



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS

ANNA PAULA DE CASTRO TEIXEIRA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE SUBSTÂNCIAS OXADIAZÓIS CONTRA
GÊNERO *Candida* E *Cryptococcus***

JOÃO PESSOA, PB
2025

ANNA PAULA DE CASTRO TEIXEIRA

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE SUBSTÂNCIAS OXADIAZÓIS CONTRA
GÊNERO *Candida* E *Cryptococcus***

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, pela Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do título de Doutor(a).

Orientadora: Prof^a Dr^a Rita de Cássia da Silveira e Sá - UFPB

Segunda orientadora: Prof^a Dr^a Hilzeth de Luna Freire Pessoa - UFPB

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Igara Oliveira Lima - UFCG

JOÃO PESSOA, PB

2025

**Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação**

T266a Teixeira, Anna Paula de Castro.

Atividade antifúngica de substâncias oxadiazóis contra gênero Candida e Cryptococcus / Anna Paula de Castro Teixeira. - João Pessoa, 2025.

84 f. : il.

Orientação: Rita de Cássia da Silveira e Sá, Hilzeth de Luna Freire Pessoa.

Coorientação: Igara Oliveira Lima.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Novos antifúngicos. 2. Doenças oportunistas. 3. Farmacologia. 4. Levedura. 5. Oxadiazóis. I. Sá, Rita de Cássia da Silveira e. II. Pessoa, Hilzeth de Luna Freire. III. Lima, Igara Oliveira. IV. Título.

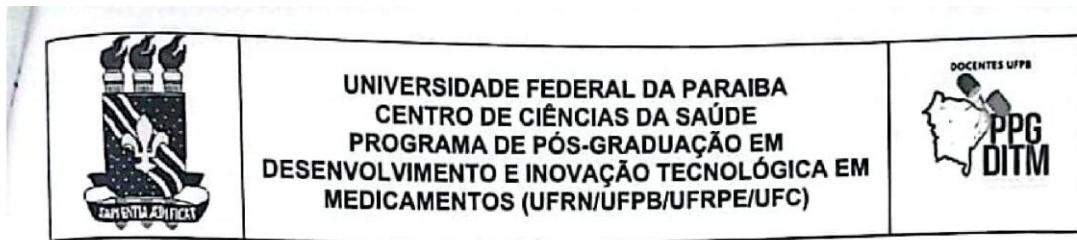
UFPB/BC

CDU 615.282(043)

	UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS (UFRN/UFPB/UFRPE/UFC)	
---	--	---

Ata da quadragésima oitava defesa de tese de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos **ANNA PAULA DE CASTRO TEIXEIRA**, candidata ao Título de "Doutor" em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos/UFPB.

As oito e quarenta e duas (8:42) do dia vinte e um de fevereiro do ano de dois mil e vinte cinco (21/02/2025), no auditório Humberto Nóbrega-CCS, reuniram-se em caráter de Solenidade pública os membros da Comissão designada para examinar a aluna **Anna Paula de Castro Teixeira**, candidata ao Título de "Doutor" em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos. Foram componentes da Banca Examinadora os Professores Doutores: Rita de Cássia Silveira e Sá (orientadora), Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes(examinador interno), Ricardo Dias de Castro(examinador interno), Abrahão Alves de Oliveira Filho (examinador externo) e Fillipe de Oliveira Pereira(examinador externo). Esteve presente também a sua Coorientadora, Igara Oliveira Lima, da Universidade Federal de Campina Grande(UFCG). Dando início aos trabalhos a presidente da banca, Prof.^a Dr.^a Rita de Cássia Silveira e Sá, após declarar os objetivos da reunião, apresentou a candidata, **Anna Paula de Castro Teixeira**, a quem concedeu a palavra para que dissertasse oral e sucintamente sobre o tema apresentado e intitulado "**Atividade antifúngica de substâncias oxadiazóis contra gênero *Candida* e *Cryptococcus***". Após discorrer sobre o referido tema durante cerca de quarenta minutos, o candidato foi arguido pelos examinadores na forma Regimental. Em seguida passou a comissão, em caráter secreto, a proceder à avaliação e julgamento do trabalho, concluindo por atribuir-lhe o conceito APROVADO. Em face da aprovação declarou a presidente achar-se a examinada, **Anna Paula de Castro Teixeira**, legalmente habilitada a receber o Título de "Doutor" em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, área Farmácia, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que o mesmo faz jus. Os trabalhos foram encerrados determinando a leitura para fins de aprovação e a lavratura da presente ata devidamente assinada por todos os membros da Banca Examinadora.



João Pessoa, em 21 de fevereiro de 2025.

Rita de Cássia de Sá
Prof.ª Dr.ª Rita de Cássia Silveira e Sá (presidente)

Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes
Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes (Examinador Interno)

Ricardo Dias de Castro
Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro (Examinador Interno)

Abrahão Alves de Oliveira Filho
Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho (Examinador Externo)

Filipe de Oliveira
Prof. Dr. Filipe de Oliveira (Examinador Externo)

**A Deus, aos meus pais Whilame e Marleide, à
minha irmã Kadija, ao bebê que está a caminho e
a todos que contribuíram de forma direta e
indireta, dedico.**

AGRADECIMENTOS

Gratidão, honra e glória a Deus, que se fez onipotente, onipresente e onisciente, podendo agir na vida de todos aqueles que têm fé. Eu, pequena sou no saber, no pensar e na fé, mas tendo um Deus tão grande, posso agradecer por todas as coisas visíveis e invisíveis.

Agradeço aos meus pais, Whilame Teixeira Pimenta e Marleide de Oliveira Castro Teixeira, que mais uma vez estiveram ao meu lado em mais uma jornada acadêmica, sendo porto seguro e apoio. Gratidão pelos princípios, valores, lado político, orientações para a vida. Amo muito vocês.

À minha irmã Kadija de Castro Teixeira, por ser a pessoa meiga, inteligente e acolhedora que és, que genuinamente acredita mais em mim do que eu mesma, você foi necessária ao longo desses anos.

À minha orientadora Profª Drª Rita de Cássia da Silveira e Sá, pela orientação e participação nesta etapa acadêmica.

À minha segunda orientadora Profª Drª Hilzeth de Luna Freire Pessoa, pelo apoio, orientação e disponibilidade em participar desta etapa.

À minha co-orientadora Profª Drª Igara Oliveira Lima da UFCG/CES, pela colaboração e disponibilização de seu laboratório para a realização dos ensaios *in vitro*, além do incentivo, paciência, amizade e inspiração ao longo desses anos, por ser exatamente a profissional compreensiva e humana que és. Obrigada pelo encorajamento, parceria e lealdade, tens um valor imensurável em minha vida.

Ao professor Dr. Wylly Araújo de Oliveira, pela paciência e contribuição nesta tese, com os ensaios de ergosterol e farnesol, bem como aos seus alunos de iniciação científica, Ítalo Felipe e Talyta Oliveira. Grata pela parceria.

À profª Drª Edeltrudes de Oliveira Lima da UFPB/CCS, por fornecer as cepas fúngicas, viabilizando a execução deste trabalho.

Ao profº Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas da UFCG/CES e sua equipe, por sintetizar e fornecer os compostos oxadiazóis por síntese orgânica, utilizados nessa tese.

À Me. Flaviana Maria de Sousa Melo, pela colaboração em meus experimentos, além da amizade, lealdade, conversas, cafés, vinhos e cervejas.

À técnica de laboratório da UFCG/CES Ismênia de Sousa Carneiro Silva, pela amizade, conversas, cafés e participação na execução dos experimentos.

Aos professores que compuseram a banca de defesa de tese, Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho (membro interno ao PPgDITM), Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes (membro externo ao PPgDITM e interno à instituição), Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro (membro externo ao PPgDITM e interno à instituição) e ao Prof. Dr. Fillipe de Oliveira Pereira (membro externo ao PPgDITM e à instituição), por aceitarem ao convite para avaliar este trabalho.

A Gelson Lopes do Nascimento, pela compreensão, apoio, paciência, lealdade e carisma nessa etapa, você é essencial em minha vida.

Ao meu bebê, que me escolheu como mãe e veio em uma bonita fase da minha vida.

A Francisco Patrício de Andrade Júnior, irmão que a vida presenteou, pelos diálogos, anos de amizade e apoio.

Ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos (UFPB/UFC/UFRN/UFRPE) da Universidade Federal da Paraíba.

À Universidade Federal da Paraíba, *campus* João Pessoa PB e à Universidade Federal de Campina Grande, *campus* Cuité PB.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ/PB), pela bolsa de fomento à pesquisa, Termo de Outorga nº 1141/2021, edital nº 07/2021 SEECT/FAPESQ/PB.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta nesta etapa da minha vida!

“Mais do que máquinas, precisamos de humanidade. Mais do que de inteligência, precisamos de afeição e doçura. Sem essas duas virtudes, a vida será de violência e tudo será perdido.”

(Charles Chaplin)

RESUMO

TEIXEIRA, A. P.C. **Atividade antifúngica de substâncias oxadiazóis contra gênero *Candida* e *Cryptococcus*.** 2025. 83p. Tese (Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) – UFPB/CCS/João Pessoa, PB.

Infecções fúngicas acometem pacientes imunocomprometidos e imunodeprimidos, sendo causadas por micro-organismos em condições favoráveis ao seu desenvolvimento, a exemplo de leveduras como *Candida spp.* e *Cryptococcus spp.*. Entretanto, o aumento dos relatos de resistência fúngica e os efeitos adversos associados aos antifúngicos disponíveis ressaltam a necessidade de novas alternativas terapêuticas. Nesse contexto, compostos derivados de oxadiazóis vêm sendo sintetizados e investigados, demonstrando amplo potencial biológico, apresentando atividades antiviral, antifúngica, antibacteriana e antineoplásica. Diante disso, o objetivo desse estudo foi verificar a ação antifúngica de quinze oxadiazóis, frente as cepas de *Candida* e *Cryptococcus*. Foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM), pela técnica de microdiluição, determinação de concentração fungicida mínima (CFM) e o estudo de cinética de crescimento para analisar as ações das substâncias frente aos fungos, ao longo do tempo. Também foi realizado o estudo de microcultivo em câmara úmida para verificar as modificações dos compostos nas estruturas de virulência dessas leveduras. A atividade antibiofilme foi realizada pela técnica de cristal violeta. O ensaio de modo de ação do ergosterol e de *quorum-sensing* farnesol de *C. albicans* foi analisado e quantificado pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Uma análise de efluxo de drogas utilizando um desacoplador da força próton-motora foi verificada. Já o estudo de associação de moléculas foi feito pela técnica de *Checkerboard*. Entre as moléculas analisadas, a JFOX-6 se destacou por inibir todas as cepas fúngicas e apresentou CIM e CFM, entre 256 e 1024 µg/mL, nas condições avaliadas. Na cinética de crescimento, apresentou atividade fungistática. Interferiu na produção das estruturas de virulência, diminuindo significativamente a espessura da cápsula do gênero *Cryptococcus* e inibiu os fatores de virulência e de reprodução do gênero *Candida*, como pseudohifas, blastoconídeos e clamidoconídeos. Também interferiu fortemente (2x CIM) na formação de biofilme nos estágios de maturação e dispersão de *C. neoformans*, moderado o de *C. gattii*, fraco o de *C. tropicalis* e inibiu 100% o biofilme de *C. albicans* no estágio de maturação. JFOX-6 interferiu na biossíntese do ergosterol e as concentrações subinibitórias estimularam a produção de farnesol em *C. albicans*. A resistência desses micro-organismos aos antifúngicos pode estar ocorrendo pela bomba de efluxo, nas condições avaliadas. Ao associar JFOX-6 com anfotericina B, a interação foi indiferente frente a *Cryptococcus spp.* e *C. albicans*. Diante do exposto, os oxadiazóis, parecem ser antifúngicos promissores frente ao estudo de leveduras oportunistas de interesse clínico.

Palavras-chave: Doenças oportunistas; Farmacologia; Leveduras; Oxadiazóis; Novos antifúngicos.

ABSTRACT

TEIXEIRA, A. P.C. **Antifungal activity of oxadiazole substances against *Candida* and *Cryptococcus* genera.** 2025. 83p. Thesis (Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) – UFPB/CCS/João Pessoa, PB.

Fungal infections affect immunocompromised and immunosuppressed patients and are caused by microorganisms under favorable conditions for their development, such as yeasts like *Candida spp.* and *Cryptococcus spp.*. However, the increasing reports of fungal resistance and the adverse effects associated with available antifungals highlight the need for new therapeutic alternatives. In this context, oxadiazole-derived compounds have been synthesized and investigated, demonstrating broad biological potential, including antiviral, antifungal, antibacterial, and antineoplastic activities. Therefore, the objective of this study was to evaluate the antifungal activity of fifteen oxadiazoles against *Candida* and *Cryptococcus* strains. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the microdilution technique, along with the minimum fungicidal concentration (MFC) and growth kinetics analysis to assess the action of the substances against fungi over time. A microcultivation assay in a humid chamber was also performed to verify the compounds' effects on the virulence structures of these yeasts. Antibiofilm activity was evaluated using the crystal violet technique. The mode of action on ergosterol and the quorum-sensing assay of farnesol in *C. albicans* were analyzed and quantified by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). Drug efflux analysis using a proton-motive force uncoupler was also performed. The molecular association study was conducted using Checkerboard technique. Among the molecules analyzed, JFOX-6 stood out by inhibiting all fungal strains, with MIC and MFC ranging from 256 to 1024 µg/mL under the evaluated conditions. In the growth kinetics assay, it exhibited fungistatic activity. It interfered with the production of virulence structures, significantly reducing the capsule thickness of *Cryptococcus* and inhibiting virulence and reproductive factors of *Candida*, such as pseudohyphae, blastoconidia, and chlamydoconidia. It also strongly interfered (2x MIC) with biofilm formation in the maturation and dispersion stages of *C. neoformans*, moderately with *C. gattii*, weakly with *C. tropicalis*, and completely inhibited *C. albicans* biofilm in the maturation stage. JFOX-6 interfered with ergosterol biosynthesis, and subinhibitory concentrations stimulated farnesol production in *C. albicans*. The resistance of these microorganisms to antifungals may be associated with efflux pump activity under the evaluated conditions. When JFOX-6 was combined with amphotericin B, the interaction was indifferent against *Cryptococcus spp.* and *C. albicans*. Considering the above, oxadiazoles appear to be promising antifungals in the study of opportunistic yeasts of clinical interest.

Keywords: Opportunistic diseases; Pharmacology; Yeasts; Oxadiazoles; New antifungals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de formação de biofilme em espécies de <i>Candida</i>	20
Figura 2. Formação de biofilme criptocócico em superfície biótica ou abiótica.....	23
Figura 3. Metodologia para determinação da Concentração Inibitória Mínima pela técnica de microdiluição.....	29
Figura 4. Subcultivo de 10 µL dos poços que não apresentou crescimento microbiano.....	30
Figura 5. Esquematização do estudo de cinética de crescimento.....	31
Figura 6. Ilustração da técnica de microcultivo de micro-organismos.....	32
Figura 7. Análise de lâminas de microscopia de <i>Candida</i> spp.....	33
Figura 8. Análise de lâminas de microscopia de <i>Cryptococcus</i> spp.....	33
Figura 9. Ilustração da técnica de análise do biofilme de leveduras no estágio de maturação.....	35
Figura 10. Esquema da técnica de coloração de biofilme dos micro-organismos, na ausência e presença de oxidazóis, utilizando cristal violeta.....	36
Figura 11. Cultivo, extração e análise de <i>C. albicans</i> tratados com JFOX-6 e quantificação de ergosterol.....	38
Figura 12. Cultivo, extração e análise de <i>C. albicans</i> tratados com JFOX-6 e quantificação de farnesol.....	39
Figura 13. Análise do comportamento do micro-organismo na presença de desacoplador da força próton motora.....	40
Figura 14. Ilustração da técnica de associação de substâncias frente às leveduras.....	41
Figura 15. Cinética de crescimento de <i>C. neoformans</i> ATCC-66031 sob exposição de JFOX-6, anfotericina B e fluconazol.....	46
Figura 16. Cinética de crescimento de <i>C. albicans</i> ATCC-10231 sob exposição de JFOX-6, anfotericina B e fluconazol.....	46
Figura 17. Efeito da CIM de JFOX-6 e Anfotericina B e suas concentrações superiores (2xCIM e 4xCIM) sobre a espessura da cápsula (µm) de <i>C. neoformans</i> e <i>C. gattii</i>	48
Figura 18. Efeito CIM de JFOX-6 e Anfotericina B e suas concentrações superiores (CIM, 2xCIM e 4xCIM) sobre a estruturas de virulência de <i>Candida</i> spp.....	50
Figura 19. Efeito de JFOX-6 em diferentes concentrações frente a formação de biofilme de <i>C. neoformans</i> ATCC-66031 e <i>C. gattii</i> ATCC-32269.....	54
Figura 20. Efeito de anfotericina B em diferentes concentrações frente a formação de biofilme de <i>C. neoformans</i> ATCC-66031 e <i>C. gattii</i> ATCC-32269.....	55
Figura 21. Efeito de JFOX-6 em diferentes concentrações frente a formação de biofilme de <i>C. albicans</i> ATCC-10231 e <i>C. tropicalis</i> ATCC-750.....	57
Figura 22. Efeito de anfotericina B em diferentes concentrações frente a formação de biofilme de <i>C. albicans</i> ATCC-10231 e <i>C. tropicalis</i> ATCC-750	58
Figura 23. Cromatograma de ergosterol da Sigma-aldrich (padrão) e do micro-organismo na ausência e presença de JFOX-6.....	60
Figura 24. Quantitativo de ergosterol de <i>C. albicans</i> ATCC-66031 após tratamento com concentrações subinibitórias de JFOX-6.....	61
Figura 25. Cromatograma da análise de farnesol padrão (Sigma-aldrich) e do micro-organismo na ausência e presença de JFOX-6.....	63
Figura 26. Produção de farnesol por <i>C. albicans</i> ATCC-66031 na ausência e presença (1/2 CIM, 1/4 CIM e 1/16 CIM) de JFOX-6.....	64
Figura 27. Principais percussores da via do mevalonato envolvidos na síntese de farnesol....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. CIM e CFM em µg/mL de oxadiazóis frente a <i>Cryptococcus</i> spp e <i>Candida</i> spp..	43
Tabela 2. Análise qualitativa das alterações morfológicas de JFOX-6 e anfotericina B sobre a estruturas de virulência de <i>C. albicans</i> ATCC-10231.....	51
Tabela 3. Análise qualitativa das alterações morfológicas de JFOX-6 e anfotericina B sobre a estruturas de virulência de <i>C. tropicalis</i> ATCC-750.....	51
Tabela 4. Interferência de JFOX-6 e suas concentrações subinibitórias sobre o ergosterol, em comparação com o controle.....	61
Tabela 5. Comportamento da bomba de efluxo do micro-organismo na ausência e presença de um desacoplador da força próton-motora.....	67
Tabela 6. Efeitos da associação entre JFOX-6 e a anfotericina B contra <i>Cryptococcus</i> spp e <i>Candida</i> spp.....	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Tratamento antifúngico da candidíase.....	18
Quadro 2. Tratamento antifúngico da criptococose.....	22
Quadro 3. Estruturas e os respectivos nomes das substâncias-teste utilizadas no estudo.....	27

LISTA DE ABREVIASÕES

- ABC - *ATP binding cassette*
ASD – Agar Sabouraud Dextrose
ATCC-- *American Type Culture Collection*
CCCP - Carbonil cianeto-3-clorofenilhidrazona
CFM – Concentração fungicida mínima
CIF - Concentração Inibitória Fracionada
CIM – Concentração inibitória mínima
CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
D. O. – Densidade ótica
DAD - Detector de arranjo de diodos
DMSO – Dimetilsulfóxido
FPP - Farnesil pirofosfato
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
ICIF - Índices de concentração inibitória fracionada
MATE - *Multidrug and toxic compound extrusion*
MDR - Resistência a múltiplas drogas
MFS - *Major facilitator superfamily*
NaCl – Cloreto de sódio
OMS - Organização Mundial de Saúde
R – Radical
RND - *Resistance-nodulation-division*
SMR - *Small muldrug resistance*
UFC/mL – Unidade formadora de colônia por mililitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Infecções fúngicas	17
2.1.1 Candidíase.....	17
2.1.2 Criptococose.....	22
2.2 Modo de ação do tratamento farmacológico da candidíase e criptococose.....	24
2.3 Síntese de compostos com potenciais antifúngicos	25
3. OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GERAL.....	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Substâncias-teste e substâncias padrão.....	28
4.2 Micro-organismos e preparação do inóculo	29
4.3 Determinação da concentração inibitória mínima	29
4.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima.....	30
4.5 Análise da cinética de crescimento microbiana	31
4.6 Efeito das substâncias na morfologia das leveduras.....	32
4.7 Análise da capacidade do micro-organismo produzir biofilme.....	34
4.8 Ensaio da interferência de JFOX-6 na formação de biofilme fúngico.....	35
4.9 Análise da extração e quantificação do ergosterol de <i>Candida</i>.....	37
4.10 Análise do efeito da JFOX-6 na biossíntese do farnesol em <i>C. albicans</i> ATCC-66031	39
4.11 Estudo da bomba de efluxo dependente de gradiente de prótons	40
4.12 Estudo do efeito da associação de substâncias-teste com substâncias padrão	41
4.13 Análise estatística	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÕES	72
7. REFERÊNCIAS	73
ANEXOS	83

1. INTRODUÇÃO

As infecções por micro-organismos são as principais causas de morte e incapacidade no mundo, em torno de 4,95 milhões de óbitos por ano, sendo 1,27 milhão associadas com a resistência aos tratamentos antimicrobianos existentes (WHO, 2022a). O aumento de infecções fúngicas em humanos depende de fatores como estado imunológico do paciente, uso intensivo de antibióticos, doenças crônicas, transplantes, tratamento oncológico, doenças autoimunes e imunossuprimidos (Araújo *et al.*, 2023).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), os fungos que compõem o grupo prioritário crítico são *Cryptococcus neoformans*, *Candida auris*, *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, por serem as espécies frequentemente isoladas em infecções humanas (WHO, 2022a).

A candidíase e a criptococose são infecções fúngicas de significativa importância clínica, especialmente em pacientes imunocomprometidos. A candidíase, causada por fungos do gênero *Candida*, destaca-se como uma infecção oportunista que pode afetar diversas mucosas, pele e até a corrente sanguínea (candidemia) em casos graves. Entre as espécies de *Candida*, *Candida albicans* é a mais prevalente, embora outras espécies, como *Candida tropicalis*, também sejam responsáveis por infecções, especialmente em pacientes hospitalizados (Barros *et al.*, 2020).

O tratamento da candidíase varia conforme a localização e a gravidade da infecção. Infecções superficiais, como a candidíase oral e vaginal, são geralmente tratadas com antifúngicos tópicos, como nistatina, ou sistêmicos, como o fluconazol. Já a candidemia e outras formas invasivas demandam terapia com a caspofungina, ou anfotericina B, especialmente em casos de resistência (Pappas *et al.*, 2016).

Já a criptococose é causada por *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, leveduras encapsuladas responsáveis meningite criptocócica, uma das principais infecções em pacientes com HIV/AIDS. O tratamento envolve uma abordagem em duas fases: indução com anfotericina B associada à flucitosina, seguida por manutenção com fluconazol por um período prolongado, visando à prevenção de recidivas (Chang *et al.*, 2018).

Concomitante a isso, a pandemia da COVID-19 demandou uma atenção urgente e imediata por se tratar de um problema de saúde pública de importância nacional e internacional. Também estimulou os interesses em pesquisa de novos antimicrobianos, bem como de diagnósticos rápidos e tratamentos de baixo custo, intensificando as limitações já existentes na saúde, como a resistência microbiana, que agravou silenciosamente, por envolver múltiplos

mecanismos nas diversas espécies de micro-organismos, enfraquecendo a segurança do paciente. Contudo, a vigilância de resistência aos antimicrobianos ainda é deficiente e tornou-se mais exposta devido à pandemia (Walia *et al.*, 2023).

Apesar da disponibilidade de opções terapêuticas, o tratamento das infecções fúngicas enfrenta diversos obstáculos que dificultam a eficácia clínica. Entre os principais desafios estão a resistência antifúngica, especialmente em *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp., o que limita a eficácia dos antifúngicos disponíveis. Além disso, a toxicidade associada a alguns fármacos, como a anfotericina B, pode restringir seu uso prolongado, principalmente em pacientes com comorbidades (Perfect *et al.*, 2014).

Diante disso, são inúmeros os caminhos para encontrar alternativas de tratamento de fúngicas resistentes, podendo-se destacar a síntese orgânica de compostos bioativos, com destaque para as oxadiazóis, que apresentam uma ampla variedade de aplicações (Oliveira *et al.*, 2018). Várias rotas, a exemplo da rota com amidoxima, são precursoras para a síntese de diversos compostos heterocíclicos, destacando-se os 1,2,4-oxadiazóis 3,5-dissubstituídos, com ações biológicas, como antimarialária, anti-hipertensivo anti-hipertensiva, antimicrobiana, antioxidante, dentre outras aplicações (Freitas-Filho *et al.*, 2015).

Os estudos utilizando 1,2,4-oxadiazol, analisam seus diferentes potenciais biológicos, principalmente com finalidade farmacológica, viabilizado pela propriedade eletrofílica ou nucleofílica associada aos seus átomos do núcleo, garantindo estabilidade em meio fisiológico e no produto ou medicamento (Aguiar; Cunha, 2015).

Portanto, devido à complexidade e aos desafios encontrados no combate às afecções fúngicas, analisar moléculas obtidas por síntese orgânica frente a fungos leveduriformes de interesse clínico tornou-se o alvo desse estudo, visto que as infecções causadas por fungos oportunistas e invasivos ainda são altamente prevalentes e de difícil tratamento. Por isso, a avaliação do potencial antifúngico de compostos oxadiazóis frente aos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*, torna-se uma abordagem promissora para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Infecções fúngicas

Infecções fúngicas são definidas por infecções causadas por micro-organismos de baixa patogenicidade, em condições favoráveis ao seu desenvolvimento, devido ao desequilíbrio no sistema imunológico ou na microbiota, como ocorre em pacientes portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), pacientes diabéticos, neoplásicos, transplantados, ou em uso prolongado de corticóides, imunossupressores e antibióticos. Podem ser superficiais ou sistêmicas, dependendo da gravidade do paciente (Torres *et al.*, 2018; Svedese *et al.*, 2022).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), os fungos que compõem o grupo prioritário crítico são *Cryptococcus neoformans*, *Candida auris*, *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*, pois são as espécies frequentemente isoladas (WHO, 2022a).

2.1.1 Candidíase

O agente etiológico da candidíase superficial ou invasiva é o gênero *Candida*, encontrado na microbiota como micro-organismo comensal de indivíduos saudáveis, apesar de serem oportunistas, acometendo pacientes imunossuprimidos. Dentre as espécies de *Candida*, *C. albicans* é a mais prevalente nos diagnósticos das infecções (Rocha *et al.*, 2021), seguida das infecções causadas por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. auris*, *C. glabrata* (*Nakaseomyces glabrata*) e *C. krusei* (*Pichia kudriavzevi*) (Campos *et al.*, 2020; Thatchanamoorthy *et al.*, 2022). Os tipos de infecções causadas por *Candida* spp. são candidíase vulvovaginal, oral, cutânea, sistêmica ou visceral (Campos *et al.*, 2020).

Morfologicamente, as espécies que constituem o gênero *Candida* possuem entre 5 e 8 mm de diâmetro, com células simples, arredondadas ou alongadas, parede celular delgada, blastoconídeo e pseudo-hifas; reproduzem-se por brotamento, possuem consistência cremosa, opaca, com coloração branca a marfim (Silva *et al.*, 2020). *C. albicans* é uma espécie polimórfica, sua colônia pode variar de pseudo-hifas a hifas, quando o ambiente é modificado, possui blastoconídeo e clamidoconídeo, mede de 3 a 5 µm de diâmetro e as colônias possuem aspecto brilhoso, oval, úmido, cremoso e com odor específico (Soares *et al.*, 2018).

C. tropicalis é a segunda espécie de *Candida* spp. responsável pelo aumento de infecções em escala global e pela infecção em pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes. É considerada uma espécie patogênica emergente e possui similaridade

genética com *C. albicans*, sendo a segunda mais virulenta, com forte produção de biofilme e resistência antifúngica; apresenta colônias brancas a creme, textura cremosa, lisa, opacas, com bordas enrugadas; possui blastoconídeos em cadeia simples ou ramificada, medindo entre 4 e 8 × 5–11 µm, e pseudo-hifas em cadeia ramificada (Zuza-Alves *et al.*, 2017).

Com relação ao tratamento farmacológico da candidíase (Quadro 1), esse depende do local infectado. A primeira escolha para tratar candidíase oral é a utilização de nistatina de uso tópico, por duas semanas. Outros fármacos utilizados são o clotrimazol, fluconazol e cetoconazol, também por duas semanas. A candidíase cutânea, por sua vez, deve ser tratada com nistatina ou clotrimazol, enquanto os casos de candidíase sistêmica, a recomendação é a administração de anfotericina B lipossomal intravenosa (Peixoto *et al.*, 2014).

