



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CARLINE LONGHI

**ATIVIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
ASSOCIADAS A FLUCONAZOL SOBRE *Candida* spp. E
BIOFILME**

CARLINE LONGHI

**ATIVIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
ASSOCIADAS A FLUCONAZOL SOBRE *Candida* spp. E
BIOFILME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
Graduação em Microbiologia da Universidade
Estadual de Londrina, como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lucy Megumi
Yamauchi Lioni.

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L854a Longhi, Carline.

Atividade de nanopartículas de prata associadas a fluconazol sobre *Candida* spp. e biofilme / Carline Longhi. – Londrina, 2014.
48 f. : il.

Orientador: Lucy Megumi Yamauchi Lioni.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2014.

Inclui bibliografia.

1. *Candida* – Teses. 2. Fungos patogênicos – Teses. 3. Microorganismos – Efeito dos metais – Teses. 4. Prata – Teses. 5. Nanopartículas – Teses. I. Lioni, Lucy Megumi Yamauchi. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

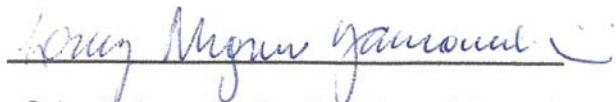
CDU 579:582.28

CARLINE LONGHI

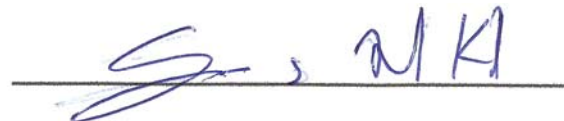
**ATIVIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
ASSOCIADAS A FLUCONAZOL SOBRE *Candida* spp. E
BIOFILME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

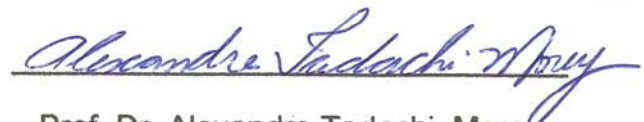
BANCA EXAMINADORA



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



Prof. Dr. Gerson Nakazato
Universidade Estadual de Londrina -
UEL



Prof. Dr. Alexandre Tadachi Morey
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 16 de abril de 2014.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais por terem possibilitado e provido toda a minha educação acadêmica e pessoal, permitindo que eu chegasse até aqui. Além disso, sou imensamente grata a todo apoio emocional, compreensão e carinho dedicados por eles durante todos esses anos;

À minha orientadora Profa. Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni por ter me acolhido e me direcionado na vida acadêmica e científica durante os últimos anos, compartilhando diariamente sua vasta experiência e conhecimento de maneira concisa e descontraída;

À Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada-Ogatta que sempre esteve presente em minha caminhada científica, também compartilhando seu vasto conhecimento de maneira muito prestativa e sempre me auxiliando sabiamente frente aos vários percalços encontrados;

Ao Prof. Alexandre Tadachi Morey pela inestimável ajuda no cotidiano laboratorial, tanto nos aspectos experimentais como teóricos e também pelo constante incentivo pela busca dos objetivos propostos nessa pós-graduação;

À colega de trabalho Jussevânia pelo suporte prático e teórico de extrema valia para a realização deste projeto;

Ao Prof. Gerson Nakazato pela participação neste trabalho e partilha de conhecimentos e técnicas necessários à sua realização;

Ao Prof. Phileo Pinge Filho, que além de sempre compartilhar seus conhecimentos científicos, certo dia ao me encontrar cabisbaixa e descontente com a realidade da vida científica, também compartilhou algumas experiências de sua própria caminhada científica e acadêmica, incentivando-me a perseverar;

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos que sempre estiveram presentes em meu cotidiano, me auxiliando nos experimentos e também compartilhando momentos agradáveis em nossas confraternizações;

Às companheiras de turma Pollyana, Marina e Paula e ao Eliandro pela amizade e apoio durante nossa jornada comum;

E a todos os professores e outros funcionários do Departamento de Microbiologia e da Pós-Graduação pela colaboração durante o todo o processo de formação.

LONGHI, Carline. **Atividade de nanopartículas de prata associadas a fluconazol sobre *Candida* spp. e biofilme.** 2014. 48f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

Nas últimas décadas vem ocorrendo um aumento significativo de infecções causadas por *Candida* spp., principalmente em pacientes hospitalizados e imunossuprimidos. Além disso, a emergência de espécies resistentes aos antifúngicos e formadoras de biofilme, dificulta a eficácia dos tratamentos. Esses fatores impulsionam os cientistas na busca de novas opções terapêuticas e desenvolvimento de antifúngicos. O potencial antimicrobiano da prata já é conhecido há desde a antiguidade, porém com os avanços na área da nanotecnologia, o uso de nanopartículas metálicas, como a de prata, tornou-se uma ferramenta muito mais efetiva no controle de patógenos. Em vista disso, os objetivos deste trabalho foram a avaliação do efeito de uma nanopartícula de prata (AgNP_{bio}) contra amostras-padrão de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* e do efeito da associação desta nanopartícula com fluconazol (AgNP_{bio}/FLC) contra *Candida* spp. resistentes ao antifúngico. O perfil de sensibilidade das amostras à AgNP_{bio} e ao FLC foi realizado pelo teste de microdiluição em caldo, resultando em concentrações inibitórias mínimas (CIMs) que variaram entre 1,09 e 4,35 µg/mL de AgNP_{bio} para todas as amostras testadas. Na sequência, as espécies que apresentaram resistência ao FLC e mais dois isolados clínicos de *C. albicans*, previamente classificados como resistentes, foram selecionados para os testes com a combinação das duas substâncias. A eficácia de AgNP_{bio}/FLC foi avaliada pelo método de “checkerboard” e o cálculo do índice de concentração inibitória fracional (ICIF). Os dados obtidos mostraram a ocorrência de aditismo entre AgNP_{bio} e FLC com todas as amostras de *C. albicans* testadas. Porém, o efeito foi indiferente e antagônico com *C. krusei* e *C. tropicalis*, respectivamente, demonstrando ser espécie-dependente. O ensaio de curva de morte e a microscopia de fluorescência revelaram que a associação tem ação fungicida em *C. albicans*, diferente do padrão fungistático estabelecido para o FLC isolado. Por fim, a avaliação do efeito de AgNP_{bio}/FLC sobre biofilmes formados por *C. albicans* também apontou resultados positivos, apresentando uma redução significativa do crescimento das leveduras em comparação às tratadas somente com AgNP_{bio}. Sobretudo, o presente estudo destaca a eficácia da associação de nanopartículas de prata com FLC contra *C. albicans* resistentes a este antifúngico.

Palavras-chave: Nanopartículas de prata. *Candida* spp. Fluconazol. Resistência. Biofilme.

LONGHI, Carline. **Activity of silver nanoparticles in combination with fluconazole against *Candida* spp. and biofilm.** 2014. 48p. Dissertation (Master degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

In the last decades there was a significant increase of infections caused by *Candida* spp., especially in immunosuppressed and hospitalized patients. In addition, the increasing emergence of resistance to antifungals, along with biofilm formation, impairs the effectiveness of treatments. These factors drive the scientists in the search for new therapeutic options and development of antifungals. The antimicrobial potential of silver is already known for a long time, however, with advances in the field of nanotechnology, the use of metal nanoparticles, such as silver, has become a much more effective tool in combating pathogens. Therefore, the aims of this study were to evaluate the effect of a silver nanoparticle (AgNP_{bio}) against the main pathogenic *Candida* species and the effect of association of this nanoparticle with fluconazole (AgNP_{bio}/FLC) against FLC-resistant *Candida* spp. The AgNP_{bio} and FLC susceptibility testing was held by broth microdilution method, resulting in low values of minimum inhibitory concentrations (MICs) of AgNP_{bio} for all yeasts tested. Next, the species that showed resistance to fluconazole and two other clinical isolates of *C. albicans* (previously classified as resistant) were selected for tests with the association between the two substances. The effect of AgNP_{bio}/FLC was evaluated by checkerboard method and calculation of fractional inhibitory concentration index (FICI). The results obtained showed additivism between AgNP_{bio} and FLC with all *C. albicans* tested. However, the effect was indifferent and antagonistic with *C. krusei* and *C. tropicalis*, respectively, revealing that positive results are dependent on the FLC-resistant species tested. The time kill curve analysis and fluorescent microscopy revealed that activity of AgNP_{bio}/FLC in *C. albicans* is fungicidal, and not fungistatic as the pattern established for FLC. Finally, the evaluation of AgNP_{bio}/FLC on biofilms formed by *C. albicans* also pointed positive results, showing a significant reduction in the yeast growth in comparison to samples treated only with AgNP_{bio}. Above all, our results highlight the effectiveness of the association of silver nanoparticles with FLC against *C. albicans* resistant to this antifungal.

Keywords: Silver nanoparticles. *Candida* spp. Fluconazole. Resistance. Biofilm.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNP _{bio}	Nanopartícula de prata obtida por método biológico
AgNP _{bio} /FLC	Associação de nanopartícula de prata com fluconazol
AgNP (s)	Nanopartícula de prata (s)
ALS	Agglutinin - like sequence
CFU	Colony forming unit
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
EPA	Epithelial adhesin
FIC	Fractional inhibitory concentration
FICI	Fractional inhibitory concentration index
FLC	Fluconazol
FLC-MIC	Minimum inhibitory concentration of fluconazole
MCF	Minimum fungicidal concentration
MIC (s)	Minimum inhibitory concentration (s)
MOPS	3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid
Pga 30	Predicted glycosylphosphatidylinositol - anchored protein 30
RPMI	Instituto Roswell Park Memorial
spp.	Espécies
SAPs	Aspartil proteinases secretadas
SD	Sabouraud Dextrose
UEL	Universidade Estadual de Londrina
XTT	2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

LISTA DE FIGURA

Figura 1 – Diagrama da formação de AgNPs por fungos	18
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	GÊNERO <i>Candida</i>	8
1.2	INFECÇÕES FÚNGICAS CAUSADAS POR <i>Candida</i> spp.	11
1.3	PRINCIPAIS ANTIFÚNGICOS E RESISTÊNCIA.....	14
1.4	NANOPARTÍCULAS DE PRATA	16
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVOS GERAIS	21
2.1.1	Objetivos Específicos	21
	REFERÊNCIAS	22
	ARTIGO	36
	CONCLUSÃO	48

1. INTRODUÇÃO

1.1 GÊNERO *Candida*

Existem aproximadamente 70 mil espécies de fungos conhecidas, tanto unicelulares (leveduras), como multicelulares (fungos filamentosos). A maioria desses organismos é saprófita, ou seja, obtêm nutrientes pela decomposição de matéria morta, no entanto, alguns gêneros incluem espécies patogênicas para plantas e animais, inclusive seres humanos (INGRAHAM; INGRAHAM, 2010). Os microrganismos do gênero *Candida* fazem parte do filo *Ascomycota*, classe dos Hemiascomycetes e ordem Saccharomycetales (STEFFAN et al., 1997). Este gênero alberga mais de 150 espécies heterogêneas, porém, apenas uma minoria causa doenças em humanos (CALDERONE, 2002). Esses microrganismos normalmente existem como comensais no trato gastrointestinal e genital de hospedeiros saudáveis, mas como são oportunistas, podem causar infecções superficiais ou mesmo sistêmicas em hospedeiros imunossuprimidos (KIM; SUDBERY, 2011; LIM et al., 2012). São fungos leveduriformes, ou seja, unicelulares, que se reproduzem por brotamento. Algumas espécies como *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* são capazes de crescer na forma filamentosa, formando hifas ou pseudo-hifas, o que auxilia na penetração do tecido hospedeiro e disseminação da infecção (VAN BURIK; MAGEE, 2001; SILVA et al., 2012).

