

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**CONSEQUÊNCIAS DA AQUISIÇÃO DA RESISTÊNCIA À NATAMICINA EM  
ESPÉCIES DE *Candida***

BRUNA RODRIGUES REBHAHM

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria  
Co-orientador: Prof. Dr. Andreas S. L. Mendez

Porto Alegre

Março/2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**CONSEQUÊNCIAS DA AQUISIÇÃO DA RESISTÊNCIA À NATAMICINA EM  
ESPÉCIES DE *Candida***

Bruna Rodrigues Rebhahm

Farmacêutica

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia Ambiental

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Co-orientador: Prof. Dr. Andreas S. L. Mendez

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil

Março/2017

CIP - Catalogação na Publicação

Rebhahm, Bruna Rodrigues  
Consequências da aquisição da resistência à  
natamicina em espécies de Candida / Bruna Rodrigues  
Rebhahm. -- 2017.  
69 f.

Orientador: Alexandre Meneghello Fuentefria.  
Coorientador: Andreas S. L. Mendez.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Natamicina. 2. Macrolídeos polienos. 3.  
Compostos antifúngicos. 4. Candida. 5. Resistência.  
I. Fuentefria, Alexandre Meneghello, orient. II.  
Mendez, Andreas S. L., coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

"Nada se obtém sem esforço;  
tudo se pode conseguir com ele."

Ralph Emerson

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,  
**Ana Lucia e Breno Roberto,**  
pela educação que me foi dada  
e pelo incentivo e apoio  
em todos os momentos da minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelas oportunidades que a vida me tem dado e principalmente pela minha saúde e obstinação, que me possibilita ir em busca dos meus objetivos.

Agradeço imensamente aos meus pais, Ana Lucia Rebhahm e Breno Roberto Rebhahm, que são o meu porto seguro e meus maiores exemplos. Vocês são responsáveis pelo o que sou hoje, por meio de toda a educação que me foi dada e por não medirem esforços para me proporcionarem os meios para realizar os meus sonhos profissionais. Se não fosse por vocês, certamente não seria o que sou hoje. Agradeço também a minha irmã Brenda Rebhahm pelo incentivo, amizade e pelas eventuais ajudas. Amo vocês!

Ao meu noivo Wagner Lopes, que certamente foi o meu maior incentivador a trocar a minha vida profissional pela vida acadêmica. Agradeço por todas as noites mal dormidas, na qual você entrava a madrugada acordado comigo, sempre ao meu lado, enquanto eu escrevia essa dissertação. Te amo muito! Obrigada por esse apoio incondicional, foi muito importante para mim!

De forma muito especial, agradeço ao meu orientador Prof. Alexandre Fuentefria que, em um momento difícil da minha vida profissional, repleto de frustrações, por meio de seus conselhos e por me permitir fazer parte do seu grupo de pesquisa, me possibilitou esse novo caminho que hoje me faz muito feliz. Muito obrigada por ter confiado no meu potencial, você não imagina a diferença que isso fez na minha vida. Agradeço também ao meu co-orientador, Prof. Andreas Mendez, sempre muito solícito e disposto a ajudar. Muito obrigada por tudo!

Agradeço também a todas as minhas colegas do Laboratório de Micologia Aplicada, especialmente a Vanessa Bergamo, que com toda a simpatia e disposição do mundo, me introduziu ao Laboratório de Micologia Aplicada e me ensinou muito. Muito obrigada mesmo, você é uma pessoa muita especial! Agradeço também a Bruna Pipi, por toda a ajuda dispensada, tanto na bancada quanto com o "paper". Obrigada de coração.

Aos demais professores da pós-graduação, funcionários e colegas desta instituição, muitíssimo obrigada.

Agradeço a participação dos membros da banca examinadora.

E por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

# CONSEQUÊNCIAS DA AQUISIÇÃO DA RESISTÊNCIA À NATAMICINA EM ESPÉCIES DE *Candida*

Autor: Bruna Rodrigues Rebhahm

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentesfria

Co-orientador: Prof. Dr. Andreas S. L. Mendez

## RESUMO

A natamicina é um composto antifúngico bastante utilizado na indústria alimentar, pois é seguro para o consumo e não afeta a qualidade dos alimentos. Recentemente surgiu uma preocupação em relação ao seu uso aditivo em bebidas e iogurtes, uma vez que a natamicina poderia exercer pressão seletiva e desencadear o desenvolvimento de resistência aos polienos *in vivo* na microbiota comensal do hospedeiro. Diante dessa incerteza, abordamos o possível desenvolvimento da resistência contra a natamicina. Uma seleção de 17 isolados de *Candida* spp. foi submetida a concentrações crescentes de natamicina durante um tempo prolongado. A exposição à natamicina provocou um aumento de MIC em 14 dos 17 isolados testados e o desenvolvimento de resistência à natamicina foi evidenciado em 5 destes 14 isolados. Dezesseis isolados apresentaram aumento de MIC para anfotericina B e 4 destes isolados mostraram resistência à anfotericina B. A capacidade de formação de biofilmes desses isolados também foi realizada e 3 isolados apresentaram aumento da capacidade de formação de biofilmes após indução de resistência à natamicina. Foi possível evidenciar que a resistência adquirida à natamicina foi maior em isolados que apresentavam baixa suscetibilidade antes da exposição à natamicina. Em vista dos resultados acima mencionados, ressalta-se a importância do monitoramento da natamicina aditivada nos alimentos, pois seus níveis residuais em concentrações elevadas podem exercer uma pressão seletiva sobre as espécies de *Candida* constituintes da microbiota comensal humana gastrointestinal, no que tange a sua virulência e resistência.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (69 p.) março, 2017.



# CONSEQUENCES OF ACQUIRED NATAMYCIN RESISTANCE IN *Candida* spp. ISOLATES

Author: Bruna Rodrigues Rebhahm

Advisor: Prof. Dr. Alexandre Meneghelo Fuentefria

Co-Advisor: Prof. Dr. Andreas S. L. Mendez

## ABSTRACT

Natamycin is a antifungal compound used in the food industry because it is safe for consumption and has no effect on quality of foods. Recently a concern has arisen over its additive use in beverages and yogurts since natamycin could exert selective pressure and trigger the development of polyene resistance in vivo in the commensal microbiota of host. In view of this uncertainty, we address the possible development of resistance against the natamycin. A selection of 17 isolates of *Candida* spp. was subjected to increasing concentrations of natamycin for prolonged time. The natamycin-exposure caused an increase of M.I.C. in 14 out of 17 tested isolates and the development of natamycin resistance was evidenced in 5 of these 14 isolates. Sixteen isolates showed increased of M.I.C to amphotericin B and 4 of these isolates showed resistance to amphotericin B. The biofilm forming capacity of the isolates also was performed and 3 isolates presented increasing the capacity to form biofilms after induction of natamycin resistance. It was possible to show that acquired natamycin resistance was increased in isolates that showed low susceptibility before natamycin exposure. In view of the aforementioned results, the importance of the monitoring of natamycin in food is highlighted, since its residual levels in high concentrations may exert a selective pressure on *Candida* species constituting the gastrointestinal human commensal microbiota, in relation to its virulence and resistance.

<sup>1</sup>Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (69 p.) march, 2017.

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	3
2.1 Objetivo Geral .....	3
2.2 Objetivos específicos .....	3
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	4
3.1 O gênero <i>Candida</i> .....	4
3.1.1 Aspectos Gerais .....	4
3.1.2 <i>Candida albicans</i> .....	5
3.1.3 <i>Candida não-albicans</i> .....	8
3.1.4 <i>Candida tropicalis</i> .....	9
3.1.5 <i>Candida parapsilosis</i> .....	9
3.1.6 <i>Candida krusei</i> .....	10
3.1.7 <i>Candida guilliermondii</i> .....	11
3.1.8 <i>Candida lusitaniae</i> .....	12
3.2 O gênero <i>Candida</i> e os alimentos .....	12
3.3 Biofilmes fúngicos .....	15
3.4 Antifúngicos Polienos.....	16
3.4.1 Anfotericina B.....	17
3.4.2 Natamicina .....	19
3.5 Natamicina como conservante de alimentos .....	21
3.6 Resistência antifúngica .....	23
3.6.1 Resistência aos Poliênicos.....	25
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
4.1 Local da Realização da Pesquisa .....	29
4.2 Seleção das cepas leveduriformes.....	29
4.3 Teste de Suscetibilidade aos Agentes Antifúngicos .....	30
4.3.1 Preparação do Inóculo Fúngico.....	30
4.3.2 Microdiluição em Caldo .....	30
4.3.3 Leitura e Interpretação dos Resultados .....	31
4.4 Indução da Resistência a Natamicina e Avaliação da sua Estabilidade ....	31

4.5 Avaliação da Resistência Cruzada .....	32
4.6 Detecção do biofilme.....	32
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
5.1 Desenvolvimento e Estabilidade da Resistência .....	34
5.2 Resistência Cruzada .....	35
5.3 Detecção do Biofilme .....	37
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>46</b>
<b>8. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>47</b>
<b>9. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>48</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Isolados selecionados para a realização do estudo.....	29-30
TABELA 2. <i>Breakpoints</i> para definição do fenótipo de suscetibilidade dos isolados para os antifúngicos testados.....	31
TABELA 3. Critérios de avaliação da formação de biofilme pelo método do cristal violeta, segundo a faixa de absorbância.....	33
TABELA 4. Valores de concentração inibitória mínima (CIM), em µg/mL, da natamicina, fenótipo e alterações macromorfológicas ( <i>Phenotypic switching</i> ) de isolados de <i>C. albicans</i> (CA), <i>C. krusei</i> (CK), <i>C. tropicalis</i> (CT), <i>C. parapsilosis</i> (CP), <i>C. guilliermondii</i> (CG) e <i>C. lusitaniae</i> (CL) antes e após a indução da resistência com exposição a concentrações crescentes de natamicina e após subcultivo em meio isento de antifúngico por 30 dias.....	35
TABELA 5. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL, e o fenótipo da anfotericina B dos isolados de <i>C. albicans</i> (CA), <i>C. krusei</i> (CK), <i>C. tropicalis</i> (CT), <i>C. parapsilosis</i> (CP), <i>C. guilliermondii</i> (CG) e <i>C. lusitaniae</i> (CL) selvagens e após a indução da resistência a natamicina.....	39
TABELA 6. Valores da detecção do biofilme dos isolados de <i>C. albicans</i> (CA), <i>C. krusei</i> (CK), <i>C. tropicalis</i> (CT), <i>C. parapsilosis</i> (CP), <i>C. guilliermondii</i> (CG) and <i>C. lusitaniae</i> (CL), antes e após a indução da resistência, com exposição a concentrações crescentes de natamicina.....	40

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrutura química da anfotericina B.....	17
FIGURA 2. Estrutura química da natamicina.....	19
FIGURA 3. Alterações macromorfológicas ( <i>Phenotypic switching</i> ) de isolados de <i>C. tropicalis</i> ATCC 750 (CT), <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 (CP1) e RL27m (CP2) e <i>C. guilliermondii</i> CGU01 (CG1) e CGU02 (CG2) antes (S) e após a indução da resistência (R), com exposição a concentrações crescentes de natamicina.....	37-38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

PATH Alliance: *Prospective Antifungal Therapy Alliance*

DNA: ácido desoxirribonucleico

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLSI: *Clinical Laboratory Standards Institute*

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

ERG: *Ergosterol Biosynthetic Enzymes*

SDA: Ágar Sabouraud Dextrose

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

TSB: Caldo de Triptose de Soja

## 1. INTRODUÇÃO

Doenças transmitidas por alimentos são a maior preocupação para os consumidores, para a indústria de alimentos e para as autoridades de segurança alimentar (Gyawalli et al., 2014). Nos últimos anos, existe um aumento na demanda por produtos naturais para conservar os alimentos e esses bioconservantes podem ser obtidos de diversas fontes, incluindo plantas, bactérias, algas e fungos. Muitos produtos, já utilizados comercialmente, são estritamente metabólitos microbianos que atuam inibindo o crescimento de outros microrganismos, como é o caso das bacteriocinas e da natamicina (Juneja et al., 2012; Gyawali et al., 2014).