A candidíase vulvovaginal deve ser tratada de forma oral ou tópica: por via oral com a administração de fluconazol em dose única e cetoconazol, duas vezes ao dia, por duas semanas. Enquanto pela via tópica, deve-se administrar clotrimazol por uma semana, terconazol por três dias e ácido bórico, duas vezes ao dia, durante 14 dias (Leal *et al.*, 2016). Os casos de candidíase vulvovaginal recorrente são frequentes, necessitando de uso de antifúngicos por um período mais prolongado, compreendendo a administração de clotrimazol, por via oral, duas vezes por semana, durante seis meses, ou a aplicação de terconazol por sete dias, cetoconazol via oral durante seis meses, fluconazol ou itraconazol por via oral durante um mês, devendo a medicação ser suspensa após esse período e, caso seja reincidente, refazer novamente o tratamento, com os medicamentos de supressão, seguido com os de manutenção, por um ano (Peixoto *et al.*, 2014; Leal *et al.*, 2016).

Quadro 1. Tratamento antifúngico da candidíase.

CLASSE	EFEITO	ANTIFÚNGICO	TRATAMENTO	REFERÊNCIA
POLIENOS	Interação com o ergosterol fúngico, alterando a permeabilidade celular	Anfotericina B	Candidíase oral e sistêmica	Peixoto <i>et al.</i> , 2014; Pappas <i>et al.</i> , 2016; Brasil, 2019; Cavassin <i>et al.</i> , 2021; WHO, 2022b
		Nistatina	Candidíase oral, vulvovaginal (indução), cutânea	Peixoto <i>et al.</i> , 2014; Pappas <i>et al.</i> , 2016
AZÓLICO	Inibição da síntese de ergosterol e bloqueio da enzima 14- α -lanosterol-demetilase	Fluzonazol	Candidíase oral, vulvovaginal (indução, manutenção e supressão)	Peixoto <i>et al.</i> , 2014; Sueth-Santiago <i>et al.</i> , 2015; Brasil, 2019; WHO, 2022b
		Itraconazol	Candidíase oral, vulvovaginal (manutenção, supressão)	Peixoto <i>et al.</i> , 2014; Sueth-Santiago <i>et al.</i> , 2015; Brasil, 2019; WHO, 2022b
		Miconazol	Candidíase oral, vulvovaginal (indução)	Peixoto <i>et al.</i> , 2014
		Clotrimazol	Candidíase oral, vulvovaginal (supressão), cutânea	Peixoto <i>et al.</i> , 2014; Leal <i>et al.</i> , 2016
		Terconazol	Candidíase vulvovaginal	Leal <i>et al.</i> , 2016
		Cetoconazol	Candidíase oral, vulvovaginal	Peixoto <i>et al.</i> , 2014; Leal <i>et al.</i> , 2016
EQUINOCANDINA	Inibe a síntese de β (1,3)-D-glucano, componente essencial da parede celular	Caspofungina	Candidíase oral	Pappas <i>et al.</i> , 2016;
		Micafungina	Candidíase oral	Pappas <i>et al.</i> , 2016;
		Anidulafungina	Candidíase oral	Terézhalmy; Huber, 2011; Pappas <i>et al.</i> , 2016;
ÁCIDO INORGÂNICO FRACO (tratamento alternativo)	Não elucidado	Ácido bórico	Candidíase vulvovaginal	Leal <i>et al.</i> , 2016; Chew; Than, 2016

Fonte: Autora, 2025.

No entanto, apesar de existirem medicamentos antifúngicos potencialmente capazes de erradicar infecções causadas por *Candida* spp., a resistência é uma crescente preocupação nessa área, que torna mais difícil o tratamento, e corrobora a dificuldade encontrada no combate à candidíase (Machado, 2022).

Apesar das demais *Candida* spp. serem menos isoladas quando comparadas com *C. albicans*, há uma preocupação clínica crescente quanto a sua ação no organismo por apresentarem perfis de resistência aos medicamentos licenciados para o tratamento de infecções causadas por essas espécies, já tendo sido constatado o desenvolvimento de resistência ao

fluconazol, além de alta incidência em adultos e mortalidade associada às infecções (Rocha *et al.*, 2021).

Nesse contexto, *C. albicans* se destaca não apenas pela sua prevalência, mas também pela sua habilidade de secreção de farnesol, 3,7,11-trimetil-2,6,10-dodecatrieno-1-ol, um álcool sesquiterpênico acíclico, sintetizado endogenamente pela via do ergosterol; estável ao calor, não é afetada pelo pH extremo e a sua produção não depende do tipo de carbono, da fonte de nitrogênio ou do meio de crescimento (Rodrigues; Černáková, 2020).

Importante mencionar que todas as cepas padrões e clínicas de *C. albicans*, estudadas até o momento e relatada na literatura, produzem farnesol, com exceção de *C. albicans* ATCC-10231, que ao invés do farnesol, secreta o ácido farnesóico (Nickerson *et al.*, 2024).

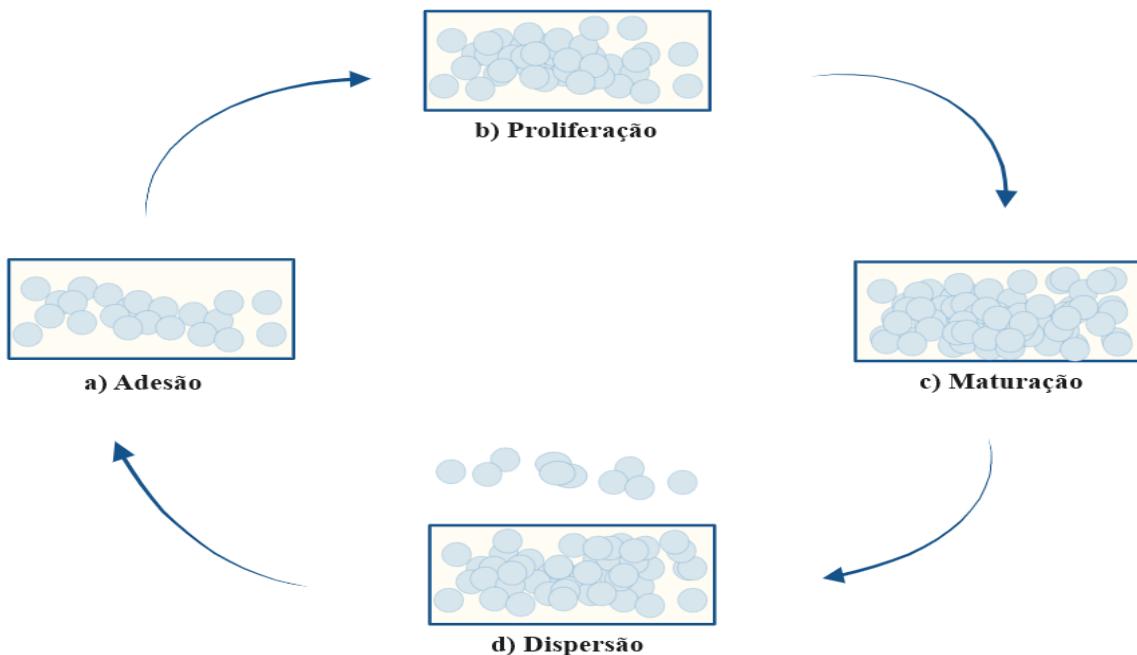
O farnesol secretado é gerado pela desfosforilação do farnesil pirofosfato como um subproduto da via do mevalonato e são influenciadas pela temperatura e condições nutricionais, variando de acordo com o ciclo de crescimento e da densidade celular, atua como um regulador da transição entre formas leveduriformes e filamentosa de *C. albicans*, influenciando a formação de biofilmes, que são essenciais para a virulência dessa espécie (Batliner *et al.*, 2024). Quando atinge uma densidade celular, o farnesol inibe a transição para a forma filamentosa e suprime a formação de biofilmes, ajudando a manter o equilíbrio entre as formas leveduriformes e filamentosas do fungo, regulando a virulência do organismo e sua capacidade de infectar o hospedeiro (Hogan, 2006).

Os estágios da formação do biofilme de *C. albicans* ocorrem em quatro fases (figura 1), iniciando com a adesão, que corresponde quando as células fúngicas se aderem à superfície biótica ou abiótica, formando uma base para ancorar o biofilme, com duração entre 60 a 90 min, seguida da proliferação, desencadeada pelo surgimento de uma rede de células que contribui para a rigidez do biofilme, através da expressão de adesinas, de enzimas de degradação de tecidos, de proteínas de defesa antioxidante e de toxina peptídica citolítica, é uma fase crítica do desenvolvimento e manutenção do biofilme (Gulati; Nobile, 2016; Barros *et al.*, 2020). Depois, ocorre a fase de maturação, fase mais complexa, normalmente se forma em 24 horas, na qual a produção de hifas ocorre juntamente com a secreção de substâncias poliméricas extracelulares: os polissacarídeos α-manano, β-1,6-glucano e β-1,3-glucano, formando uma matriz polimérica, sendo o β-1,6-glucano o principal responsável dessa matriz pela resistência do biofilme aos antifúngicos (Pereira *et al.*, 2021).

A última fase é a dispersão, em que as células se desprendem do biofilme maduro para semear novas superfícies, iniciando um novo ciclo (Gulati; Nobile, 2016). Essa fase é de

relevância clínica, pois as células dispersas podem migrar para a corrente sanguínea, estando relacionada com a candidemia e a candidíase invasiva disseminada (Pereira *et al.*, 2021).

Figura 1. Mecanismo de formação de biofilme em *Candida* spp.



a) **Adesão:** aderência de células fúngicas à superfície biótica ou abiótica, com duração entre 60 a 90 min; b) **Proliferação:** surgimento de uma rede de células que contribui para a rigidez do biofilme, é uma fase crítica do desenvolvimento e manutenção do biofilme; c) **Maturação:** produção de hifas ocorre juntamente com a secreção de substâncias poliméricas extracelulares, formando uma matriz polimérica, sendo o β -1,6-glucano o principal responsável dessa matriz pela resistência do biofilme aos antifúngicos; d) **Dispersão:** células se desprendem do biofilme maduro para semear novas superfícies, iniciando um novo ciclo (Gulati; Nobile, 2016; Barros *et al.*, 2020; Pereira *et al.*, 2021).

Fonte: Autora, 2025.

Outro fator de resistência em *C. albicans* é a superexpressão da bomba de efluxo, reduzindo o acúmulo de azóis no interior da célula, podendo estar relacionado ao fenótipo de resistência do biofilme aos medicamentos. Os transportadores de cassetes de ligação (CDR1 e CDR2) ao ATP e o principal transportador facilitador (MDR1) são comumente expressos em baixos níveis, mesmo quando não há antifúngico presente, no entanto, a transcrição de MDR1 e CDR1 é mais expressiva em biofilme de *C. albicans* do que em células planctônicas no período de 24 horas, com a expulsão dos antifúngicos de dentro da célula viabilizando a sobrevivência do micro-organismo (Taff *et al.*, 2013; Esfahani *et al.*, 2024).

2.1.2 Criptococose

A criptococose é uma doença causada por *C. neoformans* e *C. gattii*, após a inalação de leveduras por pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes, possuindo capacidade de agir como patógenos primários. Anteriormente era associada à única espécie desse fungo, o *C. neoformans*, contudo, métodos moleculares baseados no sequenciamento de genoma propõem segmentar em *C. neoformans* e *C. gattii* (*C. gattii*, *C. bacillisporus*, *C. deuterogattii*, *C. tetragattii* e *C. decagattii*) (May *et al.*, 2016).

Uma nova espécie, *C. deneoformans*, é utilizada para se referir a *C. neoformans* var. *neoformans*, que é amplamente encontrada em solos ricos de matéria orgânica e fezes de pombos. É uma levedura encapsulada por polissacarídeos, sendo o glucuronoxilmanano o componente majoritário, que a protege do sistema imunológico do paciente, inviabilizando a fagocitose pelos glóbulos brancos. É responsável pela virulência, afetando o sistema nervoso central (SNC), o trato respiratório e a pele (Zhao *et al.*, 2023).

As manifestações clínicas que afetam o SNC desencadeiam meningite, responsável pelas taxas de mortalidade por essa infecção. Também ocorre formação de criptocomas, que são lesões em massas causadas no tecido focal, além da ocorrência de manifestações que atingem o trato respiratório, com acometimento do pulmão, após inalação de células infecciosas, causando pneumonia criptocócica, e aquelas que atingem a pele, causando criptococose cutânea em feridas abertas (Huong *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2023).

C. gattii é endêmica no Norte e Nordeste do Brasil, apresentando coeficiente de letalidade entre 30 e 40% em relação aos pacientes infectados. Essa espécie possui cápsula polissacarídica maior em diâmetro quando comparada ao *C. neoformans* (3,48 µm e 2,73 µm, respectivamente) (Veiga *et al.*, 2020).

Com relação ao tratamento (Quadro 2), esse é dividido em fase de indução, fase de consolidação e fase de manutenção. A fase de indução tem a finalidade de eliminar uma quantidade significativa de micro-organismos, empregando anfotericina B em associação com a flucitosina, tendo duração de duas semanas; a fase de consolidação tem a finalidade de manter reduzida a carga fúngica ou negativação diagnóstica, conforme protocolo clínico, utiliza o fluconazol e tem duração de oito semanas; enquanto que a fase de manutenção ou supressão é dependente do estado imunológico do indivíduo, geralmente o paciente é portador de HIV ou transplantado, e o período de tratamento é de um ano com o uso de fluconazol ou itraconazol (Cavalcante; Ferreira, 2022).

Quadro 2. Tratamento antifúngico da criptococose.

CLASSE	EFEITO	ANTIFÚNGICO	TRATAMENTO	REFERÊNCIA
POLIENOS	Interação com o ergosterol fúngico, alterando a permeabilidade celular	Anfotericina B	Criptococose (terapia de indução)	Peixoto <i>et al.</i> , 2014; Pappas <i>et al.</i> , 2016; Brasil, 2019; Cavassin <i>et al.</i> , 2021; WHO, 2022b
ANÁLOGOS DE PIRIMIDINAS	Inibe o metabolismo de pirimidina e a síntese de ácido nucleico	Flucitosina	Criptococose (terapia de indução) em associação com a anfotericina B	Baddley; Forrest, 2019; Brasil, 2019; WHO, 2022b
AZÓLICO	Inibição da síntese de ergosterol e bloqueio da enzima 14- α -lanosterol-demetilase	Fluzonazol	Criptococose (terapia de consolidação e manutenção)	Peixoto <i>et al.</i> , 2014; Sueh-Santiago <i>et al.</i> , 2015; Brasil, 2019; WHO, 2022b
		Itraconazol	Criptococose (terapia de manutenção)	Peixoto <i>et al.</i> , 2014; Sueh-Santiago <i>et al.</i> , 2015; Brasil, 2019; WHO, 2022b

Fonte: Autora, 2025.

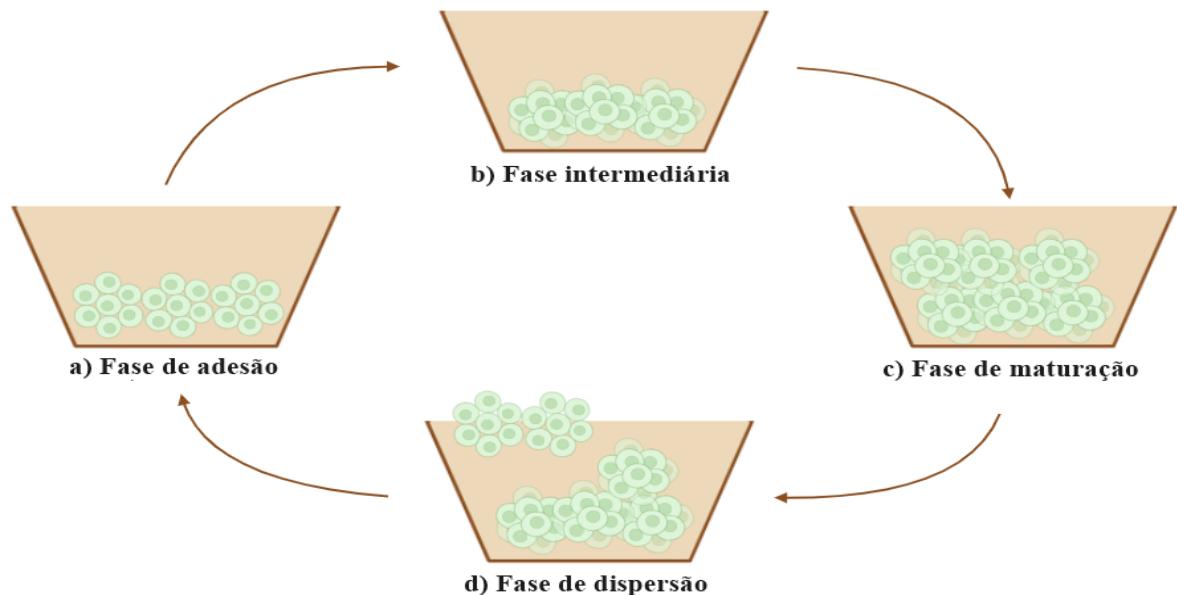
Apesar dos antifúngicos potencialmente capazes de combater infecções causadas por leveduras de interesse clínico, a resistência corrobora com a dificuldade encontrada no combate à criptococose e sua resistência inata às equinocandinas (Machado, 2022). Além disso, efeitos colaterais como nefrotoxicidade causada pela anfotericina B também são problemas enfrentados no tratamento de infecções fúngicas, sugerindo a associação com outro antifúngico (Baddeley; Forrest, 2019).

Nesse cenário, *C. neoformans* e *C. gattii* apresentam mecanismos de resistência adicionais, como os genes transportadores de bomba de efluxo *Afr1*, *Afr2* e *Mdr1*, pertencentes à família de transportadores ABC, que corresponde à família de transportadores de ATP dependentes, que bombeiam aminoácidos, proteínas, íons e outros compostos hidrofóbicos, como os azóis, para fora das células fúngicas e contra o gradiente de concentração (Prasad; Panwar; Smriti, 2002; Chang *et al.*, 2018). O gene *Afr1* é essencial para o efluxo em *C. neoformans*, e desempenha um papel importante na expulsão de outros compostos, caracterizando esse gene como um dos principais fatores da resistência clínica ao fluconazol (Chang *et al.*, 2018).

Outro fator de resistência do gênero *Cryptococcus* é a formação de biofilme em tecidos vivos e superfície abiótica (Figura 2), que se inicia com a fase de adesão, processo que ocorre

entre 2 e 4 horas com a fixação de células em superfície, seguida da fase intermediária, que ocorre entre 4 e 16 horas, formando microcolônias em quantidade significativa. Depois acontece a fase de maturação, entre 24 e 48 horas, estágio de alta e estável atividade metabólica que facilita a crescente quantidade de material extracelular, viabilizando a microarquitetura do biofilme criptocócico, e por fim, ocorre a fase de dispersão, que ocorre após 72 horas, em que as células começam a se desprender e passam a colonizar outros sítios, buscando a viabilidade de nutrientes em ambiente formidável para trocas energéticas (Martinez; Casadevall, 2015; Tavares *et al.*, 2019).

Figura 2. Formação de biofilme criptocócico em superfície biótica ou abiótica.



a) **Fase de adesão:** processo que ocorre entre 2 e 4 horas com a fixação de células; b) **fase intermediária:** ocorre entre 4 e 16 horas, formando microcolônias em quantidade significativa; c) **fase de maturação:** entre 24 e 48 horas, estágio de alta e estável atividade metabólica, viabilizando a microarquitetura do biofilme criptocócico; d) **fase de dispersão:** ocorre após 72 horas, quando as células começam a se desprender e passam a colonizar outros locais (Martinez; Casadevall, 2015; Tavares *et al.*, 2019).

Fonte: Autora, 2025.

2.2 Modo de ação do tratamento farmacológico da candidíase e criptococose

As terapias farmacológicas da candidíase e criptococose utilizam medicamentos semelhantes, alternando a dose e posologia. Os polienos possuem ação antifúngica através da afinidade com o ergosterol presente no fungo, desestabilizando e extravasando o material intracelular (Campos *et al.*, 2020). Em associação com a flucitosina, que é um análogo de pirimidina, a anfotericina B lipossomal é utilizada como terapia de indução e a ação da

flucitosina ocorre através da inibição do mecanismo de pirimidina e a síntese de ácidos nucleicos, impedindo a replicação da levedura (Henao-Martinez; Chastain; Franco-Paredes, 2018).

Os azólicos, que incluem os triazóis fluconazol, itraconazol e terconazol, e os imidazóis miconazol, clotrimazol e cetoconazol, possuem ação fungistática e são inibidores da 14- α -lanoesterol-dimetilase dependente do citocromo P450 e, consequentemente, também da biossíntese de ergosterol (Moraes; Felix; Badin, 2022).

A classe antifúngica equinocandina é eficaz contra leveduras resistentes aos azóis e formadoras de biofilmes. É representada pela caspofungina, micafungina e anidulafungina e possui ação antifúngica devido à interferência na síntese de β -glucanos, que formam ligações cruzadas fundamentais entre proteínas e quitinas, causando lise na parede celular (Rocha *et al.*, 2021).

O ácido bórico é um ácido inorgânico fraco, fungistático, e seu mecanismo de ação não está totalmente elucidado. Na prática, é utilizado 600 mg/dia como tratamento alternativo para tratar candidíase vulvovaginal recorrente, infecções por cepas de *Candida* resistentes aos azólicos ou infecções por outras espécies de *Candida* (Chew; Than, 2016).

2.3 Síntese de compostos com potenciais antifúngicos

A pesquisa translacional surgiu como uma abordagem para acelerar a aplicação dos resultados da pesquisa básica na prática clínica, promovendo o acesso de produtos, políticas e práticas aos usuários, envolvendo a criação de conhecimento e sua aplicação para gerar benefícios para a sociedade (Colombo; Anjos; Antunes, 2019).

Diante disso, os pesquisadores são constantemente instigados a analisar e estudar moléculas antifúngicas, passando por diferentes fases de estudos, iniciando da síntese até o pós-clínico (Cortés *et al.*, 2019).

Com relação aos compostos obtidos por síntese orgânica, existem várias rotas para obtenção das 1,2,4-oxadiazóis 3,5-dissubstituídos e as mais estratégicas são pela cicloadição 1,3-dipolar de nitrilas e N-óxidos de nitrila ou pela formação de *O*-acilamidoxima, seguida de desidratação (Freitas *et al.*, 2012).

Os oxadiazóis correspondem a uma classe de compostos heterocíclicos contendo cinco membros, sendo três deles, heteroátomos de oxigênio e nitrogênio. Apresentam propriedades antifúngica, antibacteriana, antitumoral, entre outras, principalmente pelos 1,2,4-oxadiazóis 3,5-dissubstituídos (Freitas-Filho *et al.*, 2015).

Na década de 1960, três oxadiazóis se destacaram quando ao seu efeito farmacológico, sendo a oxolaminas, libexina e irrigor, respectivamente, dois antitussígenos, e o último, vasodilatador coroniano e anestésico local (Freitas *et al.*, 2012).

Em estudo realizado por Kumar *et al.*, (2011), foram obtidos 1,2,4-oxadiazóis e seus bioisósteros, 1,3,4-oxadiazol e 1,3,4-tiadiazol, em sua estrutura apresentando o grupo ciclopentiloxi ou n-butilóxi na posição C3 do anel aromático e do 4-piperdinila ou triclorometila na posição C5 do anel oxadiazólico. Esses compostos foram submetidos à avaliação de atividade anticâncer em órgãos humanos, incluindo a mama, a próstata e o pâncreas.

Contudo, os estudos utilizando 1,2,4-oxadiazol vem explorando seus diferentes potenciais biológicos, principalmente com finalidade farmacológica. Ele está presente em medicamentos empregados na prática clínica, viabilizado pela propriedade eletrofílica ou nucleofílica associada aos seus átomos do núcleo, garantindo estabilidade em meio fisiológico e no produto ou medicamento (Aguiar; Cunha, 2015). Por isso, essa tese estuda oxadiazóis com a finalidade de apresentar compostos com atividade anti-*Candida* e anti-*Cryptococcus*.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a atividade antifúngica de quinze compostos oxadiazóis de frente ao gênero *Candida* e *Cryptococcus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração inibitória mínima dos oxadiazóis frente linhagens de *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp.;
- Determinar a concentração fungicida mínima dos compostos sintéticos frente às cepas leveduriformes;
- Avaliar a cinética de crescimento dos micro-organismos diante dos compostos;
- Analisar as alterações morfológicas nas estruturas de virulência do gênero *Candida* e na espessura da cápsula do gênero *Cryptococcus*;
- Analisar a ação antibiofilme;
- Verificar se a substância-teste interfere na biossíntese de ergosterol em *Candida albicans*;
- Avaliar se a substância-teste modula vias de sinalização associadas ao farnesol em *Candida albicans*;
- Analisar o comportamento dos micro-organismos na presença do inibidor da bomba de efluxo combinado à substância-teste.
- Investigar os efeitos sinérgicos, indiferente ou antagônico da associação da substância-teste com a anfotericina B.

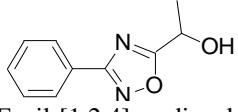
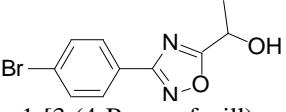
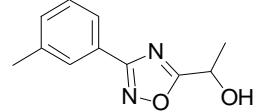
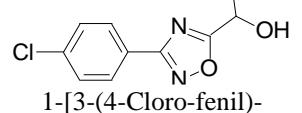
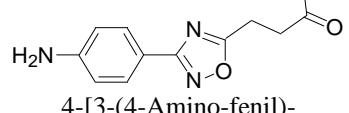
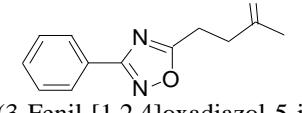
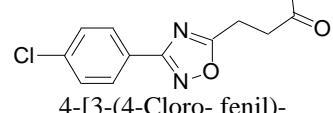
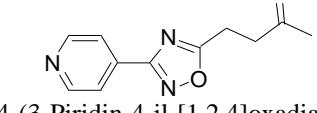
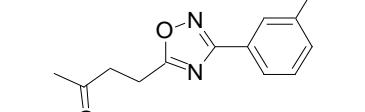
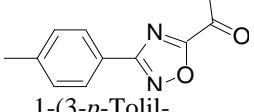
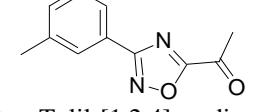
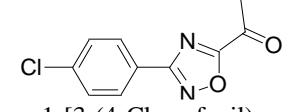
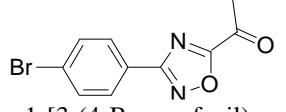
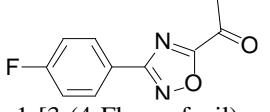
4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Substâncias-teste e substâncias padrão

Os compostos oxadiazóis foram produzidos no Laboratório de Química Orgânica e Medicinal, no Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande e cedidas pelo Professor Drº Juliano Carlo Rufino de Freitas.

Ao todo foram utilizados 15 compostos (Quadro 3) oxadiazóis: SFM-1, SFM-3, SFM-5, SFM-9, SFM-11, JFOX-1, JFOX-2, JFOX-3, JFOX-4, JFOX-5, JFOX-6, JFOX-7, JFOX-8, JFOX-9, JFOX-10, solubilizados com DMSO 1% e diluídos em água destilada esterilizada.

Quadro 3. Estruturas e os respectivos nomes das substâncias-teste utilizadas no estudo.

SFM-1  1-(3-Fenil-[1,2,4]oxadiazol-5-il)-etanol	SFM-3  1-[3-(4-Bromo-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-5-il]-etanol	SFM-5  1-(3-m-Tolil-[1,2,4]oxadiazol-5-il)-etanol
SFM-9  1-[3-(4-Cloro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-5-il]-etanol	SFM-11  1-[3-(4-Nitro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-5-il]-etanol	JFOX-1  4-[3-(4-Amino-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-5-il]-butan-2-ona
JFOX-2  4-(3-Fenil-[1,2,4]oxadiazol-5-il)-butan-2-ona	JFOX-3  4-[3-(4-Cloro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-5-il]-butan-2-ona	JFOX-4  4-(3-Piridin-4-il-[1,2,4]oxadiazol-5-il)-butan-2-ona
JFOX-5  4-(3-m-Tolil-[1,2,4]oxadiazol-5-il)-butan-2-ona	JFOX-6  1-(3-p-Tolil-[1,2,4]oxadiazol-5-il)-etanona	JFOX-7  1-(3-m-Tolil-[1,2,4]oxadiazol-5-il)-etanona
JFOX-8  1-[3-(4-Cloro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-5-il]-etanona	JFOX-9  1-[3-(4-Bromo-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-5-il]-etanona	JFOX-10  1-[3-(4-Fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-5-il]-etanona

Fonte: Autora, 2025.

A anfotericina B (Sigma-Aldrich[®]) e o fluconazol (Farmafórmula[®]), foram adquiridas comercialmente e utilizadas nos testes como antifúngicos padrão. A anfotericina B foi diluída e solubilizada em água destilada estéril com DMSO 1%, concentração suficiente de DMSO para não interferir no crescimento fúngico (Costa *et al.*, 2011). O fluconazol foi diluído e solubilizado em água destilada esterilizada.