Existem vários determinantes para o estabelecimento de uma infecção causada por um fungo oportunista, estes, geralmente, são relacionados ao hospedeiro (resposta imune, idade, presença de outras doenças) e ao microrganismo, através dos fatores de virulência. A patogenicidade de fungos do gênero *Candida* deve-se principalmente à aderência as células do hospedeiro, à habilidade de evasão do sistema imune e à produção de enzimas hidrolíticas, como proteases e fosfolipases e também hemolisinas. Esses fatores de virulência são extensamente estudados em *C. albicans*, mas pouco se sabe sobre as outras espécies (SILVA et al., 2012). Para que se inicie a infecção é necessária a aderência do microrganismo a superfícies do hospedeiro, levando à colonização. Isso contribui para a persistência do fungo no organismo e é considerado essencial para o estabelecimento da infecção (SILVA et al., 2012). Essa aderência inicial é mediada

por fatores não específicos (hidrofobicidade e forças eletrostáticas) e promovida por proteínas específicas da superfície da célula fúngica que reconhecem ligantes como outras proteínas, fibrinogênio e fibronectina (LI et al., 2003). *Candida* spp. possuem diferentes proteínas de parede celular envolvidas na adesão, denominadas adesinas. *C. albicans* possui uma família de proteínas de adesão chamada ALS (*agglutinin-like sequence*), essas proteínas desempenham um papel importante mediando a aderência a diferentes epitélios celulares (NEGRI et al., 2011). Estudos evidenciaram a presença de genes ALS em *C. tropicalis* e pelo menos três proteínas ALS identificadas através de anticorpos anti-ALS de *C. albicans* (HOYER et al., 2001; YANG, 2003). Outra família de genes (*EPA – epithelial adhesin*) codifica adesinas em *C. glabrata* e estas possuem estrutura similar às proteínas ALS de *C. albicans*. Butler e colaboradores (2009) através de bioinformática encontraram alguns genes de *C. parapsilosis* que poderiam se relacionar às ALS, incluindo genes de cinco proteínas ALS e seis Pga 30 (*predicted glycosylphosphatidylinositol-anchored protein 30*). Existem também outros fatores relacionados à adesão, como interações físico-químicas entre as células fúngicas e a superfície ou epitélio e condições ambientais (OKAWA et al., 2008; SILVA et al., 2010; SILVA et al., 2011a; SILVA et al., 2011b).

A adesão de células de *Candida* spp. a superfícies abióticas e a outras células pode levar à formação de biofilmes e estes podem desempenhar um papel importante na patogênese (MARTINEZ; FRIEZ, 2010; SARDI et al., 2013). Os biofilmes são comunidades organizadas e específicas de células de microrganismos associadas a superfícies embebidas em uma matriz extracelular, sob o controle de moléculas sinalizadoras (SILVA et al., 2009; SARDI et al., 2013). Alguns estudos mostraram que nos tecidos dos hospedeiros quase não existem microrganismos em sua forma planctônica, somente agrupados em comunidades multicelulares, tanto nos próprios tecidos como em próteses, cateteres e outras superfícies (SOLL, 2008). A matriz extracelular auxilia na defesa contra células fagocíticas, atua como um alicerce que mantém a integridade do biofilme e também limita a difusão de substâncias tóxicas, como antifúngicos, para dentro da comunidade celular (DOUGLAS, 2003; BLANKENSHIP; MITCHELL, 2006). Geralmente, a matriz extracelular é composta de carboidratos, proteínas, fósforo e hexosaminas, no entanto, as condições ambientais como a composição do meio, pH e oxigenação,

assim como fatores relacionados ao próprio microrganismo (cepa e espécie) também afetam a formação do biofilme e a composição da matriz (SARDI et al., 2013).

A espécie fúngica mais comumente relacionada à formação de biofilme é *C. albicans*, embora alguns isolados de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis* também apresentem essa característica (KUMAMOTO, 2002; SILVA et al., 2009). Essas cepas formadoras de biofilme são associadas com altas taxas de morbidade e mortalidade se comparadas com isolados não formadores e têm um impacto importante na prática clínica, pois causam infecções de difícil tratamento e representam uma fonte de reinfecção (KUMAMOTO, 2002; SHIN et al., 2002; SCHELENZ, 2008).

Após a adesão às células são necessários outros fatores que permitam a penetração nos tecidos mais profundos, como a formação de hifas ou pseudo-hifas e a produção de enzimas hidrolíticas. As enzimas mais comumente relacionadas à patogenicidade de *C. albicans* são as aspartil proteinases secretadas (SAPs), fosfolipases, lipases e hemolisinas (GALAN-LADERO et al., 2010; KOTHAVADE et al., 2010; NEGRI et al., 2010; SILVA et al., 2012). As SAPs vêm sendo intensivamente investigadas em *C. albicans* e já foram identificados pelo menos 10 tipos distintos dessas proteínas. Essas moléculas influenciam na habilidade da levedura de aderir à mucosa e invadir tecidos profundos (DE-BERNARDIS et al., 1999; SCHALLER et al., 1999). Essas enzimas também foram descritas em *C. tropicalis*, com quatro genes SAPs identificados, denominados *SAPT1* a *SAPT4* e em *C. parapsilosis*, apresentando três genes SAPP1 a SAPP3 (TOGNI et al., 1991; ZAUGG et al., 2001; MERKEROVA et al., 2006). Apenas um estudo mostrou que *C. glabrata* é capaz de produzir proteinases, porém os tipos não foram especificados (PICHOVÁ et al., 2001).

Além das SAPs, as fosfolipases são enzimas que também atuam na patogenicidade de *Candida* spp., hidrolisando fosfolipídios em ácidos graxos, resultando em dano à membrana celular do hospedeiro (GHANNOUM, 2000; KANTARCIOGLU; YÜCEL, 2002). Aparentemente, as outras espécies de *Candida* produzem níveis significativamente mais baixos de fosfolipases extracelulares se comparadas a *C. albicans* (GHANNOUM, 2000; FURLANETO-MAIA et al., 2008; CAFARCHIA et al., 2008; GALAN-LADERO et al., 2010; NEGRI et al., 2010). As lipases também são enzimas envolvidas no metabolismo de lipídios e participam da hidrólise de triacilglicerídeos (NEGRI et al., 2011). Em *C. albicans* foram

identificados 10 genes codificantes de lipases (*LIP 1-10*) e já foi mostrado que cepas de *C. albicans* mutantes para o gene *LIP8* apresentaram menor virulência em relação às selvagens em um modelo murino de infecção intravenosa (GÁCSER et al., 2007). Sequências similares às desses genes de *C. albicans* também foram detectadas em *C. tropicalis*, mas não em *C. glabrata*, porém ainda são necessários estudos mais aprofundados para se determinar o papel desses genes na virulência de *C. tropicalis* (FU et al., 1997).

Outras moléculas hidrolíticas consideradas como fatores de virulência são as hemolisinas. *Candida* spp. utilizam essas moléculas na degradação da hemoglobina, facilitando a recuperação de ferro elementar das células hospedeiras (MANNIS et al., 1994; WATANABE et al., 1999; LUO et al., 2004). *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* são todas capazes de produzir hemolisinas *in vitro*, induzindo a lise parcial ou total dos eritrócitos, embora isso seja dependente da espécie e da cepa (LUO et al., 2004).

A forma de crescimento do fungo também influencia na sua patogenicidade e capacidade de invasão do tecido hospedeiro (CULLEN; SPRAGUE, 2012). Observa-se em *C. albicans* que a formação de hifas tem um papel importante na disseminação. Estudos *in vitro* mostraram que cepas não formadoras de hifas apresentaram menor capacidade de invasão do que cepas capazes de formar hifas (JAYATILAKE et al., 2006). *C. tropicalis* exibe formas morfológicas similares às de *C. albicans* e recentemente foi mostrado que somente as formas filamentosas daquela espécie são capazes de invadir o epitélio oral (SILVA et al., 2010). Em *C. parapsilosis* a transição para a forma filamentosa pode ocorrer dependentemente da cepa (ENGER et al., 2001).

1.2 INFECÇÕES FÚNGICAS CAUSADAS POR *Candida* spp.

Nas últimas três décadas ocorreu um aumento significativo na incidência e prevalência de infecções fúngicas invasivas, principalmente na população de pacientes imunossuprimidos e ou hospitalizados com doenças subjacentes graves (ARENDRUP et al., 2005; ESPINEL-INGROFF et al., 2009). Esse aumento pode ser consequência do próprio crescimento da população de imunossuprimidos (usuários de cateteres intravenosos, pacientes com câncer, receptores de transplantes, portadores do vírus HIV, neonatos prematuros, idosos e pacientes em recuperação

de cirurgias), mas também se relaciona diretamente com o uso disseminado de antimicrobianos, o que leva ao aumento da resistência dos patógenos aos medicamentos (RICHARDSON; LASS-FLÖRL, 2008; ORTEGA et al., 2011). Observa-se que esses fatores são resultantes uns dos outros, a susceptibilidade do hospedeiro a infecções microbianas derivada de outras doenças ou condições leva à necessidade do uso de antimicrobianos para controlar ou solucionar essa vulnerabilidade. Em consequência, ocorre o desenvolvimento de resistência dos microrganismos aos medicamentos mais utilizados, resultando em falha no tratamento e por isso aumento da ocorrência ou reincidência das infecções.

Dentre os fungos patogênicos para o homem, membros do gênero *Candida* são os mais frequentes causadores de infecções, correspondendo a 80 % das invasivas e sendo a quarta causa mais comum de infecções da corrente sanguínea (COLOMBO et al., 2006; RUHNKE, 2006; ASMUNDSDOTTIR et al., 2008; HORN et al., 2009; AZIE et al., 2012; SILVA et al., 2012; MONTAGNA et al., 2013; NEOFYTOS et al., 2013). O gênero apresenta mais de 17 espécies diferentes capazes de causar infecções em humanos, porém, mais de 90 % das infecções invasivas são causadas por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (PFALLER et al., 2007). As infecções por *Candida* spp. são denominadas candidíases ou candidoses e podem se manifestar através de vários sinais clínicos, como o crescimento visível das leveduras em mucosas ou na pele (infecções superficiais) e a presença na corrente sanguínea (candidemia) ou atingindo órgãos (ambas infecções invasivas) (SARDI et al., 2013). Apesar da origem da maioria das infecções por *Candida* spp. ser endógena (microbiota do hospedeiro), também pode se originar de fontes exógenas, como instrumentos médicos ou os próprios profissionais da saúde (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

A candidemia geralmente é de difícil diagnóstico e tratamento e as taxas de mortalidade atribuíveis variam de 5 % a 71 %, enquanto as de mortalidade bruta chegam a 81 % (VISCOLI et al., 1999; ZAOUTIS et al., 2005; LEROY et al., 2009; HORN et al., 2009; BASSETTI et al., 2011; KETT et al., 2011; DE ROSA et al., 2012). No Brasil, a taxa de incidência desse tipo de infecção é bastante alta, variando de 1,27 – 2,49 por 1000 admissões, sendo que a incidência na América Latina como um todo é um pouco menor, estimada em 1,18 casos por 1000 admissões (COLOMBO et al., 2006; COLOMBO et al., 2007; FRANÇA et al., 2008; GIRÃO et al., 2008; MOTTA et al., 2010; PEREIRA et al., 2010; NUCCI et al., 2013).

Nos Estados Unidos e em vários países europeus as taxas de incidência são menores, variando de 0,28 – 0,96 e 0,02 – 1,08 casos por 1000 admissões, respectivamente (HAJJEH et al., 2004; TORTORANO et al., 2004, ALMIRANTE et al., 2005; ZILBERBERG et al., 2008; POIKONEN et al., 2010; ARENDRUP et al., 2011; DAS et al., 2011). Essas discrepâncias podem estar relacionadas aos recursos disponíveis para tratamento, treinamento de profissionais e nas dificuldades na implementação de programas de controle de infecções em hospitais nos países em desenvolvimento, desse modo, é ainda mais preocupante o quadro epidemiológico dessas infecções nesses países (NUCCI et al., 2010).

Dados obtidos pelo ARTEMIS (*Global Antifungal Surveillance Program*) mostraram que *C. albicans* é o agente causal mais comum de infecções sistêmicas e sanguíneas causadas por *Candida* spp., seguido por *C. glabrata* (44 %), *C. tropicalis* (6 %) e *C. parapsilosis* (5 %) (PFALLER et al., 2007). *C. albicans* continua sendo a mais frequentemente isolada de infecções, porém causa aproximadamente apenas 50 % dos casos de candidemia (COLOMBO et al., 2003; PFALLER; DIEKEMA, 2004; TORTORANO et al., 2004; PFALLER et al., 2007; DIEKEMA et al., 2012). Existem diferenças epidemiológicas significantes em regiões geográficas distintas, a proporção de candidemia causada por *C. albicans* varia de 37 % na América Latina até 70 % nos países nórdicos (SANDVEN et al., 2006; POIKONEN et al., 2010; NUCCI et al., 2013). A distribuição entre as outras espécies também é variável dependendo da região, na Europa e América do Norte a segunda mais frequente é *C. glabrata*, enquanto *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* são mais comuns na América Latina e Ásia-Pacífico (PFALLER et al., 2011; NUCCI et al., 2013).