As leveduras do gênero *Candida* podem contaminar os alimentos por diversos meios, como as mãos de manipuladores, além da ineficiência de processos de pasteurização, ocasionando a deterioração e a alta contagem de patógenos oportunistas nesses alimentos (Spanamberg et al., 2009; Stelato et al., 2010). Em relação aos derivados lácteos, a contaminação do leite por leveduras pode afetar o produto final por meio de alterações organolépticas, como mudanças no sabor e textura dos produtos, que ocorre pela produção de enzimas lipolíticas e proteolíticas. Quanto ao aspecto sanitário, o leite ingerido *in natura*, assim como os produtos lácteos produzidos a partir destes leites, podem possibilitar a veiculação de outros agentes potencialmente patogênicos que se oportunizam do estado de deterioração (Spanamberg et al., 2009).

Devido a sua natureza oportunista, as espécies de *Candida* não causam infecções a menos que o equilíbrio da microbiota normal ou a imunidade celular do hospedeiro seja perturbada (Delaloye & Calandra, 2014). Essa relação oportunista com o homem e animais permite a expressão dos fatores de virulência das espécies de *Candida*, ocasionando a invasão das mucosas ou da corrente circulatória, levando a processos infecciosos superficiais ou sistêmicos, podendo muitas vezes serem fatais (Miceli et al., 2011).

A resistência antifúngica é considerada um importante problema de saúde pública (Clark e Hajjeh, 2002, Tobudic et al., 2012) e é definida como um processo baseado na seleção natural de fungos com maior capacidade de sobreviver e crescer na presença de agentes antifúngicos (Campoy & Adrio, 2016). Além disso, a formação de biofilmes é muitas vezes considerada a razão pela qual o tratamento

antifúngico falha (Acker et al., 2014). Os biofilmes são comunidades microbianas altamente estruturadas que são aderidas à superfícies e / ou ligadas umas as outras, contidas em uma matriz extracelular protetora (Ramage et al., 2005).

A Natamicina, também conhecida como Pimaricina, é um composto antifúngico natural produzido pelo *Streptomyces natalensis*. Pertencente a classe dos macrolídeos poliênicos, exibe amplo espectro de ação e forte atividade antifúngica, atuando contra leveduras e fungos filamentosos tais como *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Cephalosporium* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. Seu alvo molecular é o ergosterol, componente essencial da membrana fúngica, onde a natamicina se liga irreversivelmente. Tem se tornado um dos principais antifúngicos utilizados na indústria de alimentos, pois apresenta várias características que a tornam o antifúngico ideal na preservação de alimentos e bebidas, pois é segura para o consumo e não altera a qualidade dos alimentos. Por estas razões, e devido a sua baixa toxicidade, ela tem se tornado um dos principais antifúngicos utilizados na indústria de alimentos (Juneja et al., 2012; Dalhoff et al., 2015; Qiu et al., 2015; Aparício et al., 2016).

Entretanto, surgiu uma recente preocupação em relação ao seu uso aditivo em bebidas e iogurtes, pois as *Candida* spp. gastrointestinais estariam expostas a altas concentrações da droga, exercendo uma pressão seletiva, o que poderia disparar o desenvolvimento de resistência aos polienos (Dalhoff et al., 2015).

Em vista deste panorama, o controle no crescimento de leveduras torna-se cada vez mais relevante, uma vez que a prevenção destes contaminantes evita a degradação do produto e a alteração das características organolépticas dos mesmos. Além disso, nos últimos anos surgiu uma maior preocupação com a possível seleção de cepas microbianas endógenas (constituintes da microbiota) mais resistentes, devido à excessiva exposição a antimicrobianos presentes em alimentos. No entanto, o estudo da seleção de leveduras potencialmente patogênicas e resistentes aos convencionais conservantes antifúngicos vem sendo pouco explorado. Neste sentido, este estudo objetivou esclarecer essa questão, simulando *in vitro* a aquisição de resistência a natamicina em isolados de *Candida* spp. submetidos a crescentes concentrações deste antifúngico, além de avaliar a resistência cruzada frente a anfotericina B.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de aquisição da resistência a natamicina e o aumento da virulência em espécies de *Candida* tipicamente encontradas em produtos lácteos.

### 2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Avaliar a susceptibilidade *in vitro* de isolados de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* frente à natamicina.

2.2.2 Avaliar a capacidade de aquisição da resistência desses isolados a concentrações crescentes de natamicina.

2.2.3 Avaliar a resistência cruzada entre a classe dos polienos.

2.2.4 Avaliar a capacidade de formação de biofilme dos isolados que adquiriram resistência à natamicina.

2.2.5 Avaliar as alterações fenotípicas observadas nos isolados resistentes e associar com o perfil de resistência constatado *in vitro* e *in vivo*.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 O gênero *Candida*

##### 3.1.1 Aspectos Gerais

O gênero *Candida* (*Saccharomycetales*) pertence a divisão *Ascomycota*, na qual também pertencem a maioria dos fungos patogênicos (Guarro, 2012). Compreende aproximadamente 200 espécies e é o maior gênero de leveduras de importância clínica (Brandt & Lockhart, 2012; Martins et al., 2014).

As espécies de *Candida* existem como comensais no trato gastrointestinal e no trato genital, além de serem parte da microbiota comensal que compõe a pele de hospedeiros saudáveis (Miceli et al., 2011; Delaloye & Calandra, 2014). A colonização por estas leveduras é benéfica para o hospedeiro, pois limita o crescimento de outros fungos patogênicos oportunistas e também promove a constante ativação da imunidade celular (Martins et al., 2014). Embora as espécies de *Candida* sejam parte da microbiota comensal dos seres humanos, elas também são patógenos oportunistas que possuem a capacidade de causar infecções superficiais e sistêmicas (Miceli et al., 2011), pois apresentam a propensão de invadir e causar doenças quando um desequilíbrio é criado em seu nicho ecológico ou a resposta de defesa imunitária do hospedeiro seja alterada (Miceli et al., 2011; Delaloye & Calandra, 2014). Dessa forma, os dois principais fatores que predisõem as infecções por *Candida* spp. são a colonização da pele e membranas mucosas por essas leveduras e a alteração das barreiras naturais do hospedeiro (feridas, cirurgias, inserção de cateteres intravasculares e urinários) (Méan et al., 2008).

Pelo menos 15 espécies de *Candida* são reconhecidas como causas de infecção humana, e a lista continua aumentando (Brandt & Lockhart, 2012). As espécies envolvidas em casos de infecção são: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. pelliculosa*, *C. kefyr*, *C. lipolytica*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. rugosa* e *C. norvegensis* (Yapar, 2014; Martins et al., 2014).

A frequência de infecções por *Candida* spp. aumentou nos últimos anos, em grande parte devido ao aumento da população com imunocomprometimento grave (Sanguinetti et al., 2015). A epidemia de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), transplante de órgãos, câncer, quimioterapia e fatores iatrogênicos

têm contribuído para o aumento de uma população extremamente vulnerável a infecções fúngicas (Sanguinetti et al., 2015; Criseo et al., 2015). Para estabelecer a infecção fúngica, as leveduras oportunistas têm de evadir-se da resposta imune, sobreviver e reproduzir-se no ambiente do hospedeiro e, no caso de infecção sistêmica, disseminar-se para novos tecidos e órgãos (Silva et al., 2011). A fonte predominante de infecção invasiva por *Candida* spp. é endógena e inclui a mucosa superficial e a proliferação cutânea até a disseminação hematogena. Raros casos de transmissão exógena foram descritos devido a soluções ou materiais contaminados e transmissão pelos trabalhadores de saúde aos pacientes e entres pacientes (Bassetti et al., 2010).

O evento primário na infecção por *Candida* spp. é a adesão às superfícies do hospedeiro, necessária para a colonização inicial. A adesão contribui para a persistência do organismo dentro do hospedeiro e é considerada essencial no estabelecimento da doença. Além disso, as espécies de *Candida* também podem aderir às superfícies de dispositivos médicos e formar biofilmes (Silva et al., 2011).

Durante as últimas décadas, a maioria dos hospitais relatou uma mudança importante e progressiva na etiologia da candidíase invasiva em diferentes grupos de pacientes e em ambientes hospitalares distintos, embora as razões desta mudança não sejam completamente compreendidas (Quindós, 2014). Especula-se que esta mudança seja multifatorial e que o principal motivo seja a resistência dessas espécies a agentes antifúngicos, que são utilizados durante períodos longos durante a internação, seguido da crescente popularidade dos cateteres venosos (Negri et al., 2012; Yapar, 2014). No entanto, *C. albicans* continua a ser a espécie predominante na maioria dos estudos, embora as espécies de *Candida* não-*albicans* e outras leveduras raras emergiram como importantes patógenos oportunistas (Miceli et al., 2011; Quindós, 2014).

### **3.1.2 *Candida albicans***

A espécie *C. albicans* continua sendo o principal patógeno deste grupo de leveduras (Brandt & Lockhart, 2012; Martins et al., 2014), responsável por 34,3% dos casos de candidemia no Brasil (Doi et al., 2016). É um fungo polimórfico que pode alternar facilmente entre as formas de levedura, pseudo-hifa e hifa (Richardson

& Moyes, 2015; Dühning et al., 2015). Seu crescimento leveduriforme é associado com colonização, enquanto seu crescimento em forma de pseudo-hifa ou hifa é relacionado com infecções (Richardson & Moyes, 2015). No entanto, tem sido proposto que ambas as formas de crescimento são importantes para a patogenicidade (Mayer et al., 2013). A forma de hifa mostrou ser mais invasiva do que a forma de levedura, porém acredita-se que a forma de levedura represente a forma primariamente envolvida na disseminação (Mayer et al., 2013). Essa transição entre as formas de crescimento de leveduras e hifas é denominada dimorfismo (Mayer et al., 2013).

*C. albicans* pode crescer, se proliferar e coexistir dentro do hospedeiro humano por um longo tempo, sem causar sintomas de doenças (Dühning et al., 2015). Estima-se que a *C. albicans* e, em menor grau, outras espécies de *Candida* estejam presentes na cavidade oral de até 75% da população (Mayer et al., 2013). Geralmente coloniza a pele, orofaringe, trato respiratório inferior, trato gastrointestinal e sistema geniturinário de pessoas saudáveis, embora seja capaz de causar problemas, principalmente infecções vaginais em mulheres, ainda que existam evidências de sua ação probiótica como, por exemplo, a proteção da microbiota vaginal (Martins et al., 2014; Yapar, 2014; Dühning et al., 2015).

A homeostase entre *C. albicans* e o hospedeiro humano é mantida pelo sistema imune e pela microbiota bacteriana normal presente nas mucosas e nas camadas epiteliais (Dühning et al., 2015). A relação entre portar o fungo e desenvolver uma infecção potencialmente fatal provém de dois fatores importantes: a presença ou a ausência de uma resposta imune eficaz e a capacidade do fungo em alterar a sua morfologia (Richardson & Moyes, 2015).