Foi realizado o controle de DMSO na mesma concentração de solubilização dos compostos com a finalidade de avaliar a interferência no crescimento das leveduras.

4.2 Micro-organismos e preparação do inóculo

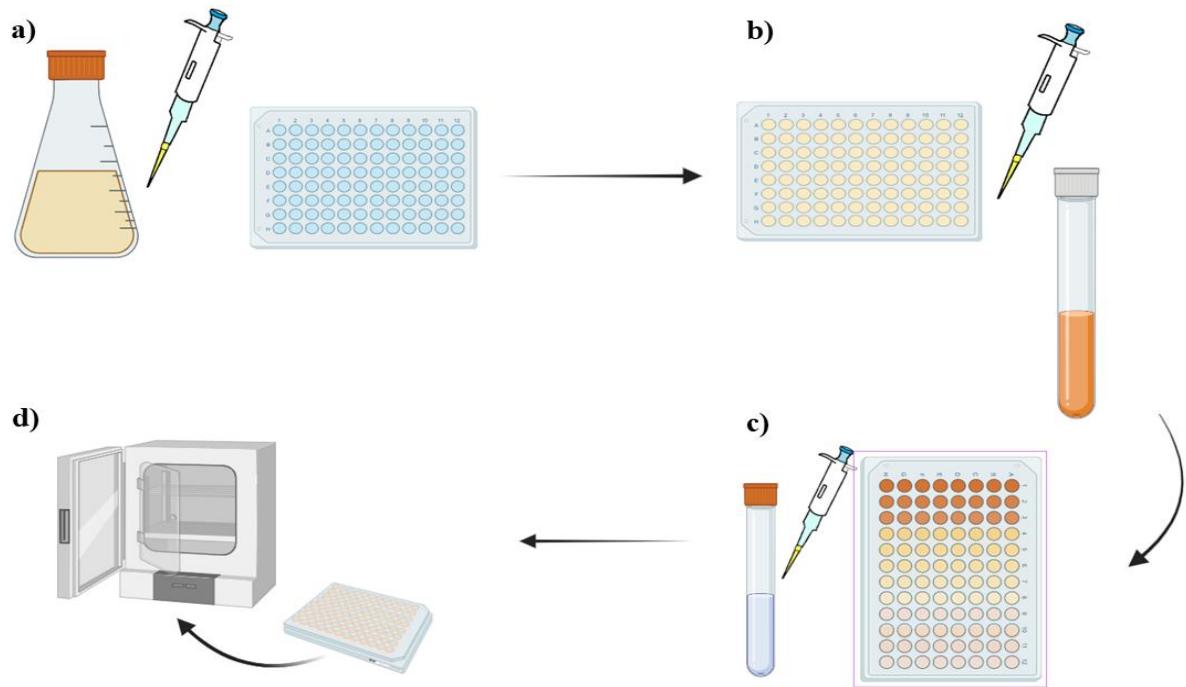
Foram utilizadas as cepas *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* ATCC-32269 e *C. neoformans* ATCC-66031, *Candida albicans* ATCC-10231, *C. albicans* ATCC-60193, *C. parapsilosis* ATCC-22019, *C. tropicalis* ATCC-750, *C. tropicalis* ATCC-13803, *C. glabrata* ATCC-90030 (*Nakaseomyces glabrata*), *C. krusei* CBS-573 (*Pichia kudriavzevi*) e *C. krusei* ATCC-6258 (*Issatchenka orientalis*), estocadas em meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) sob refrigeração à 4 °C.

Para o inóculo, uma alíquota de micro-organismo foi retirada e suspensa em tubo contendo 5 mL de NaCl a 0,85% estéril e ajustada comparando com a escala de 0,5 McFarland (1-5 x 10⁶ UFC/mL) (Cleeland; Squires, 1991; Hadacek; Greger, 2000; Andrade *et al.*, 2017).

4.3 Determinação da concentração inibitória mínima

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos derivados de oxadiazóis, foi utilizada a técnica de microdiluição, conforme descrita a norma EUCAST E.Def 7.4 (EUCAST, 2023). Inicialmente, foram distribuídos 100 µL do Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) duplamente concentrado em placas de 96 poços e fundo em “U”. Depois, foi adicionado 100 µL da substância-teste na primeira linha da placa e, em seguida, foi realizada a diluição seriada em razão de 2, partindo de 1024 até 4 µg/mL. Foi adicionado 10 µL de inóculo em cada cavidade da placa, que foi incubada a 35 °C por 24 e 48 horas para os gêneros *Candida* e *Cryptococcus*, respectivamente (Figura 3).

Figura 3. Metodologia para determinação da Concentração Inibitória Mínima pela técnica de microdiluição.



a) Adição do meio de cultura duplamente concentrado, b) Adição da substância na primeira linha da placa de microdiluição c) Realização da microdiluição seriada em razão de 2 e adição do inóculo previamente preparado e ajustado em 0,5 Mac Farland, d) Incubação em estufa.

Fonte: Autora, 2025.

Foram realizados os controles positivos, para avaliar a viabilidade dos micro-organismos (meio de cultura e inóculo na ausência da substância), e os controles negativos, para avaliar a esterilidade do meio de cultura (meio de cultura na ausência do-micro-organismo) e ausência de contaminantes das substâncias (meio de cultura e substâncias, na ausência do micro-organismo).

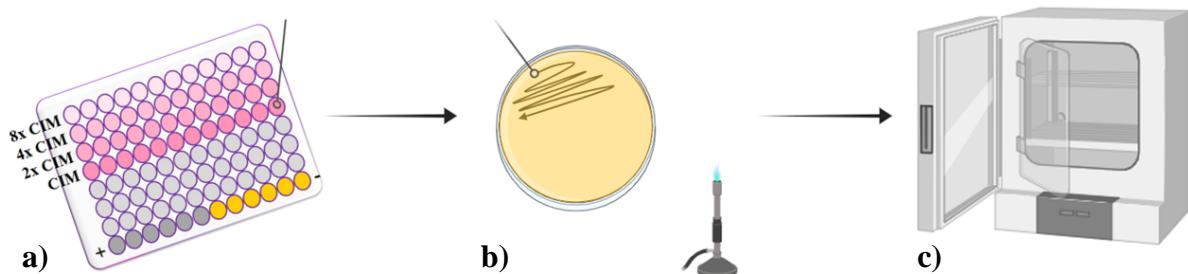
4.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima

Uma vez determinada a CIM, a etapa seguinte envolveu a determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM), através da técnica de subcultivo. Alíquotas de 10 µL dos poços da placa de microdiluição, que não houve crescimento microbiano visível, foram semeados em placas de Petri contendo meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), como ilustrado na Figura 4.

As placas de Petri foram incubadas em estufa à 35 °C, por 24 e 48 horas, para os gêneros *Candida* e *Cryptococcus*, respectivamente. Após completar o período de incubação, as placas de Petri foram analisadas, considerando CFM a mais baixa concentração da substância

que inibiu o crescimento fúngico em até três unidades log de UFC (Klepser *et al.*, 1998; Nóbrega *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2018).

Figura 4. Subcultivo de 10 µL dos poços que não apresentou crescimento microbiano.



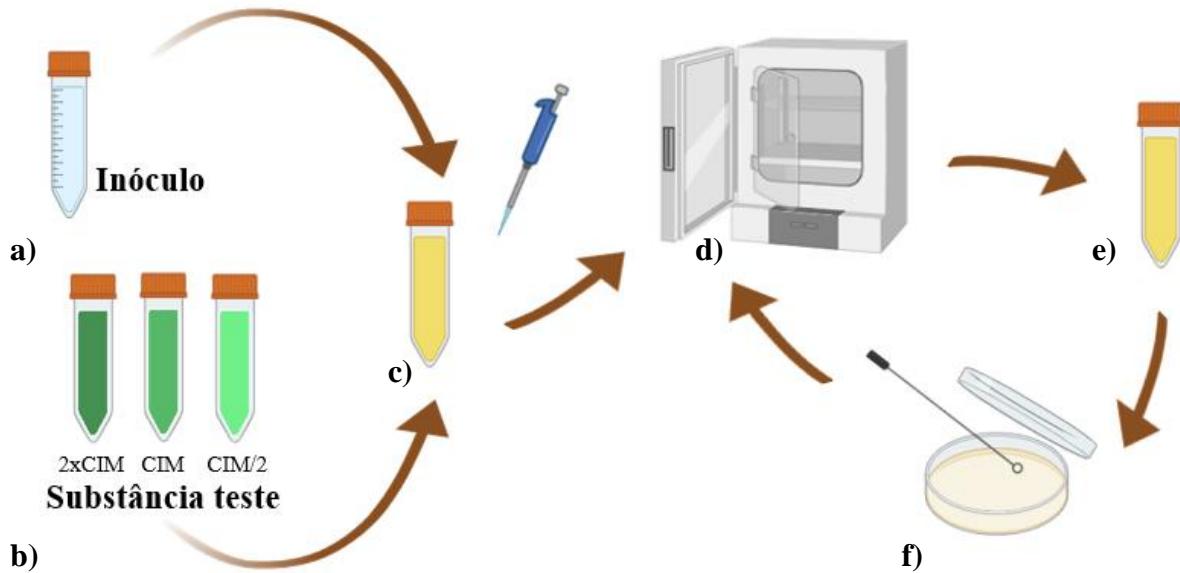
a) Retirada de 10 µL dos poços que não apresentaram crescimento microbiano visível e b) Semeadura em placa de Petri contendo ÁSD estéril. c) Incubação das placas em estufa bacteriológica.

Fonte: Autora, 2025.

4.5 Análise da cinética de crescimento microbiana

O teste da cinética de crescimento para analisar as ações ao longo do tempo contra *C. neoformans* ATCC-66031 e *C. albicans* ATCC-10231 foi realizado, utilizando CIM e 2xCIM de JFOX-6, fluconazol e anfotericina B, para avaliar suas atividades fungistática e fungicida. Para isto, foi adicionado o inóculo em CSD contendo as diferentes concentrações das substâncias, que foram incubadas a 37 °C durante o período de 0, 2, 6 e 24 horas. Após os respectivos períodos de incubação, foi retirada uma alíquota de 10 µL de cada tudo e, uniformemente, foi semeada em placa de Petri contendo ASD. As placas foram incubadas em estufa à 37 °C durante 24 horas. Após o período de incubação, foi realizada a comparação dos efeitos das substâncias-teste, fluconazol e anfotericina B através da contagem de UFC/mL com o respectivo inóculo inicial (tempo zero) (Figura 5). Este experimento foi realizado em triplicata. A ação foi considerada fungicida quando reduzir mais que $3\log_{10}$ ou 99,9 % de UFC/mL ao comparar com o inóculo inicial (Klepser *et al.*, 1998; Lewis *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2013; Shrestha *et al.*, 2015).

Figura 5. Esquematização da cinética de crescimento microbiana.



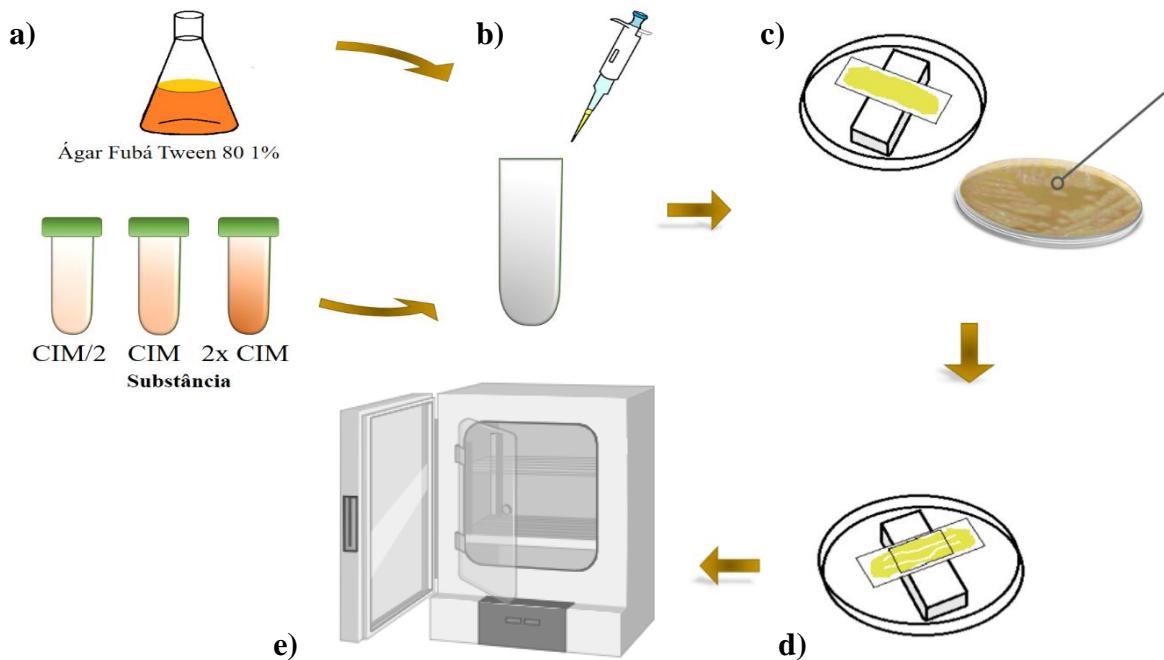
a) Tubo com inóculo; b) Tubos com diferentes concentrações de substância teste; c) Adição dos tubos A e B em CSD; d) Incubação do Tubo C em diferentes tempos (0, 2, 6 e 24 horas); e) Cultivo de 10 µL em placa de Petri contendo ASD após os respectivos períodos de incubação; f) Incubação das placas de Petri em estufa a 37 °C por 24 horas.

Fonte: Autora, 2025

4.6 Efeito das substâncias na morfologia das leveduras

A molécula JFOX-6 foi analisada frente às características morfológicas de *Candida* e *Cryptococcus*, através da técnica de microcultivo (Kurtzman; Fell, 1998; Sidrim; Rocha, 2004). Foram utilizadas câmaras úmidas estéreis contendo uma lâmina sobre um suporte em seu interior. Inicialmente, 1 mL de meio ágar Fubá-Tween 80 1,5%, contendo CIM, 2x CIM e 4x CIM da JFOX-6 foi adicionado, e foram semeadas duas estrias paralelas do micro-organismo recém cultivado. Em seguida, uma lamínula previamente esterilizada pela chama do bico de Bunsen foi adicionada, com auxílio de uma pinça, também previamente esterilizada pela chama. Por fim, 2 a 3 mL de água destilada esterilizada foram adicionados sobre o papel filtro estéril presente no interior das câmaras úmidas, para evitar o ressecamento do meio de cultura. As câmaras úmidas foram tampadas e incubadas a 35 °C, por 48 horas, para *C. neoformans* ATCC-66031 e *C. gattii* ATCC-32269, e por até cinco dias para *C. albicans* ATCC-10231 e *C. tropicalis* ATCC-750 (Figura 6). Câmaras úmidas contendo Ágar Fubá Tween 80 1,5% também foram preparadas com a ausência das substâncias, cultivando as leveduras na ausência das drogas com a finalidade de verificar as estruturas características de cada espécie.

Figura 6. Ilustração da técnica de microcultivo de micro-organismos.



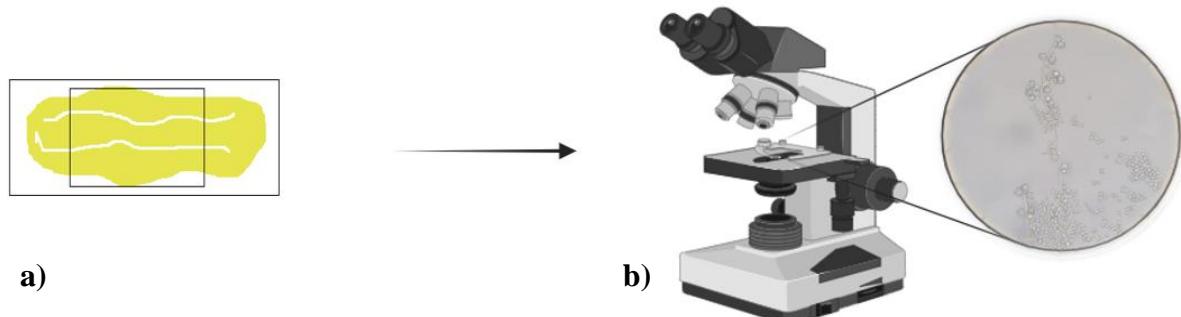
a) Adição de diferentes concentrações das drogas ao meio de cultura, b) Adição do meio de cultura à lâmina presente na câmara úmida, c) Realização de estrias paralelas do micro-organismo recém repicado, d) Adição da lamínula, e) Incubação da câmara úmida em estufa.

Fonte: Autora, 2025.

Após os respectivos períodos de incubação, as lâminas do microcultivo das cepas de *Candida* foram retiradas das câmaras úmidas e submetidas à análise por microscopia ótica (Figura 7), na objetiva de aumento de 40x, percorrendo toda a lâmina, com a finalidade de verificar as alterações nas estruturas de virulência de *C. albicans* (blastoconídeo, pseudo-hifas e clamidoconídeo) e *C. tropicalis* (pseudo-hifas e blastoconídeos).

As lamínulas das câmaras úmidas referentes às espécies de *Cryptococcus* foram retiradas e adicionadas a uma nova lâmina contendo uma gota da tinta Nanquim para a análise em microscopia óptica, na objetiva de aumento de 40x, utilizando o microscópio ótico NOVEL BM 2100, acoplado a uma câmara filmadora TUCSEN Model ISH 500, com auxílio do programa TCapture, com o intuito de verificar as alterações na cápsula polissacarídica do micro-organismo, um importante fator de virulência desse gênero. Toda a lâmina foi percorrida e foi feita a média de sessenta células referentes a cada concentração para comparação com a média da espessura da cápsula das células de *Cryptococcus* spp. na ausência das drogas (controle) (Brasil, 2004; Cardoso *et al.*, 2016) (Figura 8).

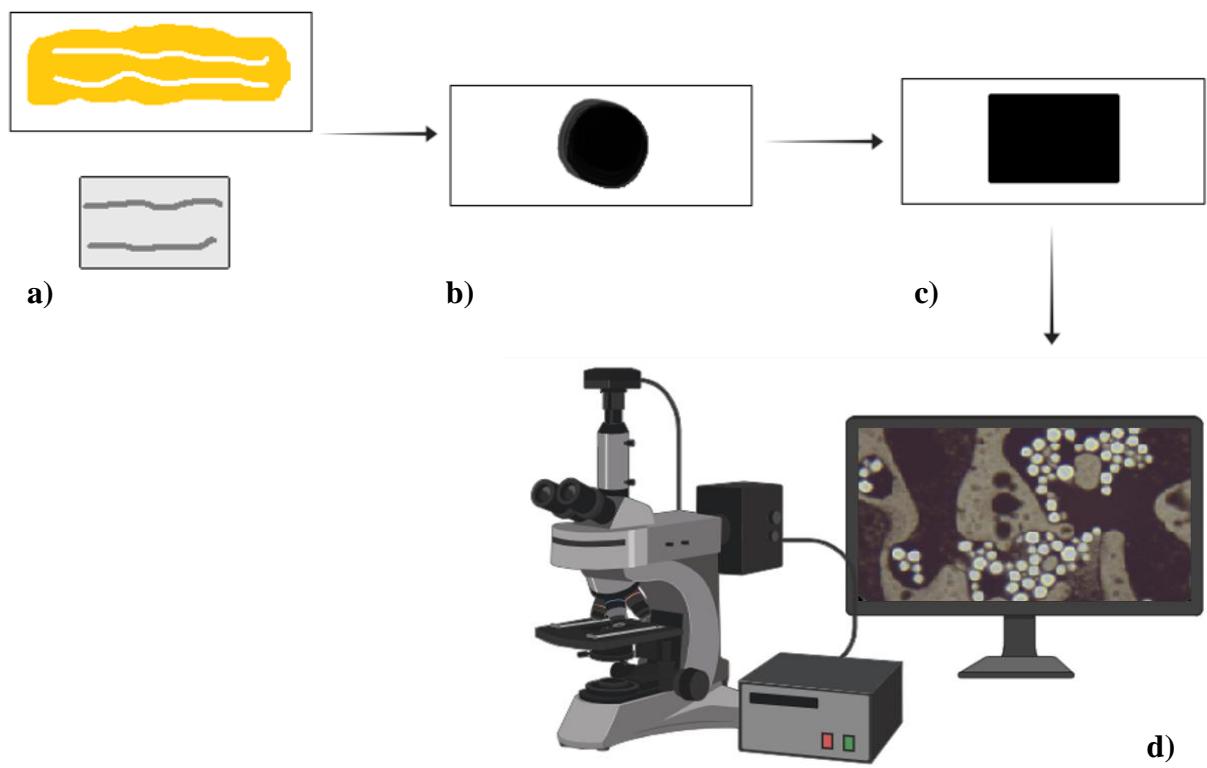
Figura 7. Análise de lâminas de microscopia de *Candida* spp.



a) Lâmina de microscopia de *Candida* spp., b) Observação em microscópio ótico com aumento de 400 vezes, com a finalidade de analisar o comportamento das substâncias em diferentes concentrações e verificar a ocorrência de alterações nas estruturas de virulência desse gênero.

Fonte: Autora, 2025.

Figura 8. Análise de lâminas de microscopia de *Cryptococcus* spp.



a) Lâmina de microscopia de *Cryptococcus* spp, b) Nova lâmina com uma gota de tinta Nanquim, c) Adição de lamínula e d) Análise em microscópio ótico com aumento de 400 vezes, com a finalidade de verificar alterações na espessura da cápsula, após presença de substância-teste e substância padrão em diferentes concentrações.

Fonte: Autora, 2025.

4.7 Análise da capacidade do micro-organismo produzir biofilme

A habilidade de *C. neoformans* ATCC-66031, *C. gattii* ATCC-32269, *C. albicans* ATCC-10231 e *C. tropicalis* ATCC-750 formarem biofilme foi analisada pela técnica do cristal

violeta (Shao *et al.*, 2019; Araújo *et al.*, 2021; Lavaee; Motamedifar; Rafiee, 2022; Wulansari, 2023). Inicialmente, para testar a formação da película de biofilme, 100 µL de CSD foi adicionado em microplacas de 96 poços e fundo chato, seguido do acréscimo de 10 µL de inóculo de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. gattii* e *C. neoformans*, previamente ajustado na escala de 0,5 Mc Farland. As microplacas foram incubadas em estufa à 37 °C, por 90 minutos, 4, 6, 24, 48, 72 e 96 horas.

Após os respectivos períodos de incubação, os poços da microplaca foram cuidadosamente lavados com solução salina 0,9% estéril e deixados para secar por 1 hora em temperatura ambiente, depois foi adicionado 200 µL de cristal violeta 1% em cada poço, e foram corados por 30 minutos. Em seguida, os poços foram novamente lavados e foi adicionado 200 µL de etanol absoluto, aguardando por 30 minutos a solubilização do corante com etanol absoluto. O biofilme foi quantificado em um leitor de microplaca ELISA (KASUAKI®) com filtro de 630 nm.

No entanto, com o intuito de compensar a absorbância do meio de cultura inseridos nos microtubos, microtubos contendo somente caldo sabouraud dextrose (branco) passaram pelas etapas acima citadas. Os valores de DO_{Branco} (0,062) foram descontados das leituras realizadas e foi considerada produtora de biofilme quando superior a três desvios padrão (DP) acima da média de DO do controle negativo (> 0,070) (Stepanović *et al.*, 2007):

$$\text{DO}_{\text{Branco}} = \text{Média de DO controle negativo} + (3 \times \text{DP controle negativo})$$

4.8 Ensaio da interferência de JFOX-6 na formação de biofilme fúngico

Uma vez comprovada a capacidade de *C. neoformans* ATCC-66031, *C. gattii* ATCC-32269, *C. albicans* ATCC-10231 e *C. tropicalis* ATCC-750 formarem biofilme, foi analisado se a JFOX-6 possui capacidade de inibir o biofilme fúngico, e esses efeitos foram comparados com a ação da anfotericina B. Em uma microplaca de 96 poços e fundo chato, foi adicionado 100 µL de caldo sabouraud dextrose, em seguida foram adicionados 100 µL das substâncias em diferentes concentrações (1/2 CIM, CIM e 2x CIM), e depois foram adicionados 20 µL de inóculo previamente ajustado na escala de 0,5 Mc Farland. As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24, 48, 72 e 96 horas, com a finalidade de verificar se as substâncias interferem nos estágios de maturação e dispersão do biofilme (Figura 9).

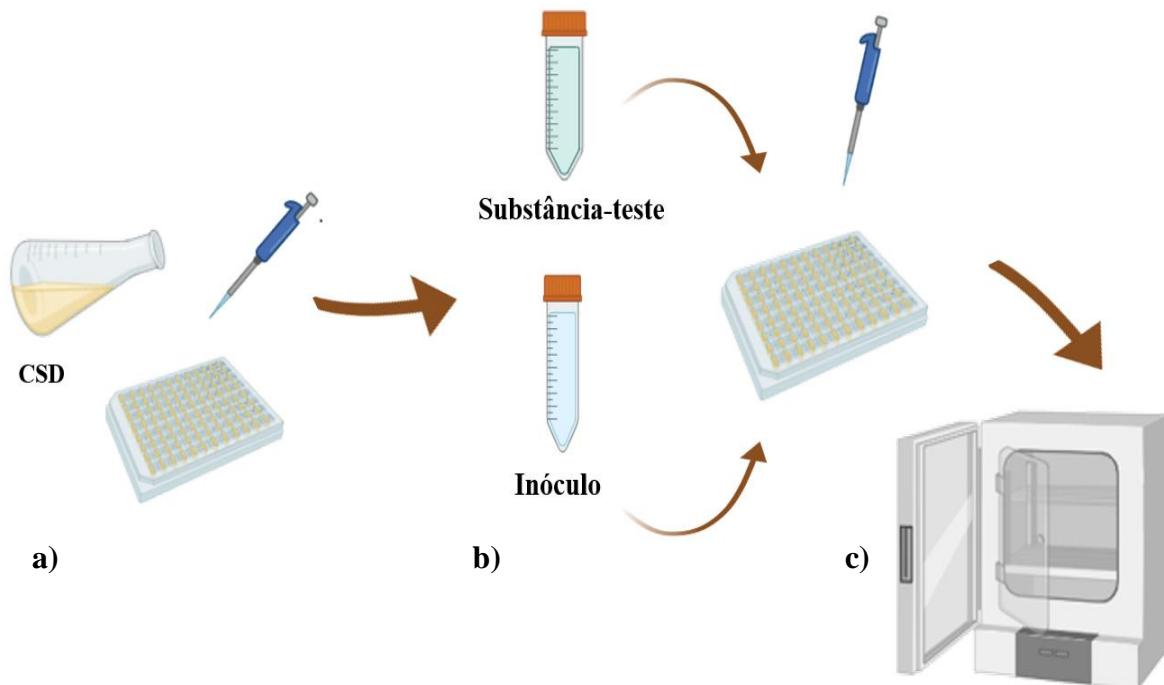
Após o período de incubação, as microplacas foram lavadas com solução salina 0,9% estéril (figura 10), secados em temperatura ambiente por 1 hora e corados por 30 minutos com cristal de violeta 1%. Novamente, as microplacas foram cuidadosamente lavadas com água

destilada e 300 µL de etanol absoluto foi adicionado. Após 30 minutos, o biofilme foi quantificado em um leitor de microplaca ELISA (KASUAKI®) com filtro de 630 nm.

