



Universidade Federal do Maranhão - UFMA
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - PPGCS
Mestrado



ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÁCIDO ELÁGICO CONTRA
***Candida* DE INTERESSE CLÍNICO**

AMANDA GRAZIELA GONÇALVES MENDES

São Luís – MA

2024

AMANDA GRAZIELA GONÇALVES MENDES

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÁCIDO ELÁGICO CONTRA
***Candida* DE INTERESSE CLÍNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação
em Ciências da Saúde da Universidade Federal do
Maranhão para obtenção do título de mestra.

Orientador: Dr. Valério Monteiro Neto.

Co-orientadora: Dra. Cristina de Andrade Monteiro.

São Luís – MA

2024

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Mendes, Amanda Graziela Gonçalves.

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÁCIDO ELÁGICO CONTRA Candida
DE INTERESSE CLÍNICO / Amanda Graziela Gonçalves Mendes. -
2024.

68 f.

Coorientador(a) 1: Cristina de Andrade Monteiro.

Orientador(a): Valério Monteiro-Neto.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2024.

1. Ácido Elágico. 2. Antivirulência. 3. Atividade
antifúngica. 4. Citotoxicidade. I. Monteiro, Cristina de
Andrade. II. Monteiro-Neto, Valério. III. Título.

AMANDA GRAZIELA GONÇALVES MENDES

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÁCIDO ELÁGICO CONTRA *Candida* DE INTERESSE CLÍNICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão para
obtenção do título de mestra.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Dr. Valério Monteiro Neto (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Dra. Cristina de Andrade Monteiro (Co-orientadora)
Instituto de Ciência, Educação e Tecnologia do Maranhão - IFMA

1º Examinador (Dra. Andrea de Souza Monteiro)
Universidade Ceuma – UNICEUMA

2º Examinador (Dr. Eduardo Martins de Sousa)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

3º Examinador (Dr. Rafael Cardoso Carvalho)
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

*“O que importa é o grau de comprometimento
envolvido numa causa, e não o número de
seguidores”*

(Remo Lupin, Harry Potter - J.K. Rowling)

Dedico a Eva de Castro Mendes, vó querida e amada que sempre estará presente em meus pensamentos e conquistas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre o ponto de apoio e oração. A minha família, em especial: Lília Maria Gonçalves Mendes, José Antônio de Castro Mendes, Hugo Leonardo Gonçalves Mendes, Kássia Raquel Gonçalves Mendes e César Fernando Moreira Cerqueira. A minha querida avó, Eva de Castro Mendes que não está mais presente em nossas vidas, mas está nos nossos corações e memória.

Aos amigos e familiares que diretamente e indiretamente fizeram parte dessa história, em especial aos amigos de laboratório que durante a caminhada se tornaram amigos para vida: Carmem, Gabriel, Flávio, José, Israel e Árlon. Aos colegas de turma que conseguiram deixar o processo de mestrado mais leve e sem competições fúteis, em especial a Felipe, Priscila, Nágila, Natália e Dayse e aos colegas feitos no Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada – NIBA.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, e aos professores que fazem parte do programa, que durante estes dois anos incentivaram meu crescimento. Ao meu querido orientador Dr. Valério Monteiro Neto e co-orientadora Dra. Cristina de Andrade Monteiro que sempre me receberam com carinho durante o processo, apontando os erros com elegância e realizado o papel de orientadores/pesquisadores por vocação e paixão.

As agências financiadoras Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA por tornarem esse sonho possível. Por fim, agradeço a todos aqueles que me ajudaram de alguma forma a conquistar essa vitória.

RESUMO

A resistência antifúngica aos azóis, a limitação de classes distintas de antifúngicos, juntamente com o aumento das infecções por *Candida*, representa um desafio significativo para a saúde pública, o que tem impulsionado a busca por novos compostos com ação antimicrobiana como alternativa a essa problemática. Os compostos fenólicos são produtos naturais oriundos de plantas que podem agir como adjuvantes aos antifúngicos convencionais. O ácido elágico (AE) é um composto fenólico dietético de ocorrência natural, derivado do ácido gálico que já foi relatado com atividade antifúngica, porém seus efeitos em associação com o fluconazol (FLZ), fármaco utilizado para tratamento da candidíase ainda não está totalmente compreendido. O objetivo deste estudo foi investigar a atividade anti-*Candida in vitro* do AE e sua capacidade de potencializar os efeitos do FLZ. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada por microdiluição em caldo e sua interação com FLZ foi avaliada usando um ensaio de tabuleiro de xadrez. Além disso, examinamos os efeitos do AE na cinética de tempo-morte, na transição de levedura para hifa, inibição da formação de biofilme, atividade hemolítica e citotoxicidade em células HeLa ATCC® CCL-2™. AE exibiu valores de CIM variando de 250 a 2000 µg/mL e mostrou interações sinérgicas e aditivas com FLZ, resultando em uma redução acentuada nos valores de MIC de FLZ (até 32 vezes) e EA (até 16 vezes). No ensaio de tempo-morte, as combinações mais eficazes foram 4× AE CIM, 2× AE CIM e 4x e 2x CIF AE + FLZ, mostraram atividade fungicida. Além disso, o AE não mostrou atividade hemolítica e demonstrou citotoxicidade baixa e dependente da dose em células HeLa, sem efeitos citotóxicos observados em combinação com FLZ. O AE e a combinação sinérgica de AE e FLZ interferiram tanto no processo de transição de levedura para hifa quanto na formação de biofilme. Além de sua atividade antifúngica, o AE apresentou um perfil de segurança favorável nas concentrações avaliadas. Os resultados obtidos indicam um grande potencial para o uso do AE em combinação com o FLZ no tratamento de infecções por *Candida*.

Palavras-Chave: Ácido Elágico; Atividade antifúngica; Antivirulência; Citotoxicidade.

ABSTRACT

Antifungal resistance to azoles, the limitation of distinct classes of antifungals, together with the increase in *Candida* infections, represent a significant challenge for public health, which has driven the search for new compounds with antimicrobial action as an alternative to this problem. Phenolic compounds are natural products from plants that can act as adjuvants to conventional antifungals. Ellagic acid (EA) is a naturally occurring dietary phenolic compound derived from gallic acid that has been reported with antifungal activity, but its effects in association with fluconazole (FLZ), a drug used to treat candidiasis, are not yet fully understood. The aim of this study was to investigate the *in vitro* anti-*Candida* activity of EA and its ability to potentiate the effects of FLZ. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined by broth microdilution and its interaction with FLZ was evaluated using a checkerboard assay. Furthermore, we examined the effects of AE on time-kill kinetics, yeast-to-hypha transition, inhibition of biofilm formation, hemolytic activity, and cytotoxicity in HeLa ATCC ® CCL-2™ cells. AE exhibited MIC values ranging from 250 to 2000 µg/mL and showed synergistic and additive interactions with FLZ, resulting in a marked reduction in the MIC values of FLZ (up to 32-fold) and EA (up to 16-fold). In the time-kill assay, the most effective combinations were 4× AE MIC, 2× AE MIC, and 4× and 2× CIF AE + FLZ, which showed fungicidal activity. Furthermore, AE showed no hemolytic activity and demonstrated low and dose-dependent cytotoxicity in HeLa cells, with no cytotoxic effects observed in combination with FLZ. AE and the synergistic combination of AE and FLZ interfered both in the yeast-to-hypha transition process and in biofilm formation. In addition to its antifungal activity, AE presented a favorable safety profile at the concentrations evaluated. The results obtained indicate a great potential for the use of AE in combination with FLZ in the treatment of *Candida* infections.

Keywords: Ellagic Acid; Antifungal activity; Antivirulence; Cytotoxicity.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AE	Ácido elágico
AE + FLZ	Ácido Elágico combinado com Fluconazol
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
ATCC	Coleção de Cultura do tipo Americano
BHI	Infusão Cérebro-Coração
CCBS	Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
FLZ	Fluconazol
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
HTs	Taninos Hidrolisáveis
ICIF	Índice da Concentração Inibitória Fracionária
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LMBA	Laboratório de Microbiologia Básica e Aplicada
LPBIOTEC	Laboratório de Pesquisa em Microbiologia, Bioprospecção e Biotecnologia
M	Molar
MOPS	Ácido 3-[N-Morfolino] propanosulfônico
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MTT	Dimethyl-2-Thiazolyl Tetrazolium·Bromide
NAC	<i>Candida não albicans</i>
NaOH	Hidróxido de Sódio
NIBA	Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
RPMI	Instituto Memorial Roswell Park
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônias por mililitro
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Ultravioleta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividades biológicas do AE	25
Tabela 2. Identificação e origem dos isolados de <i>Candida</i>	32
Tabela 3. Avaliação da atividade fúngica do AE e FLZ.	39
Tabela 4. Efeitos <i>in vitro</i> da associação do AE com o FLZ contra isolados clínicos e linhagens de referência de <i>Candida</i>	42
Tabela 5. Total de ICIF de AE + FLZ obtidas no ensaio do <i>checkerboard</i>	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Células de <i>C. albicans</i> analisadas por microscopia eletrônica de varredura.....	21
Figura 2. Células de <i>C. albicans</i> em transição celular.....	21
Figura 3. Etapas de formação do biofilme de <i>C. albicans</i>	22
Figura 4. Estrutura química do ácido elágico.....	24
Figura 5. Curva de morte de <i>C. albicans</i> ATCC 90028 sob ação do AE (A), FLZ (B) e em combinação (CIF AE + FLZ) (C).....	45
Figura 6. Curva de morte de <i>C. albicans</i> CA 08 sob ação do AE (A), FLZ (B) e em combinação (CIF AE + FLZ) (C).....	47
Figura 7. Formação de hifas de <i>Candida</i> sobre ação do AE, FLZ e em combinação com FLZ, em concentrações subinibitórias.....	48
Figura 8. Viabilidade celular de biofilmes jovens de <i>C. albicans</i>	49
figura 9. Viabilidade celular de biofilmes maduros de <i>C. albicans</i>	50
figura 10. Atividade hemolítica das concentrações de AE.....	51
figura 11. Ensaio de citotoxicidade.....	53

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	Resistência aos azóis em <i>Candida</i>	17
2.2	Formação de hifas e/ou pseudohifas e biofilme	20
2.3	Ácido elágico	23
3	OBJETIVOS	30
3.1	Geral.....	30
3.2	Específico.....	30
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1	Comitê de ética em pesquisa	31
4.2	Compostos.....	31
4.3	Linhagens, condições de crescimento e padronização do inóculo	31
4.4	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)	32
4.5	Interação <i>in vitro</i> do AE com FLZ	33
4.6	Curva de tempo morte	34
4.7	Inibição do estágio de transição levedura-hifa.....	34
1.1	4. 11 Ação do AE na formação do biofilme.....	35
1.1.1	Biofilme jovem	35
4.11.2	Biofilme maduro.....	35
4.11	Atividade hemolítica	36
4.12	Ensaio de citotoxicidade	36
4.13	Análise estatística.....	37
5	RESULTADOS.....	38
5.1	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)	38
5.2	Interação <i>in vitro</i> do ácido elágico com fluconazol	41
5.3	Curva de tempo morte	43

5.4	Inibição da formação de hifas e/ou pseudohifas	48
5.5	Efeito do AE na atividade antibiofilme.....	49
5.6	Atividade hemolítica	51
5.7	Ensaio de Citotoxicidade.....	51
6	DISCUSSÃO	54
7	CONCLUSÃO	58

REFERÊNCIAS

APÊNDICE

1 INTRODUÇÃO

Há uma grande preocupação entre as autoridades em saúde pública em relação aos índices crescentes de morbidade e mortalidade de infecções por microrganismos resistentes aos antimicrobianos convencionais no âmbito mundial, particularmente, no contexto das infecções causadas por fungos, devido uma menor diversidade de classes de antifúngicos para o tratamento de infecções invasivas e o surgimento e disseminação de patógenos fúngicos multirresistentes (Lee *et al.*, 2021).

Os fungos do gênero *Candida* são encontrados na microbiota humana vivendo em harmonia na maioria dos indivíduos saudáveis. Esse gênero é formado por microrganismos que podem ser oportunistas e acometem, principalmente, pacientes imunodeprimidos, como também aqueles em tratamento com antibacterianos de amplo espectro. Essas condições tornam esses microrganismos importantes agentes causadores de infecções superficiais e invasivas (Pappas *et al.*, 2018).

O gênero *Candida* spp. tem como agente etiológico as cinco espécies mais comuns: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida auris*. Porém, houve uma mudança na distribuição das espécies entre as infecções por *Candida* spp., sendo que *C. albicans* representa mais de 50% de todas as infecções. No entanto, as demais espécies (*Candida* não-*albicans* ou NAC) estão sendo encontradas com mais frequência como patógenos humanos e, em alguns casos, as espécies de NAC são mais isoladas do que *C. albicans* (Cleveland *et al.*, 2015; Pallotta; Viale; Barchiesi, 2023).

A patogênese da candidíase depende da saúde do hospedeiro, bem como dos fatores de virulência expressos pelo microrganismo. Esses fatores incluem formação de tubo germinativo, adesão, mudança fenotípica, formação de biofilme e produção de enzimas hidrolíticas (Marak; Dhanashree, 2018). Entre os fármacos disponíveis para o tratamento de doenças fúngicas, o fluconazol (FLZ) é um dos principais utilizados na clínica para o tratamento das candidíases (Nocua-Báez *et al.*, 2020). Contudo, seu uso de forma disseminada, em infecções recorrentes e em tratamentos longos tem levado ao aumento de cepas de *Candida* resistentes ao FLZ (Marak; Dhanashre, 2018; Berman; Krysan, 2020).

Junto a isso, uma alternativa são produtos derivados de plantas, que têm sido usados para tratar várias doenças há séculos. Pesquisas avançam para descobrir e identificar os componentes das plantas com efeitos benéficos e revelar seus mecanismos subjacentes, como compostos antifúngicos provenientes de produtos naturais, já que esses produtos apresentam compostos bioativos, os quais podem ter atividade antimicrobiana, além de possivelmente

apresentar segurança para uso em humanos e animais, ter baixo custo e apresentar poucos efeitos colaterais (Asif *et al.*, 2016; Soliman *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2018; Chagas *et al.*, 2022). Uma alternativa a mais a essa problemática é a combinação de drogas, a combinação pode resultar em interação sinérgica ou aditiva, diminuindo a concentração necessária dos fármacos para atingir o efeito desejado, além de apresentar mecanismo de ação em mais de um alvo por vez, dificultando o surgimento resistência (Lee *et al.*, 2021; Murphy; Bicanic, 2021).

Dito isso, o ácido elágico (AE) é um derivado dimérico do ácido gálico e um composto fenólico encontrado em muitas frutas como romã, uva, noz-pecã e bagas (Duman *et al.*, 2009). O AE, já foi relatado com extensas propriedades farmacológicas e biológica, estas incluem atividade antibacteriana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória, anti-hiperlipidêmica, antiviral, antiangiogênica, anticancerígena, hepato e cardioprotetora, quimiopreventiva, neuroprotetora, antidiabética, gastroprotetora, anti-hiperlipidêmica, do tipo antidepressiva, capacidade de eliminação de radicais livres e propriedades antiapoptóticas (De *et al.*, 2018; Aishwarya *et al.*, 2020; Evtyugin *et al.*, 2020).

Portanto, essas evidências sugerem que o AE apresenta potencial como adjuvante ou como uma alternativa promissora para combater infecções por *Candida*, em particular as que são resistentes às drogas convencionais. Assim, o presente estudo teve por objetivo realizar uma investigação da atividade antifúngica do AE contra espécies de *Candida* como uma alternativa a compostos com potencial antifúngico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Resistência aos azóis em *Candida*

As espécies do gênero *Candida* representam um problema de saúde em razão da emergência de isolados cada vez mais resistentes aos antifúngicos disponíveis para o tratamento de infecções causadas por estes microrganismos (Da Rocha *et al.*, 2021). Essas infecções, muitas vezes difíceis ou não tratáveis, trazem malefícios para os pacientes ao restringir ainda mais o repertório limitado de antifúngicos clinicamente relevantes, uma vez que a prevalência é cada vez maior de cepas fúngicas com resistência intrínseca ou adquirida a uma ou mais classes de drogas (Da Rocha *et al.*, 2021; Lee *et al.*, 2021).

O surgimento da resistência às drogas pode ser considerado uma consequência inevitável das pressões seletivas impostas pelos antifúngicos. Além disso, tem ocorrido várias mutações que proporcionaram um aumento na resistência ao FLZ em isolados clínicos, principalmente em *C. albicans*, é possivelmente devido aos seus níveis inerentemente elevados de resistência aos antifúngicos, devido ao FLZ ser uma opção antifúngica central (Berkow *et al.*, 2017).

A resistência aos antifúngicos ocorre quando uma cepa possui uma concentração inibitória mínima (CIM) a um dado antifúngico maior do que os pontos de cortes clínicos específicos ou quando uma cepa possui valor de CIM para um antifúngico maior do que o valor de CIM apresentado por uma cepa de referência (Berman; Krysan, 2020; Lee *et al.*, 2020).

Além disso, a resistência pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca ocorre quando todos os isolados de uma determinada espécie são resistentes a um antifúngico, sem que se tenha tido uma exposição anterior a esse. A resistência de *C. krusei* ao FLZ é um exemplo de resistência intrínseca. Já a resistência adquirida ocorre quando um microrganismo adquire resistência a um antifúngico, ao qual anteriormente ele era sensível, devido a exposição prolongada (Tortorano *et al.*, 2021). A resistência adquirida é relatada em taxas variáveis (1% a 20%) entre *C. albicans* e *C. tropicalis* e na maioria dos isolados de *C. auris* (>90%) (Lamoth *et al.*, 2018; Lamoth; Kontoyiannis, 2018).

A falta de novos fármacos antifúngicos, junto com o pequeno arsenal de antifúngicos disponíveis e com o crescente aumento de cepas apresentando resistência, faz necessária a busca por novos compostos e novas estratégias antifúngicas. Uma alternativa é o desenvolvimento de drogas voltadas contra um alvo específico do microrganismo, sendo este relacionado ao seu crescimento ou a um fator de virulência, o que ajudaria a preservar os microrganismos comensais do hospedeiro, por não agir contra eles, além de aumentar o número de possíveis

alvos antifúngicos e diminuir a pressão seletiva no surgimento da resistência às drogas (Cui *et al.*, 2015).