A capacidade de *C. albicans* infectar o hospedeiro é suportada por uma ampla gama de fatores de virulência que incluem: a transição morfológica entre as formas de levedura e hifa, a expressão de adesinas e invasinas na superfície celular, a comutação fenotípica e a secreção de enzimas hidrolíticas (Mayer et al., 2013). Um outro fator de virulência importante é sua capacidade de formar biofilmes em catéteres e dentaduras (superfícies abióticas) e em superfícies de células mucosas (superfícies bióticas) que são os substratos mais comuns. Devido à detecção de *quorum sensing*, altas densidades celulares ( $>10^7$  células  $\text{ml}^{-1}$ ) promovem o crescimento de levedura, enquanto densidades celulares menores ( $<10^7$  células  $\text{ml}^{-1}$ )

favorecem a formação de hifas. Em pHs baixos (<6) as células de *C. albicans* crescem predominantemente na forma de levedura, enquanto em um pH elevado (> 7) o crescimento de hifas é induzido (Mayer et al., 2013).

Existem dois tipos de infecções por *C. albicans* em seres humanos: as infecções superficiais e as infecções sistêmicas (Zheng et al., 2015; Dühring et al., 2015). As infecções superficiais compreendem as infecções de mucosas, como a candidíase vaginal e a candidíase oral (Dühring et al., 2015). As candidíases vaginais afetam 75% das mulheres pelo menos uma vez ao longo da vida e 40-50% destas experimentam pelo menos um episódio adicional da infecção. Além disso, 10% dos casos apresentam candidíase vaginal recorrente (Mayer et al., 2013; Poulain, 2015). Em relação a candidíase oral, são predominantemente causadas por *C. albicans* e podem afetar a orofaringe e / ou o esófago de pessoas com disfunções do sistema imune adaptativo. O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um importante fator de risco para o desenvolvimento de candidíase oral, além do uso de dentaduras e extremos de idade (Mayer et al., 2013). Estima-se que a candidíase orofaríngea ocorra em 90% dos pacientes infectados pelo HIV (Poulain, 2015). As infecções sistêmicas dizem respeito as candidíases invasivas e candidemias, as quais representam risco de vida (Zheng et al., 2015). Os pacientes em risco de candidíase invasiva são geralmente aqueles que recebem tratamentos intensivos como, por exemplo, pacientes da oncologia, neonatologia, pediatria, geriatria, internados em unidades de tratamento intensivo (UTI) e pós-cirúrgicos (Poulain, 2015). Nestes pacientes, uma combinação da doença de base juntamente com os procedimentos médico-cirúrgicos realizados para tratá-la favorecem o desenvolvimento da levedura como um patógeno (Poulain, 2015). As taxas de mortalidade giram em torno de 40%, em pacientes imunocomprometidos e aqueles que recebem terapias imunossupressoras (Richardson & Moyes, 2015).

Nas infecções por *C. albicans* tem sido frequentemente observada uma evolução para formas crônicas, gerando infecções complicadas, como septicemia, endocardite, meningite e peritonite, especialmente em pacientes com imunidade reduzida ou recebendo antibióticos (Martins et al., 2014). Sugere-se que *C. albicans* seja a espécie mais patogênica e investigações *in vitro* indicam que ela também expressa níveis mais elevados de virulência em relação a outras espécies (Silva et al., 2011).

### 3.1.3 *Candida não-albicans*

Nas duas últimas décadas, espécies de *Candida* conhecidas como *Candida não-albicans*, emergiram como patógenos oportunistas importantes dos seres humanos (Silva et al., 2011; Delaloye & Calandra, 2014; Sanguinetti et al., 2015). Dentre essas espécies as mais comuns no Brasil são: *C. parapsilosis* ou *C. tropicalis*, seguido por *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. pelliculosa* (Doi et al., 2016). As espécies mais raras relatadas em casos de candidíase invasiva incluem *C. lusitaniae*, *C. famata* e *C. guilliermondii* (Doi et al., 2016). As razões para isso podem estar relacionadas com métodos diagnósticos melhorados ou práticas médicas alteradas (Silva et al., 2011). Essas espécies são responsáveis por até 50% de todos os casos em alguns centros e juntamente com *C. albicans*, respondem por mais de 90% dos casos de candidíase invasiva (Delaloye & Calandra, 2014; Sanguinetti et al., 2015). As espécies de *Candida* mais comuns podem ser classificadas conforme a sua virulência de maneira decrescente: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii* (Arendrup, 2010).

Um estudo, realizado entre 2004 a 2008, analisou a epidemiologia de Candidíase invasiva causada apenas por espécies de *Candida não-albicans* em pacientes inscritos no PATH Alliance (*Prospective Antifungal Therapy Alliance*) que é uma rede de vigilância sentinela composta por 23 centros médicos nos EUA e dois no Canadá. Um total de 2.496 pacientes infectados por espécies de *Candida não-albicans* foram identificados. As espécies identificadas foram *C. glabrata* (46,4%), *C. parapsilosis* (24,7%), *C. tropicalis* (13,9%), *C. krusei* (5,5%), *C. lusitaniae* (1,6%), *C. dubliniensis* (1,5% ) e *C. guilliermondii* (0,4%). Desses, 2.385 (95,6%) foram infectados com uma única espécie e 111 (4,4%) foram infectados com duas ou mais espécies. A maioria dos casos foram isolados a partir do sangue (86,0%), seguido pelo abdômen (16,0%), pulmão (1,4%), esqueleto e pele / tecidos moles (1,4%), sistema nervoso central (0,8%), coração (0,6%), mucosa brônquica (0,5%), olhos (0,2%), sinusite (0,1%), e outros locais (1,2%). Outras espécies foram identificadas no Registro PATH Alliance, dentre as quais: *C. kefyr*, *C. famata*, *C. fermentati* e *C. rugosa* (Pfaller et al., 2014).

### 3.1.4 *Candida tropicalis*

A espécie *C. tropicalis* está entre as três espécies de *Candida* não-*albicans* mais isoladas ao redor do mundo (Miceli et al., 2011; Mohammadi et al., 2013; Klingspor et al., 2015; Ng et al., 2015; Motoa et al., 2016). Além disso, tem sido reconhecida como causa crescente de infecções sanguíneas fora dos Estados Unidos, particularmente na América do Sul e na Ásia (Brandt & Lockhart, 2012; Sanguinetti et al., 2015). As razões para sua alta prevalência em certas regiões geográficas do mundo não são claras (Brandt & Lockhart, 2012). *Candida tropicalis* tem sido isolada em pacientes com malignidades, doenças hematológicas e neutropenia e dessa forma, os casos expressivos de candidemia por *C. tropicalis* em pacientes com idade superior a 70 anos pode estar relacionada ao aumento da frequência de tumores sólidos e neoplasias malignas hematológicas nessa faixa etária (Silva et al., 2011; Quindós, 2014). Os fatores de risco identificados incluem: leucemia aguda, quimioterapia antineoplásica, neutropenia, profilaxia prévia com cetoconazol e inserção de cateter (Krcmery & Barnes, 2002).

Em relação à virulência e à patogenicidade, dados de modelos animais sugerem que *C. tropicalis* seja pelo menos tão virulenta quanto *C. albicans* (Krcmery & Barnes, 2002). Dados epidemiológicos mostraram que *C. tropicalis* está associada à alta mortalidade comparado a outras espécies de *Candida* e esse fato pode estar relacionado aos fatores de virulência expressos pela espécie, como formação de biofilme, secreção de proteinases e dimorfismo (Silva et al., 2011). Além disso, *C. tropicalis* parece apresentar maior propensão de disseminação no hospedeiro neutropênico do que *C. albicans* e outras espécies de *Candida* não-*albicans* (Yapar, 2014). Esta propensão pode explicar a mortalidade relativamente elevada associada a *C. tropicalis*, que parece ser ainda maior em pacientes com câncer. Ainda, *C. tropicalis* e *C. krusei* são as principais causas de infecções fúngicas invasivas em pacientes submetidos a transplante de medula óssea ou de células estaminais e em pacientes com doença hematológica maligna (Miceli et al., 2011; Yapar, 2014).

### 3.1.5 *Candida parapsilosis*

*C. parapsilosis* é considerada um patógeno fúngico emergente, uma vez que está cada vez mais associado a uma ampla gama de infecções, tais como candidemia, vaginite, endocardite, endoftalmite, artrite séptica e peritonite (Nosek et

al., 2009). É considerado um potencial patógeno oportunista em neonatos, receptores de transplantes, pacientes que recebem nutrição parenteral, pacientes em uso de cateter venoso central e pacientes com câncer (Silva et al., 2011). Entretanto, casos de candidemia por *C. parapsilosis* tem uma menor taxa de mortalidade (4%) em comparação com as espécies *C. albicans* e *C. glabrata* (Silva et al., 2011).

Pode ser isolada a partir de diversas fontes ambientais como o solo, água fresca, água marinha e insetos (Nosek et al., 2009). Além disso, é um dos fungos mais frequentemente isolados de mãos humanas e o segundo mais isolado de locais normalmente estéreis em pacientes hospitalizados (Silva et al., 2011).

Nos últimos anos, tipagens genotípicas revelaram que os isolados considerados *C. parapsilosis* são genotípicamente heterogêneos, constituídos portanto de um complexo de três espécies denominado *Candida parapsilosis lato sensu*, o qual compreende as espécies *Candida parapsilosis sensu stricto*, identificada como a espécie predominante do complexo, *Candida orthosilopsis* e *Candida metapsilosis*, que juntas representam cerca de 10% dos isolados. Métodos comumente utilizados em laboratórios de microbiologia não são capazes de diferenciar as espécies do complexo, uma vez que as três espécies têm as mesmas características morfológicas e o mesmo perfil bioquímico, sendo necessário o uso de ferramentas moleculares na discriminação destas espécies (Nosek et al., 2009; Tapia & Correa, 2015).

### **3.1.6 *Candida krusei***

A espécie *C. krusei* é a menos estudada, comparada as outras espécies de *Candida* (Turner & Butler, 2014), porém tem sido considerada a quinta causa mais comum de candidemias, na maioria das infecções documentadas (Brandt & Lockhart, 2012). Segundo Pfaller et al. (2008), *C. krusei* é a quinta entre vinte e duas espécies diferentes de *Candida*, representando 2,5% de todos os isolados (Pfaller et al., 2008). Apresenta frequência relativamente baixa em todas as regiões geográficas (Sanguinetti et al., 2015), principalmente nas regiões da Ásia-Pacífico e na América Latina, enquanto que nos países do Leste Europeu, uma maior



frequência de isolamento foi observada, demonstrando significativa diversidade geográfica (Pfaller et al., 2008).

É bem conhecida por sua resistência intrínseca ao fluconazol, com uma taxa de resistência global de 78,3%, e sua reduzida suscetibilidade a anfotericina B (Brandt & Lockhart, 2012; Sanguinetti et al., 2015). Sua aplicação industrial e seu potencial biotecnológico têm sido estudados, principalmente devido a sua presença em alimentos, como queijos, além de seu potencial na produção de enzimas e outros biocompostos, bem como o possível uso na biorremediação de compostos químicos. Entretanto, sua natureza patogênica limita estes estudos (Yadav et al., 2012). Um fator de risco importante para infecções por *C. krusei* são as leucemias, sendo associada também a cirurgia abdominal recente, tumores sólidos, pacientes idosos (> 65 anos), neutropênicos e pacientes tratados com corticóides (Yadav et al., 2012; Quindós, 2014). Pode causar infecções fatais, particularmente em pacientes com câncer e imunocomprometidos (Yadav et al., 2012).

