, foram desenvolvidas formulações lipídicas, como
14 AmBisome®, Abelcet® e Amphocil®, que mantêm a administração por via endovenosa.
15 Atualmente, está disponível no mercado uma nova formulação baseada em nanopartículas
16 (CAMB), que protege a anfotericina B da degradação pelo suco gástrico, permitindo, assim, sua
17 administração via oral. Essa abordagem reduz a toxicidade, oferece um baixo custo e aumenta
18 a acessibilidade em regiões com recursos limitados (Aigner, Lass-Förl, 2020).

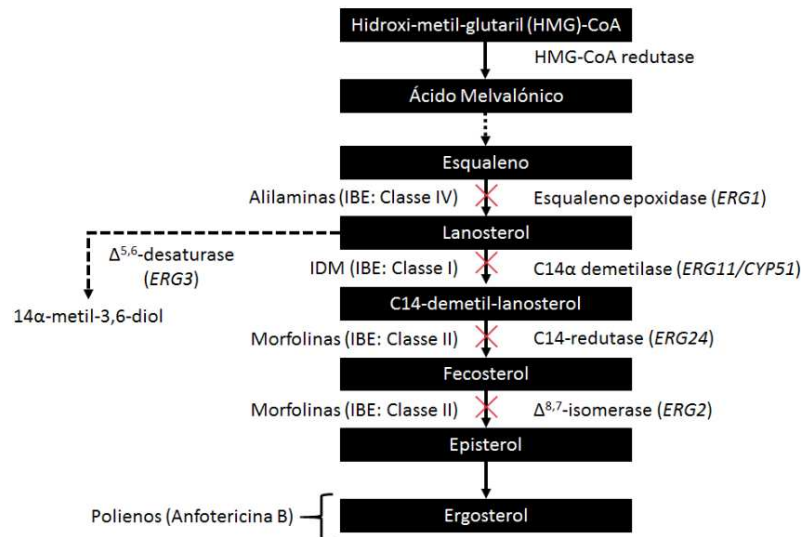
19 Os fármacos da classe dos polienos têm como alvo o ergosterol da membrana fúngica
20 e podem atuar de diferentes maneiras, mas, em todos os modelos, a ligação da Anfotericina B
21 ao ergosterol é a principal responsável pelo seu efeito fungicida. O mecanismo de ação da
22 anfotericina B ocorre por meio de diferentes processos: formação de poros (Figura 10 b),
23 adsorção na superfície, esponja de esterol e dano oxidativo. A formação de poros acontece
24 quando anfotericina B interage para criar complexos semelhantes a canais iônicos, permitindo
25 o vazamento de íons e pequenas moléculas orgânicas das células, resultando em lise celular. No
26 modelo de adsorção, propõe-se que o polieno possa adsorver moléculas de ergosterol da
27 bicamada fosfolipídica. Contudo, Anderson *et al.* (2014), por meio de ressonância magnética
28 nuclear, observaram a localização e estrutura da anfotericina B em interação com o ergosterol,
29 constatando que o polieno e o esterol formam um complexo que nem sempre está inserido na
30 membrana, gerando agregados membranosos adicionais.

1 *ERG2*, *ERG3*, *ERG6* e *ERG11*. Essas mutações levam à diminuição dos níveis de ergosterol na
2 membrana celular ou à substituição do ergosterol por esteróis alternativos, como lanosterol, o
3 que, por sua vez, reduz a eficácia dos polienos (Yang *et al.*, 2004; Jensen *et al.*, 2015; Oliveira
4 *et al.*, 2020).

5 Os primeiros relatos de resistência de *C. tropicalis* aos polienos surgiram na década de
6 1970, cinco anos após a sua introdução no mercado. Foi observado que cepas resistentes
7 apresentavam alterações no conteúdo de esteróis na membrana celular, com redução
8 significativa ou ausência de esterol e aumento nos níveis de 14-metil fecosterol e lanosterol
9 (Woods *et al.*, 1974; Safe *et al.*, 1977; Merz *et al.*, 1979). Mesa-Arango *et al.* (2016) relataram
10 um isolado de *C. tropicalis* resistente à anfotericina B que apresentava uma parede celular
11 espessa, com níveis elevados de 1,3- β -glucano. Atualmente, dados de estudos de vigilância
12 populacional indicam que *C. tropicalis* exibe baixa resistência à AmB; no entanto, alguns países
13 da região asiática relataram o isolamento de cepas resistentes a esse antifúngico (Badiee *et al.*,
14 2017; Taj-Aldeen *et al.*, 2018).

15 **2.6.4 Azóis**

16 Os azóis desempenham um papel crucial no controle de infecções fúngicas, tanto
17 invasivas quanto superficiais. Embora existam diversos mecanismos descritos para a ação
18 antifúngica dos azóis, todos compartilham um alvo comum: a inibição de uma enzima essencial
19 para a formação do ergosterol, um derivado do colesterol encontrado nos mamíferos. Entre as
20 várias enzimas que atuam na via de biossíntese do ergosterol, a 14- α -desmetilase (ou CYP51)
21 é particularmente importante (Figura 11). Essa enzima, que pertence à família do citocromo
22 P450, catalisa a remoção oxidativa do lanosterol, convertendo-o em 14-desmetil lanosterol. A
23 inibição da 14- α -desmetilase leva ao aumento dos níveis de lanosterol e 14- α -desmetilase,
24 enquanto os níveis de ergosterol diminuem, resultando em alterações na permeabilidade e
25 fluidez da membrana celular fúngica (Choi, Podust, Roush, 2014; Liu *et al.*, 2018; Shafiei *et*
26 *al.*, 2020).



1

2 **Fonte:** Lichtemberg *et al.*, 2016.3 **Figura 11.** Rota de biossíntese do ergosterol evidenciando os pontos de bloqueio dos antifúngicos. Enzimas alvos
4 a direita das setas com os genes entre parênteses. Antifúngicos à esquerda das setas.

5

6 O primeiro relato da atividade antifúngica de um composto azólico foi reportado por
7 Woolley (1944), que evidenciou a atividade antifúngica do benzimidazol contra *saccharomyces*
8 *cerevisiae*. Anos depois, o desenvolvimento do primeiro fármaco se deu na década de 1958,
9 com o surgimento do clotrimazol, sendo o pioneiro na pesquisa sobre a atividade antifúngica
10 dos azóis.

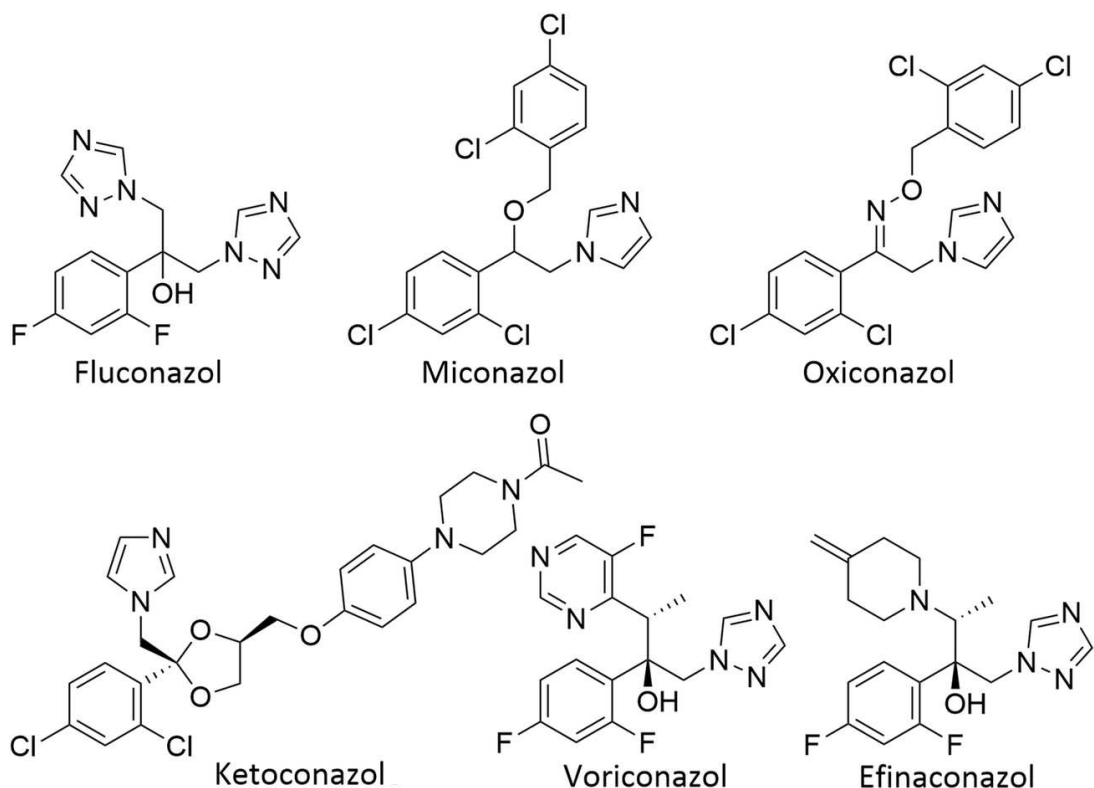
11 A primeira geração dos azóis foi marcada pela introdução de três compostos:
12 clotrimazol, miconazol (Figura 12) e econazol. Esses medicamentos foram desenvolvidos como
13 agentes antifúngicos de uso tópico, tornando-se essenciais para o tratamento de infecções
14 fúngicas. Após a descoberta dessa estrutura, diversos compostos análogos foram
15 comercializados, sendo classificados como pertencentes à primeira geração devido às suas
16 propriedades físico-químicas semelhantes e indicações para o tratamento de infecções fúngicas
17 superficiais, como candidíase cutânea e vaginal. Em relação a estrutura, esses compostos
18 possuem um arcabouço comum contendo imidazol e podem ser subdivididos em três categorias:
19 aqueles baseados em miconazol, aqueles baseados em clotrimazol e derivações de vinil-
20 imidazol (Sawyer *et al.*, 1975; Allen *et al.*, 2015; Shafiei *et al.*, 2020).

21 A segunda geração dos azóis é marcada por três mudanças principais que resultaram
22 em melhorias significativas na segurança, espectro de ação e farmacocinética dos compostos.
23 Essas alterações estruturais levaram ao surgimento do cetoconazol, o primeiro agente azólico
24 de uso oral para o tratamento de infecções sistêmicas. Uma inovação importante nessa geração
25 foi a introdução de um anel triazol, que substituiu o imidazol na estrutura dos azóis. O triazol

1 foi utilizado pela primeira vez no fluconazol (Figura 12), desenvolvido pela Pfizer em 1989.
 2 Essa modificação conferiu ao fluconazol propriedades como menor toxicidade, maior
 3 estabilidade metabólica, menor ligação a proteínas e maior solubilidade e biodisponibilidade.
 4 A descoberta do fluconazol é considerada um dos estudos mais notáveis em química medicinal,
 5 destacando a importância das modificações estruturais para o aprimoramento de propriedades
 6 desejáveis (Heeres *et al.*, 1979; Shafiei *et al.*, 2020).

7 Com o aumento das infecções fúngicas, surgiu a terceira geração de azóis, também
 8 contendo um anel triazol, que apresenta melhorias nas estruturas dos fármacos da segunda
 9 geração. Essa nova geração é dividida em dois grupos: um que é semelhante ao fluconazol e
 10 outro que é similar ao itraconazol. Dado que o fluconazol é ineficaz contra *Aspergillus* spp. e
 11 pode contribuir para o aumento da resistência em *Candida* spp., a FDA aprovou o voriconazol
 12 (Figura 12) em 2002 como uma alternativa ao tratamento (Walsh *et al.*, 2007; Rabelo *et al.*,
 13 2017).

14



15

16 **Fonte:** Sari *et al.*, 2021.

17

18 **Figura 12.** Estrutura química dos principais azóis.

19

20 Em seguida, o posaconazol foi identificado como um novo agente antifúngico da
 21 classe dos triazóis. Este fármaco apresentou um espectro de atividade mais amplo contra
 diversas espécies fúngicas, incluindo zigomicetos, sendo utilizado no tratamento de infecções

1 fúngicas do sistema nervoso central e meningite criptocócica. Além disso, várias derivações de
2 álcool triazólico estão sendo avaliadas em pesquisas de química medicinal para determinar sua
3 atividade antifúngica, aumentando assim as chances de descobrir novos agentes antifúngicos
4 (Saravoulatz, Johnson, Kauffman, 2003; Sabatelli *et al.*, 2006; Raad *et al.*, 2006; Qian *et al.*,
5 2018; Cheng *et al.*, 2020).

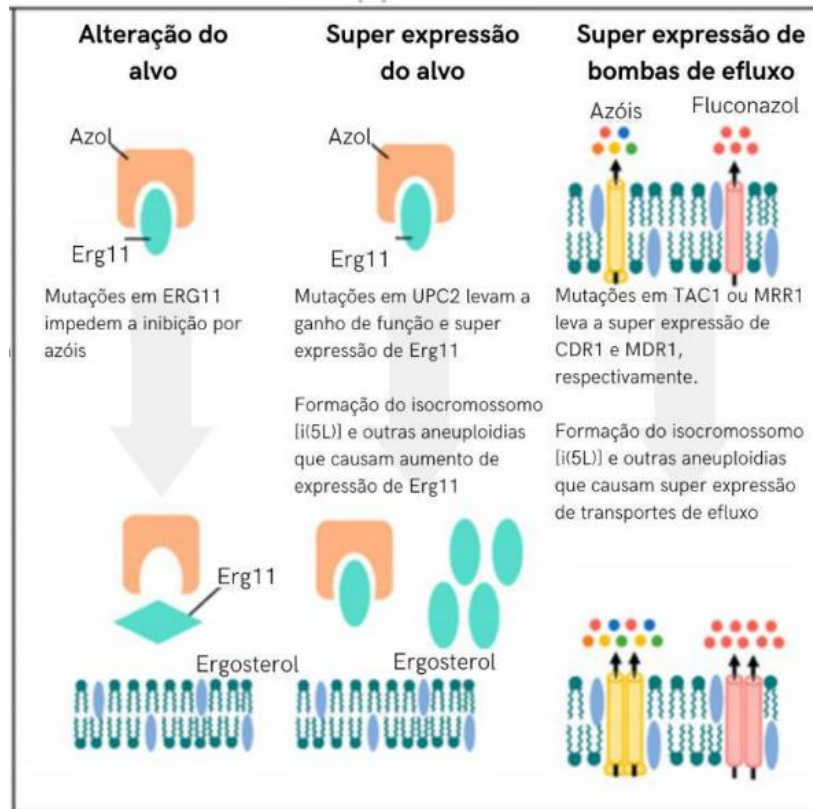
6 As gerações anteriores de azóis foram eficazes em reduzir a resistência, ter um grande
7 espectro de ação e boa farmacocinética, contudo, a principal limitação que ainda persiste é a
8 interação medicamentosa, frequentemente causada pela inibição da enzima CYP3A4 humana,
9 uma vez que a região de ligação de metal dessa enzima se conecta às estruturas dos azóis (Allen
10 *et al.*, 2015).

11 Entre os azólicos desenvolvidos, o voriconazol se destaca por ter a menor afinidade
12 pela CYP3A4 humana, o que levou à sua escolha como substância líder para a criação de novas
13 formulações. O quiseconazol está na fase clínica I, onde sua eficácia no tratamento de meningite
14 criptocócica está sendo avaliada. Por outro lado, o oteseconazol, um composto tetrazólico,
15 concluiu com sucesso os ensaios clínicos para o tratamento de candidíase vulvovaginal 48
16 semanas e, em março de 2019, foi aprovado pela FDA, tornando-se o primeiro medicamento
17 indicado para essa condição (Warrilow *et al.*, 2016; Sobel *et al.*, 2022; Wiederhold *et al.*, 2018;
18 Shafiei *et al.*, 2020).

19 A resistência aos azóis está relacionada a modificações nos genes que codificam o alvo
20 do fármaco, especificamente o gene *ERG11*, com mais de 140 substituições diferentes de
21 aminoácidos já relatadas (Figura 13). Além disso, um dos mecanismos mais comuns de
22 resistência é o aumento da expressão do alvo do fármaco. Outro mecanismo significativo é a
23 elevação do efluxo do fármaco, que diminui o acúmulo intracelular do medicamento por meio
24 da regulação positiva das bombas de efluxo na membrana plasmática (Marichal *et al.*, 1999;
25 Morio *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2023).

26 A resistência pelo aumento do efluxo está relacionada aos cassetes de transportadores
27 ligados ao ATP (ABC), especificamente os transportadores CDR1 e CDR2, além do
28 transportador facilitador principal, MDR1. Outro mecanismo importante de resistência aos
29 azóis envolve mutações no gene *ERG3*, nas quais mutações de perda de função impedem o
30 acúmulo de esterol que, normalmente, ocorreria em resposta à inibição mediada pelos azóis no
31 gene *ERG11* (Sanglard *et al.*, 1995; Sanglard *et al.*, 1997; Navarro-Rodríguez *et al.*, 2020).

32



1

2 **Fonte:** Adaptado de Lichtemberg *et al.*, 2016.3 **Figura 13.** Mecanismos de resistência aos azóis.

4

5 Um dos primeiros estudos a reportar o mecanismo de resistência por superexpressão
6 dos genes *CDR1* e *MDR1* foi conduzido por Barchiesi e colaboradores em 2000. Vandeputte e
7 sua equipe, em 2005, relataram a superexpressão do gene *ERG11* associada a uma mutação
8 pontual de sentido trocado “*missense*” na posição 393 desse gene em um único isolado clínico.
9 Essa mutação resulta na substituição de tirosina por fenilamina, o que diminui a afinidade dos
10 azóis pela molécula-alvo. Jiang *et al.* (2013) analisaram 52 isolados clínicos de *C. tropicalis* na
11 China e constataram que os isolados resistentes ao fluconazol apresentavam um nível médio de
12 expressão de *ERG11* quatro vezes maior do que os isolados sensíveis. Além disso, a expressão
13 de *ERG11* foi ainda mais elevada em isolados resistentes não apenas ao fluconazol, mas também
14 ao itraconazol e voriconazol. Posteriormente, Choi e colaboradores (2016) relataram resultados
15 semelhantes.

16 Paul *et al.* (2020) relataram a superexpressão do gene *CDR1* em isolados clínicos de
17 *C. tropicalis* resistentes aos azóis. Este estudo também foi pioneiro ao identificar a
18 superexpressão dos genes *ERG1*, *ERG2* e *ERG3* relacionada à resistência aos azóis em *C.*
19 *tropicalis*. Além disso, Rojas e colaboradores (2023) observaram superexpressão do gene *ERG3*

1 em *C. tropicalis* com resistência ou sensibilidade dose-dependente ao fluconazol na presença
2 desse azólico.

3 **2.6.5 Alilaminas**

4 As alilaminas, como a naftifina e a terbinafina, são antifúngicos que inibem a
5 biossíntese inicial do ergosterol. Elas inibem a enzima esqualeno epoxidase (codificada por
6 *ERG1*), essencial para a síntese de ergosterol. Como resultado, fungos tratados com alilaminas
7 acumulam esqualeno e tornam-se deficientes em ergosterol, afetando a estrutura e função da
8 membrana celular fúngica. A ação fungicida das alilaminas é atribuída ao acúmulo de esqualeno
9 intracelular. Devido à sua capacidade de se acumularem na pele e no leito ungueal, as alilaminas
10 são especialmente eficazes contra infecções por dermatófitos (Scorzoni *et al.*, 2017; Hammoudi
11 Halat *et al.*, 2022).

12 **2.6.6 Amorolfina**

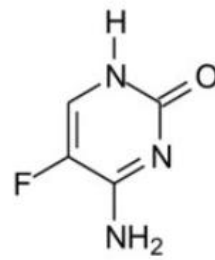
13 A amorolfina é um agente antifúngico eficaz contra dermatófitos, alguns fungos
14 filamentosos e leveduras, quando aplicado topicamente. Sua principal indicação atualmente é
15 o tratamento da onicomicose. No entanto, é ineficaz quando utilizada sistemicamente para tratar
16 micoses potencialmente fatais. A amorolfina atua inibindo a síntese de ergosterol.

17 **2.6.7 Flucitosina**

18 A flucitosina (5-FC) (Figura 14 a) é um composto pertencente ao grupo das
19 pirimidinas. Inicialmente desenvolvida como um possível anticancerígeno, e sua atividade
20 antifúngica foi descoberta durante pesquisas de triagem, e atualmente, a flucitosina é utilizada
21 como tratamento adjuvante com anfotericina para criptococose (WHO 2022).

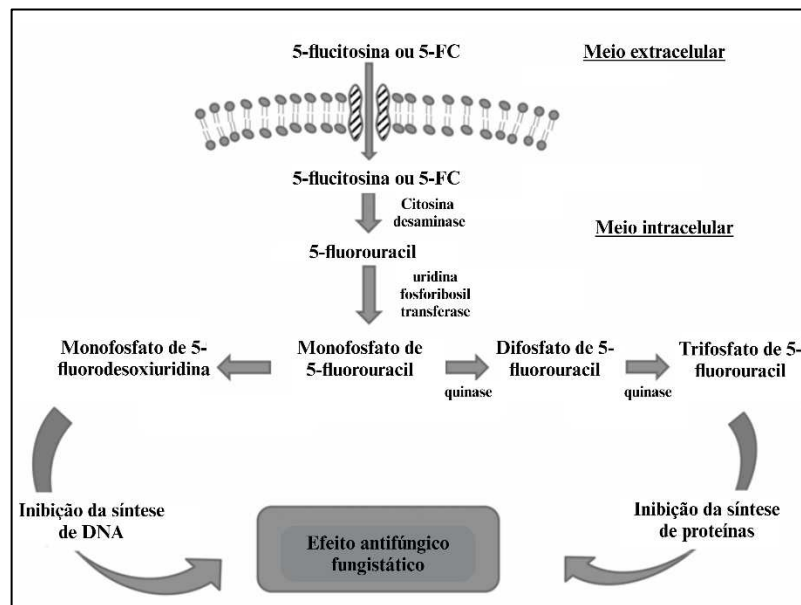
22 A especificidade da flucitosina decorre da presença da enzima citosina permease nos
23 fungos, que é necessária para sua absorção e conversão em 5-fluorouracil (Figura 14 b). Esse
24 metabólito se incorpora ao RNA, provocando a terminação prematura da cadeia e inibindo a
25 síntese de DNA ao afetar a timidilato sintase. Como a maioria dos fungos filamentosos não
26 possui essa enzima, a ação da flucitosina é restrita às leveduras patogênicas (Sigera *et al.*, 2023).

27



Flucitosina (5-FC)

(a)



(b)

Fonte: Adaptado de Morio e Le Pape 2014; Drew, 2019.

Figura 14. Estrutura química do antifúngico flucitosina (a) e esquema descrevendo o modo de ação da flucitosina (b). Sua ação depende de duas vias distintas: a conversão de 5-fluorouracil pela uridina fosforibosil transferase em monofosfato de 5-fluorouracil, Difosfato de 5-fluorouracil, Trifosfato de 5-fluorouracil, permitindo o bloqueio da síntese de proteína através da sua incorporação em RNA. A outra via, baseia-se no bloqueio da síntese de DNA após a inibição da síntese do timidilato pelo monofosfato de 5-fluorodesoxiuridina obtido pela ação da ribonucleotídeo redutase sobre o monofosfato de 5-fluorouracil. O efeito antifúngico resultante é fungistático em leveduras do gênero *Candida*.

A resistência a essa classe de antifúngicos apresenta variações entre diferentes espécies de fungos. Desnos-Ollivier *et al.* (2008) relataram que isolados de *C. tropicalis* provenientes de sangue mostraram resistência à flucitosina, evidenciando que todas as cepas apresentavam uma mutação *missense* no gene *URA3*, que está relacionado à biossíntese de pirimidinas. Alterações na sequência de aminoácidos do gene *URA3* também foram identificadas no estudo de Chen *et al.* (2011). Além disso, uma mutação sem sentido “*nonsense*” no gene *FYC2*, juntamente com a perda de heterozigidade desse gene, contribuiu para a resistência de *C. tropicalis* à flucitosina. Este gene codifica uma purina citosina permease, que é essencial para a entrada da flucitosina nas células fúngicas. Embora a sensibilidade de *C. tropicalis* à flucitosina tenha sido

1 avaliada com frequência para o tratamento de infecções, poucos estudos de vigilância relataram
2 baixa sensibilidade dessa espécie ao antifúngico.

3 **2.6.8 Griseofulvina**

4 A griseofulvina é um metabólito secundário produzido pelo fungo *Penicillium*
5 *griseofulvum*, que atua bloqueando a organização dos microtúbulos nas células fúngicas
6 sensíveis, sem afetar as células de mamíferos. Este antifúngico impede a interação do fuso
7 mitótico com os microtúbulos polimerizados, bloqueando a função da proteína tubulina. Este
8 antifúngico tem sido amplamente usado para infecções fúngicas por dermatófitos em humanos
9 e animais (Aris *et al.*, 2022).

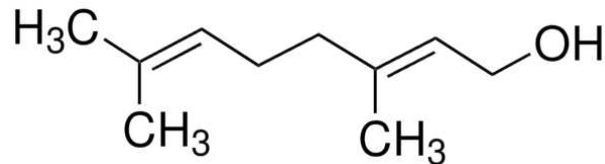
10 **2.6.9 Limitações dos antifúngicos**

11 Atualmente, diversas moléculas estão sendo investigadas por seu potencial
12 antifúngico, como derivados de monoterpênicos e triterpenoides. No entanto, as opções
13 terapêuticas disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas ainda são bastante limitadas.
14 Isso se deve, em parte, à estreita relação evolutiva entre esses patógenos eucarióticos e seus
15 hospedeiros, o que torna desafiador o desenvolvimento de tratamentos que atinjam
16 predominantemente os fungos sem causar impactos negativos ao hospedeiro. A crescente
17 diversidade de cepas resistentes a medicamentos tradicionais, associada à toxicidade, aos altos
18 custos de tratamento, a significativas interações medicamentosas e à biodisponibilidade
19 insuficiente, tem impulsionado a busca por novos antifúngicos que sejam mais eficazes e
20 seguros (Rybak *et al.*, 2019; Personett *et al.*, 2019; Berman, Krysan, 2020).

21 O desenvolvimento de novos antifúngicos enfrenta desafios devido às semelhanças de
22 organização e composição celular entre fungos patogênicos e o hospedeiro humano. É
23 fundamental que novos agentes antifúngicos sejam seletivos, direcionando-se a alvos
24 específicos nos fungos sem prejudicar o hospedeiro (Salci *et al.*, 2018). A seleção de alvos para
25 intervenção deve levar em conta a essencialidade desses alvos para o crescimento e viabilidade
26 dos fungos, além de sua caracterização completa em termos de função fisiológica e natureza
27 bioquímica (Ivanov; Ćirić; Stojković, 2022; Fuentesfria *et al.*, 2018). Moléculas bioativas
28 provenientes de plantas têm atraído novamente a atenção como fontes promissoras de novos
29 agentes terapêuticos, oferecendo potencial inovador para o tratamento de diversas condições,
30 incluindo doenças infecciosas, e destacando-se por sua aplicabilidade e versatilidade (Atanasov
31 *et al.*, 2021; Howes *et al.*, 2020).

2.7 Geraniol

O geraniol (GER) (3,7-dimetilocta-trans-2,6-dien-1-ol) (Figura 15) é uma substância transparente insolúvel em água, mas solúvel na maioria dos solventes orgânicos. O monoterpene é um álcool acíclico com fórmula química $C_{10}H_{18}O$ (Chen, Viljoen 2010; Liu *et al.*, 2013).



Fonte: Sigma-Aldrich.