Além dessas, outras espécies vêm sendo isoladas tanto de pessoas saudáveis como de pacientes. *C. dubliniensis* normalmente é encontrada em combinação com outras espécies, principalmente com *C. albicans* e é presente em ambientes humanos e não-humanos, sendo possível a transmissão entre hospedeiros (SULLIVAN et al., 2004; NUNN et al., 2007; LORETO et al., 2010; KHAN et al., 2012). Dentre as principais espécies de *Candida* responsáveis por causar candidemia, *C. krusei* apresenta a menor proporção de isolados, variando de 0,81 % na Ásia-Pacífico até 3,3 % na América do Norte (PFALLER et al., 2013). Essa espécie é intrinsecamente resistente ao fluconazol e causa infecções fortemente relacionadas à profilaxia anterior com este fármaco e neutropenia (SARDI et al., 2013).

1.3. PRINCIPAIS ANTIFÚNGICOS E RESISTÊNCIA

O controle e tratamento de infecções fúngicas são limitados por alguns fatores como a segurança e a eficiência dos medicamentos antifúngicos disponíveis, além da resistência dos patógenos aos tratamentos (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006). Como fungos são organismos eucariotos, eles utilizam os mesmos mecanismos de síntese de proteínas e ácidos nucleicos que as células animais (TORTORA et al., 2005). Desse modo, o controle da toxicidade para as células animais é dificultado devido a algumas características compartilhadas com as células fúngicas. A toxicidade seletiva depende do alvo de ação do antifúngico, a maioria deles interfere com a biossíntese ou integridade do ergosterol (principal esteroide da membrana celular fúngica), enquanto outros afetam a parede celular, síntese proteica e de ácidos nucleicos. Com base na estrutura química, os antifúngicos são agrupados em cinco classes: polienos, azóis, alilaminas, equinocandinas e outros agentes, como griseofulvina e flucitosina (GEORGOPAPADAKOU; WALSH, 1996; KAUFFMAN, 2004; CHEN; SORRELL, 2007).

Os azólicos são os medicamentos antifúngicos mais amplamente utilizados e agem primariamente pela inibição da enzima 14 α -demetilase (codificada pelo gene *ERG11*), do citocromo P450 fúngico (CHEN; SORRELL, 2007). A inibição dessa enzima resulta na diminuição da síntese do ergosterol, levando ao acúmulo de esteróides metilados. Estes por sua vez, previnem a 14- α demetilação do lanosterol em ergosterol (VANDEN BOSSCHE et al., 1995). Desse modo, os azóis bloqueiam a síntese do ergosterol, o principal componente das membranas celulares fúngicas (ANDRIOLE, 2000; SARMIENTO et al., 2011). Esse esteroide age como biorregulador da fluidez da membrana e sua integridade, logo, a intervenção na síntese desse componente resulta na inibição do crescimento fúngico por inviabilização da membrana celular (KATHIRAVAN et al., 2012). O fluconazol é um azólico de segunda geração (triazólico) e apresenta toxicidade reduzida em comparação aos imidazólicos (1^a geração), pois tem uma maior afinidade pelas enzimas do citocromo P450 fúngico do que pelas proteínas homólogas de mamíferos. Por esse motivo, os imidazólicos são limitados ao tratamento de micoses superficiais (revisado por CHEN; SORRELL, 2007).

O desenvolvimento dos antifúngicos triazólicos aumentou as opções para tratamento das infecções fúngicas e o fato de apresentarem toxicidade reduzida levou ao uso generalizado desses medicamentos. O fluconazol é eficaz no tratamento de todas as formas de infecções por *Candida*, mas a repetição e a longa duração da terapia levaram a um aumento na incidência de cepas resistentes, seguida de falha no tratamento (RUHNKE et al., 1994; LISCHEWSKI et al., 1995; REX et al., 1995; REX et al., 2001; PEREIRA et al., 2010). A resistência pode ser inerente, quando é presente sem exposição prévia ao antifúngico, ou pode ser adquirida, quando se desenvolve após um período de exposição ao agente (SILVA et al., 2012). Além de *C. krusei*, alguns isolados de *C. glabrata* também apresentam resistência inerente ao fluconazol, sendo que as outras espécies como *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* são normalmente sensíveis a esse antifúngico, podendo desenvolver uma resistência secundária (SARDI et al., 2013). Nota-se que casos de resistência aos azóis, principalmente ao fluconazol, em *Candida* spp. vêm aumentando muito na última década (TORTORANO et al., 2003; BRUN et al., 2004; VERMITSKY; EDLIND, 2004; YANG et al., 2004; PFALLER et al., 2009; PFALLER, 2012).

Os principais mecanismos pelos quais *Candida* spp. desenvolvem resistência aos azóis são por mutações ou superexpressão do gene *ERG11* e pelo efluxo do antifúngico por dois tipos de proteínas de efluxo codificadas pelos genes *MDR* e *CDR*. As mutações no gene *ERG11* levam a uma afinidade diminuída dos azóis pelo seu alvo, a enzima 14- α demetilase, e conseqüentemente à resistência. Esses mecanismos podem ocorrer separadamente ou combinados, contribuindo para a aquisição de resistência aos azóis (GHANNOUM; RICE, 1999; LUPETTI et al., 2002; MORSCHAÜSER, 2002; SANGLARD; ODDS, 2002, MacCALLUM et al., 2010).

Outros antifúngicos também agem na biossíntese do ergosterol, como as alilaminas (terbinafina e naftifina), porém inibindo enzimas e componentes da via de biossíntese diferentes daqueles que os derivados azólicos inibem (AKINS, 2005; GAUWERKY et al., 2009; VAN MINNEBRUGGEN et al., 2010). Os polienos (anfotericina B e a nistatina) formam um complexo com o ergosterol e rompem a membrana celular, resultando no aumento da permeabilidade e vazamento de conteúdo citoplasmático, levando à morte da célula fúngica. A anfotericina B exibe o maior espectro de atividade dentre os antifúngicos disponíveis, porém apresenta alta toxicidade por ser pouco seletiva, atingindo tanto o ergosterol da célula fúngica como

o colesterol das células animais (BARKER; ROGERS, 2006; CANNON et al., 2009; KATHIRAVAN et al., 2012; VANDEPUTTE et al., 2012).

A classe mais recente de antifúngicos utilizada clinicamente é a das equinocandinas. Existem três fármacos dessa classe disponíveis para uso clínico, a caspofungina, micafungina e anidulafungina (BAL, 2010). A mais utilizada é a caspofungina, a qual é disponível somente na forma intravenosa (DERESINSKI e STEVENS, 2003). O mecanismo de ação desses antifúngicos inclui a inibição da β -1,3-D glucana sintase, a qual produz um componente importante da parede celular de muitos fungos patogênicos como *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. (CANNON et al., 2009; BAYEGAN et al., 2010; KUCHARÍNOVÁ et al., 2010). Essa inibição leva a ruptura da estrutura da parede celular, resultando em instabilidade osmótica e morte das células fúngicas (RIPEAU et al., 2002). Alguns antifúngicos não estão incluídos em nenhuma classe como a flucitosina, uma pirimidina fluorinada que tem ação antifúngica por interferir no metabolismo das pirimidinas e na síntese de DNA, RNA e de proteínas (VERMES et al., 2000; BARKER; ROGERS, 2006; ABACI; HALIKI-UZTAN, 2011). Esse antifúngico não deve ser administrado como único agente devido ao rápido desenvolvimento de resistência, normalmente é combinado com anfotericina B e fluconazol (SAAG et al., 2000; VERMES et al., 2000). A griseofulvina, utilizada somente contra fungos dermatófitos, interfere com a produção intracelular de microtúbulos, inibindo a mitose da célula fúngica. Esse composto possui toxicidade seletiva moderada, podendo levar a comprometimento hepático do paciente (FRANK, 2003; WOYKE et al., 2004; GAUWERKY et al., 2009; DENNING; HOPE, 2010).

O tratamento de infecções fúngicas continua sendo complicado, devido à toxicidade dos fármacos disponíveis, à pouca variedade de antifúngicos e ao aumento da resistência aos medicamentos clássicos mais utilizados, como os derivados azólicos. Desse modo, é de extrema necessidade o desenvolvimento de novos antifúngicos com eficácia melhorada e menor toxicidade (SARDI et al., 2011).

1.4 NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A nanotecnologia é um campo emergente da ciência com extensa aplicabilidade nas disciplinas de eletrônica, nanomedicina, aeronáutica, biomateriais e energia, cosméticos e alimentos (BHATTACHARYYA et al., 2009). Inicialmente foi

apresentada por Richard Feynman, do Instituto Americano de Tecnologia em 1959. O termo “nano” refere-se ao tamanho das partículas (10^{-9} m), que comumente possuem de 0,1 a 1000 nm em cada dimensão espacial (NARAYANAN; SAKTHIVEL, 2010).

As nanopartículas metálicas como de prata, ouro e platina estão sendo intensivamente estudadas na última década e se mostram úteis em metodologias diagnósticas, na terapêutica antimicrobiana e também como dispositivos de entrega de medicamentos e genes (BHOWMIK et al., 2010; CHAUHAN et al., 2013). Esses materiais nanométricos vêm despertando o interesse dos pesquisadores tanto na ciência básica, como na aplicada devido às suas propriedades singulares, se comparados com os materiais a granel. As propriedades óticas, termais, elétricas, químicas, físicas, mecânicas, magnéticas e biológicas derivam do tamanho maior de superfície do átomo, grande energia de superfície e imperfeições reduzidas (NARAYANAN; SAKTHIVEL, 2010; THAKKAR et al., 2010; ZAHMAKIRAN; ÖZKAR, 2011; DESIREDDY et al., 2013).

Nanopartículas metálicas podem ser obtidas por métodos químicos, físicos ou biológicos, no entanto, os métodos químicos contêm vários inconvenientes como o uso de solventes tóxicos, a geração de subprodutos perigosos e o alto consumo de energia, os quais apresentam riscos potenciais à saúde humana e ao meio-ambiente (WHITESIDES, 2003; DURÁN et al., 2010). Ultimamente, a alternativa que vem sendo adotada pelos pesquisadores para subtrair tais problemas é a fabricação dessas partículas através da utilização de organismos vivos, como fungos, bactérias e até mesmo plantas. Já foi reportada a produção de nanopartículas de prata, ouro, platina e paládio a partir de bactérias como *Bacillus licheniformis*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas stutzeri* e fungos como *Fusarium semitactum*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus sp.*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus* (AHMAD et al., 2003; BHAINSA; SOUZA et al., 2006; VIGNESHWARAM et al., 2007; BASAVARAJA et al., 2008; KALIMUTHU et al., 2008; BHAMBURE et al., 2009; KUMAR; YADAV, 2009; NANDA; SARAVANAN, 2009; GOVINDARAJU et al., 2010; JAIN et al., 2011; LI et al., 2011; ZHANG et al., 2011). A síntese biológica de nanopartículas provou ser livre de limitações associadas à produção de subprodutos danosos e, além disso, consiste num procedimento simples e de baixo custo (GADE et al., 2010).

A prata é um dos metais que vêm sendo mais difundidos na pesquisa e confecção de nanopartículas. O uso deste metal na terapêutica de enfermidades vem sendo descrito desde o século XV aproximadamente. Utilizava-se o nitrato de prata para o tratamento de úlceras nos séculos XVII e XVIII e no século XIX para terapia e prevenção de infecções microbianas, principalmente em queimaduras. Com o surgimento da penicilina o uso da prata foi reduzido, porém o aparecimento de microrganismos resistentes aos fármacos convencionais despertou novamente o interesse na ação antimicrobiana deste metal (KLASEN, 2000a; KLASEN, 2000b; SILVER, 2003; HWANG et al., 2012). A prata em sua forma iônica apresenta uma desvantagem, os íons podem ser facilmente inativados por complexação e precipitação, por esse motivo o uso nessa forma foi bastante limitado. Já as nanopartículas de prata (AgNPs) possuem um tamanho menor, maior proporção de área de superfície por volume e maior área de superfície disponível para contato com os microrganismos (MONTEIRO et al., 2009; MONTEIRO et al., 2013).