### **3.1.7 *Candida guilliermondii***

A *C. guilliermondii* é amplamente distribuída na natureza e frequentemente isolada do solo, plantas, água do mar e alimentos processados, além de ser uma parte da microbiota comensal humana na pele e superfícies mucosas. Alguns estudos epidemiológicos apontam baixas prevalências de *C. guilliermondii* (em torno de 1%) em infecções nosocomiais (Ece et al., 2012; Alburquerque et al., 2013; Pu et al., 2015). No entanto, estudos realizados no Brasil apresentaram prevalências maiores, entre 6 a 7% dos isolados de *Candida* spp., representando a 4° e a 5° espécie mais isoladas nestes estudos (Storti et al., 2012; Neufeld et al., 2015) Outro estudo realizado na China, verificou que a espécie *C. guilliermondii* foi a 3° mais isolada em casos de candidemia, representando 16,4% dos isolados (Wu et al., 2014).

É uma espécie considerada "tolerante aos poliênicos" pois é capaz de desenvolver resistência secundária à anfotericina B após o uso excessivo na profilaxia ou tratamento empírico, levando a seleção de leveduras menos suscetíveis (Krcmery & Barnes, 2002).

Sangue, pele, unhas, tecidos moles e (com menor frequência) amostras de urina e do trato genital representam as amostras das quais este fungo costuma ser isolado (Savini et al., 2010). Não foram descritos fatores de risco específicos para *C. guilliermondii*, porém parece afetar pacientes com câncer, internados em UTI e pacientes pós-cirúrgicos. Infecções profundas e sistêmicas ocorrem em hospedeiros comprometidos e freqüentemente resultam em desfecho desfavorável, com óbitos ocorrendo principalmente em pacientes com neoplasias malignas (Savini et al., 2010).

### **3.1.8 *Candida lusitaniae***

*Candida lusitaniae* é considerada uma espécie emergente de *Candida* não-*albicans*, apresentando um crescente surgimento em pacientes hospitalizados (Krcmery & Barnes, 2002; Savini et al., 2010), a qual representa 0,7% dos casos de candidemia no Brasil (Doi et al., 2016). Assim como *C. guilliermondii*, é uma espécie considerada "tolerante aos poliênicos" (Krcmery & Barnes, 2002).

Os fatores de risco para o desenvolvimento de uma infecção oportunista por *C. lusitaniae* incluem transplante de medula óssea e altas doses de medicações citostáticas. Outros fatores podem ser associados a oportunismo por esta espécie como, a intensidade da quimioterapia, o uso de antibióticos de amplo espectro e a epidemiologia local. Casos de candidemia costumam ocorrer em pacientes com doença maligna, principalmente neoplasias hematológicas ou submetidos a transplante de medula óssea (Krcmery & Barnes, 2002).

## **3.2 O gênero *Candida* e os alimentos**

Espécies do gênero *Candida*, incluindo espécies patogênicas oportunistas de *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans*, têm sido isoladas frequentemente no leite *in natura* e em produtos lácteos, como consequência da manipulação dos insumos sem a devida higienização das mãos pelos produtores de leite e queijos (Lima et al., 2009; El-Sharoud et al., 2009). Além disso, esse tipo de contaminação também pode originar-se através de utensílios contaminados que possam ter entrado em contato com esses produtos, sendo assim, consideradas contaminantes

do processo produtivo (Facchin et al., 2013). Espécies deste gênero também tem sido isoladas do leite de vacas acometidas por mastite fúngica e isso pode ocorrer em razão do uso prévio de antibióticos intramamários (Crawshaw et al., 2005). Contudo, Gaudie et al. (2009) indicou a presença de leveduras patogênicas de *C. krusei* ligadas a mastite micótica em rebanho leiteiro, sem uso de terapia antimicrobiana prévia.

Um estudo realizado na província de Heilongjiang, nordeste da China, avaliou 412 casos de mastite clínica em vacas leiteiras, entre julho de 2007 a novembro de 2010 (Zhou et al., 2013). Um total de 478 microrganismos aeróbios foram isolados do leite destas vacas e dentre estes, as leveduras representaram 35,6% dos isolados, contabilizando 170 espécies fúngicas. Dentre essas espécies, 79,4% pertenceram ao gênero *Candida*. Dentre as 135 cepas isoladas do gênero *Candida*, a prevalência de distribuição das espécies se dispuseram da seguinte forma: *C. krusei* (37%), *C. rugosa* (11,9%), *C. lusitaniae* (11,1%), *C. tropicalis* (10,4%), *C. albicans* (7,4%), *C. lipolytica* (6,7%), *C. stellatoidea* (4,4%), *C. guilliermondii* (4,4%), *C. zeylanoides* (3,0%), *C. utilis* (3,0%), *C. catenulata* (2,2%), *C. kefir* (2,2%), e outras *Candida* spp. (3,7%) (Zhou et al., 2013).

Wanderley et al. (2013) também verificou o predomínio da espécie *C. krusei* em amostras de queijo artesanal produzidas a partir de leite de vaca *in natura*. Quarenta e cinco amostras de queijo artesanal foram analisadas e um total de 251 isolados de *Candida* spp. foram obtidos. Destes isolados, 79,3% foram identificadas como *C. krusei*, 12,3% como *C. glabrata*, 6,0% como *C. tropicalis* e 2,4% como *C. albicans*. Também foram isoladas cepas de *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. dubliniensis*, *C. kefir* e *C. lusitaniae* (Wanderley et al., 2013).

Outro estudo também avaliou 66 amostras de leite coletadas de 44 vacas com mastite clínica ou subclínica em pequenas propriedades no norte da Polônia ou perto de Varsóvia. No entanto, este estudo verificou o predomínio de *C. parapsilosis* ao invés de *C. krusei*, como nos estudos anteriores. Cinquenta e cinco isolados pertencentes ao gênero *Candida* foram isolados a partir destas amostras de leite e incluem: *C. parapsilosis* (25), *C. krusei* (15), *C. lusitaniae* (5), *C. famata* (5), *C. guilliermondii* (3), *C. tropicalis* (1) e *C. albicans* (1). Esta alta diversidade encontrada pode sugerir grandes propriedades adaptativas ambientais das espécies de *Candida* (Dworecka-Kaszak et al., 2012).

Delavenne et al. (2011) investigou a diversidade fúngica em amostras de leite *in natura*, não apenas em leite de vaca, mas também em leites de cabra e ovelha e verificou a presença do gênero *Candida*, incluindo a espécie patogênica *C. parapsilosis* nas amostras de leite provenientes de cabras e ovelhas (Delavenne et al., 2011). Corroborando com este estudo, Banjara et al. (2015) avaliou diversos tipos de queijo adquiridos no varejo em Nebraska (EUA), entre 2012 e 2013 e *C. parapsilosis* foi isolada de queijos do tipo suíço, queijo azul, e também do queijo Cheddar de leite de cabra. Essa espécie tem sido considerada uma levedura deteriorante de grande importância na indústria láctea, visto que produz enzimas lipolíticas e proteolíticas (Banjara et al., 2015).

Maroszyńska et al. (2013) avaliou 18 cepas do gênero *Candida* de origem alimentar quanto à sensibilidade a quatro antifúngicos. *Candida lusitanae* e *C. krusei* representaram o maior número de isolados alimentares. No entanto, *C. albicans* e *C. glabrata* comumente isolados em humanos, não foram encontradas em alimentos. Os resultados do teste de sensibilidade aos antifúngicos mostraram que um grupo de isolados expressaram sensibilidade intermediária ou resistência aos antifúngicos testados. Dessa forma, não se exclui a possibilidade da circulação de cepas resistentes a antifúngicos fora do ambiente hospitalar e a ocorrência de infecções fúngicas através dos alimentos (Maroszyńska et al., 2013), visto que as leveduras presentes nos alimentos podem ser uma fonte subestimada de infecções e outros problemas de saúde nos seres humanos (Fleet, 2007).

Diariamente, os humanos acabam ingerindo populações de leveduras sem impacto na saúde, já que esses fungos não costumam estarem relacionados a surtos de gastroenterite alimentar, intoxicações ou outras infecções. Porém, é necessário ter cautela pois, o crescimento excessivo de leveduras no trato gastrointestinal, geralmente associado ao uso de terapia antimicrobiana, imunocomprometimento e outras doenças de base, pode contribuir para o desenvolvimento de distúrbios gastrointestinais ou até mesmo reações alérgicas e de hipersensibilidade (Fleet & Balia, 2006; Fleet, 2007).

Além do risco potencial para a saúde, muitas espécies de leveduras são capazes de crescer e deteriorar uma grande variedade de alimentos, incluindo leite e produtos lácteos, como queijos (Narvhus & Gadaga, 2003; Smits & Brul, 2005). A deterioração desses produtos causa graves perdas econômicas pois, o crescimento

dessas leveduras leva a produção de gás, alteração de sabor e aromas e mudanças na coloração e texturas dos alimentos (Narvhus & Gadaga, 2003).

### 3.3 Biofilmes fúngicos

Biofilmes são comunidades complexas de microrganismos altamente estruturadas e hidratadas, que estão ligadas a uma superfície e / ou ligadas uma a outra, contidos em uma matriz extracelular protetora auto-produzida (Ramage et al. 2005; Ramage et al., 2009; Sandai et al., 2016; Sheppard & Howell, 2016). Essa matriz extracelular é composta de proteínas, DNA extracelular, lípidos, monossacarídeos e polissacarídeos (Sheppard & Howell, 2016). Canais de água facilitam a difusão de nutrientes do meio ambiente para as camadas mais baixas da biomassa e permitem que os resíduos sejam eliminados (Sandai et al., 2016).

O crescimento em biofilme é o principal modo de vida microbiana e estima-se que 80% de todos os microrganismos vivam como células sésseis no ambiente, permitindo a sobrevivência em ambientes hostis (Bonhomme & d'Enfert, 2013). Os biofilmes podem se formar no ambiente natural, bem como dentro do hospedeiro humano. As vantagens em relação a produção de biofilmes para os microrganismos incluem a proteção do ambiente, a proteção contra o sistema imunitário do hospedeiro, a proteção contra os agentes antimicrobianos, a resistência física e química das células, a metabolização e uma regulação comunitária da expressão genética (Ramage et al., 2009; Sandai et al., 2016).

Nas últimas duas décadas, o aumento no uso de dispositivos médicos implantáveis levou a um aumento na taxa de infecções por *Candida* spp. A formação de biofilmes nestes dispositivos, na qual as células fúngicas se encontram encapsuladas e agregadas, se apresentam mais tolerantes aos agentes antifúngicos quando comparadas às células fúngicas livres (Sandai et al., 2016).

Entre os patógenos fúngicos de seres humanos, *C. albicans* é a espécie mais frequentemente associada a formação de biofilmes, particularmente em implantes médicos, impactando significativamente no prognóstico clínico. Além disso, *C. albicans* forma biofilmes morfológicamente complexos, pois são compostos de leveduras, pseudo-hifas e hifas (Bonhomme & d'Enfert, 2013).

O primeiro passo na formação de biofilmes é a adesão das células planctônicas (células livres) a um substrato, tal como uma superfície de célula epitelial ou um cateter intravascular. Após a adesão, os biofilmes de *C. albicans* sofrem maturação, através da reprodução de células de levedura, e a substituição das leveduras por hifas filamentosas e pseudo-hifas. Os biofilmes maduros podem sofrer uma fase de dispersão na qual os microrganismos mudam a sua morfologia, ou seja, voltam a forma de levedura e são liberados para o ambiente (Sheppard & Howell, 2016).