Para compensar a absorbância do meio de cultura, novamente a DO_{Branco} foi descontada das leituras realizadas dos poços da microplaca referentes ao micro-organismo na presença das substâncias-teste (1/2 CIM, CIM e 2xCIM). Foi também calculada a inibição percentual da formação do biofilme por meio da diferença da D.O. dos poços contendo microrganismo na ausência (controle) e presença da substância-teste (tratado) em razão da D.O. do poço contendo microrganismo na ausência da substância-teste, classificando a inibição como fraca (< 40%), moderada (entre 40 e 80%) e forte (> 80%) (Pagano *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2021):

$$\% \text{ de inibição de formação} = \frac{(DO \text{ microtubo controle} - DO \text{ microtubo tratado})}{DO \text{ microtubo controle}} \times 100$$

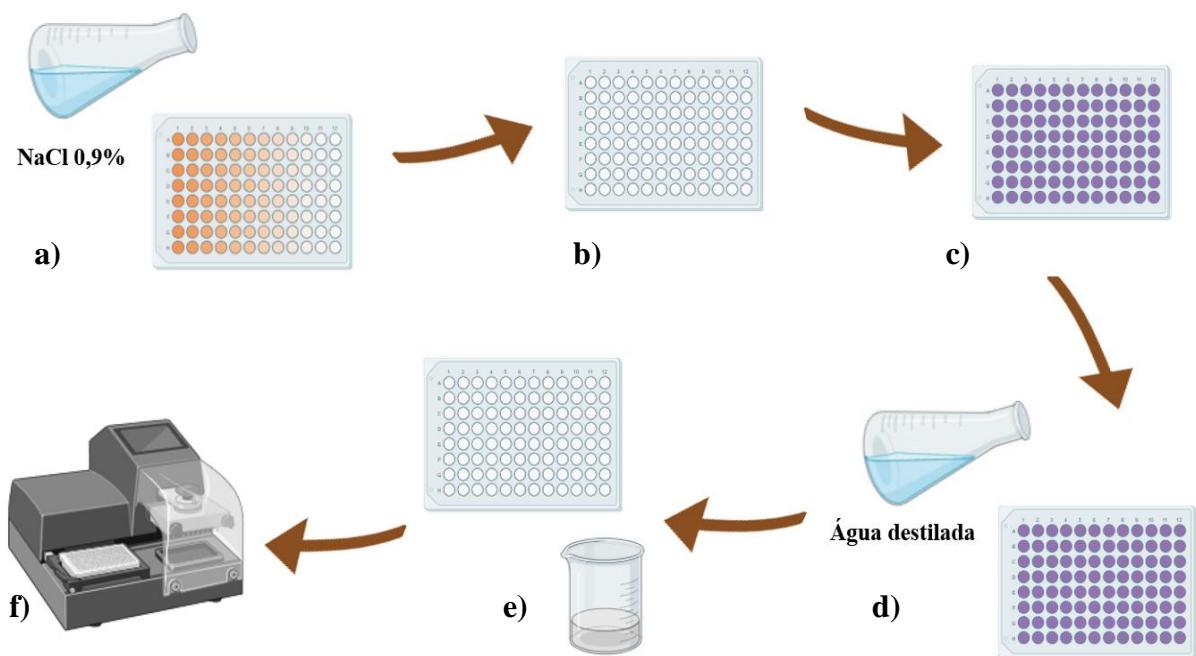
Figura 9. Ilustração da técnica de análise do biofilme de leveduras no estágio de maturação.



a) Adição do meio de cultura CSD em poço da microplaca. b) Adição de diferentes concentrações das substâncias teste e substância padrão e depois, o inóculo. c) Microplacas foram tampadas e incubadas à 37 °C por 24, 48, 72 e 96 horas.

Fonte: Autora, 2025.

Figura 10. Esquema da técnica de coloração de biofilme dos micro-organismos, na ausência e presença de oxidiazóis, utilizando cristal violeta.



a) A microplaca de 96 poços e fundo chato foi retirada da estufa e lavada com solução salina 0,9% estéril, b) e secaram em temperatura ambiente por 1h. c) Após esse período, foi adicionado o cristal violeta 1% e aguardou corar por 30 minutos. d) Os poços da microplaca foram novamente lavados e e) foi adicionado o etanol absoluto, aguardando descorar por 20 minutos. f) O conteúdo dos poços foi quantificado em um leitor de microplaca com filtro de 630 nm.

Fonte: Autora, 2025.

4.9 Análise da extração e quantificação do ergosterol de *Candida*

Para análise do ergosterol das células fúngicas (Figura 11), a extração ocorreu conforme descrito por Arthington-Skaggs, Warnock e Morrison (2000), com modificações. Inicialmente, o micro-organismo *C. albicans* ATCC-60193 foi inoculado em tubos contendo CSD e JFOX-6 nas concentrações de 1/2 CIM, 1/4 CIM e 1/16 CIM. As culturas foram incubadas a 35 °C por 24 horas.

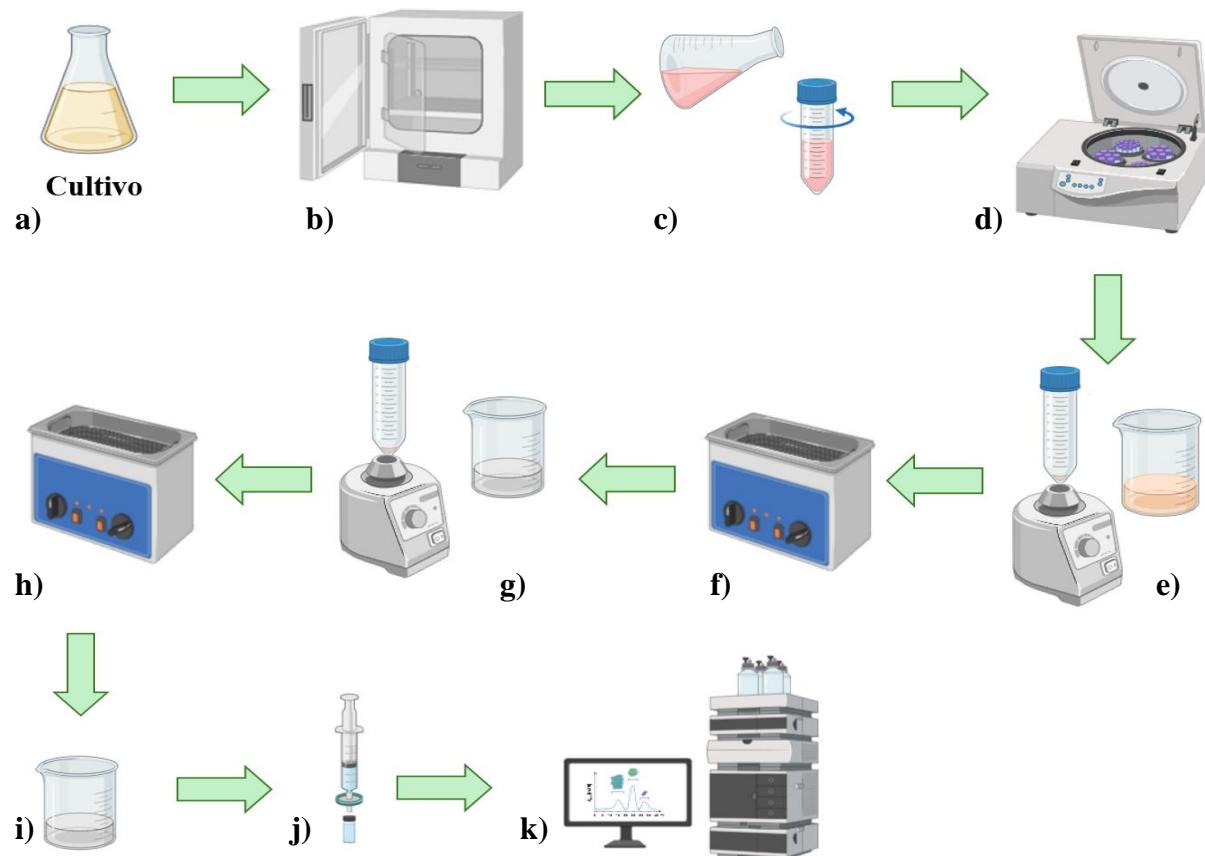
Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos e o peso úmido dos sedimentos foi determinado. Em seguida, foram adicionados 3 mL da solução de hidróxido de potássio alcoólico a 25% (25 g de KOH, 36 mL de água destilada estéril e completada até 100 mL com etanol 100%). As suspensões foram agitadas por 2 minutos e incubadas em banho-maria a 80 °C por 1 hora. Foi adicionada uma mistura de 1 mL de água e 3 mL de heptano, após esfriar em temperatura ambiente, seguida de agitação em vórtex por 3 minutos. A camada de heptano foi transferida para tubos secos e limpos e essa fase foi

evaporada. Por fim, o ergosterol extraído foi ressuspenso com 1,5 mL de metanol, filtrado e transferido para frascos.

A quantificação do ergosterol foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando um equipamento Shimadzu com detector de arranjo de diodos (DAD), monitorando a absorção em 282 nm. As análises cromatográficas ocorreram no modo isocrático, com metanol como fase móvel e fluxo de 1,4 mL/min. A fase estacionária corresponde a uma coluna analítica C18 Shim-pack CLC-ODS (250 x 4,6 mm DI) com tamanho de partícula de 5 µm, mantida a 30 °C.

O método cromatográfico foi desenvolvido e validado conforme a técnica de adição de padrão, avaliando os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão e exatidão, através de análises inter e intradia em triplicata. O padrão analítico utilizado foi o ergosterol (Sigma Chemical). A linearidade foi verificada na faixa de concentrações de 0,63 a 10 µg/mL (Yuan *et al.*, 2007; Chiocchio; Matković, 2011; Cabral; Figueroa; Fariña, 2013).

Figura 11. Cultivo, extração e análise de *C. albicans* tratados com JFOX-6 e quantificação de ergosterol.



a) Cultivo de *C. albicans* em CSD tratados com JFOX-6; b) Incubação por 24 horas; c) Transferência do cultivo para tubo falcon; d) Centrifugação por 15 minutos a 1500 rpm e) Descarte do sobrenadante, acréscimo de hidróxido de potássio alcoólico a 25% ao pellet e agitação por 2 minutos; f) Banho maria por 1 hora a 80 °C; g) Adição de heptano e agitação por 3 minutos h) Transferência da fase heptâmica para novos tubos e evaporação do heptano em banho maria; i) Ressuspensão de ergosterol com metanol; j) Filtração do ergosterol com filtro de 0,45 µm para um frasco; k) Análise em cromatografia líquida de alta eficiência.

Fonte: Autora, 2025.

4.10 Análise do efeito da JFOX-6 na biossíntese do farnesol em *C. albicans* ATCC-66031

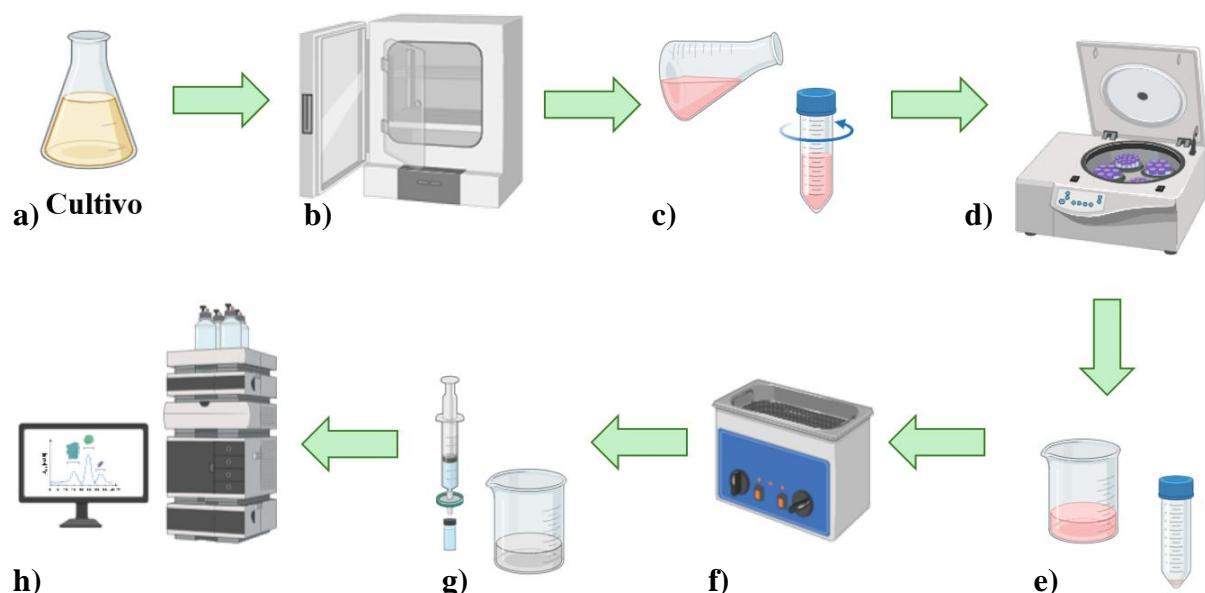
Inicialmente, *C. albicans* ATCC-60193 foi inoculada em frascos CSD na ausência e presença de JFOX-6 em concentrações de 1/2 CIM, 1/4 CIM e 1/16 CIM e incubados a 30 °C por 24 horas (Figura 12). Após esse período, as culturas foram centrifugadas a 3.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro frasco e o farnesol foi extraído pela adição de acetato de etila ao sobrenadante (4 partes do sobrenadante:1 parte de acetato de etila).

As fases com acetato de etila foram transferidas e evaporadas e o sedimento foi ressuspenso em 1,5 mL de metanol, filtrado e transferido para um frasco para análise em CLAE, com detecção em 210 nm, fase móvel (eluente) metanol e água (4:1); fluxo 1mL/min,

temperatura 30 °C, coluna fase reversa C18 grupo octadecil CLC-ODS (250 x 4,6 mm DI), 5 µm de diâmetro de partículas, 100 Å de diâmetro dos poros.

O peso úmido das células, após centrifugação, foi determinado e calculado a concentração de farnesol/mg de peso úmido. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (Hornby *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2019).

Figura 12. Cultivo, extração e análise de *C. albicans* tratados com JFOX-6 e quantificação de farnesol.



a) Cultivo de *C. albicans* em CSD tratados com JFOX-6; b) Incubação por 24 horas; c) Transferência do cultivo para tubo falcon; d) Centrifugação por 15 minutos a 1500 rpm e) Acréscimo de acetato de etila ao sobrenadante; f) Separação da fase com acetato de etila para um novo Becker para evaporação; g) Ressuspensão do farnesol e filtragem com filtro de 0,45 µm para um frasco; h) Análise em cromatografia líquida de alta eficiência.

Fonte: Autora, 2025.

4.11 Estudo da bomba de efluxo dependente de gradiente de prótons

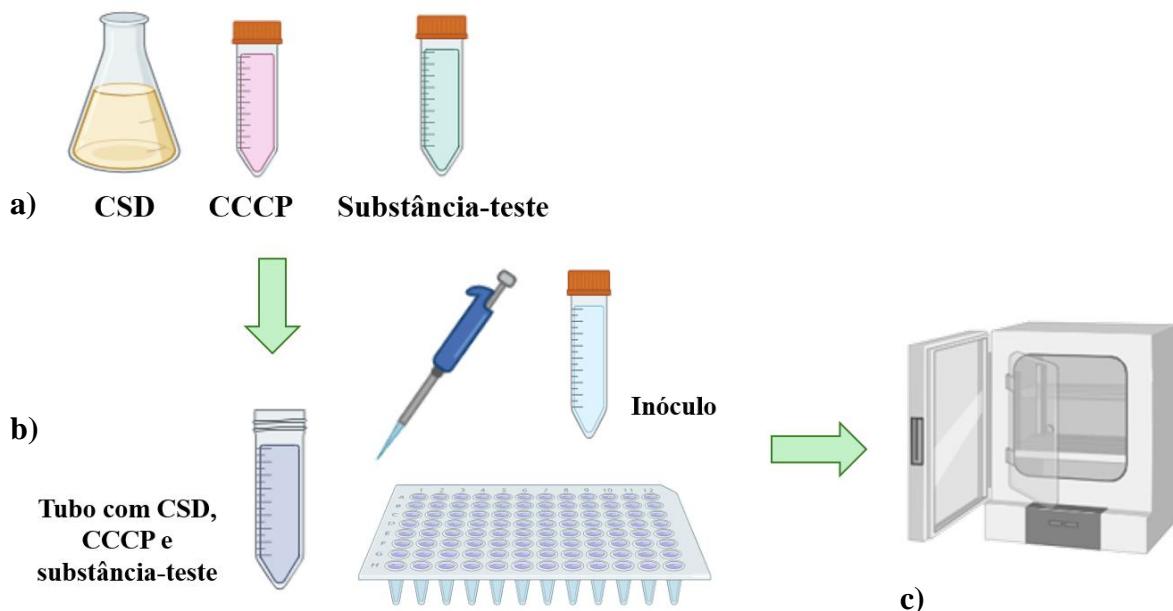
O estudo da bomba de efluxo (Figura 13) foi realizado utilizando um desacoplador da força próton motiva, o carbonil cianeto-3-clorofenil-hidrazona (CCCP), na qual atua diminuindo a energia utilizada para o transporte de íons para dentro e fora da célula (Bobek; Situ, 2003; Moreira *et al.*, 2005; Yousfi *et al.*, 2019; Lev *et al.*, 2020).

O teste foi realizado retirando um volume de 200 µL de um tubo contendo meio de cultura CSD, substância CCCP e substância-teste, de acordo com a concentração inibitória. O material foi depositado em uma placa de microdiluição de 96 poços estéril, seguido da adição de 20 µL de inóculo. A placa foi incubada a 35 °C por 24 horas para *C. albicans* e por 48 horas para *C. neoformans*.

Após o período de incubação, se houver redução de CIM, de no mínimo duas vezes, em presença do desacoplador, o resultado é considerado positivo para bombas de efluxo. Este estudo foi realizado em triplicata.

Foram realizados os controles: controle negativo - CSD e substância teste com o micro-organismo na ausência de CCCP; controle positivo - micro-organismo na presença de CCCP; controle de esterilidade - CSD na ausência do micro-organismo; e controle de viabilidade - CSD e micro-organismo na ausência das drogas.

Figura 13. Análise do comportamento do micro-organismo na presença de desacoplador da força próton motora.



- a) Meio de cultura CSD, CCCP e substância-teste; b) Retirada de 200 µL do tubo contendo a mistura de CSD, substância-teste e CCCP para adição em uma placa de 96 poços, seguido do acréscimo de 20 µL de inóculo; c) Incubação da placa de 96 poços em estufa a 37 °C.

Fonte: Autora, 2025.

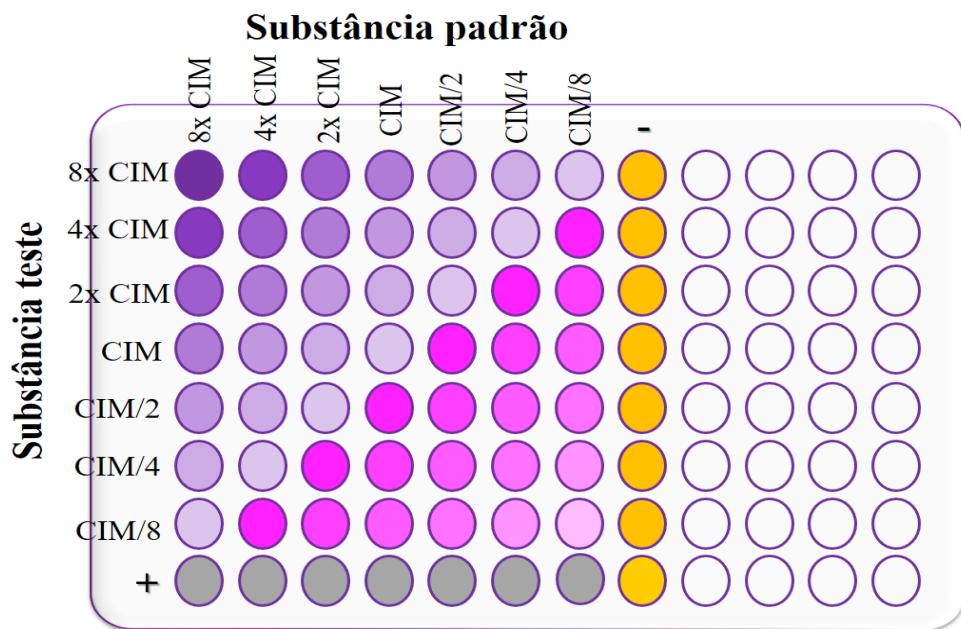
4.12 Estudo do efeito da associação de substâncias-teste com substâncias padrão

Para esse estudo, foram preparadas, em tubos, sete diluições duplamente concentradas em série (8x CIM, 4x CIM, 2x CIM, CIM, 1/2 CIM, 1/4 CIM, 1/8 CIM) dos compostos testados e do antifúngico padrão (anfotericina B). 100 µL de meio de cultura duplamente concentrado foram adicionados e, em seguida, 50 µL de cada diluição das substâncias-teste, nos poços da placa de microdiluição de 96 cavidades e fundo em “U”, em orientação vertical, e 50 µL de cada diluição da anfotericina B, numa orientação horizontal, com a finalidade de conter em cada cavidade, várias combinações das concentrações dos dois compostos (Figura 14). Em

seguida, 20 µL do inóculo (0,5 Mc Farland) foram adicionados em cada cavidade da placa e essa foi fechada e incubada por 35 °C por 24 e 48 horas, respectivamente, para o gênero *Candida* e *Cryptococcus*.

Após os respectivos períodos de incubação, as Concentrações Inibitórias Fracionárias (CIFs) foram calculadas com a CIM da combinação da substância analisada e o antimicrobiano padrão, dividida pela CIM da substância analisada ou antimicrobiano padrão sozinhos. O índice de CIF foi calculado adicionando ambos os CIFs e interpretado com efeito sinérgico quando for $\leq 0,5$, como aditivo ou não-sinérgico, quando $> 0,5-1,0$, indiferente quando entre 1,0 e 4,0 e antagonista se >4.0 (Doern *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014; Andrade-Júnior *et al.*, 2019).

Figura 14. Ilustração da técnica de associação de substâncias frente às leveduras.



Fonte: Autor, 2025

4.13 Análise estatística

Os resultados do ensaio do comportamento das substâncias na espessura da cápsula de *Cryptococcus* spp. foram submetidos ao teste estatístico teste t – *Student*. O estudo antibiofilme, ensaio de quantificação de ergosterol e farnesol foram expressos em média ± erro padrão e submetidos ao teste estatístico teste t – *Student*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, estão descritos os resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) frente às cepas de *Cryptococcus* e *Candida*. Com exceção dos compostos JFOX-1, JFOX-2, JFOX-4 e JFOX-10, os demais apresentaram propriedade inibitória contra uma ou mais cepas de levedura.

Tabela 1. CIM e CFM, em µg/mL, de oxadiazóis frente a *Cryptococcus* spp e *Candida* spp.

COMPOSTOS	<i>C. neoformans</i> ATCC-66031		<i>C. gattii</i> ATCC-32269		<i>C. albicans</i> ATCC-10231		<i>C. albicans</i> ATCC-60193		<i>C. tropicalis</i> ATCC-750		<i>C. tropicalis</i> ATCC-13803		<i>C. parapsilosis</i> ATCC-22019		<i>C. krusei</i> CBS 573		<i>C. krusei</i> ATCC-6258		<i>C. glabrata</i> ATCC-90030		
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	
SFM-1	nd	nd	256	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
SFM-3	256	256	256	256	512	nd	512	nd	512	nd	512	nd	512	nd	nd	nd	nd	nd	nd	512	nd
SFM-5	128	128	128	256	nd	nd	512	nd	nd	nd	512	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
SFM-9	256	256	256	256	512	512	nd	nd	512	nd	nd	nd	512	512	nd	nd	nd	nd	nd	512	nd
SFM-11	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
JFELL-1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
JFOX-1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
JFOX-2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
JFOX-3	nd	nd	256	512	nd	nd	256	512	512	nd	8	128	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
JFOX-4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
JFOX-5	1024	nd	1024	nd	nd	nd	512	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
JFOX-6	512	1024	512	1024	256	nd	256	512	1024	1024	256	512	256	256	256	512	256	512	512	512	512
JFOX-7	256	256	256	512	512	nd	512	nd	512	nd	512	nd	512	512	nd	nd	nd	nd	nd	512	nd
JFOX-8	512	nd	512	nd	nd	nd	256	nd	512	nd	64	nd	64	64	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
JFOX-9	512	512	512	512	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
JFOX-10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
ANFOTERICINA B	0,25	2	0,5	1	0,5	1	0,125	64	0,5	4	0,25	0,5	0,25	0,5	2	8	2	16	0,5	2	
FLUCONAZOL	1024	1024	256	256	64	256	32	256	64	512	64	512	16	64	128	512	256	512	256	512	
CONTROLE “+”	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
CONTROLE “-”	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

nd: Concentração não determinada; + Controle positivo; - Controle negativo.

Fonte: Autora, 2025.

As substâncias SFM-3, SFM-5, SFM-9, JFOX-5, JFOX-6, JFOX-7, JFOX-8, JFOX-9, apresentaram atividade inibitória frente a *C. neoformans* ATCC-66031 e *C. gattii* ATCC-32269, com CIM que variaram entre 128 µg/mL e 1024 µg/mL. SFM-1 e JFOX-3 inibiram apenas *C. gattii*, com CIM de 256 µg/mL.

O composto JFOX-3 inibiu as cepas *C. albicans* ATCC-60193 (256 µg/mL), *C. tropicalis* ATCC-750 (512 µg/mL) e *C. tropicalis* ATCC-13803 (8 µg/mL). JFOX-8 apresentou atividade frente a *C. parapsilosis* ATCC-22019, *C. tropicalis* ATCC-13803, *C. albicans* ATCC-60193 e *C. tropicalis* ATCC-750, com CIM de 64, 64, 256 e 512 µg/mL, respectivamente. Os compostos SFM-3, SFM-5, SFM-9, JFOX-5 e JFOX-7 tiveram CIM de 512 µg/mL, porém não inibiram todas as espécies de *Candida* nas condições avaliadas. O composto JFOX-6 exibiu atividade inibitória frente a todas as espécies de *Candida*, com CIM de 256 µg/mL, exceto para a cepa de *C. glabrata* ATCC-90030 e *C. tropicalis* ATCC-750, cuja CIM foi de 512 µg/mL e 1024 µg/mL, respectivamente.

A maioria dos compostos apresentaram ação fungicida frente ao *C. neoformans* ATCC-66031 e *C. gattii* ATCC-32269, com CFM de 256 µg/mL (SFM-3 e SFM-9) para as duas cepas, correspondendo ao valor de CIM. O composto JFOX-9 apresentou CFM de 1024 µg/mL para as duas cepas, ou seja, o dobro da CIM. Os compostos SFM-1 e JFOX-3 mostraram CFM de 512 µg/mL frente a *C. gattii*, correspondendo ao dobro da CIM. JFOX-6 apresentou CFM de 1024 µg/mL, referente a CIM e a 2xCIM, do composto. Em complemento, o composto SFM-5 apresentou CFM de 128 e 256 µg/mL frente a *C. neoformans* e *C. gattii*, respectivamente, e o composto JFOX-7, CFM de 256 e 512 µg/mL frente a *C. neoformans* e *C. gattii*, respectivamente.

Apesar da maioria ter apresentado atividade fungicida frente a *Cryptococcus*, JFOX-6 foi a única molécula que inviabilizou o crescimento das cepas de *Candida*, com CFM entre 256 e 1024 µg/mL, com exceção da cepa *C. albicans* ATCC-10231. A CFM foi de 256 µg/mL para *C. parapsilosis* ATCC-22019, 512 µg/mL para *C. albicans* ATCC-60193, *C. tropicalis* ATCC-13803, *C. krusei* CBS 573, *C. krusei* ATCC-6258, *C. glabrata* ATCC-90030 e 1024 µg/mL para *C. tropicalis* ATCC-750.

O JFOX-7 apresentou CFM apenas frente a *C. parapsilosis* ATCC-22019 (512 µg/mL, igual ao valor de CIM para a referida cepa). O composto JFOX-3 apresentou CFM somente frente a *C. albicans* ATCC-60193 (512 µg/mL) e *C. tropicalis* ATCC-13803 (128 µg/mL), correspondendo ao dobro e a 16x o valor de CIM, respectivamente. O SFM-9 exibiu CFM de 512 µg/mL frente a *C. albicans* ATCC-10231 e *C. parapsilosis* ATCC-22019, correspondendo ao valor de CIM.

Embora tenha apresentado efeito fungistático em relação a algumas leveduras, os compostos JFOX-5 e JFOX-8 não apresentaram atividade fungicida diante do gênero *Cryptococcus* e *Candida*, nas condições avaliadas, com exceção da JFOX-8 que apresentou CFM somente frente a *C. parapsilosis*, correspondendo a 8x o valor de CIM.

No estudo de atividade antifúngica realizado após a síntese de análogos de 1,3,4-oxadiazol 2,5-dissubstituído, contendo porção pirazol, frente ao dermatófito *Chrysosporium keratinophilum*, a levedura *C. albicans* e ao filamentoso *A. flavus*, utilizando o fluconzaol como antifúngico padrão, dois compostos apresentaram atividade contra ambos os patógenos fúngicos com CIM entre 500, e 1000 µg/mL frente a *C. albicans*. Essa atividade está associada à presença do substituinte 2-clorofenil ligado à 5^a posição do anel oxadiazol e à presença de substituintes fenil e p-clorofenil no anel pirazol que está ligado à 2^a posição do anel oxadiazol (Malladi *et al.*, 2014).

Oxidiazóis dissustituidos inibiram o crescimento de *C. albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium marneffei* e *Trichophyton mentagrophytes* nas concentrações que variaram de 6,25 µg/mL a 12,5 µg/mL, destacando a atividade antifúngica dessa classe (Farshori *et al.*, 2017).