Outra estratégia que pode ser utilizada é a combinação de drogas, que podem agir de forma sinérgica ou aditiva, diminuindo a concentração necessária dos fármacos para atingir o efeito desejado, comparado ao uso de fármacos isolados, além de apresentar mecanismo de ação em mais de um alvo por vez, dificultando o surgimento de mecanismos de resistência (Santos *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2021).

A combinação de drogas com mecanismos de ação diferentes proporciona um maior número de alvos visados em processos intracelulares, dificultando o desenvolvimento de resistência, uma vez que o microrganismo precisaria apresentar mutações em diversos genes para driblar o efeito das drogas simultaneamente (Caplan; Cowen, 2017; Spitzer; Robbins; Wright, 2017; Lee *et al.*, 2021; Robbins).

Ademais, a terapia combinada também pode aumentar o potencial fungicida de drogas fungistáticas, como os azóis. Ao reduzir o número de microrganismos, também seria reduzida a probabilidade do desenvolvimento de uma resistência (Spitzer; Robbins; Wright, 2017). A partir dessas combinações, compostos que isoladamente não apresentam efeito sobre um patógeno, podem levar o microrganismo à morte quando combinados (Berman; Krysan, 2020).

Os conhecimentos obtidos com a medicina popular permitem investigar a obtenção de novos compostos antimicrobianos por meio de produtos naturais. Esses produtos podem apresentar compostos bioativos, os quais podem agir sobre o crescimento microbiano, na integridade da parede e/ou membrana celular fúngica, induzir apoptose, dentre outros mecanismos, além de possivelmente apresentarem segurança para uso em humanos e animais, ter baixo custo e apresentar poucos efeitos colaterais evidentes (Asif *et al.*, 2016; Soliman *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2018). Além disso, a fitoterapia é uma ferramenta acessível a populações de baixo poder aquisitivo, sem contar a grande variedade de plantas e de seus produtos disponíveis mundialmente (Santos *et al.*, 2018).

Os azóis, como o fluconazol são capazes de tratar infecções fúngicas interferindo com a enzima lanosterol 14- α -esterol desmetilase. Essa enzima participa de uma das etapas mais importantes da rota da biossíntese de ergosterol nas leveduras e fungos filamentosos. Nas espécies do gênero *Candida* essa enzima é codificada pelo gene *ERG11*, sendo uma das dez enzimas responsáveis pela última etapa da rota de conversão do lanosterol em ergosterol (Akins, 2005; Prasad; Shah; Rawal, 2016).

O ergosterol é um componente essencial das membranas das células fúngicas que determina a fluidez, a permeabilidade e a atividade das proteínas associadas à membrana.

Deficiências na biossíntese de esteróis causam defeitos pleiotrópicos que limitam a proliferação celular e a adaptação ao estresse (Jordá; Puig, 2020).

Outras classes de antifúngicos também podem ser indicadas para o tratamento da candidíase, principalmente quando o agente etiológico é resistente aos azólicos, incluindo nistatina, anfotericina B, flucitosina ou equinocandinas (Sobel; Sobel, 2018; Mroczynska; Brillowsks, 2020).

Os fungos do gênero *Candida* são responsáveis por 15% das infecções relacionadas aos cuidados em saúde e entre 70 a 90% de todas as infecções fúngicas invasivas, as quais, frequentemente evoluem para sepse e choque séptico. Entre as espécies do gênero *Candida*, *C. albicans* é uma das principais responsáveis por vários tipos de candidíase, possivelmente devido a facilidade de crescimento à temperatura de 37°C, enquanto a maioria dos fungos cresce melhor entre 20 a 30°C. Além disso, *C. albicans* é uma das espécies mais encontradas na microbiota humana, pois coloniza os indivíduos saudáveis, vivendo em equilíbrio com o hospedeiro (Lohse *et al.*, 2018; Muthamil, *et al* 2018; Gulati *et al.*, 2018). Durante a pandemia de coronavírus (COVID-19) foi possível observar um aumento associado na incidência de coinfeções fúngicas invasivas. Três grupos de infecções fúngicas foram mais associadas ao COVID-19 tais como: aspergilose, mucormicose e candidemia, que muitas vezes resultaram em consequências devastadoras (Raut; Huy, 2021).

Em 2022, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou uma lista de patógenos fúngicos prioritários. Onde, dezenove fungos causadores de doenças foram classificados e categorizados em três grupos prioritários, sendo *C. albicans* classificada no grupo de prioridade crítica, enquanto *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foram classificadas no grupo de alta prioridade, o que reforça a necessidade de estudos voltados para o gênero (WHO, 2022).

Neste contexto, as espécies de *Candida* são comensais, integrando a microbiota regular das mucosas oral, trato gastrointestinal e geniturinário, onde a espécie mais associada a infecções deste gênero *Candida* é *C. albicans*. Contudo, é possível notar que nos últimos anos, apesar de ainda ser maior em números, as infecções por *C. albicans* vem diminuindo, passando de 57,4% entre 1997 e 2001 para 46,4% entre 2015 e 2016, enquanto há um aumento no número de infecções causadas por outras espécies de *Candida* não-*albicans* (NAC), como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. auris* (Lamoth *et al.*, 2018; Vasilyeva *et al.*, 2018; Friedman; Schwartz, 2019; Pfaller *et al.*, 2019; Du *et al.*, 2020).

Assim, é necessária uma atualização constante dos tratamentos disponíveis, a fim de compreender e direcionar as pesquisas para a busca de novos antifúngicos. Além disso, é importante investigar os principais mecanismos de resistência de *Candida* spp. aos

antifúngicos, visando o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento mais eficazes para essas infecções (Da Rocha *et al.*, 2021).

2.2 Formação de hifas e/ou pseudohifas e biofilme

A mudança morfológica de levedura unicelular para forma de hifa filamentosa é crucial na virulência de *C. albicans*. A capacidade de virulência das hifas não é produzida por sua morfologia por si, mas pela expressão de genes específicos. Por exemplo, a proteína *Csa2* participa do aproveitamento do ferro da hemoglobina e favorece o crescimento das hifas (Jacobsen; Hube, 2017).

A capacidade que *Candida* spp. tem de formar hifas e/ou pseudohifas é fundamental nos processos de colonização, invasão celular e formação de biofilmes. De fato, quanto maior a capacidade de um fungo aderir à célula hospedeira e formar hifas, maiores serão as chances de infecções (Desai, 2018; Yong *et al.*, 2020).

No processo de colonização e disseminação no organismo, essas leveduras costumam apresentar-se na forma de blastoconídios (Figura 1A). Nos processos de adesão, invasão tecidual, secreção de enzimas hidrolíticas e sobrevivência dentro de macrófagos costumam estar associados a forma filamentosa (Figura 1B, 2A e 2B). É descrito também que a forma filamentosa pode apresentar menor sensibilidade a antifúngicos do que a forma de blastoconídios (Sudbery, 2011; Silva *et al.*, 2012; Cassone, 2015; Tang *et al.*, 2019).

A distinção de hifas e pseudohifas está relacionada com a forma como essas estruturas são originadas. As pseudohifas são formadas a partir de células de levedura ou hifas por brotamento, mas a nova estrutura permanece ligada à célula-mãe e se alonga. Isso resulta em filamentos com constrições nas junções célula-célula. Não há paredes transversais internas (septos) associadas a pseudohifas (Figura 2). Em comparação, as hifas verdadeiras são formadas a partir de células de levedura ou mesmo como ramificações de hifas existentes. O desenvolvimento de hifas verdadeiras é iniciado por uma projeção de tubo germinativo (Figura 1 e Figura 2). Este se alonga e depois se ramifica com septos definidos que dividem as hifas em unidades fúngicas separadas (Silva *et al.*, 2012).

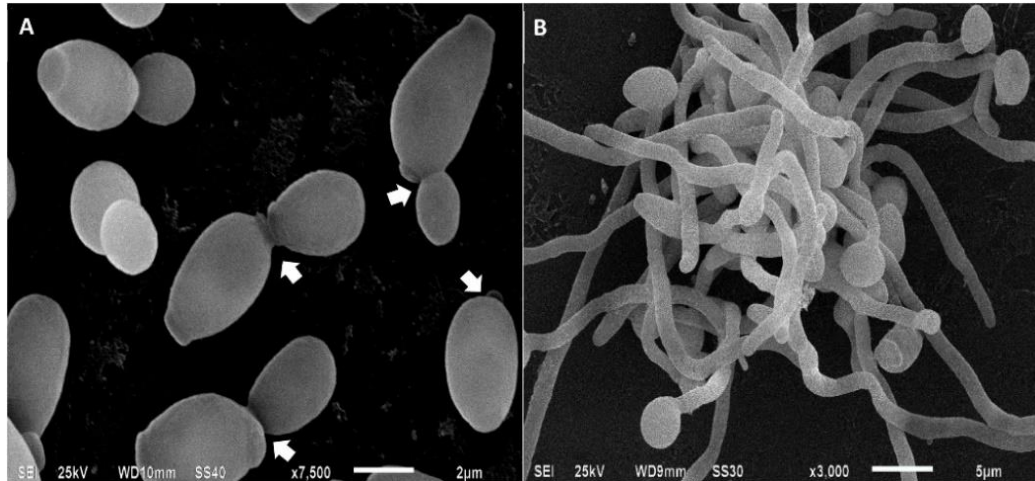


Figura 1. Células de *C. albicans* analisadas por microscopia eletrônica de varredura. Fonte: Macias-Paz *et al.*, (2023). Na Figura 1A, as leveduras estão em processo de brotamento, as setas indicam o local da divisão celular entre a célula-mãe e a célula-filha. Na Figura 1B, observa-se o micélio de *C. albicans*, envolvido na invasão tecidual durante o processo infeccioso (Macias-Paz *et al.*, 2023). Fonte: (Macias-Paz *et al.*, 2023).

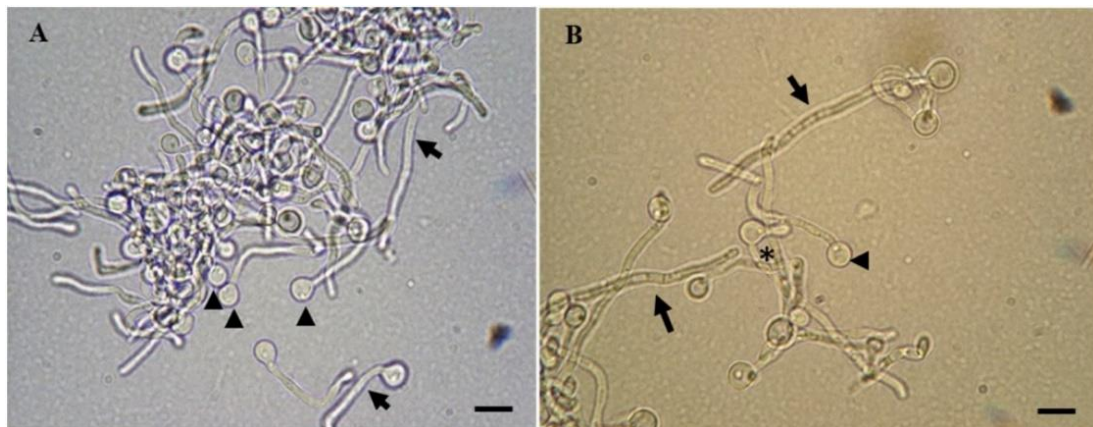


Figura 2. Células de *C. albicans* em transição celular. Fonte: Macias-Paz *et al.*, (2023). A Figura 2 mostra células de *C. albicans* em transição celular analisadas por microscopia de luz. Em (2A), encontra-se uma combinação de clamidósporos (pontas de seta) e hifas (setas). Em (2B), observam-se pseudohifas (asterisco), clamidósporos (cabeça de seta) e hifas multicelulares (setas). As barras de escala representam 5µm (Macias-Paz *et al.*, 2023). Fonte: (Macias-Paz *et al.*, 2023).

C. albicans e *C. dubliniensis* são verdadeiramente polimórficas, devido à capacidade de formar hifas e/ou pseudohifas. Sendo estas espécies também referidas com tubo germinativo positivo, sendo esta uma característica diagnóstica. Em contraste, *C. glabrata* não é polimórfica, crescendo apenas como blastoconídios (levedura). No que diz respeito a *C. parapsilosis*, esta espécie não produz hifas verdadeiras, mas pode gerar pseudohifas que são caracteristicamente grandes e curvas, muitas vezes referidas como “células gigantes”. Em

contraste, em ágar de farinha de milho e polissorbato 80 a 25 °C após 72 h, *C. tropicalis* produz blastosporos ovais, pseudohifas, dependendo de alguns relatos hifas verdadeiras (Fidel *et al.*, 1999; Calderone, 2002; Larone, 2002; Trofa *et al.*, 2008).

Muitas das infecções adquiridas em ambientes nosocomiais estão relacionadas a formação de biofilme, que se formam tanto em superfícies abióticas, como no hospedeiro, causando alta morbidade e mortalidade. O biofilme é uma comunidade de microrganismos estruturada e composto por vários tipos de células fúngicas, como: leveduras, hifas e pseudohifas contidas em uma matriz extracelular (Figura 3). (Roschetto *et al.*, 2018; Gulati *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2021). Essa matriz é composta de polissacarídeos, DNA extracelular, proteínas e lipídeos (Muthamil *et al.*, 2018).

A matriz extracelular do biofilme atua como uma barreira protetora, tornando as células microbianas mais resistentes à terapêutica antifúngica convencional e ao sistema imunológico do hospedeiro, bem como a outras perturbações ambientais. Portanto, as infecções por *Candida* formadoras de biofilme são difíceis de tratar, e as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) relacionadas ao biofilme (sésseis) são frequentemente maiores do que as CIMs para células planctônicas (sem biofilme) (Douglas, 2003; Olsen, 2015).

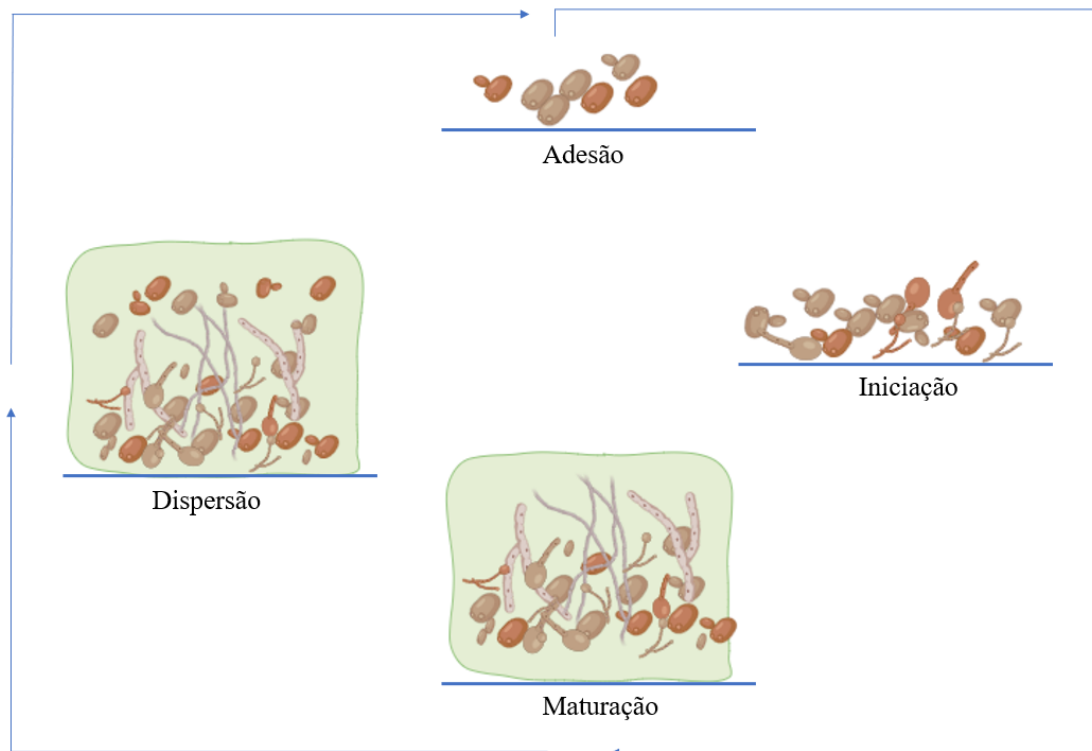


Figura 3. Etapas de formação do biofilme de *C. albicans*. A ilustração mostra a fase inicial, a adesão, onde as células em forma de levedura aderem a uma superfície sólida, formando uma camada basal que ancora o biofilme. Posteriormente, no estágio de iniciação, as células pseudohifas e/ou hifas começam

a se formar e se alongar, proliferando ao longo da conclusão da formação do biofilme. Durante a maturação, as células fúngicas produzem maiores quantidades de substâncias poliméricas extracelulares, que formam a matriz do biofilme e dispersão de células em forma de levedura do biofilme para semear novos locais (Lohse, 2018; Costa-Orlandi, 2018). Fonte: Próprio Autor (2024), criado com BioRender.com.

Durante a maturação, as células fúngicas produzem maiores quantidades de substâncias poliméricas extracelulares, que formam a matriz do biofilme. Para fungos, um biofilme maduro é caracterizado por uma mistura estruturada de células em forma de levedura, pseudohifas e hifas circundadas por esta matriz, juntamente com a presença de canais de água que permitem a circulação de nutrientes (Lohse, 2018; Costa-Orlandi, 2018).

Os biofilmes formados por diferentes espécies de *Candida* podem variar em morfologia e densidade. Os componentes da matriz extracelular diferem daqueles encontrados na parede celular de *Candida* (Johnson *et al.*, 2016 ; Zawrotniak *et al.*, 2017; Hoyer *et al.*, 2018).

Apesar do impacto que as infecções fúngicas têm sobre a saúde humana, apenas algumas classes de drogas antifúngicas estão atualmente disponíveis para o tratamento dessas infecções com risco de vida. Em geral, o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos tem sido lento em grande parte devido à natureza eucariótica das células fúngicas. Além disso, desafios associados à permeabilidade do composto através da parede e membrana celular fúngica e um interesse limitado da indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos antifúngicos dificultam esse processo (Roemer; Krysan, 2014; Perlin; Rautemaa-Richardson; Alastruey-Izquierdo, 2017).