O mecanismo envolvido na biossíntese das AgNPs é associado com o potencial redutor de algumas proteínas fúngicas (AHMAD et al., 2003; VIGNESHWARAN et al., 2007). Os íons de prata são subsequentemente reduzidos às AgNPs por enzimas como naftoquinonas e antraquinonas. A nanopartícula utilizada neste trabalho foi obtida através de um procedimento biológico, utilizando o fungo *Fusarium oxysporum*, segundo o método de Durán e colaboradores (2005). Neste caso, a redução dos íons de prata ocorre extracelularmente, sendo uma quinona e uma redutase nitrato-ADP dependente as enzimas responsáveis pela reação (AHMAD et al., 2003).

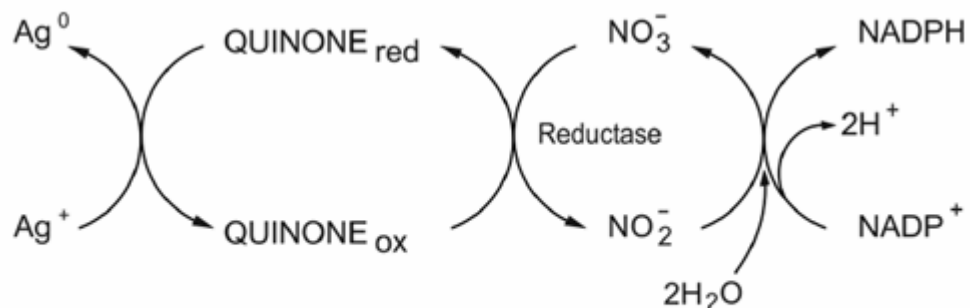


Figura 1 – Diagrama da formação de AgNPs por fungos (DURÁN et al., 2010)

A ação antimicrobiana das nanopartículas vem sendo extensamente estudada principalmente em bactérias patogênicas humanas, como *Escherichia coli* e *S.*

aureus. As AgNPs apresentam uma forte ação antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo cepas multiresistentes, sem no entanto apresentar efeitos agudos tóxicos em células humanas (MORONES et al., 2005; PANACEK et al., 2006; CARLSON et al., 2008; ASHARANI et al., 2009, AZAM et al., 2012). Além disso, já foi reportada sua ação antifúngica e antiviral (ROGERS et al., 2008; KIM et al., 2009). De acordo com os estudos realizados até o momento, infere-se que o mecanismo antibacteriano das AgNPs seria a interação com os grupos tióis do peptidoglicano, componente da parede celular bacteriana e das proteínas presentes na membrana celular, assim como ao fósforo encontrado na membrana e enzimas celulares. Além disso, a parede celular de fungos, enzimas e proteínas estruturais fúngicas e virais também são afetadas pelas nanopartículas (MOHANPURIA et al., 2008; LARA et al., 2010). Alguns fungos filamentosos e leveduriformes como *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *Fusarium solani*, *Trichopyton mentagrophytes*, *A. fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* mostram-se sensíveis ao tratamento com AgNPs (PANACEK et al., 2009; QIAN et al., 2013; XU et al., 2013; ISHIDA et al., 2013). Essas partículas provocam a formação de poros na membrana celular de *C. albicans*, levando à morte celular, mas pode ocorrer também a destruição da membrana plasmática e consequente interação com compostos contendo fósforo e enxofre, causando danos ao DNA e às proteínas (NASROLLAHI et al., 2011; KRISHNARAJ et al., 2013; KIM et al., 2012). Como resultado das interações com todos esses componentes celulares pode ocorrer perda do conteúdo intracelular e inibição das enzimas da cadeia respiratória, o que levaria à morte da célula. Ademais, devido à ligação ao DNA, a reprodução da célula também pode ser comprometida (MONTEIRO et al., 2009; RAI et al., 2009). Essa ação em múltiplos componentes celulares permite que as AgNPs possam agir contra um grande espectro de alvos microbianos e também faz com que seja mais difícil o surgimento de resistência, devido às várias mutações que seriam necessárias para desenvolvê-la (ALLAKER, 2010).

Além da ação antimicrobiana das AgNPs isoladas, muitos estudos recentes estão explorando combinações dessas nanopartículas com antibacterianos e antifúngicos já em uso no mercado (GAJBHIYE et al., 2009; SINGH et al., 2013; CHAUHAN et al., 2013; MONTEIRO et al., 2013; NAVQI et al., 2013.). A presença de AgNPs aumentou o efeito antibacteriano de tigeiclina, vancomicina, eritromicina e ofloxacina quando testados em *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp.,

S. aureus, *Shigella* sp., *Proteus mirabilis*, *Enterococci* sp. e *Klebsiella pneumoniae* (CHAUHAN et al., 2013). Outros antibacterianos como imipinem, gentamicina e ciprofloxacino também apresentaram ação sinérgica com as AgNPs, aumentando de 20 – 30 % a sensibilidade de amostras de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Bacillus* spp. e *Micrococcus luteus* a esses medicamentos (NAQVI et al., 2013). Existem poucos estudos abordando a combinação de AgNPs com antifúngicos contra *Candida* spp. e a maior parte deles testou a combinação somente em *C. albicans* (GAJBHIYE et al., 2009; SINGH et al., 2013). Já o estudo de Monteiro e colaboradores (2013) apresenta uma abordagem distinta, mostrando a associação entre AgNPs e antifúngicos como nistatina e o antisséptico digluconato de clorexidina contra biofilmes formados por isolados clínicos de *C. glabrata* e *C. albicans*. Portanto, são necessários mais estudos sobre a combinação de AgNPs com antifúngicos, principalmente em relação a amostras resistentes aos agentes mais difundidos na prática clínica. Dessa maneira, a exposição dos fungos a esses medicamentos pode ser diminuída, aumentando a eficácia do tratamento e reduzindo sua toxicidade.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antifúngico de nanopartículas de prata (AgNP_{bio}) contra as principais espécies de *Candida* patogênicas para humanos e também sua associação com fluconazol (FLC) contra amostras de *Candida* spp. resistentes ao antifúngico.

2.1.1. Objetivos Específicos

Estabelecer o perfil de sensibilidade das amostras de *Candida* spp. ATCC ao FLC e à AgNP_{bio} através do método de microdiluição em caldo, determinando-se a concentração mínima inibitória (CIM);

Avaliar os resultados da associação de AgNP_{bio} com este antifúngico através do ensaio de “checkerboard” com as amostras resistentes selecionadas e com dois isolados clínicos também resistentes e determinar se houve sinergismo, aditismo, indiferença ou antagonismo;

Analisar a natureza (fungistática ou fungicida) e os efeitos da ação antifúngica da AgNP_{bio} e da associação com FLC através do ensaio de curva de morte e microscopia de fluorescência;

Avaliar os efeitos da AgNP_{bio} isolada e em associação com FLC sobre biofilmes formados por *Candida albicans* resistente ao FLC.

REFERÊNCIAS

- ABACI, O.; HALIKI-UZTAN, A. Investigation of susceptibility of *Candida* species isolated from denture wearers to different antifungal antibiotics. **Afr J Microbiol Res**, v. 5, p. 1398-1403, 2011.
- AHMAD, A. et al. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. **Coll Surf B Biointer**, v. 28, p. 313–18, 2003.
- AKINS, R. A. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. **Med Mycol**, v. 43, n. 4, p. 285-318, Jun 2005.
- AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **J Med Microbiol**, v. 55, n. Pt 8, p. 999-1008, Aug 2006.
- ALLAKER, R. P. The use of nanoparticles to control oral biofilm formation. **J Dent Res**, v. 89, n. 11, p. 1175-86, Nov 2010.
- ALMIRANTE, B. et al. Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 4, p. 1829-35, Apr 2005.
- ANDRIOLE, V. T. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal therapy. **Int J Antimicrob Agents**, v. 16, n. 3, p. 317-21, Nov 2000.
- ARENDRUP, M. C. et al. National surveillance of fungemia in Denmark (2004 to 2009). **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 1, p. 325-34, Jan 2011.
- _____. Seminal surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 9, p. 4434-40, Sep 2005.
- ASHARANI, P. V. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. **ACS Nano**, v. 3, n. 2, p. 279-90, Feb 2009.
- ASMUNDSDÓTTIR, L. R. et al. Molecular epidemiology of candidemia: evidence of clusters of smoldering nosocomial infections. **Clin Infect Dis**, v. 47, n. 2, p. e17-24, Jul 2008.
- AZAM, A. et al. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. **Int J Nanomedicine**, v. 7, p. 6003-9, 2012.
- AZIE, N. et al. The PATH (Prospective Antifungal Therapy) Alliance® registry and invasive fungal infections: update 2012. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 73, n. 4, p. 293-300, Aug 2012.
- BAL, A. M. The echinocandins: three useful choices or three too many? **Int J Antimicrob Agents**, v. 35, n. 1, p. 13-8, Jan 2010.

BARKER, K. S.; ROGERS, P. D. Recent insights into the mechanisms of antifungal resistance. **Curr Infect Dis Rep**, v. 8, n. 6, p. 449-56, Nov 2006.

BASAVARAJA, S. et al. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum*. **Mater Res Bull**, v. 43, p. 1164–70, 2008.

BASSETTI, M. et al. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility and outcome of nosocomial candidemia in a tertiary care hospital in Italy. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24198, 2011.

BAYEGAN, S. et al. In vivo studies with a *Candida tropicalis* isolate exhibiting paradoxical growth in vitro in the presence of high concentration of caspofungin. **J Microbiol**, v. 48, n. 2, p. 170-3, Apr 2010.

BHAINSA, K. C.; D'SOUZA, S. F. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 47, n. 2, p. 160-4, Feb 2006.

BHAMBURE, R. et al. Extracellular biosynthesis of gold nanoparticles using *Aspergillus niger* – its characterization and stability. **Chem Eng and Technol**, v. 32, p. 1036–41, Jul 2009.

BHATTACHARYYA, D. et al. Nanotechnology, big things from a tiny world: a review. **Int J u- and e-Serv Sci Technol**, v. 2, p. 29–38, 2009.

BHOWMIK, D. et al. Nanomedicine—an overview. **Inter J of PharmTech Res**, v. 2 p. 2143–51, 2010.

BLANKENSHIP, J. R.; MITCHELL, A. P. How to build a biofilm: a fungal perspective. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, n. 6, p. 588-94, Dec 2006.

BRUN, S. et al. Mechanisms of azole resistance in petite mutants of *Candida glabrata*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 5, p. 1788-96, May 2004.

BUTLER, G. et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. **Nature**, v. 459, n. 7247, p. 657-62, Jun 2009.

CAFARCHIA, C. et al. Phospholipase activity of yeasts from wild birds and possible implications for human disease. **Med Mycol**, v. 46, n. 5, p. 429-34, Aug 2008.

CALDERONE, R. A. **Candida and Candidiasis**. Washington, DC: ASM Press, 2002.

CANNON, R. D. et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. **Clin Microbiol Rev**, v. 22, n. 2, p. 291-321, Table of Contents, Apr 2009.

CARLSON, C. et al. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. **J Phys Chem B**, v. 112, n. 43, p. 13608-19, Oct 2008.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J. et al. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Rev**

Esp Quimioter, v. 19, n. 2, p. 130-9, Jun 2006.

CHAUHAN, R.; KUMAR, A.; ABRAHAM, J. A Biological Approach to the Synthesis of Silver Nanoparticles with *Streptomyces* sp JAR1 and its Antimicrobial Activity. **Sci Pharm**, v. 81, n. 2, p. 607-21, Jun 2013.

CHEN, S. C.; SORRELL, T. C. Antifungal agents. **Med J Aust**, v. 187, n. 7, p. 404-9, Oct 2007.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003 Sep-Oct 2003.

COLOMBO, A. L. et al. Global distribution and outcomes for *Candida* species causing invasive candidiasis: results from an international randomized double-blind study of caspofungin versus amphotericin B for the treatment of invasive candidiasis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 22, p. 470–74, Aug 2003.