Figura 15. Estrutura química do geraniol.

Até o momento, sabe-se que o monoterpene é constituinte de mais de 250 óleos essenciais, incluindo *Monarda fistulosa* (> 95%) (Simon, Beliveau, Aube, 1986), óleo essencial de ninde (66%) (Baser, Kurkcuoglu, Demirci, 2005), óleo de rosa (44%) (Baydar e Baydar, 2005), óleo de palmarosa (53,5% e cerca de 80,9% na folha) e óleo de citronela (24,8%) (Rajeswara Rao *et al.*, 2004). Além disso, pode ser extraído de diversas plantas aromáticas como *Annamomum tenuipilum*, *Valeriana officinalis*, *Phyla Scaberrima* e *Perilla frutesces* var. *hirtella* (Regev, Cone, 1976; Macka, Winska, Grabarczyk, 2020).

O monoterpene tem mostrado diversas atividades biológicas como anti-oxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitumoral, anti-helmintica e efeitos inseticida e repelente. A atividade antimicrobiana dos monoterpenos pode ser atribuída ao seu caráter apolar, que permite perturbar a estrutura lipídica da membrana celular dos microrganismos. Essa interação com os componentes da membrana aumenta sua permeabilidade, facilitando a entrada de outros compostos, como os antibióticos (Rizzello *et al.*, 2018; Chen, Viljoen; Macka, Winska, Grabarczyk, 2020).

GER tem sido amplamente utilizado nas indústrias de aromas e fragrâncias nas últimas décadas e é amplamente empregado na indústria cosmética. Dados mostram que o GER está presente em 76% dos desodorantes comercializados no mercado europeu, em 41% dos detergentes e produtos de limpeza, e em 33% das formulações cosméticas à base de ingredientes naturais. A produção anual de GER ultrapassa 1.000 toneladas, destacando sua importância e ampla aplicação no setor de cosméticos e produtos de higiene pessoal (Chen, Viljoen, 2010; Macka, Winska, Grabarczyk, 2020).

1 Os estudos iniciais sobre o metabolismo de GER em animais datam da década de 1980,
2 mas ainda há lacunas significativas no conhecimento. Foi mostrado que CYP2B6, CYP1A1 e
3 CYP3A5 metabolizam o GER na pele. Em contraste, evidências indicam que o GER inibe a
4 atividade da CYP2B6, uma enzima crucial para o metabolismo de fármacos como bupropiona
5 e o tamoxifeno. Este fato ressalta a importância de compreender as interações do GER com o
6 sistema enzimático hepático, dada a sua capacidade de interferir no metabolismo de
7 medicamentos essenciais (Chadha, Madystha 1984; Hesse *et al.*, 2000; Zehetner, Hoferl,
8 Buchbauer, 2019).

9 A biossíntese do GER ocorre principalmente pela via do mevalonato, embora em
10 algumas plantas seja sintetizado pela via não-mevalonato. No capim-limão, as proporções de
11 geraniol e acetato de geranila variam ao longo do desenvolvimento das folhas. O nível de
12 acetato de geranila diminui de 59% para 3%, enquanto o nível de GER aumenta de 33% para
13 91% durante o crescimento foliar. Essas flutuações indicam claramente a atuação de uma
14 esterase na conversão do acetato de geranila em GER (Luan, Wust, 2002; Mahmoud, croteau,
15 2002; Ganjewala, Luthra 2009).

16 Uma vantagem notável do monoterpene é sua capacidade de ser produzido em grande
17 escala, e devido a isso, pesquisas têm sido feitas para melhorar o rendimento e a eficiência dos
18 processos biotecnológicos de produção de GER. Esses avanços na biotecnologia não apenas
19 promovem uma produção mais sustentável e eficiente, mas também abrem novas possibilidades
20 para a síntese de derivados com potencial aplicação em várias indústrias, incluindo cosmética,
21 farmacêutica e de fragrâncias (Chen, Viljoen, 2010).

22 Thompson e colaboradores (2010) investigaram a capacidade de *Rhodococcus*
23 *erythropolis* (microrganismo presente no solo) de transformar trieno β -mirceno em GER. Os
24 pesquisadores evidenciaram que a capacidade de transformar β -mirceno em GER, foi restrita
25 às células que haviam sido cultivadas com esse substrato (β -mirceno) como única fonte de
26 carbono. Liu e colaboradores (2013) manipularam geneticamente *S. cerevisiae* para aumentar
27 o fornecimento de difosfato de geranila, um substrato utilizado na biossíntese de GER e os
28 resultados revelaram que a superexpressão de *MAF1* é um método eficaz para aumentar a
29 produção deste monoterpene em *S. cerevisiae*.

30 Recentemente, Zhao et al. (2022), utilizando engenharia genética exploraram com
31 sucesso uso de *Candida glycerinogenes*, como hospedeiro heterólogo para produção de GER.
32 Esses estudos, fornecem uma importante ferramenta para produção de GER, demonstrando ser
33 possível a produção escalonada do monoterpene. Além disso, GER é classificada como
34 geralmente reconhecido como seguro (GRAS) pela *Flavor and Extract Manufactures*

1 *Association* (FEMA) e pela FDA (PubChem CID: 3821). Isso abre portas, para a possibilidade
2 de aplicação em tratamentos clínicos e para uso em terapias antifúngicas convencionais (FDA
3 2023).

4 Estudos indicam que GER atravessa a monocamada de células intestinais, sendo
5 transportado ativamente do lúmen intestinal para a corrente sanguínea, sem sofrer degradação
6 no trato digestivo. Após administração intravenosa, o GER é rapidamente eliminado da corrente
7 sanguínea, com uma meia-vida de aproximadamente 12 minutos, mesmo em concentrações de
8 300 µg/mL (De Fazio *et al.*, 2016). Esse comportamento é atribuído à ligação do GER a
9 componentes celulares e proteínas sanguíneas, bem como à sua penetração em compartimentos
10 lipídicos do corpo. Em estudos com ratos Sprague-Dawley machos, a biodisponibilidade
11 absoluta do GER emulsificado em glicerol foi determinada em 92% e a concentração plasmática
12 máxima, foi de aproximadamente 270 µg/mL, após 30 minutos da administração. Foi
13 evidenciado também, que GER atravessa facilmente a barreira hematoencefálica, mas sua
14 concentração no líquido cefalorraquidiano diminui rapidamente, seguindo um padrão similar
15 ao observado no sangue. Os resultados, mostram baixa toxicidade de GER sobre ratos, porém
16 a rápida absorção e eliminação do monoterpene é um problema a ser solucionado, visto que
17 concentrações apropriadas são necessárias para obter efeitos terapêuticos (Pavan *et al.*, 2018).

18 Diante dessa problemática, Rizzello *et al.*, (2018) foram os pioneiros a realizar a
19 microencapsulação de GER em suspensões de micelas de lectina de soja (Patente: WO 201
20 1/128597 A1) e administrar oralmente em humanos. No estudo, a formulação foi desenvolvida
21 para avaliar a capacidade de GER ser entregue no intestino grosso em micelas de lectina para
22 reduzir a sintomatologia em pacientes com Síndrome do intestino irritável. Ricci *et al.* (2022)
23 realizaram o primeiro ensaio clínico randomizado duplo-cego utilizando 450 mg de GER
24 (BIOintestil[®]) em pacientes com síndrome do intestino irritável (SII). Ao final do estudo os
25 pacientes tratados com a formulação relataram redução da intensidade da dor abdominal e
26 aumento da satisfação com os hábitos intestinais. Esses dados sustentam a segurança em torno
27 da administração de GER em humanos.

28 Estudos demonstram que GER apresenta atividade contra bactérias Gram-positivas,
29 como *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Enterococcus faecalis* (Gu *et al.*, 2022; Fajdek-
30 Bieda *et al.*, 2024) e contra bactérias Gram-negativas, incluindo *Escherichia coli* e
31 *Pseudomonas aeruginosa* (Li *et al.*, 2023). Além da ação antibacteriana, GER demonstrou
32 eficácia contra leveduras do gênero *Candida* em estado planctônico e sésil. Além disso, o
33 composto exibe efeito fungicida sobre fungos filamentosos, como *Aspergillus fumigatus* e
34 *Trichophyton rubrum* (Zore *et al.*, 2011; Leite *et al.*, 2015; Kaypetch *et al.*, 2022; Fatima,

1 Fatima, Hameed 2023). Esses dados ressaltam o potencial do GER como uma alternativa
2 promissora no desenvolvimento de novas estratégias para o controle de infecções microbianas.

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar o potencial antifúngico do geraniol, isolado e em combinação com fluconazol, contra células planctônicas e sésseis de *C. tropicalis*, investigando sua interação molecular, efeitos sobre a permeabilidade celular e mecanismo de efluxo, bem como sua toxicidade e atividade *in vivo* em modelo de infecção em *Galleria mellonella*.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a concentração Inibitória Mínima (CIM) e fungicida mínima (CFM) *in vitro* de geraniol e fluconazol sobre células planctônicas;
- Determinar o efeito combinado entre geraniol e fluconazol *in vitro* sobre células planctônicas;
- Avaliar o efeito antifúngico de geraniol e fluconazol isolados ou em combinação sobre a cinética de crescimento de células planctônicas;
- Avaliar a expressão de genes associados a resistência em *C. tropicalis*;
- Avaliar o efeito de geraniol sobre o efluxo de rodamina 6G em células planctônicas;
- Determinar a interação molecular de geraniol com a proteína CDR1 de *C. tropicalis in silico*;
- Avaliar o efeito de geraniol sobre a permeabilidade da membrana;
- Avaliar o efeito da exposição prolongada de geraniol e da combinação sobre células planctônicas;
- Avaliar o efeito de geraniol e fluconazol isolados ou em combinação sobre a adesão e biofilme maduro;
- Analisar o efeito do geraniol e fluconazol isolados ou em combinação sobre a morfologia e ultraestrutura do biofilme maduro;
- Avaliar a toxicidade de geraniol *in silico* e *in vivo*;
- Avaliar a atividade antifúngica de geraniol e fluconazol isolados ou em combinação na infecção de *C. tropicalis* em modelo de *Galleria mellonella*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Substâncias

GER (trans-3,7-Dimethyl-2,6-octadien-1-ol) (pureza 98%) e afotericiba B (AmB) foram adquiridos comercialmente da Sigma-Aldrich, Cotia, SP, Brasil. Para os ensaios de atividade antifúngica, o GER foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) (1%) e Tween® 80 (0,5%) (Nascimento *et al.*, 2006; Sousa *et al.*, 2020), e posteriormente diluído em água destilada esterilizada, obtendo uma solução de trabalho de 4.096 µg/mL. Fluconazol (FLZ) e itraconazol (ITR) foram adquiridos comercialmente da Fagron do Brasil (São Paulo, Brasil). Para todos os ensaios antifúngicos, AmB, FLZ e ITR foram dissolvidos em DMSO (100%) para obter uma solução estoque de 4 mg/mL, 6 mg/mL e 4 mg/mL, respectivamente. Essas soluções estoques foram mantidas a -20°C e posteriormente diluídas no meio de cultura para obtenção das concentrações utilizadas em cada ensaio. DMSO e Tween® 80 não ultrapassaram 1% e 0,5%, respectivamente, em todos os ensaios.

4.2 Microrganismos

Para os ensaios foram utilizadas cepas de referência *American Type Culture Collection* (ATCC): *C. tropicalis* ATCC 28707 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. Foram incluídas *C. tropicalis* resistentes aos azóis (CTR) de origem clínica, isoladas de cateteres urinários, todas as cepas pertencem à coleção microbiana do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos (BioMMLab) da Universidade Estadual de Londrina, com perfil de sensibilidade caracterizado previamente pelo método automatizado (Vitek Biomerieux- Cartão VITEK 2 YST ID). As cepas de *C. tropicalis* foram cultivadas em ágar sabouraud dextrose (ASD) à 37 °C por 24 h e armazenadas a 4 °C. Para preparar uma suspensão fúngica padrão, as células foram colhidas por centrifugação (10.000 x g por 1 min) e ressuspensas em NaCl 0,85% esterilizada (solução salina) para atingir uma turbidez equivalente ao padrão McFarland 0,5, usando o densímetro DensiCHEK™ PLUS (bioMérieux). A suspensão fúngica padrão, que corresponde a $1 - 5 \times 10^6$ unidades formadoras de colônias (UFCs)/mL, foi posteriormente diluída em meio de cultura para atingir o inóculo utilizado nos ensaios, exceto quando especificado.

4.3 Efeito antifúngico do geraniol e geraniol/fluconazol sobre células planctônicas de *C. tropicalis*

4.3.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

As CIMs de GER e FLZ foram determinadas pela técnica de microdiluição em caldo preconizada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute documento M60 (CLSI, 2020)*. Resumidamente, 100 µL de meio *Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI)* suplementado com Ácido 3- [N-Morfolino] propanosulfônico (MOPS) e contendo diferentes concentrações de GER (2.048 µg/mL – 4 µg/mL), FLZ (256 µg/mL – 0,25 µg/mL), AmB (16 µg/mL – 0,015 µg/mL), ITR (16 µg/mL – 0,015 µg/mL) foram adicionados em cada poço da placa de poliestireno de 96 poços fundo “U”. Cerca de 100 µL de RPMI-MOPS contendo uma densidade celular de $0,5 - 2,5 \times 10^3$ células/mL foram adicionadas em cada poço e a placa foi incubada a 37 °C. Poços contendo solventes mais inóculo fúngico e somente inóculo foram utilizados como controles. Os experimentos foram realizados em duplicata com três repetições. Para o ensaio foi utilizado *C. parapsilosis* ATCC 22019 como controle de qualidade da técnica.

As CIM foram determinadas visualmente após 48 horas de incubação. A resistência ao FLZ e ITRA foram determinadas de acordo com o documento M60 do CLSI, 2020, classificando as cepas em resistente quando $CIM > 8,0 \mu\text{g/mL}$. A atividade antifúngica de GER foi interpretada segundo os critérios: 0,005 - 500 µg/mL forte atividade; 600 – 1.500 µg/mL moderada atividade e $> 1.500 \mu\text{g/mL}$ produto inativo (Sartoratto *et al.*, 2004).

Após a leitura da CIM, poços com inibição completa do crescimento fúngico foram devidamente homogeneizadas e, alíquotas de 10 µL, foram inoculadas em ASD e incubados por 24 e 48 horas. A CFM foi definida como a menor concentração que reduziu 99% na contagem das UFC. Quando a razão de CFM/CIM estiver entre 1 e 4 a substância é considerada fungicida contra o patógeno, quando a razão for > 4 a ação do antimicrobiano é considerada fungistática (Siddiqui *et al.*, 2013; Balouri, Sadiki, Ibsoud, 2016).

4.3.2 Efeito antifúngico combinado entre geraniol e fluconazol

O efeito combinado entre GER, FLZ e ITRA foi determinado utilizando o método de *Checkerboard*, conforme descrito em Longhi e colaboradores (2015). O inóculo de leveduras foi definido de acordo com protocolo padrão (CLSI, 2017). Em uma placa de poliestireno 96 com poços fundo “U”, foram realizadas diluições seriadas duplas em linhas e colunas da placa com GER (2.048 – 4 µg/mL) isolado ou combinado com FLZ ou ITR (8 – 0,031 µg/mL), respectivamente, em meio RPMI-MOPS. A concentração inicial de cada substância foi

1 determinada a partir dos resultados obtidos no ensaio de microdiluição em caldo. A placa foi
2 incubada por 48 h a 37 °C e os resultados foram interpretados usando o Índice de Concentração
3 Inibitória Fracionada (ICIF). O ICIF foi calculado utilizando a seguinte equação: $CIF_{GER} /$
4 CIM_{GER} combinado/ CIM_{GER} individual; $CIF_{FLZ} /$ CIM_{FLZ} combinado/ CIM_{FLZ}
5 individual; ICIF: $CIF_{GER} + CIF_{FLZ}$. Os valores de ICIF foram interpretados como:
6 sinergismo (ICIF 0,5); indiferença ($0,5 < ICIF < 4$) e antagonismo ($ICIF > 4,0$) (Odds, 2003).

7 **4.3.3 Efeito sobre a cinética de crescimento**

8 O efeito de GER sobre o crescimento das leveduras foi avaliado segundo proposto por
9 Klepser *et al.* (1998). Colônias previamente crescidas em ASD, foram transferidas para solução
10 salina esterilizada até atingir $0,5 - 2,5 \times 10^6$ UFC/mL. Em seguida, 1 mL da suspensão fúngica
11 foi diluída (1:10) em 9 mL de RPMI-MOPS contendo concentrações crescentes de GER de
12 acordo com sua CIM (0,5 CIM, CIM e 2 CIM). A concentração combinada entre GER/FLZ foi
13 baseado no estudo de *checkerboard*. A CIM de AmB também foi incluído no ensaio. Meio
14 contendo solvente mais inóculo fúngico e meio contendo somente inóculo foram utilizados
15 como controles.

16 Nos intervalos de 2 h, 4 h, 8 h, 12 h e 24 h de incubação, alíquotas de 10 µL foram
17 diluídas 1:10 e semeadas uniformemente em placas de ASD, e posteriormente incubadas a 37
18 °C por 24 h e 48 h. Após incubação, foi realizada a contagem de colônias presentes nas placas
19 e os valores foram expressos como UFC/mL. Foi considerada atividade fungicida quando houve
20 redução no crescimento maior ou igual a 3 log₁₀ (99,9%) a partir do inóculo inicial e atividade
21 fungistática quando houve redução no crescimento menor que 3 log₁₀ (<99,9%). A análise da
22 atividade fungicida da combinação foi considerada quando houve redução de 3 log₁₀ em
23 comparação com o composto mais ativo sozinho (Klepser *et al.*, 1998).

24 **4.3.4 Extração de RNA e avaliação da expressão gênica**

25 Os níveis relativos de mRNA de *ERG11*, *ERG3*, *CDR1* e *MDR1* de *C. tropicalis* foram
26 determinados por PCR quantitativa em tempo real (qPCR). As sequências de nucleotídeos dos
27 genes *CDR1* e *ERG3* de *C. tropicalis* depositadas nas bases de dados GenBank/EMBL
28 (disponíveis em //www.ncbi.nlm.nih.gov) foram utilizadas para desenho dos oligonucleotídeos
29 iniciadores. As sequências foram analisadas utilizando o software BioEdit v.7.2.0. Os
30 iniciadores foram projetados com base na sequência consenso, empregando a ferramenta
31 OligoAnalyzer™ (//www.idtdna.com). Os iniciadores dos genes *ERG11*, *MDR1* e *ACT1* (que
32 codifica para actina) foram aqueles descritos por Bizerra e colaboradores (2008). O gene *ACT1*

1 foi utilizado como controle interno e para normalizar os níveis de expressão dos genes alvos.
 2 As sequências de iniciadores e o tamanho esperado dos amplicons para cada gene são
 3 apresentados na tabela 2.

4

5 **Tabela 2.** Características dos oligonucleotídicos iniciadores utilizados no presente estudo.

| Gene | Amplicon (pb) | Temperatura de hibridação (°C) | Iniciadores (5'-3') F/R | Referências |
|---------------|---------------|--------------------------------|--|-------------------------------|
| <i>CDR 1</i> | 169 | 57 | TACATCAACCTTCTGCGCTTAT TCTGCTGGATTGGCTTCTTT | Este estudo |
| <i>ERG 3</i> | 175 | 57 | ACTGGTGGTTATAAGGCACTTT CTGGATGGAAAGCATGGGAT | Este estudo |
| <i>MDR 1</i> | 315 | 55 | CCCAGAAGTTTTTCATTCCA CCCCAAGCAACAGGATAAT | Bizerra <i>et al.</i> 2008 |
| <i>ERG 11</i> | 320 | 55 | ATGGCTATTGTTGATACTGC GCATTGTAAATGAATTCGTG | Bizerra <i>et al.</i> 2008 |
| <i>ACT 1</i> | 322 | 55 | ATGGACGGGGTATGTTTCA GACATAAGTAATTTCCAATGTG | Bizerra <i>et al.</i> 2008 |

6

7 Células planctônicas de *C. tropicalis* foram cultivadas em meio *Yeast Peptone dextrose*
 8 (YPD) (Difco-BD), contendo 256 µg/mL de FLZ a 37 °C por 12 h. O RNA total foi extraído
 9 utilizando TRIzol™, conforme descrito por Silva et al. (2020) e posteriormente purificado
 10 usando o kit RNeasy® MinElute® Clean-up seguindo as instruções do fabricante. Os ensaios
 11 de qPCR foram realizados em um instrumento Rotor-Gene Q 5PlexHRM (QIAGEN, Hilden,
 12 Alemanha), utilizando RNA total (100 ng), 1 µM de cada par de iniciadores e o volume
 13 recomendado do kit QuantiNova SYBR® Green RT-PCR (Qiagen, Brasil) em um volume final
 14 de 20 µL. As condições de ciclagem foram uma etapa inicial a 60 °C por 10 min e 95 °C por 2
 15 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 s, hibridação a 57 ou 55 °C por 30 s
 16 e extensão a 72 °C por 30 s. A análise da curva de dissociação térmica confirmou que o qPCR
 17 gerou um amplicon específico para cada par de iniciadores. Para determinar os níveis de
 18 expressão, os valores de Ct (limiar de ciclo) foram normalizados e analisados com o software
 19 REST2009. As diferenças nos níveis de mRNA foram comparadas com células planctônicas
 20 cultivadas sem FLZ (grupo de referência).

4.4 Mecanismo de ação de geraniol sobre células planctônicas

4.4.1 Avaliação da Inibição de Cdr1 em *C. tropicalis*

O efluxo de rodamina 6G (R6G) foi determinada como descrito previamente por Shukla *et al.* (2003) e Zhao *et al.* (2019). Para o ensaio, foi utilizado a curcumina (CUR) como controle positivo de inibição de Cdr1 (Sharma *et al.*, 2009). Inicialmente 1×10^6 células planctônicas (leveduras) recém cultivadas (18 h) foram transferidas para caldo YPD e incubadas por 5 h na presença de 128 $\mu\text{g/mL}$ de GER e 37 $\mu\text{g/mL}$ de CUR. Posteriormente, as células foram sedimentadas e lavadas duas vezes com tampão fosfato salina (PBS) 0,15 M, pH 7,2. Uma suspensão com 1×10^8 de leveduras foi preparada em 2 mL de PBS e desenergizadas por 1 h. Em seguida, as células desenergizadas foram sedimentadas, lavadas e ressuspensas em PBS sem glicose, à qual R6G foi adicionado em uma concentração final de 10 μM e incubado protegido da luz, por 1 hora a 30 °C. As células foram sedimentadas, o sobrenadante foi coletado e a densidade óptica (D.O) foi medida a 530 nm. O efluxo dependente de energia (no tempo indicado) foi medido após a adição de PBS suplementado com 2% de glicose nas células. Controles sem glicose e isolados de *C. tropicalis* sensíveis foram incluídas em todos os experimentos.

4.4.2 Previsão da estrutura 3D para Cdr1 de *C. tropicalis*

O programa AlphaFold2 foi utilizado para construir os modelos tridimensionais de Cdr1 de *C. tropicalis* (*CtCdr1*), com o auxílio do software ColabFold (disponível gratuitamente e utiliza uma máquina virtual para a síntese dos modelos) (Jumper *et al.*, 2021; Varandi *et al.*, 2022). A sequência de nucleotídeos do gene *CDR1* do genoma de *C. tropicalis* MYA-3404 foi utilizado para a construção da proteína. A conformação dos modelos de *CtCdr1* prevista pelo AlphaFold2 foi validada por meio do diagrama de Ramachandran. A análise dos ângulos de torção *phi* (Φ) e *psi* (Ψ) foi realizada utilizando o servidor online PROCHECK para calcular a conformação do modelo previsto. Além disso, o modelo também foi submetido a uma verificação adicional utilizando o servidor online MolProbity para confirmar sua avaliação (Sobolev *et al.*, 2020).

4.4.2.1 Detecção do sítio de ligação e formação da grid box

Utilizando o software visualizador Discovery Studio (DS), 2021, foram identificados os sítios de ligação da enzima *CtCdr1*. Em seguida, foi realizado o mapeamento em grade para direcionar os inibidores da proteína, sendo eles CUR e o farnesol (FAR), bem como o ligante GER, a fim de procurar sua região de forte afinidade com o sítio ativo da proteína. CUR e FAR

1 foram utilizados como controles conhecidos, visto que se trata de inibidores seletivos para
2 superfamília ABC (Sharma *et al.*, 2009). A grade utilizada para a proteína CtCdr1 foi de
3 dimensões de $40 \times 40 \times 40$ pontos da grade, com um espaçamento de $0,375 \text{ \AA}$ entre os pontos
4 da grade. Esses pontos foram centrados no ligante, nas coordenadas da proteína CtCdr1 (-
5 21.567, -0.843 e 20.058). A criação da grade teve como objetivo buscar uma interação
6 promissora e oferecer melhor suporte durante o encaixe, considerando a orientação, posição e
7 conformação dos receptores (Repasky *et al.*, 2007).

8 **4.4.2.2 Preparação dos ligantes e moléculas de proteínas e** 9 **docagem molecular de geraniol ao sítio ativo da enzima**

10 Utilizando o Auto Dock Tools (ADT) versão 1.5.6 do Scripps Research Institute, foram
11 adicionados átomos de hidrogênio com natureza polar aos modelos AlphaFold2 previstos para
12 CtCdr1. Além disso, cargas de Kollman foram atribuídas a cada átomo, e os átomos de
13 hidrogênio não polares foram incorporados à estrutura da proteína. As estruturas resultantes
14 foram salvas no formato de arquivo PDBQT para análises posteriores no ADT (Westermaier e
15 Scapozza, 2015). Em seguida, foi realizada a preparação das estruturas 3D dos ligantes CUR,
16 FAR e GER. Essas estruturas foram obtidas do PubChem NCBI
17 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) no formato de entrada '.sdf'. Após a análise do estado de
18 protonação no software Marvin Sketch 18.08.0, os arquivos foram carregados e pré-otimizados
19 no software Avogadro 1.2.0 em pH 7,4, utilizando o campo de força MMFF94 recomendado
20 para moléculas orgânicas. Após a pré-otimização, foram criados arquivos de entrada '.mop' para
21 otimização no programa Mopac2012, no nível PM7, gerando saídas no formato '.pdb'. Em
22 seguida, as cargas AM1-BCC foram adicionadas usando o software UCSF Chimera 1.16, e os
23 arquivos foram salvos no formato '.mol2' (Hanwell *et al.*, 2012; Pettersen *et al.*, 2004). Os
24 arquivos '.mol2' dos ligantes foram então convertidos em arquivos PDBQT, utilizando
25 processos como detecção de raiz, seleção de torção e definição do número de torções, por meio
26 do ADT. A simulação de docking molecular entre os ligantes e a enzima CtCdr1 foram
27 realizadas utilizando o conjunto de docking Autodock 4.2, empregando o algoritmo genético
28 Lamarckiano conforme descrito anteriormente (Morris *et al.*, 2009).

29 **4.4.3 Efeito de geraniol na permeabilidade da membrana celular**

30 Para o ensaio, células de *C. tropicalis* recém cultivadas por 18 h em ASD foram
31 centrifugadas a 3.000 xg por 20 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ e lavadas com PBS por três vezes. Em seguida, foi
32 preparada uma suspensão com densidade celular de $1,0 \times 10^5$ e as células foram tratadas com

1 GER (0,25 CIM, 0,5 CIM e CIM) e incubadas a 37 °C por 0 min, 30 min, 60 min e 120 min.
2 Controles sem tratamento e tratadas com FLZ foram incluídos no teste. Nos tempos indicados,
3 alíquotas de 2 mL de cada tratamento foram centrifugados a 3.000 xg por 20 minutos.
4 Posteriormente, o sobrenadante foi utilizado para medir a absorbância em 260/280 nm
5 (Martinez, Ortiz e Patiño, 2022; Tao, OuYang e Lei jia, 2014).