### 3.4 Antifúngicos Polienos

Os macrolídeos polienos constituem uma grande classe de antifúngicos produzidos principalmente por *Streptomyces*, uma classe de bactérias filamentosas (Aparicio et al., 2004; Caffrey et al., 2016). Considerada uma das principais classes de agentes antifúngicos, utilizados principalmente no tratamento de micoses invasivas, na qual envolvem risco de vida (Pierce et al., 2013). O primeiro membro da classe chamava-se fungicidina, sendo renomeado posteriormente para nistatina (Gupte et al., 2002). A descoberta e a introdução dos polienos na década de 1950, em especial a anfotericina B, possibilitou o tratamento de diversas infecções fúngicas, sendo considerada "padrão ouro" por décadas (Pierce et al., 2013). Desde então, mais de 200 membros diferentes desta classe foram descritos (Gupte et al., 2002; Madden et al., 2014), porém apenas anfotericina B, nistatina e natamicina vêm sendo utilizadas (Zotchev, 2003).

Por pertencerem ao grupo de antibióticos macrolídeos, estes apresentam um anel lactona macrocíclico hidroxilado contendo normalmente um açúcar, além da presença de um cromóforo formado por um sistema de três a sete duplas ligações conjugadas no anel macrolactona (Aparicio et al., 2004; Belakhov & Garabadzhiu, 2015).

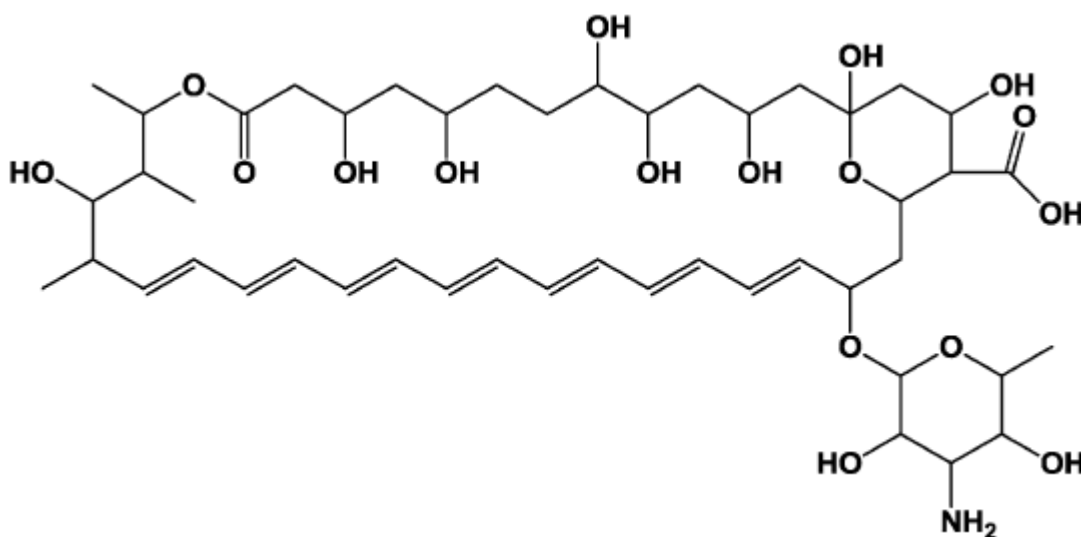
O mecanismo a respeito da interação entre os polienos e as células fúngicas ocorre através da ligação do antifúngico ao ergosterol, que é o principal esterol da membrana citoplasmática, tornando a célula fúngica permeável a íons e a outras moléculas, levando a morte celular (Pierce et al., 2013; Paramythiotou et al., 2014). Esse efeito se dá principalmente pela perda de fosfato inorgânico, pequenas

moléculas e íons monovalentes, incluindo os íons de  $K^+$  e  $Na^+$ , através desses canais (Zotchev, 2003; Aparicio et al., 2004).

Apesar disso, os macrolídeos polienos são tóxicos e podem causar efeitos adversos graves como nefrotoxicidade e tromboflebite, especialmente quando da administração intravenosa (Pierce et al., 2013; Jensen, 2016). É provável que uma ligação mais fraca entre os polienos e o colesterol seja responsável por essa toxicidade, havendo uma reação cruzada com o colesterol humano, estruturalmente semelhante ao ergosterol (Caffrey et al., 2016).

Os polienos apresentam forte atividade antifúngica, atuando contra leveduras, fungos filamentosos e dimórficos, porém a maioria dos dados disponíveis dizem respeito principalmente à anfotericina B (Paramythiotou et al., 2014).

### 3.4.1 Anfotericina B



**FIGURA 1.** Estrutura química da anfotericina B.

Adaptado de Bhatta et al. (2011).

A anfotericina B, que pertence ao grupo de antifúngicos macrolídeos polienos, é um antifúngico de amplo espectro que tem sido usado como terapia padrão no tratamento de muitas infecções fúngicas invasivas, desde sua introdução na prática clínica em 1958 (Baginski et al., 2005; Aguirre & Hamid, 2015; Nett & Andes, 2016). Apresenta potente atividade antifúngica, mas está associado com toxicidade renal significativa e reações de infusão (Nett & Andes, 2016). A incidência de nefrotoxicidade varia muito, porém estima-se que uma diminuição significativa na função renal ocorra em mais de 80% dos pacientes e está associada a maiores

taxas de mortalidade, maiores custos e tempo de internação hospitalar (Aguirre & Hamid, 2015). Apesar da sua toxicidade e devido à falta de outras alternativas, a anfotericina B ainda é considerada de extrema importância no tratamento de infecções que impõem risco de vida (Baginski et al., 2005). Outros efeitos adversos incluem insuficiência renal, anormalidades eletrolíticas, toxicidade renal e hepatotoxicidade (Nett & Andes, 2016).

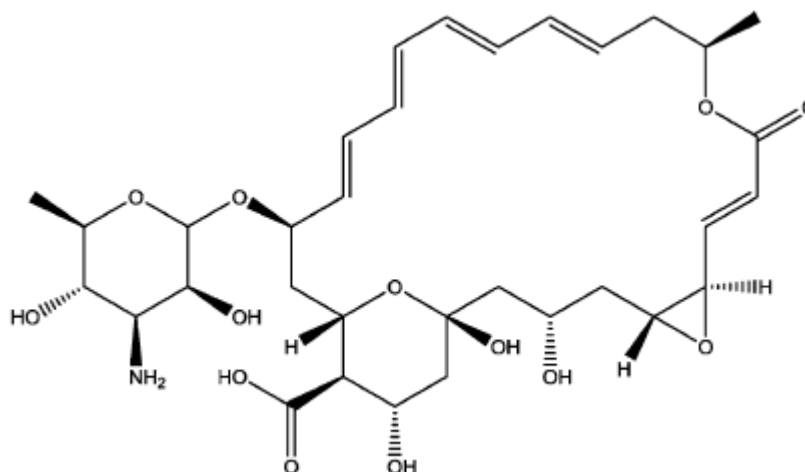
Além da toxicidade, a anfotericina B exibe diversas características positivas, incluindo uma elevada atividade antifúngica, atuando contra leveduras e fungos filamentosos, amplo espectro antifúngico, atividade fungicida e rara indução de resistência fúngica (Baginski et al., 2005; Nett & Andes, 2016). Foi o primeiro antifúngico desenvolvido e aprovado para o tratamento de muitas infecções fúngicas invasivas, incluindo candidíase, aspergilose, criptococose, blastomicose, histoplasmose, mucormicose e esporotricose. Entretanto, devido a sua solubilidade limitada e a baixa biodisponibilidade oral, todas as formulações são parenterais (Nett & Andes, 2016).

A anfotericina B exerce a sua atividade através da ligação ao ergosterol da membrana celular (Nett & Andes, 2016), formando canais trans-membranosos que perturbam a função de barreira da membrana. Os canais são responsáveis pelo efluxo de cátions, como o  $K^+$ , levando à morte celular (Baginski et al., 2005).

A anfotericina B está disponível na formulação de desoxicolato, que é a original, e em formulações lipídicas. As formulações lipídicas, em comparação com a formulação original, apresentam efeitos secundários melhorados em relação a nefrotoxicidade (Nett & Andes, 2016).



### 3.4.2 Natamicina



**FIGURA 2.** Estrutura química da natamicina.  
Adaptado de Bhatta et al. (2011).

A Natamicina, também conhecida como Pimaricina, é um composto antifúngico natural produzido por fermentação aeróbica pelo *Streptomyces natalensis*, bactéria filamentosa que habita o solo (EFSA, 2009; Juneja et al., 2012; Aparício et al., 2016). Seu nome provém da região sul-africana de Natal, local onde Vasco da Gama desembarcou em 25 de dezembro 1497, e onde a primeira cepa de *Streptomyces natalensis* foi isolada. Além desta, outras cepas como *S. gilvosporeus*, *S. lydicus* e *S. chatanoogensis* também foram identificadas como produtoras de natamicina (Aparício et al., 2016).

Pertence a classe dos macrolídeos poliênicos e apresenta atividade fungicida, exibindo amplo espectro de ação e forte atividade antifúngica, sendo seguro e eficaz em concentrações muito baixas (Juneja et al., 2012; TNO, 2012; Dalhoff et al., 2015; Aparício et al., 2016). Seu núcleo estrutural é um anel macrolactona de 26 membros com quatro ligações duplas conjugadas (cromóforo) (Aparício et al., 2016). Apresenta atividade *in vitro* contra leveduras e fungos filamentosos tais como *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Cephalosporium* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. (Dalhoff et al., 2015; Aparício et al., 2016).

Seu alvo molecular é o ergosterol, componente essencial da membrana fúngica, ao qual a natamicina se liga irreversivelmente (Juneja et al., 2012; Qiu et al., 2015; Aparício et al., 2016). Por esta razão, a natamicina não é eficaz contra as bactérias, visto que as membranas bacterianas não contêm esteróis (Juneja et al., 2012; Dalhoff et al., 2015; Aparício et al., 2016). Além disso, a única forma do fungo

inibir sua ação seria mudar os esteróis de suas membranas, o que torna a resistência microbiana um pouco mais difícil (Aparício et al., 2016).

Ao contrário de outros polienos, a natamicina não parece formar complexos de ruptura de membrana e sua ação deve estar relacionada com a alteração do funcionamento normal do ergosterol nas membranas fúngicas (Aparício et al., 2016). Além disso, diferentemente de outros polienos que formam poros na membrana, o modo de ação da natamicina permanece obscuro, porém não inclui a formação de poros e a permeabilização da membrana (Welscher et al., 2012). Segundo Welscher et al. (2008), a natamicina leva a inibição do crescimento e morte da célula fúngica através de ligação específica ao ergosterol, porém sem permeabilização da membrana plasmática. Isso se dá, provavelmente devido a inibição de importantes funções do esterol, devido a essa ligação ao ergosterol, o impedindo de executar seus efeitos funcionais (Welscher et al., 2008).

Outro estudo concluiu que a natamicina inibe o estágio de iniciação da fusão vacuolar através da interação específica com ergosterol. Este resultado sugere um novo modo de ação da natamicina, que envolve a degradação da fusão da membrana através da perturbação das reações de iniciação dependentes do ergosterol que precedem a fusão da membrana e podem apontar para um efeito da natamicina sobre a função de proteínas dependentes de ergosterol. Além disso, a base da toxicidade da natamicina poderia ser essa inibição dos processos de fusão e fissão (Welscher et al., 2010). Este mesmo autor, em estudo posterior, verificou que a ligação da natamicina ao ergosterol tem um forte efeito sobre a expressão de um subconjunto de proteínas da membrana plasmática. Em detrimento disso, a natamicina inibe o crescimento de leveduras e fungos filamentosos através da inibição do transporte de aminoácidos e glicose através da membrana plasmática (Welscher et al., 2012).