_____. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 28, n. 5, p. 570-6, May 2007.

_____. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 8, p. 2816-23, Aug 2006.

CULLEN, P. J.; SPRAGUE, G. F. The regulation of filamentous growth in yeast. **Genetics**, v. 190, n. 1, p. 23-49, Jan 2012.

DAS, I. et al. Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia: experience in a tertiary referral center in the UK. **Int J Infect Dis**, v. 15, n. 11, p. e759-63, Nov 2011.

DE BERNARDIS, F. et al. Evidence that members of the secretory aspartyl proteinase gene family, in particular SAP2, are virulence factors for *Candida* vaginitis. **J Infect Dis**, v. 179, n. 1, p. 201-8, Jan 1999.

DE ROSA, F. G. et al. Mortality in patients with early- or late-onset candidaemia. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 4, p. 927-35, Apr 2013.

DENNING, D. W.; HOPE, W. W. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. **Trends Microbiol**, v. 18, n. 5, p. 195-204, May 2010.

DERESINSKI, S. C.; STEVENS, D. A. Caspofungin. **Clin Infect Dis**, v. 36, n. 11, p. 1445-57, Jun 2003.

DESIREDDY, A. et al. Ultrastable silver nanoparticles. **Nature**, v. 501, n. 7467, p. 399-402, Sep 2013.

DIEKEMA, D. et al. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 73, n. 1, p. 45-8, May 2012.

DOUGLAS, L. J. *Candida biofilms* and their role in infection. **Trends Microbiol**, v. 11, n. 1, p. 30-6, Jan 2003.

DURÁN, N. et al. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **J Nanobiotechnology**, v. 3, p. 8, 2005.

_____. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. **J Braz Chem Soc**, v. 21, p. 949-59, 2010.

ENGER, L. et al. Cloning and characterization of a complex DNA fingerprinting probe for *Candida parapsilosis*. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 2, p. 658-69, Feb 2001.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. Comparison of 24-hour and 48-hour voriconazole MICs as determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution method (M27-A3 document) in three laboratories: results obtained with 2,162 clinical isolates of *Candida* spp. and other yeasts. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 9, p. 2766-71, Sep 2009.

FRANÇA, J. C.; RIBEIRO, C. E.; QUEIROZ-TELLES, F. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: incidence, frequency of different species, risk factors and antifungal susceptibility. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 1, p. 23-8, 2008 Jan-Feb 2008.

FRANK, O. Antifungal agents: their diversity and increasing sophistication. **Mycolog**, v. 17, p. 51-55, 2003.

FU, Y. et al. Cloning and characterization of a gene (*LIP1*) which encodes a lipase from the pathogenic yeast *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 143 (Pt 2), p. 331-40, Feb 1997.

FURLANETO-MAIA, L. et al. *In vitro* evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of *Candida* spp. obtained from elderly healthy individuals. **Mycopathologia**, v. 166, n. 4, p. 209-17, Oct 2008.

GÁCSEK, A. et al. Targeted gene deletion in *Candida parapsilosis* demonstrates the role of secreted lipase in virulence. **J Clin Invest**, v. 117, n. 10, p. 3049-58, Oct 2007.

GADE, A. et al. Mycogenic metal nanoparticles: progress and applications. **Biotechnol Lett**, v. 32, n. 5, p. 593-600, May 2010.

GAJBHIYE, M. et al. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. **Nanomedicine**, v. 5, n. 4, p. 382-6, Dec 2009.

GALÁN-LADERO, M. A. et al. Enzymatic activities of *Candida tropicalis* isolated from hospitalized patients. **Med Mycol**, v. 48, n. 1, p. 207-10, Feb 2010.

GAUWERKY, K.; BORELLI, C.; KORTING, H. C. Targeting virulence: a new paradigm for antifungals. **Drug Discov Today**, v. 14, n. 3-4, p. 214-22, Feb 2009.

GEORGOPAPADAKOU, N. H.; WALSH, T. J. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 40, n. 2, p. 279-91, Feb 1996.

GHANNOUM, M. A. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin Microbiol Rev**, v. 13, n. 1, p. 122-43, table of contents, Jan 2000.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clin Microbiol Rev**, v. 12, n. 4, p. 501-17, Oct 1999.

GIRÃO, E. et al. Seven-year trend analysis of nosocomial candidemia and antifungal (fluconazole and caspofungin) use in Intensive Care Units at a Brazilian University Hospital. **Med Mycol**, v. 46, n. 6, p. 581-8, Sep 2008.

GOVINDARAJU, K. et al. Biogenic silver nanoparticles by *Solanum torvum* and their promising antimicrobial activity. **J Biopest**, v. 3, p. 394-99, 2010.

HAJJEH, R. A. et al. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 4, p. 1519-27, Apr 2004.

HORN, D. L. et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. **Clin Infect Dis**, v. 48, n. 12, p. 1695-703, Jun 2009.

HOYER, L. L. et al. Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-*albicans* *Candida* and phylogenetic analysis of the ALS family. **Genetics**, v. 157, n. 4, p. 1555-67, Apr 2001.

HWANG, I. S. et al. Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals. **FEBS J**, v. 279, n. 7, p. 1327-38, Apr 2012.

INGRAHAM, J. L.; INGRAHAM, C. A. Micro-organismos eucariontes, helmintos e vetores artrópodes. In: _____. **Introdução à microbiologia: uma abordagem baseada em estudos de casos**. 3 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010. p. 278-288.

ISHIDA, K. et al. Silver nanoparticle production by the fungus *Fusarium oxysporum*: nanoparticle characterization and analysis of antifungal activity against pathogenic yeasts. **Mem Ins Oswaldo Cruz**, p. 1-9, Sep 2013.

- JAIN, N. et al. Extracellular biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Aspergillus flavus* NJP08: a mechanism perspective. **Nanoscale**, v. 3, n. 2, p. 635-41, Feb 2011.
- JAYATILAKE, J. A. et al. Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and non-albicans *Candida* species in reconstituted human oral epithelium. **J Oral Pathol Med**, v. 35, n. 8, p. 484-91, Sep 2006.
- KALIMUTHU, K. et al. Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 65, n. 1, p. 150-3, Aug 2008.
- KANTARCIOGLU, A. S.; YÜCEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. **Mycoses**, v. 45, n. 5-6, p. 160-5, Jun 2002.
- KATHIRAVAN, M. K. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. **Bioorg Med Chem**, v. 20, n. 19, p. 5678-98, Oct 2012.
- KAUFFMAN, C. A. New antifungal agents. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 25, n. 2, p. 233-9, Apr 2004.
- KETT, D. H. et al. *Candida* bloodstream infections in intensive care units: analysis of the extended prevalence of infection in intensive care unit study. **Crit Care Med**, v. 39, n. 4, p. 665-70, Apr 2011.
- KHAN, Z. et al. *Candida dubliniensis*: an appraisal of its clinical significance as a bloodstream pathogen. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e32952, 2012.
- KIM, J.; SUDBERY, P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. **J Microbiol**, v. 49, n. 2, p. 171-7, Apr 2011.
- KIM, K. J. et al. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. **Biometals**, v. 22, n. 2, p. 235-42, Apr 2009.
- KIM, S. W. et al. Antifungal Effects of Silver Nanoparticles (AgNPs) against Various Plant Pathogenic Fungi. **Mycobiology**, v. 40, n. 1, p. 53-8, Mar 2012.
- KLASEN, H. J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. **Burns**, v. 26, n. 2, p. 131-8, Mar 2000a.
- _____. Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. **Burns**, v. 26, n. 2, p. 117-30, Mar 2000b.
- KOTHAVADE, R. J. et al. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **J Med Microbiol**, v. 59, n. Pt 8, p. 873-80, Aug 2010.

- KRISHNARAJ, C. et al. Optimization for rapid synthesis of silver nanoparticles and its effect on phytopathogenic fungi. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, v. 93, p. 95-9, Jul 2012.
- KUCHARÍKOVÁ, S. et al. In vivo efficacy of anidulafungin against mature *Candida albicans* biofilms in a novel rat model of catheter-associated Candidiasis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 10, p. 4474-5, Oct 2010.
- KUMAMOTO, C. A. *Candida* biofilms. **Curr Opin Microbiol**, v. 5, n. 6, p. 608-11, Dec 2002.
- KUMAR, V.; YADAV, S. K. Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 84, p. 151-57, Feb 2009.
- LARA, H. H. et al. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. **J Nanobiotechnology**, v. 8, p. 1, 2010.
- LEROY, O. et al. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). **Crit Care Med**, v. 37, n. 5, p. 1612-8, May 2009.
- LI, X.; YAN, Z.; XU, J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 149, n. Pt 2, p. 353-62, Feb 2003.
- LI, X. et al. Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. **J Nanomater**, v. 2011, p. 1-16, May 2011.
- LIM, C. S. et al. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, n. 1, p. 21-31, Jan 2012.
- LISCHEWSKI, A. et al. Molecular epidemiology of *Candida* isolates from AIDS patients showing different fluconazole resistance profiles. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 3, p. 769-71, Mar 1995.
- LORETO, E. S. et al. *Candida dubliniensis*: epidemiology and phenotypic methods for identification. **Mycopathologia**, v. 169, n. 6, p. 431-43, Jun 2010.
- LUO, G. et al. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of HLP gene expression in *Candida glabrata* and its possible role in in vitro haemolysin production. **APMIS**, v. 112, n. 4-5, p. 283-90, 2004 Apr-May 2004.
- LUPETTI, A. et al. Molecular basis of resistance to azole antifungals. **Trends Mol Med**, v. 8, n. 2, p. 76-81, Feb 2002.
- MACCALLUM, D. M. et al. Genetic dissection of azole resistance mechanisms in *Candida albicans* and their validation in a mouse model of disseminated infection. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 4, p. 1476-83, Apr 2010.
- MANNS, J. M.; MOSSER, D. M.; BUCKLEY, H. R. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. **Infect Immun**, v. 62, n. 11, p. 5154-6, Nov 1994.

MARTINEZ, L. R.; FRIES, B. C. Fungal biofilms: relevance in the setting of human disease. **Curr Fungal Infect Rep**, v. 4, p. 266–275, Dec 2010.

MERKEROVÁ, M. et al. Cloning and characterization of Sapp2p, the second aspartic proteinase isoenzyme from *Candida parapsilosis*. **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 7, p. 1018-26, Nov 2006.

MOHANPURIA, P.; RANA, N. K.; YADAV, S. K. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. **J. Nanoparticle Res**, v. 10, n. 3, p. 507-517, Mar 2008.

MONTAGNA, M. T. et al. Epidemiology of invasive fungal infections in the intensive care unit: results of a multicenter Italian survey (AURORA Project). **Infection**, v. 41, n. 3, p. 645-53, Jun 2013.

MONTEIRO, D. R. et al. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. **Int J Antimicrob Agents**, v. 34, n. 2, p. 103-10, Aug 2009.

_____. Antifungal activity of silver nanoparticles in combination with nystatin and chlorhexidine digluconate against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. **Mycoses**, v. 56, n. 6, p. 672-80, Nov 2013.

MORONES, J. R. et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 10, p. 2346-53, Oct 2005.

MORSCHHÄUSER, J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1587, n. 2-3, p. 240-8, Jul 2002.

MOTTA, A. L. et al. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. **Braz J Infect Dis**, v. 14, n. 5, p. 441-8, 2010 Sep-Oct 2010.

NANDA, A.; SARAVANAN, M. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. **Nanomedicine**, v. 5, n. 4, p. 452-6, Dec 2009.

NAQVI, S. Z. et al. Combined efficacy of biologically synthesized silver nanoparticles and different antibiotics against multidrug-resistant bacteria. **Int J Nanomedicine**, v. 8, p. 3187-95, 2013.

NASROLLAHI, A.; POURSHAMSIAN, K.; MANSOURKIAEE, P. Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi. **Int J Nano Dim**, v. 1, n. 3, p. 233-239, Jan 2011.

NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. **Adv Colloid Interface Sci**, v. 156, n. 1-2, p. 1-13, Apr 2010.

NEGRI, M. et al. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. **Mycopathologia**, v. 169, n. 3, p. 175-82, Mar 2010.

_____. *Candida tropicalis* biofilms: artificial urine, urinary catheters and flow model. **Med Mycol**, v. 49, n. 7, p. 739-47, Oct 2011.