6 O efeito de GER na integridade da membrana celular de *C. tropicalis* também foi
7 avaliado usando o kit LIVE/DEAD™ Yeast Viability de acordo com as recomendações do
8 fabricante. *C. tropicalis* foi tratada com GER na CIM por 3 h. Células fúngicas tratadas e não
9 tratadas foram incubadas com corantes FUN1® e Calcofluor White™ M2R e analisadas em
10 microscopia de fluorescência (OLYMPUS BX53, Japão) utilizando filtros de fluoresceína com
11 comprimentos de onda de excitação/emissão de 480/530 nm, na objetiva de 40x.

12 **4.4.4 Exposição prolongada de *C. tropicalis* ao geraniol**

13 O ensaio de exposição prolongada ao GER foi realizado conforme Barchiesi *et al.*
14 (2000) com modificações. As leveduras foram cultivadas em caldo Sabouraud dextrose (CSD)
15 com agitação 130 rpm a 37 °C. Durante 30 dias as leveduras foram expostas a concentrações
16 crescentes de GER (iniciando com valor de 64 µg/mL) e incubadas a 37 °C a 130 rpm. Todos
17 os dias as leveduras foram sedimentadas e utilizadas para o preparo de uma nova suspensão
18 com densidade celular equivalente à 0,5 ($1-5 \times 10^6$) da escala de McFaland, diluídas de 1:10 e
19 adicionadas em meio de cultura com o tratamento de GER. A cada três dias as concentrações
20 foram aumentadas e as leveduras foram cultivadas em ágar Cândida cromogênio (KASVI) para
21 verificar a presença ou ausência de contaminação.

22 **4.5 Efeito antifúngico de geraniol e fluconazol sobre células sésseis de *C.*** 23 ***tropicalis***

24 **4.5.1 Efeito de geraniol e fluconazol isolados ou combinados sobre** 25 **adesão de *C. tropicalis* em poliestireno**

26 O ensaio de adesão foi realizado segundo Raut e colaboradores (2013) em superfície
27 de poliestireno. Os fungos foram crescidos em ASD. Diferentes concentrações de GER (1.024
28 – 128 µg/mL), FLZ (256 – 16 µg/mL) e a combinação GER/FLZ (1.024/4 µg/mL; 512/2 µg/mL,
29 256/1 µg/mL, 128/0,5 µg/mL, 64/0,25 µg/mL e 32/0,125 µg/mL) foram diluídas em PBS. Nas
30 placas de 96 poços de fundo chato, foram adicionados 50 uL de GER em diferentes
31 concentrações. Poços sem GER foram utilizados como controle e AmB foi utilizado como
32 antifúngico de referência. Concomitante, 50 µL da suspensão fúngica (1×10^7) foram

1 adicionados em cada poço. As placas foram incubadas a 37 °C por 90 minutos a 100 rpm para
2 adesão das células à superfície de poliestireno. Depois da incubação, os poços foram lavados
3 com PBS para remover as células não aderidas. A adesão fúngica em cada poço foi analisada
4 como atividade metabólica relativa, usando o brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-
5 2H-tetrazólio (MTT) (Invitrogen), sendo adicionado 100 µL de PBS contendo 0,5 mg/mL de
6 MTT, 1% de glicose e 0,5% de menadiona, em cada poço.

7 **4.5.2 Efeito de geraniol e geraniol/fluconazol sobre biofilme maduro** 8 **de *C. tropicalis***

9 O efeito de GER e GER/FLZ em biofilme de *C. tropicalis* foi avaliado segundo Bizerra
10 *et al.*, 2008, com algumas modificações. Resumidamente, os microrganismos foram cultivados
11 a 37 °C por 24 h em YPD. Posteriormente, as leveduras foram cultivadas a 37 °C em YPD caldo
12 por 18 h. Após a incubação, as culturas foram centrifugadas a 3.000 x g, 5 minutos a 4 °C, as
13 células foram lavadas duas vezes e ressuspensas em PBS. A densidade celular final foi
14 ajustada para $1,0 \times 10^6$ e 100 µL da suspensão de células foram adicionadas em placas de
15 poliestireno com 96 poços de fundo chato e incubadas 37 °C por 24 h, 48 h, 72 h e 96 h. Após
16 a incubação, o meio foi aspirado, lavado duas vezes com PBS e a atividade metabólica das
17 células sésseis foi determinada pela redução do MTT (como descrito no tópico 4.5.1). Após
18 determinar o tempo do biofilme maduro, o biofilme foi novamente formado como descrito
19 anteriormente. Após 48 h de incubação, o meio foi aspirado, os poços foram lavados duas vezes
20 com PBS, tratados com GER (2.048 µg/mL – 32 µg/mL), FLZ (256 – 16 µg/mL) e a combinação
21 de GER/FLZ (1.024/4 µg/mL; 512/2 µg/mL, 256/1 µg/mL, 128/0,5 µg/mL, 64/0,25 µg/mL e
22 32/0,125 µg/mL) e incubadas por 24 h. Posteriormente, foi realizada a lavagem dos poços com
23 PBS e a viabilidade dos biofilmes foi determinada pelo método de redução do MTT (Longhi *et*
24 *al.*, 2015). Adicionalmente, a atividade do monoterpeno isolado e combinado com FLZ foi
25 avaliado pelo método de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Os biofilmes
26 foram formados e tratados conforme descrito anteriormente. Após o tratamento os biofilmes
27 foram lavados com PBS e os poços foram raspados com o auxílio de ponteiros de 100 µL no
28 sentido vertical, horizontal e ao redor do poço de forma homogênea. O procedimento foi
29 repetido após adição de 100 µL de PBS. As suspensões fúngicas foram homogeneizadas,
30 inoculadas (10 µL) em ASD e incubadas a 37 °C por 24 h. Posteriormente, realizou-se a
31 contagem de UFC para quantificar as células viáveis (Silva-Rodrigues *et al.*, 2024).

32

4.5.3 Efeito de geraniol e geraniol/fluconazol sobre a morfologia e ultraestrutura de biofilme maduro de *C. tropicalis*

Para avaliar o efeito do tratamento sobre a morfologia e estrutura do biofilme, *C. tropicalis* ATCC 28707 foi selecionada para análise. Biofilmes tratados com GER, FLZ e GER/FLZ foram analisados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Lâminas de poliestireno de aproximadamente 1 cm² foram colocadas no fundo dos poços de uma placa de 24 poços. Inóculos de 1,0 × 10⁶ células/mL em RPMI foram adicionados nos poços. O sistema foi incubado por 48 h a 37 °C, e após esse período os biofilmes foram lavados e tratados com as concentrações (GER: 1.024, 512 e 256 µg/mL; FLZ: 256 µg/mL e GER/FLZ 128/0,5) por 24 h à 37 °C. Posteriormente, os biofilmes tratados e não tratados foram fixados com 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 em temperatura ambiente por 4 h. Em seguida, foram realizadas a pós fixação em tetróxido de ósmio (OsO₄) 1% por 2 h e uma série de lavagens com etanol (30, 50, 70, 90 e 100%). Após as lavagens com etanol, as amostras foram incubadas três vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1M por 10 min cada e por fim, foram secas no ponto crítico em CO₂ (BAL-TEC, CPD 030), revestidas com ouro (BAL-TEC, SCD 050) e observadas no microscópio eletrônico de varredura (PHILIPS-FEI, Quanta 200) (Silva-Rodrigues *et al.*, 2024).

4.6 Toxicidade *in silico* e *in vivo* de geraniol e geraniol/fluconazol

4.6.1 ADMET

O GER foi submetido à pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/prediction>) para prever suas propriedades farmacocinéticas e toxicológicas mais relevantes, como absorção intestinal, metabolismo e toxicidade (ADMET) (Pires *et al.*, 2015).

Ademais, foram realizadas previsões das propriedades semelhantes à fármacos (*drug-likeness*) licenciados utilizando as ferramentas online *Osiris Property Explorer* (<https://www.organicchemistry.org/prog/peo/>) e *Molinspiration* (<https://www.molinspiration.com/>) (Daina *et al.*, 2017). Os resultados foram interpretados com base na regra dos cinco de Lipinski, que estabelece que a maioria das moléculas "semelhantes a fármacos" deve apresentar cLogP ≤ 5, peso molecular (MW) ≤ 500 Da, número de aceptores de ligações de hidrogênio ≤ 10 (nHBA ≤ 10) e número de doadores de ligações de hidrogênio ≤ 5 (nHBD ≤ 5). Portanto, moléculas que violam mais de uma dessas regras podem apresentar problemas de biodisponibilidade (Lipinski *et al.*, 2001).

4.6.2 Toxicidade de geraniol e geraniol/fluconazol *in vivo* em *Galleria mellonella*

Para determinar a citotoxicidade de GER e GER/FLZ foram utilizadas larvas no 6º instar com aproximadamente 150-300 mg e de coloração homogênea. Para inoculação das substâncias, os materiais foram devidamente higienizados, a região ventral e as patas de cada larva foram higienizadas com álcool 70%. As larvas foram distribuídas nos seguintes grupos: grupo tratado com 256 µg/mL de GER; grupo tratado com 512 µg/mL de GER e grupo tratado com a combinação de GER/FLZ (256/1,0 µg/mL). As larvas infectadas foram incubadas a 35 °C e acompanhadas por um período de cinco dias. A morte das larvas foi monitorada por inspeção visual de sua coloração (marrom-marrom escuro e ausência de resposta ao estímulo). Cada grupo experimental continha 10 larvas (Silva-Rodrigues *et al.*, 2024).

4.7 Avaliação da atividade antifúngica de geraniol e geraniol/fluconazol no tratamento de infecção por *C. tropicalis* em *Galleria mellonella*

Inicialmente foram determinadas as doses letais para 50% e 90% das larvas. Para o modelo de infecção *in vivo* foi utilizada *C. tropicalis* ATCC 28707. Assim, foram selecionados quatro inóculos fúngicos: 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7 células/mL e 10 µL de cada suspensão foram inoculados na última pata esquerda. As larvas foram incubadas e observadas por cinco dias como descrito acima. Para a avaliação da eficácia antifúngica *in vivo*, as larvas foram incubadas com a dose letal 80% e incubadas à 35 °C por 2 h. Em seguida, as larvas foram divididas nos seguintes grupos: grupo controle negativo (apenas PBS), grupo controle positivo (inoculação fúngica), grupo infectado e tratado com 256 µg/mL de GER, grupo infectado e tratado com 512 µg/mL de GER e grupo infectado e tratado com a combinação de GER/FLZ (256/1,0 µg/mL). A mortalidade das larvas foi monitorada a cada 24 h durante cinco dias. Ao final do quinto dia de avaliação, as linfas de todas as larvas sobreviventes foram coletadas, diluídas e semeadas para contagem de células viáveis (Liu *et al.*, 2017; Vega-Chacón *et al.*, 2021).

4.8 Análises Estatísticas

Para as análises estatísticas foi utilizado o software GraphPad Prism versão 8.0.0 (GraphPad Software, San Diego, California USA). Foi utilizado o teste de ANOVA para análise da diferença entre os grupos, seguida do pós-teste de Tukey para identificar e quantificar a diferença entre os grupos. Foram considerados p-valor < 0,05.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 *Candida tropicalis* são resistentes a FLZ e ITR e o mecanismo de resistência pode estar associado a superexpressão dos genes *ERG3* e *CDR1*

A cepa de referência *C. tropicalis* ATCC 28707 e os isolados clínicos apresentaram resistência ao FLZ com valores de CIM e CFM superiores a 256 µg/mL. Além disso, os isolados clínicos foram sensíveis à AmB e resistentes ao ITR (Tabela 3). O valor de CIM de FLZ para a cepa *C. parapsilosis* ATCC 22019 estava dentro da faixa aceitável (CLSI, 2020; EUCAST 2020).

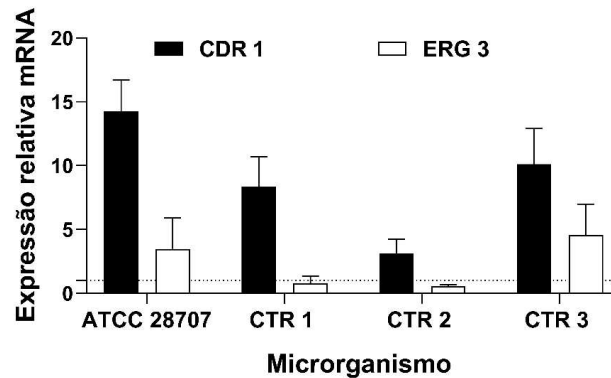
Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) de fluconazol, itraconazol, anfotericina B e geraniol para *C. tropicalis*.

| <i>Candida tropicalis</i> | FLZ | ITR | AmB | GER | |
|---------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------|
| | CIM/CFM (µg/mL) | CIM/CFM (µg/mL) | CIM/CFM (µg/mL) | CIM/CFM (µg/mL) | CFM/CIM* |
| <i>C. tropicalis</i> ATCC 28707 | > 256/ > 256 | > 0.5/ >0.5 | - | 512/1024 | 2 |
| CTR 1 | > 256/ > 256 | > 0.5/ >0.5 | 1/1 | 512/1024 | 2 |
| CTR 2 | > 256/ > 256 | > 0.5/ >0.5 | 1/1 | 512/1024 | 2 |
| CTR 3 | > 256/ > 256 | > 0.5/ >0.5 | 0.5/0.5 | 512/1024 | 2 |

FLZ: Fluconazol; GER: Geraniol; AmB: Anfotericina B; ITR: Itraconazol; CIM: Concentração inibitória mínima; CFM: Concentração fungicida mínima. O perfil de sensibilidade de fluconazol, itraconazol e anfotericina B foram interpretados conforme recomendado pelo EUCAST.

*Interpretação: 1 – 4 fungicida e fungistático >4.

Para investigar o mecanismo de resistência aos azóis nas cepas de *C. tropicalis*, a expressão dos genes *ERG11*, *ERG3*, *MDR1* e *CDR1* foi analisada por qPCR. A análise dos níveis de mRNA revelou que o gene *CDR1* estava superexpresso em todas as cepas de *C. tropicalis* resistentes aos azóis incubadas com 256 µg/mL de FLZ por 12 h em comparação com células planctônicas não tratadas. As diferenças na expressão do gene *CDR1* variaram de $3,14 \pm 1,11$ a $14,27 \pm 2,45$ vezes. Além disso, superexpressão do gene *ERG3* também foi observada para a cepa de referência ATCC 28707 e para o isolado clínico CTR3, mostrando uma diferença na expressão de $3,48 \pm 2,42$ e $4,57 \pm 2,45$ vezes, respectivamente, quando comparadas às células incubadas sem FLZ (Figura 16). A expressão de *ERG11* e *MDR1* não foi regulada positivamente nestas cepas. Estes resultados indicam um papel ativo dos genes *CDR1* e *ERG3* na resistência aos azóis das cepas de *C. tropicalis* analisadas neste estudo.



1
2 **Fonte:** o próprio autor.

3 **Figura 16.** Padrão de expressão de *CDR1* (barras pretas) e *ERG3* (barras brancas) em *C. tropicalis* resistentes a
4 azóis. Os transcritos foram quantificados por PCR em tempo real usando o sistema SYBR green e o método de
5 limiar de ciclo. A altura das barras representa a alteração na expressão gênica de células planctônicas incubadas
6 com 256 µg/mL de fluconazol por 12 h em comparação com as células cultivadas na ausência do antifúngico. O
7 gene que codifica para actina foi utilizado como normalizador. As barras representam dados de três réplicas. As
8 barras de erro representam desvios padrão.

9
10 Paul *et al.* (2022) reportaram a superexpressão de *CDR1* associada a resistência ao
11 azol em isolados clínicos de *C. tropicalis* resistente aos azóis. Adicionalmente, este foi o
12 primeiro estudo a relatar a superexpressão de *ERG1*, *ERG2* e *ERG3*, associada a resistência aos
13 azóis em *C. tropicalis*. Rojas e colaboradores (2023) relataram superexpressão do gene *ERG3*
14 em *C. tropicalis* exibindo resistência ou sensibilidade dose-dependente ao FLZ na presença
15 deste antifúngico. Em contraste com nossos resultados, estudos anteriores relataram a
16 superexpressão dos genes *MDR1*, *CDR2*, *CDR3* e *ERG11* em *C. tropicalis* resistente a azóis
17 (Barchiesi *et al.*, 2000; Vandeputte *et al.*, 2005; Khalifa *et al.*, 2022). Assim, outros
18 mecanismos, que não foram investigados neste estudo, também podem estar associados à
19 resistência aos azóis nesta espécie de fungo.

20 **5.2 Geraniol apresenta atividade fungicida contra células planctônicas de *C.***
21 ***tropicalis* resistentes aos azóis, prejudicando a permeabilidade da**
22 **membrana celular, e a exposição prolongada ao monoterpeno não seleciona**
23 **mutantes resistentes**

24 Estudos anteriores relataram o efeito antifúngico de GER contra espécies de *Candida*
25 exibindo diferentes perfis de sensibilidade ao monoterpeno, com valores de CIM/CFM variando
26 de 16 a 1000 µg/mL (Zore *et al.*, 2011; Leite *et al.*, 2015; Kaypetch *et al.*, 2022; Fatima, Fatima,
27 Hameed 2023). No presente estudo, GER inibiu o crescimento de todas as cepas de *C.*
28 *tropicalis*, apresentando valores de CIM de 512 µg/mL e CFM de 1.024 µg/mL de GER (Tabela
29 3), evidenciando forte atividade antifúngica (Sartoratto *et al.*, 2004). Além disso, a razão entre
30 CFM/CIM igual a 2 indica um efeito fungicida (Balouri, Sadiki, Ibsoud, 2016).

1 Mirron e colaboradores (2014) reportaram atividade fungicida de GER contra *C.*
2 *tropicalis* e *C. parapsilosis*, com uma CIM ≥ 128 $\mu\text{g/mL}$ para ambas as espécies. A ação
3 fungicida de GER foi relatada também contra os fungos filamentosos, *Aspergillus flavus*, *A.*
4 *fumigatus* e *A. niger*, mostrando uma ação de amplo espectro do monoterpeneo contra fungos
5 (Zore *et al.*, 2011). Sharma, Khan e Manzoor (2016) descreveram valores de CIM e CFM iguais
6 a 80 $\mu\text{g/mL}$ para *C. tropicalis*. Singulari *et al.* (2018), reportaram uma CIM de 250 $\mu\text{g/mL}$ para
7 *C. tropicalis* ATCC 13803 e 37,5 $\mu\text{g/mL}$ para *C. parapsilosis* ATCC 22019.

8 Com base nos resultados obtidos na técnica de microdiluição em caldo, analisamos o
9 efeito de GER sobre a cinética de crescimento das leveduras. Esta análise desempenha um papel
10 fundamental, permitindo compreender a dinâmica de crescimento dos microrganismos, na
11 presença da substância testada, auxiliando na determinação da concentração ideal e o tempo de
12 exposição necessários para obter o efeito antifúngico. Foram utilizadas as concentrações de
13 CIM (512 $\mu\text{g/mL}$) e CFM (1.024 $\mu\text{g/mL}$) de GER para o experimento. AmB foi incluído no
14 ensaio como controle de atividade antifúngica conhecida.

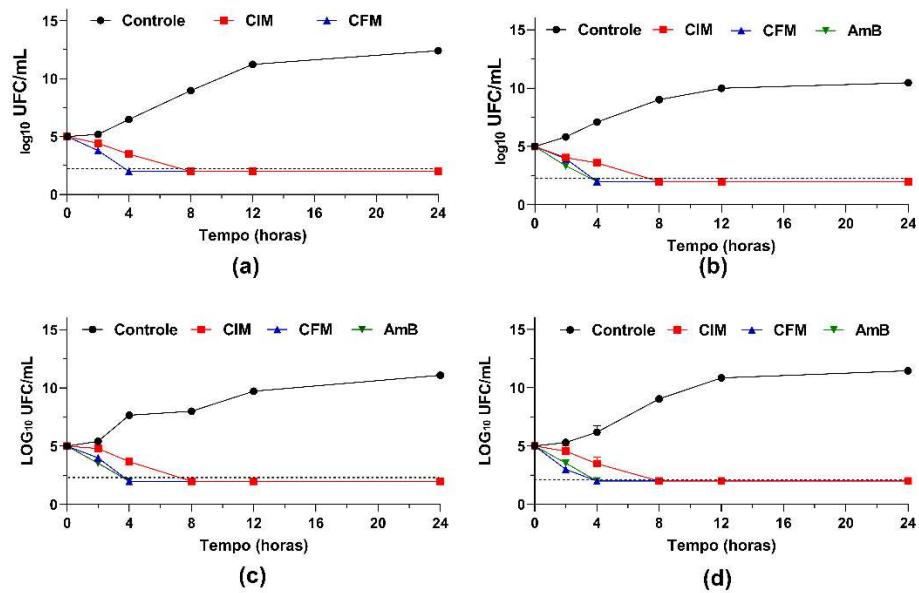
15 Ao avaliar o efeito de GER sobre o crescimento de *C. tropicalis*, houve redução de
16 aproximadamente 3 \log_{10} UFC/mL nas primeiras quatro horas do tratamento na concentração
17 de 1.024 $\mu\text{g/mL}$, quando comparado com inóculo inicial, padrão semelhante ao observado com
18 AmB, um agente fungicida já conhecido (Carolus *et al.*, 2020). Já o valor de CIM (512 $\mu\text{g/mL}$),
19 a redução de 3 \log_{10} UFC/mL em comparação com o inóculo inicial foi observado após 8 h de
20 incubação (Figura 17).

21

22

23

24



1

2 **Fonte:** o próprio autor.

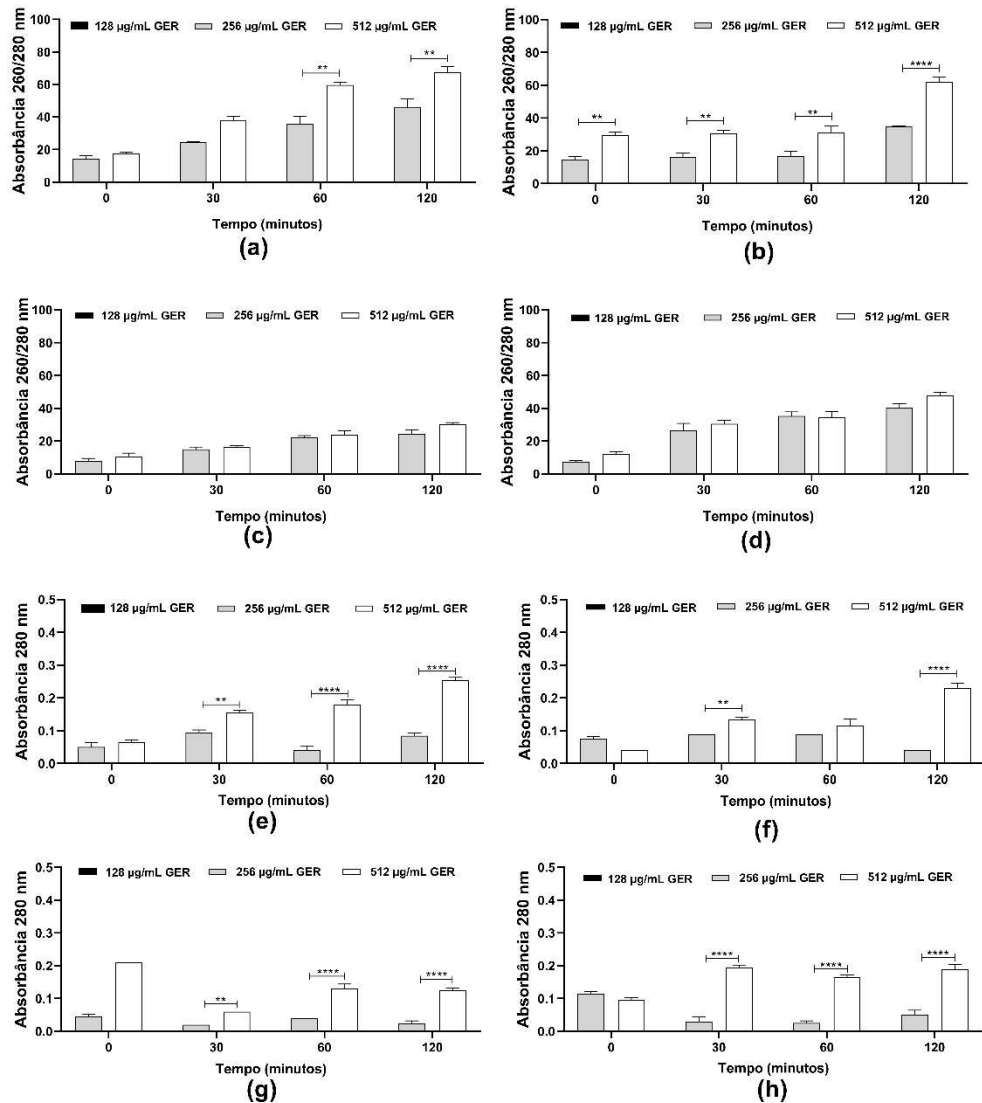
3 **Figura 17.** Atividade antifúngica do geraniol (GER) em *C. tropicalis*. Cinética de crescimento de *C. tropicalis*
 4 ATCC 28707 (a); CTR1 (b); CTR2 (c) e CTR3 (d), incubados com a concentração inibitória mínima (CIM) e
 5 concentração fungicida mínima (CFM). As linhas pontilhadas representam redução de 99% (3 log₁₀) na contagem
 6 de UFC/mL. Os valores representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes. AmB:
 7 anfotericina B.

8

9 Estudos sugerem que o efeito fungicida de terpenos e seus derivados de diferentes
 10 espécies de plantas sobre *C. albicans* pode ser devido ao dano à membrana plasmática e a
 11 permeabilidade alterada (Masyita *et al.*, 2022). Por exemplo, o monoterpeno isoespintanol,
 12 isolado de folhas de *Oxandra xilopioides*, causou danos na membrana plasmática de *C.*
 13 *tropicalis*, resultando em vazamento de conteúdo intracelular (ácido nucleico e proteínas)
 14 (Contreras *et al.*, 2022). Além disso, GER causou diminuição dependente da dose no efluxo de
 15 prótons estimulado pela glicose e mediado pela atividade da H⁺-ATPase em *C. albicans* e *C.*
 16 *glabrata* (Sharma, Khan, Manzoor 2016; Singh, Fatima, Hameed 2016).

17 Devido as evidências reportadas para outras espécies, o possível efeito do GER na
 18 integridade da membrana plasmática de *C. tropicalis* foi analisada indiretamente pela medida
 19 da absorbância a 260/280 nm, do conteúdo intracelular liberado. Conforme mostrado na Figura
 20 18, foi observado o aumento nesses valores para todas as cepas fúngicas, indicando o vazamento
 21 de componentes intracelulares.

22



1

2 **Fonte:** o próprio autor.

3 **Figura 18.** Análise da integridade da membrana plasmática. Células planctônicas foram incubadas com ou sem
 4 $0,5 \times \text{CIM}$ e CIM de geraniol (GER). O conteúdo intracelular liberado a 260/280 nm (a-d) ou 280 nm (e-h) foi
 5 determinado após os intervalos de tempo especificados. Os valores são as médias e os desvios padrão de três
 6 experimentos independentes. *C. tropicalis* ATCC 28707 (a, e); CTR1 (b, f); CTR2 (c,g); CTR3 (d,h). ** $p < 0,01$,
 7 *** $p < 0,001$ em comparação com células fúngicas não tratadas.