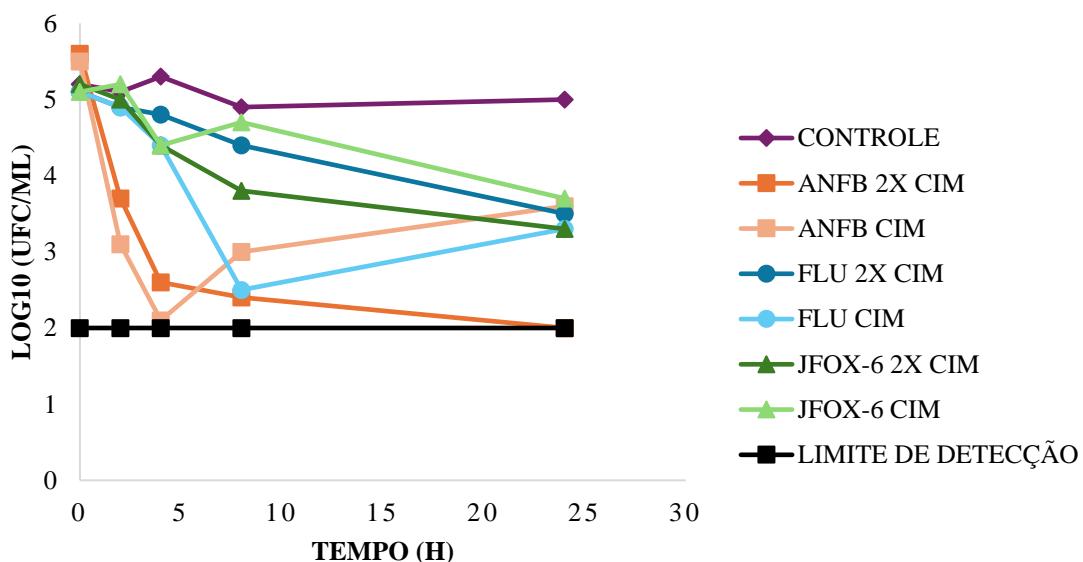
O composto 1,3,4-oxadiazol frente a *C. albicans*, o 4- [ciclohexil(etil)sulfamoil]N[5-(4-fluorofenil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]benzamida, exibiu perfil fungicida, com potencial terapêutico observado nas concentrações entre 8 a 256 µg/mL, com redução da UFC $\geq 5 \log_{10}$, apresentando efeito melhor do que a droga padrão utilizada no estudo, o fluconazol (Faria *et al.*, 2021).

Segundo Kumar *et al.* (2018), a possibilidade para o sucesso terapêutico de infecções fúngicas consiste na interferência no crescimento do micro-organismo patogênico, o que está intrinsicamente relacionado a elucidação dessa atividade. Diante disso, considerando que a JFOX-6, o 1-(3-p-Tolil-[1,2,4]oxadiazol-5-il)-etanona, apresentou um amplo espectro de ação ao inibir o crescimento das cepas submetidas ao estudo, podendo essa atividade estar associada ao anel aromático com grupo metil (p-tolil) no oxadiazol, conferindo lipofilicidade, facilitando sua penetração através da membrana celular dos fungos, então a próxima etapa foi verificar as alterações no crescimento de *C. neoformans* ATCC-66031, e *C. albicans* ATCC-10231 ao longo do tempo.

A possível interferência das substâncias na cinética de crescimento de *C. neoformans* e *C. albicans* foi avaliada em diferentes períodos. Os resultados estão apresentados nas Figuras 15 e 16, expressando o número de logUFC/mL em relação aos intervalos de tempo para as diferentes concentrações. Foi observado que o comportamento da CIM e 2xCIM de JFOX-6 foi

semelhante à 2xCIM do fluconazol, diante de *C. neoformans* e frente a *C. albicans*, JFOX-6 agiu semelhante ao fluconazol independentemente do valor das concentrações testadas.

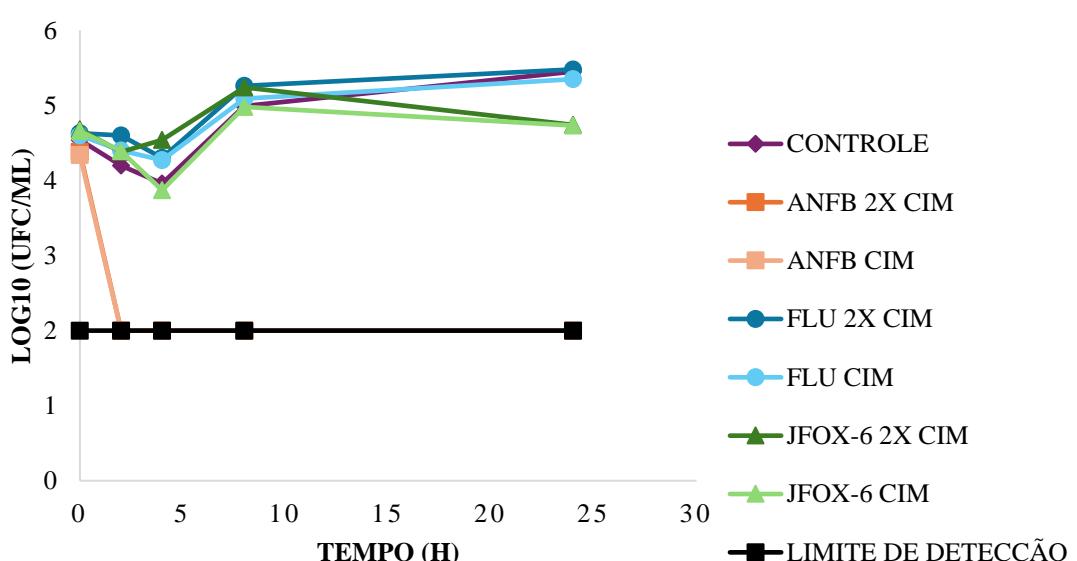
Figura 15. Cinética de crescimento de *C. neoformans* ATCC-66031 sob exposição de JFOX-6, anfotericina B e fluconazol.



ANFB: Anfotericina B; FLU: Fluconazol; CIM: Concentração Inibitória Mínima; UFC: Unidade Formadora de Colônia.

Fonte: Autora, 2025.

Figura 16. Cinética de crescimento de *C. albicans* ATCC-10231 sob exposição de JFOX-6, anfotericina B e fluconazol.



ANFB: Anfotericina B; FLU: Fluconazol; CIM: Concentração Inibitória Mínima; UFC: Unidade Formadora de Colônia.

Fonte: Autora, 2025.

A Figura 15 mostra que JFOX-6 reduziu a população de *C. neoformans* em função do tempo, ao comparar com o controle. No entanto, essa redução foi menor que 99,9%, e, na Figura 16, a substância teste apresentou comportamento semelhante ao fluconazol frente a *C. albicans*. Já a anfotericina B, que tem perfil fungicida, reduziu o crescimento em $\geq 3\log_{10}$ UFC/mL, ao comparar com o inóculo inicial, no tempo de 2 horas contra *C. albicans* e no tempo de 4 horas contra *C. neoformans*.

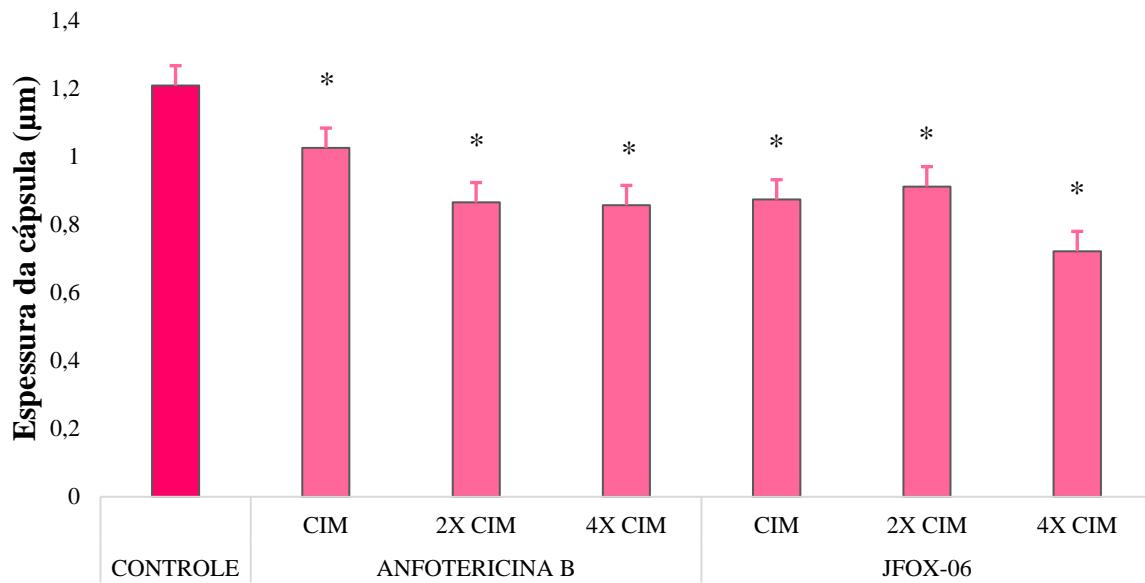
No estudo de Kong *et al.* (2020), o fluconazol e a anfotericina B foram submetidos ao estudo de cinética frente a *C. neoformans*. As concentrações de fluconazol (4 µg/mL) e anfotericina B (1 µg/mL) foram eficazes na inibição do crescimento do micro-organismo. O fluconazol diminuiu o número de células em comparação com o controle e a cinética de morte de anfotericina B foi comprovada com a erradicação das células fúngicas em 3 horas.

JFOX-6 apresentou ação fungistática, interrompendo o metabolismo do fungo sem matá-lo e sua propriedade antifúngica foi independentemente do valor das concentrações testadas, ao observar o aumento da atividade com o aumento da concentração. Resultado semelhante foi observado com outros derivados oxadiazóis, como o oxadiazoliltiazóis frente a *Candida*, do estudo de Hagras *et al.* (2020), e dois compostos 1,3,4-oxadiazol do estudo de Capoci *et al.* (2019), que apresentaram perfil fungistático.

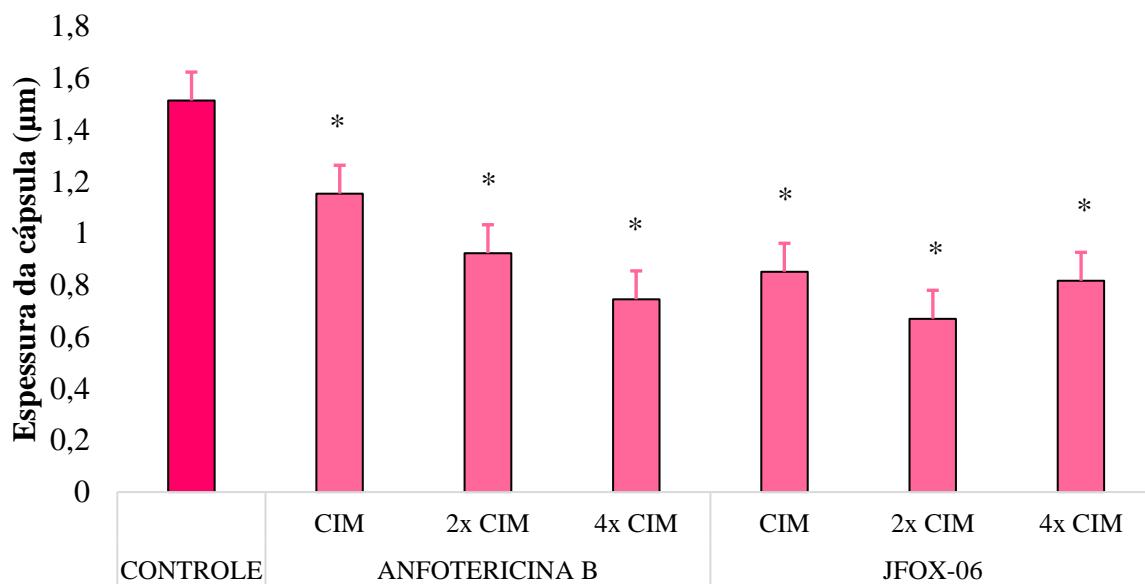
Essa atividade pode estar relacionada aos heterociclos que possuem afinidade com várias enzimas, através do sítio ativo ou estruturas enzimáticas, devido às interações moleculares como força de Van-der-Waals e forças hidrofóbicas, além de pontes de hidrogênio e ligações metálicas, que são bases no designer de novas moléculas na química farmacêutica (Pearce, 2017).

Uma vez demonstrado o perfil fungistático, a próxima etapa compreendeu a análise das alterações na estrutura de *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp., verificando se a molécula JFOX-6 provoca interferências na espessura da cápsula polissacarídica de *C. neoformans* e *C. gattii*, expressando quantitativamente essa interferência, conforme Figura 17.

Figura 17. Efeito da CIM de JFOX-6 e Anfotericina B e suas concentrações superiores (2xCIM e 4xCIM) sobre a espessura da cápsula (μm) de *C. neoformans* ATCC-66031 e *C. gattii*.
a) *C. neoformans* ATCC-66031



b) *C. gattii* ATCC-32269



Controle: micro-organismo na ausência das diferentes concentrações de JFOX-6 e anfotericina B; CIM: concentração inibitória mínima; * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Fonte: Autora, 2025.

Cryptococcus corresponde a uma levedura unicelular em cultura ou tecidos animais, que dependendo das condições ambientais, pode assumir formas filamentosas multicelulares como hifas verdadeiras ou pseudo-hifas (Wang; Lin, 2015). São leveduras ovais a esféricas, isoladas ou em cadeias, de parede fina, envoltas por uma cápsula polissacarídica (Aldama *et al.*, 2021).

Os micro-organismos foram cultivados na ausência e presença da droga-teste e anfotericina B nas concentrações CIM e superiores (2x CIM e 4x CIM). A JFOX-6 e a droga padrão anfotericina B reduziram a espessura da cápsula de *C. gattii* ATCC-32269 e *C. neoformans* ATCC-66031, em comparação ao controle ($p < 0,05$).

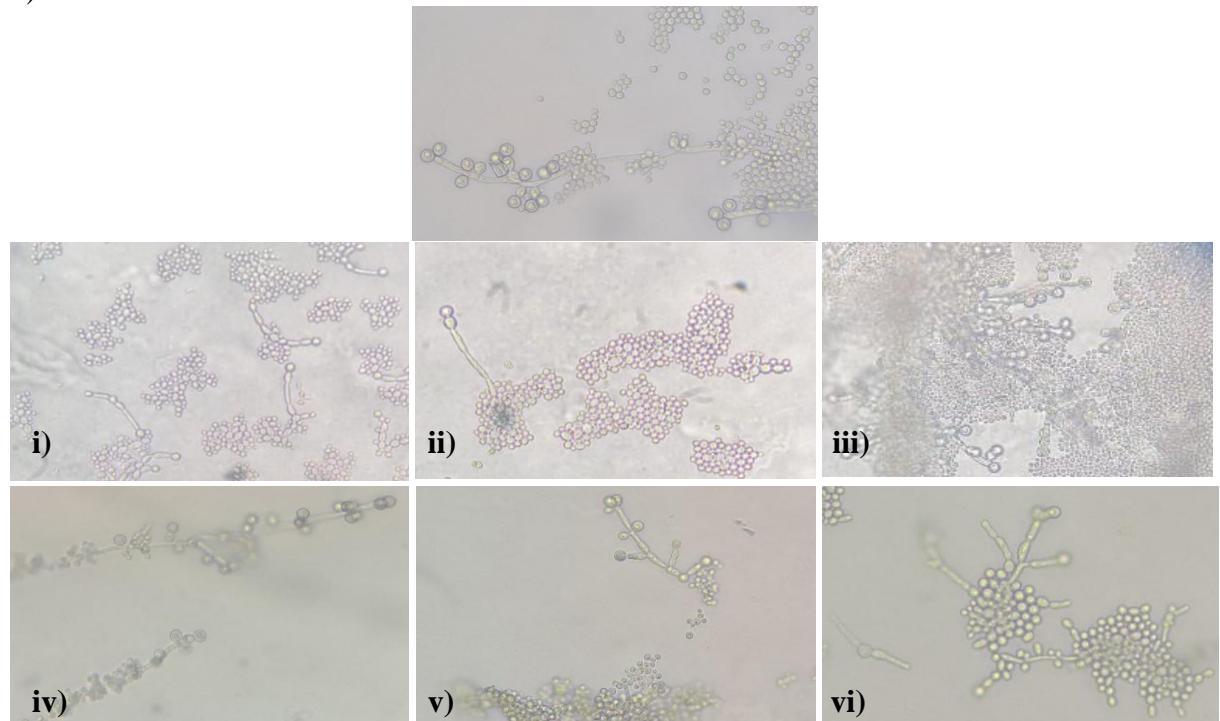
A cápsula é um importante fator de virulência, composto por galactoxilomanana, manoproteínas, β -glucanas e glucuronoxilomanana (GXM), entre outros constituintes, sendo GXM o composto predominante e que influencia na virulência, além de ajudar a interferir na imunidade do paciente, bem como proteger as células do micro-organismo aos ataques do sistema imunológico (Crawford *et al.*, 2020). Dessa forma, um candidato à antifúngico que seja capaz de diminuir a espessura da cápsula é de grande relevância, visto que a mesma é um importante fator de virulência, contribuindo para o estabelecimento da doença no indivíduo acometido.

A ação da JFOX-6 foi semelhante ao da anfotericina B, antifúngico já licenciado e utilizado na prática clínica (Andriani *et al.*, 2023). Também foi semelhante ao do estudo realizado com artesunato, halofantrina e amodiaquina frente a *C. gattii* e *C. neoformans*, que reduziram a cápsula polissacarídica, fator de virulência essencial para proteger as células de *Cryptococcus* da resposta imune (Freitas *et al.*, 2023).

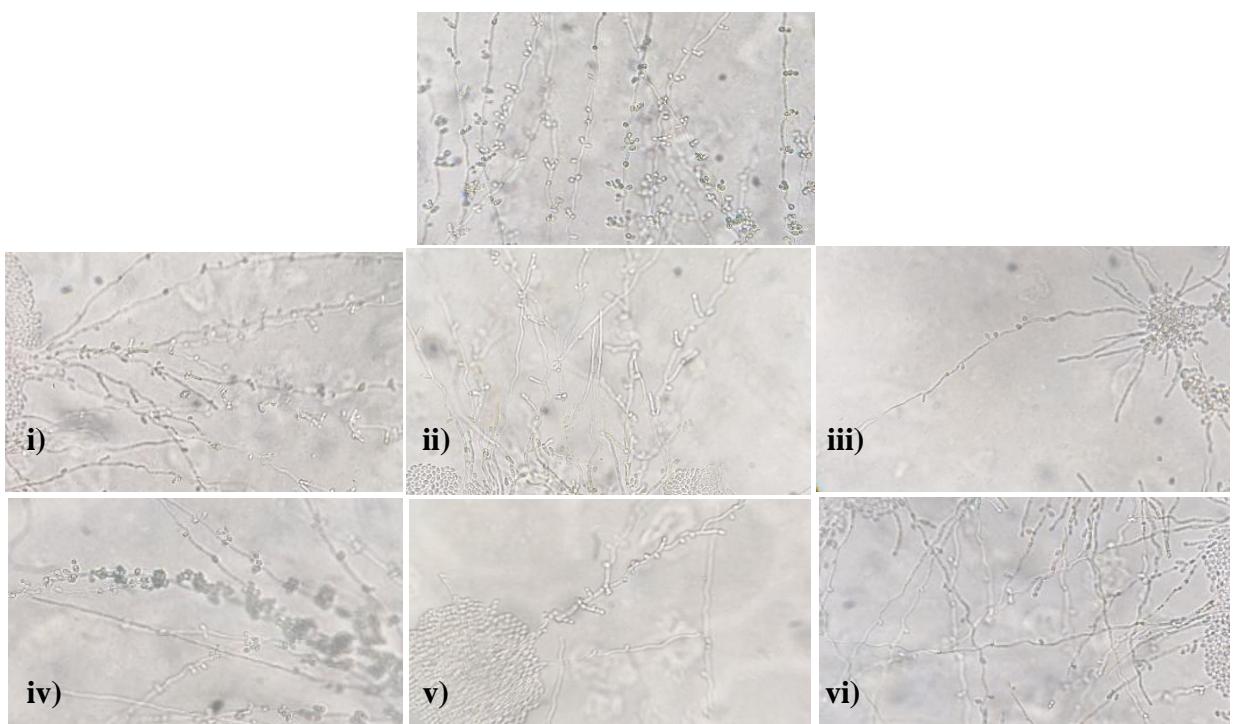
As cepas de *C. albicans* ATCC-10231 e *C. tropicalis* ATCC-750 também foram cultivadas na ausência e presença da JFOX-6 e anfotericina B nas concentrações CIM e superiores (2x CIM e 4x CIM) (Figura 18), e analisadas quanto a ocorrência de alterações nas estruturas de virulência (Tabela 2 e 3).

Figura 18. Efeito CIM de JFOX-6 e Anfotericina B e suas concentrações superiores (CIM, 2xCIM e 4xCIM) sobre a estruturas de virulência de *Candida* spp.

a) *C. albicans* ATCC-10231



b) *C. tropicalis* ATCC-750



i) Controle de *Candida* spp. (ausência de substâncias); ii) CIM de Anfotericina B; iii) 2x CIM de Anfotericina B; iv) 4x CIM de Anfotericina B; v) CIM de JFOX-6; vi) 2x CIM de JFOX-6 e; vii) 4x CIM de JFOX-6. Objetiva de 400x.

Fonte: Autora, 2025.

Tabela 2. Análise qualitativa das alterações morfológicas de JFOX-6 e anfotericina B sobre a estruturas de virulência de *C. albicans* ATCC-10231.

	Blastoconídeo	Clamidoconídeo	Pseudohifas
Controle	+++	+++	+++
CIM de JFOX-6	+++	+++	+++
2x CIM de JFOX-6	+++	++	++
4x CIM de JFOX-6	+++	+	+
CIM de Anfotericina B	+	+	+
2x CIM de Anfotericina B	+	+	+
4x CIM de Anfotericina B	+	+	+

+++ Muito; ++ Moderado; + Pouco. CIM: Concentração Inibitória Mínima

Fonte: Autora, 2025.

Tabela 3. Análise qualitativa das alterações morfológicas de JFOX-6 e anfotericina B sobre a estruturas de virulência de *C. tropicalis* ATCC-750.

	Blastoconídeo	Pseudohifas
Controle	+++	+++
CIM de JFOX-6	+++	+++
2x CIM de JFOX-6	++	++
4x CIM de JFOX-6	+	+
CIM de Anfotericina B	+	+
2x CIM de Anfotericina B	+	+
4x CIM de Anfotericina B	+	+

+++ Muito; ++ Moderado; + Pouco. CIM: Concentração Inibitória Mínima

Fonte: Autora, 2025.

Morfologicamente, a levedura *C. albicans* possui 5 a 8 mm de diâmetro, com células simples, arredondadas, ovais ou alongadas, identificada pela produção de clamidoconídeo. É uma levedura dimórfica, com várias formas microscópicas como blastoconídeos, pseudo-hifas e hifas, estando esse polimorfismo associado à transição da forma comensal para a forma patológica, marcada pela transição dos blastoconídeos em hifas e a forma de transição entre as pseudo-hifas. Os clamidoconídeos são os esporos assexuados, formados em condições adversas, e são 3 vezes maiores que os blastoconídeos (Talapko *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2021).

C. tropicalis é a segunda espécie comum do gênero *Candida* e possui similaridade genética com *C. albicans*, sendo a segunda espécie mais virulenta e produtora de biofilme do gênero. Morfologicamente, tem entre 4 e 11 µm, e possui blastoconídeos esféricos ou ovóides em cadeia simples ou ramificada, pseudo-hifas em cadeias ramificadas e, às vezes, pode podem ser vistas hifas verdadeiras (Silva *et al.*, 2021).

O composto JFOX-6 (4xCIM) reduziu as estruturas de reprodução em comparação com o controle, os clamidoconídeos, e as estruturas de transição, diminuindo o tamanho das pseudo-hifas da *C. albicans* ATCC-10231, que apresentaram cadeias de blastoconídeos e alguns clamidoconídeos terminais. As demais concentrações (CIM e 2xCIM) não apresentaram modificações significativas em comparação ao controle (ausência de substâncias).

A substância JFOX-6 (2xCIM) frente a *C. tropicalis* ATCC-750 apresentou redução de pseudo-hifas e pouca alteração dos blastoconídeos em cadeias. Já 4xCIM reduziu significativamente as pseudo-hifas e os blastoconídeos, exibindo apenas blastoconídeos isolados ou em pequenos grupos. A concentração de CIM de JFOX-6 foi semelhante ao controle do micro-organismo (ausência de substância).

A substância JFOX-6 (2xCIM) frente a *C. tropicalis* ATCC-750, apresentou redução de pseudo-hifas, e pouca alteração dos blastoconídeos em cadeias. Na concentração de 4xCIM, houve redução de forma significativa das pseudo-hifas e dos blastoconídeos, apresentando apenas blastoconídeos isolados ou em pequenos grupos. A concentração de CIM de JFOX-6 foi semelhante ao controle do micro-organismo (ausência de substância).

Como controle, a anfotericina B inibiu a transição morfológica, ou seja, reduziu significativamente a formação de pseudo-hifas de *C. albicans* e *C. tropicalis*, independente de concentração, e reduziu as estruturas de reprodução, como os blastoconídeos e o clamidoconídeo de *C. albicans* e os blastoconídeos de *C. tropicalis*, independente de concentração (CIM, 2xCIM e 4xCIM), nas condições avaliadas.

Devido à necessidade de desenvolver novos agentes antifúngicos, conhecer o direcionamento de fatores de virulência do micro-organismo é relevante para investigação dos possíveis agentes terapêuticos, pois orienta a extrair ou projetar fármacos altamente específicos, minimizando efeitos colaterais nos pacientes (Bu *et al.*, 2022).

Estudo semelhante de um composto obtido por síntese orgânica foi realizado por Costa *et al.* (2023), utilizaram propil (E)-3-(furan-2-il) acrilato frente a *C. albicans*, demonstrando-se eficaz na redução do desenvolvimento de estruturas de virulência (pseudo-hifas, blastoconídeos e clamidoconídeos), ponto significativo que minimiza a patogenicidade dessas leveduras e, consequentemente, a virulência.

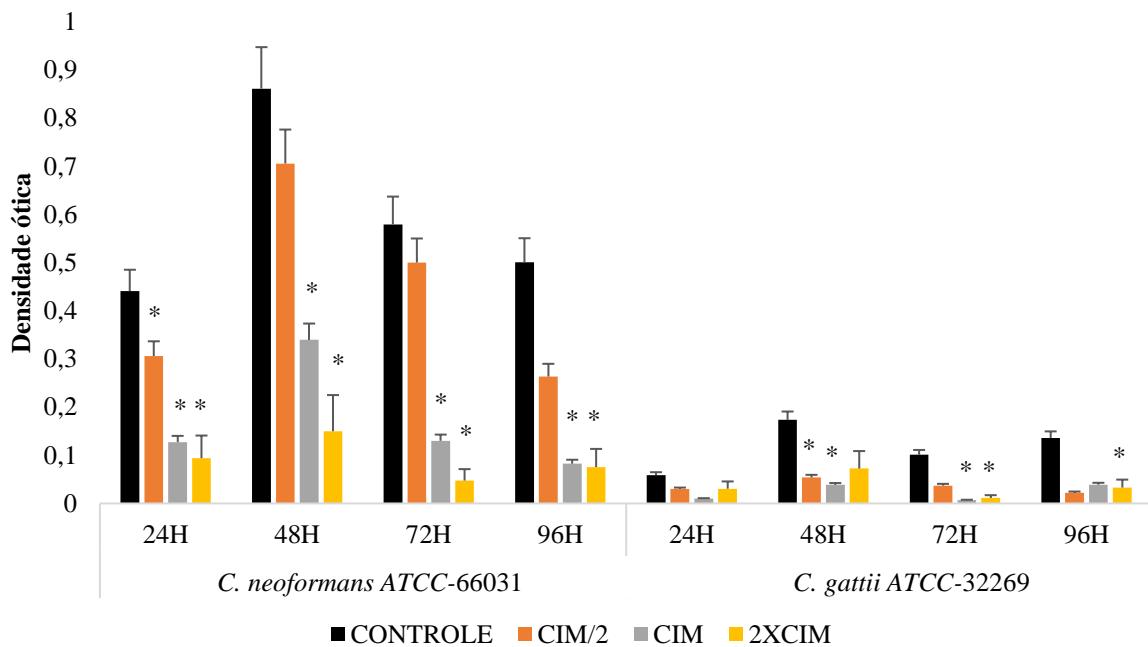
Além da morfologia celular, também são fatores de virulência de *C. albicans* e *C. tropicalis* o efluxo de drogas e a formação de biofilme. Esses possuem papel essencial no micro-organismo, na transição de comensal para patogênico (Rocha *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2021). Então, o próximo estudo foi analisar a viabilidade de *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp. em formar biofilme.

Inicialmente, *C. neoformans* ATCC-66031 e *C. gattii* ATCC-32269 foram avaliadas no período de 4, 24, 48, 72 e 96 horas, e foi considerada produtora de biofilme, quando a média da D. O. for três vezes superior ao branco. Porém no período de análise de 4h, não foi superior ao valor de ponto de corte, não quantificando o biofilme nesse estágio (Pagano *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2021). A partir de 24h foi considerada produtora de biofilme (D. O. < 0,090), porém essa produção foi considerada fraca pois a D.O. foi menor que duas vezes o valor do branco (0,062) (Stepanović *et al.*, 2007).