2.3 Ácido elágico

O ácido elágico (AE) ($C_{14}H_6O_8$) (Figura 4) é um composto fenólico bioativo que ocorre naturalmente como metabólito secundário em muitos táxons vegetais. A quantidade de AE é considerável em *Punica granatum* L. e na madeira de casca de algumas espécies de árvores. Estruturalmente, o AE é uma dilactona de ácido hexahidroxidifênico (HHDP), um derivado dimérico do ácido gálico, produzido principalmente pela hidrólise de elagitaninos, um grupo amplamente distribuído de metabólitos secundários. O AE vem chamando a atenção devido às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimutagênicas e antiproliferativas. O AE exibiu efeitos farmacológicos em vários *in vitro* e *in vivo* em sistemas modelo. Além disso, o AE também foi bem documentado por suas propriedades antialérgicas, antiateroscleróticas,

cardioprotetoras, hepatoprotetoras, nefroprotetoras, neuroprotetora e antimicrobianas (Sharifi-Rad *et al.*, 2022).

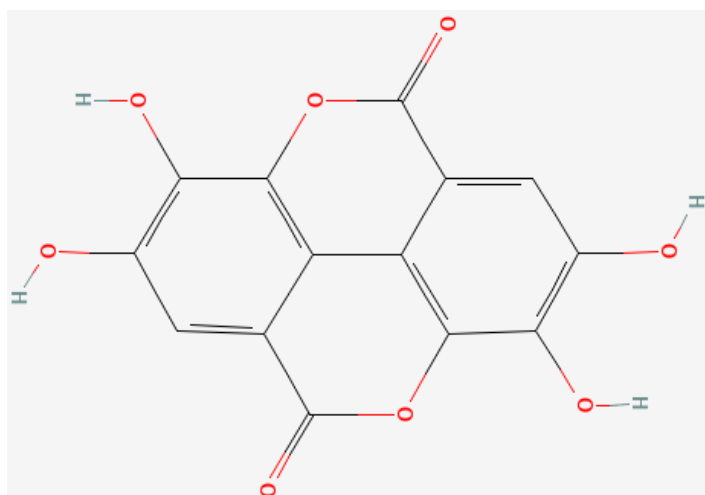


Figura 4. Estrutura química do ácido elágico. Fonte: PubChem (2023).

O AE, de acordo com a *International Union of Pure and Applied Chemistry - IUPAC*, é chamado de 2,3,7,8 tetrahidroxi-benzopiranol [5,4,3-cde] benzopiranol-5,10-diona. Possui uma massa molecular de 338,2 g/mol. Essa molécula é altamente termoestável devido aos seus quatro anéis, que representam um domínio lipofílico. Além disso, possui quatro grupos fenólicos e dois grupos de lactona, que representam uma região hidrofílica (Bala, *et al.*, 2006; Girish; Pradhan, 2008).

Essas propriedades resultam em um baixo nível de solubilidade em água ($\sim 9,7 \mu\text{g} / \text{mL}$), mas poupando a solubilidade em álcool, levando a algumas dificuldades no desenho de formulações farmacêuticas (Behl *et al.*, 2011). Altas concentrações de etanol (80% ou mais) ou solução alcalina são algumas sugestões para a solubilização de AE que pode ser mais solúvel em solventes básicos devido à sua natureza ácida (Siriwohardn; Wrolstand, 2011).

Devido a sua solubilidade e permeabilidade serem baixas, o que comprometem muito sua biodisponibilidade oral e utilizações clínicas. Para superar essas limitações dos parâmetros físico-químicos, várias abordagens de formulação, incluindo redução do tamanho de partícula, amorfização e formulações à base de lipídeos, têm sido usadas. Embora essas estratégias ainda não tenham levado a uma aplicação clínica, algumas delas resultaram em melhorias significativas na solubilidade e na biodisponibilidade do AE (Nyamba *et al.*, 2021).

Tabela 1. Atividades biológicas do AE

Antibacteriana	Foi demonstrado que o extrato de romã rico em AE tem atividade antibacteriana significativa e sinergia com efeito bactericida da moxifloxacina contra <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilicina (MRSA) (Dahash <i>et al.</i>, 2021). Já no estudo de (Chambers <i>et al.</i>, 2020) foi demonstrado que os glicosídeos de AE possuem efeitos inibidores sobre o crescimento de patógenos Gram-negativos. Os derivados do AE também foram descritos por possuírem propriedades antimicrobianas e antibiofilme em uma ampla gama de patógenos microbianos, como <i>Streptococcus agalactiae</i>. Moraes-Neto <i>et al.</i>, (2022) relatou que a fração de acetato de etila de <i>Bixa orellana</i> e seu componente AE exerceram propriedades antibacterianas e antiinflamatórias contra <i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>Massiliense</i>.
Antifúngica	No estudo de Possamai Rossatto <i>et al.</i>, 2021 foi demonstrado os efeitos antifúngicos e antivirulentos do AE contra <i>C. auris</i>, justificando uma investigação mais aprofundada como um novo agente antifúngico promissor, particularmente contra fungos do gênero <i>Candida</i> resistentes ao FLZ. Os extratos e frações de caules de <i>Myrcia hatschbachii</i> que apresentaram em sua composição 40% de compostos fenólicos em sua composição, como AE, onde a fração de acetato de etila foi capaz de inibir o crescimento de <i>C. albicans</i> e ainda apresentou ação fungistática (Gatto <i>et al.</i>, 2020). Sampaio <i>et al.</i>, (2021) avaliaram complexos ácido AE-ciclodextrina quanto à atividade antifúngica contra <i>C. albicans</i> ATCC 18804. Além disso, foram relatadas a atividade antimicrobiana de <i>Carya illinoensis</i> e ácidos fenólicos como: ácido gálico e AE, flavonoides (rutina) e taninos (catequinas e epicatequinas) identificados e que podem ser parcialmente responsáveis pela atividade antimicrobiana, onde os extratos foram capazes de inibir a produção de tubos germinativos de <i>C. albicans</i> (Bottari <i>et al.</i>, 2017). Experimentos <i>in vivo</i> mostraram uma redução na invasão epitelial fúngica após o tratamento com o complexo AE encapsulado com ciclodextrina (AE/HP-β-CD) por 24 h e 96 h quando comparado ao controle negativo. Em conclusão, os resultados demonstraram que EA/HP-β-CD apresenta efeitos antifúngicos e anti-inflamatórios, reduzindo a capacidade invasiva de <i>C.</i>

albicans. O que sugere que EA/HP- β -CD pode ser uma alternativa promissora para o tratamento de candidíase oral (Sampaio *et al.*, 2021).

Khan *et al.*, (2021) demonstraram em estudos *in vivo* que o AE lipossomal, eliminou efetivamente a infecção por *C. neoformans* em camundongos leucopênicos. Camundongos tratados com AE lipossomal apresentaram taxa de sobrevivência de 70% e carga fúngica altamente reduzida em seus tecidos pulmonares.

Esse composto já demonstrou potencial atividade antifúngica contra *Candida* spp. (Sampaio *et al.*, 2018). Os desafios de síntese e produção de AE estimulam pesquisas adicionais sobre novos métodos e fontes alternativas (Evtyugin *et al.*, 2020).

O AE também aumentou o efeito inibidor do crescimento de outros medicamentos antifúngicos, incluindo a micafungina e o miconazol. Assim, dados sugerem o efeito inibitório do crescimento sinérgico do inibidor de calcineurina FK506 e AE podem ser úteis para compreender o mecanismo para superar a resistência antifúngica (Hagihara *et al.*, 2022).

Antiviral

Os efeitos protetores e mecanismos do AE na lesão intestinal em leitões infectados com o vírus da diarreia epidêmica suína (PEDV) foram investigados, onde resultados revelaram que a AE poderia promover a restauração da homeostase intestinal regulando a via do interferon que estava inter-relacionada com a ativação da sinalização JAK2/STAT3. Onde, estas descobertas podem fornecer uma base teórica para o uso de AE como terapia direcionada à infecção por PEDV em leitões (Song *et al.*, 2024).

Anti-inflamatória e anticancerígena

O AE pode ser transformado em urolitinas na microbiota intestinal, que são metabólitos biodisponíveis que podem exercer efeitos anti-inflamatórios e anticarcinogênicos (Tomás-Barberán *et al.*, 2014).

Evidências experimentais apoiaram que o AE no direcionamento das principais características do câncer, como: proliferação, angiogênese, evasão de apoptose, evasão imunológica, inflamação, instabilidade genômica e muito mais baseados em estudos *in vitro* e *in vivo*. Onde mecanismos moleculares pelos quais a AE modula as vias de sinalização e os alvos moleculares estão envolvidos nas características do câncer (Čižmaríková *et al.*, 2023).

Já foi sugerido que a AE tem potencial para melhores resultados de cicatrização em feridas orais e parece ter eficácia terapêutica promissora (Tekin; Deveci; Deveci, 2024).

O AE já foi relato reduzindo a progressão das transformações morfológicas e suprimindo concomitantemente a expressão de proteínas fibróticas e relacionadas com EMT (vimentina e N-caderina) *in vitro* e *in vivo*. Descobertas que melhoram a compreensão do papel da AE na supressão da fibrogênese renal e demonstra o papel promissor que o AE pode desempenhar no tratamento da doença renal crônica (Huang *et al.*, 2023).

Antiparasitário

O potencial efeito associativo da combinação de anfotericina B convencional, também usada para tratamento de doenças fúngicas com AE em formulações tópicas foram promissoras para o tratamento da leishmaniose cutânea em *in vivo* (Alves *et al.*, 2020). Outro efeito biológico relato do AE foi o de microesferas que restringiram o crescimento de *Babesia*, *Theileria* *in vitro* e *Babesia microti* *in vivo* (Beshbishy *et al.*, 2019).

Cardioprotetor

Lee *et al.*, (2024) investigou a proteção do AE contra a hipertrofia miocárdica induzida por Ang-II e atenuação do estresse oxidativo através de vias de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno mediadas por espécies reativas de oxigênio em células H9c2. Assim, o AE foi um composto eficaz para prevenir a hipertrofia miocárdica induzida por Ang-II (Lee *et al.*, 2024). O AE pode ser um composto dietético ateroprotetor que dificulta a aterogênese induzida pela dieta, melhorando a funcionalidade (Park *et al.*, 2024).

O AE também pode ter diferentes modos de ação, podendo ser usado para explicar suas outras funcionalidades, como a atividade antimicrobiana. Os fitoquímicos fenólicos, especialmente os ácidos fenólicos, são ácidos fracos e são capazes de se dissociar na membrana celular em um pH biológico de 6,8-7,2. Essa dissociação pode criar um gradiente de prótons através da membrana celular o que pode alterar a função de bombas de prótons na membrana celular. Está fraca dissociação é proposta como um mecanismo importante pelo qual o AE e outros antioxidantes fenólicos exercem seu efeito antimicrobiano (Vattem; Shetty, 2005).

O AE pode formar um complexo com proteínas e inativar adesões microbianas, enzimas e envelope celular proteínas de transporte (Kuete *et al.*, 2007). A hidrofobicidade parcial do AE permite que ele seja ativo na água da interface da membrana da bactéria e, possivelmente, seja incorporada, resultando em ruptura ou desestabilização da membrana. Tal mecanismo de ação é particularmente necessário para inibir bactérias Gram-negativas porque a camada externa de lipopolissacarídeo é altamente hidrofóbica. O AE também pode interromper alguns canais de

íons importantes na membrana de bactérias Gram-negativas que conferem tolerância ao sal às bactérias (Vattem *et al.*, 2004).

A ação antimicrobiana de AE pode estar relacionada à sua capacidade de inativar adesinas microbianas, enzimas e proteínas de transporte do envelope celular (Haslam, 1996). Taninos hidrolisáveis (HTs) são metabólitos secundários de plantas, que são aproximadamente classificados em galotaninos e elagitaninos com resíduos de ácido gálico e AE, respectivamente, ligados ao grupo hidroxila da glicose por ligação éster. A presença de porções hexahidroxidifenoíla e nonahidroxiterfenoíla é considerada como responsável pela propriedade antimicrobiana dos HTs. Os HTs também apresentam sinergia considerável com os antibióticos (Ekambaram *et al.*, 2016).

Além disso, já foram relatados vários efeitos farmacológicos do AE, que incluem atividade antibacteriana direta, modificação da atividade antibiótica e reversão do fenótipo de resistência associado às bombas de efluxo (Lima *et al.*, 2016; Dos Santos *et al.*, 2021; Jenic *et al.*, 2021; Sivakumar *et al.*, 2020).

Resultados revelaram que o mecanismo antifúngico subjacente de AE contra *Trichophyton rubrum* pode estar relacionado à destruição da membrana celular fúngica. Assim como a inibição de C14 demetilase e a taxa catalítica de esqualeno ciclo-oxidase na via de biossíntese de ergosterol através da regulação negativa de MEP4 e SUB1. Sugerindo que AE têm potencial para um agente antifúngico natural para uso clínico (Li *et al.*, 2020).

Estudos para desvendar o mecanismo de ação do AE contra fungos já foram realizados, porém esses mecanismos precisam ser mais elucidados. O AE inibiu a biossíntese do ergosterol e reduziu a atividade do esterol 14- α -desmetilase P450 (CYP51) na membrana de *Trichophyton rubrum* (Li *et al.*, 2015).

Já Zacchino *et al.*, (2010) para verificar se o AE atua ou não como agente antifúngico sobre o ergosterol, observou-se a valores do CIM do mesmo na presença de aumento concentrações de ergosterol, onde os resultados obtidos mostraram que a CIM da anfotericina B contra *Saccharomyces cerevisiae* aumentou com a mudança para adição de ergosterol, enquanto a do AE permaneceu inalterado, sugerindo um modo diferente de ação.

Outro mecanismo de ação avaliado *in vitro* na parede celular foi realizado, nos ensaios, o CIM do AE contra *S. cerevisiae* foi aumentado de 62 a 250 $\mu\text{g/mL}$ na presença de sorbitol 0,8 M, sugerindo que o AE atuaria modificando a parede celular do fungo, enquanto a CIM da anfotericina B foi não modificado, como esperado (Zacchino *et al.*, 2010).

Um efeito protetor de AE também foi observado contra infecção fúngica por *C. albicans* em modelo de *Drosophila melanogaster* em concentrações não tóxicas. Neste estudo foi

demostrado que a AE é um composto promissor para o tratamento da candidíase (Sampaio *et al.*, 2018). Adicionalmente, os compostos bioativos, como AE também podem apresentar atividades sinérgica ou aditiva com antifúngicos tradicionais, representando uma alternativa promissora contra espécies resistentes aos antifúngicos (Rodrigues *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- ✓ Investigar o potencial antifúngico do ácido elágico e deste em associação com fluconazol contra *Candida*.

3.2 Específico

- ✓ Determinar a Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima;
- ✓ Avaliar a interação *in vitro*;
- ✓ Analisar a curva de morte;
- ✓ Verificar a ação do AE na transição levedura-hifa e biofilme de *Candida*;
- ✓ Buscar se o composto possui atividade hemolítica;
- ✓ Examinar a citotoxicidade do AE;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comitê de ética em pesquisa

A obtenção dos isolados clínicos obedeceu aos preceitos éticos conforme parecer: 813.402 CEP/UNICEUMA.

4.2 Compostos

O AE foi obtido comercialmente da Sigma-Aldrich, EUA® com grau de pureza $\geq 95\%$ (HPLC) e solubilizado em hidróxido de sódio a 1 molar com tampão de fosfato e sódio com pH 7.5 - 8.0 (NaOH 1M e PBS), colocado em agitador e levado ao sonificador por 10 minutos (Sampaio *et al.*, 2021; Gontijo *et al.*, 2019), posteriormente filtrado em membrana micropore 0,22 μ m e agitado por 3 minutos antes do uso. O antifúngico (FLZ) foi obtido da Sigma-Aldrich, EUA® dissolvido seguindo as recomendações do fabricante e armazenados a -20°C.

4.3 Linhagens, condições de crescimento e padronização do inóculo

Para as análises *in vitro* foram utilizadas diferentes espécies de *Candida*. Fungos oriundos da *American Type Culture Collection* e isolados clínicos de *Candida* pertencentes às coleções de culturas do Laboratório de Microbiologia Básica e Aplicada – LMBA do Núcleo de Imunologia Básica e Aplicada - NIBA da Universidade Federal do Maranhão – UFMA e do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia, Bioprospecção e Biotecnologia - LPBIOTEC do Instituto Federal do Maranhão – IFMA, todos identificados pelo VITEK II – BIOMÈRIEUX (Tabela 1). Para os testes, as linhagens foram cultivadas por até 24 horas a 37 °C, em aerobiose, em meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD). Para estoque as linhagens foram semeadas e armazenadas a -20°C em caldo BHI (*Brain-Heart Infusion*) com 20% de glicerol.

Para a padronização do inóculo as linhagens foram suspensas em PBS até se obter a concentração de turvação correspondente a aproximadamente 1×10^6 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônias por mililitro). A densidade ótica (0,08 – 0,1) das suspensões foi mensurada por espectrofotometria (λ : 530 nm), posteriormente foram diluídas em 1:20 e 1:50 em RPMI 1640 / MOPS para obtenção de um inóculo final de 1×10^3 UFC/mL em placa (CLSI, 2008).

Tabela 2. Identificação e origem dos isolados de *Candida*.

Microrganismos	Origem
Linhagens	
<i>C. albicans</i> (ATCC 90028), <i>C. albicans</i> SC5314 (ATCC MYA-2876) e <i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	ATCC
Isolados clínicos	
<i>C. albicans</i> (CA 01), <i>C. albicans</i> (CA 03), <i>C. albicans</i> (CA 04), <i>C. albicans</i> (CA 05), <i>C. albicans</i> (CA 06), <i>C. albicans</i> (CA 09), <i>C. albicans</i> (CA 010), <i>C. albicans</i> (CA 011), <i>C. albicans</i> (CA 013), <i>C. albicans</i> (CA 014), <i>C. albicans</i> (CA 016), <i>C. albicans</i> (CA 017).	Urina
<i>C. parapsilosis</i> (CP 01), <i>C. albicans</i> (CA 02), <i>C. albicans</i> (CA 07), <i>C. albicans</i> (CA 012), <i>C. albicans</i> (CA 015), <i>C. albicans</i> (CA 019), <i>C. albicans</i> (CA 020), <i>C. albicans</i> (CA 021)	Secreção traqueal
<i>C. albicans</i> (CA 08)	Escarro
<i>C. albicans</i> (CA 018)	Hemocultura

Legenda: ATCC: *American Type Culture Collection*; os isolados clínicos foram obtidos de diferentes pacientes. Fonte: Próprio autor (2024).