8

9

O efeito não diferiu entre ambas as concentrações de GER para as cepas CTR2 e CTR3

10

(Figura 18 c,d) para os componentes que absorvem a 260/280 nm. Notavelmente, a cepa CTR1

11

exibiu uma diferença significativa ($p < 0,01$ e $p < 0,0001$) no vazamento do conteúdo intracelular

12

entre todas as concentrações de GER durante o período de análise (Figura 18 b). Além disso, a

13

cepa de referência apresentou diferença significativa no vazamento entre as concentrações de

14

GER apenas nos tempos de 60 e 120 minutos (Figura 18 a). Para componentes que absorvem a

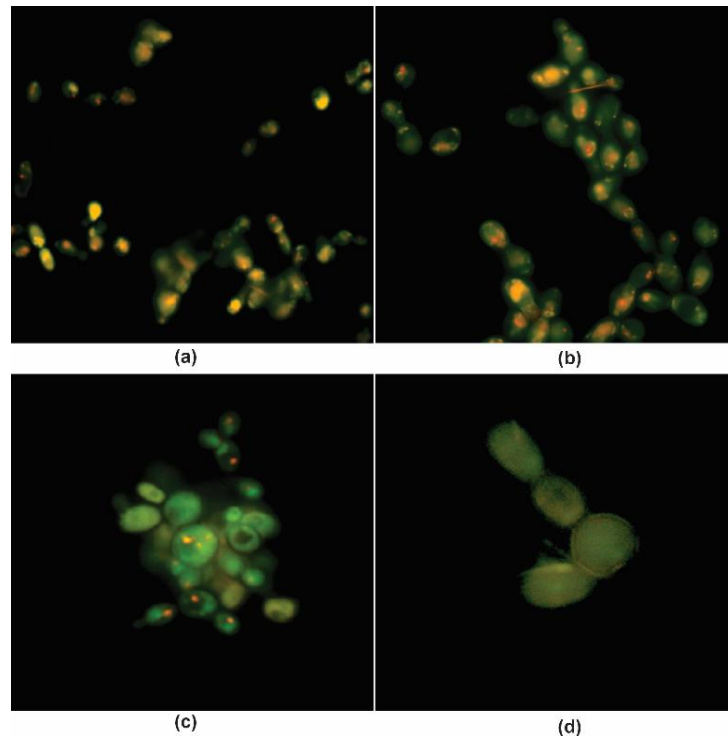
15

280 nm (proteína), foi observado um vazamento dependente da dose para a maioria das cepas

16

de *C. tropicalis* com diferença estatística variando de $p < 0,01$ a $p < 0,0001$ (Figura 18 e,h).

1 A fim de explorar ainda mais o efeito do GER na membrana plasmática, *C. tropicalis*
 2 ATCC 28707 tratados e não tratado com a concentração da CIM de GER por 3 h foram
 3 incubados com corantes fluorescentes FUN1® e Calcofluor White™ M2R para marcação
 4 diferencial (figura 19).



6 **Fonte:** o próprio autor.

7 **Figura 19.** Análise da viabilidade celular e integridade da membrana plasmática de *C. tropicalis* ATCC 28707
 8 após marcação diferencial com FUN-1™ e Calcofluor White™ MR2 com aumento de 400x. A levedura foi
 9 incubada sem (a,b) e com CIM de geraniol (GER) (c,d) por 3 h. Células contendo estruturas intravacuolares
 10 fluorescentes vermelhas representam leveduras metabolicamente ativas e integridade da membrana plasmática
 11 (a,b). Células com fluorescência verde-amarela difusa caracterizam células metabolicamente inativas e perda da
 12 integridade da membrana (c, d).
 13
 14

15 Estruturas intravasculares fluorescentes vermelho-laranja foram observadas dentro do
 16 citoplasma de células fúngicas não tratadas, indicando que as células estão metabolicamente
 17 ativas com membrana citoplasmática intacta (Figura 19 a,b). Por outro lado, as células tratadas
 18 com GER exibiram coloração difusa de fluorescência verde-amarelada, indicativa de atividade
 19 metabólica prejudicada e membrana plasmática danificada (Figura 19 c,d). Esses dados
 20 corroboram a atividade fungicida de GER pelo vazamento do conteúdo intracelular das células
 21 fúngicas, mostrando alteração na integridade da membrana celular.

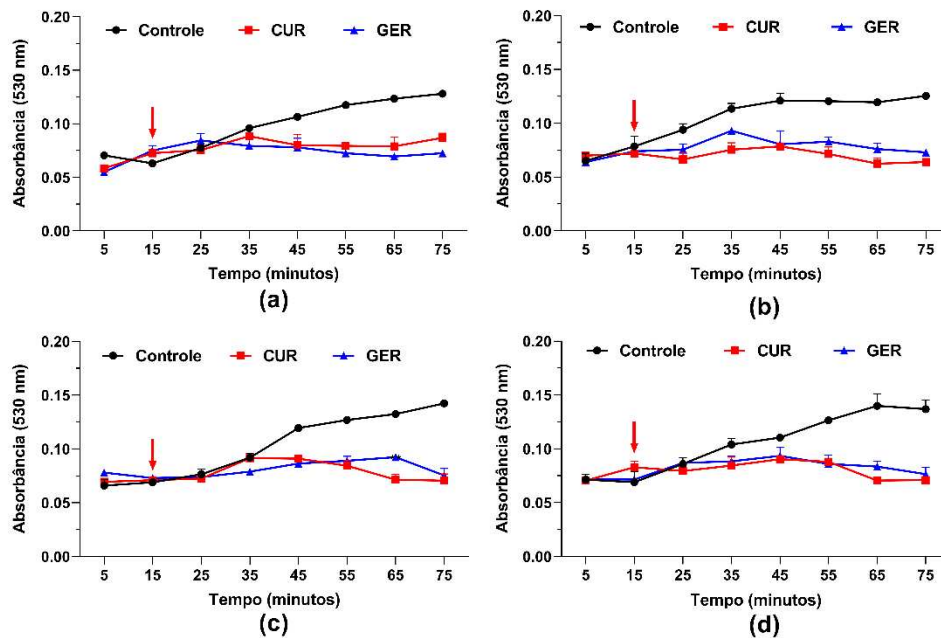
22 A exposição excessiva a agentes antifúngicos, decorrente de terapias prolongadas, uso
 23 inadequado e, ocasionalmente, aplicação indiscriminada na saúde humana, agricultura e
 24 medicina veterinária, tem contribuído significativamente para o aumento da resistência fúngica,

1 especialmente aos azóis (Dos Santos, Ishida, 2023). Devido a isso, a seleção de mutantes de *C.*
2 *tropicalis* resistentes ao GER foi realizada cultivando a levedura em concentrações sub-CIM ao
3 longo de trinta dias. Após o tratamento prolongado com Sub-CIM de GER, não foram
4 observadas mudanças na sensibilidade ao monoterpeno, uma vez que a CIM permaneceu
5 constante em 512 µg/mL ao longo de todo o experimento. Esses resultados sugerem que o GER
6 é um candidato promissor para o desenvolvimento de novas estratégias de controle contra
7 diferentes espécies de *Candida*.

8 **5.3 Geraniol pode inibir a atividade da bomba de efluxo de *C. tropicalis* ligando-** 9 **se à proteína Cdr1**

10 Estudos anteriores evidenciaram que GER inibe a atividade dos transportadores da
11 família ABC em *C. albicans* (Singht *et al.*, 2018), *C. glabrata* (Gupta *et al.*, 2020) e *C. auris*
12 (Fatima *et al.*, 2023). Dada a superexpressão do gene *CDR1* em *C. tropicalis* resistente a azol
13 no presente estudo, e para obtermos mais informações sobre o mecanismo de ação de GER,
14 avaliamos o seu efeito na atividade de bomba de efluxo monitorando o efluxo de R6G induzido
15 por glicose. Como GER não causou vazamento do conteúdo intracelular (absorvendo a
16 OD_{260/280} nm) em concentração de 128 µg/mL, avaliamos se esta concentração poderia atuar
17 como um inibidor da bomba de efluxo em *C. tropicalis*.

18 Os dados evidenciaram que o controle (sem tratamento prévio com GER ou CUR)
19 apresentou efluxo funcional de R6G induzido por glicose, podendo ser observado pela
20 concentração extracelular no sobrenadante. Um efeito contrário pode ser observado quando as
21 células receberam tratamento prévio com 37 µg/mL CUR e 128 µg/mL de GER, visto que não
22 ocorreu aumento na absorbância, indicando que GER inibiu o efluxo de R6G (Figura 20).



1

2 **Fonte:** o próprio autor.

3 **Figura 20.** Efeito do geraniol no efluxo de rodamina 6G por células planctônicas de *C. tropicalis*. As células
 4 planctônicas foram incubadas com geraniol (GER) $0,5 \times \text{CIM}$ por 5 h. O efluxo R6G dependente de energia foi
 5 iniciado pela adição de glicose a 2% (seta) e quantificado medindo a absorbância do sobrenadante a 530 nm. *C.*
 6 *tropicalis* ATCC 28707 (a); CTR1 (b); CTR2 (c); CTR3 (d). CUR: curcumina. Os valores são as médias e os
 7 desvios padrão de três experimentos independentes.

8

9 Para elucidar melhor a inibição observada da bomba de efluxo por GER, uma análise
 10 de docagem molecular foi realizada para investigar a interação potencial entre GER e *CtCdr1*.
 11 Como não há registros de estudos computacionais teóricos ou do modelo cristalográfico no
 12 *Protein Data Bank* (PDB) no período deste estudo, um modelo desta proteína foi desenvolvido
 13 usando o AlphaFold2 por meio do servidor ColabFold. O servidor AlphaFold2 da ColabFold é
 14 uma ferramenta para previsões de estruturas de proteínas. O programa gera previsões de alta
 15 qualidade da estrutura 3D de moléculas de proteínas a partir de suas sequências de aminoácidos
 16 (Varadi *et al.*, 2022).

17 O gene *CDR1* codifica um polipetídeo com 1.268 aminoácidos que foram modelados
 18 adequadamente e pode ser observado pela métrica (pLDDT), que calcula a diferença local entre
 19 as distâncias reais e distâncias previstas entre os átomos em uma estrutura proteica. A diferença
 20 entre essas distâncias é calculada para cada resíduo individualmente e depois atribuí um escore.
 21 Escore $>70\%$ são classificados como confiáveis (Mariani *et al.*, 2013). Em nosso estudo, o
 22 escore de pLDDT para a proteína de *C. tropicalis* foi acima de 84%. Devido diversas opções de
 23 proteínas obtidas pelas previsões, os valores de pLDDT foram calculados e em seguida
 24 atribuímos um rank para cada previsão obtida. Optamos pelo ranks_1, por apresentar maior
 25 conservação e confiabilidade em toda sua estrutura (Figura 21 a).

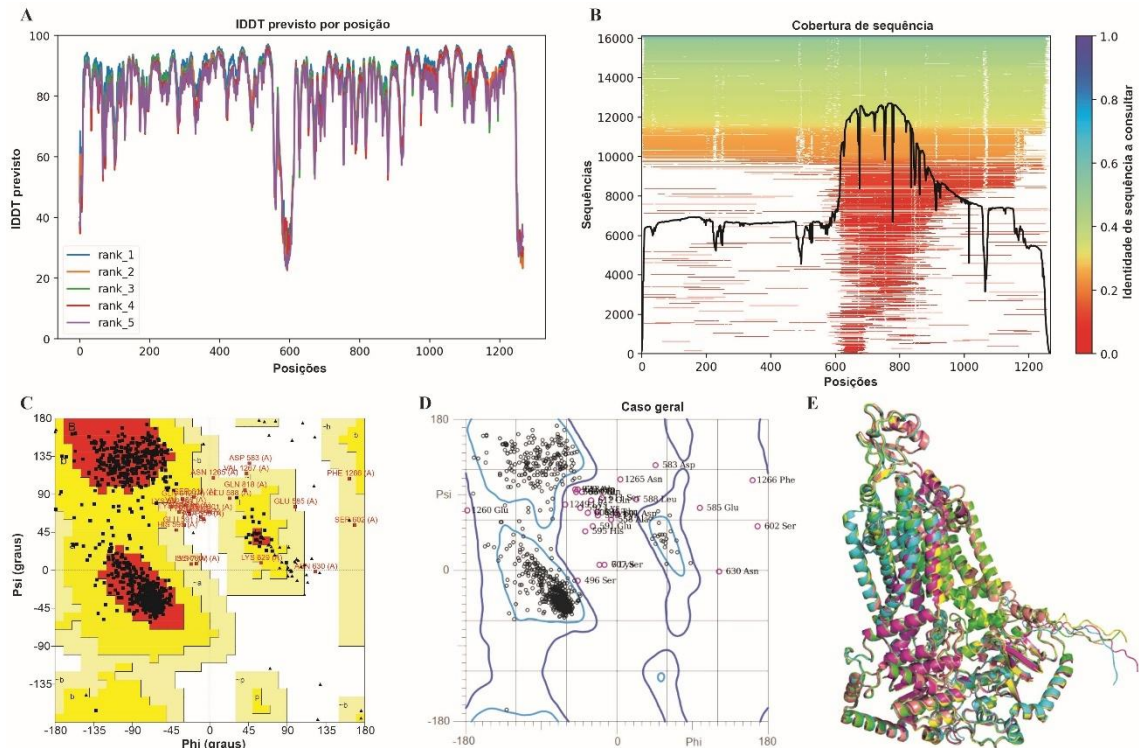
1 A cobertura de sequência utilizada para produzir os modelos da proteína foi baseado
2 em número de sequência homólogas entre 14.000 e 16.000 e a identidade das sequências foi
3 superior a 70%. As regiões sem cobertura não prejudicam as regiões do sítio de ligação com a
4 proteína, pois embora possa haver lacunas nas sequências, as mesmas não afetam essas regiões.
5 Então mesmo com a falta de certas regiões, as previsões e modelos resultantes são confiáveis e
6 úteis para estudar os sítios de ligação de GER na proteína, como pode ser observado no topo do
7 gráfico (Figura 21 b).

8 Trabalhar com proteína desenhada pode trazer certas incertezas a respeito dos
9 resultados obtidos, nesse sentido etapas de validações se fazem necessárias, pois podem ocorrer
10 erros na estrutura modelada. A validação em estruturas prontas disponíveis no PDB também é
11 fundamental, visto que não há exigência formal de qualidade de estrutura para depósito neste
12 repositório. Nesse sentido, o gráfico de Ramachandran é um método que fornece informações
13 de resíduos individuais e qualidade geral da estrutura proteica. A distribuição dos resíduos em
14 pontos de região permitidas indica uma conformação diédrica consistente e bem dobrada
15 (Sobolev *et al.*, 2020). Para verificar a confiabilidade do melhor modelo previsto, gráficos de
16 Ramachandran foram obtidos independentemente nos servidores PROCHECK e MolProbity.
17 O servidor PROCHECK mostrou que mais de 88,4% dos resíduos para CtCDR1 estavam nas
18 regiões mais favoráveis (A, B e L) indicando um modelo de boa qualidade (Figura 21 c).

19

20

21



1

2

Fonte: o próprio autor.

3

Figura 21. Processo de resolução e validação da estrutura 3D da proteína Cdr1 de *C. tropicalis*. Cobertura prevista de posição de resíduos de aminoácidos e pLDDT de Cdr1 (A, B). Validação do modelo de pontuação máxima pelo gráfico PROCHECK Ramachandran e pelo gráfico MolProbity Ramachandran, respectivamente (C, D). Alinhamento das cinco estruturas 3D de Cdr1 de *C. tropicalis* previstas pelo AlphaFold2 (E).

7

8

Os gráficos MolProbity Ramachandran, também mostraram 96,9% dos resíduos de *CtCDR1* nas regiões permitidas, o que novamente confirmou a qualidade do modelo previsto (Figura 21 d). Assim, ambos os softwares indicaram a confiabilidade das estruturas previstas das proteínas (Sobolev *et al.*, 2020). Ainda pode-se verificar os alinhamentos das estruturas 3D de *CtCdr* do rank_1 realizados pelo AlphaFold2, evidenciando que o desvio quadrático médio (RMSD) foi de 0.452 Å (Figura 21 e).

14

O AutoDock 4.2 foi utilizado para determinar a orientação dos ligantes CUR, FAR e GER para o sítio ativo de *CtCdr1*, e a conformação 3D com os valores da energia mínima de ligação (ΔG) e constante inibitória (K_i) para cada molécula, foi escolhido para análise posterior e os resultados são apresentados na tabela 5. A ΔG , indica o quanto a molécula inibidora está ligada ao alvo, referindo-se a energia livre de Gibbs associada a formação de um completo ligante-receptor. Por outro lado, K_i descreve a afinidade relativa de um inibidor em relação ao alvo molecular, sendo que valores baixos indicam maior afinidade e eficácia do inibidor. (Junior; Gonçalves, 2019). Portanto, os modos de ligação dos inibidores conhecidos CUR e FAR, bem como GER foram investigados usando o software visualizador Discovey Studio (DS), 2021 (Biovia, 2021).

23

1 **Tabela 4.** Energia de ligação de *CtCdr1* com geraniol, curcumina e farnesol.

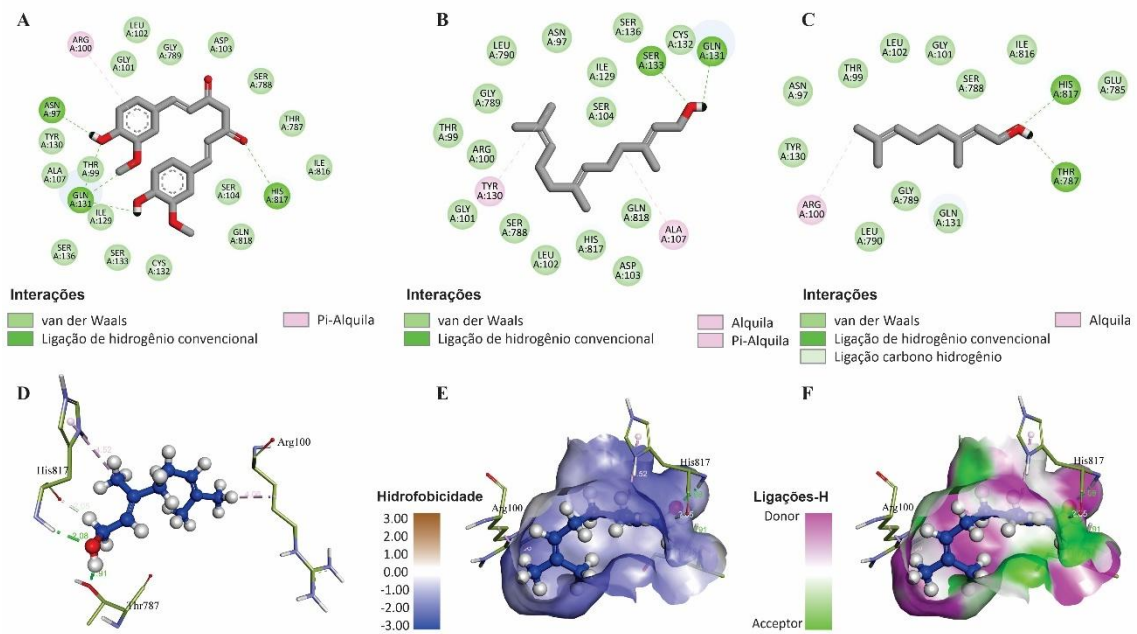
| Enzima | ^a CUR | | ^b FAR | | ^c GER | |
|---------------------------|---------------------------------------|--------------------|---------------------------------------|--------------------|---------------------------------------|--------------------|
| | ^d ΔG (kcal/mol) | ^e K_i | ^d ΔG (kcal/mol) | ^e K_i | ^d ΔG (kcal/mol) | ^e K_i |
| <i>C. tropicalis</i> Cdr1 | - 9.55 | 99.73 nM | -7.00 | 7.41 μ M | - 5.61 | 77.56 μ M |

2 ^aCurcumina; ^bFarnesol; ^cGeraniol; ^dEnergia livre de ligação e constante de inibição calculada.

3
4 GER é uma molécula pequena que exhibe principalmente propriedades físico-químicas
5 lipofílicas, com apenas um grupo funcional polar (OH) (Figura 22 c). No entanto, GER exhibe
6 bioatividade contra *C. tropicalis* ao interagir com resíduos importantes dentro do sítio de
7 ligação da proteína *CtCdr1*, possivelmente inibindo sua atividade. Também vale destacar a
8 baixa hidrofobicidade do sítio de ligação de *CtCdr1*, o que justifica a menor afinidade de GER
9 por essa região composto principalmente por resíduos hidrofílicos (Figura 22 e,f). Na verdade,
10 o caráter anfipático de GER facilita as interações com essas regiões hidrofóbicas do sítio de
11 ligação de *CtCdr1*, formando ligações de hidrogênio com resíduos His817 e Thr787. Além
12 disso, o grupo C1 e 7-metil do GER também pode interagir com os resíduos His817 e Arg100,
13 respectivamente, por meio de ligações carbono-hidrogênio (Figura 22 c). Por outro lado, o CUR
14 forma ligações de hidrogênio com Asn97, Gln131 e His8107 (Figura 22 a), enquanto o FAR
15 interage com os resíduos Ser133 e Gln131 (Figura 22 b) dentro do sítio de ligação *CtCdr1*.
16 Além disso, *CtCdr1* interage com GER, CUR e FAR por meio de ligações alquil, π -alquil,
17 hidrogênio-carbono e interações de van der Waals. Finalmente, ligações empilhadas amida- π
18 foram observadas entre *CtCdr1* e CUR e FAR.

19 Da mesma forma, um ΔG de -8,8 kcal/mol foi observado para GER como um ligante
20 da proteína Cdr1 de *C. albicans* (*CaCdr1*), exibindo interações de ligação de hidrogênio com
21 Pro1061 e Ser1062, além de interações hidrofóbicas com vários resíduos de aminoácidos em
22 seu sítio de ligação (Singh *et al.*, 2018). Coletivamente, esses resultados sustentam que GER se
23 liga ao sítio de ligação das proteínas Cdr1 de *Candida* spp., contribuindo para seu efeito
24 antifúngico.

25
26
27
28
29
30



1
2
3 **Fonte:** o próprio autor.

4 **Figura 22.** Interações moleculares de geraniol (GER), curcumina (CUR) e farnesol (FAR) com a proteína de
5 resistência de *Candida tropicalis* (CtCdr1). Os principais tipos de ligação de CUR (a), FAR (b) e GER (c) ao sítio
6 de ligação de CtCdr1p) em 2D. A distribuição 3D e as distâncias de ligação química do GER (azul) com os
7 aminoácidos (verde) do sítio de ligação do CtCdr1p (d). Modelos de superfície 3D mostrando as regiões do ligante
8 (GER) com maiores ou menores graus de hidrofbicidade e os sítios doadores e aceptores de hidrogênio (e, f).
9

10 **5.4 Geraniol apresenta interação sinérgica com fluconazol em células** 11 **planctônicas de *C. tropicalis* resistentes aos azóis**

12 A terapia combinada de antimicrobianos é amplamente empregada no tratamento de
13 diversas infecções, incluindo aquelas causadas por espécies fúngicas. Essa abordagem busca
14 aumentar a eficácia dos medicamentos, além de reduzir tanto a dosagem necessária quanto os
15 efeitos adversos. Ademais, ela é uma estratégia crucial no combate à resistência antimicrobiana
16 (Sullivan *et al.*, 2020; Bermas *et al.*, 2020; Andriani *et al.*, 2021).

17 O efeito antifúngico do GER combinado com FLZ ou ITR foi investigado usando o
18 ensaio de *Checkerboard*. O FICI do GER (256 µg/mL) com FLZ (1 µg/mL) foi de 0,50 para
19 todas as cepas de *C. tropicalis*, indicando uma interação sinérgica (Odds, 2003) (Tabela 5). Da
20 mesma forma, uma interação sinérgica entre GER e ITR foi observada, em um valor de ICIF
21 de 0,26 foi identificado para a cepa CTR1 e 0,27 para as outras cepas de *C. tropicalis*. Foi
22 observada uma redução de pelo menos 64 vezes nos valores de CIM do ITR (Tabela 5).
23
24

1 **Tabela 5:** Interação antifúngica entre geraniol e itraconazol e geraniol e fluconazol em
 2 células planctônicas de *C. tropicalis*.

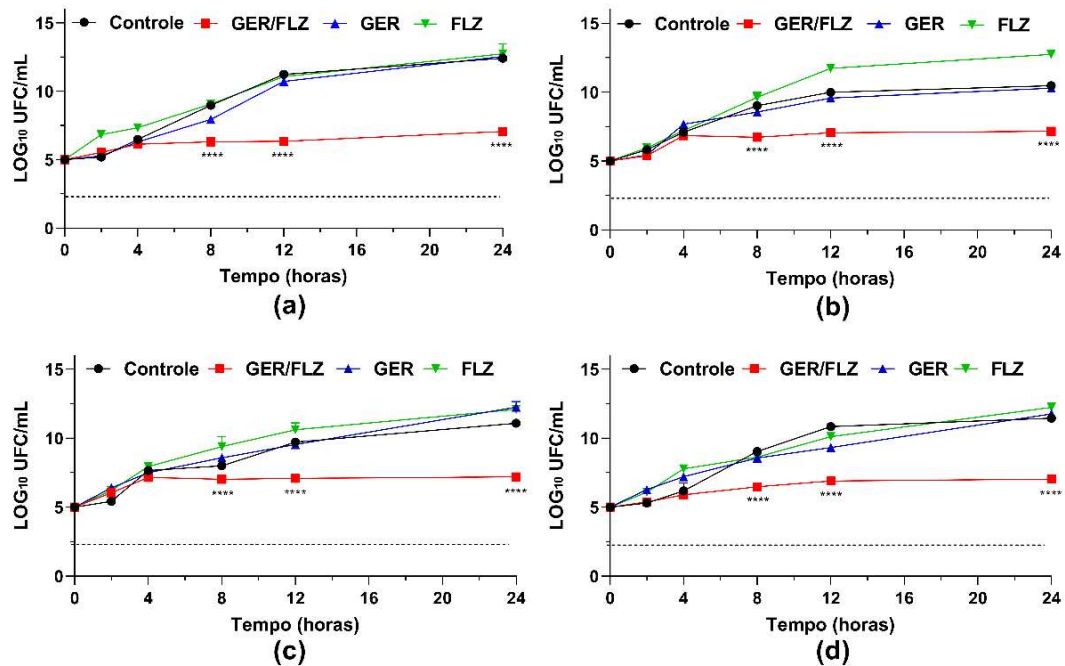
| <i>Candida tropicalis</i> | GER CIM ($\mu\text{g/mL}$) | ITR CIM ($\mu\text{g/mL}$) | GER/ITR CIM ($\mu\text{g/mL}$) | ICIF | Interação* |
|---------------------------|------------------------------------|------------------------------------|--|------|------------|
| ATCC 28707 | 512 | 1 | 128/0,015 | 0,27 | Sinergismo |
| CTR 1 | 512 | 2 | 128/0,015 | 0,26 | Sinergismo |
| CTR 2 | 512 | 1 | 128/0,015 | 0,27 | Sinergismo |
| CTR 3 | 512 | 1 | 128/0,015 | 0,27 | Sinergismo |
| <i>Candida tropicalis</i> | GER CIM ($\mu\text{g/mL}$) | FLZ CIM ($\mu\text{g/mL}$) | GER/FLZ CIM ($\mu\text{g/mL}$) | ICIF | Interação* |
| ATCC 28707 | 512 | > 256 | 256/1 | 0,50 | Sinergismo |
| CTR 1 | 512 | > 256 | 256/1 | 0,50 | Sinergismo |
| CTR 2 | 512 | > 256 | 256/1 | 0,50 | Sinergismo |
| CTR 3 | 512 | > 256 | 256/1 | 0,50 | Sinergismo |

3 GER: Geraniol; ITR: Itraconazol; CIM: Concentração Inibitória Mínima; ICIF: índice de Concentração Inibitória
 4 Fracionada;

5 *Valores de referência: sinergismo, $\text{ICIF} \leq 0.5$; antagonismo, $\text{ICIF} \geq 4$ e indiferente, $\text{ICIF} > 0.5$ a 4 (Odds, 2003).
 6

7 O efeito da combinação de GER e FLZ também foi observado na cinética de
 8 crescimento (Figura 23). Entretanto, diferente da CIM de GER isolada que apresentou atividade
 9 fungicida, a combinação apresentou atividade fungistática. Apesar disso, a adição de GER com
 10 FLZ causou redução de pelo menos 256 vezes nos valores de CIM de FLZ para todas as cepas
 11 de *C. tropicalis* analisadas neste estudo. A vantagem da combinação é potencializada quando
 12 se observa as concentrações da combinação de forma isolada. Os padrões de cinética de
 13 crescimento na presença deste monoterpenoide (256 $\mu\text{g/mL}$) e FLZ (1 $\mu\text{g/mL}$) foram
 14 semelhantes ao controle não tratado para todas as cepas de *C. tropicalis* analisadas.