A formação do biofilme de *C. neoformans* e *C. gattii* inicia com o estágio de adesão (entre 2 e 4h), na qual as células estão metabolicamente ativas, em seguida, o estágio intermediário (entre 4 e 16h), aumentando significativamente as células aderidas, depois, a maturação (24 a 48h), continuando alta atividade metabólica e estável, nesse estágio aumenta o material extracelular e formando a complexa microarquitetura do biofilme (Martinez; Casadevall, 2015). Por fim, após 72h, ocorre a dispersão do biofilme, cuja finalidade é das células se desprendem do biofilme e se propagarem colonizando outros locais abióticos, devido à escassez de nutriente para estabelecer gradientes de nutrientes e trocas energéticas (Scherrer; Marcon, 2016).

Após confirmar a capacidade das cepas de *Cryptococcus* spp. formarem biofilme, esses foram expostos à presença das substâncias JFOX-6 e anfotericina B, em diferentes concentrações (2x CIM, CIM e 1/2 CIM), com o intuito de analisar a influência nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas.

Figura 19. Efeito de JFOX-6 em diferentes concentrações frente a formação de biofilme de *C. neoformans* ATCC-66031 e *C. gattii* ATCC-32269.



Controle: micro-organismo na ausência das diferentes concentrações de JFOX-6; CIM: concentração inibitória mínima; * p < 0,05 em comparação com o controle.

Fonte: Autora, 2025.

A JFOX-6 (Figura 19) interferiu na formação do biofilme no estágio de maturação e dispersão, de modo que a molécula na concentração de 2x CIM (1024 µg/mL) inibiu fortemente (>80%) em todos os períodos, o biofilme de *C. neoformans* ATCC-66031. JFOX-6 na concentração de CIM (512 µg/mL) inibiu moderado (entre 40 e 80%), em todos os períodos e 1/2 CIM (256 µg/mL) inibiu fracamente (< 40%) nos períodos de 24, 48 e 72 horas, e moderado, no período de 96 horas (dispersão).

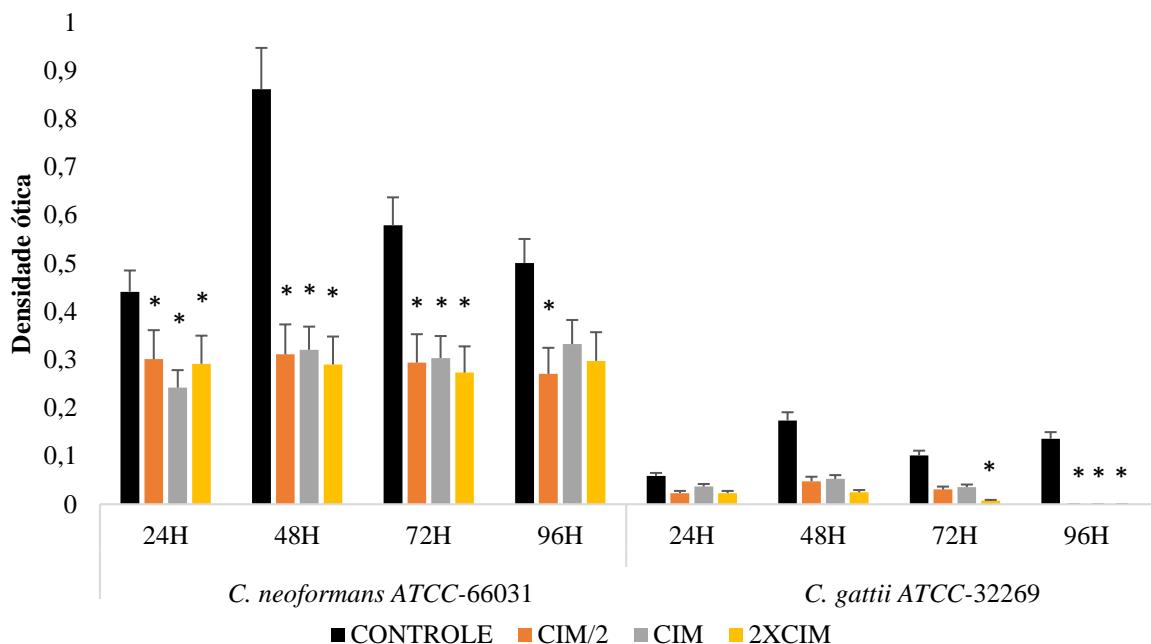
Já frente a *C. gattii* ATCC-32269, 2x CIM (1024 µg/mL), CIM (512 µg/mL) e 1/2 CIM (256 µg/mL) de JFOX-6 em 24 e 48 horas inibiram de forma moderada o biofilme (entre 40 e 80%), e em 72 horas, 2x CIM (1024 µg/mL) e CIM (512 µg/mL) inibiram fortemente a formação de biofilme (> 80%), enquanto 1/2 CIM, moderado (63%) e essas três concentrações interferiram moderadamente na dispersão (período de 96 horas). Esses resultados podem ser justificados devido à complexidade do combate a biofilmes criptococócicos, especialmente devido à composição da matriz extracelular e à capacidade adaptativa desses fungos (Martinez; Casadevall, 2015).

Conforme descrito por Qian *et al.* (2022), geralmente, os biofilmes maduros apresentam resistência diante da ação do antifúngico, necessitando de uma maior concentração de substância para erradicá-lo, devido a formação de uma matriz complexa, como aconteceu

em seu estudo utilizando plumbagina, cuja redução significativa do biofilme de *C. neoformans* H99 ocorreu ao utilizar 8x CIM do respectivo composto e, com a utilização de 16x CIM, ocasionou no desaparecimento por completo da arquitetura do biofilme.

A anfotericina, utilizada como composto-padrão, também foi submetido ao estudo da atividade antibiofilme das leveduras. Na Figura 20 estão os efeitos do polieno frente ao biofilme no estágio de maturação de *C. neoformans* e *C. gattii*, e na Figura 22, frente à *C. albicans* e *C. tropicalis*.

Figura 20. Efeito de anfotericina B em diferentes concentrações frente a formação de biofilme de *C. neoformans* ATCC-66031 e *C. gattii* ATCC-32269.



Controle: micro-organismo na ausência das diferentes concentrações de anfotericina B; CIM: concentração inibitória mínima; * p < 0,05 em comparação com o controle.

Fonte: Autora, 2025.

A anfotericina B, quando testada diante de *C. neoformans* ATCC-66031, independente de concentração, afetou de forma moderada (entre 40 e 80%) a formação do biofilme no período de 48 horas (maturação) e, no período de 96 horas (estágio de dispersão), a interferência foi fraca (< 40%).

Diante de *C. gattii* ATCC-32269, Anfotericina B interferiu na formação do biofilme, no estágio de maturação, com concentração de 2x CIM (1 µg/mL) afetando moderadamente no período de 24 horas e fortemente (> 80%) no período de 48 e 72 horas, enquanto CIM (0,5 µg/mL) e 1/2 CIM (0,25 µg/mL) interferiram fracamente no período de 24 horas e

moderadamente no período de 48 e 72 horas. No período de 96 horas (dispersão), ocorreu inibição de 100% do biofilme nesse estágio.

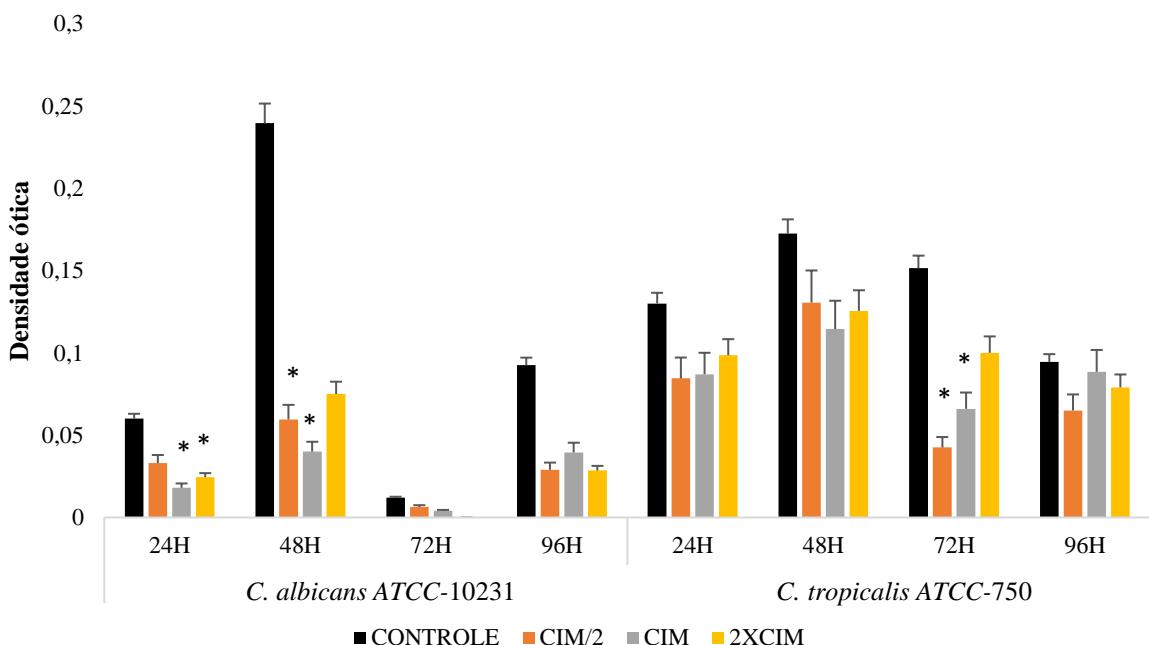
No estudo realizado por Zuo *et al.* (2016), para inibir o biofilme de *C. neoformans* ATCC-66031, foi necessário utilizar concentrações superiores a CIM, como 64xCIM (6,25 μ M) de anfotericina B.

Com relação ao gênero *Candida*, a análise de formação de biofilme ocorreu com *C. albicans* ATCC-10231 e *C. tropicalis* ATCC-750, avaliando no período de 90 minutos, 6, 24, 48, 72 e 96 horas, e foi considerada produtora de biofilme (D. O. < 0,090) a partir de 24 horas, não conseguindo quantificar a formação em 90 minutos e 6 horas.

Assim como ocorre com o gênero *Cryptococcus*, a etapa inicial corresponde à adesão celular (0 – 2 horas), formando uma camada basal de células, em seguida, ocorre a etapa de iniciação (2 – 18 horas), correspondendo a fase de proliferação celular em toda a superfície e filimentação, formando projeções alongadas que crescem como hifas filamentosas, depois ocorre a etapa de maturação (24 - 72 horas), correspondendo a marca registrada do início da formação do biofilme, seguida pelo acúmulo de uma matriz polissacarídica extracelular à medida que o biofilme amadurece e por fim, ocorre a etapa de dispersão (96 horas), em que as células de levedura não aderentes são liberadas do biofilme para o ambiente colonizando outras superfícies, sendo de grande significado clínico já que as células dispersas podem iniciar a formação de novos biofilmes, disseminando-se em tecidos dos pacientes, sendo associados à doença invasiva disseminada (Tsui; Kong; Jabra-Rizk, 2016; Ranjith *et al.*, 2018; Mc-Call *et al.*, 2019; Ardizzone *et al.*, 2022).

As cepas *C. albicans* ATCC-10231 e *C. tropicalis* ATCC-750 foram submetidas à presença de JFOX-6 e anfotericina B, em diferentes concentrações (2x CIM, CIM e 1/2 CIM), com o intuito de analisar a interferência dos compostos nos períodos de 24, 48, 72 e 96 horas (Figura 21).

Figura 21. Efeito de JFOX-6 em diferentes concentrações frente a formação de biofilme de *C. albicans* e *C. tropicalis*.



Controle: micro-organismo na ausência das diferentes concentrações de JFOX-6; CIM: concentração inibitória mínima; * p < 0,05 em comparação com o controle.

Fonte: Autora, 2025.

Na Figura 21 observa-se que 1/2 CIM (128 µg/mL) e CIM (256 µg/mL) de JFOX-6 interferiram na formação do biofilme no estágio de maturação, nos períodos de 24, 48 e 72 horas e de dispersão, 96 horas, apresentando atividade moderada frente a *C. albicans* ATCC-10231, reduzindo entre 40 e 80% o biofilme, enquanto 2x CIM (512 µg/mL) apresentou interferência moderada em 24, 48 e 96 horas (entre 40 e 80%) e inibiu totalmente o biofilme em 72 horas. Já a 2x CIM (2048 µg/mL), CIM (1024 µg/mL) e 1/2 CIM (512 µg/mL) de JFOX-6 diante de *C. tropicalis* ATCC-750, reduziram fracamente a formação nos períodos de 24, 48 e 96 horas (< 40%) e moderado no período de 72 horas (entre 40 e 80%).

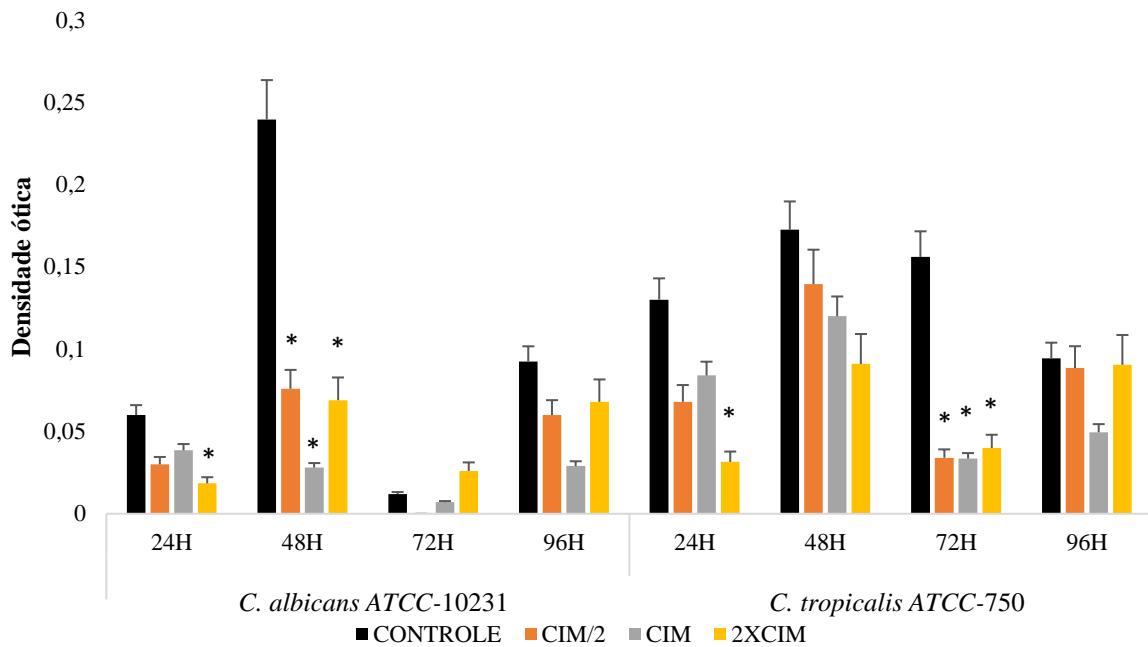
No entanto, a ação do composto JFOX-6 sobre a formação e dispersão de biofilmes de *C. albicans* e *C. tropicalis* varia de acordo com a concentração e o tempo de exposição. A eficácia de antifúngicos contra biofilmes depende de fatores como a espécie fúngica, o estágio de desenvolvimento do biofilme e a dosagem aplicada. Contudo, concentrações sub inibitórias de antifúngicos que interferem na maturação do biofilme, comprometendo sua integridade estrutural e funcionalidade (Barros *et al.*, 2020).

No estudo de Qian *et al.* (2022), para inibir totalmente o biofilme de *C. albicans*, concentrações superiores a CIM de uma combinação de quereritrina (alcalóide benzofenantridina) com sanguinarina (sesquiterpeno monocíclico) foram necessárias (8x CIM),

visto que biofilmes maduros são mais resistentes a ação de antifúngicos, devido a formação de uma matriz complexa.

Na Figura 21, estão os efeitos da anfotericina B frente ao biofilme no estágio de maturação de *C. albicans* ATCC-10231 e *C. tropicalis* ATCC-750.

Figura 22. Efeito de anfotericina B em diferentes concentrações frente a formação de biofilme de *C. albicans* ATCC-10231 e *C. tropicalis* ATCC-750



Controle: micro-organismo na ausência das diferentes concentrações de anfotericina B; CIM: concentração inibitória mínima; * p < 0,05 em comparação com o controle.

Fonte: Autora, 2025.

A anfotericina B afetou a formação do biofilme de *C. albicans* ATCC-10231 e *C. tropicalis* ATCC-750, dependendo da concentração, pois a CIM frente a *C. albicans* inibiu nos períodos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente, fraco (35%), forte (88%) e moderado (41%) e no período de 96 horas, inibiu de forma moderada (68%), já contra *C. tropicalis*, 2x CIM (1 µg/mL) reduziu de forma moderada, nos períodos de 24, 48 e 72 horas, a formação do biofilme (entre 40 e 80%) e no período de dispersão, a 2x CIM (1 µg/mL) reduziu de forma fraca, nas condições submetidas.

Colaborando com nossos resultados, semelhante foi observado no estudo realizado por Zuo *et al.* (2016), na qual foi necessário utilizar 16x CIM (12,5 µM) de anfotericina B para inibir o biofilme de *C. albicans* SC5314.

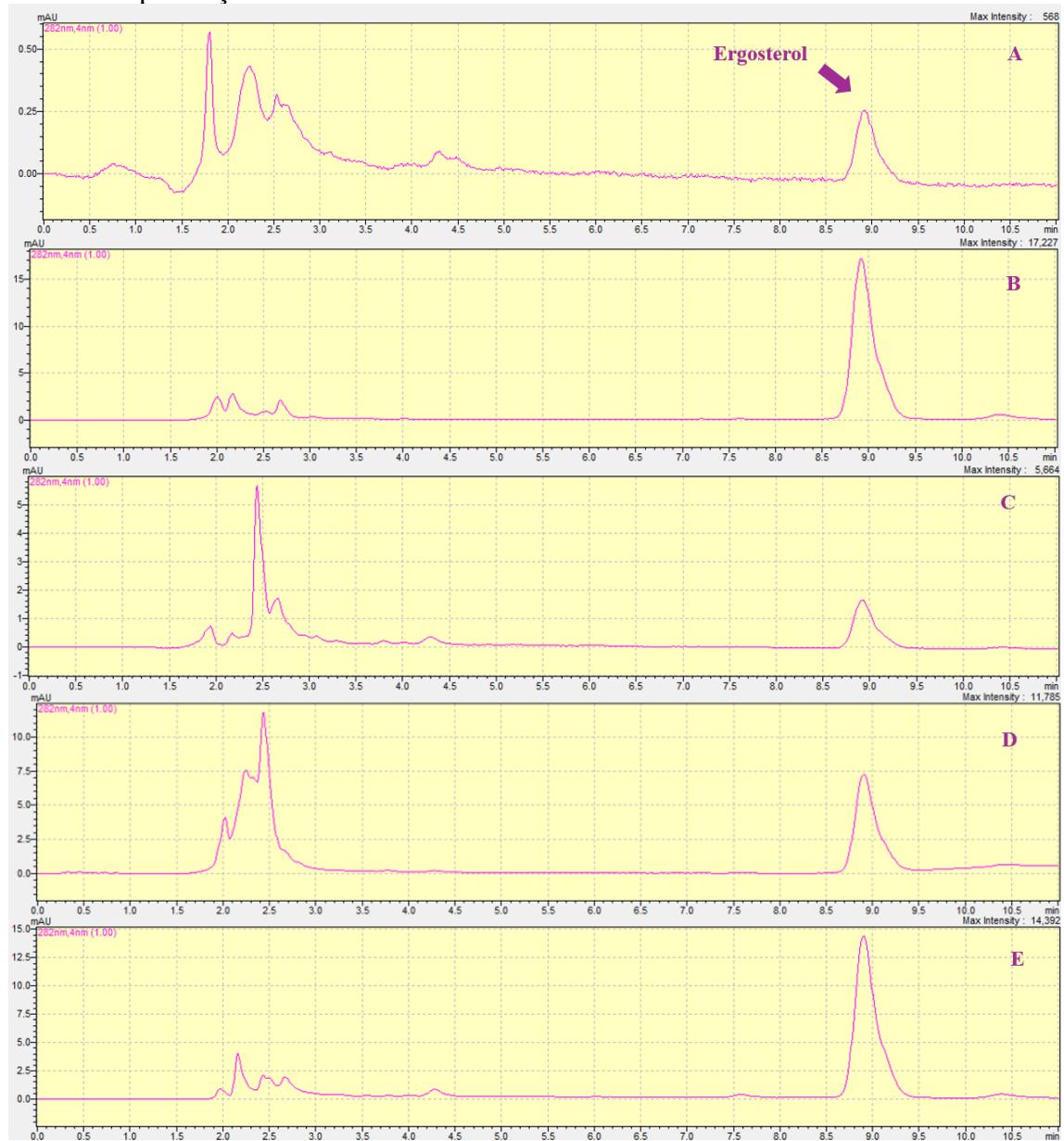
Novas moléculas com potencial antimicrobiano têm mostrado atividade contra micro-organismos na forma planctônica em ambientes laboratoriais. No entanto, na prática clínica, a

forma predominante é a séssil, na qual os micro-organismos formam biofilmes, seja infectando o hospedeiro ou vivendo no ambiente. Nesse contexto, o estudo da atividade de inibição de biofilme de um composto se torna essencial, pois o biofilme está fortemente associado a infecções persistentes (Martinez; Casadevall, 2015).

Diante disso, os resultados obtidos demonstram que JFOX-6 é um candidato promissor por possuir uma ação inibitória contra células planctônicas de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. neoformans* e *C. gattii*, como também pode servir para interferir nos biofilmes maduros desses patógenos, sendo um candidato à fármaco ou a um produto de ação desinfectante de superfícies abióticas.

Então, o próximo estudo consistiu em analisar a interferência da substância na biossíntese do ergosterol por *C. albicans* ATCC-66031, um lipídio que constitui a membrana celular em fungos, modula a fluidez, permeabilidade, integridade e espessura da membrana do micro-organismo (Gao *et al.*, 2018). Foi construída a curva de calibração linear e o R² foi de 0,9995 com ergosterol padrão (Sigma-Aldrich®). Na Figura 23 estão apresentados os cromatogramas, nos quais é possível observar a área do pico, a altura e o tempo de retenção do ergosterol (8,9 minutos).

Figura 23. Cromatograma de Ergosterol da Sigma-aldrich (padrão) e do micro-organismo na ausência e presença de JFOX-6.

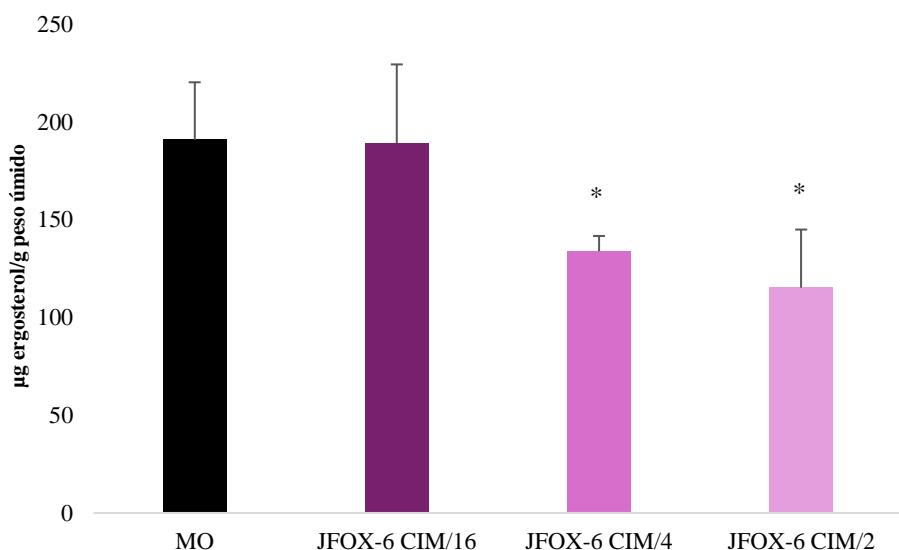


Comatograma A - padrão do ergosterol (Sigma-aldrich); Comatograma B – Micro-organismo na ausência de JFOX-6; Comatograma C – Micro-organismo exposto a 1/2 CIM de JFOX-6; Comatograma D - Micro-organismo exposto a 1/4 CIM de JFOX-6 e Comatograma E - Micro-organismo exposto a 1/16 CIM.

Fonte: Autora, 2025.

Nas condições avaliadas, a concentração de ergosterol diminuiu ao aumentar a concentração de JFOX-6, quando comparado com o controle (micro-organismo na ausência da droga), indicando uma possível interação sobre a biossíntese deste esterol (Figura 24).

Figura 24. Quantitativo de ergosterol de *C. albicans* ATCC-66031 após tratamento com concentrações subinibitórias de JFOX-6.



MO – Micro-organismo na ausência de JFOX-6; CIM – Concentração InibitóriaMínima; * p < 0,05 em comparação com o micro-organismo na ausência de JFOX-6.

Fonte: Autora, 2025.

O conteúdo de ergosterol diminuiu após o tratamento com concentrações subinibitórias de JFOX-6, quando submetidas a 1/2 CIM e 1/4 CIM, e foi reduzido em, respectivamente, 39,6% e 29,8%, em relação ao micro-organismo sem substância teste (Tabela 4).

Tabela 4. Interferência de JFOX-6 e suas concentrações subinibitórias sobre o ergosterol, em comparação com o controle.

	Controle	1/16 CIM	1/4 CIM	1/2 CIM
Conteúdo de ergosterol (µg erg/ g peso úmido)	190,88	189,25	133,91	115,23
% de ergosterol Redução ou aumento	100%	-0,86%	-29,85%	-39,63%

CIM: Concentração inibitória mínima; - Redução; + Aumento.

Fonte: Autora, 2025.

JFOX-6 interferiu na biossíntese de ergosterol. O mesmo ocorreu no estudo de Rather *et al.*, (2022), no qual observou-se uma diminuição dependente da concentração na biossíntese de ergosterol ao tratar *C. albicans* com compostos derivados triazólicos, com redução variando entre 33 e 64% com 1/2 CIM e, 91 a 96%, com CIM, indicando que esses compostos podem inibir a síntese de ergosterol e impedir o crescimento fúngico.

Resultado semelhante também foi encontrado no estudo desenvolvido por Behbehani *et al.* (2023), em que a 1/4 CIM e a 1/2 CIM de capsaicina reduziram 42,4% e 88,7%, respectivamente, o ergosterol em *C. albicans* e 64 µg/mL de cetoconazol reduziu 99,1%, indicando que o efeito antifúngico capsaicina é dependente de suas concentrações e o modo primário de ação pode estar ocorrendo pela inibição da biossíntese de ergosterol.

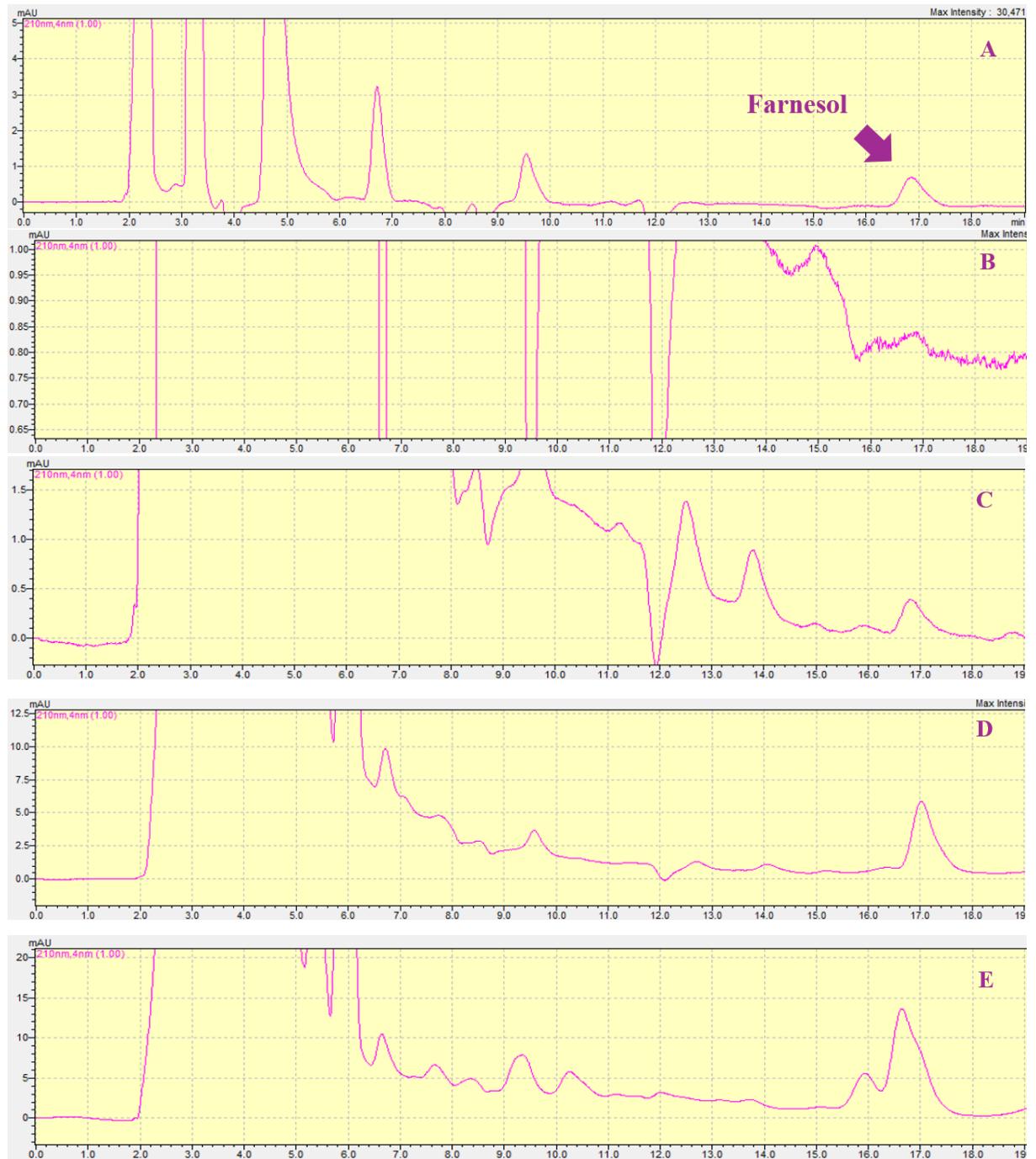
Um isolado de *Magnolia officinalis*, o polifenol honoquiol, também diminuiu significativamente o conteúdo de ergosterol nas células tratadas em comparação com o grupo controle, interferindo na biossíntese do ergosterol de *C. albicans* (Sun; Liao, 2020).