4.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A atividade antifúngica foi determinada pelo método de microdiluição em caldo. Os ensaios foram feitos em microplaca (Global Trade) estéril de 96 poços com fundo chato adicionando-se 100 µL de meio de cultura RPMI-1640/MOPS (Sigma Aldrich®). Para os ensaios, o AE foi utilizado em diferentes concentrações (31,5 a 2.000 µg/mL) e adicionado diretamente nos poços da microplaca. O FLZ foi utilizado nas concentrações de 64 – 0,5 µg / mL. Os controles utilizados foram: controle de crescimento, controle de esterilidade do meio, controle do composto e controle do veículo. Os ensaios foram incubados a 37°C / 24 - 48 horas. A CIM foi definida como a concentração mais baixa do agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento das leveduras detectado pela falta de turbidez visual (CLSI, 2008). A resazurina foi utilizada para avaliar a viabilidade celular. Este reagente, quando exposto a produtos oriundos da respiração celular microbiana, converte-se em resorufina por uma reação de oxirredução. Assim, a sua cor originalmente azul, passa à rosa, indicando crescimento microbiano (Liu *et al.*, 2007; Leong *et al.*, 2017). Os testes foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes.

Após a determinação da CIM, alíquotas de 10 µL dos poços correspondentes a CIM e concentrações superiores, foram semeados em placas de ASD e incubadas por 24 horas a 37 ° C. A CFM foi dada com menor concentração onde houve ausência de crescimento fúngico. A relação CFM / CIM foi calculada de forma a determinar se o AE possui atividade fungistática ($CFM / CIM > 4$) ou fungicida ($CFM / CIM \leq 4$) (Siddiqui *et al.*, 2013). Os ensaios foram realizados em triplicada em três experimentos independentes.

4.5 Interação *in vitro* do AE com FLZ

Os efeitos decorrentes da combinação do AE com o FLZ foram avaliados pelo método de *Checkerboard*, também conhecido como método de microdiluição em matriz ou tabuleiro de xadrez, que é uma técnica utilizada para avaliar a atividade de combinações de agentes antimicrobianos (Bidaud *et al.*, 2021). Os ensaios foram realizados em microplaca estéril de 96 poços com meio de cultura RPMI – 1640 / MOPS (Sigma Aldrich®), a concentração do inóculo na placa foi de 1×10^3 UFC / mL, utilizando concentrações 2 vezes maiores dos agentes isolados e combinados e incubados a 37° C / 24 - 48 horas. Os resultados foram avaliados mediante análise quantitativa (Índice Concentração Inibitória Fracionada - ICIF). A CIM do FLZ e AE em combinação foi definida como a menor concentração da associação das drogas que inibe o crescimento fúngico. A interação do AE com FLZ foi expressa como a soma do ICIF de cada agente. A CIF de cada agente foi calculada como a CIM desse agente em combinação, dividido pela CIM do agente sozinho. Os ensaios foram realizados em triplicada em três experimentos independentes. A resazurina foi utilizada para avaliar a viabilidade celular. O ICIF foi calculado:

$$\frac{CIM\ AE\ combinado}{CIM\ AE\ sozinho} + \frac{CIM\ FLZ\ combinado}{CIM\ FLZ\ sozinho}$$

Onde: CIM AE_{Combinado} = Concentração inibitória mínima do AE combinado com FLZ
CIM AE_{sozinho} = Concentração inibitória mínima do AE sozinho, CIM FLZ_{Combinado} = Concentração inibitória mínima do FLZ combinado com AE e CIM FLZ_{sozinho} = Concentração inibitória mínima do FLZ sozinho.

O ICIF foi interpretado conforme descrito previamente (Gómez-Lopez *et al.*, 2003):

- sinérgico: $ICIF \leq 0,5$
- aditivo: $> 0,5$ $ICIF \leq 1,0$
- indiferente ou sem interação: > 1 $ICIF \leq 4$
- antagonista: $ICIF > 4,0$

4.6 Curva de tempo morte

Avaliou-se a curva de morte do AE e deste com FLZ em relação ao crescimento microbiano pelo tempo. Inóculos padronizados ($100 \mu\text{L}$) em concentração final equivalente a 1×10^3 UFC / mL foram depositados em placas de microdiluição de 96 poços contendo $100 \mu\text{L}$ de concentrações variadas dos compostos (4X CIM AE, 2X CIM AE, CIM AE, CIM AE/2, 4X CIM FLZ, 2X CIM FLZ, CIM FLZ, CIM FLZ/2, 4X CIF AE+FLZ, 2X CIF AE+FLZ, CIF AE+FLZ, CIF AE+FLZ/2). As microplacas foram incubadas a 37°C por até 48 horas. Durante este período e em diferentes intervalos de tempo, começando com o momento da inoculação (tempo zero) e seguindo-se 4h, 8h, 12h, 24h, 36h e 48h, alíquotas de $100 \mu\text{L}$ foram removidas de cada poço, diluídas serialmente em $900 \mu\text{L}$ de PBS estéril e semeadas em meio ASD.

As placas de Petri foram incubadas a 37°C por 24h e após o período de incubação, as colônias fúngicas foram contadas para determinação das unidades formadoras de colônias (UFC / mL). Foi elaborada uma curva de morte em função do número em Log_{10} UFC / mL recuperadas ao longo do tempo e as curvas foram construídas com a média de crescimento das colônias comparadas sempre em relação ao controle de crescimento do fungo sem tratamento relacionado a cada tempo (Liu *et al.*, 2017).

Para cada experimento, realizamos controle de esterilidade constituído de $200 \mu\text{L}$ de RPMI – 1640 / MOPS, controle de crescimento do fungo constituído de $100 \mu\text{L}$ de inóculo e $100 \mu\text{L}$ de RPMI – 1640 / MOPS, os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes.

4.7 Inibição do estágio de transição levedura-hifa

Para a determinação do efeito do AE sobre a transição levedura-hifa foram realizados os testes conforme metodologia empregada por Silva *et al.*, (2022) com adaptações. Para os testes, inóculos padronizados em 1×10^6 UFC / mL foram depositados em microplacas de 24 poços contendo concentrações subinibitórias da CIM (AE/2, AE/4, FLZ/2, FLZ/4), CIF (AE+FLZ/2 e AE+FLZ/4) na proporção 1:1 (tratamento, meio de cultura RPMI – 1640 / MOPS) com 10% de soro fetal bovino, com volume final de 1 mL. O controle de crescimento (inóculo + meio de cultura RPMI – 1640 / MOPS + 10% de soro fetal bovino) e o antifúngico FLZ. As microplacas foram incubadas a 37°C por 04 horas em agitação de 100 rpm, foram realizadas contagens 100 de células (hifas e leveduras) em lâmina de vidro e calculado o percentual de filamentação e inibição nos grupos tratamento e controle. As porcentagens (%) de formação de hifas em 100 células e a porcentagem (%) de inibição da formação de hifas foi calculada

conforme Silva *et al.*, (2022). O experimento foi realizado em triplicata em três experimentos independentes.

A percentagem de filamentação foi determinada por:

$$\text{N}^\circ \text{ de hifas em 100 células do controle de crescimento sem tratamento} = 100\% / \text{n}^\circ \text{ de hifas em 100 células dos grupos tratamento.}$$

1.1 4. 11 Ação do AE na formação do biofilme

1.1.1 Biofilme jovem

A interferência do AE na formação do biofilme foi realizada conforme descrito por Seneviratne *et al.*, (2016) em placas de microdiluição de 96 poços com fundo chato. Primeiramente foi realizada a adesão das linhagens com 200 µL de inóculo padronizado (1×10^6 UFC / mL) adicionados aos poços da placa de microdiluição e incubados por 90 minutos a 37 °C. Em seguida, os poços foram lavados 3 vezes com PBS para retirada de células não aderidas e, após, 200 µL de RPMI-1640/MOPS com o tratamento (1:1) em concentrações subinibitórias CIM (AE/2, AE/4, FLZ/2, FLZ/4), CIF (AE+FLZ/2 e AE+FLZ/4) foram adicionados aos poços. Os controles de crescimento e controles de esterilidade do meio de cultura foram realizados, a placa foi incubada a 37 ° C por 24 horas em estufa de aerobiose. Os poços foram então lavados 3 vezes com PBS e corados com MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) (Gularti *et al.*, 2017) e a leitura da absorbância realizada em espectrofotômetro de UV- visível (λ : 530 nm). Os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes.

4.11.2 Biofilme maduro

A análise do efeito do AE sobre o biofilme maduro seguiu o mesmo procedimento adotado para a interferência na formação do biofilme, sendo que após a adesão, 200 µL de meio RPMI – 1640 / MOPS foram adicionados e as microplacas incubadas por 24 horas a 37°C em aerobiose. Então, as microplacas foram lavadas 3 vezes com PBS e adicionados meio de cultura com tratamento (1:1) nas concentrações da CIM e superiores CIM (8X AE, 4X AE, 2X AE, CIM AE, 8X FLZ, 4X FLZ, 2X FLZ, CIM FLZ), CIF (8X AE+FLZ, 4X AE+FLZ, 2X AE+FLZ). As placas foram incubadas por mais 24 horas a 37 ° C e depois novamente lavadas 3 vezes com PBS antes de verificar a atividade metabólica por MTT. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de UV- visível (λ : 530 nm) (Gulart *et al.*, 2017). Os testes foram realizados em triplicata em três testes independentes.

4.11 Atividade hemolítica

A metodologia utilizada foi adaptada de Greco *et al.*, (2019), Greco *et al.*, (2020) e Zafar *et al.*, (2023). As amostras de sangue foram disponibilizadas pelo Biotério Central da UFMA, coletadas em tubos contendo EDTA-K2 como anticoagulante e utilizadas para o teste no mesmo dia de coleta. Sangue total de carneiro, 10 mL, foi centrifugado a 1.500 rpm por 5 min a 20° C para evitar coagulação e a fração plasmática resultante foi removida das amostras. Os *pellets* foram lavados com igual volume (10 mL) com PBS e misturados por inversão. As etapas de centrifugação e lavagem foram repetidas 3 vezes e após a última lavagem, um volume de PBS foi adicionado e as amostras resultantes foram diluídas 1:10 com PBS para produzir uma concentração de hemácias de $\sim 5 \times 10^8$ hemácias/mL. O ensaio foi realizado em microplaca de polipropileno de 96 poços e o AE (31.25 a 8.000 $\mu\text{g} / \text{mL}$) e o NaOH a 1M como controle do veículo (6.25 %) foram testados em diluições seriadas 1:1 em PBS, o Triton X-100 a 0.1% foi utilizado como controles de hemólise. O controle sem hemólise foi feito com PBS. As concentrações finais foram obtidas adicionando aos poços 100 μL de cada solução, AE e NaOH, seguido de 100 μL da solução de hemácias em cada poço. A placa foi fechada, agitada em agitador de placas por 20 s e incubada por uma hora a 37°C. Depois foi homogeneizada delicadamente cada poço e transferido o conteúdo total para tubos e finalmente, após centrifugação a 1.500 rpm por 5 min em temperatura ambiente, 100 μL do sobrenadante foram removidos e transferidos para outra microplaca e agitados a 1.000 rpm por 1 min para remover bolhas de ar. A densidade óptica foi medida a 450 nm usando um leitor de placas. A porcentagem de hemólise foi calculada com a seguinte equação:

$$\% \text{ hemólise} = \frac{(\text{absorvância do AE} - \text{absorvância do PBS}) \times 100}{(\text{absorvância do triton} - \text{absorvância do PBS})}$$

4.12 Ensaio de citotoxicidade

A atividade citotóxica do AE, FLZ, AE+FLZ e veículo (NaOH 1M + PBS) foram avaliadas contra linhagem celular de carcinoma do colo do útero humano (HeLa, ATCC® CCL-2™). A linhagem foi semeada em placas de 96 poços a uma densidade celular de $2,5 \times 10^4$ células por poço, reabastecidas com meio de crescimento consistindo em meio de Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) com 10% de soro fetal bovino (FBS), 100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina. As células foram incubadas a 37°C em CO₂ a 5% durante 24 horas. Em seguida, adicionadas uma série de concentrações dos agentes, AE (62,5

– 4.000 µg/mL), FLZ (256 - 16 µg/mL), AE+FLZ (31,25±0,5 – 500±8) e veículo (0,20%-3,25%) testados foram adicionadas a cada poço da placa e incubadas por 24, 48 e 72 h. Depois disso, lavadas e adicionados 10 µL de solução fresca de reagente MTT a 5 mg/mL foram adicionados a cada poço e a placa foi incubada em uma incubadora de CO₂ a 37 °C por 4h. Após a obtenção do precipitado roxo, as células foram dissolvidas em etanol e sua densidade óptica foi registrada em 570 nm. Os controles negativos foram obtidos medindo o meio celular não tratado. Os dados das células controles e tratadas foram calculados e expressos como porcentagem de células viáveis. O experimento foi realizado em triplicata em três experimentos independentes (Mosmann, 1983; ATCC, 2011).

4.13 Análise estatística

Os resultados dos testes foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk (exceto MIC, CFM e interação *in vitro*). Diferenças significativas entre grupos foram determinadas por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida por comparação múltipla de Tukey quando a amostra foi considerada com distribuição normal e pela análise de Kruskal Wallis seguido por teste de Dunn para distribuição anormal no GraphPad Prism® 9.0, onde o valor (* $p < 0.05$) foi considerado estatisticamente significativo. Todos os experimentos foram realizados em triplicado em três independente experimentos.

5 RESULTADOS

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

A CIM do AE e FLZ foram determinadas contra 22 isolados clínicos e 3 linhagens padrão (Tabela 3). O AE apresentou CIM contra todos os isolados testados com valores entre 250 - 2000 µg / mL. O AE apresentou CIM = 2000 µg / mL contra 4% das linhagens, CIM = 1000 µg / mL contra 28% destas CIM = 500 µg / mL contra 48% e CIM = 250 µg / mL contra 20% destas linhagens (Tabela 3). O AE mostrou ação fungicida contra 56% das linhagens. Não foi possível calcular a atividade da CFM para o AE contra 44% dos isolados, isso ocorreu devido aos valores de CFM elevados de AE > 2000 µg / mL, conforme mostrado na Tabela 3.

A CIM do FLZ foi categorizada conforme a diretriz de interpretação do CLSI (2008) para testes de sensibilidade *in vitro* das espécies de *Candida* determinando os pontos de corte contra o agente utilizado, o FLZ. As CIMs foram mensuradas usando uma escala que produz resultados entre uma categoria. Do total de 100%, 20% dos fungos foram classificados como resistentes (R), 40% como Sensibilidade Dose-Dependente (S-DD) e 40 % como sensíveis (S). Vale mencionar que o controle do veículo (NaOH + PBS) não foi capaz de inibir as linhagens testadas.

Tabela 3. Avaliação da atividade fúngica do AE e FLZ.

Microrganismos	CIM AE (µg/mL)	CFM AE (µg/mL)	CFM/CIM	Atividade	CIM FLZ (µg/mL)
Linhagens					
<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)	500	1000	2	Fungicida	2 (S)
<i>C. albicans</i> SC5314 (ATCC MYA-2876)	250	1000	4	Fungicida	8 (S)
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	250	500	2	Fungicida	4 (S)
Isolados clínicos					
<i>C. parapsilosis</i> CP 01	500	2000	4	Fungicida	4 (S)
<i>C. albicans</i> CA 01	1000	2000	2	Fungicida	4 (S)
<i>C. albicans</i> CA 02	500	>2000	*	*	8 (S)
<i>C. albicans</i> CA 03	1000	>2000	*	*	16 (S-DD)
<i>C. albicans</i> CA 04	500	500	1	Fungicida	16 (S-DD)
<i>C. albicans</i> CA 05	1000	2000	2	Fungicida	32 (S-DD)
<i>C. albicans</i> CA 06	2000	>2000	*	*	8 (S)
<i>C. albicans</i> CA 07	500	2000	4	Fungicida	32 (S-DD)
<i>C. albicans</i> CA 08	1000	2000	2	Fungicida	64 (R)
<i>C. albicans</i> CA 09	500	2000	4	Fungicida	32 (S-DD)

<i>C. albicans</i> CA 010	1000	2000	2	Fungicida	64 (R)
<i>C. albicans</i> CA 011	500	1000	2	Fungicida	32 (S-DD)
<i>C. albicans</i> CA 012	500	2000	4	Fungicida	2 (S)
<i>C. albicans</i> CA 013	1000	1000	1	Fungicida	64 (R)
<i>C. albicans</i> CA 014	250	>2000	*	*	32 (S-DD)
<i>C. albicans</i> CA 015	500	>2000	*	*	64 (R)
<i>C. albicans</i> CA 016	500	>2000	*	*	64 (R)
<i>C. albicans</i> CA 017	500	>2000	*	*	2 (S)
<i>C. albicans</i> CA 018	250	>2000	*	*	<0,5 (S)
<i>C. albicans</i> CA 019	250	>2000	*	*	16 (S-DD)
<i>C. albicans</i> CA 020	1000	>2000	*	*	16 (S-DD)
<i>C. albicans</i> CA 021	500	>2000	*	*	16 (S-DD)

Legenda: (*) não calculável, (FLZ) Fluconazol, (AE) Ácido elágico. A relação CFM/CIM foi calculada de forma a determinar se o AE possui atividade fungistática (CFM/CIM>4) ou fungicida (CFM/CIM≤4) (Siddiqui *et al.*, 2013). Segundo a diretriz de interpretação do CLSI (2008) para testes de sensibilidade *in vitro* das espécies de *Candida*, diz que valores ≤8 µg/mL pra fluconazol é (Sensível - S), 16-32 µg/mL é (Sensibilidade dose dependente – S-DD) e ≥64 µg/mL é (Resistente - R). Fonte: Próprio autor (2024).

5.2 Interação *in vitro* do ácido elágico com fluconazol

Para a interação *in vitro* do AE com FLZ foram selecionados 13 dos microrganismos mostrados na Tabela 4, resistentes (R) à fluconazol, tais como: *C. albicans* (CA 08), *C. albicans* (CA 010), *C. albicans* (CA 013), *C. albicans* CA (015) e *C. albicans* (CA 016), sensibilidade dose dependente (S-DD) como: *C. albicans* (CA 04), *C. albicans* (CA 05), *C. albicans* (CA 014) e sensíveis como: *C. parapsilosis* (CP 01), *C. albicans* (CA 02), *C. albicans* (CA ATCC 90028), *C. albicans* SC5314 (CA ATCC MYA-2876) e *C. parapsilosis* (CP ATCC 22019).

As concentrações iniciais utilizadas para a interação *in vitro* foram 2 vezes maiores a CIM AE e FLZ. O AE + FLZ apresentou interação aditiva contra 23,07 % das linhagens, indiferente contra 30,76% e interação sinérgica contra 46,15% dos fungos. Estes resultados mostram que AE pode potencializar o efeito antifúngico do FLZ (Tabela 4). Os ICIF mostrados na Tabela 4 correspondem aos menores índices calculados.