Além disso, tem sido associada a ativação da resposta imune desencadeando a ativação de interleucina-1 $\beta$ . O mecanismo de ativação depende da indução do efluxo de potássio das células, bem como sobre a desestabilização do lisossoma dependente de fagocitose. Isto sugere que, além de inibir o crescimento fúngico diretamente, também pode suprimir o crescimento fúngico indiretamente, através da ativação da defesa inata do hospedeiro (Aparício et al., 2016).

A natamicina é utilizada na clínica como um agente tópico no tratamento de infecções superficiais. Entretanto, é considerado muito importante no tratamento de micoses oftálmicas, como a ceratite fúngica, que é relativamente comum em climas quentes e em países em desenvolvimento. Atualmente, é considerado o fármaco mais eficaz contra *Fusarium* e *Aspergillus*, além de atuar no tratamento de ceratites produzidas por protozoários que apresentam ergosterol em suas membranas, como a *Acanthamoeba* (Aparício et al., 2016).

### **3.5 Natamicina como conservante de alimentos**

A Natamicina tem se tornado um dos principais antifúngicos utilizados na indústria de alimentos, visto que apresenta várias características que a tornam o antifúngico ideal na preservação de alimentos e bebidas. É segura para o consumo, eficaz em baixas concentrações (entre 1 mg/kg - 10 mg/kg), não altera a qualidade dos alimentos e apresenta baixa toxicidade (EFSA, 2009; Juneja et al., 2012; Dalhoff et al., 2015; Aparício et al., 2016).

É utilizada há mais de 40 anos, principalmente na superfície de queijos e produtos cárneos curados (Juneja et al., 2012; Aparício et al., 2016). Mesmo que a superfície destes produtos não seja removida, a exposição dietética estimada à natamicina é dez vezes menor do que o nível de ingestão diária aceitável (0,3 mg/kg de peso corporal por dia) definido pelo Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Portanto, o tratamento superficial de queijos e produtos cárneos curados pode ser considerado seguro para uso humano (Dalhoff et al., 2015; WHO/JEFCA, 2002). Além disso, quando aplicada na superfície dos alimentos, não afeta as suas propriedades organolépticas, como sabor, textura e cor (Juneja et al., 2012; Aparício et al., 2016).

Pode ser utilizada também em iogurtes e outros produtos lácteos, bem como para prolongar a vida de prateleira de diferentes frutas, vegetais, saladas, produtos de panificação, molhos, peixes e aves. Da mesma forma, também é utilizada em sucos, cervejas, vinhos, sidras e chás gelados, dependendo das resoluções de cada país (Dalhoff et al., 2015; Aparício et al., 2016). É aprovada como conservante alimentar pela União Européia, pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e por 70 países (US EPA, 2016). Entretanto, as resoluções a respeito

da utilização da natamicina em alimentos variam de um país para o outro (Aparício et al., 2016).

No Brasil, por exemplo, a Resolução CNS/MS nº 04, de 24 de novembro de 1988, aprovou o uso da natamicina apenas nas crostas de queijos, no limite máximo permitido de 2 mg/100cm<sup>2</sup>, não havendo migração para a parte comestível do queijo (Brasil, 1988). Mais recentemente, a Resolução RDC nº 28, de 23 de fevereiro de 2001, aprovou a extensão de uso da natamicina como conservador, para tratamento de superfícies de produtos cárneos embutidos no limite máximo de 1 mg/dm<sup>2</sup>, com ausência em 5 mm de profundidade (Brasil, 2001).

Além disso, como as membranas bacterianas não contêm esteróis, a natamicina não é ativa contra bactérias, tornando-se então um conservante antifúngico ideal durante os processos de maturação bacteriana e fermentação dos alimentos (Juneja et al., 2012; Aparício et al., 2016).

Sua segurança tem sido amplamente avaliada por autoridades de segurança alimentar, incluindo a United States Food and Drug Administration (US FDA), European Food Safety Authority (EFSA), World Health Organization Joint Expert Committee on Food Additives (WHO/JEFCA) e pela U.S. Environmental Protection Agency (US EPA), entre outras (WHO/JEFCA, 2002; EFSA, 2009; US FDA, 2016; US EPA, 2016).

Apesar de ser considerada segura para o uso humano no tratamento da superfície de queijos e embutidos cárneos, recentemente surgiu uma preocupação em relação ao seu uso como aditivo em bebidas e iogurtes, pois a microbiota gastrointestinal estaria exposta à natamicina, que poderia exercer pressão seletiva e o consequente desenvolvimento de resistência aos antifúngicos polienos. O uso de formulações mais solúveis poderiam elevar esse risco em relação a eficácia dos polienos, pois o aumento da solubilidade poderia aumentar sua taxa de dissolução e a sua biodisponibilidade, resultando em uma pressão seletiva ainda maior. A quantidade total de natamicina consumida com bebidas ou iogurtes é depositada nas fezes e, por ela não se ligar à matéria fecal, é antifúngicamente ativa. Dessa forma, as *Candida* spp. intestinais estariam expostas a altas concentrações de natamicina o que poderia disparar o desenvolvimento e a propagação de resistência aos polienos, incluindo a possível resistência a anfotericina B, que é utilizada para

tratamento de infecções graves, colocando pessoas imunocomprometidas em risco (Dalhoff et al., 2015).

### **3.6 Resistência antifúngica**

Diversas espécies fúngicas não são afetadas por agentes antifúngicos, independente da concentração administrada (Sanglard, 2016). Essa ausência de atividade antifúngica é denominada resistência e é definida como um processo baseado na seleção natural de fungos com a capacidade aumentada de sobreviver e crescer na presença de antifúngicos (Campoy & Adrio, 2016). O uso excessivo desses antifúngicos acaba propiciando à seleção de subpopulações de células resistentes e ocorre mais facilmente em pacientes com um sistema imunológico enfraquecido (Kołaczkowska & Kołaczkowski, 2016). O estado imunológico do hospedeiro é importante, pois o sistema imunológico deve trabalhar em conjunto com drogas antifúngicas para controlar uma infecção. A disfunção imune grave resulta em pacientes menos responsivos ao tratamento, uma vez que a carga microbiana é maior e a droga deve combater a infecção sem suporte imunológico (Perlin et al., 2015).

O surgimento de microorganismos resistentes aos antifúngicos é um retrocesso inevitável, no que diz respeito a exposição às drogas antifúngicas. A resistência é induzida através da pressão seletiva exercida por essas drogas, o que elimina microrganismos sensíveis, permitindo a sobrevivência de microrganismos mais resistentes, o que é altamente indesejável e pode contribuir na falha do tratamento (Jensen, 2016). O desenvolvimento da resistência antifúngica é um processo complexo envolvendo o hospedeiro, a droga e os fatores microbianos, que juntos contribuem para a falha terapêutica (Perlin et al., 2015).

A evolução da resistência contra agentes antifúngicos é onipresente na natureza e os microrganismos desenvolvem várias estratégias para combater a ação dessas drogas (Campoy & Adrio, 2016). A resistência, quando apresentada por uma espécie que nunca foi pré-exposta ao fármaco, é conhecida como resistência intrínseca (Sanglard, 2016; Kołaczkowska & Kołaczkowski, 2016). Contudo, a resistência antifúngica também pode ser adquirida pela exposição a droga durante o tratamento médico, o que leva a falência terapêutica (Sanglard, 2016; Kołaczkowska

& Kołaczkowski, 2016). A resistência antifúngica adquirida tem sido relatada praticamente para todos os agentes antifúngicos existentes e para os principais patógenos fúngicos (Sanglard, 2016).

Antifúngicos podem apresentar resistência cruzada a um grupo de antifúngicos da mesma classe, bem como a representantes de classes não estruturalmente relacionadas. A resistência múltipla também pode surgir em resposta a abordagens terapêuticas em que dois ou mais antifúngicos com diferentes mecanismos de ação são administrados sequencialmente ou em combinação (Kołaczowska & Kołaczkowski, 2016).

Para neutralizar os efeitos fungicidas ou fungistáticos dos antifúngicos, os microrganismos desenvolveram três mecanismos principais de resistência: a diminuição da concentração efetiva do fármaco, alterações no alvo do fármaco e modificações metabólicas para desviar os efeitos tóxicos exercidos por alguns antifúngicos (Sanglard, 2016; Campoy & Adrio, 2016; Kołaczowska & Kołaczkowski, 2016). Estes mecanismos estão ligados a processos que permitem a proteção da integridade celular e são coordenados com vias de sinalização de resposta ao estresse. A adaptação ao estresse promove a evolução e manutenção da resistência clínica aos fármacos (Kołaczowska & Kołaczkowski, 2016).

Além disso, a formação de biofilmes é muitas vezes considerada à razão pela qual o tratamento com antifúngicos falha e estima-se que 65-80% de todas as infecções são relacionadas a formação de biofilmes. Vários mecanismos estão envolvidos com a resistência do biofilme, incluindo a penetração lenta do agente antimicrobiano através do biofilme e a presença de uma população de células extremamente persistentes, que podem tolerar certos agentes antimicrobianos (Acker et al., 2014).

A resistência antifúngica pode ser verificada por meio do teste de susceptibilidade antifúngica, o qual prevê o potencial terapêutico e o espectro de atividade dos fármacos pesquisados, através da concentração inibitória mínima (CIM) (Sanglard, 2016; Albatineh et al., 2016). Esse teste pode ser de valor, pois os valores elevados da CIM estão associados a prognósticos desfavoráveis e ao avanço das infecções, uma vez que a resistência microbiológica pode ser preditiva da resistência clínica (Sanglard, 2016; Albatineh et al., 2016). Dessa forma, o teste fornece uma estimativa da potência *in vitro* de um antifúngico contra os

microrganismos de interesse, e os resultados podem ser correlacionados com a atividade *in vivo*, prevendo o resultado da terapia (Albatineh et al., 2016). A falha clínica pode ocorrer, não apenas em razão da resistência, mas também devido a uma função imune prejudicada, baixa biodisponibilidade ou o metabolismo acelerado do antifúngico administrado (Loeffler & Stevens, 2003).

Atualmente são utilizados dois protocolos principais, originados de subcomitês de testes de susceptibilidade antifúngica, chamados: CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) e EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) (Delarze & Sanglard, 2015; Sanglard, 2016). Além dos métodos estabelecidos pelo CLSI e EUCAST, existem testes comerciais disponíveis, que incluem o Etest (bioMérieux), que é considerado um método sensível e confiável para detectar a susceptibilidade diminuída à anfotericina B entre os isolados de *Candida* spp., e o Vitek 2 (bioMérieux), que é um teste totalmente automatizado. A detecção de resistência pode ser a função mais importante destes testes de suscetibilidade a antifúngicos, pois o uso de fármacos aos quais o organismo infeccioso se apresenta resistente são mais suscetíveis de resultar em falha clínica (Albatineh et al., 2016).

### **3.6.1 Resistência aos Poliênicos**

O polieno mais utilizado é a anfotericina B e, em comparação com outros fármacos, é considerada refratária ao desenvolvimento de resistência (Kołaczkowska & Kołaczkowski, 2016). Apesar dos quase 50 anos de uso na clínica médica, relatos de resistência a anfotericina B são escassos (Kołaczkowska & Kołaczkowski, 2016; Loeffler & Stevens, 2003). Isso se deve, em parte, a sua baixa solubilidade e a toxicidade ao hospedeiro, que limitam seu uso por longos períodos (Shapiro et al., 2011). Resistência primária a anfotericina B foi verificada em alguns isolados de *C. lusitanae*, *C. lipolytica* e *C. guilliermondii*, enquanto a resistência secundária tem sido verificada ocasionalmente em *Candida* spp. (Shapiro et al., 2011).