No estudo de Costa *et al.* (2023), as concentrações de CIM e 2x CIM de fluconazol reduziram, respectivamente, 79% e 69% do ergosterol em *C. albicans*, e a concentração de 2x CIM do composto (E)-3-(furan-2-il) acrilato de propila reduziu 75% do ergosterol, exercendo seu efeito antifúngico, interferindo na biossíntese de ergosterol em *C. albicans* e prejudicando a integridade da membrana. Esse efeito do fluconazol está relacionado ao seu mecanismo de ação, que envolve a inibição da enzima responsável pela 14 α -lanosterol-desmetilase, acarretando o acúmulo de intermediários anteriores da via (Mutasa; Mangoyi; Mukanganyam, 2015).

A próxima etapa do trabalho foi avaliar se a molécula estudada poderia alterar o *quorum sensing*, que constitui um importante mecanismo de comunicação entre micro-organismos, sendo também um sistema de resposta que depende da densidade celular. Ocorre quando as células liberam e detectam continuamente pequenas moléculas sinalizadoras e não participam diretamente do metabolismo central, porém desempenham papéis importantes em diversas funções biológicas (Kovács; Majoros, 2020). Por isso, a próxima etapa consistiu em monitorar a biossíntese e liberação de farnesol, o álcool de cadeia curta, autoindutor em *C. albicans*, visto que esse micro-organismo libera como um produto secundário da via sintética do ergosterol, através da desfosforilação do pirofosfato de farnesol.

Assim como o estudo anterior, o farnesol foi detectado por CLAE. Foi construída a curva de calibração com o farnesol padrão (Sigma-Aldrich®) e o R² foi de 0,9999. Na Figura 25 estão os cromatogramas indicando a área do pico, a altura e o tempo de retenção do farnesol (16,9 minutos). A JFOX-6 1/16 CIM estimulou a biossíntese de farnesol por *C. albicans* ATCC-60193, e ao comparar com o controle (micro-organismo na ausência da droga), foi possível observar que submeter a levedura a um estresse estimula esse autoindutor.

Figura 25. Cromatograma da análise de farnesol padrão (Sigma-aldrich) e do micro-organismo na ausência e presença de JFOX-6.



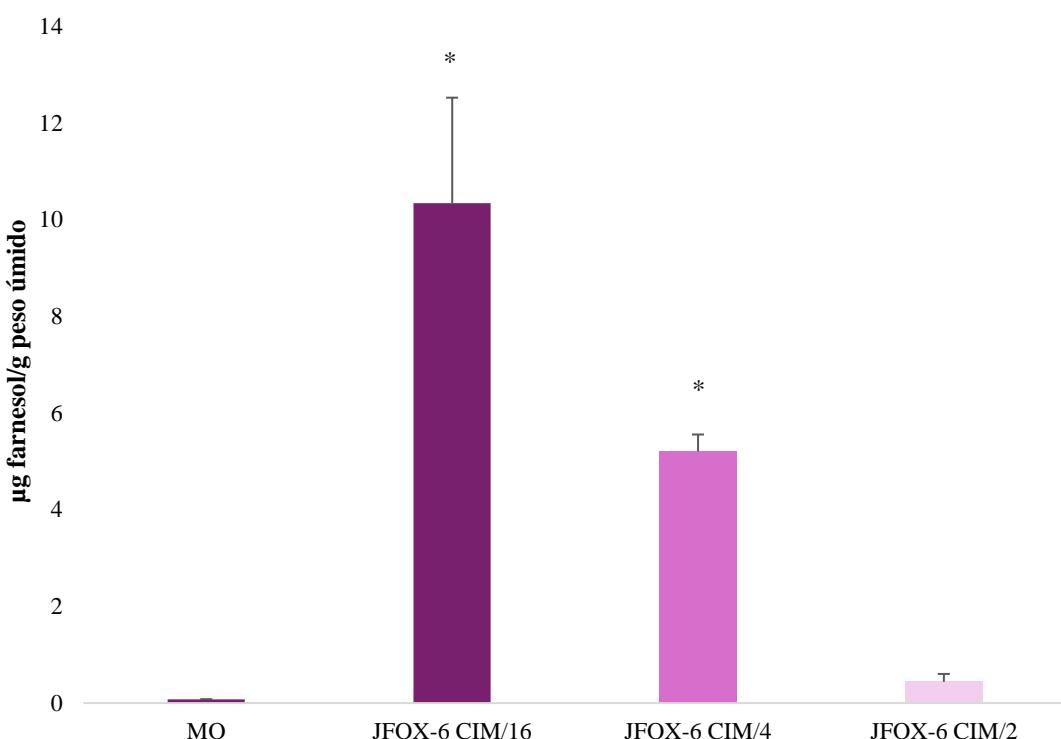
Comatograma A - padrão do farnesol (Sigma-aldrich); Cromatograma B – Micro-organismo na ausência de JFOX-6; Cromatograma C – Micro-organismo exposto a 1/2 CIM de JFOX-6; Cromatograma D - Micro-organismo exposto a 1/4 CIM de JFOX-6 e Cromatograma E - Micro-organismo exposto a 1/16 CIM.

Fonte: Autora, 2025.

Na ausência da substância-teste, o micro-organismo apresentou uma concentração pequena de farnesol e a produção foi induzida na presença de concentrações subinibitórias de

JFOX-6 (Figura 26), apresentando diferença significativa de produção de farnesol entre o controle e as condições avaliadas.

Figura 26. Produção de farnesol por *C. albicans* ATCC-66031 na ausência e presença (1/2 CIM, 1/4 CIM e 1/16 CIM) de JFOX-6.



MO – Micro-organismo na ausência de JFOX-6; CIM – Concentração InibitóriaMínima; * $p < 0,05$ em comparação com o micro-organismo na ausência de JFOX-6.

Fonte: Autora, 2025.

Ao comparar o comportamento de *C. albicans* submetida ao tratamento com JFOX-6 em concentrações subinibitórias, notou-se que a produção de farnesol foi estimulada ao diminuir a concentração. O mesmo ocorreu no estudo de Hornby; Nickerson (2004), ao submeter o micro-organismo ao tratamento com CIM de fluconazol (1 μM), o farnesol excretado aumentou aproximadamente 13 vezes. O tratamento com 1 μM de cetoconazol, 1 μM de clotrimazol e 0,5 μM de miconazol estimulou a produção de farnesol de 45, 45 e 44 vezes, respectivamente, em comparação com a cepa sem tratamento antifúngico. Tal efeito ocorre por esses antifúngicos inibirerem uma etapa na biossíntese do esterol, impedindo o fluxo de carbono para o ergosterol, aumentando assim a produção de farnesol.

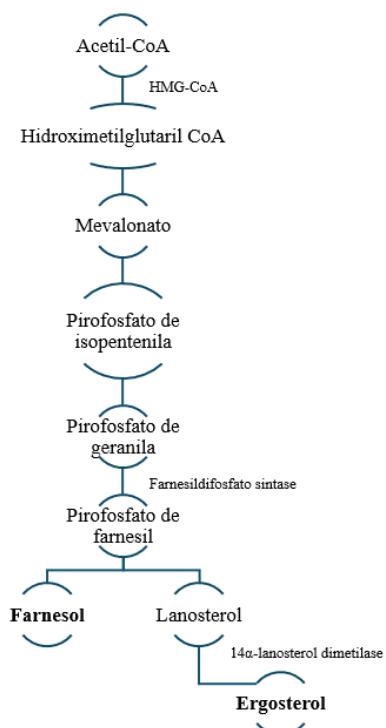
Isso pode ser explicado porque o farnesol é uma molécula de autoindutora que normalmente é secretada em resposta às condições de alta densidade celular ou situações

específicas. O farnesol é encontrado no interior de biofilmes, durante o crescimento em temperatura de 23 a 43 °C, e em quantidades aproximadamente proporcionais ao número de células (Rodrigues; Černáková, 2020).

Essa molécula bloqueia a transição da levedura para filamentos, quando acumulada acima de um nível limite, influencia na formação de biofilme, protege contra o estresse oxidativo e estimula a formação de clamidósporos. A sua sinalização é relevante durante uma infecção disseminada e níveis muito baixos podem induzir a morte celular (Langford *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2021).

O farnesol é sintetizado pelo farnesil pirofosfato (FPP) (Figura 27), catalisado pela atividade de múltiplas fosfatases não específicas atuando em FPP, e o fluxo de carbono, pela via do isopreno, é regulado principalmente na enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA redutase. Notadamente, os antifúngicos ocasionaram a diminuição do ergosterol e elevaram a expressão de dipeptidilpeptidase-3, aumentando o farnesol medido extracelularmente e inibindo a adenil ciclase, o que levou à redução da adenosina monofosfato cíclico, diminuindo a filamentação e, consequentemente, a virulência (Nickerson *et al.*, 2024).

Figura 27. Principais percursos da via do mevalonato envolvidos na síntese de farnesol.



Fonte: Autora, 2025.

A diferença na regulação da síntese de farnesol e ergosterol, embora ambos compartilhem o FPP como precursor na via do mevalonato, está relacionada ao papel do farnesol como molécula de sinalização e à regulação do fluxo metabólico, de modo que o acúmulo de farnesol redireciona o metabolismo para sua própria formação, diminuindo a disponibilidade de FPP para a biossíntese de ergosterol (Nickerson *et al.*, 2024).

O micro-organismo apresenta respostas celulares diferentes à medida que as concentrações de farnesol exógeno foram aumentadas, incluindo a modificação de coloração das colônias, a formação de hifas e a produção de biofilme, influenciando sua capacidade de causar infecções. *C. albicans* não possui apenas um gene para a resposta ao farnesol, mas uma rede de proteínas. Com isso, modula o potencial do micro-organismo em desenvolver candidíase local ou sistêmica, além de inibir o crescimento dos fungos e interferir na formação de biofilmes e na resistência a múltiplas drogas (Sachivkina; Podoprigora; Bokov, 2021; Nickerson *et al.*, 2024).

Diante disso, a próxima etapa foi o estudo de bomba de efluxo, visto que a superexpressão dessa bomba pode ser um dos mecanismos de resistência de micro-organismos. As bombas de efluxo podem ser divididas em cinco famílias distintas: ABC (“ATP binding cassette”), MFS (“major facilitator superfamily”), SMR (“small muldrug resistance”), RND (“resistance-nodulation-division”), MATE (“multidrug and toxic compound extrusion”) (Webber *et al.*, 2003; Delmar *et al.*, 2014). As leveduras *C. neoformans* e *C. albicans* possuem transportadores de multidrogas pertencentes à família ABC, o grupo principal dessa família é composto por proteínas de efluxo de drogas dependentes de força motriz de prótons (Pasrija; Banerjee; Prasad, 2007; Chang *et al.*, 2018). Então, esses micro-organismos foram submetidos ao tratamento com JFOX-6 e um desacoplador do gradiente eletroquímico de prótons da síntese de ATP, o CCCP, com a finalidade de verificar se há resultado positivo para bombas de efluxo.

O resultado dessa interação está na Tabela 5 e a interpretação dos resultados envolve a modificação da atividade da droga testada: se não modificar a CIM da JFOX-6 diante dos micro-organismos, pode indicar transporte potencialmente normal, então o mecanismo de resistência ocorre por uma via que pode induzir o desenvolvimento de resistência aos fármacos em leveduras. Caso diminua a CIM da JFOX-6, então a resistência está correlacionada a esse mecanismo (Guinea *et al.*, 2006).

Tabela 5. Comportamento da bomba de efluxo do micro-organismo na ausência e presença de um desacoplador da força próton-motora.

	<i>C. albicans</i> ATCC-10231						<i>C. neoformans</i> ATCC-66031					
	CCCP			CCCP AUSENTE			CCCP			CCCP AUSENTE		
	JFOX-6	ANFB	FLU	JFOX-6	ANF	FLU	JFOX-6	ANFB	FLU	JFOX-6	ANF	FLU
4x CIM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2x CIM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CIM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/2 CIM	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
1/4 CIM	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Cont + cccp	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cont +	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cont -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cont +: Viabilidade de crescimento do micro-organismo na ausência de CCCP e demais drogas-teste; **Cont + CCCP:** Viabilidade de crescimento do micro-organismo em contato com a concentração de 0,5 ou 0,25 µg/mL de CCCP; **Cont -:** Esterilidade do meio de cultura; **CIM:** Concentração Inibitória Mínima; **CCCP:** Carbonil cianeto-3-clorofenil-hidrazona; **ANFB:** Anfotericina B; **FLU:** Fluconazol; **+**: Houve crescimento de micro-organismo; **-**: Não houve crescimento de micro-organismo.

Fonte: Autora, 2025.

A Tabela 5 apresenta os resultados da interação de JFOX-6, anfotericina B e fluconazol contra *C. albicans* e *C. neoformans*, na presença e ausência de um desacoplador da bomba de prótons (CCCP). A adição de CCCP aumentou a susceptibilidade de ambos os fungos a todas as substâncias testadas, como visto nas concentrações subinibitórias, podendo indicar que as bombas de efluxo estão envolvidas na resistência aos antifúngicos.

As espécies de *C. neoformans* e *C. gattii* possuem três transportadores ABC: *Afr1*, *Afr2* e *MDR1*. O papel do *Afr1* vem sendo associado a uma bomba primária de efluxo de azóis em ambos os complexos dessas espécies e a superexpressão de *Afr1* influenciou o aumento de CIM do fluconazol em *C. neoformans*, enquanto a deleção do gene reduziu significativamente a CIM do fluconazol *in vitro* em ambas as espécies (Chang *et al.*, 2018).

Em estudo realizado por Oliveira *et al.* (2022), investigou o transcriptoma de células jovens e maduras de *C. neoformans* e observaram uma expressão significativamente maior do gene *CNAG_06909* nas células maduras, indicando que ele codifica um transportador do tipo ABC. Esse gene, renomeado como *Afr3* devido às semelhanças com os transportadores *Afr1* e *Afr2*, está envolvido no efluxo de fármacos, influenciando a susceptibilidade ao tratamento e a virulência das células de *C. neoformans*.

C. albicans ATCC-10231 é resistente a múltiplas drogas (MDR), como anidulafungina, voriconazol, itraconazol e fluconazol (Souza *et al.*, 2023). O estudo identificou que a resistência desse micro-organismo pode envolver o uso de bombas de efluxo. Os transportadores *Cdr1p* e *Cdr2p* são proteínas multidrogas de *Candida* que possuem dois domínios transmembranares hidrofóbicos e dois domínios de ligação a nucleotídeos no citoplasma, em que, cada domínio transmembranar é composto por seis segmentos que asseguram especificidade de substrato, incluindo compostos estruturalmente não relacionados, tais como azóis, lipídios e esteróides (Pasrija; Banerjee; Prasad, 2007).

No estudo de Basso-Jr *et al.* (2010), observou-se que o transporte de fluconazol mediado por transportadores da família MFS, como o *Mdr1p*, depende do gradiente de prótons transmembrana. Isso sugere que o *Mdr1p* em *Candida* utiliza esse gradiente para expelir o fluconazol da célula. A adição de CCCP, que desacopla o gradiente de prótons, bloqueia a função do *Mdr1p*, resultando em uma redução na resistência de *Candida* ao fluconazol, demonstrando que influenciou no transporte de fluconazol.

O mecanismo de superexpressão de carreadores associados à membrana que atuam como bombas de efluxo de drogas é um dos mecanismos descritos referentes à resistência de *C. albicans* aos fármacos. A diminuição da permeabilidade da membrana às drogas, aliada à capacidade das bombas de efluxo em expulsar os fármacos, pode explicar a resistência observada nessa espécie (Yousfi *et al.*, 2019).

O transporte de fluconazol em *C. albicans* para fora da célula antifúngico mediado pelo transportador Mdr1, foi inibido pelo CCCP, sugerindo que o mecanismo de resistência utiliza a força próton-motriz para o transporte de substratos (Basso *et al.*, 2010).

Os fungos desenvolvem resistência aos azóis por meio de mecanismos como mutações nos genes que codificam as enzimas-alvo (esterol 14- α -desmetilase) e pela superexpressão do gene *ERG1*, além de fatores como a superexpressão de genes codificadores do transporte de membrana e a ativação de bombas de efluxo, que impedem o acúmulo antifúngicos dentro da célula. Os principais sistemas de efluxo estão relacionados à resistência aos azóis: os transportadores ABC, presente na membrana plasmática, e os MDR1, presente na membrana interna e externa da célula, permitindo a rápida expulsão dos antifúngicos de dentro da célula, impedindo que permaneçam concentrações prejudiciais intracelular, garantindo a sobrevivência do micro-organismo (Esfahani *et al.*, 2024).

Compreender o mecanismo de resistência em leveduras é fundamental para o desenvolvimento de inibidores específicos das bombas de efluxo, além de possibilitar a combinação de antifúngicos com esses inibidores ou a inclusão de fármacos capazes de

contornar esse mecanismo, contribuindo para a eficácia terapêutica e a segurança do paciente. Diante disso, o próximo estudo foi a associação de substâncias relacionando a JFOX-6, com perfil fungistático aparente, com a anfotericina B, um composto fungicida, padrão-ouro na prática clínica, mas nefrotóxico, com a finalidade de verificar a interação dos dois compostos pela técnica de *Checkerboard*.

Na Tabela 6, estão os valores da Concentração Inibitória Fracionada (CIF) e dos respectivos Índices de CIF (I_{CIF}) frente às cepas de *Cryptococcus* e *Candida*, determinados pelo estudo de associação da JFOX-6 com a anfotericina B. Os estudos de associação objetivam reduzir a dose dos antifúngicos e consequentemente, seus efeitos tóxicos, como a nefrotoxicidade da anfotericina B.

Tabela 6. Efeitos da associação entre JFOX-6 e a anfotericina B contra *Cryptococcus* spp. e *Candida* spp.

COMBINAÇÃO (A) COM (B)	<i>C. neoformans</i> ATCC-66031	<i>C. gattii</i> ATCC-32269	<i>C. albicans</i> ATCC-10231	<i>C. tropicalis</i> ATCC-750
CIF_A	2,21	2,21	2,9844	2,3875
CIF_B	1,31	1,31	0,4219	2,1875
I_{CIF}	3,52	3,52	3,4063	4,575
INTERAÇÃO	Indiferente	Indiferente	Indiferente	Antagônico

(A): JFOX-6; (B): Anfotericina B; CIF: Concentração Inibitória Fracionada; I_{CIF} : Índice de Concentração Inibitória Fracionada

Fonte: Autora, 2025.

A interação de JFOX-6 com a Anfotericina B foi indiferente frente a *C. neoformans*, *C. gattii* e *C. albicans* e antagônica frente a *C. tropicalis*. A associação de substâncias vem sendo rotineiro na prática clínica, cuja finalidade é potencializar o efeito, sinergismo, minimizar a toxicidade, diminuir a concentração e desenvolvimento leveduras resistentes (Hagras *et al.*, 2021). Porém, esse efeito indiferente significa que a interação entre as duas moléculas não resulta em efeitos positivos ou negativos, já o efeito antagônico ocorre por diminuir o efeito individual da outra molécula (Chavarria; Esparza; Pozos, 2019).

No entanto, as interações podem variar dependendo da espécie fúngica, e a interação indiferente pode ser considerada vantajosa, pois não resulta em prejuízos na atividade do antifúngico (Andrade-Júnior *et al.*, 2024), enquanto a interação antagônica com *C. tropicalis* requer aumento de concentração dos antifúngicos.

Ao associar o composto sintético 1,3,4-oxadiazol-4-[ciclohexil(etyl)sulfamoil]N[5-(4-fluorofenil)-1,3,4-oxadiazol-2-il]benzamida com a anfotericina B frente as cepas de *C. albicans*, apresentaram interação sinérgica frente a todas as cepas, já ao associar o mesmo

composto com o fluconazol e itraconazol, foi observado que não apresentaram efeito sinérgico frente as cepas de *C. albicans* submetidas ao estudo (Faria *et al.*, 2021).

Em outro estudo, as interações entre o composto *Cis*-N-{5-[2-((1,1'-Bifenil)-4-il)-4-metiltiazol-5-il]-1,3,4-oxadiazol-2-il}ciclo-hexano-1,2-diamina e fluconazol, 5-fluorocitosina ou caspofungina apresentaram efeitos aditivos (IFIC entre 1,0 e 1,25) frente a *C. auris*, sendo essa associação desejável pelo objetivo de diminuir o desenvolvimento de resistência e a toxicidade dos antifúngicos administrados em terapias prolongadas, como o caso de infecções fúngicas invasivas (Hagras *et al.*, 2021).

Por fim, estudos *in vivo* são essenciais para avaliar a atividade antifúngica do JFOX-6, incluindo a redução de carga infectante desses fungos e diminuição de danos causados pela infecção. Além disso, é essencial esclarecer o mecanismo de ação da substância-teste, para viabilizar o seu uso futuro no tratamento de infecções como a criptococose e candidíase, considerando que o uso prolongado dos atuais antifúngicos empregados na prática clínica apresenta efeitos lesivos significativos, como a nefrotoxicidade.

6. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais desenvolvidas nesse estudo, a molécula JFOX-6 parece ser um antifúngico promissor, que/cuja(s):

- ✓ Apresentou ação fungistática e fungicida nas condições avaliadas;
- ✓ Na cinética de crescimento, apresentou atividade semelhante ao fluconazol;
- ✓ Interferiu nas estruturas de virulência, diminuindo a espessura da cápsula do gênero *Cryptococcus*, e inibiu os fatores de virulência e de reprodução do gênero *Candida*;
- ✓ Interferiu fortemente (2x CIM) na formação de biofilme nos estágios de maturação e dispersão de *C. neoformans*, e interferiu moderadamente no de *C. gattii*;
- ✓ Não permitiu formar biofilme de *C. albicans* no período de 72h, que é o estágio de maturação, enquanto diante de *C. tropicalis*, a interferência foi fraca.
- ✓ Interferiu na biossíntese de ergosterol em *C. albicans*;
- ✓ Concentrações subinibitórias estimularam a produção de farnesol, uma molécula *quorum sensing* em *C. albicans*;
- ✓ A resistência aos antifúngicos por essas leveduras podem estar associadas com a bomba de efluxo em *C. neoformans* e *C. albicans*;
- ✓ Apresentou atividade indiferente frente a *C. neoformans*, *C. gattii*, *C. albicans* ao associar com anfotericina B.

No entanto, o investimento em moléculas sintéticas é propício para o desenvolvimento de alternativas antifúngicas, podendo reduzir a CIM por meio da otimização da síntese e da encapsulação da molécula para melhores resultados. A continuidade dos estudos é necessária para explorar seus efeitos *in vitro* e *in vivo*, visando seu potencial como alternativa no tratamento de infecções causadas por leveduras e, futuramente, como candidato a antifúngico.

7. REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. P.; CUNHA, F. S. Síntese e bioatividade de 1, 2, 4-oxadiazóis. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2509-2530, 2015.
- ALDAMA, J. A. M.; PÉREZ, B. R., GALLARDO, S. G.; SÁNCHEZ, T. A. C. Daño estructural en *Cryptococcus neoformans* producido por un propóleo mexicano. **Nova Scientia**, v. 12, n. 25, p. 1-19, 2021.
- ANDRADE JÚNIOR, Francisco Patrício de et al. Anti-*Trichophyton rubrum* potential, association with fluconazole, and mechanism of action of (R)-(+)-citronellal. **Natural Product Research**, p. 1-6, 2024.
- ANDRADE, A. R. C.; PEREIRA, L. M. G.; SOUSA, J. K.; PORTELA, F. V. M.; ESPANA, J. D. A.; CORDEIRO; R. A. Formação de biofilme microcosmos a partir de amostras de pacientes com candidíase vulvovaginal. **Encontros Universitários da UFC**, v. 2, n. 1, 2017.
- ANDRADE-JÚNIOR, F. P.; TEIXEIRA, A. P. C.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, E. O.; LIMA, I. O. Estudo da associação do timol com a anfotericina B contra *Rhizopus orizae*. **Periódico Tchê Química**, v. 16, n. 31, p. 156-163, 2019.
- ANDRIANI, G. M.; SPOLADORI, L. F. D. A.; FABRIS, M.; CAMARGO, P. G.; PEREIRA, P. M. L.; SANTOS, J. P., BARTOLOMEU-GONÇALVES, G.; ALONSO, L.; LANCHEROS, C. A. C.; ALONSO, A.; NAKAMURA, C. V.; MACEDO-JÚNIOR, F.; PINGE FILHO, P.; YAMAUCHI, L. M.; BISPO, M. L. F.; TAVARES, E. R.; YAMADA-OGATTA, S. F. Synergistic antifungal interaction of N-(butylcarbamothioyl) benzamide and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 01-16, 2023.
- ARAÚJO, F. B.; MORAIS, V. C.; OLIVEIRA, B. T.; LIMA, K. Y.; GOMES, V. T.; AMARAL, I. P.; VASCONCELOS, U. Multi-purpose disinfecting solutions only partially inhibit the development of ocular microbes biofilms in contact lens storage cases. **Middle East African Journal of Ophthalmology**, v. 28, n. 2, p. 116, 2021.
- ARAÚJO, R. K. S.; FROTA, V. C. A.; SANTANA, M. S.; SOUZA, N. R. Risco emergente das infecções fúngicas invasivas: Revisão da literatura. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 9, n. 8, p. 1111-1125, 2023.
- ARDIZZONI, A. et al. Capezzone de Joannon A, Durando L, et al. Effects of benzydamine and mouthwashes containing benzydamine on *Candida albicans* adhesion, biofilm formation, regrowth, and persistence. **Clin Oral Investig**, v. 26, p. 3613-25, 2022.
- ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; JRADI, H.; DESAI, T.; MORRISON, C. J. Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3332-3337, 1999.
- BADDLEY, J. W.; FORREST, G. N. Cryptococcosis in solid organ transplantation - Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. **Clinical Transplantation**, v. 33, n. 9, p. 1-11, 2019.
- BARROS, P. P.; ROSSONI, R. D.; DE SOUZA, C. M.; SCORZONI, L.; FENLEY, J. D. C.; JUNQUEIRA, J. C. *Candida* biofilms: an update on developmental mechanisms and therapeutic challenges. **Mycopathologia**, v. 185, n. 3, p. 415-424, 2020.