15



1

2 **Fonte:** o próprio autor.

3 **Figura 23.** Atividade antifúngica do geraniol (GER) combinado com fluconazol (FLZ) contra células planctônicas
 4 de *C. tropicalis*. *C. tropicalis* ATCC 28707 (a); CTR1 (b); CTR2 (c) e CTR3 (d). Incubadas com GER e FLZ em
 5 combinação ou sozinhas em concentrações da combinação. As linhas pontilhadas representam redução de 99% (3
 6 \log_{10}) na contagem de UFC/mL. Os valores representam a média e o desvio padrão de três experimentos
 7 independentes. **** $p < 0,0001$ em comparação com células fúngicas não tratadas.

8

9 Até o presente momento, não foram encontrados relatos na literatura da ação
 10 combinada entre GER/FLZ em *C. tropicalis* resistentes a FLZ, porém, Cardoso et al. (2016) e
 11 Singh et al (2018) relataram uma interação sinérgica entre GER e FLZ contra células
 12 planctônicas de *C. albicans* resistentes a FLZ. No entanto, ambos estudos não avaliaram a
 13 natureza desta combinação sinérgica. A interação sinérgica entre GER/FLZ já foi descrita
 14 também, contra *T. rubrum* (IOA-9) (Ahmad e Ahmad 2011).

15 5.5 O geraniol sozinho ou combinado com fluconazol inibe o biofilme maduro 16 de *C. tropicalis* resistentes aos azóis formados em superfícies abióticas

17 A adesão é um estágio onde os microrganismos interagem com uma superfície.
 18 Estudar o GER e GER/FLZ no contexto da adesão celular, pode fornecer informações
 19 fundamentais uma vez que a interferência na adesão representa o primeiro passo na prevenção
 20 do estabelecimento da infecção (Ponde *et al.*, 2021).

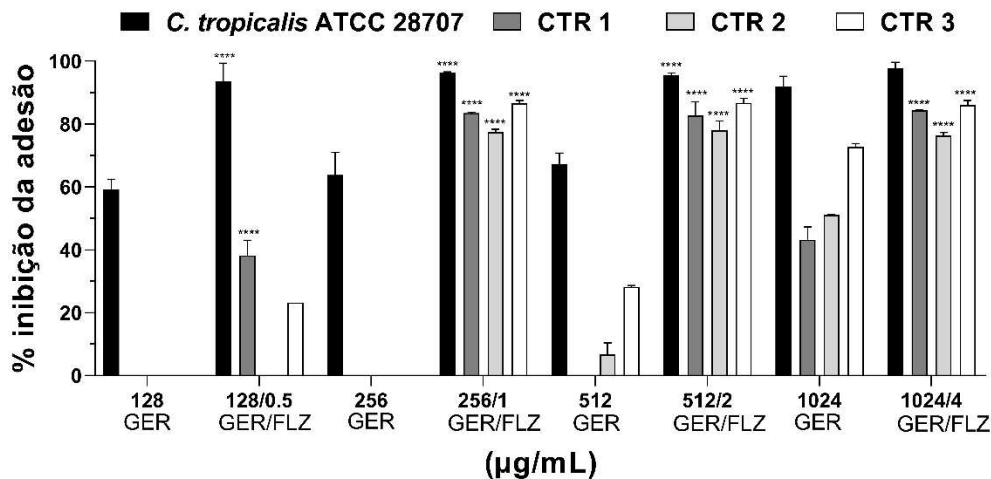
21 O teste de adesão foi realizado em superfície de poliestireno, utilizando
 22 concentrações que variaram de 1.024 – 128 $\mu\text{g/mL}$. Para a combinação, optamos por iniciar
 23 utilizando 4X CIM da concentração obtida no ensaio de *checkerboard*, resultando nas seguintes

1 combinações de GER/FLZ ($\mu\text{g/mL}$): 1.024/4; 512/2; 256/1 e 128/0,5. É importante citar, que
2 os ensaios de inibição da adesão e biofilme maduro foi realizado com FLZ isolado também.

3 Ao analisarmos a curva de crescimento de *C. tropicalis* ATCC 28707, CTR 1, CTR 2
4 e CTR 3, após 2 h de exposição ao tratamento nas concentrações de 1.024 e 512 $\mu\text{g/mL}$,
5 observou-se uma redução de 1 \log_{10} , indicando a viabilidade de 90% dos microrganismos
6 inoculados inicialmente. Esses resultados sugerem que a atividade anti-adesão, não se deve à
7 inviabilidade celular e sim pela capacidade reduzida de aderir a superfície.

8 Na concentração de 128 $\mu\text{g/mL}$, 256 $\mu\text{g/mL}$ e 512 $\mu\text{g/mL}$ de GER, a inibição da
9 adesão foi evidenciada somente em *C. tropicalis* ATCC 28707, sendo que em 512 $\mu\text{g/mL}$ houve
10 65% de redução. GER (1.024 $\mu\text{g/mL}$) foi capaz de inibir a adesão de *C. tropicalis* ATCC 28707,
11 CTR 2 e CTR 3. Os dados indicam que é necessária uma concentração mais elevada de GER
12 para prevenir a adesão de *C. tropicalis* à superfície de poliestireno. Ao combinarmos GER/FLZ,
13 nota-se um aumento no efeito anti-adesão em *C. tropicalis* ATCC 28707, CTR 1, CTR 2 e CTR
14 3 em comparação com o controle ($p < 0,0001$), destacando a concentração de 128/0,5 $\mu\text{g/mL}$
15 para a cepa padrão com inibição acima de 90% (Figura 24).

16



17

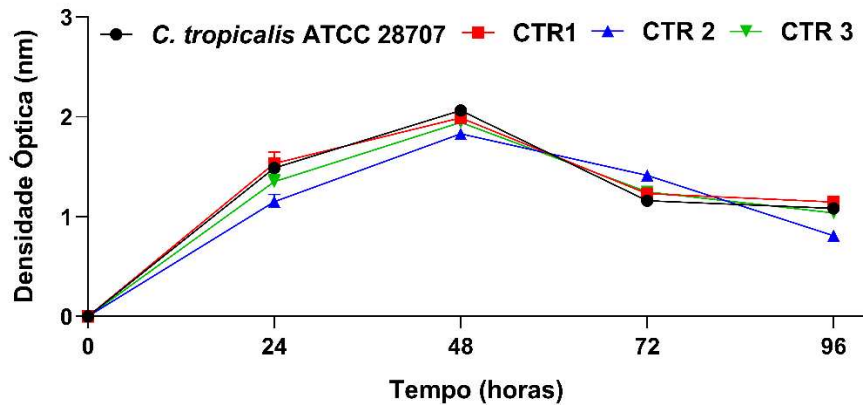
18 **Fonte:** o próprio autor.

19 **Figura 24.** Efeito de geraniol (GER) sozinho ou combinado com fluconazol (FLZ) na adesão de *C. tropicalis* à
20 superfície de poliestireno. O efeito de GER sozinho ou em combinação foi avaliada usando o ensaio de redução
21 do MTT (550 nm). **** $p < 0,0001$ em comparação com células fúngicas tratadas.

22

23 Inicialmente determinamos que em 48 horas, o biofilme de *C. tropicalis* ATCC 28707,
24 CTR 1, CTR 2 e CTR 3, estavam maduros, uma vez que nos tempos posteriores, ocorreu um
25 declínio na D.O, sugerindo a fase de dispersão das células (Figura 25). Estudos anteriores
26 também estabeleceram 48 h como pico da atividade metabólica e biomassa dos biofilmes de *C.*

1 *tropicalis* (Jabra-Rizk, Falkler e Meiller, 2004; Bizerra *et al.*, 2005 Ramage *et al.*, 2005; Tseng
2 *et al.*, 2020; ATiencia-Carrera *et al.*, 2022).



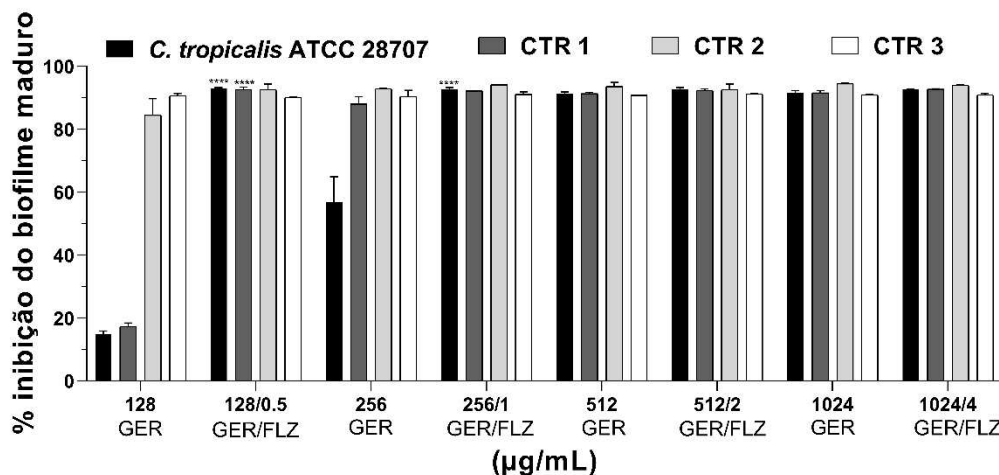
3
4
5
6
7
8

Fonte: o próprio autor.

Figura 25. Cinética de formação do biofilme por *C. tropicalis* resistentes aos azóis na superfície de poliestireno monitorada pela atividade metabólica de células sésseis usando o ensaio de redução do MTT (550 nm). Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19

Para obter uma redução acima de 90% em biofilmes maduro em todas as cepas analisadas, foi necessária uma concentração de 1.024 $\mu\text{g/mL}$ de GER. Na menor concentração avaliada, 128 $\mu\text{g/mL}$ de GER, nota-se redução acima de 50% somente em *C. tropicalis* ATCC 28707 e CTR 3. Ao combinarmos GER/FLZ, houve um aumento da inibição da atividade metabólica do biofilme maduro da cepa padrão e isolados clínicos avaliados, obtendo inibição de 90% nas concentrações sub-inibitórias da combinação (128/0,5 e 256/1,0 $\mu\text{g/mL}$). O tratamento em combinação aumentou a atividade anti-biofilme em *C. tropicalis* ATCC 28707 e CTR 1 (Figura 26). Na cepa padrão o tratamento de 128 $\mu\text{g/mL}$ de GER causou redução de 14% versus 92% quando combinado GER/FLZ 128/0,5 $\mu\text{g/mL}$, com diferença estatística na combinação quando comparado com o tratamento isolado do monoterpene ($p < 0,0001$).



1 **Fonte:** o próprio autor.

2 **Figura 26.** Efeito de geraniol (GER) sozinho ou combinado com fluconazol (FLZ) sobre biofilmes maduros de *C.*
 3 *tropicalis* formados na superfície de poliestireno. O efeito de GER sozinho ou em combinação foi avaliado pelo
 4 ensaio de redução do MTT (550 nm). **** $p < 0,0001$ em comparação com células fúngicas tratadas.
 5
 6

7 Resultados similares foi observado no isolado CTR 1, sendo que ao tratar o biofilme
 8 maduro com 128 µg/mL de GER houve redução de apenas 17% versus 92% quando combinado
 9 GER/FLZ 128/0,5 µg/mL com diferença estatística ($p < 0,0001$) da combinação quando
 10 comparado com o tratamento isolado de GER. Nos isolados CTR 2 e CTR 3,
 11 surpreendentemente a atividade do monoterpene isolado na concentração de 128 µg/mL
 12 promoveu redução acima de 90% e 80%, para os isolados CTR3 e CTR2, respectivamente
 13 (Figura 26).

14 Souza *et al.* (2016) ao avaliarem a atividade antifúngica de óleos essenciais derivados
 15 de plantas sobre células planctônicas e biofilme de *C. tropicalis* por método de contagem de UFC,
 16 evidenciaram a capacidade de GER em interferir em biofilmes pré-formados dessa espécie.
 17 Observamos que a ação de GER em células sésseis foram em concentrações próximas às células
 18 planctônicas, dados similares foram descritos anteriormente por Khan, Malik Hmad 2012 e
 19 Gupta, Gupta e Poluri (2021).

20 *C. tropicalis* é conhecida como uma das principais espécies produtoras de biofilme
 21 entre as cepas patogênicas de *Candida*. Os biofilmes formados por essa espécie apresentam
 22 uma estrutura complexa, caracterizada pela presença de leveduras, hifas e pseudo-hifas envoltas
 23 por MEC e têm a capacidade de resistir a altas concentrações das principais classes de
 24 antifúngicos disponíveis. A resistência observada nos biofilmes de *C. tropicalis* é resultado de
 25 vários fatores, incluindo um aumento na atividade metabólica das células e a presença da MEC
 26 (Souza *et al.*, 2023).

27 Um componente essencial da MEC de *C. tropicalis* é o β -1,3 glucano, β -1,6 glucano e

1 manana (Souza *et al.*, 2023). Mitchel *et al.* (2013) mostraram que o β -1,3-glucano contribui
2 para a resistência de *C. tropicalis* aos antifúngicos. O FLZ embora pouco eficaz sozinho contra
3 o biofilme, reduziu significativamente o biofilme na presença de enzimas que hidrolisam β -1,3-
4 glucano, um componente crucial da MEC dos biofilmes. De fato, dentre os antifúngicos
5 disponíveis, as equinocandinas são os mais ativos contra o biofilme de *C. tropicalis*. Em estudo
6 conduzido por Marcos-Zambran *et al.* (2016) os pesquisadores demonstraram que 0,5 mg/L de
7 micafungina foi suficiente para redução de 50% do biofilme de *C. tropicalis*, enquanto 16 mg/L
8 foram necessários para inibição de 80%. Esses resultados foram confirmados por MEV. Em
9 outro estudo, Zuo e colaboradores (2021) mostraram que micafungina apresentou atividade
10 inibitória sobre a adesão e biofilme em *C. tropicalis*.

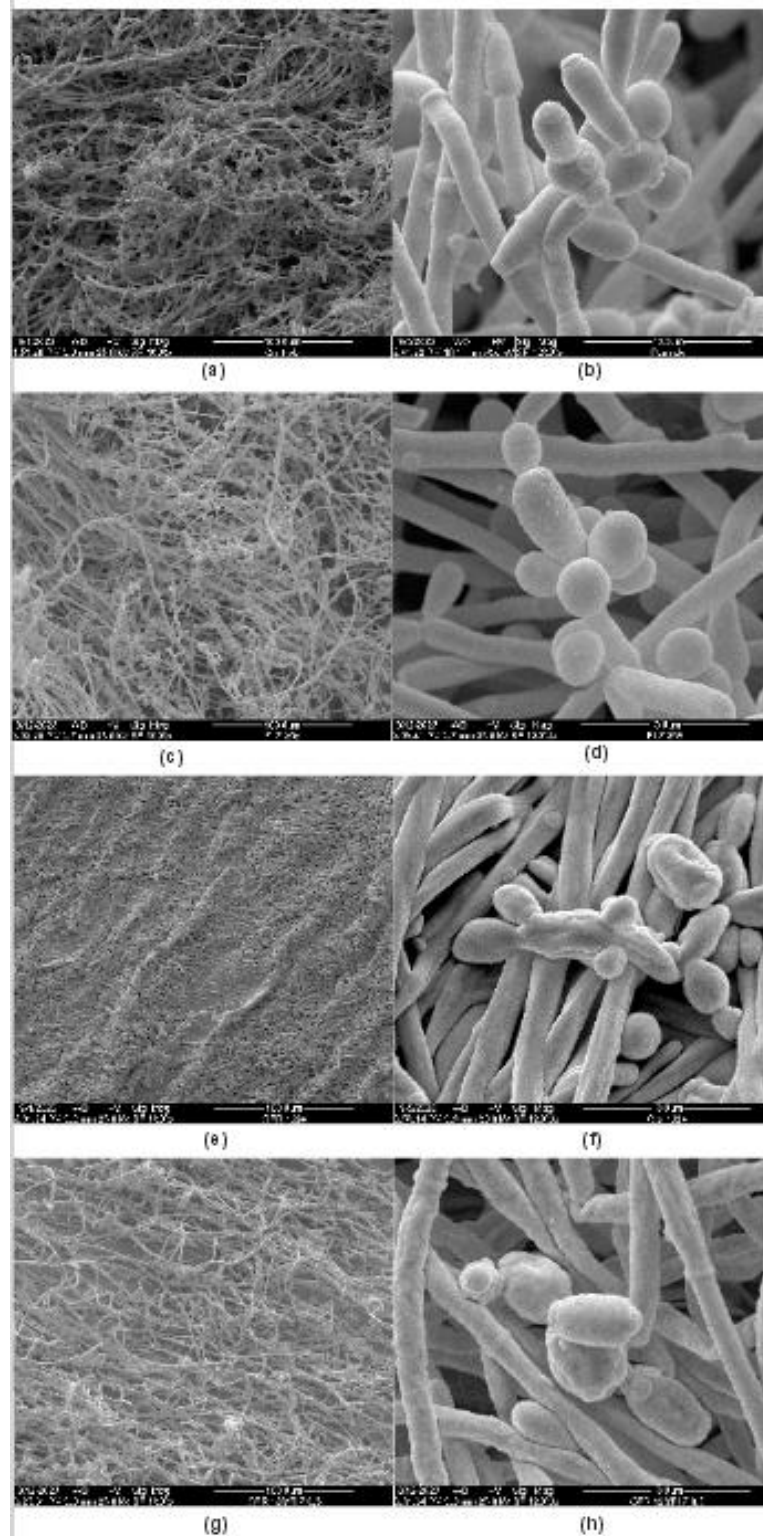
11 Dominguez *et al.* (2018) demonstraram que o complexo manano-glucano contribui
12 para o sequestro de fármacos e aumenta a resistência aos antifúngicos no biofilme. Os autores
13 mostraram que 1.000 μ L/mL de FLZ foi ineficaz contra o biofilme de *C. tropicalis*, e ao avaliar
14 o sequestro do fármaco radiomarcado, observou-se baixa concentração do medicamento dentro
15 do biofilme, devido à afinidade diferencial entre a matriz e o fármaco. Os autores sugeriram
16 que a ruptura desse complexo aumenta a sensibilidade do biofilme ao FLZ, o que foi confirmado
17 pela morte das células biofilmes quando o complexo foi perturbado. Resultados semelhantes de
18 resistência ao fluconazol, voriconazol e itraconazol foram observados por Sasani *et al.* (2021).

19 Estudos têm revelado que biofilmes de *C. tropicalis* apresentam altos níveis de
20 resistência não apenas aos antifúngicos da classe dos azóis, mas também aos polienos, como
21 AmB. Fernandes, Silva e Henrique (2015) mostraram que a produção do biofilme de *C.*
22 *tropicalis*, aumenta com o tratamento com AmB.

23 A boa atividade de GER em biofilme, pode ser devido a ação de GER sobre MEC. A
24 caracterização enzimática e química da MEC evidenciou o impacto substancial de GER nos
25 principais constituintes biológicos e nas enzimas hidrolíticas da MEC. Foi observado que GER
26 é capaz de se difundir pela MEC dos biofilmes de *C. glabrata*, interagindo com diversas
27 moléculas e desativando enzimas hidrolíticas (como fosfolipase e protease) que são
28 responsáveis pela movimentação do monoterpene através da MEC (Gupta; Gupta; Poluri,
29 2021).

30 Neste estudo, as imagens de MEV do biofilme de *C. tropicalis* ATCC 28707
31 evidenciaram uma rede densa e heterogênea com estruturas típicas de leveduras, hifas e pseudo-
32 hifas e intensa atividade de brotamento. É possível observar a matriz extracelular polimérica e
33 microcanais para fluxo de fluidos. Nota-se que as células do biofilme de *C. tropicalis* ATCC
34 28707 apresentou largura cilíndrica uniforme, com cicatrizes de broto (Figura 27 a,b).

1 Assim como esperado, quando o biofilme foi tratado com 256 µg/mL de FLZ, as
2 células permaneceram com as estruturas preservadas assim como observados no controle.
3 Adicionalmente, é possível notar intensa atividade de brotamento, bem como células com
4 cicatrizes de brotamento (Figura 27 c,d). Em contrapartida, ao tratar o biofilme maduro de *C.*
5 *tropicalis* ATCC 28707 com 1.024 µg/mL de GER notou-se uma redução na massa celular,
6 sendo possível a visualização do fundo da superfície de poliestireno (Figura 27 e,f). Além disso,
7 é possível observar hifas colabadas, quebradas e regiões com torções nas hifas, e hifas murchas,
8 com superfície rugosa, indicando extravasamento intracelular. A morfologia do biofilme após
9 o tratamento com a combinação de GER/FLZ também foi alterada, com hifas murchas e com
10 superfície rugosa (Figura 27 g,h).

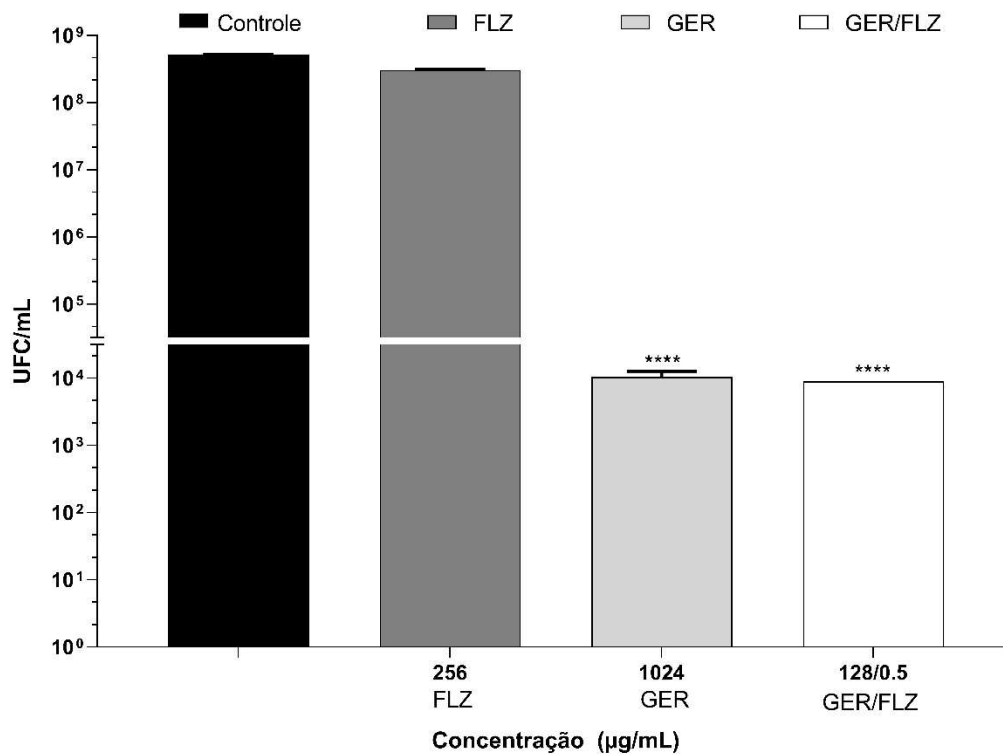


1

2 **Fonte:** o próprio autor.

3 **Figura 27.** Efeito do geraniol (GER) sozinho ou combinado com fluconazol (FLZ) na morfologia e ultraestrutura
 4 de biofilmes de *Candida tropicalis* ATCC 28707. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de
 5 biofilmes em poliestireno durante 48 h de incubação. Controle não tratado (a, b); tratado com 128 µg/mL de FLZ
 6 (c, d); tratado com 1024 µg/mL de GER (e, f); tratados com 128/0,5 µg/mL GER/FLZ (g, h). Células sésseis após
 7 o tratamento com GER sozinho ou combinação GER/FLZ foi avaliada usando contagem de unidades formadoras
 8 de colônias (i). Os valores são a média e o desvio padrão de três experimentos independentes. **** $p < 0,0001$.

1 Após a análise das imagens da MEV, realizamos um experimento complementar para
 2 corroborar os resultados obtidos pelo método de redução de MTT. O biofilme maduro foi
 3 formado e os poços da placa de poliestireno foram raspados e semeados em ASD para contagem
 4 das UFC. Os resultados mostraram uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) nos
 5 tratamentos com 1.024 $\mu\text{g/mL}$ de GER e 128/0,5 $\mu\text{g/mL}$ de GER/FLZ quando comparados com
 6 o controle sem tratamento (Figura 28).



8
 9 **Fonte:** o próprio autor.
 10 **Figura 28.** Viabilidade das células sésseis de *Candida tropicalis* ATCC 28707. A viabilidade das células sésseis
 11 após o tratamento com geraniol (GER) isolado ou combinado com fluconazol (FLZ) foi avaliada pela contagem
 12 de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e os valores foram a média e o desvio padrão de três experimentos
 13 independentes. **** $p < 0,0001$.

14
 15 Os resultados mostraram que as células fúngicas não estavam viáveis, indicando uma
 16 ação fungicida. Gupta; Gupta; Poluri (2021), observaram que GER destruiu a estrutura do
 17 biofilme formado por *C. glabrata* (*N. glabrata*), além disso, demonstraram que o monoterpeneo
 18 atuou sobre β -glucano e quitina presentes na parede celular do fungo.

19 Até o presente momento, não encontramos informações disponíveis sobre a atividade
 20 antimicrobiana de GER/FLZ sobre a adesão e biofilme maduro de *C. tropicalis*. A falta de dados
 21 na literatura dificulta a comparação direta de nossos resultados, no entanto, reforça a
 22 originalidade e contribuição de nossos achados.

1 **5.6 Análises *in silico*, *in vitro* e *in vivo* mostram que o geraniol apresenta**
 2 **propriedades farmacocinéticas e de similaridade de fármaco de um**
 3 **candidato seguro para o desenvolvimento de um novo fármaco**

4 Definir o perfil farmacocinético e de toxicidade de um novo candidato a fármaco é
 5 essencial para minimizar o risco de falhas terapêuticas ou efeitos adversos durante os ensaios
 6 clínicos (Kola, Landis, 2004; Waring *et al.*, 2015). As pesquisas sempre visam desenvolver
 7 moléculas bioativas por via oral devido às características preferenciais da medicação oral, que
 8 não é invasiva e propícia a adesão do paciente ao tratamento (Alqahtani *et al.*, 2021). As regras
 9 Lipinski são usadas para determinar a biodisponibilidade oral de compostos (Lipinski *et al.*,
 10 2001). Foi demonstrado que GER não apresentou grupos químicos com potencial mutagênico,
 11 tumorigênico, irritante e que possa interferir nos processos de reprodução (tabela 6).