Tabela 4. Efeitos *in vitro* da associação do AE com o FLZ contra isolados clínicos e linhagens de referência de *Candida*.

Microrganismos	CIM (µg/mL)		CIF (µg/mL)		ICIF	Efeito
	AE _i	FLZ _i	AE _c	FLZ _c		
Linhagens						
<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)	500	2	125	1	0.75	Aditivo
<i>C. albicans</i> SC5314 (ATCC MYA-2876)	250	8	250	0.5	1.06	Indiferente
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	250	4	250	0.25	1.06	Indiferente
Isolados clínicos						
<i>C. parapsilosis</i> CP 01	500	4	500	0.5	1.12	Indiferente
<i>C. albicans</i> CA 02	500	8	250	0.5	0.56	Aditivo
<i>C. albicans</i> CA 04	500	16	250	2	0.62	Aditivo
<i>C. albicans</i> CA 05	1000	32	250	1	0.28	Sinérgico
<i>C. albicans</i> CA 08	1000	64	62.5	2	0.09	Sinérgico
<i>C. albicans</i> CA 010	1000	64	125	2	0.15	Sinérgico
<i>C. albicans</i> CA 013	1000	64	125	2	0.15	Sinérgico
<i>C. albicans</i> CA 014	250	32	250	2	1.06	Indiferente
<i>C. albicans</i> CA 015	500	64	62.5	2	0.15	Sinérgico
<i>C. albicans</i> CA 016	500	64	62.5	4	0.18	Sinérgico

Legenda: AE_i (Ácido elágico sozinho), AE_c (Ácido elágico combinado), FLZ_i (Fluconazol sozinho) e FLZ_c (Fluconazol combinado). Concentração Inibitória Fracionaria (CIF), Índice de Combinação Inibitória Fracionaria (ICIF): Sinérgico ≤ 0.5 ; aditivo $0.5 < \text{ICIF} \leq 1$; indiferença $1 < \text{ICIF} \leq 4.0$; e Antagonismo: $\text{ICIF} > 4.0$ (Gómez-Lopez *et al.*, 2003). Fonte: Próprio autor (2024).

A interação *in vitro* de AE + FLZ contra *C. albicans* SC5314 ATCC MYA-2876, *C. parapsilosis* ATCC 22019, CA 014 e CP 01 foi indiferente, sem resultado para interação aditiva, sinérgica ou antagônica. O AE potencializou o efeito do FLZ com interação aditiva em *C. albicans* ATCC 90028 (ICIF=0.75) e em mais de uma concentração em associação para as outras leveduras, como mostrado a seguir na Tabela 5.

Tabela 5. Total de ICIF de AE + FLZ obtidas no ensaio do *Checkerboard*

Fungos	Interação (ICIF)*	
	Sinérgica	Aditiva
CA 02	-	0.56 – 0.62 – 0.75 e 1.0
CA 04	-	0.62 – 0.75 – 1.0
CA 05	0.28 – 0.31 – 0.37 – 0.5	0.53 – 0.56 – 0.62 – 0.75 e 1.0
CA 08	0.09 – 0.12 – 0.15 – 0.18 – 0.25 – 0.28 – 0.31 – 0.37 e 0.5	0.53 – 0.56 – 0.62 – 0.75 e 1.0
CA 010	0.15 – 0.18 – 0.25 – 0.28 – 0.31 – 0.37 e 0.50	0.53 – 0.56 – 0.62 – 0.75 e 1.0
CA 013	0.15 – 0.18 – 0.25 – 0.28 – 0.31 – 0.37 – 0.50	0.53 – 0.56 – 0.62 – 0.75 – 1.0
CA 015	0.15 - 0.18 – 0.25 – 0.28 – 0.31- 0.37	0.53 – 0.56 – 0.62 – 0.75 e 1.0
CA 016	0.15 – 0.18 – 0.25 – 0.28 – 0.31 – 0.37 e 0.5	0.53 – 0.56 – 0.62 – 0.75 e 1.0

Legenda: (-) sem interação; Índice de Combinação Inibitória Fracionaria (ICIF): Sinergismo ≤ 0.5 ; aditivo $0.5 > \text{ICIF} \leq 1$; indiferença $1 > \text{ICIF} \leq 4.0$; e Antagonismo: $\text{ICIF} > 4.0$ (Gómez-Lopez *et al.*, 2003). Fonte: Próprio autor (2024).

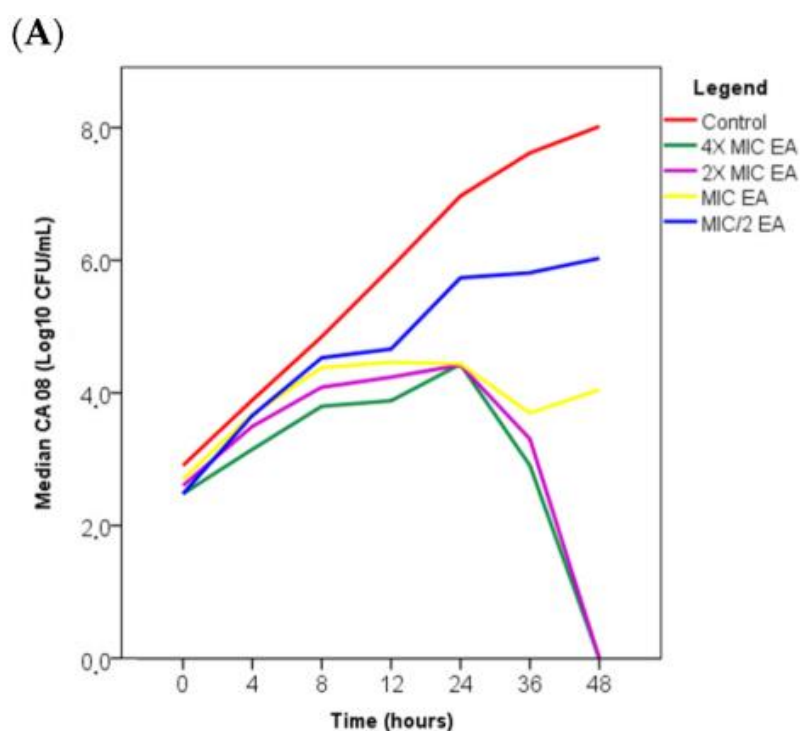
5.3 Curva de tempo morte

A curva de tempo de morte microbiana (*time-kill curve*) é um ensaio utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana de um agente em relação a um microrganismo alvo ao longo do tempo. Nesse ensaio, uma população conhecida de fungos foi exposta a concentrações crescentes dos agentes antimicrobianos em estudo. Uma cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 90028) que teve interação aditiva e um isolado clínico de escarro *C. albicans* (CA08) resistente ao FLZ (CIM = 64 µg/mL) com interação sinérgica e menor índice (ICIF= 0.09) entre os demais fungos (Tabela 4) foram selecionados para o teste.

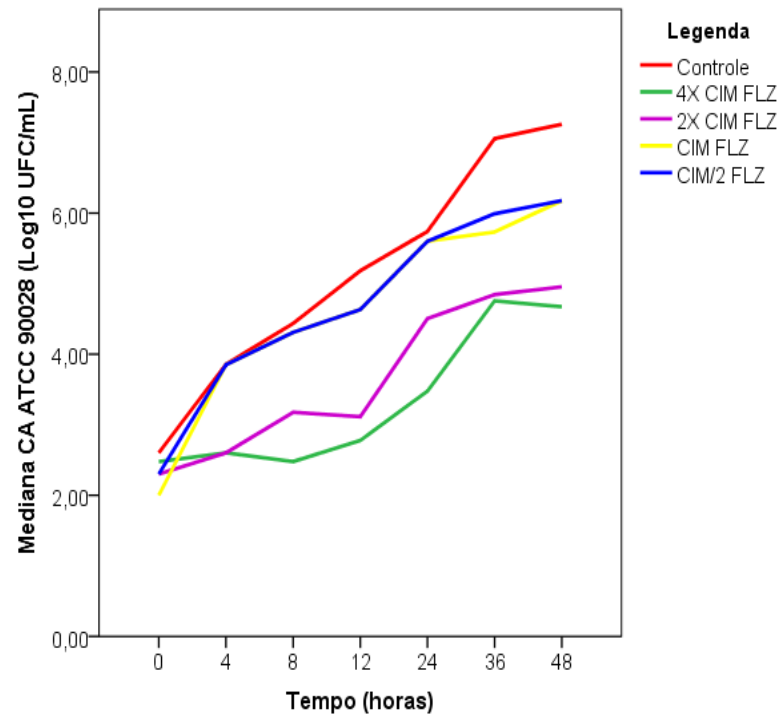
A Figura 5 e 6 mostram os efeitos dos tratamentos com os agentes sozinhos e em associação sobre o crescimento de *C. albicans* ATCC 90028 e do isolado clínico CA08, respectivamente, em diferentes intervalos de tempo (0, 4, 8, 12, 24, 36 e 48 horas) em relação ao controle de crescimento sem tratamento (Controle).

Conforme mostrado na Figura 5 A, os grupos que receberam concentrações de 4X e 2X AE após 48 h de incubação apresentaram redução no número de células viáveis de *C. albicans* ATCC 90028, com crescimento de 3,69 e 4,17 Log₁₀ UFC/mL, respectivamente, em comparação ao controle, que apresentou 7,26 Log₁₀ UFC/mL, indicando um potencial efeito fungicida do composto. Em contraste, nas concentrações CIM e CIM/2 AE, não foi observada redução no número de células em ≥ 3 Log₁₀ UFC/mL, sugerindo atividade fungistática (Figura 5 A).

A Figura 5 B mostra que o tratamento com FLZ não resultou em reduções significativas no número de células *C. albicans* ATCC 90028 em ≥ 3 Log₁₀ UFC/mL, confirmando a ação fungistática do FLZ. As combinações inibitórias fracionadas (CIFs) de AE + FLZ (Figura 5 C) usadas mostraram reduzir significativamente as células fúngicas no 4X CIF (sem crescimento) e 2X AE + FLZ (3,69 Log₁₀ UFC/mL) após 48 h em comparação ao controle que apresentou 7,26 Log₁₀ UFC/mL, sugerindo um efeito fungicida em *C. albicans* ATCC 90028. Nas concentrações de CIF e CIF/2 AE + FLZ, não houve redução significativa nas células em ≥ 3 Log₁₀ UFC/mL, indicando atividade fungistática.



(B)



(C)

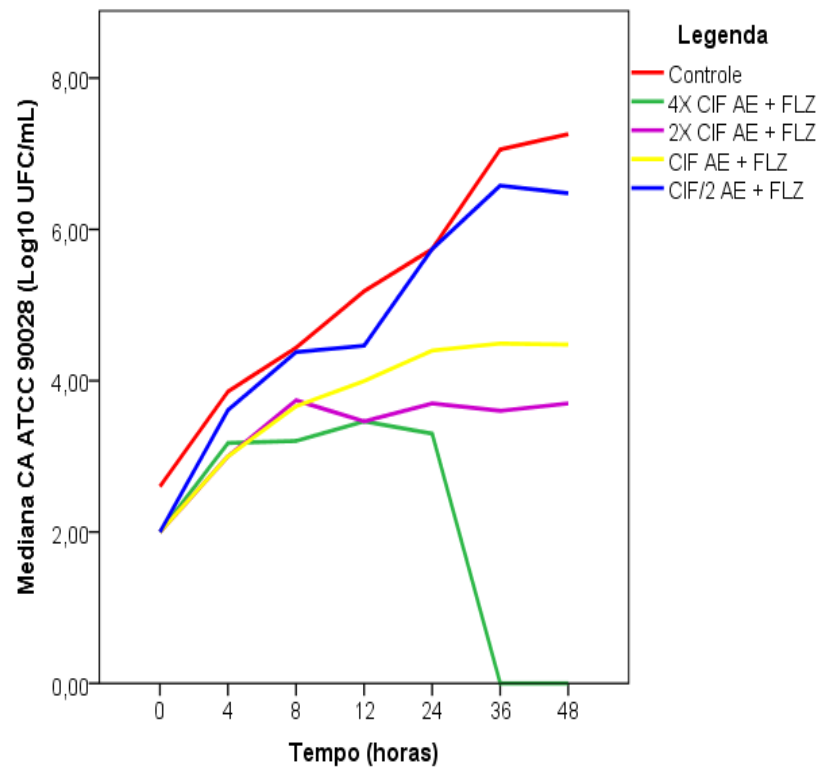
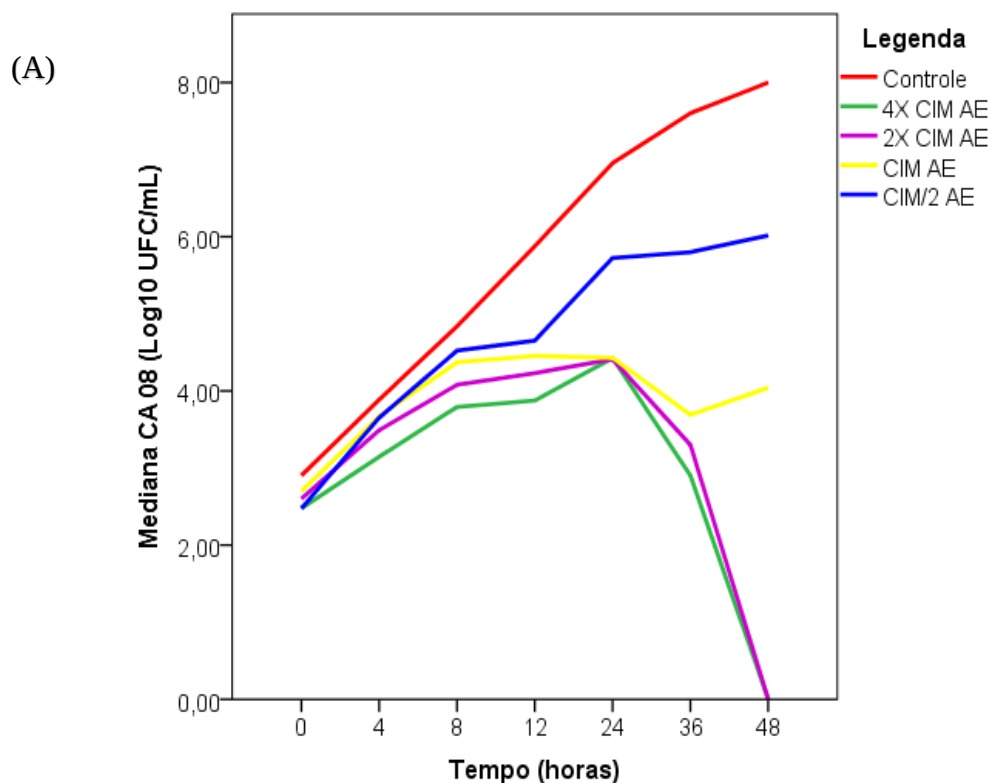


Figura 5. Curva de morte de *C. albicans* ATCC 90028 sob ação do AE (A), FLZ (B) e em combinação (CIF AE + FLZ) (C). Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas pela análise de

Kruskal-Wallis seguida pelo teste de Dunn com ($p>0.05$) considerado significativo. Descrição das concentrações dos grupos em anexo no Apêndice.

Testes de curva de tempo-morte com o isolado clínico *C. albicans* CA08 (Figura 6 A) revelaram que tratamentos com 4X e 2X CIM de AE não resultaram em crescimento após 48 h, com uma redução de 99,99% nas células, sugerindo um efeito fungicida. O grupo controle não tratado apresentou crescimento de 8 Log₁₀ UFC/mL. Os tratamentos AE CIM e CIM/2 não apresentaram redução no número de células fúngicas viáveis em ≥ 3 Log₁₀ UFC/mL, sugerindo atividade fungistática.

Após o período de incubação de 48 h, os tratamentos FLZ não foram capazes de reduzir o número de células fúngicas viáveis para ≥ 3 Log₁₀ UFC/mL, com atividade fungistática (Figura 6 B). Por outro lado, as cepas tratadas com 4X CIF AE + FLZ (Figura 6 C) não apresentaram crescimento após 48 h; 2X CIF AE + FLZ apresentaram crescimento logarítmico de 3,6 Log₁₀ UFC/mL, em comparação ao controle de 8 Log₁₀ UFC/mL, o que sugere efeito fungicida. Os tratamentos CIF e CIF/2 EA + FLZ não foram capazes de reduzir o número de células viáveis com valores logarítmicos de 5,77 e 6,46 Log₁₀ UFC/mL, respectivamente, em relação ao controle de 8 log₁₀ UFC/mL, o que sugere atividade fungistática.