Os mecanismos de resistência propostos aos polienos, incluem a diminuição do acesso ao fármaco devido redução no conteúdo de ergosterol na membrana (Pfaller, 2012), acumulação de outros esteróis e o aumento da atividade da catalase, levando a uma redução do dano oxidativo (Pfaller, 2012). Membranas

de isolados de *C. tropicalis* com baixa susceptibilidade à anfotericina B apresentaram pouca quantidade de ergosterol, enquanto que em *C. albicans*, a depleção do ergosterol levou ao acúmulo de diferentes esteróis como o C-14-metil esterol ou de lanosterol (Kołaczkowska & Kołaczkowski, 2016).

Entretanto, apesar da deficiência na biossíntese do ergosterol, os isolados podem ser menos competitivos do que os isolados do tipo selvagem, em condições encontradas no hospedeiro. Como resultado da perda de função do ERG3 em mutantes específicos, o ergosterol está ausente nas membranas celulares e isso leva a uma menor afinidade da anfotericina B em relação a membrana plasmática, provavelmente devido a falta de local para ligação (Loeffler & Stevens, 2003; Sanglard, 2016). Deste modo, os mutantes escapam ao efeito tóxico de anfotericina B, que normalmente atua como uma "esponja" em relação ao ergosterol, desestabilizando rapidamente as funções da membrana. Outras mutações na via da biossíntese do ergosterol (ERG6, ERG24 e ERG2) apresentam o mesmo efeito e também um efeito compensatório (Sanglard, 2016).

Os polienos induzem estresse oxidativo e dessa forma, as células fúngicas e isolados resistentes podem ter níveis mais elevados de enzimas antioxidantes e / ou alterações na produção de radicais livres (Cuenca-Estrella, 2013). Além disso, a anfotericina B induziu ao acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio. As células de *C. tropicalis* resistentes à anfotericina B apresentaram atividade mitocondrial alterada e produziram significativamente menos espécies reativas de oxigênio. Um regulador chave das respostas de estresse celular, a chaperona Hsp90, também tem sido implicada em respostas à anfotericina B (Shapiro et al., 2011). Ela regula a estabilidade e a função de diversas proteínas e controla as respostas ao estresse através da estabilização da proteína fosfatase calcineurina. A sinalização de calcineurina-Crz1 influencia uma ampla gama de funções de resposta celular, incluindo homeostase iônica e biogênese da parede celular (Perlin et al., 2015). Entretanto, não está claro se estes efeitos resultam diretamente da depleção do ergosterol, que pode afetar a composição e a função da membrana mitocondrial, ou de outros eventos intracelulares induzidos pela anfotericina B (Kołaczkowska & Kołaczkowski, 2016).

Muitas infecções fúngicas são tratadas com diferentes classes de agentes antifúngicos, incluindo azóis e polienos. A resistência a múltiplas drogas, entre estas



duas classes de fármacos, poderia ser mediada por mutações genômicas diferentes. Entretanto, foi relatado que está relacionada somente com mutações de perda de função em ERG3 . Tais mutações foram relatadas em *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Outros defeitos genéticos de ERG podem também conferir resistência a múltiplas drogas, tais como a mutação de perda de função em ERG2 observada em *C. albicans*. Contudo, alguns isolados apresentam mutações simultâneas em vários genes como uma causa desse tipo de resistência (Sanglard, 2016). Isso foi relatado em *C. tropicalis* por perturbação na função de ERG3 e ERG11(Eddouzi et al., 2013), e em *C. albicans* por mutações em ERG11 e ERG5. Entretanto, a associação de resistência a mais de duas classes de fármacos não é uma observação frequente em isolados clínicos (Sanglard, 2016; Campoy & Adrio, 2016).

Jensen et al. (2015), caracterizou os mecanismos moleculares em isolados de *C. albicans* apresentando resistência a múltiplas drogas. O seqüenciamento dos genes revelou uma mutação heterozigótica em ERG2 e os isolados resistentes a anfotericina B apresentaram depleção do ergosterol, exibindo ergosta-8-enol, ergosta-8,22-dienol, ergosta-5,8,22-trienol e fecosterol, bem como outros poucos esteróis, demonstrando que *C. albicans* apresenta uma capacidade diversificada de adaptação à exposição aos antifúngicos (Jensen et al., 2015).

Outra causa de resistência a anfotericina B pode ser uma alteração no conteúdo de  $\beta$ -1,3-glucanos na parede celular fúngica. Estes componentes, que aumentam a estabilidade da parede celular, influenciam o acesso de grandes moléculas como a anfotericina B à membrana plasmática (Loeffler & Stevens, 2003).

Há relatos do isolamento de leveduras resistentes a anfotericina B em pacientes com malignidades. Entretanto, se o tratamento com quimioterapia imunossupressora pode ser responsável pela resistência ao polienos, ainda precisa ser esclarecido (Loeffler & Stevens, 2003).

Além disso, outro mecanismo que reduz a concentração efetiva de fármaco em alguns fungos clinicamente relevantes é a capacidade de formação de biofilme, que está associada a resistência a vários fármacos, incluindo polienos. Curiosamente, dados recentes mostraram que a matriz participa desse processo por sua capacidade de sequestrar agentes antifúngicos. Esse processo foi sugerido para anfotericina B em *C. albicans* (Sanglard, 2016; Campoy & Adrio, 2016).

Somente a anfotericina B e as equinocandinas demonstram atividade *in vitro* consistente contra biofilmes de *C. albicans*. No entanto, mesmo com estes dois antifúngicos, infecções por *Candida* spp. envolvendo biofilmes são extremamente difíceis, se não impossíveis de erradicar (Campoy & Adrio, 2016). Contudo, um estudo avaliou a capacidade da anfotericina B em controlar e combater os biofilmes de *C. tropicalis* e verificou que o fármaco é incapaz de prevenir a formação de biofilmes e erradicar os biofilmes pré-formados, além de desencadear a produção de proteínas e carboidratos, resultando em um aumento da matriz do biofilme e assim contribuindo para a resistência de *C. tropicalis* à anfotericina B (Fernandes et al., 2015).

Nos últimos anos surgiu uma maior preocupação com a possível seleção de cepas microbianas endógenas (constituintes da microbiota) mais resistentes, devido à excessiva exposição a antimicrobianos presentes em alimentos. Dessa forma, o presente estudo objetivou simular a aquisição de resistência a natamicina *in vitro* em isolados de *Candida* spp. submetidos a crescentes concentrações deste antifúngico, além de avaliar a resistência cruzada frente a anfotericina B.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Local da Realização da Pesquisa

Os ensaios e avaliações microbiológicas foram realizados nas dependências do Laboratório de Micologia Aplicada, na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

### 4.2 Seleção das cepas leveduriformes

Para a realização do estudo, foram selecionadas três cepas de seis espécies de *Candida*, incluindo uma cepa ATCC (exceto para a espécie *C. guilliermondii* e *C. lusitanae*). As espécies selecionadas estão apresentadas na Tabela 1. Os isolados pertencem à coleção de fungos do laboratório de Micologia Aplicada da UFRGS. Todos foram identificados fenotipicamente através do sistema automatizado *Vitek Yeast Biochemical Card* (bioMérieux Vitek, Hazelwood, Mo.). Os isolados permaneceram armazenados em geladeira cultivados em ágar Sabouraud dextrose (SDA; Himedia).

**TABELA 1.** Isolados selecionados para a realização do estudo.

Espécie	Código	Origem Da Cepa
<i>Candida tropicalis</i>	ATCC750	ATCC
	72P	Isolado Clínico
	CT56	Fiocruz
<i>Candida krusei</i>	ATCC6258	ATCC
	CK03	PNCq
	RL52	Fungemia
<i>Candida albicans</i>	ATCC18804	ATCC
	CA01	PNCq
	DEB05	Candidúria
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC22019	ATCC
	RL27m	Indução Resistência
	RL20	Ponta de catéter
<i>Candida lusitanae</i>	RL21	Hemocultura
	RL28	Hemocultura
	RL30	Hemocultura
<i>Candida guilliermondii</i>	CGU01	Fiocruz
	CGU02	Catéter

### **4.3 Teste de Suscetibilidade aos Agentes Antifúngicos**

Foram realizados testes de suscetibilidade aos agentes antifúngicos, natamicina e anfotericina B, para confirmar a sensibilidade ou resistência para todos os isolados. As CIMs foram determinadas pela técnica da microdiluição em caldo de acordo com as normas de padronização publicadas no documento M27-A3 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) levando em consideração as atualizações do documento M27-S4 (Quarto Suplemento Informativo, 2012).

#### **4.3.1 Preparação do Inóculo Fúngico**

Para preparação do inóculo foram realizados subcultivos dos isolados em SDA e incubados a 35 °C por 24 h. A seguir as células foram suspensas em solução salina 0,85% estéril e ajustadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 530 nm, a fim de se obter transmitância equivalente ao tubo 0,5 na escala de McFarland ( $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células/mL). A partir desta suspensão, uma suspensão de trabalho foi preparada fazendo-se uma diluição 1:50 seguida de uma diluição 1:20 em caldo Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640), resultando em concentração 0,5 a  $2,5 \times 10^3$  células/mL (CLSI, 2008).

#### **4.3.2 Microdiluição em Caldo**

A microdiluição em caldo foi realizada em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços (dispostos em 12 colunas e 8 linhas). As soluções de antifúngicos duas vezes mais concentradas foram depositadas na primeira coluna da microplaca e microdiluições seriadas em caldo RPMI 1640 foram realizadas até a décima coluna; totalizando 100 µL de 10 concentrações teste para cada agente antifúngico. Volumes de 100 µL de cada inóculo fúngico foram depositados nos poços já contendo igual volume do respectivo agente antifúngico. Na coluna 11 foi feito controle positivo de crescimento fúngico; na coluna 12, controle negativo, foi pipetado apenas meio RPMI 1640 servindo como controle de esterilidade do ensaio. Os testes foram realizados em triplicatas e incubados a 35 °C por 48 h, para

posterior leitura e determinação da CIM (CLSI, 2008). A faixa de concentração para natamicina testada foi de 1 µg/mL a 512 µg/mL e para anfotericina B foi de 0,031 µg/mL a 16 µg/mL.

#### 4.3.3 Leitura e Interpretação dos Resultados

A leitura para determinação da CIM foi realizada visualmente. As CIMs para a anfotericina B (CLSI, 2008) e natamicina foram consideradas como sendo as menores concentrações que promoveram 100% de inibição (Sav et al., 2016). Os critérios de definição de suscetibilidade foram estabelecidos conforme estudos anteriores (Lalitha et al., 2008; Pradhan et al., 2011; Moralez et al., 2014). Todos os *breakpoints* utilizados neste trabalho estão demonstrados na Tabela 2.

**TABELA 2.** *Breakpoints* para definição do fenótipo de suscetibilidade dos isolados para os antifúngicos testados.

Antifúngicos	S	R
AnfB <sup>a</sup>	< 1 µg/mL	> 1 µg/mL
NAT <sup>b</sup>	≤ 16 µg/mL	> 16 µg/mL

AnfB: anfotericina; B NAT: natamicina; S: sensível; R: resistente.

<sup>a</sup> Adaptado de CLSI (2008) e Moralez et al. (2014).

<sup>b</sup> Adaptado de Lalitha et al. (2008) e Pradhan et al. (2011).

#### 4.4 Indução da Resistência a Natamicina e Avaliação da sua Estabilidade

Para investigar a capacidade dos isolados de desenvolverem resistência a natamicina, os isolados foram expostos a concentrações crescentes desse agente antifúngico.