12 **Tabela 6.** Propriedades toxicológicas do geraniol e parâmetros de Lipinski (explorador da
 13 propriedade Osiris) determinadas *in silico*.

| Propriedades toxicológicas | | Parâmetros de Lipinski | |
|----------------------------|---|------------------------|--------|
| Mutagênico | N | Peso molecular (g/mol) | 154.25 |
| Tumorigênico | N | TPSA | 20.23 |
| Irritante | N | Semelhança com drogas | -3.54 |
| Efeito reprodutivo | N | Pontuação de drogas | 0.45 |
| - | - | nHBA & nHBD | 1.0 |
| - | - | cLogP | 3.49 |
| - | - | cLogS | -1.89 |

14 Fonte: o próprio autor.

15 N: sem risco; TPSA: área de superfície polar topológica; nHBA: número de aceptores de ligações de hidrogênio;
 16 nHBD: número de doadores de ligações de hidrogênio; cLogP: coeficiente de solubilidade da molécula em
 17 octanol/água; cLogS: coeficiente de solubilidade da molécula em água.

18
 19 A análise farmacocinética de GER revelou propriedades importantes do ponto de vista
 20 farmacológico. É possível destacar que o GER é uma molécula com elevada absorção intestinal
 21 (> 30%), apresentando baixa solubilidade em água (-2.866 log mol/L) e baixa permeabilidade
 22 na pele (logKp -2,5). Além do mais, o monoterpene atravessa facilmente à barreira
 23 hematoencefálica (BHC) (logBB > 0,3) e o SNC (logPS > -2,0). No entanto, o VDss é baixo
 24 (logVDss > 0,45), mas pode apresentar em torno de 56% de fração livre. Além disso, GER
 25 parece não interferir com as principais isoenzimas do complexo citocromo P450 (CYP450) e
 26 sua depuração é majoritariamente por excreção renal (Tabela 7).

27

28

29

1 **Tabela 7.** Parâmetros farmacocinéticos *in silico* pkSCM do geraniol.

| Propriedades | Nome do modelo | Valor previsto | Unidade |
|--------------|--------------------------------|----------------|--|
| Absorção | Solubilidade em água | -2.866 | Numérico (log mol/L) |
| | Permeabilidade Caco2 | 1.49 | Numérico (log Papp in 10 ⁻⁶ cm/s) |
| | Absorção intestinal (humana) | 92.788 | Numérico (% Absorção) |
| | Permeabilidade na pele | -1.511 | Numérico (log Kp) |
| | Substrato de glicoproteína P | No | Categorica (Sim/Não) |
| | Inibidor de glicoproteína P1 | No | Categorica ((Sim/Não) |
| | Inibidor de glicoproteína P2 | No | Categorica ((Sim/Não) |
| Distribuição | VDss (humano) | 0.17 | Numérico (log L/kg) |
| | Fração não ligada (humana) | 0.447 | Numérico (Fu) |
| | Permeabilidade BBB | 0.606 | Numérico (log BB) |
| | Permeabilidade SNC | -2.159 | Numérico (log PS) |
| Metabolismo | Substrato CYP2D6 | No | Categorica (Sim/Não) |
| | Substrato CYP3A4 | No | Categorica (Sim/Não) |
| | Inibidor CYP1A2 | No | Categorica (Sim/Não) |
| | Inibidor CYP2C19 | No | Categorica (Sim/Não) |
| | Inibidor CYP2C9 | No | Categorica (Sim/Não) |
| | Inibidor CYP2D6 | No | Categorica (Sim/Não) |
| | Inibidor CYP3A4 | No | Categorica (Sim/Não) |
| Excreção | Clearance total | 0.437 | Numérico (log ml/min/kg) |
| | Substrato OCT2 renal | No | Categorica (Sim/Não) |
| Toxicidade | Toxicidade AMES | No | Categorica (Sim/Não) |
| | Hepatotoxicidade | No | Categorica (Sim/Não) |
| | Toxicidade aguda oral em ratos | 1.636 | Numérico (mol/kg) |

2 Fonte: o próprio autor.

3

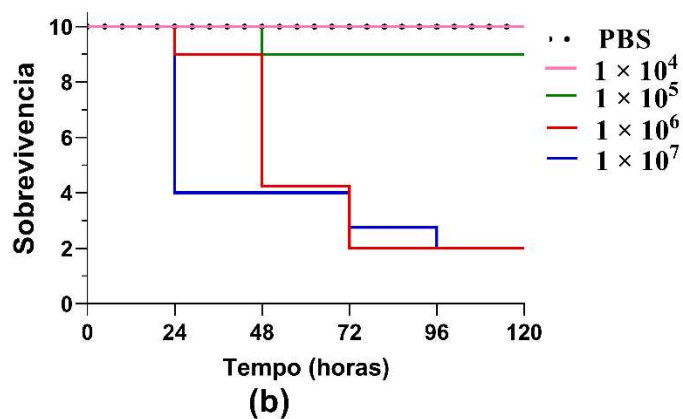
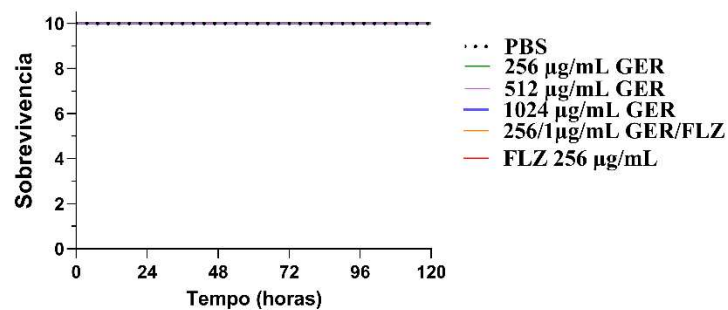
4 Em vista da crescente preocupação e busca por novas opções terapêuticas, a
5 preocupação acerca da toxicidade das moléculas propostas tem sido estudada (Pagar *et al.*,
6 2022). Nossos resultados, indicam que GER não apresenta efeitos tóxicos e mutagênicos.
7 Evidenciamos também que GER não interfere nas principais enzimas de metabolismo hepático,
8 diminuindo chances de ocorrer uma interação medicamentosa e riscos de efeitos adversos.
9 Pavan e colaboradores (2018) mostraram em ratos Sprague-Dawley machos, que GER é capaz
10 de aumentar as defesas antioxidantes no fígado sem sinais de toxicidade, assim como prevista
11 pela triagem em pkCSM do presente estudo. Considerando as múltiplas abordagens e
12 evidências experimentais para uma avaliação completa da segurança de GER, seguimos
13 avaliando a toxicidade do monoterpeneo *in vivo*.

14 Analisamos o efeito tóxico de GER em modelo de *G. mellonella*. O modelo foi escolhido
15 devido a facilidade de inoculação, baixo custo e capacidade de gerar resultados rápidos de
16 acordo com a análise escolhida. Além disso, as larvas têm sido um modelo de escolha para

1 descobertas de novos potenciais antimicrobianos (Piatek, Sheehan e Kavanagh 2020; More *et*
2 *al.*, 2020).

3 Inicialmente, foi determinado a toxicidade do GER sozinho ($0,5 \times \text{MIC}$ e MIC/kg de
4 larva) ou combinado com FLZ (a uma concentração sinérgica/kg de larva) em larvas de *G.*
5 *mellonella*. Foi observada uma taxa de sobrevivência de 100% no grupo controle tratado com
6 PBS e em todos os grupos tratados com GER e FLZ após 5 dias, indicando que esses compostos
7 não causam toxicidade nas concentrações testadas (Figura 29 a). Em seguida, foi determinado
8 o inóculo letal de *C. tropicalis* ATCC 28707 em larvas de *G. mellonella* (Figura 29 b).
9 Observou-se redução gradual na sobrevivência das larvas com inóculos de 1×10^6 e $1 \times$
10 10^7 UFC/mL de *C. tropicalis* atingindo 50% de mortalidade após 48 h e 24 h pós-infecção.
11 Entretanto, após 72 h pós-infecção, 80% de mortalidade foi observada para ambos os inóculos
12 de levedura. Por outro lado, para 1×10^4 ou 1×10^5 UFCs, taxas de sobrevivência de 100% e
13 90% foram observadas após 72 h, respectivamente.

14



15

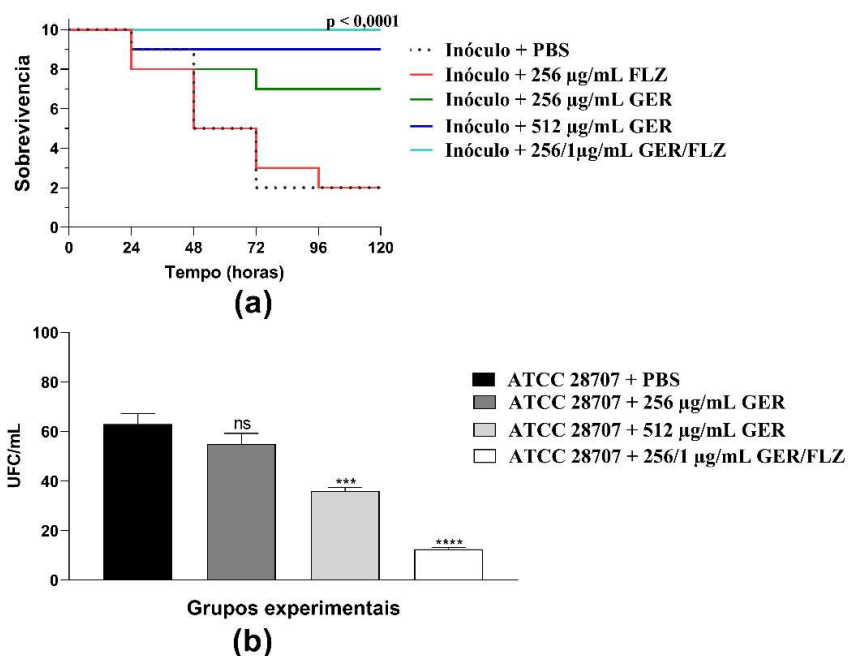
16 **Fonte:** o próprio autor.

17 **Figura 29.** Curva de sobrevivência de larvas de *G. mellonella*. As larvas foram inoculadas com geraniol (GER),
18 fluconazol (FLZ) e a combinação de GER/FLZ para análise de toxicidade dos compostos (a) e as larvas foram
19 infectadas com células fúngicas para determinação do inóculo letal (b). Os experimentos foram realizados em
20 duplicata com três repetições.

21

22

1 Após realizar a curva de sobrevivência, as larvas foram infectadas com um inóculo de
 2 1×10^6 e após duas horas as larvas foram tratadas com concentrações isoladas de GER, FLZ e
 3 GER/FLZ. Os resultados revelaram que o tratamento de GER/FLZ garantiu a sobrevivência de
 4 todas as larvas do grupo expostas ao tratamento, com diferença estatística quando comparado
 5 com o grupo infectado sem tratamento ($p < 0,0001$). Quando analisado a concentração de CIM,
 6 o monoterpeno garantiu a sobrevivência de nove larvas. Supreendentemente, ao tratarmos as
 7 larvas na concentração sub-inibitória de GER (256 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ao final do teste, sete larvas do
 8 grupo de dez haviam sobrevivido (Figura 30 a). Ao final do tratamento, foi realizado a
 9 recuperação fúngica na hemolinfa das larvas, a fim de quantificar a carga fúngica/larva e
 10 comparar com os resultados obtidos com o tratamento. Foi observado, que as larvas infectadas
 11 e tratadas com a combinação de GER/FLZ (256/1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e tratadas com o valor de CIM (512
 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$) obtiveram diferença estatística ($p < 0,0001$) quando comparado com o grupo de larvas
 13 que não receberam o tratamento (Figura 30 b).

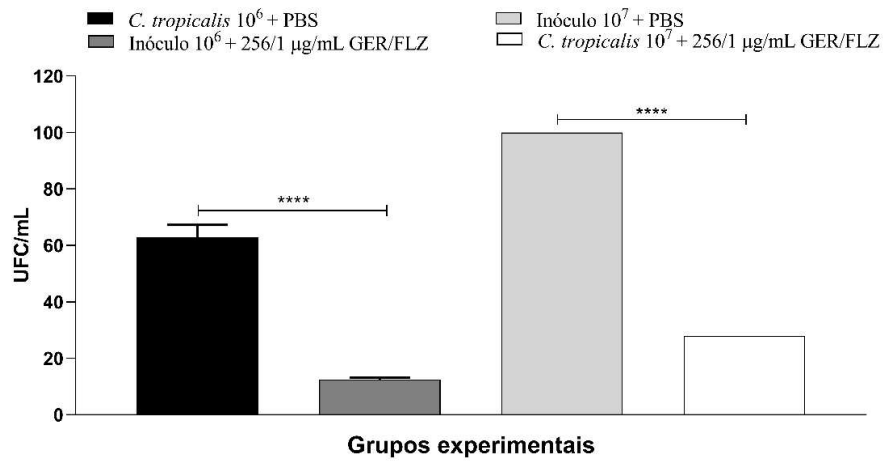


15 **Fonte:** o próprio autor.

16 **Figura 30.** Curva de sobrevivência de larvas de *G. mellonella*. As larvas foram infectadas com células fúngicas (1×10^6) e tratadas com geraniol (GER), fluconazol (FLZ) e combinação de GER/FLZ (a). Todos os grupos foram comparados com larvas infectadas e não tratadas. A carga fúngica da hemolinfa de larvas não tratadas e tratadas com os compostos foi determinada por contagens de UFC (b). A análise dos dados de sobrevivência de *G. mellonella* foi realizada utilizando o log-rank de um experimento representativo. Os asteriscos indicam uma redução significativa na carga fúngica das larvas tratadas e infectadas em comparação com o grupo não infectado (***) $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

24 Além disso, a combinação teve o mesmo efeito no aumento da sobrevida e reduziu a

1 carga fúngica na hemolinfa de larvas infectadas com 1×10^7 UFC de *C. tropicalis* (Figura 31).
 2



3

4 **Fonte:** o próprio autor.

5 **Figura 31.** Carga fúngica na hemolinfa de larvas de *G. mellonella*. As larvas foram infectadas com células fúngicas
 6 (1×10^6 ou 1×10^7) e tratadas com a combinação GER/FLZ (256/1 µg/mL) 2 h após a infecção. A carga fúngica
 7 foi determinada por contagem de UFC. **** $p < 0,0001$.

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

6. CONCLUSÃO

O presente estudo relata a atividade antifúngica do geraniol (GER), sozinho ou combinado com fluconazol (FLZ), contra células planctônicas e sésseis (biofilme) de *C. tropicalis* resistente a azol. As principais descobertas incluem: (I) GER exibe atividade fungicida contra células planctônicas e sésseis ao prejudicar a permeabilidade da membrana celular; (II) exposição prolongada a GER não induz o desenvolvimento de *C. tropicalis* resistente a GER; (III) GER exibe sinergismo com FLZ e esse efeito pode ser atribuído à inibição da atividade da bomba de efluxo *CtCdr1* devido à ligação de GER a essa proteína; (IV) a combinação GER/FLZ inibe a adesão da levedura e biofilmes pré-formados na superfície de poliestireno; (V) a combinação GER/FLZ não causa toxicidade e aumenta a sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com *C. tropicalis* resistente a azol. Em conjunto, nossos resultados indicam que o GER tem potencial como adjuvante no tratamento de infecções causadas por *C. tropicalis* resistentes aos azóis.

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

1 REFERÊNCIAS

- 2 ADELHOEFER, Siegfried J. et al. *Candida spondylodiscitis*: a systematic review and meta-
3 analysis of seventy two studies. **International Orthopaedics**, p. 1-16, 2023.
- 4 AGUILAR-ZAPATA, Daniel; PETRAITIENE, Ruta; PETRAITIS, Vidmantas. Echinocandins:
5 the expanding antifungal armamentarium. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. suppl_6, p.
6 S604-S611, 2015.
- 7 AHMED, Nafisa et al. COVID-19-associated candidiasis: possible patho-mechanism,
8 predisposing factors, and prevention strategies. **Current microbiology**, v. 79, n. 5, p. 127,
9 2022.
- 10 AIGNER, Maria; LASS-FLÖRL, Cornelia. Encochleated amphotericin B: is the oral
11 availability of amphotericin B finally reached?. **Journal of fungi**, v. 6, n. 2, p. 66, 2020.
- 12 AL-FATTANI, Mohammed A.; DOUGLAS, L. Julia. Biofilm matrix of *Candida albicans* and
13 *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **Journal of medical**
14 **microbiology**, v. 55, n. 8, p. 999-1008, 2006.
- 15 ALLEN, David et al. Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection
16 management. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 13, n. 6, p. 787-798, 2015.
- 17 ALQAHTANI, Mohammed S. et al. Advances in oral drug delivery. **Frontiers in**
18 **pharmacology**, v. 12, p. 618411, 2021.
- 19 ALRABADI, Adel et al. Extensive Urinary Tract Fungal Bezoars Causing Anuria: A Case
20 Report. **Clinical Medicine Insights: Case Reports**, v. 16, p. 11795476231220998, 2023.
- 21 ANDERSON, Thomas M. et al. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol
22 sponge. **Nature chemical biology**, v. 10, n. 5, p. 400-406, 2014
- 23 ANDRIANI, Gabriella Maria et al. Antifungal combination of ethyl acetate extract of
24 *Poincianella pluviosa* (DC.) LP queiros stem bark with amphotericin B in *Cryptococcus*
25 *neoformans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 660645, 2021.
- 26 ANIL, S.; HASHEM, M.; VELLAPPALLY, S.; PATIL, S.; BANDARA, H.;
27 SAMARANAYAKE, L. P. Sub-inhibitory concentrations of antifungals suppress hemolysin
28 activity of oral *Candida albicans* and *Candida tropicalis* isolates from HIV-infected
29 individuals. *Mycopathologia*, v. 178, n. 3-4, p. 207-215, 2014.
- 30 ANTINORI, S.; MILAZZO, L.; SOLLIMA, S.; GALLI, M.; CORBELLINO, M. Candidemia
31 and invasive candidiasis in adults: A narrative review. **Eur. J. Intern. Med.**, v. 34, n. 1, p. 21-
32 28, 2016.
- 33 ARIS, Parisa et al. Griseofulvin: an updated overview of old and current
34 knowledge. **Molecules**, v. 27, n. 20, p. 7034, 2022.
- 35
- 36 ASLAN, Hacer; GÜLMEZ, Dolunay. Investigation of the correlation between biofilm forming
37 ability of urinary *Candida* isolates with the use of urinary catheters and change of antifungal
38 susceptibility in the presence of biofilm. **Mikrobiyoloji Bulteni**, v. 50, n. 2, p. 256-265, 2016.
- 39
- 40 ATALAY, M.A. et al. Investigation of possible virulence factors in *Candida* strains isolated
41 from blood cultures. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, v. 18, n. 1, 2015

- 1
- 2 ATANASOV, Atanas G. et al. Natural products in drug discovery: advances and
3 opportunities. **Nature reviews Drug discovery**, v. 20, n. 3, p. 200-216, 2021.
- 4 ATIENCIA-CARRERA, María Belén et al. Evaluation of the biofilm life cycle between
5 *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**,
6 v. 12, p. 953168, 2022.
- 7 AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor
- 8 BADIEE, Parisa et al. Antifungal susceptibility testing of *Candida* species isolated from the
9 immunocompromised patients admitted to ten university hospitals in Iran: comparison of
10 colonizing and infecting isolates. **BMC infectious diseases**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2017.
- 11 BALOUIRI, Mounyr; SADIKI, Moulay; IBNSOUDA, Saad Koraichi. Methods for in vitro
12 evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of pharmaceutical analysis**, v. 6, n. 2, p.
13 71-79, 2016.
- 14 BANERJEE, Mohua et al. Filamentation is associated with reduced pathogenicity of multiple
15 non-albicans *Candida* species. **Mosphere**, v. 4, n. 5, p. 10.1128/msphere.00656-19, 2019.
- 16 BARCHIESI, Francesco et al. Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida*
17 *tropicalis* ATCC 750. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 6, p. 1578-1584,
18 2000.
- 19 BASER, K. Hüsnü Can; KÜRKÇÜOĞLU, Mine; DEMIRCI, Betül. Ninde oil (*Aeollanthus*
20 *myrianthus* Taylor) revisited: Analysis of a historical oil. **Journal of essential oil research**, v.
21 17, n. 2, p. 137-138, 2005.
- 22 BAUER, Bastian Klemens et al. *Candida tropicalis* defibrillator endocarditis: a case report and
23 review of current literature. **Medical mycology case reports**, v. 25, p. 1-9, 2019.
- 24 BEARDSLEY, Justin et al. *Candida glabrata* (*Nakaseomyces glabrata*): A systematic review
25 of clinical and microbiological data from 2011 to 2021 to inform the World Health Organization
26 Fungal Priority Pathogens List. **Medical Mycology**, v. 62, n. 6, p. myae041, 2024.
- 27
- 28 BERMAN, Judith; KRYSAN, Damian J. Drug resistance and tolerance in fungi. **Nature**
29 **Reviews Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 319-331, 2020.
- 30 BERMAS, Arianne; GEDDES-MCALISTER, Jennifer. Combatting the evolution of antifungal
31 resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular microbiology**, v. 114, n. 5, p. 721-734,
32 2020.
- 33 BIOVIA, Dassault Systèmes, discovery studio (DS) visualizer, San Diego: Dassault Systèmes,
34 2021.
- 35 BIZERRA, Fernando Cesar et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis*
36 and antifungal resistance. **FEMS yeast research**, v. 8, n. 3, p. 442-450, 2008.
- 37 BRANCO, Joana; MIRANDA, Isabel M.; RODRIGUES, Acácio G. *Candida parapsilosis*
38 virulence and antifungal resistance mechanisms: a comprehensive review of key
39 determinants. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 1, p. 80, 2023.
- 40

- 1 BRILHANTE, R. S. N.; CASTELO BRANCO, D. S. C. M.; DUARTE, G. P. S.; PAIVA, M. A.
 2 N.; TEIXEIRA, C. E. C.; ZEFERINO, J. P. O.; MONTEIRO, A. J.; CORDEIRO, R. A.;
 3 SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Yeast microbiota of raptors: a possible tool for
 4 environmental monitoring. **Environ. Microbiol. Rep.**, v. 4, n. 2, p. 189–193, 2012.
- 5 BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.;
 6 JÚNIOR, F. A. S.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Phenotypic
 7 characterization and in vitro antifungal sensitivity of *Candida* spp. and *Malassezia*
 8 *pachydermatis* strains from dogs. **Vet. J.**, v. 174, n. 1, p. 147–153, 2007.
- 9 BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.;
 10 MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. The anatomical distribution and
 11 antimicrobial susceptibility of yeast species isolated from healthy dogs. **Vet. J.**, v. 182, n. 2, p.
 12 320–326, 2009
- 13 BUTLER, G.; RASMUSSEN, M. D.; LIN, M. F.; SANTOS, M. A. S.; SAKTHIKUMAR, S.;
 14 MUNRO, C. A.; RHEINBAY, E.; GRABHERR, M.; FORCHE, A.; REEDY, J. L. Evolution of
 15 pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature*, v. 459, n. 7247, p.
 16 657, 2009.
- 17 CALDER, P. Fatty acids: metabolism. 2015.
- 18 CAROLUS, Hans et al. Amphotericin B and other polyenes—Discovery, clinical use, mode of
 19 action and drug resistance. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 321, 2020.
- 20 CAVALHEIRO, Mafalda; TEIXEIRA, Miguel Cacho. *Candida* biofilms: threats, challenges,
 21 and promising strategies. **Frontiers in medicine**, v. 5, p. 28, 2018.
- 22 CAVASSIN, Franceline B. et al. Sixty years of amphotericin B: an overview of the main
 23 antifungal agent used to treat invasive fungal infections. **Infectious Diseases and Therapy**, v.
 24 10, p. 115-147, 2021.
- 25 CHADHA, A.; MADYASTHA, K. Madhava. Metabolism of geraniol and linalool in the rat and
 26 effects on liver and lung microsomal enzymes. **Xenobiotica**, v. 14, n. 5, p. 365-374, 1984.
- 27 CHEN, Weiyang; VILJOEN, Alvaro M. Geraniol—A review of a commercially important
 28 fragrance material. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 4, p. 643-651, 2010.
- 29 CHEN, Yen-Ning et al. Loss of heterozygosity of FCY2 leading to the development of
 30 flucytosine resistance in *Candida tropicalis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55,
 31 n. 6, p. 2506-2514, 2011.
- 32 CHENG, Yi-Nan et al. Synthesis of 1, 2, 4-triazole benzoyl arylamine derivatives and their high
 33 antifungal activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 200, p. 112463, 2020.
- 34 CHIN, V. K. et al. *Candida albicans* isolates from a Malaysian hospital exhibit more potent
 35 phospholipase and haemolysin activities than non-albicans *Candida* isolates. *Tropical*
 36 *Biomedicine*, v. 30, n. 4, p.654–662, 2013
- 37 CHOI, Jun Yong; PODUST, Larissa M.; ROUSH, William R. Drug strategies targeting CYP51
 38 in neglected tropical diseases. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 22, p. 11242-11271, 2014.
- 39 CHOI, Min Ji et al. Resistance mechanisms and clinical features of fluconazole-nonsusceptible
 40 *Candida tropicalis* isolates compared with fluconazole-less-susceptible
 41 isolates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3653-3661, 2016.