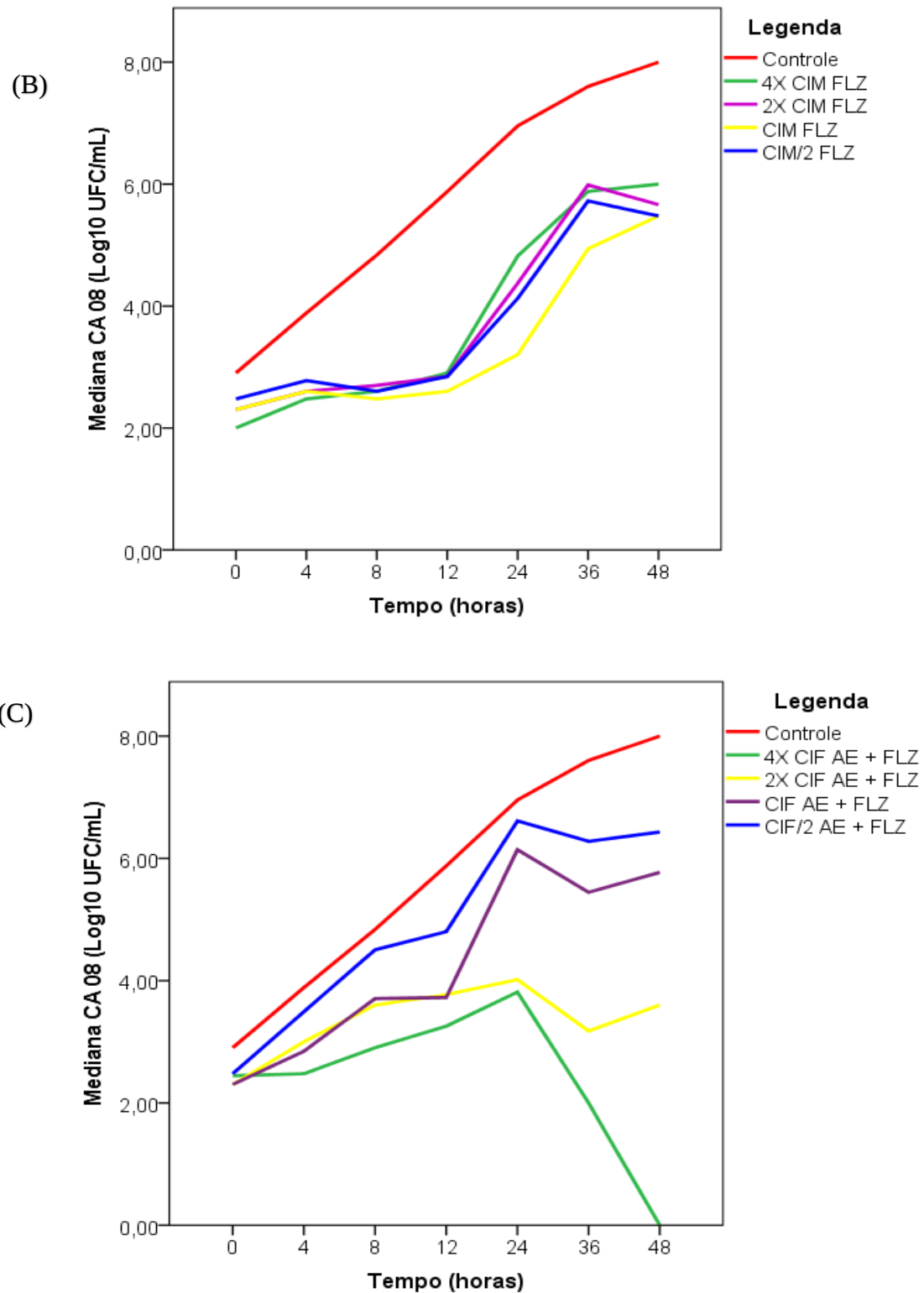


Figura 6. Curva de morte de *C. albicans* CA 08 sob ação do AE (A), FLZ (B) e em combinação (CIF AE + FLZ) (C), em diferentes concentrações e Controle. Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas por análise de Kruskal Wallis seguido de teste de Dunn, valores significantes ($p < 0.05$). Descrição das concentrações dos grupos no Anexo 1.

5.4 Inibição da formação de hifas e/ou pseudohifas

Para os testes de formação de hifas, quatro leveduras foram selecionadas, uma cepa padrão de referência: *C. albicans* ATCC 90028, sensível ao FLZ e com interação aditiva, e três isolados clínicos: *C. albicans* CA 08 de escarro, *C. albicans* CA 010 e *C. albicans* CA 013 isolados de urina (Tabela 2) resistentes ao FLZ (Tabela 3) e com os ICIF menores entre os outros fungos (Tabela 4).

A Figura 7 mostra a porcentagem formação de hifas de *Candida* sobre ação do AE, FLZ e em combinação (CIF AE+FLZ), em concentrações subinibitórias. Calculado a porcentagem de formação de hifas por 100 células comparada com controle de crescimento sem tratamento (CONTROLE), (*) significante $p < 0.05$.

A Figura 7 (A, B, C e D) mostra que todos os grupos de tratamento apresentaram significância em relação ao controle de crescimento sem tratamento, exceto no grupo tratamento (CIM AE/4) como mostrado na Figura 7 (C), onde o grupo não apresentou significância em relação ao controle sem tratamento.

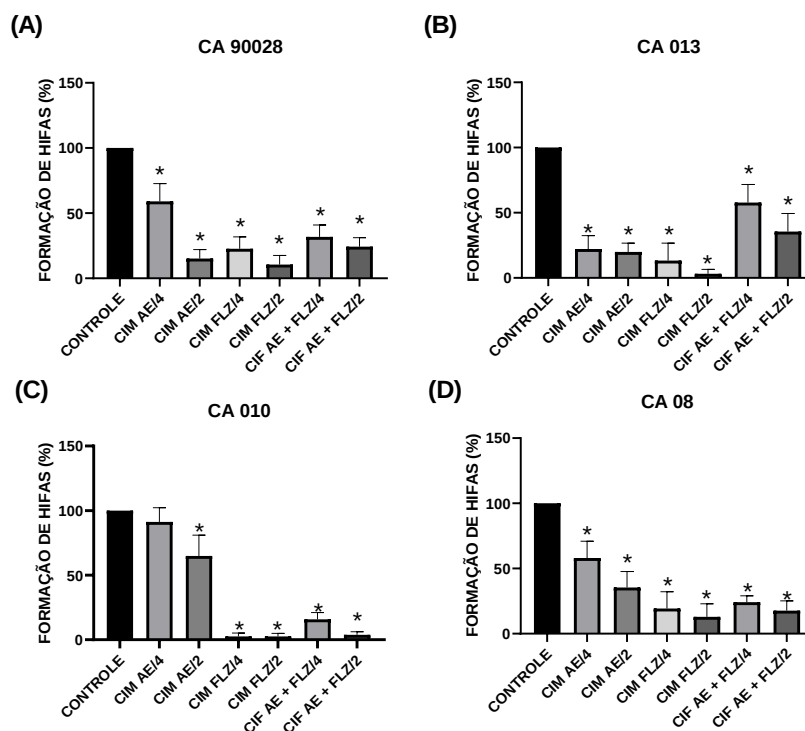


Figura 7. Formação de hifas de *Candida* sobre ação do AE, FLZ e em combinação com FLZ, em concentrações subinibitórias. Os resultados dos testes foram apresentados com média e desvio padrão, diferenças significativas entre os grupos foram determinadas por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida por teste de comparação múltipla de Tukey onde o valor de (* $p < 0.05$) significante. Descrição das concentrações dos grupos em anexo no Apêndice. Fonte: Próprio autor (2024).

5.5 Efeito do AE na atividade antibiofilme

Para os testes de biofilme as quatro leveduras selecionadas no teste anterior foram utilizadas. A Figura 8 mostra a porcentagem de viabilidade celular dos biofilmes jovem e maduro das diferentes linhagens sob ação dos grupos de tratamentos em comparação ao controle de crescimento não tratado (controle) após 24 e 48 horas a 37 ° C.

A Figura 8 A e B mostra que os grupos tratados com concentrações subinibitórias de AE sozinho reduziram a formação de biofilmes jovens de *C. albicans* ATCC 90028 e CA013. Os grupos CA013 FLZ/2 e FLZ/4 apresentaram reduções significativas ($p < 0,05$) (Figura 8 B).

As concentrações subinibitórias da combinação CIF AE + FLZ provaram ser eficazes no tratamento de biofilmes jovens de *C. albicans* ATCC 90028, CA 08 e CA 013 (Figura 8 A, B, D) e ineficazes no tratamento de biofilmes de CA 010 (Figura 8 C) em comparação com o controle não tratado.

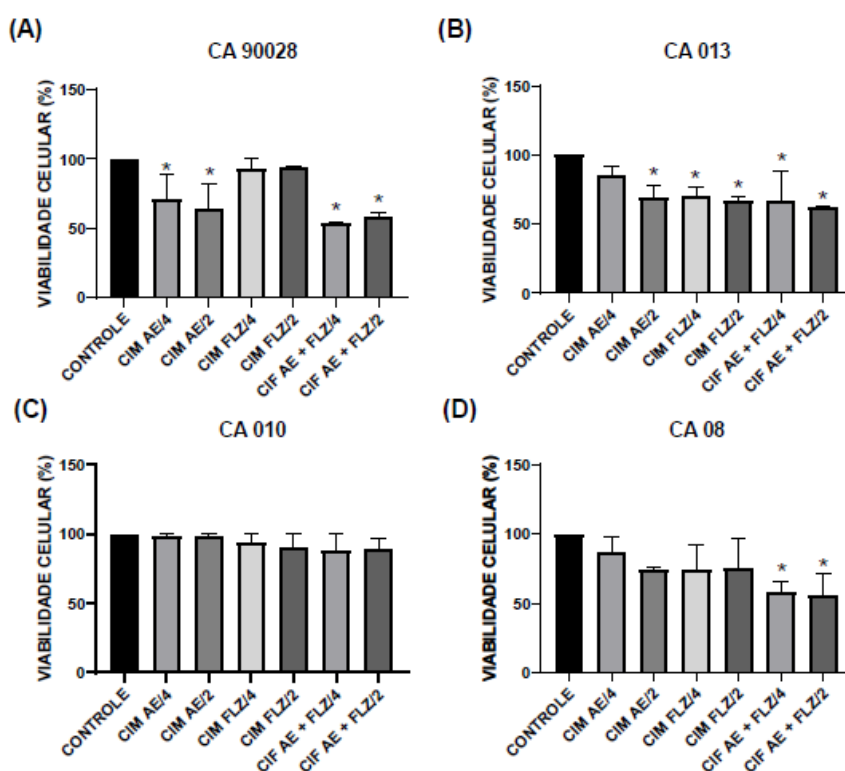


Figura 8. Viabilidade celular de biofilmes jovens de *C. albicans*. Isolados clínicos: (A) CA 90028, (B) CA 013, (C) CA 010, (D) CA08. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi aplicado. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão, diferenças significativas entre os grupos foram determinadas por análise de variância de uma via (ANOVA) seguida por comparação múltipla de Tukey onde o valor de $p < 0,05$ (*) foi significativo.

Nos testes de interferência no biofilme maduro, foram testadas quatro linhagens de leveduras utilizadas no biofilme jovem. A Figura 9 mostra a porcentagem de viabilidade celular dos biofilmes maduros das diferentes linhagens sob a ação do tratamento em comparação com o controle de crescimento não tratado (controle).

Apenas o grupo de tratamento 8X AE CIM apresentou atividade significativa ($p < 0.05$) contra os biofilmes maduros de *C. albicans* ATCC 90028, CA08 e CA013, conforme mostrado na Figura 9 A, B, D. Nenhum dos tratamentos utilizados foi capaz de inibir ou erradicar o biofilme CA 010, conforme mostrado na Figura 9 C.

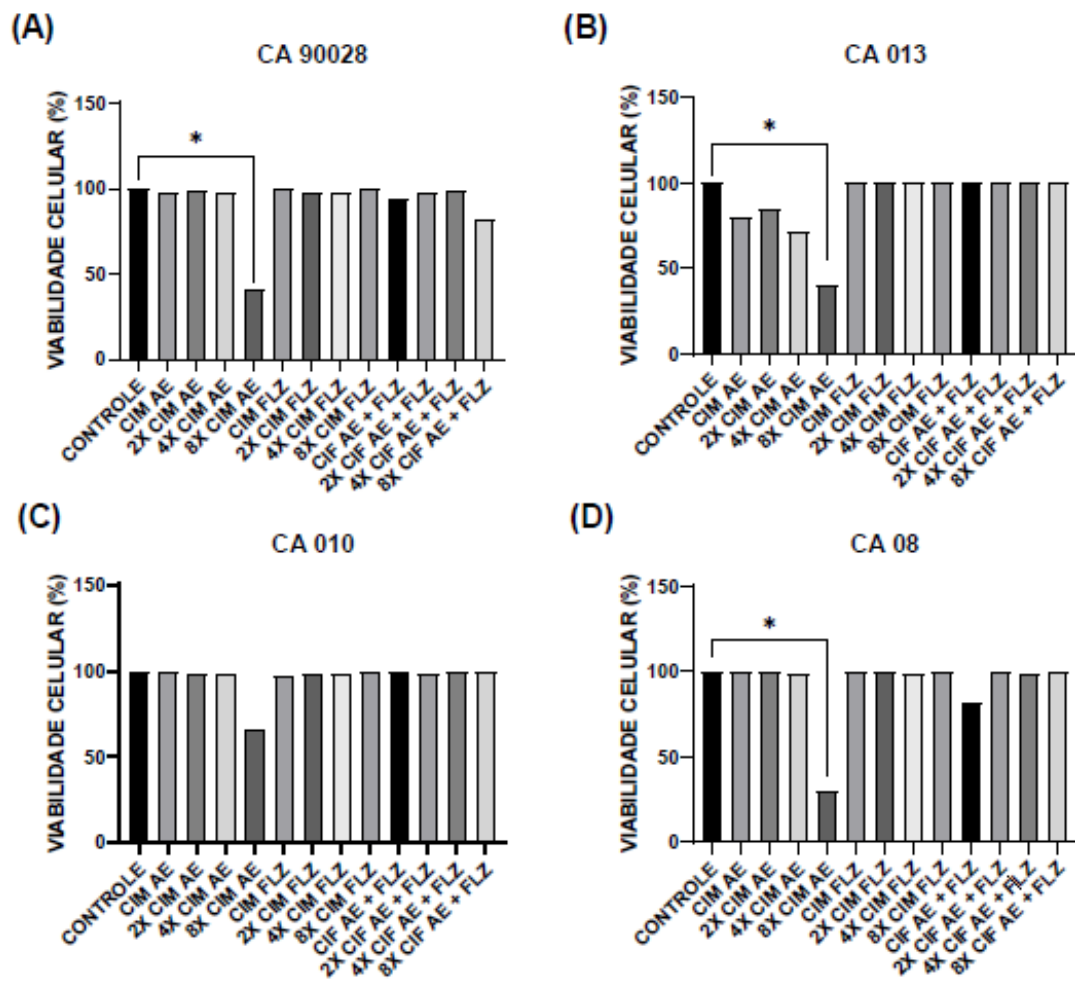


Figura 9. Viabilidade celular de biofilmes maduros de *C. albicans*. Isolados clínicos: (A) CA 90028, (B) CA 013, (C) CA 010, (D) CA08. Foi aplicado o teste de normalidade de Shapiro–Wilk. As diferenças significativas entre os grupos foram determinadas pela análise de variância de Kruskal–Wallis seguida pelo teste de Dunn, onde o valor de $p < 0.05$ (*) foi significativo.

5.6 Atividade hemolítica

Este ensaio teve como objetivo avaliar se o AE poderia induzir hemólise e examinar seus potenciais efeitos tóxicos. A porcentagem de atividade hemolítica foi obtida comparando os dados dos grupos tratados com AE em diferentes concentrações, bem como seu veículo (78–2500 µg/mL NaOH), em comparação com a solução de Triton X-100 0,1% (controle positivo, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). Diferentes concentrações de AE e veículo não apresentaram atividade hemolítica em comparação com o controle positivo (0,1% Triton X-100), mesmo na maior concentração de AE (8000 µg/mL), observamos uma porcentagem de hemólise de apenas 24,53%.

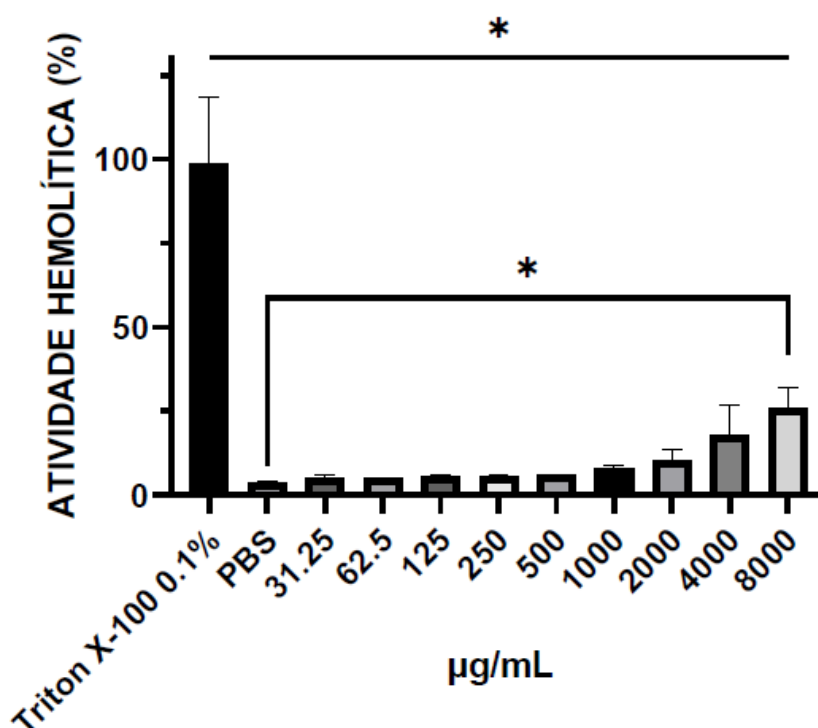


Figura 10. Atividade hemolítica das concentrações de AE. Os resultados dos testes foram apresentados com média e desvio padrão, diferenças significativas entre os grupos foram determinadas por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida por teste de comparação múltipla de Tukey onde o valor de (* $p < 0.05$) é significativo. Fonte: Próprio autor (2024).

5.7 Ensaio de Citotoxicidade

A atividade citotóxica do AE, FLZ, AE+FLZ e veículo (NaOH 1 M + PBS) foram avaliadas contra linhagem celular de carcinoma do colo do útero humano (ATCC® CCL-2™), através do corante MTT, já que compostos citotóxicos capazes de danificar ou provocar morte celular diminuem a redução do MTT em formazan, reduzindo a quantidade de células viáveis

(Ulukaya *et al.*, 2008). Não foram evidenciados efeitos citotóxicos nas associações testadas em nenhum período de incubação dos ensaios (24, 48 e 72h) (Figura 11).

A Figura 11 A mostra que em todos os tratamentos, mesmo nas maiores concentrações testadas, não foram observados efeitos citotóxicos significativos nas células HeLa (ATCC ® CCL-2™) após 24 h de incubação, indicando alta viabilidade celular.

Após 48 h (Figura 11 B), reduções significativas na viabilidade celular foram observadas apenas em concentrações de EA de 500–4000 µg/mL e no veículo, sem evidência de efeitos nos ensaios FLZ (Figura 11 B). A Figura 11 C mostra efeitos citotóxicos após 72 h de tratamento com AE em concentrações de 500 a 4000 µg/mL. No entanto, concentrações de AE abaixo de 500 µg/mL não reduziram significativamente a viabilidade celular após 72 h.