- BASSO JR, L. R.; Gast, C. E.; Mao, Y.; Wong, B. Fluconazole transport into *Candida albicans* secretory vesicles by the membrane proteins Cdr1p, Cdr2p, and Mdr1p. **Eukaryotic cell**, v. 9, n. 6, p. 960-970, 2010.
- BATLINER, M.; SCHUMACHER, F.; WIGGER, D.; VIVAS, W.; PRELL, A.; FOHMANN, I.; KÖHLER, T.; SCHEMPP, R.; RIEDEL, A.; VAETH, M.; FEKETE, A.; KLEUSER, B.; KURZAI, O.; NIEUWENHUIZEN, N. E. The *Candida albicans* quorum-sensing molecule farnesol alters sphingolipid metabolism in human monocyte-derived dendritic cells. **Mbio**, v. 15, n. 8, p. 1-22, 2024.
- BEHBEHANI, J. M.; IRSHAD, M.; SHREAZ, S.; KARCHED, M. Anticandidal activity of capsaicin and its effect on ergosterol biosynthesis and membrane integrity of *Candida albicans*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2, p. 1046, 2023.
- BOBEK, Libuse A.; SITU, Hongsa. MUC7 20-Mer: investigation of antimicrobial activity, secondary structure, and possible mechanism of antifungal action. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 643-652, 2003.
- BRASIL. **Detecção e identificação dos fungos de importância médica**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 2004.
- BRASIL. **Guia de Vigilância em Saúde: volume único**. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. 3^a ed, Brasília: Ministério da Saúde, 2019.
- BU, Q. R.; BAO, M. Y.; YANG, Y.; WANG, T. M.; WANG, C. Z. Targeting virulence factors of *Candida albicans* with natural products. **Foods**, v. 11, n. 19, p. 1-22, 2022.
- CABRAL, M. E.; FIGUEROA, L. I. C.; FARIÑA, J. I. Synergistic antifungal activity of statin–azole associations as witnessed by *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* bioassays and ergosterol quantification. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 30, n. 1, p. 31-38, 2013.
- CAMPOS, T.; COSENTINO, C.; SIMIONI, P. U.; UGRINOVICH, L. A. Avaliação do comportamento de leveduras do gênero *Candida* a fármacos antifúngicos. **Ciência & Inovação**, v. 5, n. 1, p. 17-24, 2020.
- CAPOCI, I. R. G.; SAKITA, K. M.; FARIA, D. R.; VENDRAMINI, R.; VILUGRON, F. A.; ARITA, G. S.; OLIVEIRA, A. G.; FELIPE, M. S.; MAIGRET, B.; MENDONÇA, P. S. B.; KIOSHIMA, E. S.; SVIDZINSKI, T. I. E. Two new 1, 3, 4-oxadiazoles with effective antifungal activity against *Candida albicans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2130-2141, 2019.
- CARDOSO, N. N. R.; ALVIANO, C. S.; BLANK, A. F.; ROMANOS, M. T.; FONSECA, B. B.; ROZENTAL, S.; RODRIGUES, I. A.; ALVIANO, D. S. Synergism effect of the essential oil from *Ocimum basilicum* var. Maria Bonita and its major components with fluconazole and its influence on ergosterol biosynthesis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p.1-12, 2016.
- CAVALVANTE, F.; FERREIRA, T. Mecanismos de virulência do *Cryptococcus* spp e os desafios no tratamento da criptococose. **Repositório Institucional: Anais do Simpósio ICESP**, v. 24, n. 1, p. 645-656, 2022.

- CAVASSIN, F. B.; BAÚ-CARNEIRO, J. L.; VILAS-BOAS, R. R.; QUEIROZ-TELLES, F. Sixty years of Amphotericin B: An overview of the main antifungal agent used to treat invasive fungal infections. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 10, n. 1, p. 115-147, 2021.
- CHANG, M.; SIONOV, E.; LAMICHHANE, A. K.; KWON-CHUNG, K. J.; CHANG, Y. C. Roles of three *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* efflux pump-coding genes in response to drug treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 4, p., 2018.
- CHAVARRÍA, B. D.; ESPARZA, V. V.; POZOS, G. A. Pharmacological synergism: A multimodal analgesia approach to treat dental pain. **Odovtos International Journal of Dental Sciences**, v. 21, n. 1, p. 10-14, 2019.
- CHEW, S. Y.; THAN, L. T. L. Vulvovaginal candidosis: Contemporary challenges and the future of prophylactic and therapeutic approaches. **Mycoses**, v. 59, n. 5, p. 262–273, 2016.
- CHIOCCHIO, V. M.; MATKOVIĆ, L. Determination of ergosterol in cellular fungi by HPLC. A modified technique. **Journal of Argentine Chemical Society**, v. 98, p. 10-15, 2011.
- CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials "in vitro" and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. *Antibiotics in laboratory medicine*. 3^a ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1991. p.739-788.
- COLOMBO, I. M.; ANJOS, D. A. S.; ANTUNES, J. R. Pesquisa translacional em ensino: uma aproximação. **Saúde Debate**, v. 3, n. esp 2, p. 181-199, 2019.
- CORTÉS, J. C. G. CURTO, M. Á.; CARVALHO, V. S.; PÉREZ, P.; RIBAS, J. C. The fungal cell wall as a target for the development of new antifungal therapies. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 6, p. 1-23, 2019.
- COSTA, J. P. R.; ALMEIDA, A. C.; MARTINS, E. R.; RODRIGUES, M. N.; SANTOS, C. A.; MENEZES, I. R. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim-pimenta e do extrato bruto seco do barbatimão diante de bactérias isoladas do leite. **Biotemas**, v. 24, n. 4, p. 1-6, 2011.
- COSTA, P. C. T.; SANTOS, T. L. B.; RAMOS, J. F.; SANTOS, J. A. M.; MEDEIROS, F. D. D.; FREITAS, J. C. R.; OLIVEIRA, W. A. Propyl (E)-3-(furan-2-yl) Acrylate: a synthetic antifungal potential with a regulatory effect on the biosynthesis of ergosterol in *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 59, n. 1, p. 1-14, 2023.
- CRAWFORD, C. J.; CORDERO, R. J.; GUAZZELLI, L.; WEAR, M. P.; BOWEN, A.; OSCARSON, S.; CASADEVALL, A. Exploring *Cryptococcus neoformans* capsule structure and assembly with a hydroxylamine-armed fluorescent probe. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 13, p. 4327-4340, 2020.
- DELMAR, J. A.; SU, C. C.; YU, E. W. Bacterial multidrug efflux transporters. **Annual Review of Biophysics**, v. 43, n. 1, p. 93-117, 2014.
- DOERN C. D. When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 12, p. 4124–4128, 2014.
- ESFAHANI, A.; OMRAN, A. N.; SALEHI, Z.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; GHANE, M.; EYBPOOSH, S.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Up-regulation of CDR1 and MDR1 efflux pump genes and fluconazole resistance are involved in recurrence in *Candida albicans*.

induced vulvovaginal candidiasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 109, n. 1, p. 116242, 2024.

EUCAST. EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. **Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts**. Def, v. 7, n. 4, 2023.

FARIA, D. R.; MELO, R. C.; ARITA, G. S.; SAKITA, K. M.; RODRIGUES-VENDRAMINI, F. A. V.; CAPOCI, I. R. G.; BECKER, T. C. A.; BONFIM-MENDONÇA, P. S.; FELIPE, M. S. S.; SVIDZINSKI, T. I. E.; KIOSHIMA, E. S. Fungicidal activity of a safe 1, 3, 4-oxadiazole derivative against *Candida albicans*. **Pathogens**, v. 10, n. 3, p. 1-19, 2021.

FARSHORI, N. N.; RAUF, A.; SIDDIQUI, M. A.; AL-SHEDDI, E. S.; AL-OQAIL, MM. A facile one-pot synthesis of novel 2, 5-disubstituted-1, 3, 4-oxadiazoles under conventional and microwave conditions and evaluation of their in vitro antimicrobial activities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, n. 2, p. S2853-S2861, 2017.

FREITAS, G. J. C.; RIBEIRO, N. Q.; GOUVEIA-EUFRASIO, L.; EMIDIO, E. C.; GUIMARÃES, G. M.; CÉSAR, I. C.; PAIXÃO, T. A.; OLIVEIRA, J. B. S.; JAMES, M. C.; SANTOS, D. A. Antimalarials and amphotericin B interact synergistically and are new options to treat cryptococcosis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 62, n. 1, p. 106807, 2023.

FREITAS, J. J. R.; SILVA, E. E.; REGUEIRA, J. L.; DE ANDRADE, S. A.; CAVALCANTE, P. M. M.; OLIVEIRA, R. N.; FREITAS FILHO, J. R. 1, 2, 4-Oxadiazóis: Síntese e aplicações. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 670-691, 2012.

FREITAS-FILHO, J. R.; SILVA, R. L.; SANTOS, J. A. M.; SILVA, E. E.; FREITAS, J. J. R.; FREITAS, J. C. Amidoximas: Aplicações e principais estratégias sintéticas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2549-2596, 2015.

GAO, J.; Wang, H.; Li, Z.; Wong, A. H. H.; Wang, Y. Z.; Guo, Y.; Lin, X.; Zeng, G.; Liu, H.; Wang Y.; Wang, J. *Candida albicans* gains azole resistance by altering sphingolipid composition. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 4495, 2018.

GUINEA, J.; SÁNCHEZ-SOMOLINOS, M.; CUEVAS, O.; PELÁEZ, T.; BOUZA, E. Fluconazole resistance mechanisms in *Candida krusei*: the contribution of efflux-pumps. **Medical Mycology**, v. 44, n. 6, p. 575-578, 2006.

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

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v. 11, n.3, p. 137-147, 2000.

HAGRAS, M.; ABUTALEB, N. S.; SAYED, A. M.; SALAMA, E. A.; SELEEM, M. N.; MAYHOUB, A. S. Evaluation of bisphenylthiazoles as a promising class for combating multidrug-resistant fungal infections. **Plos one**, v. 16, n. 11, p. 1-17, 2021.

HAGRAS, M.; SALAMA, E. A.; SAYED, A. M.; ABUTALEB, N. S.; KOTB, A.; SELEEM, M. N.; MAYHOUB, A. S. Oxadiazolylthiazoles as novel and selective antifungal agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 189, p. 1-9, 2020.

- HENAO-MARTÍNEZ, A. F.; CHASTAIN, D. B.; FRANCO-PAREDES, C. Treatment of cryptococcosis in non-HIV immunocompromised patients. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 31, n. 4, p. 278-285, 2018.
- HOGAN, D. A. Talking to themselves: autoregulation and *quorum sensing* in fungi. **Eukaryotic cell**, v. 5, n. 4, p. 613-619, 2006.
- HORNBY, J. M.; JENSEN, E. C.; LISEC, A. D.; TASTO, J. J.; JAHLKE, B.; SHOEMAKER, R.; DUSSAULT, P.; NICKERSON, K. W. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 7, p. 2982-2992, 2001.
- HORNBY, J. M.; NICKERSON, K. W. Enhanced production of farnesol by *Candida albicans* treated with four azoles. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2305-2307, 2004.
- HUONG, N. T. C.; ALTIBI, A.; HOA, N. M.; TUAN, L. A.; SALMAN, S.; MORSY, S.; LIEN, N. T. B.; TRUONG, N. T.; MAI, N. T. H.; HOA, F. T. L.; THANG, N. B; TRUNG, V. T. Progressive cutaneous Cryptococcosis complicated with meningitis in a *myasthenia gravis* patient on long-term immunosuppressive therapy – A case report. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 1-7, 2017.
- KLEPSER, M. E.; ERNST, E. J.; LEWIS, R. E.; ERNST, M. E.; PFALLER, M. A. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 5, p. 1207-1212, 1998.
- KONG, Q.; CAO, Z.; LV, N.; ZHANG, H.; LIU, Y.; HU, L.; LI, J. Minocycline and fluconazole have a synergistic effect against *Cryptococcus neoformans* both *in vitro* and *in vivo*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 836, 2020.
- KOVÁCS, R.; MAJOROS, L. Fungal quorum-sensing molecules: a review of their antifungal effect against *Candida* biofilms. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 99, 2020.
- KUMAR, A.; ZARYCHANSKI, R.; PISIPATI, A.; KUMAR, A.; KETHIREDDY, S.; BOW, E. J. Fungicidal versus fungistatic therapy of invasive *Candida* infection in non-neutropenic adults: A meta-analysis. **Mycology**, v. 9, n. 2, p. 116-128, 2018.
- KUMAR, D.; PATEL, G.; CHAVERS, A. K.; CHANG, K. H.; SHAH, K. Synthesis of novel 1, 2, 4-oxadiazoles and analogues as potential anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 7, p. 3085-3092, 2011.
- KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. 4^a ed. Amsterdam: Elsevier Science, 1055p., 1998.
- LANGFORD, M. L. HARGARTEN, J. C.; PATEFIELD, K. D.; MARTA, E.; BLANKENSHIP, J. R.; FANNING, S.; NICKERSON, K. W. ATKIN, A. L. *Candida albicans* Czf1 and Efg1 coordinate the response to farnesol during quorum sensing, white-opaque thermal dimorphism, and cell death. **Eukaryotic cell**, v. 12, n. 9, p. 1281-1292, 2013.
- LAVAEE, F.; MOTAMEDIFAR, M.; RAFIEE, G. The effect of photodynamic therapy by gold nanoparticles on *Streptococcus mutans* and biofilm formation: An *in vitro* study. **Lasers in Medical Science**, v. 37, n. 1, p. 1717-1725, 2022.
- LEAL, M. R. D.; LIMA, M. C. N. P. C.; KLEIN, S. D. O. T.; GARBOGGI, P. V. S. L. Tratamento da candidíase vulvovaginal e novas perspectivas terapêuticas: uma revisão narrativa. **Revista Pesquisa em Fisioterapia**, v. 6, n. 4, p. 462-469, 2016.

- LEE, J.; Kim, Y. G.; Khadke, S. K.; Lee, J. Antibiofilm and antifungal activities of medium-chain fatty acids against *Candida albicans* via mimicking of the *quorum-sensing* molecule farnesol. **Microbial Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 1353-1366, 2021.
- LEV, S.; LI, C.; DESMARINI, D.; LIUWANTARA, D.; SORRELL, T. C.; HAWTHORNE, W. J.; DJORDJEVIC, J. T. Monitoring glycolysis and respiration highlights metabolic inflexibility of *Cryptococcus neoformans*. **Pathogens**, v. 9, n. 9, p. 684, 2020.
- LEWIS, R.E.; DIEKEMA, D. J.; MESSER, M. A.; PFALLER, M. A.; KLEPSER, M. E. Comparison of Etest, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 345-351, 2002.
- LI, D.; XU, Y.; ZHANG, D.; QUAN, H.; MYLONAKIS, E. HU, D.; LI, M.; ZHAO, L.; ZHU, L.; WANG, Y.; JIANG, Y. Fluconazole assists berberine to kill fluconazole-resistant *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, p. 6016-6027, 2013.
- LIU, W.; LI, L. P.; ZHANG, J. D.; LI, Q.; SHEN, H.; CHEN, S. M.; Ele, L. J.; Yan, L.; Xu, G. T.; Na, M. M.; JIANG, Y. Y. Synergistic antifungal effect of glabridin and fluconazole. **PloS One**, v. 9, n. 7, p. 1-10, 2014.
- MACHADO, K. R. G. Influência das condições nutricionais na virulência e resistência antifúngica de *Cryptococcus* spp. **Revista Ceuma Perspectivas**, v. 37, n. 20, p. 55-64, 2022.
- MALLADI, S.; ISLOOR, A. M.; PEETHAMBAR, S. K.; FUN, H. K. Synthesis and biological evaluation of newer analogues of 2, 5-disubstituted 1, 3, 4-oxadiazole containing pyrazole moiety as antimicrobial agents. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 7, n. 6, p. 1185-1191, 2014.
- MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Biofilm formation by *Cryptococcus neoformans*. **Microbiology spectrum**, v. 3, n. 3, p. 135-147, 2015.
- MAY, Robin C.; STONE, N. R.; WIESNER, D. L.; BICANIC, T.; NIELSEN, K. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 106-117, 2016.
- MCCALL, A. D.; PATHIRANA, R. U.; PRABHAKAR, A.; CULLEN, P. J.; EDGERTON, M. *Candida albicans* biofilm development is governed by cooperative attachment and adhesion maintenance proteins. **NPJ biofilms and microbiomes**, v. 5, n. 1, p. 21, 2019.
- MORAES, S. S.; FELIX, L. S.; BADIN, R. C. Azole antifungals: clinical utility and drug interactions. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 10, p. 66152-66169, 2022.
- MORAES-PINTO, M. I.; FERRARINI, M. A. G. Infecções oportunistas em pediatria: quando suspeitar e como abordar. **Jornal de Pediatria**, v. 96, p. 47-57, 2020.
- MOREIRA, M. A.; OLIVEIRA, J. A.; TEIXEIRA, L. M.; MORAES, C.A. Detection of a chloramphenicol efflux system in *Escherichia coli* isolated from poultry carcass. **Veterinary Microbiology**, v. 109, p.75–81. 2005.
- MUTASA, T.; MANGOYI, R.; MUKANGANYAMA, S. The effects of *Combretum zeyheri* leaf extract on ergosterol synthesis in *Candida albicans*. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, v. 21, n. 2, p. 211-217, 2015.

- NICKERSON, K. W.; GUTZMANN, D. J.; BOONE, C. H.; PATHIRANA, R. U.; ATKIN, A. L. Physiological adventures in *Candida albicans*: farnesol and ubiquinones. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 88, n. 1, p. 1-33, 2024.
- NÓBREGA, R. O.; TEIXEIRA, A. P. C.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, E. O.; LIMA, I. O. Investigation of the antifungal activity of carvacrol against strains of *Cryptococcus neoformans*. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 11, p. 2591-2596, 2016.
- OLIVEIRA, N. K.; BHATTACHARYA, S.; GAMBHIR, R.; JOSHI, M.; FRIES, B. C. Novel ABC transporter associated with fluconazole resistance in aging of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 7, p. 677, 2022.
- OLIVEIRA, R. J.; SANTOS, C. S.; FREITAS FILHO, J. R.; SANTOS, F. A.; MEDEIROS, H. I. R.; FREITAS, J. C. R. Synthesis and toxicological bioassay of arylamidoximes. **Periodico Tchê Química**, v. 16, n. 31, p. 281-300, 2018.
- PAGANO, P. J., BUCHANAN, L. V., DAILEY, C. F., HAAS, J. V., VAN ENK, R. A., GIBSON, J. K. Effects of linezolid on staphylococcal adherence versus time of treatment. **International journal of antimicrobial agents**, v. 23, n. 3, p. 226-234, 2004.
- PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D. R.; CLANCY, C. J.; MARR, K. A.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI, A. C.; SCHUSTER, M. G.; VÁZQUEZ, J. A.; WALSH, T. J.; ZAOUTIS, T. R.; SOBEL, J. D. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 4, p. e1-e50, 2016.
- PASRIJA, R.; BANERJEE, D.; PRASAD, R. Structure and function analysis of CaMdr1p, a major facilitator superfamily antifungal efflux transporter protein of *Candida albicans*: identification of amino acid residues critical for drug/H⁺ transport. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 3, p. 443-453, 2007.
- PEARCE, S. The importance of heterocyclic compounds in anti-cancer drug design. **Drug Discovery**, v. 18, n. 2, p. 66-70, 2017.
- PEIXOTO, J. V.; ROCHA, M. G.; NASCIMENTO, R. T. L.; MOREIRA, V. V.; KASHIWABARA, T. G. B. Candidíase - Uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research - BJSCR**, v. 8, n. 2, p. 75-82, 2014.
- PEREIRA, R.; FONTENELLE, R. O. S.; BRITO, E. H. S.; MORAIS, S. M. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 1, p. 11-22, 2021.
- PERFECT, J. R. Cryptococcosis: a model for the understanding of infectious diseases. **The Journal of clinical investigation**, v. 124, n. 5, p. 1893-1895, 2014.
- PRASAD, R.; PANWAR, S. L.; SMRITI. Drug resistance in yeasts - an emerging scenario. **Advances in Microbial Physiology**, v. 46, n. 1, p. 155-201, 2002.
- QIAN, Weidong *et al.* Exploitation of the antifungal and antibiofilm activities of plumbagin against *Cryptococcus neoformans*. **Biofouling**, v. 38, n. 6, p. 558-574, 2022.
- RANJITH, K.; CHAKRAVARTHY, S. K.; ADICHERLA, H.; SHARMA, S.; SHIVAJI, S. Temporal expression of genes in biofilm-forming ocular *Candida albicans* isolated from patients with keratitis and orbital cellulitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 59, n. 1, p. 528-538, 2018.

- RATHER, I. A.; SABIR, J. S.; ASSERI, A. H.; WANI, M. Y.; AHMAD, A. Triazole derivatives target 14 α -demethylase (LDM) enzyme in *Candida albicans* causing ergosterol biosynthesis inhibition. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 7, p. 688, 2022.
- ROCHA, W. R. V.; NUNES, L. E.; NEVES, M. L. R.; XIMENES, E. C. P. A.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A. Gênero *Candida* - Fatores de virulência, epidemiologia, candidíase e mecanismos de resistência. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. 1-14, 2021.
- RODRIGUES, C. F.; ČERNÁKOVÁ, L. Farnesol and tyrosol: secondary metabolites with a crucial quorum-sensing role in *Candida* biofilm development. **Genes**, v. 11, n. 4, p. 444, 2020.
- SACHIVKINA, N.; PODOPRIGORA, I.; BOKOV, D. Morphological characteristics of *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, and *Candida glabrata* biofilms, and response to farnesol. **Veterinary World**, v. 14, n. 6, p. 1608, 2021.
- SCHERRER, J. V.; MARCON, L. N. Formação de biofilme e segurança dos alimentos em serviços de alimentação. **Revista da Associação Brasileira de Nutrição-RASBRAN**, v. 7, n. 2, p. 91-99, 2016.
- SHAO, X.; XIE, Y.; ZHANG, Y.; DENG, X. Biofilm Formation Assay in *Pseudomonas syringae*. **Bio-protocol**, v. 9, n. 10, p. e3237, 2019.
- SHRESTHA, S. K.; FOSSO, S. K.; GREEN, K. D.; GARNEAU-TSODIKOVA, S. Amphiphilic tobramycin analogues as antibacterial and antifungal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, 2015.
- SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 338p.
- SILVA S. L.; LIMA, M. E.; SANTOS, R. D. T.; LIMA, E. O. Onicomicoses por fungos do gênero *Candida*: uma revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. 1-26, 2020.
- SILVA, K. G. V.; PIRES, K. G. R.; FURTADO, H. L. A.; MOTTA, B. L. A.; FIRMO, W. C. A. Morfologia, epidemiologia e virulência de espécies do gênero *Candida*. **Tópicos nas Ciências da Saúde**, v. 7, p. 42-58, 2021.
- SILVA, P. M.; MOURA, M. C.; GOMES, F. S.; TRENTIN, D. S.; OLIVEIRA, A. P. S.; MELLO, G. S. V.; PITTA, M. G. R.; REGO, M. J. B. M.; COELHO, L. C. B. B.; MACEDO, A. J.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H. PgTeL, the lectin found in *Punica granatum* juice, is an antifungal agent against *Candida albicans* and *Candida krusei*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, n. 1, p. 391-400, 2018.
- SOARES, D. M.; LIMA, E. O.; SOARES, D. M. M.; SILVA, N. F.; COSTA, N. G. M.; FARIA, F. S. E. D. V.; RODRIGUEZ, A. F. R. Candidíase vulvovaginal: Uma revisão de literatura com abordagem para *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Surgery & Clinical Research**, v. 25, n. 1, p. 28-34, 2018.
- SOUZA, T. F. FERREIRA, T. G.; FERREIRA, K. C.; OLIVEIRA, L. M.; CAMPOS, L. M.; CARVALHO, L. A.; ANDRADE, N. B.; FABRI, R. L. *Mitracarpus frigidus*: explorando o potencial medicinal e os compostos bioativos de uma fonte natural—um estudo de revisão. **Revista Científica da FAMINAS**, v. 18, n. 2, p. 43-61, 2023.

- STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; HOLÀ, V.; BONAVENTURA, G. D.; DJUKIĆ, S.; ĆIRKOVIĆ, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*, v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007.
- SUETH-SANTIAGO, V.; FRANKLIM, T. N.; LOPES, N. D.; LIMA, M. E. F. CYP51: Uma Boa Ideia? *Revista Virtual de Química*, v. 7, n. 2, p. 539-575, 2015.
- SUN, L.; LIAO, K. The effect of honokiol on ergosterol biosynthesis and vacuole function in *Candida albicans*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 30, n. 12, p. 1835, 2020.
- SVEDSE, V. M.; MACEDO, E. S.; LEÃO, I. F.; DINIZ, M. C. COVID-19 e doenças fúngicas invasivas: levantamento bibliográfico e patentário. *Saúde e Meio Ambiente: Revista Interdisciplinar*, v. 11, n. 1, p. 25-42, 2022.
- TAFF, H. T.; MITCHELL, K. F.; EDWARD, J. A.; ANDES, D. R. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiology*, v. 8, n. 10, p. 1325-1337, 2013.
- TALAPKO, J., JUZBAŠIĆ, M., MATIJEVIĆ, T., PUSTIJANAC, E., BEKIĆ, S., KOTRIS, I., & ŠKRLEC, I. *Candida albicans* - The virulence factors and clinical manifestations of infection. *Journal of Fungi*, v. 7, n. 2, pág. 1-19, 2021.
- TAVARES, E. R.; GIONCO, B.; MORGUETTE, A. E. B.; ANDRIANI, G. M.; MOREY, A. T.; CARMO, A. O.; PEREIRA, U. P.; ANDRADE, G.; OLIVEIRA, A. G.; PINGE-FILHO, P.; NAKAMURA, C. V.; YAMAUCHI, L. M.; YAMADA-OGATTA, S. F. Phenotypic characteristics and transcriptome profile of *Cryptococcus gattii* biofilm. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2019.
- THATCHANAMOORTHY, N.; DEVI, V. R.; CHANDRAMATHI, S.; TAY, S. T. *Candida auris*: A mini review on epidemiology in healthcare facilities in Asia. *Journal of Fungi*, v. 8, n. 11, p. 1-18, 2022.
- TORRES, P. P. T.; RABAHI, M. F.; MOREIRA, M. A. C.; SANTANA, P. R. P.; GOMES, A. C. P.; MARCHIORI, E. Avaliação tomográfica das doenças fúngicas no tórax: abordagem por padrões e sinais. *Radiologia Brasileira*, v. 51, n. 5, p. 313-321, 2018.
- TSUI, C.; KONG, E. F.; JABRA-RIZK, M. A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *FEMS Pathogens and Disease*, v. 74, n. 4, 2016.
- VEIGA, F. F.; CÉZAR, J. S.; JARROS, I. C.; NEGRI, M. Fatores de virulência e susceptibilidade a antifúngicos de *Cryptococcus* spp. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, v. 24, n. 1, p. 3-7, 2020.
- WALIA, K.; MENDELSON, M.; KANG, G.; VENKATASUBRAMANIAN, R.; SINHA, R.; VIJAY, S.; VEERARAGHAVAN, B.; BASNYAT, B.; RODRIGUES, C.; BANSAL, N.; RAY, P.; MATHUR, P.; GOPALAKRISHNAN, R.; OHRI, V. C. How can lessons from the COVID-19 pandemic enhance antimicrobial resistance surveillance and stewardship?. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 23, n. 1, p. e301-e309, 2023.
- WANG, L.; LIN, X. The morphotype heterogeneity in *Cryptococcus neoformans*. *Current Opinion in Microbiology*, v. 26, n. 1, p. 60-64, 2015.
- WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 51, n. 1, p. 9-11, 2003.

- WHO. **Fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action.** Geneva: World Health Organization, p. 48, 2022a.
- WHO. **Guidelines for diagnosing, preventing and managing cryptococcal disease among adults, adolescents and children living with HIV.** Geneva: World Health Organization, 2022b.
- WULANSARI, S.; MINTARJO, D. F. Efek ekstrak etanol biji alpukat (*persea americana*) terhadap biofilm candida albicans. **Jurnal Kedokteran Gigi Terpadu**, v. 5, n. 1, p. 239-243, 2023.
- YAN, Y.; Tan, F.; Miao, H.; Wang, H.; Cao, Y. Effect of shikonin against *Candida albicans* biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1-11, 2019.
- YOUSFI, H.; CASSAGNE, C.; RANQUE, S.; ROLAIN, J. M.; BITTAR, F. Repurposing of ribavirin as an adjunct therapy against invasive *Candida* strains in an *in vitro* study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 10, p. e00263-19, 2019.
- YUAN, J. P.; WANG, J. H.; LIU, X.; KUANG, H. C.; ZHAO, S. Y. Simultaneous determination of free ergosterol and ergosteryl esters in *Cordyceps sinensis* by HPLC. **Food Chemistry**, v. 105, n. 4, p. 1755-1759, 2007.
- ZHAO, Y.; YE, L.; ZHAO, F.; ZHANG, L.; LU, Z.; CHU, T.; WANG, S.; LIU, Z.; SUN, Y.; CHEN, M.; LIAO, G.; DING, C.; XU, Y.; LIAO, W.; WANG, L. *Cryptococcus neoformans*, a global threat to human health. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 12, n. 1, p. 1-18, 2023.
- ZUO, R. *et al.* *In vitro* antifungal and antibiofilm activities of halogenated quinoline analogues against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 48, n. 2, p. 208-211, 2016.
- ZUZA-ALVES D. L.; SILVA-ROCHA, W. P.; CHAVES, G. M. An update on *Candida tropicalis* based on basic and clinical approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 1-25, 2017.

ANEXOS



Do menthol and its derivatives present biological activity with antifungal potential?

Anna Paula de Castro Teixeira, Flaviana Maria de Sousa Melo, Igara Oliveira Lima, Hilzeth de Luna Freire Pessôa & Rita de Cássia da Silveira e Sá

To cite this article: Anna Paula de Castro Teixeira, Flaviana Maria de Sousa Melo, Igara Oliveira Lima, Hilzeth de Luna Freire Pessôa & Rita de Cássia da Silveira e Sá (2024) Do menthol and its derivatives present biological activity with antifungal potential?, *Journal of Essential Oil Research*, 36:4, 291-320, DOI: [10.1080/10412905.2024.2376673](https://doi.org/10.1080/10412905.2024.2376673)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/10412905.2024.2376673>

View supplementary material [\[PDF\]](#)

Published online: 18 Jul 2024.

Submit your article to this journal [\[PDF\]](#)

Article views: 54

View related articles [\[PDF\]](#)

View Crossmark data [\[PDF\]](#)