- 1 CLANCY, Cornelius J.; NGUYEN, M. Hong. Diagnosing candidemia with the T2 *Candida*
 2 panel: an instructive case of septic shock in which blood cultures were negative. **Diagnostic**
 3 **Microbiology and Infectious Disease**, v. 93, n. 1, p. 54-57, 2019.
- 4 CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility. Reference Method for Broth Dilution
 5 Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. CLSI document M27. Wayne, PA: Clinical and
 6 Laboratory Standards Institute, 2020.
- 7 CONTRERAS MARTÍNEZ, Orfa Inés; ANGULO ORTÍZ, Alberto; SANTAFÉ PATIÑO,
 8 Gilmar. Mechanism of antifungal action of monoterpene isoespintanol against clinical isolates
 9 of *Candida tropicalis*. **Molecules**, v. 27, n. 18, p. 5808, 2022.
- 10 CORDEIRO, R. DE A.; OLIVEIRA, J. S. DE; CASTELO-BRANCO, D. DE S. C. M.;
 11 TEIXEIRA, C. E. C.; MARQUES, F. J. DE F.; BITTENCOURT, P. V.; CARVALHO, V. L.;
 12 BANDEIRA, T. DE J. P. G.; BRILHANTE, R. S. N.; MOREIRA, J. L. B. *Candida tropicalis*
 13 isolates obtained from veterinary sources show resistance to azoles and produce virulence
 14 factors. *Med. Mycol.*, v. 53, n. 2, p. 145–152, **2015**.
- 15 COSTA, K. R. C.; FERREIRA, J. C.; LAVRADOR, M. A. S.; BARUFFI, M. D.; CANDIDO,
 16 R. C. Virulence attributes and genetic variability of oral *Candida albicans* and *Candida*
 17 *tropicalis* isolates. *Mycoses*, v. 55, n. 3, p. e97–e105, 2012
- 18 CZECHOWICZ, Paulina; NOWICKA, Joanna; GOŚCINIAK, Grażyna. Virulence factors of
 19 *Candida* spp. and host immune response important in the pathogenesis of vulvovaginal
 20 candidiasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 11, p. 5895, 2022.
- 21 Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: A free web tool to evaluate
- 22 DANNAOUI, Éric. Résistance des *Candida* aux antifongiques: détection et mécanismes. **revue**
 23 **francophone des laboratoires**, v. 2013, n. 450, p. 71-77, 2013.
- 24 DAVIS, M. et al. Ibrexafungerp: a novel oral glucan synthase inhibitor. *academic.oup.com*, v.
 25 58, n. 5, p. 579–592, 2020.
- 26 DE FAZIO, Luigia et al. Dietary geraniol by oral or enema administration strongly reduces
 27 dysbiosis and systemic inflammation in dextran sulfate sodium-treated mice. **Frontiers in**
 28 **Pharmacology**, v. 7, p. 38, 2016.
- 29 DE SOUZA, Cássia M. et al. Adhesion and biofilm formation by the opportunistic pathogen
 30 *Candida tropicalis*: what do we know?. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 69, n. 6, p.
 31 207-218, 2023.
- 32 DENNING, David W.; HOPE, William W. Therapy for fungal diseases: opportunities and
 33 priorities. **Trends in microbiology**, v. 18, n. 5, p. 195-204, 2010.
- 34 DEORUKHKAR, S. C.; SAINI, S.; MATHEW, S. Virulence factors contributing to
 35 pathogenicity of *Candida tropicalis* and its antifungal susceptibility profile. *Int. J. Microbiol.*,
 36 v. 2014, n. 456878, p. 1–6, 2014.
- 37 DEORUKHKAR, S. C.; SAINI, S.; MATHEW, S. Virulence factors contributing to
 38 pathogenicity of *Candida tropicalis* and its antifungal susceptibility profile. *Int. J. Microbiol.*,
 39 v. 2014, n. 456878, p. 1–6, 2014.
- 40 DEORUKHKAR, Sachin C.; ROUSHANI, Shahriar. Virulence traits contributing to
 41 pathogenicity of *Candida* species. **J. Microbiol. Exp**, v. 5, p. 00140, 2017.

- 1 DESNOS-OLLIVIER, Marie et al. Clonal population of flucytosine-resistant *Candida*
2 *tropicalis* from blood cultures, Paris, France. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 4, p. 557,
3 2008.
- 4 DOMINGUEZ, Eddie et al. Conservation and divergence in the *Candida* species biofilm matrix
5 mannan-glucan complex structure, function, and genetic control. **MBio**, v. 9, n. 2, p.
6 10.1128/mbio.00451-18, 2018.
- 7 DOS SANTOS, Murilo Moreira; ISHIDA, Kelly. We need to talk about *Candida tropicalis*:
8 Virulence factors and survival mechanisms. **Medical Mycology**, v. 61, n. 8, p. myad075, 2023.
- 9 DREW, Richard H. Flucytosine. In: **Antifungal Therapy, Second Edition**. CRC Press, 2019.
10 p. 177-191.
- 11 ESTIVILL, D. et al. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical
12 materials. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, n. 2, p. 238-242, 2011.
- 13 EVREN, Ebru et al. Medically important *Candida* spp. identification: An era beyond traditional
14 methods. **Turkish journal of medical sciences**, v. 52, n. 3, p. 834-840, 2022.
- 15 FAJDEK-BIEDA, Anna et al. Evaluation of the Antimicrobial Activity of Geraniol and Selected
16 Geraniol Transformation Products against Gram-Positive Bacteria. **Molecules**, v. 29, n. 5, p.
17 950, 2024.
- 18 FALL, Bécaye et al. The ongoing revolution of MALDI-TOF mass spectrometry for
19 microbiology reaches tropical Africa. **The American journal of tropical medicine and**
20 **hygiene**, v. 92, n. 3, p. 641, 2015.
- 21 FATIMA, Tazeen; FATIMA, Zeeshan; HAMEED, Saif. Abrogation of efflux pump activity,
22 biofilm formation, and immune escape by candidacidal geraniol in emerging superbug,
23 *Candida auris*. **International Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 881-891, 2023.
- 24 Favero D, Furlaneto-Maia L, França EJG, Góes H P, Furlaneto MC. Hemolytic Factor
25 Production by Clinical Isolates of *Candida* Species. *Curr Microbiol*. 2014; 68 2: 161-6
- 26 FELIX, Gabriel N. et al. Performance of a Real-Time PCR Assay for the Detection of Five
27 *Candida* Species in Blood Samples from ICU Patients at Risk of Candidemia. **Journal of**
28 **Fungi**, v. 9, n. 6, p. 635, 2023.
- 29 FERNANDES, Tânia; SILVA, Sónia; HENRIQUES, Mariana. Effect of voriconazole on
30 *Candida tropicalis* biofilms: Relation with ERG genes expression. **Mycopathologia**, v. 181, p.
31 643-651, 2016.
- 32 FERNÁNDEZ-RUIZ, Mario et al. *Candida tropicalis* bloodstream infection: incidence, risk
33 factors and outcome in a population-based surveillance. **Journal of Infection**, v. 71, n. 3, p.
34 385-394, 2015.
- 35 FERREIRA, Carina et al. *Candida tropicalis* biofilm and human epithelium invasion is highly
36 influenced by environmental pH. **FEMS Pathogens and Disease**, v. 74, n. 8, p. ftw101, 2016.
- 37 Flexibility. *J. Comput. Chem.* 2009; 30: 2785. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>
- 38 FRANÇA, E. J. G. et al. Haemolytic and proteinase activities in clinical isolates of *Candida*
39 *parapsilosis* and *Candida tropicalis* with reference to the isolation anatomic site. *Mycoses*, v.
40 54, p. e44-e51, 2010.

- 1 FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L.; FURLANETO, M. C. Hemolytic capability and
2 expression of a putative haem oxygenase-encoding gene by blood isolates of *Candida tropicalis*
3 are influenced by iron deprivation and the presence of hemoglobin and erythrocytes. *Microb.*
4 *Pathog.*, v. 105, p. 235–239, 2017
- 5 FROMTLING, Robert A. Overview of medically important antifungal azole
6 derivatives. **Clinical microbiology reviews**, v. 1, n. 2, p. 187-217, 1988.
- 7 FUENTEFRIA, Alexandre M. et al. Antifungals discovery: an insight into new strategies to
8 combat antifungal resistance. **Letters in applied microbiology**, v. 66, n. 1, p. 2-13, 2018.
- 9 FURLANETO-MAIA, L. et al. In vitro evaluation of putative virulence attributes of oral
10 isolates of *Candida* spp. obtained from elderly healthy individuals. *Mycopathologia*, v. 166, p.
11 209–217, 2007.
- 12 GALAN-LADERO, M. A.; BLANCO, M. T.; SACRISTAN, B.; FERNÁNDEZCALDERÓN,
13 M. C.; PEREZ-GIRALDO, C.; GOMEZ-GARCIA, A. C. Enzymatic activities of *Candida*
14 *tropicalis* isolated from hospitalized patients. *Med. Mycol.*, v. 48, n. 1, p. 207– 210, 2010.
- 15 GANJEWALA, Deepak; LUTHRA, Rajesh. Geranyl acetate esterase controls and regulates the
16 level of geraniol in lemongrass (*Cymbopogon flexuosus* Nees ex Steud.) mutant cv. GRL-1
17 leaves. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 64, n. 3-4, p. 251-259, 2009.
- 18 GARCIA-EFFRON, Guillermo et al. Novel FKS mutations associated with echinocandin
19 resistance in *Candida* species. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 5, p. 2225-
20 2227, 2010.
- 21 GARCIA-RUBIO, Rocio et al. The fungal cell wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus*
22 species. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2993, 2020.
- 23 GHELARDI, EMILIA et al. Efficacy of Chromogenic *Candida* Agar for isolation and
24 presumptive identification of pathogenic yeast species. **Clinical microbiology and infection**,
25 v. 14, n. 2, p. 141-147, 2008.
- 26 GOJE, Oluwatosin et al. Oral ibrexafungerp for vulvovaginal candidiasis treatment: an analysis
27 of VANISH 303 and VANISH 306. **Journal of women's health**, v. 32, n. 2, p. 178-186, 2023.
- 28 GOW, Neil AR; LATGE, Jean-Paul; MUNRO, Carol A. The fungal cell wall: structure,
29 biosynthesis, and function. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 3, p. 10.1128/microbiolspec. funk-
30 0035-2016, 2017.
- 31 GROLL, Andreas H. et al. Clinical pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and efficacy
32 of liposomal amphotericin B. **Clinical Infectious Diseases**, v. 68, n. Supplement_4, p. S260-
33 S274, 2019.
- 34 GROSSET, Marine et al. Recurrent episodes of candidemia due to *Candida glabrata*, *Candida*
35 *tropicalis* and *Candida albicans* with acquired echinocandin resistance. **Medical mycology**
36 **case reports**, v. 14, p. 20-23, 2016
- 37 GU, Kexin et al. Geraniol inhibits biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus*
38 *aureus* and increase the therapeutic effect of vancomycin in vivo. **Frontiers in Microbiology**,
39 v. 13, p. 960728, 2022.
- 40 GUPTA, Payal; GUPTA, Hrishikesh; POLURI, Krishna Mohan. Geraniol eradicates *Candida*
41 *glabrata* biofilm by targeting multiple cellular pathways. **Applied Microbiology and**
42 **Biotechnology**, v. 105, n. 13, p. 5589-5605, 2021.

- 1 HAMAD, I.; KEITA, M. B.; PEETERS, M.; DELAPORTE, E.; RAOULT, D.; BITTAR, F.
2 Pathogenic eukaryotes in gut microbiota of western lowland gorillas as revealed by molecular
3 survey. **Sci. Rep.**, v. 4, n. 6417, p. 1–9, 2014.
- 4 HAMMOUDI HALAT, Dalal et al. Allylamines, benzylamines, and fungal cell permeability: a
5 review of mechanistic effects and usefulness against fungal pathogens. **Membranes**, v. 12, n.
6 12, p. 1171, 2022.
- 7 HASSAN, Yahaya; CHEW, Shu Yih; THAN, Leslie Thian Lung. *Candida glabrata*:
8 pathogenicity and resistance mechanisms for adaptation and survival. **Journal of Fungi**, v. 7,
9 n. 8, p. 667, 2021.
- 10 HEERES, J. et al. Antimycotic imidazoles. Part 4. Synthesis and antifungal activity of
11 ketoconazole, a new potent orally active broad-spectrum antifungal agent. **Journal of**
12 **Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 8, p. 1003-1005, 1979.
- 13 HESSE, Leah M. et al. CYP2B6 mediates the in vitro hydroxylation of bupropion: potential
14 drug interactions with other antidepressants. **Drug metabolism and disposition**, v. 28, n. 10,
15 p. 1176-1183, 2000.
- 16 HIGASHI, Carolina Matias et al. Comparação do sistema de identificação automatizado Vitek
17 2 e PCR-ITS para caracterização das espécies dos isolados clínicos de *Candida* spp. **Semina:**
18 **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 36, n. 1Supl, p. 233-242, 2015.
- 19 HIPÓLITO, Daise Damaris Carnietto et al. Diferentes intervalos de tempo de leitura do
20 sistema API 20C AUX® na identificação de leveduras de interesse médico. **Revista do**
21 **Instituto Adolfo Lutz**, v. 74, n. 1, p. 71-74, 2015.
- 22 HOWES, Melanie-Jayne R. et al. Molecules from nature: Reconciling biodiversity conservation
23 and global healthcare imperatives for sustainable use of medicinal plants and fungi. **Plants,**
24 **People, Planet**, v. 2, n. 5, p. 463-481, 2020.
- 25 HOYER, L. L.; FUNDYGA, R.; HECHT, J. E.; KAPTEYN, J. C.; KLIS, F. M.; ARNOLD, J.
26 Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-albicans *Candida* and
27 phylogenetic analysis of the ALS family. **Genetics**, v. 157, n. 4, p. 1555–1567, 2001.
- 28 IVANOV, Marija; ĆIRIĆ, Ana; STOJKOVIĆ, Dejan. Emerging antifungal targets and
29 strategies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 5, p. 2756, 2022.
- 30 JENSEN, Rasmus Hare et al. Stepwise emergence of azole, echinocandin and amphotericin B
31 multidrug resistance in vivo in *Candida albicans* orchestrated by multiple genetic alterations.
32 **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 9, p. 2551-2555, 2015.
- 33 JIANG, Cen et al. Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis*
34 in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 4, p. 778-785, 2013.
- 35 Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates
36 R, Židek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-
37 Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M,
38 Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW,
39 Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis D. Highly accurate protein structure prediction with
40 AlphaFold. **Nature**. 2021 Aug;596(7873):583-589. doi: 10.1038/s41586-021-03819-2. Epub
41 2021 Jul 15. PMID: 34265844; PMCID:
- 42 KADOSH, David; MUNDODI, Vasanthakrishna. A re-evaluation of the relationship between
43 morphology and pathogenicity in *Candida* species. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 13, 2020.

- 1 KANAFANI, Zeina A.; PERFECT, John R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and
2 clinical impact. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. 1, p. 120-128, 2008.
- 3 KAYPETCH, Rattiporn et al. Geraniol and thymoquinone inhibit *Candida* spp. biofilm
4 formation on acrylic denture resin without affecting surface roughness or color. **Journal of**
5 **Oral Science**, v. 64, n. 2, p. 161-166, 2022.
- 6 KEIGHLEY, Caitlin et al. *Candida tropicalis*—A systematic review to inform the World Health
7 Organization of a fungal priority pathogens list. **Medical Mycology**, v. 62, n. 6, p. myae040,
8 2024.
- 9 KHALIFA, Hazim O.; WATANABE, Akira; KAMEI, Katsuhiko. Azole and echinocandin
10 resistance mechanisms and genotyping of *Candida tropicalis* in Japan: Cross-boundary
11 dissemination and animal–human transmission of *C. tropicalis* infection. **Clinical**
12 **Microbiology and Infection**, v. 28, n. 2, p. 302. e5-302. e8, 2022.
- 13 KHAN, Mohd Sajjad Ahmad; AHMAD, Iqbal. Antifungal activity of essential oils and their
14 synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and
15 *Trichophyton rubrum*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, p. 1083-1094, 2011.
- 16 KHAN, Mohd Sajjad Ahmad; MALIK, Abida; AHMAD, Iqbal. Anti-candidal activity of
17 essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug
18 resistant isolates of *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 50, n. 1, p. 33-42, 2012.
- 19 KHAN, Ziauddin et al. Development of echinocandin resistance in *Candida tropicalis*
20 following short-term exposure to caspofungin for empiric therapy. **Antimicrobial Agents and**
21 **Chemotherapy**, v. 62, n. 4, p. 10.1128/aac. 01926-17, 2018.
- 22 KIDD, Sarah E.; ABDOLRASOULI, Alireza; HAGEN, Ferry. Fungal nomenclature: Managing
23 change is the name of the game. In: **Open Forum Infectious Diseases**. US: Oxford University
24 Press, 2023. p. ofac559.
- 25 KLEPSEK, Michael E. et al. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results:
26 proposal for standardized methods. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 5, p.
27 1207-1212, 1998.
- 28 KOLA, Ismail; LANDIS, John. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? **Nature**
29 **reviews Drug discovery**, v. 3, n. 8, p. 711-716, 2004.
- 30 KOTHAVADE, Rajendra J. et al. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and
31 increasing resistance to fluconazole. **Journal of medical microbiology**, v. 59, n. 8, p. 873-880,
32 2010.
- 33 LACKEY, Erika et al. Comparative evolution of morphological regulatory functions in *Candida*
34 species. **Eukaryotic cell**, v. 12, n. 10, p. 1356-1368, 2013.
- 35 LEE, Yunjin et al. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and
36 beyond. **Chemical reviews**, v. 121, n. 6, p. 3390-3411, 2020.
- 37 LEE, Yunjin; ROBBINS, Nicole; COWEN, Leah E. Molecular mechanisms governing
38 antifungal drug resistance. **npj Antimicrobials and Resistance**, v. 1, n. 1, p. 5, 2023.
- 39 LEITE, Maria Clerya Alvino et al. Investigating the antifungal activity and mechanism (s) of
40 geraniol against *Candida albicans* strains. **Medical mycology**, v. 53, n. 3, p. 275-284, 2015.
- 41 LEON-SICAÍROS, Nidia et al. Strategies of intracellular pathogens for obtaining iron from the
42 environment. **BioMed research international**, v. 2015, 2015

- 1 LI, Wen-Ru et al. Geraniol attenuates virulence factors by inhibiting quorum sensing of
2 *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1190619, 2023.
- 3 LICHTEMBERG, Paulo dos Santos Faria et al. Resistência de *Monilinia* spp. aos fungicidas
4 dos grupos dos inibidores da desmetilação (IDM), dos inibidores da quinona externa (IQE) e
5 dos metilo benzimidazol carbamatos (MBC). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 24,
6 p. 145-173, 2016.
- 7 Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational
8 approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings.
9 *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 46: 3–26, doi: org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0.
- 10 LIU, Jidong et al. Overproduction of geraniol by enhanced precursor supply in *Saccharomyces*
11 *cerevisiae*. **Journal of biotechnology**, v. 168, n. 4, p. 446-451, 2013.
- 12 LIU, Na et al. Emerging new targets for the treatment of resistant fungal infections. **Journal of**
13 **medicinal chemistry**, v. 61, n. 13, p. 5484-5511, 2018.
- 14 LIU, Wei; YUAN, Lin; WANG, Shengzheng. Recent progress in the discovery of antifungal
15 agents targeting the cell wall. **Journal of medicinal chemistry**, v. 63, n. 21, p. 12429-12459,
16 2020.
- 17 LIU, Xiaoyan et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of ibrexafungerp in healthy
18 Chinese subjects: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 1 trial. **Antimicrobial**
19 **Agents and Chemotherapy**, v. 67, n. 12, p. e01075-23, 2023.
- 20 LIU, Xinning et al. Synergistic antifungal effect of fluconazole combined with licofelone
21 against resistant *Candida albicans*. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2101, 2017.
- 22 LONGHI, Carline et al. Combination of fluconazole with silver nanoparticles produced by
23 *Fusarium oxysporum* improves antifungal effect against planktonic cells and biofilm of drug-
24 resistant *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 54, n. 4, p. 428-432, 2015.
- 25 LUAN, Fang; WÜST, Matthias. Differential incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into (3S)-
26 linalool and geraniol in grape berry exocarp and mesocarp. **Phytochemistry**, v. 60, n. 5, p. 451-
27 459, 2002.
- 28 LUO, G.; SAMARANAYAKE, L. P.; YAU, J. Y. Y. *Candida* species exhibit differential in vitro
29 hemolytic activities. *Journal of clinical microbiology*, v. 39, n. 8, p. 2971-2974, 2001.
- 30 MAĆZKA, Wanda; WIŃSKA, Katarzyna; GRABARCZYK, Małgorzata. One hundred faces
31 of geraniol. **Molecules**, v. 25, n. 14, p. 3303, 2020.
- 32 MAHMOUD, Soheil S.; CROTEAU, Rodney B. Strategies for transgenic manipulation of
33 monoterpene biosynthesis in plants. **Trends in plant science**, v. 7, n. 8, p. 366-373, 2002.
- 34 MARCOS-ZAMBRANO, Laura Judith et al. Comparison of the antifungal activity of
35 micafungin and amphotericin B against *Candida tropicalis* biofilms. **Journal of Antimicrobial**
36 **Chemotherapy**, v. 71, n. 9, p. 2498-2501, 2016.
- 37 Mariani V, Biasini M, Barbato A, Schwede T. IDDT: a local superposition-free score for
38 comparing protein structures and models using distance difference tests. *Bioinformatics*. 2013
39 Nov 1;29(21):2722-8. doi: 10.1093/bioinformatics/btt473. Epub 2013 Aug 27. PMID:
40 23986568; PMCID: PMC3799472.

- 1 MARICHAL, Patrick et al. Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 α -demethylase
2 (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 145, n. 10, p.
3 2701-2713, 1999.
- 4 MARTIN, M. V. Germ-tube formation by oral strains of *Candida tropicalis*. **Journal of**
5 **Medical Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 187-194, 1979.
- 6 MASYITA, Ayu et al. Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils,
7 their roles in human health and potential application as natural food preservatives. **Food**
8 **chemistry: X**, v. 13, p. 100217, 2022.
- 9 MAY, Robin C.; CASADEVALL, Arturo. In fungal intracellular pathogenesis, form determines
10 fate. **MBio**, v. 9, n. 5, p. 10.1128/mbio. 02092-18, 2018.
- 11 MBA, Ifeanyi Elibe; NWEZE, Emeka Innocent. Mechanism of *Candida* pathogenesis:
12 revisiting the vital drivers. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious**
13 **Diseases**, v. 39, p. 1797-1819, 2020.
- 14 MCCARTHY, M. W. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Ibrexafungerp. *Drugs in R*
15 *and D*, v. 22, n. 1, p. 9–13, 2022.
- 16 MERZ, W. G.; SANDFORD, G. R. Isolation and characterization of a polyene-resistant variant
17 of *Candida tropicalis*. **Journal of clinical microbiology**, v. 9, n. 6, p. 677-680, 1979.
- 18 MESA-ARANGO, Ana C. et al. Cell wall changes in amphotericin B-resistant strains from
19 *Candida tropicalis* and relationship with the immune responses elicited by the
20 host. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 4, p. 2326-2335, 2016
- 21 MESA-ARANGO, Ana C.; SCORZONI, Liliana; ZARAGOZA, Oscar. It only takes one to do
22 many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Frontiers in**
23 **microbiology**, v. 3, p. 286, 2012.
- 24 MIRON, Diogo et al. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against
25 dermatophytes and yeasts. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v. 24, n. 6, p. 660-667, 2014.
- 26 MITCHELL, K. F. et al. Role of matrix β -1, 3 glucan in antifungal resistance of non-albicans
27 *Candida* biofilms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 1918-1920, 2013.
- 28 molecules. *Sci Rep* 2017; 7:1–13, doi: org/10.1038/srep42717.
- 29 MONDAY, Lea M.; PARRAGA ACOSTA, Tommy; ALANGADEN, George. T2*Candida* for
30 the diagnosis and management of invasive *Candida* infections. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 3, p.
31 178, 2021.
- 32 MORALES-UBALDO, Ana Lizet et al. Bovine mastitis, a worldwide impact disease:
33 prevalence, antimicrobial resistance, and viable alternative approaches. **Veterinary and**
34 **Animal Science**, p. 100306, 2023.
- 35 MORIO, Florent et al. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11
36 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review
37 of the literature. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 66, n. 4, p. 373-384, 2010.
- 38 Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al.
- 39 NAVARRO-RODRÍGUEZ, Patricia et al. Expression of ERG11 and efflux pump genes CDR1,
40 CDR2 and SNQ2 in voriconazole susceptible and resistant *Candida glabrata* strains. **Medical**
41 **Mycology**, v. 58, n. 1, p. 30-38, 2020.

- 1 NEGRI, M. et al. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors.
2 **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 31, p. 1399-1412, 2012.
- 3 NEGRI, Melyssa et al. An in vitro evaluation of *Candida tropicalis* infectivity using human cell
4 monolayers. **Journal of medical microbiology**, v. 60, n. 9, p. 1270-1275, 2011.
- 5 NGUYEN, Thi Anh et al. *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*): A systematic review to inform
6 the World Health Organisation priority list of fungal pathogens. **Medical Mycology**, v. 62, n.
7 6, p. myad132, 2024.
- 8 NUNEZ-BELTRAN, Arianna; LOPEZ-ROMERO, Everardo; CUELLAR-CRUZ, Mayra.
9 Identification of proteins involved in the adhesion of *Candida* species to different medical
10 devices. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 293-303, 2017.
- 11 NYIRJESY, Paul et al. Phase 2 randomized study of oral ibrexafungerp versus fluconazole in
12 vulvovaginal candidiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 74, n. 12, p. 2129-2135, 2022.
- 13 ODDS, Frank C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal**
14 **of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1-1, 2003.
- 15 OKAWA, Yoshio; MIYAUCHI, Masayoshi; KOBAYASHI, Hidemitsu. Comparison of
16 pathogenicity of various *Candida tropicalis* strains. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**,
17 v. 31, n. 8, p. 1507-1510, 2008.
- 18 OLIVEIRA, G. S.; RIBEIRO, E. T.; BARONI, F. A. An evaluation of manual and mechanical
19 methods to identify *Candida* spp. from human and animal sources. **Revista do Instituto de**
20 **Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 6, p. 311-315, 2006.
- 21 OLIVEIRA, Jonathas Sales de et al. The yeast, the antifungal, and the wardrobe: a journey into
22 antifungal resistance mechanisms of *Candida tropicalis*. **Canadian Journal of Microbiology**,
23 v. 66, n. 6, p. 377-388, 2020.
- 24 [org/10.1016/j.jymeth.2014.08.001](https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2014.08.001)
- 25 PAGAR, Roshani R. et al. Comprehensive review on the degradation chemistry and toxicity
26 studies of functional materials. **ACS biomaterials science & engineering**, v. 8, n. 6, p. 2161-
27 2195, 2022.
- 28 PANARIELLO, Beatriz Helena Dias et al. Inactivation of genes TEC1 and EFG1 in *Candida*
29 *albicans* influences extracellular matrix composition and biofilm morphology. **Journal of Oral**
30 **Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 1385372, 2017.
- 31 PAPPAS, Peter G. et al. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p.
32 1-20, 2018.
- 33 PASQUALE, Tim et al. Emergence of *Candida tropicalis* resistant to caspofungin. **Journal of**
34 **Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 1, p. 219-219, 2008.
- 35 PAUL, Saikat et al. Mechanisms of azole antifungal resistance in clinical isolates of *Candida*
36 *tropicalis*. **PLoS One**, v. 17, n. 7, p. e0269721, 2022.
- 37 PAVAN, Barbara et al. Geraniol pharmacokinetics, bioavailability and its multiple effects on
38 the liver antioxidant and xenobiotic-metabolizing enzymes. **Frontiers in pharmacology**, v. 9,
39 p. 18, 2018.
- 40 PEREIRA, G. M. V. et al. What is *Candida* doing in my food? A review and safety alert on its
41 use as starter cultures in fermented foods. **Microorganisms**, v. 10, n. 9, p. 1855, 2022.