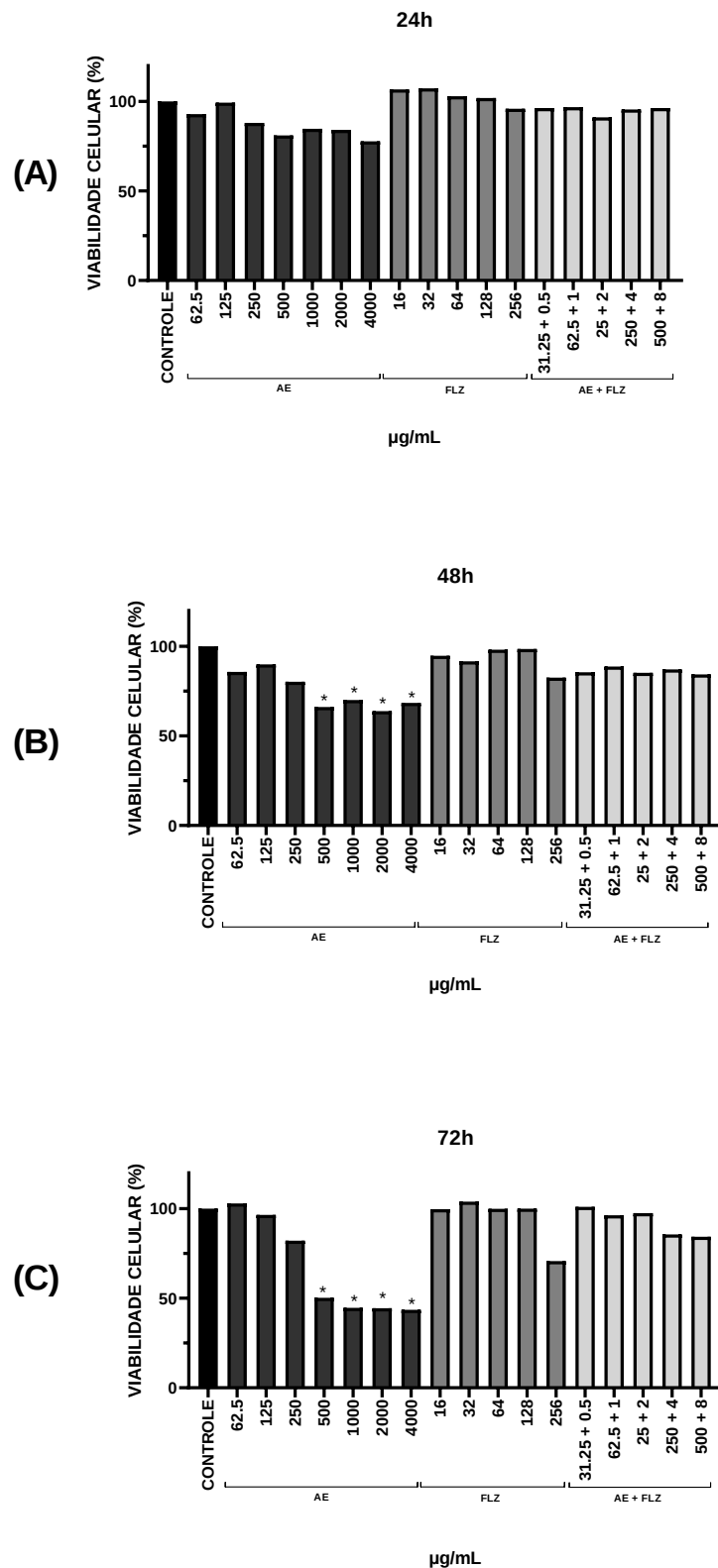


Figura 11. Ensaio de citotoxicidade dos compostos AE, FLZ, AE+FLZ e veículo. Os resultados dos testes foram apresentados com média e desvio padrão, diferenças significativas entre os grupos foram determinadas por análise Kruskal Wallis seguido do teste de comparações múltiplas de Dunn onde o valor de ($*p < 0.05$) significante.

6 DISCUSSÃO

Em nosso estudo, a avaliação da atividade antifúngica *in vitro* do AE e de suas combinações com o FLZ confirmou seu potencial anti-*Candida*, colaborando com resultados da literatura, nosso objetivo era obter mais conhecimento sobre a ação antifúngica do AE com percentual de pureza elevado. Onde, suas propriedades e efeitos foram satisfatórios, contra espécies de *Candida*.

Apesar de alguns estudos já sugerirem a atividade antifúngica do AE (Sampaio *et al.*, 2021; Zacchino *et al.*, 2010). Nesta pesquisa o AE conseguiu ter atividade contra todas as leveduras testadas, incluindo linhagens ATCC e isolados clínicos categorizados como: sensíveis, sensibilidade dose dependente e resistentes ao FLZ, com resultados de CIM AE entre 250 – 2000 µg/mL. Neste estudo foi demonstrado a atividade antifúngica do AE contra um painel de 23 isolados de *C. albicans* e 2 *C. parapsilosis*. Além disso, investigou-se aqui a possibilidade de o AE ter ação sobre isolados clínicos de *Candida* provenientes de diversos sítios de origem.

Zacchino *et al.*, (2010) avaliaram a atividade antifúngica do AE de *Lafoensia pacari* contra leveduras do gênero *Candida* por meio de microdiluição em caldo e obtiveram valores de CIM entre 125 - > 1000 µg/mL. Já, Li *et al.*, (2015) obtiveram valores menores de CIM, entre 25 - 75 µg/mL, contra *Candida* spp. Em um estudo, com plantas que possuem AE na composição, foram investigadas suas atividades antifúngicas e antivirulência contra *C. auris* e *C. albicans* onde foi observado atividade antifúngica (Possamai Rossatto *et al.*, 2021).

Quanto aos diferentes valores de CIM observados em nosso estudo, acredita-se que isso possa estar relacionado a plasticidade do genoma de *Candida* spp., como variações genéticas entre as espécies e na expressão de genes, que podem variar tanto entre as diferentes espécies como entre cepas de uma mesma espécie. Além disso, a presença de diferentes fatores de virulência e mecanismos de resistência, a adaptação as condições ambientais e a resposta a múltiplos estresses também podem influenciar na sensibilidade das diferentes espécies e cepas de *Candida* a uma determinada substância (Mba; Nweze, 2020; Moran; Coleman; Sullivan, 2011). Estas diferenças também podem estar relacionadas com diferentes condições de crescimento, pureza dos compostos e origem das estirpes (Possamai Rossatto *et al.*, 2021).

Nossos resultados demonstraram que o AE e suas combinações com o FLZ, antifúngico de escolha para tratamento da candidíase, tiveram interações sinérgicas, aditivas, contudo, a sua associação teve atividade contra a maioria das cepas utilizadas, reduzindo o crescimento de

Candida. Portanto, confirmamos a hipótese de que este composto potencializa os efeitos antifúngicos do FLZ.

A busca por associações com antifúngicos se dá em razão do aumento de isolados de *Candida* spp. resistentes aos antifúngicos convencionais, como o FLZ, associado ao baixo arsenal de fármacos disponíveis, torna necessária a busca por novos antimicrobianos, bem como de substâncias com ação sinérgica que possam melhorar a atividade dos antifúngicos (Li *et al.*, 2017, Lu *et al.*, 2021, Tortorano *et al.*, 2021).

As interações *in vitro* entre o AE associado ao azóis, como FLZ contra o gênero *Candida* ainda são escassos. Desta forma, buscou-se verificar a ação combinada, o AE + FLZ interagiram sinergicamente contra 46,15% das linhagens e de maneira aditiva contra 23,07%. Mesmo em associações não sinérgicas houve redução da CIM de ambos os compostos, o que mostra que o AE, quando combinado a um antifúngico, pode reduzir a concentração necessária do antimicrobiano para inibir *in vitro* o crescimento de cepas resistentes, amplificando a atividade antifúngica do fármaco. Esses resultados são relevantes do ponto de vista clínico. Em um estudo, Possamai Rossato *et al.*, (2021) também verificaram interações entre AE e antifúngicos, entretanto, diferentemente deste trabalho, evidenciaram somente interações indiferentes.

No geral, as evidências aqui reunidas sugerem que o AE pode ser útil como adjuvante da terapia com FLZ, dado que seriam utilizadas doses reduzidas deste antifúngico comercial em conjunto com o AE para tratar infecções causadas por *Candida*, que teria um grande potencial de sucesso, pois as concentrações dos mesmos seriam mais baixas, reduzindo efeitos tóxicos e a resistência, porém é uma hipótese que ainda precisa ser investigada.

A análise de concentrações subinibitórias de AE e/ou combinações, na formação de hifas de *Candida* reforçou a sua eficácia no combate de fatores de virulência do fungo. Aqui, nesse estudo, o AE isolado ou em combinação com FLZ, inibiu a transição levedura-hifa das linhagens testadas. Isto é importante visto este processo constituir um dos principais fatores de virulência, sendo a forma invasiva e patogênica mais expressiva do gênero. Diferentemente, Sampaio *et al.*, (2019) não verificaram AE inibindo o processo de transição levedura-hifa em *C. albicans* SC 5314 após exposição *in vitro* ao composto por 4 horas.

A formação de biofilme também foi realizada na pesquisa, já que é um importante processo para a falta de ação dos antifúngicos azólicos. Sendo um mecanismo de resistência comum também às demais classes de antifúngicos, o biofilme representa um importante desafio para o tratamento de infecções crônicas. Portanto, é necessária a busca por novos alvos terapêuticos e estratégias de combinação de drogas na busca de mais de um tratamento efetivo (Koo *et al.*, 2017).

Quanto a atividade frente ao biofilme de *Candida* spp., o AE apresentou atividade antibiofilme somente quando combinado com FLZ, contra o biofilme em formação das cepas testadas (*C. albicans* ATCC 90028, CA 08 e CA 013). Já no biofilme maduro, foi a maior concentração de AE que foi capaz de interferir na formação (*C. albicans* ATCC 90028, CA 08, CA 010 e CA 013) e a maior concentração do AE em combinação (*C. albicans* ATCC 90028) interferindo de maneira significativa na viabilidade celular dos biofilmes.

A pesquisa comprovou que o AE possui atividade antibiofilme contra *Candida*, porém a ação combinada com o FLZ que ainda é pouco estudada, é relevante principalmente no tratamento de células não planctônicas devido a dificuldade do tratamento.

O AE não apresentou atividade hemolítica nas concentrações testadas para os eritrócitos de carneiro e pesquisas que relatam a atividade hemolítica do AE isolado ainda são reduzidas. Contudo, em um estudo de Possamai Rossatto *et al.*, (2021) também realizaram o ensaio de hemólise para diferentes concentrações de AE, não apresentando atividade hemolítica, resultados que corroboram com o demonstrado no estudo.

A avaliação da citotoxicidade do AE, FLZ, AE+FLZ e controles foi utilizando HeLa (adenocarcinoma epitelial do colo do útero humano, ATCC® CCL-2™), que apesar de alguns dos tratamentos apresentarem citotoxicidade durante os tempos de 48 – 72 horas, sua maioria foi considerada com baixa citotoxicidade para esse tipo celular entre 24 – 72 horas.

Contudo, em um ensaio com HeLa, a inibição do crescimento mediada por AE ocorreu de maneira dependente da dose, os resultados mostraram que o AE inibiu o crescimento de células HeLa (Wang *et al.*, 2023). O AE extraído da casca da romã, também inibiu a proliferação tumoral regulando a expressão do IGBP7 de maneira dose-dependente (Guo; Zhang; Fu, 2016). Assim como em Pani *et al.*, (2020) onde o efeito citotóxico do AE (25 µmol/L) foi examinado em células de câncer cervical HeLa por 96 h, o resultado mostrou que o composto induziu citotoxicidade em células HeLa com valor de IC₅₀ do AE de 15,84 µM (Pani *et al.*, 2020).

Tais resultados são promissores, pois sugerem que o AE e em combinação com FLZ pode ajudar a reduzir a dose necessária destes para matar ou inibir o crescimento fúngico, reduzindo possíveis efeitos citotóxicos relacionados a dose. Porém são necessárias mais pesquisas para entender o mecanismo de ação do AE e AE + FLZ. No entanto, dificuldades para aplicações terapêuticas *in vivo* devido à sua fraca solubilidade em água e, consequentemente, baixa biodisponibilidade. Assim, serão necessários no futuro mais trabalhos para melhorar a sua solubilidade em água e biodisponibilidade (Wang *et al.*, 2023).

Notamos que a citotoxicidade dependente da dose foi observada ao longo do tempo em tratamentos apenas com AE, indicando que o efeito tóxico deste agente nas células se intensifica à medida que a dose aumenta e o tempo avança. No entanto, também enfatizamos que a maioria dos valores de CIM obtidos para o AE tem baixa ou nenhuma citotoxicidade em HeLa, o que significa que, em doses reduzidas, o agente pode ser usado de uma forma que não seja prejudicial ou mesmo inofensiva às células.

Algumas limitações podem ser destacadas neste estudo, como a necessidade de estudos em animais para avaliar melhor a eficácia e a segurança do AE. No entanto, considerando todos os resultados, o AE parece ser um possível candidato para futuras formulações terapêuticas.

7 CONCLUSÃO

Diante dos achados *in vitro* deste estudo, pode-se concluir que o AE apresenta atividade antifúngica contra *Candida* spp. e pode potencializar a ação do FLZ de forma sinérgica ou aditiva, inibindo o crescimento de *C. albicans* em concentrações bem inferiores em relação à CIM. As análises da curva de tempo-morte na presença do AE e combinado comprovou a ação fungicida, principalmente nas maiores concentrações do AE e suas combinações.

O AE também possui propriedade antivirulência, uma vez que interfere significativamente no processo de transição levedura-hifa, bem como na formação de biofilmes e na erradicação dos mesmos. Aparentemente, apresenta um nível de segurança relativo, uma vez que somente as concentrações mais elevadas foram citotóxicas. Contudo, não foi evidenciada efeito citotóxico nas combinações com fluconazol e tão pouco atividade hemolítica em eritrócitos de carneiro.

REFERÊNCIAS

- AISHWARYA, Venkatasubramanian; SOLAIPRIYA, Solairaja; SIVARAMAKRISHNAN, Venkatabalasubramanian. Role of ellagic acid for the prevention and treatment of liver diseases. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 6, p. 2925-2944, 2021.
- AKINS, Robert A. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. **Medical mycology**, v. 43, n. 4, p. 285-318, 2005.
- ALVES, Michel Muálem de Moraes *et al.* Gallic and ellagic acids are promising adjuvants to conventional amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 12, p. 10.1128/aac. 00807-20, 2020.
- ASIF, Afifa *et al.* Therapeutic potentials of bioactive compounds from mango fruit wastes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 53, p. 102-112, 2016.
- BALA, I. *et al.* Analytical methods for assay of ellagic acid and its solubility studies. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 40, n. 1, p. 206-210, 2006.
- BEHL, Gautam *et al.* Synthesis, Characterization, and Evaluation of Radical Scavenging Ability of Ellagic Acid-Loaded Nanogels. **Journal of Nanomaterials**, v. 2011, n. 1, p. 695138, 2011.
- BERKOW, Elizabeth L.; LOCKHART, Shawn R. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. **Infection and drug resistance**, p. 237-245, 2017.
- BERMAN, Judith; KRYSAN, Damian J. Author Correction: drug resistance and tolerance in fungi. **Nat Rev Microbiol**, v. 18, p. 539, 2020.
- BESHBISHY, Amani Magdy *et al.* Ellagic acid microspheres restrict the growth of *Babesia* and *Theileria* *in vitro* and *Babesia microti* *in vivo*. **Parasites & vectors**, v. 12, p. 1-13, 2019.
- BIDAUD, Anne-Laure *et al.* Techniques for the assessment of *in vitro* and *in vivo* antifungal combinations. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 113, 2021.
- BOTTARI, Nathieli Bianchin *et al.* Antimicrobial activity and phytochemical characterization of *Carya illinoensis*. **Microb Pathog.** 2017 Mar;104:190-195.
- CALDERONE, Richard A.; CLANCY, Cornelius J. (Ed.). *Candida* and candidiasis. **American Society for Microbiology Press**, 2011.
- CASSONE, Antonio. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 122, n. 6, p. 785-794, 2015.
- CHAGAS, Maria do Socorro S. *et al.* Flavonols and flavones as potential anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial compounds. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2022, n. 1, p. 9966750, 2022.

CHAMBERS, Schuyler A.; GADDY, Jennifer A.; TOWNSEND, Steven D. Synthetic ellagic acid glycosides inhibit early stage adhesion of *Streptococcus agalactiae* biofilms as observed by scanning electron microscopy. **Chemistry—A European Journal**, v. 26, n. 44, p. 9923-9928, 2020.

ČIŽMÁRIKOVÁ, Martina *et al.* Ellagic acid and cancer hallmarks: insights from experimental evidence. **Biomolecules**, v. 13, n. 11, p. 1653, 2023.

CLEVELAND, Angela Ahlquist *et al.* Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008–2013: results from population-based surveillance. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0120452, 2015.

CLSI. Reference method for broth dilution tests for the determination of yeast sensitivity to antifungal therapy. **Clinical and Laboratorial Standards Institute**. CLSI Norma M27-A3. 2008.

COSTA-ORLANDI, Caroline B. *et al.* Fungal biofilms and polymicrobial diseases. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 2, p. 22, 2017.

CUI, Jinhui *et al.* Synergistic combinations of antifungals and anti-virulence agents to fight against *Candida albicans*. **Virulence**, v. 6, n. 4, p. 362-371, 2015.

DA ROCHA, W. R. V. *et al.* *Candida* genus–virulence factores, epidemiology, candidiasis and resistance mechanisms. Res Soc Dev 10: e43910414283 [em linha]. 2021.

DAHASH, Salma Luaiby *et al.* Ellagic acid-rich Pomegranate extracts synergizes moxifloxacin against methicillin resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA). **J. Pak. Med. Assoc**, v. 71, p. S88-S92, 2021.

DE OLIVEIRA SANTOS, Giselle C. *et al.* *Candida* infections and therapeutic strategies: mechanisms of action for traditional and alternative agents. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1351, 2018.

DE, Ronita *et al.* Antimicrobial activity of ellagic acid against *Helicobacter pylori* isolates from India and during infections in mice. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 6, p. 1595-1603, 2018.

DESAI, Jigar V. *Candida albicans* hyphae: from growth initiation to invasion. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 1, p. 10, 2018.

DOS SANTOS, Joycy FS *et al.* Enhancement of the antibiotic activity by quercetin against *Staphylococcus aureus* efflux pumps. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 53, p. 157-167, 2021.

DOSS, Vijayakumar Arul; THANGAVEL, Kalaichelvan Puthupalayam. Antioxidant and antimicrobial activity using different extracts of anacardium occidentale L. 2011.

DOUGLAS, L. Julia. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends in microbiology**, v. 11, n. 1, p. 30-36, 2003.

DU, Han *et al.* *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. **PLoS pathogens**, v. 16, n. 10, p. e1008921, 2020.

EKAMBARAM, Sanmuga Priya; PERUMAL, Senthamil Selvan; BALAKRISHNAN, Ajay. Scope of hydrolysable tannins as possible antimicrobial agent. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 7, p. 1035-1045, 2016.