NEOFYTOS, D. et al. Epidemiology, outcomes, and risk factors of invasive fungal infections in adult patients with acute myelogenous leukemia after induction chemotherapy. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 75, n. 2, p. 144-9, Feb 2013.

NUCCI, M. et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e59373, 2013.

_____. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clin Infect Dis**, v. 51, n. 5, p. 561-70, Sep 2010.

NUNN, M. A. et al. Environmental source of *Candida dubliniensis*. **Emerg Infect Dis**, v. 13, n. 5, p. 747-50, May 2007.

OKAWA, Y.; MIYAUCHI, M.; KOBAYASHI, H. Comparison of pathogenicity of various *Candida tropicalis* strains. **Biol Pharm Bull**, v. 31, n. 8, p. 1507-10, Aug 2008.

ORTEGA, M. et al. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. **J Hosp Infect**, v. 77, n. 2, p. 157-61, Feb 2011.

PANACEK, A. et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. **J Phys Chem B**, v. 110, n. 33, p. 16248-53, Aug 2006.

PANÁČEK, A. et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. **Biomaterials**, v. 30, n. 31, p. 6333-40, Oct 2009.

PEREIRA, G. H. et al. Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*C. albicans* *Candida* species. **Med Mycol**, v. 48, n. 6, p. 839-42, Sep 2010.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **Am J Med**, v. 125, n. 1 Suppl, p. S3-13, Jan 2012.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 10, p. 4419-31, Oct 2004.

_____. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 1, p. 133-63, Jan 2007.

_____. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 9, p. 2846-56, Sep 2012.

PFALLER, M. A. et al. Comparison of results of fluconazole and voriconazole disk diffusion testing for *Candida* spp. with results from a central reference laboratory in the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Program. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 65, n. 1, p. 27-34, Sep 2009.

_____. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 6, p. 1735-45, Jun 2007.

_____. Echinocandin and triazole antifungal susceptibility profiles for clinical opportunistic yeast and mold isolates collected from 2010 to 2011: application of new CLSI clinical breakpoints and epidemiological cutoff values for characterization of geographic and temporal trends of antifungal resistance. **J Clin Microbiol**, v. 51, p. 2571–81, Aug 2013.

_____. Geographic variations in species distribution and echinocandin and azole antifungal resistance rates among *Candida* bloodstream infection isolates: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008 to 2009). **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 1, p. 396-9, Jan 2011.

PICHOVÁ, I. et al. Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. **Eur J Biochem**, v. 268, n. 9, p. 2669-77, May 2001.

POIKONEN, E. et al. Secular trend in candidemia and the use of fluconazole in Finland, 2004-2007. **BMC Infect Dis**, v. 10, p. 312, 2010.

QIAN, Y. et al. Biosynthesis of silver nanoparticles by the endophytic fungus *Epicoccum nigrum* and their activity against pathogenic fungi. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 36, n. 11, p. 1613-9, Nov 2013.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnol Adv**, v. 27, n. 1, p. 76-83, 2009 Jan-Feb 2009.

REX, J. H. et al. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clin Microbiol Rev**, v. 14, n. 4, p. 643-58, table of contents, Oct 2001.

REX, J. H.; RINALDI, M. G.; PFALLER, M. A. Resistance of *Candida* species to fluconazole. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 1, p. 1-8, Jan 1995.

RICHARDSON, M.; LASS-FLÖRL, C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. **Clin Microbiol Infect**, v. 14 Suppl 4, p. 5-24, May 2008.

RIPEAU, J. S. et al. Effect of the echinocandin caspofungin on expression of *Candida albicans* secretory aspartyl proteinases and phospholipase *in vitro*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 9, p. 3096-100, Sep 2002.

ROGERS, J. V. et al. A preliminary assessment of silver nanoparticle inhibition of monkeypox virus plaque formation. **Nanos Res Lett**, v. 3, p. 129–33, Apr 2008.

RUHNKE, M. Epidemiology of *Candida albicans* infections and role of non-*Candida-albicans* yeasts. **Curr Drug Targets**, v. 7, n. 4, p. 495-504, Apr 2006.

RUHNKE, M. et al. Emergence of fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* in patients with recurrent oropharyngeal candidosis and human immunodeficiency virus infection. **J Clin Microbiol**, v. 32, n. 9, p. 2092-8, Sep 1994.

SAAG, M. S. et al. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v. 30, n. 4, p. 710-8, Apr 2000.

SANDVEN, P. et al. Candidemia in Norway (1991 to 2003): results from a nationwide study. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 6, p. 1977-81, Jun 2006.

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **Lancet Infect Dis**, v. 2, n. 2, p. 73-85, Feb 2002.

SARDI, J. C.; ALMEIDA, A. M.; MENDES GIANNINI, M. J. New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites--a brief review. **Arch Oral Biol**, v. 56, n. 10, p. 951-9, Oct 2011.

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

SARMIENTO, G. P. et al. Synthesis and antifungal activity of some substituted phenothiazines and related compounds. **Eur J Med Chem**, v. 46, n. 1, p. 101-5, Jan 2011.

SCHALLER, M. et al. Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. **Mol Microbiol**, v. 34, n. 1, p. 169-80, Oct 1999.

SCHELENZ, S. Management of candidiasis in the intensive care unit. **J Antimicrob Chemother**, v. 61 Suppl 1, p. i31-4, Jan 2008.

SHIN, J. H. et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 4, p. 1244-8, Apr 2002.

SILVA, S. et al. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. **Med Mycol**, v. 47, n. 7, p. 681-9, Nov 2009.

_____. The role of secreted aspartyl proteinases in *Candida tropicalis* invasion and damage of oral mucosa. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 2, p. 264-72, Feb 2011a.

_____. Silicone colonization by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine. **J Med Microbiol**, v. 59, n. Pt 7, p. 747-54, Jul 2010.

_____. Adherence and biofilm formation of *non-Candida albicans Candida* species. **Trends Microbiol**, v. 19, n. 5, p. 241-7, May 2011b.

_____. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, n. 2, p. 288-305, Mar 2012.

SILVER, S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. **FEMS Microbiol Rev**, v. 27, n. 2-3, p. 341-53, Jun 2003.

SINGH, R. et al. Synthesis, optimization, and characterization of silver nanoparticles from *Acinetobacter calcoaceticus* and their enhanced antibacterial activity when combined with antibiotics. **Int J Nanomedicine**, v. 8, p. 4277-90, 2013.

SOLL, D. R. *Candida* biofilms: is adhesion sexy? **Curr Biol**, v. 18, p. 717–720, Aug 2008.

STEFFAN, P. et al. Identification of *Candida* species by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting of colony lysates. **J Clin Microbiol**, v. 35, n. 8, p. 2031-9, Aug 1997.

SULLIVAN, D. J. et al. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. **FEMS Yeast Res**, v. 4, n. 4-5, p. 369-76, Jan 2004.

THAKKAR, K. N.; MHATRE, S. S.; PARIKH, R. Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. **Nanomed Nanotech Biol Med**, v. 6, n. 2, p. 257-62, Apr 2010.

TOGNI, G. et al. Isolation and nucleotide sequence of the extracellular acid protease gene (ACP) from the yeast *Candida tropicalis*. **FEBS Lett**, v. 286, n. 1-2, p. 181-5, Jul 1991.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Drogas antimicrobianas. In: _____. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 559-585.

TORTORANO, A. M. et al. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 23, n. 4, p. 317-22, Apr 2004.

_____. The European Confederation of Medical Mycology (ECMM) survey of candidaemia in Italy: antifungal susceptibility patterns of 261 non-albicans *Candida* isolates from blood. **J Antimicrob Chemother**, v. 52, n. 4, p. 679-82, Oct 2003.

VAN BURIK, J. A.; MAGEE, P. T. Aspects of fungal pathogenesis in humans. **Annu Rev Microbiol**, v. 55, p. 743-72, 2001.

VANDEN BOSSCHE, H.; KOYMANS, L.; MOEREELS, H. P450 inhibitors of use in medical treatment: focus on mechanisms of action. **Pharmacol Ther**, v. 67, n. 1, p. 79-100, 1995.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **Int J Microbiol**, v. 2012, p. 713687, 2012.

VAN MINNEBRUGGEN, G. et al. A general overview on past, present and future antimycotics. **Open Mycol J**, v. 4 p. 22-32, 2010.

VERMES, A.; GUCHELAAR, H. J.; DANKERT, J. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. **J Antimicrob Chemother**, v. 46, n. 2, p. 171-9, Aug 2000.

VERMITSKY, J. P.; EDLIND, T. D. Azole resistance in *Candida glabrata*: coordinate upregulation of multidrug transporters and evidence for a Pdr1-like transcription factor. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 10, p. 3773-81, Oct 2004.

VIGNESHWARAN, N. et al. Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. **Mater Lett**, v. 61, p. 1413–18, Mar 2007.

VISCOLI, C. et al. Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). **Clin Infect Dis**, v. 28, n. 5, p. 1071-9, May 1999.

WATANABE, T. et al. Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 145 (Pt 3), p. 689-94, Mar 1999.

WHITESIDES, G. M. The 'right' size in nanobiotechnology. **Nat Biotechnol**, v. 21, n. 10, p. 1161-5, Oct 2003.

WOYKE, T. et al. Differential gene expression in auristatin PHE-treated *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 2, p. 561-7, Feb 2004.

XU, Y. et al. In vitro antifungal activity of silver nanoparticles against ocular pathogenic filamentous fungi. **J Ocul Pharmacol Ther**, v. 29, n. 2, p. 270-4, Mar 2013.

YANG, Y. L. Virulence factors of *Candida* species. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 36, n. 4, p. 223-8, Dec 2003.

YANG, Y. L. et al. Susceptibilities of *Candida* species to amphotericin B and fluconazole: the emergence of fluconazole resistance in *Candida tropicalis*. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 25, n. 1, p. 60-4, Jan 2004.

ZAHMAKIRAN, M.; OZKAR, S. Metal nanoparticles in liquid phase catalysis; from recent advances to future goals. **Nanoscale**, v. 3, n. 9, p. 3462-81, Sep 2011.

ZAOUTIS, T. E. et al. The epidemiology and attributable outcomes of candidemia in adults and children hospitalized in the United States: a propensity analysis. **Clin Infect Dis**, v. 41, n. 9, p. 1232-9, Nov 2005.

ZAUGG, C. et al. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. **Infect Immun**, v. 69, n. 1, p. 405-12, Jan 2001.

ZHANG, X. et al. Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. **Chemosphere**, v. 82, n. 4, p. 489-94, Jan 2011.

ZILBERBERG, M. D.; SHORR, A. F.; KOLLEF, M. H. Secular trends in candidemia-related hospitalization in the United States, 2000-2005. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 29, n. 10, p. 978-80, Oct 2008.

ARTIGO

O artigo apresentado abaixo será submetido à revista “*Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*”, a qual aceita as seguintes modalidades de artigos: *Communications, Original Articles, Reviews, Perspectives, Technical and Commercialization Notes, Letters to the Editor and Case Studies*, sendo o presente trabalho categorizado como “*Communication*”.

As orientações da revista para este tipo de artigo são as seguintes:

“Communications are to disseminate new observations quickly to the scientific community. Length of communications should not exceed 1.200 words (including body text, and figure legends), and the article should have no more than 4 figures. No more than 20 references should be cited. Include an Abstract of 150 words or less without internal subheadings” (Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2014).

Association of silver nanoparticles with fluconazole increases the antifungal effects against *Candida albicans* resistant isolates and biofilm

Carline Longhi, MSc^a, Alexandre Tadachi Morey, PhD^a, Jussevania Pereira Santos, MSc^a, Pollyana Myrella Capela dos Santos, MSc^a, Priscyla Daniely Marcato, PhD^b, Nelson Durán, PhD^c, Gerson Nakazato, PhD^d, Sueli Fumie Yamada-Ogatta, PhD^d, Lucy Megumi Yamauchi, PhD^{d*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rodovia Celso Garcia Cid s/n, km 380 PR445 Campus Universitário, Londrina, Paraná, 86057-970, Brazil.

^bFaculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. do Café s/nº, Campus Universitário da USP. Vila Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP, 14040903, Brazil

^cInstituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. Cidade Universitária Zeferino Vaz, s/n Barão Geraldo, Caixa-postal 6154, Campinas, SP, 13085-970, Brazil

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

Corresponding author: Lucy Megumi Yamauchi. Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso

Garcia Cid s/n, km 380 PR445 Campus Universitário, Londrina, Paraná, 86057-970, Brazil. Tel: +55-43-3371-5503; fax: +55-43-3371-4788. E-mail address: lionilmy@uel.br

The authors of this article report no conflict of interest.

This work is supported by grant from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Grant number 402728/2013-0) and Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina. CL, ATM, PMCS, GN, SFYO and LMY received fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Pessoal and Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná.

Abstract

The resistance of pathogens to antifungals along with biofilm formation impairs the treatment of infections caused by *Candida* spp., challenging researchers to seek new therapeutic alternatives. Silver nanoparticles (AgNPs) have been extensively studied for its antimicrobial potential, presenting encouraging results in association with antibiotics and antifungals. Here, we evaluate the effect of an AgNP biologically synthesized (AgNP_{bio}) alone and in association with fluconazole (FLC) against *Candida* spp., FLC-resistant *C. albicans* isolates and biofilm. AgNP_{bio} (alone) demonstrated antifungal effect in non-toxic concentrations against all species tested. Furthermore, the AgNP_{bio} increases the antifungal effect of FLC against FLC-resistant *C. albicans*, revealing a fungicidal effect, although the combination has not presented satisfactory effects against other FLC-resistant species. Finally, this association exhibited a significant biofilm growth inhibition effect against FLC-resistant *C. albicans*. Above all, our results highlight the effectiveness of the combination of silver nanoparticles with FLC against *C. albicans* resistant to this antifungal.

Keywords: *Candida* spp.; AgNP_{bio}; Fluconazole; biofilm; FLC-resistant isolates.

Background

In the last decades there was a significant increase in the incidence and prevalence of infections caused by *Candida* spp., especially in the immunosuppressed and hospitalized with serious underlying diseases' patients^{1,2}. *C. albicans* is the predominant cause of these infections and the most frequently

associated with biofilm formation, producing a great impact on morbidity and mortality³. Furthermore, the treatment of fungal infections remains complicated, caused by the toxicity of drugs available, the low variety of antifungals, biofilm and increased resistance to the more classic drugs, such as fluconazole (FLC). Therefore, the development of new antifungal and the improvement of efficiency and toxicity are necessary⁴. Silver nanoparticles (AgNPs) have been extensively investigated because of their antimicrobial properties⁵. A great potential in nanomedicine has been due to effectiveness against pathogens. This breakthrough in nanotechnology has led microbiologists to apply metal nanoparticles as an effective way to control certain infectious diseases⁶. Therefore, the aim of this study was to evaluate the potential of silver nanoparticles biologically synthesized (AgNP_{bio}) against *Candida* species and the effect of combination of AgNP_{bio} with FLC (AgNP_{bio}/FLC) against *C. albicans* resistant isolates and biofilm.

Methods

Candida spp. isolates

This study used *C. albicans* ATCC26790, *C. tropicalis* ATCC28707, *C. parapsilosis* ATCC22019; *C. krusei* ATCC34135; *C. dubliniensis* ATCCMYA-646 and *C. glabrata* ATCC2001, provided by FIOCRUZ, Brazil. Two clinical *C. albicans* FLC-resistant isolates provided by Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos/UEL, Brazil. The microorganisms were maintained on Sabouraud dextrose (SD) agar (Himedia) and also kept at -80°C.

Synthesis of AgNP_{bio}

The AgNP_{bio} were obtained following the method of Durán and collaborators (2005)⁷. Briefly, 10g of *Fusarium oxysporum* biomass was taken in a flask containing 100mL of distilled water, kept for 72h at 28°C. Then, the aqueous solution components were separated by filtration, followed by addition of AgNO₃ (10⁻³M) and kept at 28°C. The characterization was performed by Transmission Electron Microscopy (Carl Zeiss CEM-902).

AgNP_{bio} and FLC susceptibility testing

The minimum inhibitory concentrations (MICs) of FLC and AgNP_{bio} were determined by broth microdilution method, as described by Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI M27-A3)⁸. The minimum fungicidal concentration (MFC) was defined as 99.9% decrease of the viable counts compared to untreated sample⁹. The effect of AgNP_{bio}/FLC against FLC-resistant *Candida* samples was accessed by checkerboard method, following Scott and collaborators (1995)¹⁰. We tested concentrations of AgNP_{bio} ranging from 0.28 to 8.7µg/mL and FLC from 0.25 to 128µg/mL. The effect of AgNP_{bio}/FLC was determined using the fractional inhibitory concentration index (FICI)¹⁰, which was synergistic if FICI≤0.5, additive if FICI>0.5 and <1.0, indifferent if FICI>1.0 and ≤2.0, and antagonistic if FICI>2¹¹.

For time kill curve analysis, 1x10⁶ CFU/mL of *C. albicans* in RPMI 1640 MOPS (0.165M) were incubated for 24h with MIC values of FLC and AgNP_{bio} and checkerboard assay values for AgNP_{bio}/FLC. The aliquots, obtained at 2, 4, 8, 16, 24h, were plated on SD agar, incubated at 37°C for 24h. All assays were carried out in duplicate and on different days.

For the cellular viability assay, 1x10⁷ CFU/mL of *C. albicans* in RPMI/MOPS medium were incubated with the FLC, AgNP_{bio} and AgNP_{bio}/FLC concentrations describe above. The viability was observed after staining with FUN-1 component of LIVE/DEAD yeast viability kit (Molecular Probes®) following the manufacturer's instructions. After 1 and 2h of incubation at 37°C, the cellular staining was observed using a Leica fluorescent microscopy (DM2000).

The biofilm formation and quantification of metabolic activity using the 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT)-reduction assay was performed as described by Bizerra and collaborators (2008)¹². Mature biofilms were challenged with FLC serial dilutions (2 to 1024µg/mL) with a fixed concentration of AgNP_{bio} 72.5 and 36.25µg/mL for 24h. Finally, the XTT-formazan product was measured at 490nm with microtiter plate reader (Universal Microplate Reader ELx 800, Bio-Tek Instruments).

Statistical analysis

The results were analyzed by One-way ANOVA using the software GRAPHPAD PRISM version 6.0 (GRAPHPAD Software). Comparative analysis of the samples was carried out using Tukey's test. *p* values less than 0.05 were considered significant.

Results

The antifungal activity of AgNP_{bio} was observed against all ATCC samples tested, showing low MIC values, with the highest at 4.35µg/mL against *C. albicans* and the lowest at 1.09µg/mL against *C. tropicalis* e *C. krusei*. The AgNP_{bio} MCF was the same as the MIC for all samples, indicating that its effect is fungicidal and not only fungistatic (data not shown). Next, the AgNP_{bio}/FLC was tested against FLC-resistant *Candida* ATCC samples and other two clinical isolates (Table 1). *C. albicans* ATCC26790 MIC value for FLC decreased from >128µg/mL (alone) to 2µg/mL in the presence of 2.17µg/mL of AgNP_{bio}. The FICI was 0.51, indicating additive effect between the substances. Similar results were observed with *C. albicans* 122 and E isolates, the FLC-MIC was 128 and 64µg/mL alone, and in the presence of 1.45µg/mL of AgNP_{bio} reduced to 8 and 4µg/mL, respectively, showing an additive effect (FICI: 0.895) for both isolates. Contrasting results were obtained when *C. krusei* and *C. tropicalis* were tested. FLC-MIC value for *C. krusei* was 32µg/mL (alone), and it remained in the presence of 2.17µg/mL of AgNP_{bio}, indicating an indifferent effect (FICI: 2). *C. tropicalis* showed a reduction of FLC-MIC from 128µg/mL (alone) to 0.25µg/mL in the presence of AgNP_{bio}. However, the MIC for AgNP_{bio} in association increased to 2.17µg/mL, indicating antagonism effect (FICI: 2.001). To confirm, these results, time kill curve analysis and cellular viability assay were conducted with *C. albicans* ATCC26790 (figure 1). The data confirmed the fungistatic effect of FLC (figure 1A and 1B-2), while AgNP_{bio} presented a fungicidal effect (figure 1A). This cellular death could be seen in 2h of treatment (figure 1B-3). The most significant result was obtained with AgNP_{bio}/FLC, in which fungicidal effect was noticed in earlier time (figure 1A), showing clearly the yeast death when compared to other treatments (figure 1B-4). The effect of AgNP_{bio}/FLC was also evaluated in *C. albicans* biofilm (figure 2). The results showed that the AgNP_{bio}/FLC

association reduced significantly and in a dose-dependent manner the biofilm formation (figure 2A) when compared to AgNP_{bio} (alone).

Discussion

In recent times the occurrence of *Candida* infections is increasing considerably and the biofilm formation and resistance to antifungals are some of the factors that lead to high mortality rates³. Therefore, the development or upgrading of antifungals to achieve greater effectiveness in treatment is a priority area of research. Nanomedicine is a recent field that promotes a good platform for the development of nanoparticles with antimicrobial properties, as in the case of metallic ones, being an extremely useful tool in antifungal research^{13,14}. Hence, our study aimed at evaluating the antifungal potential of a AgNP alone and in combination with FLC against the main pathogenic *Candida* spp. and *C. albicans* resistant isolates and biofilm. The AgNP_{bio} alone had an antifungal effect against different *Candida* spp. and the MIC values obtained was lower than the cytotoxic concentration established by Marcato and collaborators (2013)¹⁵. Furthermore, our study showed that the association with FLC was able to reduce the FLC-MIC of FLC-resistant *Candida* species. Similar results with FLC-sensitive *Candida* were obtained by Gajbhiye and collaborators (2009)¹⁶. Unfortunately, the association was ineffective to *C. krusei* and *C. tropicalis* strains, revealing that positive effects are dependent on the FLC-resistant species tested. Additionally, the results on *C. albicans* biofilm demonstrated a significant growth inhibition in the presence of AgNP_{bio} associated to FLC. This is an important finding because biofilms are highly resistant against most antifungal¹⁷. Overall, our results suggest that the antifungal effect of FLC could be improved by addition of AgNP_{bio}, highlighting the effectiveness of drug combinations against FLC-resistant *C. albicans*. This allows the achievement of a greater efficacy with lowest concentrations of antifungal drugs, avoiding adverse effects and decreasing the costs of treatment¹⁸. Nevertheless, several experimental trials on experimental candidiasis must be performed before using AgNPs or its combinations as antifungal agents.

References

1. Arendrup MC, Fuursted K, Gahrn-Hansen B, Jensen IM, Knudsen JD, Lundgren B, et al. Seminal surveillance of fungemia in Denmark: notably high rates of fungemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. *J Clin Microbiol.* 2005;**43**:4434-40.
2. Espinel-Ingroff A, Canton E, Peman J, Rinaldi MG, Fothergill AW. Comparison of 24-hour and 48-hour voriconazole MICs as determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution method (M27-A3 document) in three laboratories: results obtained with 2,162 clinical isolates of *Candida* spp. and other yeasts. *J Clin Microbiol.* 2009;**47**:2766-71.
3. Kumamoto CA. *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol.* 2002;**5**:608-11.
4. Sardi JC, Almeida AM, Mendes Giannini MJ. New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites--a brief review. *Arch Oral Biol.* 2011;**56**:951-9.
5. Naqvi SZ, Kiran U, Ali MI, Jamal A, Hameed A, Ahmed S, et al. Combined efficacy of biologically synthesized silver nanoparticles and different antibiotics against multidrug-resistant bacteria. *Int J Nanomed.* 2013;**8**:3187-95.
6. Monteiro DR, Gorup LF, Takamiya AS, Ruvollo-Filho AC, de Camargo ER, Barbosa DB. The growing importance of materials that prevent microbial adhesion: antimicrobial effect of medical devices containing silver. *Int J Antimicrob Agents.* 2009;**34**:103-10.
7. Durán N, Marcato PD, Alves OL, Souza GI, Esposito E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *J Nanobiotechnol.* 2005;**3**:8.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; Approved Standard: In: CLSI document M27-A3 (ISBN 1-56238-666-2), 3rd ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
9. Puhl MC, Cortez DA, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Filho BP. Antimicrobial activity of *Piper gaudichaudianum* Kuntze and its synergism with different antibiotics. *Molecules.* 2011;**16**:9925-38.
10. Scott EM, Tariq, VN, McCrory, RM. Demonstration of synergy with fluconazole and either ibuprofen, sodium salicylate, or propylparaben against *Candida albicans* *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother.* **1995**; **12**: 2610-14.
11. Cha JD, Jeong MR, Jeong SI, Lee KY. Antibacterial activity of sophoraflavanone G isolated from the roots of *Sophora flavescens*. *J Microbiol Biotechnol.* 2007;**17**:858-64.
12. Bizerra FC, Nakamura CV, de Poersch C, Estivalet Svidzinski TI, Borsato