- 1 PERINI, Hugo F. et al. Phenotypic switching in *Candida tropicalis* alters host-pathogen
2 interactions in a *Galleria mellonella* infection model. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 12555,
3 2019.
- 4 PERSONETT, Heather A. et al. Renal recovery following liposomal amphotericin B-induced
5 nephrotoxicity. **International journal of nephrology**, v. 2019, n. 1, p. 8629891, 2019.
- 6 PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and
7 analysis. *Journal of Computational Chemistry*, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004.
- 8 pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small
- 9 PIATEK, Magdalena; SHEEHAN, Gerard; KAVANAGH, Kevin. Utilising *Galleria mellonella*
10 larvae for studying in vivo activity of conventional and novel antimicrobial agents. **Pathogens**
11 **and Disease**, v. 78, n. 8, p. ftaa059, 2020.
- 12 Pires DEV, Blundell TL, Ascher DB. pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and
13 toxicity properties using graph-based signatures. *J Med Chem* 2015; 58: 4066–4072, doi:
14 org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104
- 15 PRIJI, P.; UNNI, K. N.; SAJITH, S.; BENJAMIN, S. *Candida tropicalis* BPU1, a novel isolate
16 from the rumen of the Malabari goat, is a dual producer of biosurfactant and
17 polyhydroxybutyrate. **Yeast**, v. 30, n. 3, p. 103–110, 2013.
- 18 QIAN, Anran et al. Design, synthesis, and structure-activity relationship studies of novel
19 tetrazole antifungal agents with potent activity, broad antifungal spectrum and high
20 selectivity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 3, p. 344-350, 2018.
- 21 RAAD, Issam I. et al. Safety of long-term oral posaconazole use in the treatment of refractory
22 invasive fungal infections. **Clinical infectious diseases**, v. 42, n. 12, p. 1726-1734, 2006.
- 23 RABELO, Vitor W. et al. Targeting CYP 51 for drug design by the contributions of molecular
24 modeling. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 31, n. 1, p. 37-53, 2017.
- 25 RAMAGE, Gordon et al. *Candida* biofilms: an update. **Eukaryotic cell**, v. 4, n. 4, p. 633-638,
26 2005.
- 27 RAMAGE, Gordon et al. Fungal biofilm resistance. **International journal of microbiology**,
28 v. 2012, 2012.
- 29 RAMAGE, Gordon; MARTÍNEZ, José Pedro; LÓPEZ-RIBOT, José Luis. *Candida* biofilms
30 on implanted biomaterials: a clinically significant problem. **FEMS yeast research**, v. 6, n. 7,
31 p. 979-986, 2006.
- 32 RAMIREZ, María Guadalupe Ramirez et al. *Candida tropicalis* in peritoneal dialysis-related
33 peritonitis diagnosed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass
34 spectrometry. **Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation**, v. 32, n. 1, p. 245-
35 248, 2021.
- 36 RAUT, Jayant S. et al. Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm
37 formation by *Candida albicans*. **Biofouling**, v. 29, n. 1, p. 87-96, 2013.
- 38 REAGAN, Krystle L. et al. Risk factors for *Candida* urinary tract infections in dogs and
39 cats. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 33, n. 2, p. 648-653, 2019.

- 1 REGEV, S.; CONE, Wyatt W. Analyses of pharate female twospotted spider mites for nerolidol
2 and geraniol: evaluation for sex attraction of males. **Environmental Entomology**, v. 5, n. 1, p.
3 133-138, 1976.
- 4 Repasky MP, Shelley M, Friesner RA. Flexible ligand docking with Glide. *Curr Protoc*
5 *Bioinformatics*. 2007 Jun;Chapter 8:Unit 8.12. doi: 10.1002/0471250953.bi0812s18. PMID:
6 18428795.
- 7 RICCI, Chiara et al. Geraniol treatment for irritable bowel syndrome: A double-blind
8 randomized clinical trial. **Nutrients**, v. 14, n. 19, p. 4208, 2022.
- 9 RICETO, É. B. DE M.; MENEZES, R. DE P.; PENATTI, M. P. A.; PEDROSO, R. DOS S.
10 Enzymatic and hemolytic activity in different *Candida* species. *Rev. Iberoam. Micol.*, v. 32, n.
11 2, p. 79–82, 2015.
- 12 RIERA, Fernando Oscar et al. invasive candidiasis: Update and current challenges in the
13 management of this mycosis in south america. **Antibiotics**, v. 11, n. 7, p. 877, 2022.
- 14 RIZZELLO, Fernando et al. Dietary geraniol ameliorates intestinal dysbiosis and relieves
15 symptoms in irritable bowel syndrome patients: A pilot study. **BMC complementary and**
16 **alternative medicine**, v. 18, p. 1-11, 2018.
- 17 ROJAS, Ana Elisa et al. Expression of ERG11, ERG3, MDR1 and CDR1 genes in *Candida*
18 *tropicalis*. **Biomédica**, v. 43, p. 144-155, 2023.
- 19 RYBAK, Jeffrey M. et al. Abrogation of triazole resistance upon deletion of CDR1 in a clinical
20 isolate of *Candida auris*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 4, p. 10.1128/aac.
21 00057-19, 2019.
- 22 SABATELLI, F. et al. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole,
23 voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and
24 yeasts. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 2009-2015, 2006.
- 25 SAFAVIEH, M.; COARSEY, C.; ESIÖBU, N.; MEMIC, A.; VYAS, J. M.; SHAFIEE, H.;
26 ASGHAR, W. Advances in *Candida* detection platforms for clinical and point-of-care
27 applications. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 37, n. 4, p. 441–458, 2017.
- 28 SAFE, L. M. et al. Sterol content and polyene antibiotic resistance in isolates of *Candida krusei*,
29 *Candida parakrusei*, and *Candida tropicalis*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 23, n. 4,
30 p. 398-401, 1977.
- 31 SALCI, Tânia P. et al. Targeting *Candida* spp. to develop antifungal agents. **Drug discovery**
32 **today**, v. 23, n. 4, p. 802-814, 2018.
- 33 SALVATORE, Maria Michela et al. An integrated analysis of intracellular metabolites and
34 virulence gene expression during biofilm development of a clinical isolate of *Candida tropicalis*
35 on distinct surfaces. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, p. 9038, 2021.
- 36 SANGLARD, D. et al. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans*
37 isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. **Antimicrobial agents and**
38 **chemotherapy**, v. 39, n. 11, p. 2378-2386, 1995.
- 39 SANGLARD, Dominique et al. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to
40 azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter
41 gene. **Microbiology**, v. 143, n. 2, p. 405-416, 1997.

- 1 SANO, Tomoya et al. Ocular candidiasis in a tertiary hospital in Japan: A 10-year single-center
2 retrospective study. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 29, n. 11, p. 1081-1087, 2023.
- 3 SARAVOLATZ, Louis D.; JOHNSON, Leonard B.; KAUFFMAN, Carol A. Voriconazole: a
4 new triazole antifungal agent. **Clinical infectious diseases**, v. 36, n. 5, p. 630-637, 2003.
- 5 SARI, Suat et al. Azole derivatives with naphthalene showing potent antifungal effects against
6 planktonic and biofilm forms of *Candida* spp.: An in vitro and in silico study. **International**
7 **Microbiology**, v. 24, p. 93-102, 2021.
- 8 SARTORATTO, Adilson et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from
9 aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.
- 10 SASANI, Elahe et al. The relationship between biofilm formation and mortality in patients with
11 *Candida tropicalis* candidemia. **Microbial pathogenesis**, v. 155, p. 104889, 2021.
- 12 SAWYER, Phyllis R. et al. Clotrimazole: a review of its antifungal activity and therapeutic
13 efficacy. **Drugs**, v. 9, p. 424-447, 1975.
- 14 SCHALLER, M.; BORELLI, C.; KORTING, H. C.; HUBE, B. Hydrolytic enzymes as
15 virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 48, n. 6, p. 365–377, 2005.
- 16 SCHWEBKE, Jane R. et al. Ibrexafungerp versus placebo for vulvovaginal candidiasis
17 treatment: a phase 3, randomized, controlled superiority trial (VANISH 303). **Clinical**
18 **Infectious Diseases**, v. 74, n. 11, p. 1979-1985, 2022.
- 19 SCORZONI, Liliana et al. Antifungal therapy: new advances in the understanding and
20 treatment of mycosis. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 36, 2017.
- 21 SHAFIEI, Mohammad et al. History of the development of antifungal azoles: A review on
22 structures, SAR, and mechanism of action. **Bioorganic chemistry**, v. 104, p. 104240, 2020.
- 23 SHARMA, Monika et al. Curcumin modulates efflux mediated by yeast ABC multidrug
24 transporters and is synergistic with antifungals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.
25 53, n. 8, p. 3256-3265, 2009.
- 26 SHARMA, Y.; CHUMBER, S. K.; KAUR, M. Studying the prevalence, species distribution,
27 and detection of in vitro production of phospholipase from *Candida* isolated from cases of
28 invasive candidiasis. **J. Glob. Infect. Dis.**, v. 9, n. 1, p. 8, 2017
- 29 SHARMA, Y.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. Anti-*Candida* activity of geraniol involves
30 disruption of cell membrane integrity and function. **Journal de mycologie medicale**, v. 26, n.
31 3, p. 244-254, 2016.
- 32 SHUKLA, Suneet et al. Functional characterization of *Candida albicans* ABC transporter
33 Cdr1p. **Eukaryotic cell**, v. 2, n. 6, p. 1361-1375, 2003.
- 34 SIDDIQUI, Zeba N. et al. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel
35 halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 17, n. 2, p. 237-243, 2013.
- 36 SIDRIM, J. J. C.; DE SOUZA COLLARES, D. C. B.; BRILHANTE, R. S. N.; SOARES, G.
37 D. P.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, M. F. G. *Candida* species isolated from
38 the gastrointestinal tract of cockatiels (*Nymphicus hollandicus*): in vitro antifungal
39 susceptibility profile and phospholipase activity. **Vet. Microbiol.**, v. 145, n. 3, p. 324–328,
40 2010.

- 1 SIGERA, L. Shamithra M.; DENNING, David W. Flucytosine and its clinical
2 usage. **Therapeutic advances in infectious disease**, v. 10, p. 20499361231161387, 2023.
- 3 Silva, M.C.; Carbone, D.C.B.; Diniz, P.F.; Fernandes, F.F.; Fuzo, C.A.; Trindade, C.S.P.C.;
4 Chang, M.R.; Silva, J.S. Modulation of ERG Genes expression in clinical isolates of *Candida*
5 *tropicalis* susceptible and resistant to fluconazole and itraconazole. *Mycopathologia* 2020, 185,
6 675–684.
- 7 SILVA, S. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology,
8 epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36,
9 n. 2, p. 288–305, 2012.
- 10 SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO,
11 J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology,
12 pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 36, n. 2, p. 288–305, 2012
- 13 SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO,
14 J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology,
15 pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 36, n. 2, p. 288–305, 2012.
- 16 SILVA, Sónia et al. *Candida* species biofilms' antifungal resistance. **Journal of Fungi**, v. 3, n.
17 1, p. 8, 2017.
- 18 SILVA-RODRIGUES, Gislaïne et al. Geraniol Potentiates the Effect of Fluconazole against
19 Planktonic and Sessile Cells of Azole-Resistant *Candida tropicalis*: In Vitro and In Vivo
20 Analyses. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 8, p. 1053, 2024.
- 21 SIM, J. P. et al. *Candida tropicalis* arthritis of the knee in a patient with acute lymphoblastic
22 leukaemia: successful treatment with caspofungin. **Hong Kong Med J**, v. 11, n. 2, p. 120-3,
23 2005.
- 24 SIMON, David Z.; BELIVEAU, Jacques; AUBE, Claude. Extraction by hydrodiffusion of the
25 essential oil of *Monarda fistulosa* grown in the province of Quebec: Assay of geraniol in the
26 hydrodiffused oil. **International Journal of Crude Drug Research**, v. 24, n. 3, p. 120-122,
27 1986.
- 28 SINGH, Shweta et al. Fungicidal action of geraniol against *Candida albicans* is potentiated by
29 abrogated CaCdr1p drug efflux and fluconazole synergism. **PloS one**, v. 13, n. 8, p. e0203079,
30 2018.
- 31 SINGH, Shweta; FATIMA, Zeeshan; HAMEED, Saif. Insights into the mode of action of
32 anticandidal herbal monoterpenoid geraniol reveal disruption of multiple MDR mechanisms
33 and virulence attributes in *Candida albicans*. **Archives of microbiology**, v. 198, p. 459-472,
34 2016.
- 35 SINGULANI, Junya L. et al. Geraniol and linalool anticandidal activity, genotoxic potential
36 and embryotoxic effect on zebrafish. **Future Microbiology**, v. 13, n. 15, p. 1637-1646, 2018.
- 37 SOBEL, Jack D. et al. Efficacy and safety of oteseconazole in recurrent vulvovaginal
38 candidiasis. **NEJM evidence**, v. 1, n. 8, p. EVIDoA2100055, 2022.
- 39 Sobolev OV, Afonine PV, Moriarty NW, Hekkelman ML, Joosten RP, Perrakis A, Adams PD.
40 A Global Ramachandran Score Identifies Protein Structures with Unlikely Stereochemistry.
41 *Structure*. 2020 Nov 3;28(11):1249-1258.e2. doi: 10.1016/j.str.2020.08.005. Epub 2020 Aug
42 27. PMID: 32857966; PMCID: PMC7642142.

- 1 SOUZA, Caio Marcelo Cury et al. Antifungal activity of plant-derived essential oils on *Candida*
2 *tropicalis* planktonic and biofilms cells. **Sabouraudia**, v. 54, n. 5, p. 515-523, 2016.
- 3 SPRUIJTENBURG, Bram et al. Short tandem repeat genotyping and antifungal susceptibility
4 testing of Latin American *Candida tropicalis* isolates. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 2, p. 207, 2023.
- 5 STAHELIN, Robert V. Phospholipid catabolism. In: **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins**
6 **and Membranes**. Elsevier, 2016. p. 237-257.
- 7 SULLIVAN, Geraldine J. et al. How antibiotics work together: molecular mechanisms behind
8 combination therapy. **Current opinion in microbiology**, v. 57, p. 31-40, 2020.
- 9 SUWUNNAKORN, Sumanun et al. FKS2 and FKS3 genes of opportunistic human pathogen
10 *Candida albicans* influence echinocandin susceptibility. **Antimicrobial Agents and**
11 **Chemotherapy**, v. 62, n. 4, p. 10.1128/aac. 02299-17, 2018.
- 12 SZYMAŃSKI, Mateusz et al. Echinocandins—structure, mechanism of action and use in
13 antifungal therapy. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 1, p.
14 876-894, 2022.
- 15 TAJ-ALDEEN, Saad J. et al. Molecular analysis of resistance and detection of non-wild-type
16 strains using Etest epidemiological cutoff values for amphotericin B and echinocandins for
17 bloodstream *Candida* infections from a tertiary hospital in Qatar. **Antimicrobial Agents and**
18 **Chemotherapy**, v. 62, n. 9, p. 10.1128/aac. 00214-18, 2018.
- 19 TAKAHASHI, H.; UEDA, K.; ITANO, E. N.; YANAGISAWA, M.; MURATA, Y.; MURATA,
20 M.; YAGUCHI, T.; MURAKAMI, M.; KAMEI, K.; INOMATA, T. *Candida albicans* and *C.*
21 *tropicalis* isolates from the expired breathes of captive dolphins and their environments in an
22 aquarium. *Vet. Med. Int.*, v. 2010, n. 349364, p. 1–12, 2010.
- 23 TAO, Nengguo; OUYANG, Qiuli; JIA, Lei. Citral inhibits mycelial growth of *Penicillium*
24 *italicum* by a membrane damage mechanism. **Food control**, v. 41, p. 116-121, 2014.
- 25 THOMPSON, Mark L. et al. Biotransformation of β -myrcene to geraniol by a strain of
26 *Rhodococcus erythropolis* isolated by selective enrichment from hop plants. **Applied**
27 **microbiology and biotechnology**, v. 85, p. 721-730, 2010.
- 28 TSENG, Yi-Kai et al. Evaluation of biofilm formation in *Candida tropicalis* using a silicone-
29 based platform with synthetic urine medium. **Microorganisms**, v. 8, n. 5, p. 660, 2020.
- 30 TURNER, S. A.; BUTLER, G. The *Candida* pathogenic species complex. **Cold Spring Harb.**
31 **Perspect. Med.**, v. 4, n. 9, p. a019778, 2014.
- 32 VANDEPUTTE, Patrick et al. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida*
33 *tropicalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4608-4615, 2005.
- 34 Varadi M, Anyango S, Deshpande M, Nair S, Natassia C, Yordanova G, Yuan D, Stroe O, Wood
35 G, Laydon A, Židek A, Green T, Tunyasuvunakool K, Petersen S, Jumper J, Clancy E, Green
36 R, Vora A, Lutfi M, Figurnov M, Cowie A, Hobbs N, Kohli P, Kleywegt G, Birney E, Hassabis
37 D, Velankar S. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural
38 coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.* 2022 Jan
39 7;50(D1):D439-D444. doi: 10.1093/nar/gkab1061. PMID: 34791371; PMCID: PMC8728224.
- 40 VEGA-CHACÓN, Yuliana et al. Verapamil inhibits efflux pumps in *Candida albicans*, exhibits
41 synergism with fluconazole, and increases survival of *Galleria mellonella*. **Virulence**, v. 12, n.
42 1, p. 231-243, 2021.

- 1 VERSTREPEN, Kevin J.; KLIS, Frans M. Flocculation, adhesion and biofilm formation in
2 yeasts. **Molecular microbiology**, v. 60, n. 1, p. 5-15, 2006.
- 3 WALSH, Thomas J. et al. Treatment of invasive aspergillosis with posaconazole in patients who
4 are refractory to or intolerant of conventional therapy: an externally controlled trial. **Clinical**
5 **infectious diseases**, v. 44, n. 1, p. 2-12, 2007.
- 6 WANG, J.; MA, X.; LIU, S.; SUN, P.; FAN, P.; XIA, C. Biodegradation of phenol and 4-
7 chlorophenol by *Candida tropicalis* W1. **Procedia Environ. Sci.**, v. 16, p. 299–303, 2012.
- 8 WANG, Lei et al. Rapid Detection of *Candida tropicalis* in Clinical Samples From Different
9 Sources Using RPA-LFS. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 970,
10 2022.
- 11 WARING, Michael J. et al. An analysis of the attrition of drug candidates from four major
12 pharmaceutical companies. **Nature reviews Drug discovery**, v. 14, n. 7, p. 475-486, 2015.
- 13 WARRILOW, Andrew GS et al. The investigational drug VT-1129 is a highly potent inhibitor
14 of *Cryptococcus* species CYP51 but only weakly inhibits the human enzyme. **Antimicrobial**
15 **agents and chemotherapy**, v. 60, n. 8, p. 4530-4538, 2016.
- 16 WASAN, Ellen et al. Review of novel oral amphotericin B formulations for the treatment of
17 parasitic infections. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 11, p. 2316, 2022.
- 18 WEBER, K.; SCHULZ, B.; RUHNKE, M. The quorum-sensing molecule E, E-farnesol—its
19 variable secretion and its impact on the growth and metabolism of *Candida* species. **Yeast**, v.
20 27, n. 9, p. 727-739, 2010.
- 21 Westermaier Y, Barril X, Scapozza L. Virtual screening: An in silico tool for interlacing the
22 chemical universe with the proteome. *Methods* 2015; 71: 44–57. doi:
- 23 WHO Fungal Priority Pathogens List to Guide Research, Development and Public Health
24 Action; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2022.
- 25 WIEDERHOLD, Nathan P. et al. Fungal-specific Cyp51 inhibitor VT-1598 demonstrates in
26 vitro activity against *Candida* and *Cryptococcus* species, endemic fungi, including
27 *Coccidioides* species, *Aspergillus* species and *Rhizopus arrhizus*. **Journal of Antimicrobial**
28 **Chemotherapy**, v. 73, n. 2, p. 404-408, 2018.
- 29 WOODS, R. A. et al. Resistance to polyene antibiotics and correlated sterol changes in two
30 isolates of *Candida tropicalis* from a patient with an amphotericin B-resistant
31 funguria. **Journal of Infectious Diseases**, v. 129, n. 1, p. 53-58, 1974.
- 32 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for diagnosing, preventing and**
33 **managing cryptococcal disease among adults, adolescents and children living with HIV.**
34 World Health Organization, 2022.
- 35 YANG, Weiming et al. Fungal invasion of epithelial cells. **Microbiological research**, v. 169,
36 n. 11, p. 803-810, 2014.
- 37 YANG, Yun-Liang et al. Susceptibilities of *Candida* species to amphotericin B and fluconazole:
38 the emergence of fluconazole resistance in *Candida tropicalis*. **Infection Control & Hospital**
39 **Epidemiology**, v. 25, n. 1, p. 60-64, 2004.
- 40 YAPAR, N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. **Ther. Clin. Risk Manag.**,
41 v. 10, p. 95-105, 2014.

- 1 YAZDANPANA, Somayeh et al. Species distribution and antifungal susceptibility profiles of
2 yeasts isolated from onychomycosis: a cross-sectional study with insights into emerging
3 species. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 117, n. 1, p. 6, 2023.
- 4 YE, Naifang et al. Systematic characterization of epidemiology, antifungal susceptibility, risk
5 factors and outcomes of candidaemia: a six-year Chinese study. **Infection and Drug**
6 **Resistance**, p. 4887-4898, 2022.
- 7 ZARAGOZA, Carolina Segundo et al. Yeasts isolation from bovine mammary glands under
8 different mastitis status in the Mexican High Plateau. **Revista iberoamericana de micologia**, v.
9 28, n. 2, p. 79-82, 2011.
- 10 ZEHETNER, Petra; HÖFERL, Martina; BUCHBAUER, Gerhard. Essential oil components
11 and cytochrome P450 enzymes: a review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 34, n. 4, p. 223-
12 240, 2019.
- 13 ZHANG, Li-Juan et al. Polymorphism analysis of virulence-related genes among *Candida*
14 *tropicalis* isolates. **Chinese Medical Journal**, v. 132, n. 04, p. 446-453, 2019.
- 15 ZHAO, Haisu et al. Prognostic Risk Factors for Patients with *Candida Tropicalis* Fungemia
16 Infections and Hematological Malignancies. **Blood**, v. 142, n. Supplement 1, p. 5846-5846,
17 2023.
- 18 ZHAO, Ya-Jing et al. The efflux pump inhibitor tetrandrine exhibits synergism with fluconazole
19 or voriconazole against *Candida parapsilosis*. **Molecular Biology Reports**, v. 46, p. 5867-
20 5874, 2019.
- 21 ZORE, Gajanan B. et al. Evaluation of anti-*Candida* potential of geranium oil constituents
22 against clinical isolates of *Candida albicans* differentially sensitive to fluconazole: inhibition
23 of growth, dimorphism and sensitization. **Mycoses**, v. 54, n. 4, p. e99-e109, 2011.
- 24 ZUO, Xiao-shu et al. Association of different *Candida* species with catheter-related
25 candidemia, and the potential antifungal treatments against their adhesion properties and
26 biofilm-forming capabilities. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 35, n. 4, p. e23738,
27 2021.
- 28 ZUO, Xiao-shu et al. Association of different *Candida* species with catheter-related
29 candidemia, and the potential antifungal treatments against their adhesion properties and
30 biofilm-forming capabilities. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 35, n. 4, p. e23738,
31 2021.
- 32 ZUZA-ALVES, D. L.; DE MEDEIROS, S. S. T. Q.; DE SOUZA, L. B. F. C.; SILVAROCHA,
33 W. P.; FRANCISCO, E. C.; DE ARAÚJO, M. C. B.; LIMA-NETO, R. G.; NEVES, R. P.; DE
34 AZEVEDO MELO, A. S.; CHAVES, G. M. Evaluation of virulence factors in vitro, resistance
35 to osmotic stress and antifungal susceptibility of *Candida tropicalis* isolated from the coastal
36 environment of Northeast Brazil. *Front. Microbiol.*, v. 7, p. 1783, 2016.
- 37 ZUZA-ALVES, Diana L.; SILVA-ROCHA, Walicyranison P.; CHAVES, Guilherme M. An
38 update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. **Frontiers in**
39 **microbiology**, v. 8, p. 1927, 2017.
- 40 ZWART, P.; BUITELAAR, M. N. *Candida tropicalis* enteric infections and their treatment in
41 Chelonians. **Proceedings of the American Associations of Zoo Veterinarians**, p. 58-59, 1980.
- 42

1 APÊNDICE A



pharmaceutics



Article

Geraniol Potentiates the Effect of Fluconazole against Planktonic and Sessile Cells of Azole-Resistant *Candida tropicalis*: In Vitro and In Vivo Analyses

Gislaine Silva-Rodrigues¹, Isabela Madeira de Castro¹, Paulo Henrique Guilherme Borges¹, Helena Tiemi Suzukawa¹, Joyce Marinho de Souza¹, Guilherme Bartolomeu-Gonçalves², Marsileni Pelisson², Cássio Ilan Soares Medeiros³, Marcelle de Lima Ferreira Bispo⁴, Ricardo Sérgio Couto de Almeida¹, Kelly Ishida⁵, Eliandro Reis Tavares^{6,7}, Lucy Megumi Yamauchi^{1,7} and Sueli Fumie Yamada-Ogatta^{1,2,7,*}

- ¹ Postgraduate Program in Microbiology, Department of Microbiology, State University of Londrina, Londrina 86057-970, Brazil; gislaine.srodrigues@uel.br (G.S.-R.); isabela.mcastro@uel.br (I.M.d.C.); paulo.guilhermeph@uel.br (P.H.G.B.); helena.tiemi.suzukawa@uel.br (H.T.S.); lionilmy@uel.br (L.M.Y.)
- ² Postgraduate Program in Clinical and Laboratory Pathophysiology, Department of Pathology, Clinical and Toxicological Analysis, State University of Londrina, Londrina 86038-350, Brazil
- ³ Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58059-900, Brazil; cassioism@hotmail.com
- ⁴ Synthesis of Medicinal Molecules Laboratory, Department of Chemistry, State University of Londrina, Londrina 86057-970, Brazil; mlfbispo@uel.br
- ⁵ Laboratory of Antifungal Chemotherapy, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo 05508-900, Brazil; ishidakelly@usp.br
- ⁶ Department of Medicine, Pontifical Catholic University of Paraná, Campus Londrina, Londrina 86067-000, Brazil; tavares.eliandro@gmail.com
- ⁷ Laboratory of Molecular Biology of Microorganisms, Department of Microbiology, State University of Londrina, Londrina 86057-970, Brazil
- * Correspondence: ogatta@uel.br; Tel.: +55-43-3371-5503



Citation: Silva-Rodrigues, G.; Castro, I.M.d.; Borges, P.H.G.; Suzukawa, H.T.; Souza, J.M.d.; Bartolomeu-Gonçalves, G.; Pelisson, M.; Medeiros, C.I.S.; Bispo, M.d.L.F.; Almeida, R.S.C.d.; et al. Geraniol Potentiates the Effect of Fluconazole against Planktonic and Sessile Cells of Azole-Resistant *Candida tropicalis*: In Vitro and In Vivo Analyses. *Pharmaceutics* **2024**, *16*, 1053. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16081053>

Academic Editor: Clive Prestidge

Received: 27 June 2024

Revised: 24 July 2024

Accepted: 3 August 2024

Published: 9 August 2024



Abstract: *Candida tropicalis* is regarded as an opportunistic pathogen, causing diseases ranging from superficial infections to life-threatening disseminated infections. The ability of this yeast to form biofilms and develop resistance to antifungals represents a significant therapeutic challenge. Herein, the effect of geraniol (GER), alone and combined with fluconazole (FLZ), was evaluated in the planktonic and sessile cells of azole-resistant *C. tropicalis*. GER showed a time-dependent fungicidal effect on the planktonic cells, impairing the cell membrane integrity. Additionally, GER inhibited the rhodamine 6G efflux, and the molecular docking analyzes supported the binding affinity of GER to the *C. tropicalis* Cdr1 protein. GER exhibited a synergism with FLZ against the planktonic and sessile cells, inhibiting the adhesion of the yeast cells and the viability of the 48-h biofilms formed on abiotic surfaces. *C. tropicalis* biofilms treated with GER, alone or combined with FLZ, displayed morphological and ultrastructural alterations, including a decrease in the stacking layers and the presence of wilted cells. Moreover, neither GER alone nor combined with FLZ caused toxicity, and both treatments prolonged the survival of the *Galleria mellonella* larvae infected with azole-resistant *C. tropicalis*. These findings indicate that the combination of GER and FLZ may be a promising strategy to control azole-resistant *C. tropicalis* infections.

Keywords: antibiofilm activity; Cdr1p; efflux pump activity; *Galleria mellonella* infection model; itraconazole resistance; in silico toxicity analyses; molecular docking; monoterpenoid; synergism