EVTYUGIN, Dmitry D.; MAGINA, Sandra; EVTUGUIN, Dmitry V. Recent advances in the production and applications of ellagic acid and its derivatives. A review. **Molecules**, v. 25, n. 12, p. 2745, 2020.

FIDEL JR, Paul L.; VAZQUEZ, Jose A.; SOBEL, Jack D. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 1, p. 80-96, 1999.

GATTO, Larissa Junqueira *et al.* *Myrcia hatschbachii*: Antifungal activity and structural elucidation of ellagic and 3-O-methyl ellagic acids. **Natural Product Research**, v. 35, n. 23, p. 5540-5543, 2021.

GIRISH, C.; PRADHAN, Suresh Chandra. Drug development for liver diseases: focus on picroliv, ellagic acid and curcumin. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 22, n. 6, p. 623-632, 2008.

GÓMEZ-LÓPEZ, Alicia *et al.* *In vitro* evaluation of combination of terbinafine with itraconazole or amphotericin B against Zygomycota. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 45, n. 3, p. 199-202, 2003.

GONTIJO, Aline VL *et al.* Biopharmaceutical and antifungal properties of ellagic acid-cyclodextrin using an *in vitro* model of invasive candidiasis. **Future microbiology**, v. 14, n. 11, p. 957-967, 2019.

GRECO, Ines *et al.* Characterization, mechanism of action and optimization of activity of a novel peptide-peptoid hybrid against bacterial pathogens involved in canine skin infections. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 3679, 2019.

GRECO, Ines *et al.* Correlation between hemolytic activity, cytotoxicity and systemic in vivo toxicity of synthetic antimicrobial peptides. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 13206, 2020.

GULATI, Megha *et al.* *In vitro* culturing and screening of *Candida albicans* biofilms. **Current protocols in microbiology**, v. 50, n. 1, p. e60, 2018.

GULATI, Megha *et al.* Visualization of biofilm formation in *Candida albicans* using an automated microfluidic device. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 130, p. 56743, 2017.

GUO, Hongjun; ZHANG, Dongya; FU, Qingrui. Inhibition of cervical cancer by promoting IGFBP7 expression using ellagic acid from pomegranate peel. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 22, p. 4881, 2016.

HA, Kien C.; WHITE, Theodore C. Effects of azole antifungal drugs on the transition from yeast cells to hyphae in susceptible and resistant isolates of the pathogenic yeast *Candida albicans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 4, p. 763-768, 1999.

HAGIHARA, Kanako *et al.* Ellagic acid combined with tacrolimus showed synergistic cell growth inhibition in fission yeast. **Biocontrol Science**, v. 27, n. 1, p. 31-39, 2022.

HASLAM, Edwin. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of natural products**, v. 59, n. 2, p. 205-215, 1996.

HOYER, Amanda R. *et al.* Echinocandin treatment of *Candida albicans* biofilms enhances neutrophil extracellular trap formation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 9, p. 10.1128/aac. 00797-18, 2018.

HUANG, Po-Yu *et al.* Ellagic acid ameliorates renal fibrogenesis by blocking epithelial-to-mesenchymal transition. **Tzu Chi Medical Journal**, v. 36, n. 1, p. 59-66, 2024.

JACOBSEN, Ilse D.; HUBE, Bernhard. *Candida albicans* morphology: still in focus. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 15, n. 4, p. 327-330, 2017.

JENIC, Darko *et al.* Reversal of tetracycline resistance by cepharanthine, cinchonidine, ellagic acid and propyl gallate in a multi-drug resistant *Escherichia coli*. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 11, p. 345-355, 2021.

JOHNSON, Chad J. *et al.* The extracellular matrix of *Candida albicans* biofilms impairs formation of neutrophil extracellular traps. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 9, p. e1005884, 2016.

JORDÁ, Tania; PUIG, Sergi. Regulation of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genes**, v. 11, n. 7, p. 795, 2020.

KHAN, Masood Alam *et al.* Liposomal ellagic acid alleviates cyclophosphamide-induced toxicity and eliminates the systemic *Cryptococcus neoformans* infection in leukopenic mice. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 6, p. 882, 2021.

KOO, Hyun *et al.* Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 12, p. 740-755, 2017.

KUETE, Victor *et al.* Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and compounds from the stem bark of *Irvingia gabonensis* (Ixonanthaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 1, p. 54-60, 2007.

LAMOTH, Frederic *et al.* Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. suppl_1, p. i4-i13, 2018.

LAMOTH, Frederic; KONTOYIANNIS, Dimitrios P. The *Candida auris* alert: facts and perspectives. **The Journal of infectious diseases**, v. 217, n. 4, p. 516-520, 2018.

LARONE, Davise Honig; LARONE, D. H. **Medically important fungi: a guide to identification**. New York: Elsevier, 1987.

LEE, Ya-Che *et al.* Ellagic acid protects against angiotensin II-induced hypertrophic responses through ROS-mediated MAPK pathway in H9c2 cells. **Environmental Toxicology**, v. 39, n. 5, p. 3253-3263, 2024.

LEE, Yunjin *et al.* Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. **Chemical reviews**, v. 121, n. 6, p. 3390-3411, 2020.

- LEONG, Cheryl *et al.* Antifungal susceptibility testing of *Malassezia* spp. with an optimized colorimetric broth microdilution method. **Journal of clinical microbiology**, v. 55, n. 6, p. 1883-1893, 2017.
- LI, De-Dong *et al.* Potent *in vitro* synergism of fluconazole and osthole against fluconazole-resistant *Candida albicans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 8, p. 10.1128/aac. 00436-17, 2017.
- LI, Zhi-Jian *et al.* Antifungal activity of ellagic acid *in vitro* and *in vivo*. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 7, p. 1019-1025, 2015.
- LI, Zhi-Jian *et al.* Ellagic acid inhibits *Trichophyton rubrum* growth via affecting ergosterol biosynthesis and apoptotic induction. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, n. 1, p. 7305818, 2020.
- LIMA, Valéria N. *et al.* Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. **Microbial pathogenesis**, v. 99, p. 56-61, 2016.
- LIU, Guorong *et al.* Antibacterial activity and mechanism of bifidocin A against *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 73, p. 854-861, 2017.
- LIU, Manjuan *et al.* Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 325-329, 2007.
- LOHSE, Matthew B. *et al.* Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 19-31, 2018.
- LU, Hui *et al.* *Candida albicans* targets that potentially synergize with fluconazole. **Critical reviews in microbiology**, v. 47, n. 3, p. 323-337, 2021.
- MACIAS PAZ, Ignacio Uriel *et al.* *Candida albicans* el principal hongo patógeno oportunista en humanos. **Revista argentina de microbiología**, v. 55, n. 2, p. 12-12, 2023.
- MARAK, Munmun B.; DHANASHREE, Biranthabail. Antifungal susceptibility and biofilm production of *Candida* spp. isolated from clinical samples. **International journal of microbiology**, v. 2018, n. 1, p. 7495218, 2018.
- MBA, Ifeanyi Elibe; NWEZE, Emeka Innocent. Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, n. 10, p. 1797-1819, 2020.
- MORAES-NETO, Roberval Nascimento *et al.* Ethyl acetate fraction of *Bixa orellana* and its component ellagic acid exert antibacterial and anti-inflammatory properties against *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense*. **Antibiotics**, v. 11, n. 6, p. 817, 2022.
- MORAN, Gary P.; COLEMAN, David C.; SULLIVAN, Derek J. Comparative genomics and the evolution of pathogenicity in human pathogenic fungi. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 1, p. 34-42, 2011.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MROCZYŃSKA, Martyna; BRILLOWSKA-DĄBROWSKA, Anna. Review on current status of echinocandins use. **Antibiotics**, v. 9, n. 5, p. 227, 2020.

MTT Cell Proliferation Assay. Available online: <https://www.atcc.org/~media/DA5285A1F52C414E864C966FD78C9A79.ashx> (acesado em 12/04/2024).

MURPHY, Sarah E.; BICANIC, Tihana. Drug resistance and novel therapeutic approaches in invasive candidiasis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 759408, 2021.

MUTHAMIL, Subramanian *et al.* Synergistic effect of quinic acid derived from *Syzygium cumini* and undecanoic acid against *Candida* spp. biofilm and virulence. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2835, 2018.

NOCUA-BÁEZ, Laura Cristina *et al.* Azoles de antes y ahora: una revisión. **Revista chilena de infectología**, v. 37, n. 3, p. 219-230, 2020.

NYAMBA, Isaïe *et al.* Physical formulation approaches for improving aqueous solubility and bioavailability of ellagic acid: A review. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 159, p. 198-210, 2021.

OLSEN, I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 34, p. 877-886, 2015.

PALLOTTA, Francesco; VIALE, Pierluigi; BARCHIESI, Francesco. *Candida auris*: the new fungal threat. **Le Infezioni in Medicina**, v. 31, n. 3, p. 323, 2023.

PANI, Sarita *et al.* Phytocompounds curcumin, quercetin, indole-3-carbinol, and resveratrol modulate lactate–pyruvate level along with cytotoxic activity in HeLa cervical cancer cells. **Biotechnology and applied biochemistry**, v. 68, n. 6, p. 1396-1402, 2021.

PAPPAS, Peter G. *et al.* 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.

PARK, Sin-Hye *et al.* Ellagic acid, a functional food component, ameliorates functionality of reverse cholesterol transport in murine model of atherosclerosis. **Nutrition Research and Practice**, v. 18, n. 2, p. 194-209, 2024.

PEREIRA, R. *et al.* Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. **Journal of applied microbiology**, v. 131, n. 1, p. 11-22, 2021.

PERLROTH, Joshua; CHOI, Bryan; SPELLBERG, Brad. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Medical mycology**, v. 45, n. 4, p. 321-346, 2007.

PFALLER, Michael A. *et al.* Twenty years of the SENTRY antifungal surveillance program: results for *Candida* species from 1997–2016. In: **Open forum infectious diseases**. US: Oxford University Press, 2019. p. S79-S94.

POSSAMAI ROSSATTO, Fernanda Cristina *et al.* Antifungal activity of the phenolic compounds ellagic acid (EA) and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against drug-resistant *Candida auris*. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 9, p. 763, 2021.

PRASAD, Rajendra; SHAH, Abdul Haseeb; RAWAL, Manpreet Kaur. Antifungals: mechanism of action and drug resistance. **Yeast Membrane Transport**, p. 327-349, 2016.

RANG HP, DALE MM, RITTER JM, MOORE PK. Farmacologia. (6a ed.), *Guabanara*, Koogan AS. 2007.

RANGKADILOK, Nuchanart *et al.* *In vitro* antifungal activities of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed extract. **Fitoterapia**, v. 83, n. 3, p. 545-553, 2012.

RAUT, Akshay; HUY, Nguyen Tien. Rising incidence of mucormycosis in patients with COVID-19: another challenge for India amidst the second wave?. **The Lancet. Respiratory Medicine**, v. 9, n. 8, p. e77, 2021.

REVIE, Nicole M. *et al.* Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. **Current opinion in microbiology**, v. 45, p. 70-76, 2018.

ROBBINS, Nicole; CAPLAN, Tavia; COWEN, Leah E. Molecular evolution of antifungal drug resistance. **Annual review of microbiology**, v. 71, n. 1, p. 753-775, 2017.

RODRIGUES, Maria Elisa *et al.* Novel strategies to fight *Candida* species infection. **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n. 4, p. 594-606, 2016.

ROEMER, Terry; KRYSAN, Damian J. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 5, p. a019703, 2014.

ROSCETTO, Emanuela *et al.* Antifungal and anti-biofilm activity of the first cryptic antimicrobial peptide from an archaeal protein against *Candida* spp. clinical isolates. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 17570, 2018.

SAMPAIO, Aline da Graça *et al.* Ellagic acid–cyclodextrin complexes for the treatment of oral candidiasis. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 505, 2021.

SAMPAIO, Aline da Graca *et al.* *In vivo* efficacy of ellagic acid against *Candida albicans* in a *Drosophila melanogaster* infection model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 12, p. 10.1128/aac. 01716-18, 2018.

SCHWALBE, Richard; STEELE-MOORE, Lynn; GOODWIN, Avery C. **Antimicrobial susceptibility testing protocols**. Crc Press, 2007.

SELEEM, Dalia; PARDI, Vanessa; MURATA, Ramiro Mendonça. Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity *in vitro*. **Archives of oral biology**, v. 76, p. 76-83, 2017.

- SENEVIRATNE, Chaminda J. *et al.* Antifungal susceptibility in serum and virulence determinants of *Candida* bloodstream isolates from Hong Kong. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 216, 2016.
- SHARIFI-RAD, Javad *et al.* [Retracted] Ellagic Acid: A Review on Its Natural Sources, Chemical Stability, and Therapeutic Potential. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2022, n. 1, p. 3848084, 2022.
- SILVA, Bruna LR *et al.* *In silico* and *in vitro* analysis of sulforaphane anti-*Candida* activity. **Antibiotics**, v. 11, n. 12, p. 1842, 2022.
- SILVA, Sónia *et al.* *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012.
- SIRIWOHARN, T.; WROLSTAD, R. E. Polyphenolic composition of Marion and Evergreen blackberries. **Journal of food science**, v. 69, n. 4, p. FCT233-FCT240, 2004.
- SIVAKUMAR, Sivaharini; GIRIJA, AS Smiline; PRIYADHARSINI, J. Vijayashree. Evaluation of the inhibitory effect of caffeic acid and gallic acid on tetR and tetM efflux pumps mediating tetracycline resistance in *Streptococcus* sp., using computational approach. **Journal of King Saud University-Science**, v. 32, n. 1, p. 904-909, 2020.
- SOBEL, J. D.; SOBEL, R. Current treatment options for vulvovaginal candidiasis caused by azole-resistant *Candida* species. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 19, n. 9, p. 971-977, 2018.
- SOLIMAN, Sameh *et al.* Plants' natural products as alternative promising anti-*Candida* drugs. **Pharmacognosy reviews**, v. 11, n. 22, p. 104, 2017.
- SONG, Zhuan *et al.* Protective effects and mechanisms of ellagic acid on intestinal injury in piglets infected with porcine epidemic diarrhea virus. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1323866, 2024.
- SPITZER, Michaela; ROBBINS, Nicole; WRIGHT, Gerard D. Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 169-185, 2017.
- SUDBERY, Peter E. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 737-748, 2011.
- TANG, Yuanting *et al.* The changes of antifungal susceptibilities caused by the phenotypic switching of *Candida* species in 229 patients with vulvovaginal candidiasis. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 33, n. 1, p. e22644, 2019.
- TEKIN, Gülüçağ Giray; DEVECI, Buşra; DEVECI, Engin. Ellagic acid protected the gingival tissue via fibroblast and epidermal growth factors in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 39, p. e391224, 2024.
- TOMÁS-BARBERÁN, Francisco A. *et al.* Ellagic acid metabolism by human gut microbiota: consistent observation of three urolithin phenotypes in intervention trials, independent of food source, age, and health status. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 28, p. 6535-6538, 2014.

TORTORANO, Anna Maria *et al.* Candidemia: evolution of drug resistance and novel therapeutic approaches. **Infection and Drug Resistance**, p. 5543-5553, 2021.

TROFA, David; GÁCSE, Attila; NOSANCHUK, Joshua D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. **Clinical microbiology reviews**, v. 21, n. 4, p. 606-625, 2008.

TSANG, Paul Wai-Kei; BANDARA, H. M. H. N.; FONG, Wing-Ping. Purpurin suppresses *Candida albicans* biofilm formation and hyphal development. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e50866, 2012.

ULUKAYA, Engin *et al.* The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested. **Toxicology in vitro**, v. 22, n. 1, p. 232-239, 2008.

VASILYEVA, N. V. *et al.* Etiology of invasive candidosis agents in Russia: a multicenter epidemiological survey. **Frontiers of Medicine**, v. 12, p. 84-91, 2018.

VATTEM, D. A. *et al.* Antimicrobial activity against select food-borne pathogens by phenolic antioxidants enriched in cranberry pomace by solid-state bioprocessing using the food grade fungus *Rhizopus oligosporus*. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 1939-1946, 2004.

VATTEM, D. A.; SHETTY, Kalidas. Biological functionality of ellagic acid: a review. **Journal of food biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 234-266, 2005.

WANG, Jialuan *et al.* Ellagic acid from Hull Blackberries: extraction, purification, and potential anticancer activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 20, p. 15228, 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action**. World Health Organization, 2022.

YONG, Jiangyan *et al.* Synergistic effect of berberine hydrochloride and fluconazole against *Candida albicans* resistant isolates. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1498, 2020.

ZACCHINO, Susana; CECHINEL FILHO, Valdir; MARTINS, Domingos TABAJARA Oliveira. Evaluation of the antifungal activity and mode of action of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., *Lythraceae*, stem-bark extracts, fractions and.. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 3, p. 422-428, 2010.

ZAFAR, Imran *et al.* *In silico* and *in vitro* study of bioactive compounds of *Nigella sativa* for targeting neuropilins in breast cancer. **Frontiers in Chemistry**, v. 11, p. 1273149, 2023.

ZAWROTNIAK, Marcin *et al.* Aspartic proteases and major cell wall components in *Candida albicans* trigger the release of neutrophil extracellular traps. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 414, 2017.

APÊNDICE

Tratamentos utilizados durante a pesquisa com seus respectivos grupos e concentrações correspondentes (µg/mL).

Tratamentos (µg/mL)	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. albicans</i> CA 08	<i>C. albicans</i> CA 010	<i>C. albicans</i> CA 013
8X CIM AE	4000	8000	8000	8000
4X CIM AE	2000	4000	4000	4000
2X CIM AE	1000	2000	2000	2000
CIM AE	500	1000	1000	1000
CIM AE/2	125	500	500	500
CIM AE/4	62,5	250	250	250
8X CIM FLZ	16	512	512	512
4X CIM FLZ	8	256	256	256
2X CIM FLZ	4	128	128	128
CIM FLZ	2	64	64	64
CIM FLZ/2	1	32	32	32
CIM FLZ/4	0,5	16	16	16
8X CIF AE+FLZ	1000+8	500+16	1000+16	1000+16
4X CIF AE+FLZ	500+4	250+8	500+8	500+8
2X CIF AE+FLZ	250+2	125+4	250+4	250+4
CIF AE+FLZ	125+1	62,5+2	125+2	125+2
CIM AE+FLZ/2	62,5+0,5	31,25+1	62,5+1	62,5+1
CIM AE+FLZ/4	31,25+0,25	15,62+0,5	31,25+0,5	31,25+0,5