- Quesada RM, Goldenberg S, et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res.* 2008;**8**:442-50.
13. Marcato PD and Duran N. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. *J Nanosci Nanotechnol.* 2008; **8**:2216–29.
14. Singh R and Singh NH. Medical applications of nanoparticles in biological imaging, cell labeling, antimicrobial agents, and anticancer nanodrugs. *J Biomed Nanotechnol.* 2011; **7**:489–503.
15. Marcato PD, Parizotto NV, Martinez DST, Paula AJ, Ferreira IR, Melo PS, et al. New hybrid material based on layered double hydroxides and biogenic silver nanoparticles: antimicrobial activity and cytotoxic effect. *J. Braz. Chem. Soc.* 2013; **24**: 266-72.
16. Gajbhiye M, Kesharwani J, Ingle A, Gade A, Rai M. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. *Nanomed.* 2009;**5**:382-6.
17. Gao Y, Zhang C, Lu C, Liu P, Li Y, Li H, et al. Synergistic effect of doxycycline and fluconazole against *Candida albicans* biofilms and the impact of calcium channel blockers. *FEMS Yeast Res.* 2013;**13**:453-62.
18. Poikonen E, Lyytikäinen O, Anttila VJ, Koivula I, Lumio J, Kotilainen P, et al. Secular trend in candidemia and the use of fluconazole in Finland, 2004-2007. *BMC Infect Dis.* 2010;**10**:312.

Legends

Figure 1. Antifungal effect of AgNP_{bio}, FLC and the association against FLC-resistant *C. albicans*. Time kill plot of AgNP_{bio}, FLC and AgNP_{bio}/FLC effect (A). *C. albicans* stained with FUN-1 and calcofluor and viewed by fluorescent microscopy using fluorescein filter, untreated viable cells (B1), FLC (B2), AgNP_{bio} (B3) and AgNP_{bio}/FLC (B4) treated cells. Bar = 5µM.

Figure 2. *In vitro* effect of AgNP_{bio} and AgNP_{bio}/FLC against *C. albicans* biofilms. Biofilms were challenged with serial dilutions of FLC with fixed concentrations of AgNP_{bio}: 36.25µg/mL (A) and 72.5µg/mL (B). Assays were performed in quadruplicate. All values were means and standard deviations. The asterisk indicates a *P* value of <0.05 for an XTT values of association treatment compared to AgNP_{bio} (alone).

Table 1. Effect of combination of AgNP_{bio} and FLC against *Candida* spp. resistant to fluconazole.

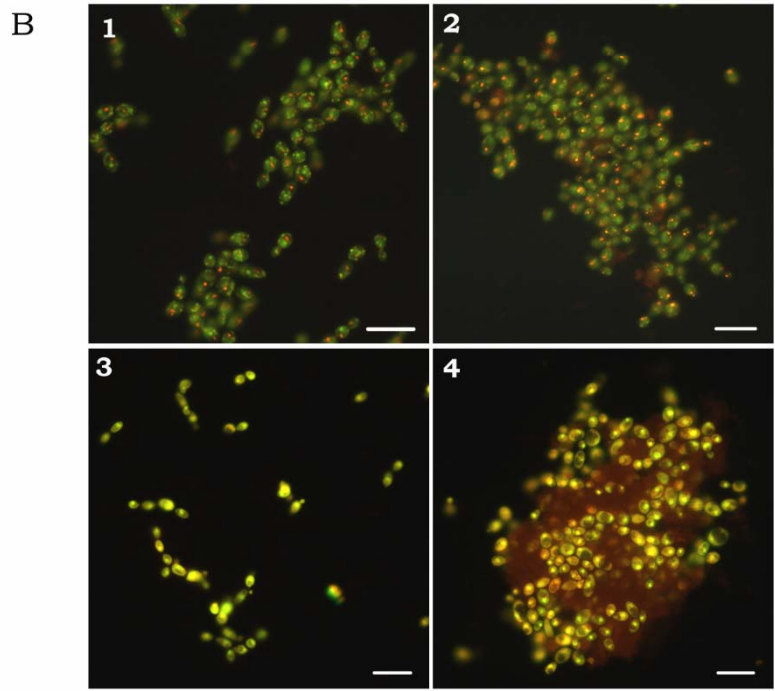
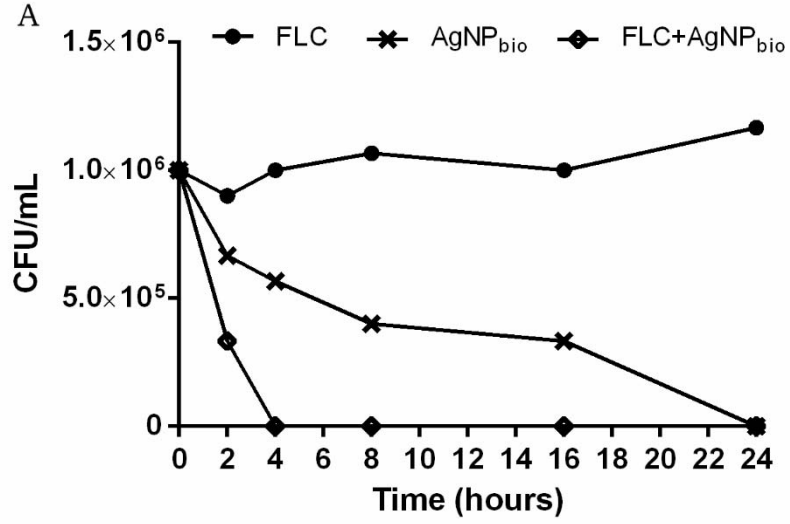
Samples	MIC* FLC (µg / mL)	MIC AgNP _{bio} (µg / mL)	MIC (FLC/AgNP _{bio}) (µg / mL)	FICI†	Effect
<i>C. albicans</i> ATCC 26790	> 128	4.35	2 / 2.17	0.51	Aditism
<i>C. krusei</i> ATCC 34135	32	2.17	32 / 2.17	2	Indiferent
<i>C. tropicalis</i> ATCC 28707	128	1.09	0,25 / 2.17	2.001	Antagonism
<i>C. albicans</i> "E"	64	1.74	4 / 1.09	0.895	Aditism
<i>C. albicans</i> 122	128	1.74	8 / 1.09	0.895	Aditism

* Minimum inhibitory concentration

† Fractional inhibitory concentration index

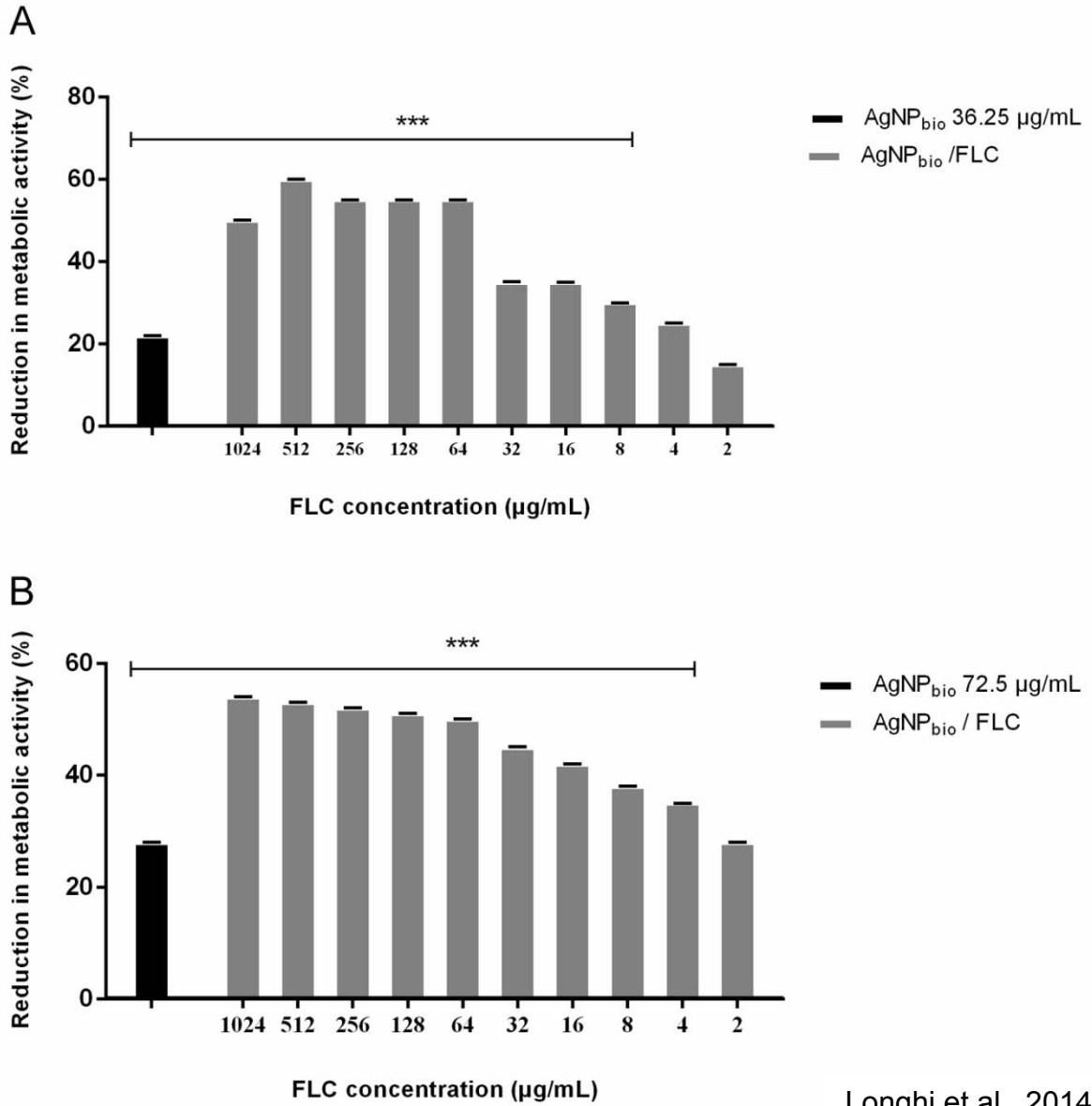
Longhi et al., 2014.

Figure 1



Longhi et al., 2014.

Figure 2



Longhi et al., 2014.

CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos foi possível concluir que baixas concentrações da nanopartícula de prata apresentam efeito antifúngico contra todas as amostras testadas: *C. albicans* ATCC 26790, *C. tropicalis* ATCC 28707, *C. parapsilosis* ATCC 22019; *C. krusei* ATCC 34135; *C. dubliniensis* ATCC MYA-646 and *C. glabrata* ATCC 2001. Além disso, a nanopartícula em associação com o fluconazol mostrou-se capaz de reduzir significativamente a concentração inibitória mínima de amostras de *C. albicans* resistentes ao fluconazol. Por fim, verificou-se uma diminuição significativa da formação do biofilme quando comparado à AgNP_{bio} isolada. Dessa maneira, o presente estudo mostrou que a AgNP_{bio} ou sua associação com fluconazol apresenta efeitos antifúngicos contra as espécies de *Candida* patogênicas tanto na sua forma planctônica como na forma sésil.

Esses resultados são bastante significativos, pois os microrganismos formadores de biofilme frequentemente estão associados à resistência à maioria dos antifúngicos. Sobretudo, o presente estudo sugere que o efeito antifúngico do fluconazol pode ser melhorado pela adição de nanopartículas de prata, destacando a efetividade da combinação de agentes antifúngicos contra amostras de *C. albicans* resistentes ao fluconazol. Dessa forma, sugere-se que seja possível obter-se uma efetividade maior com concentrações menores dos antifúngicos, diminuindo os efeitos adversos e também o custo dos tratamentos.