Seguindo a técnica desenvolvida por Fekete-Forgacs et al. (2000), e aperfeiçoada por Pippi et al. (2015), uma única colônia de cada isolado foi incubada *overnight* a 35 °C em 10 mL de RPMI 1640 contendo 4% de glicose. Após centrifugar (centrífuga clínica 80-2B-15mL, Centri Bio), a 3000 rotações por minuto (RPM) por 5 minutos, e descartar o sobrenadante, as células foram adicionadas em frascos contendo 10 mL do meio de cultura até chegar a uma absorbância final de 0,1 ( $\lambda = 600$  nm) e incubadas por 10 h. Em seguida a incubação, os frascos foram

centrifugados e os sobrenadantes descartados. Foram adicionados 10 mL do agente antifúngico para obter uma concentração final de antifúngico de 1,5 µg/mL. Depois de 14 h de incubação, o último procedimento foi repetido três vezes consecutivas, com intervalos de 24 h de incubação. Após a terceira incubação, uma alíquota de células contendo 20 µL de cada cultura foram subcultivadas em SDA por 24 h para determinação da CIM e estocadas em tubos de vidro também com SDA para testes futuros. Posteriormente à retirada das alíquotas, as células foram adicionadas (até absorvância 0,1) a frascos contendo 10 mL do antifúngico a 1,5 µg/mL diluído em meio RPMI 1640 e incubados por 10 h. Os frascos foram centrifugados e após o descarte do sobrenadante, foram adicionados 10 mL do agente antifúngico para obter uma concentração final de antifúngico a 3 µg/mL. Após 14 h de incubação, o último procedimento foi repetido três vezes consecutivas com intervalo de 24 h de incubação e 20 µL de cada cultura foram subcultivados em SDA por 24 h. O experimento continuou sendo conduzido dessa maneira, com a concentração de antifúngico sempre duplicando até alcançar 24 µg/mL.

Para avaliar a estabilidade da resistência, os isolados obtidos foram subcultivados diariamente em SDA sem a presença de antifúngico, por 30 dias, e a CIM foi reavaliada.

#### **4.5 Avaliação da Resistência Cruzada**

A resistência cruzada a anfotericina B foi avaliada através da determinação da CIM para este antifúngico, comparado com a CIM antes da exposição à natamicina (CLSI, 2008).

#### **4.6 Detecção do biofilme**

Como descrito por Stepanovic et al. (2007) e aperfeiçoada por Bergamo et al. (2015), a detecção de biofilmes foi realizada em microplaca pelo método de cristal violeta, em quintuplicata. Os isolados, antes e após a indução da resistência à natamicina, foram cultivados em SDA durante 24 h a 35 ° C e após o período de incubação, foi preparado o inóculo em Caldo de Triptose de Soja (TSB, Oxoid®) de

acordo com a escala 0,5 de McFarland ( $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células/mL). Alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  foram transferidas para microplacas e suplementadas com 180  $\mu\text{L}$  de TSB. Após incubação de 24 horas a 35 °C, a cultura foi cuidadosamente removida com uma pipeta multicanal, sem tocar as paredes. A cada poço foi adicionada água destilada estéril para lavar e remover as células fracamente aderentes. Uma alíquota de Metanol 99,9% (150  $\mu\text{L}$ ) foi adicionada e após 20 minutos, as placas foram invertidas e secou-se durante 30 minutos. Estas placas foram coradas durante 15 minutos com 150  $\mu\text{L}$  de cristal violeta a 0,5%, a temperatura ambiente. Em seguida, procedeu-se a aspiração do corante e a lavagem das placas com água destilada estéril. Por fim, o corante foi novamente suspenso em 150  $\mu\text{L}$  de etanol 100% e depois de 30 minutos, a leitura foi feita através da medição da absorção (450nm), conforme a Tabela 3:

**TABELA 3.** Critérios de avaliação da formação de biofilme pelo método do cristal violeta, segundo a faixa de absorbância.

<b>Formação do Biofilme</b>	<b>Faixa De Absorbância</b>
Forte	> 0,280
Médio	0,170 – 0,279
Fraco	0,070 – 0,170
Não Formador	< 0,070

Adaptado de Bergamo et al. (2015).

#### **4.7 Comparação macromorfológica dos isolados antes e após indução de resistência com exposição a concentrações crescentes de natamicina**

Os isolados originais não expostos à natamicina e os isolados submetidos ao procedimento de indução de resistência, com exposição a concentrações crescentes de natamicina, foram cultivados em SDA sem natamicina durante 24h a 35 ° C para comparar a morfologia de crescimento. Os isolados foram comparados para avaliar se alterações macromorfológicas (*Phenotypic switching*) no comportamento de crescimento foram conduzidas durante o procedimento de indução de resistência.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Desenvolvimento e Estabilidade da Resistência

A Tabela 4 demonstra os valores de CIM determinados para a natamicina antes e após a indução da resistência com exposição a concentrações crescentes do agente antifúngico.

**TABELA 4.** Valores de concentração inibitória mínima (CIM), em µg/mL, da natamicina, fenótipo e, alterações macromorfológicas (*Phenotypic switching*) de isolados de *C. albicans* (CA), *C. krusei* (CK), *C. tropicalis* (CT), *C. parapsilosis* (CP), *C. guilliermondii* (CG) e *C. lusitaniae* (CL) antes e após a indução da resistência com exposição a concentrações crescentes de natamicina e após subcultivo em meio isento de antifúngico por 30 dias.

Isolados	CIM da natamicina / Fenótipo								
	Inicial	Evolução das concentrações de exposição à natamicina						Subcultivo isento de NAT / 30 dias	PS
		1,5 µg/ml	3 µg/ml	6 µg/ml	12 µg/ml	24 µg/ml			
CA ATCC 18804	8/S	8/S	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	Não
CA CA01	8/S	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	Não
CA DEB05	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	Não
CK ATCC 6258	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	Não
CK CK03	8/S	8/S	8/S	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	Não
CK RL52	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	Não
CT ATCC 750	16/S	16/S	16/S	16/S	32/R	32/R	16/S	16/S	Sim
CT 72P	8/S	8/S	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	Não
CT CT56	8/S	8/S	16/S	16/S	16/S	16/S	8/S	8/S	Não
CP ATCC 22019	8/S	8/S	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	Sim
CP RL27m	8/S	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	Sim
CP RL20	8/S	8/S	8/S	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	Não
CG CGU01	8/S	8/S	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	16/S	Sim
CG CGU02	16/S	16/S	16/S	32/R	32/R	32/R	16/S	16/S	Sim
CL RL21	16/S	16/S	16/S	16/S	32/R	32/R	16/S	16/S	Não
CL RL28	16/S	16/S	16/S	32/R	32/R	32/R	16/S	16/S	Não
CL RL30	16/S	16/S	16/S	32/R	32/R	32/R	16/S	16/S	Não

S: suscetível; R: resistente NAT: natamicina PS: *Phenotypic switching*

Na Tabela 4 pode-se observar que, ao final do processo, os isolados de *C. tropicalis* (ATCC 750), *C. guilliermondii* (CGU02) e *C. lusitaniae* (RL21, RL28 e



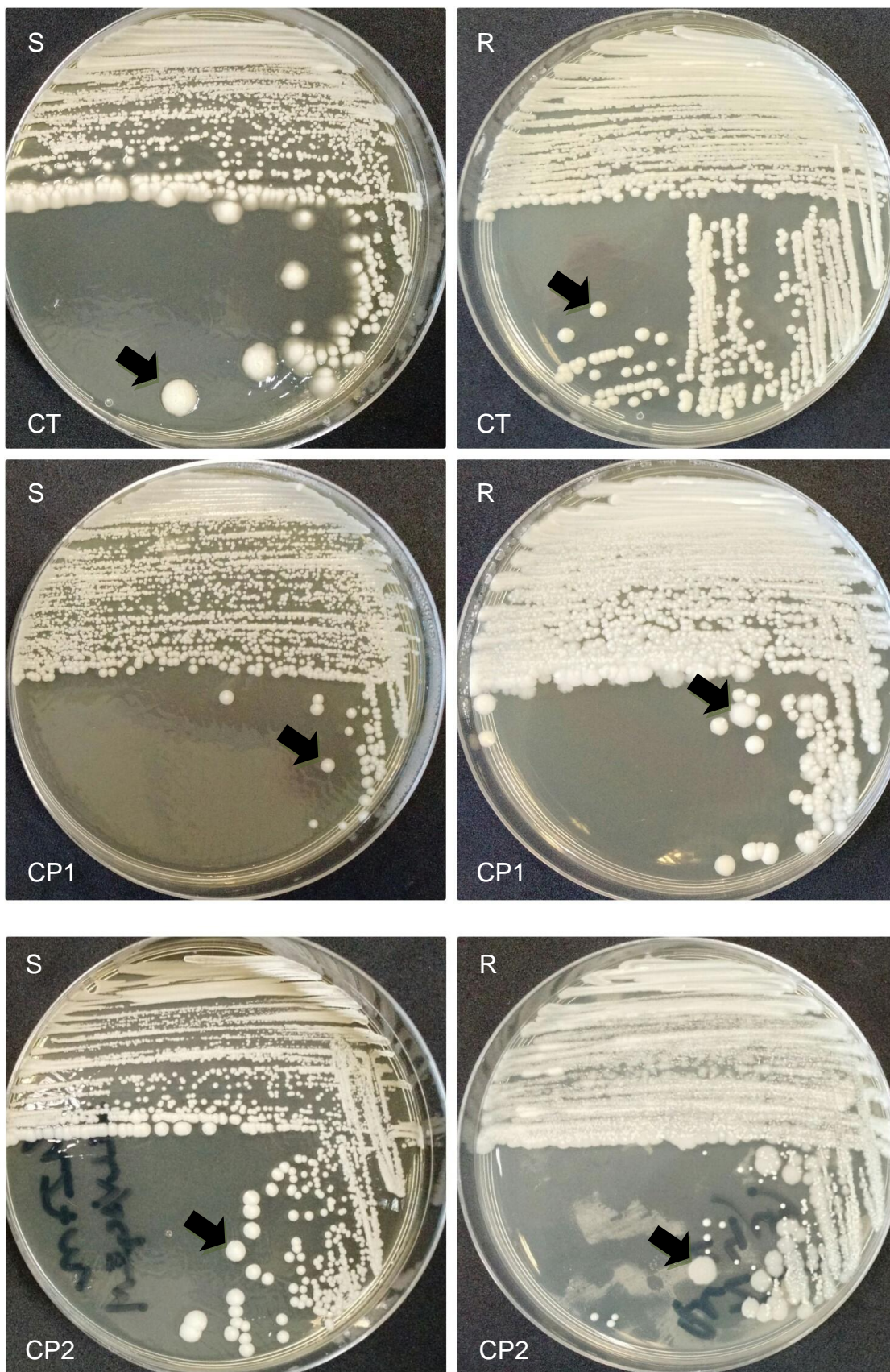
RL30) desenvolveram resistência. Os isolados de *C. albicans* (ATCC 18804, CA01), *C. krusei* (CK03), *C. tropicalis* (CT 72P, CT56), *C. parapsilosis* (ATCC 22019, RL27m, RL20) e *C. guilliermondii* (CGU01) apresentaram apenas diminuição de suscetibilidade a natamicina, porém sem alteração de fenótipo.

A respeito da estabilidade da resistência desenvolvida após a sua indução, os isolados perderam seu fenótipo de resistência, em razão do subcultivo em meio isento de antifúngico por 30 dias. No entanto, não foi observada redução da CIM superior a uma diluição.

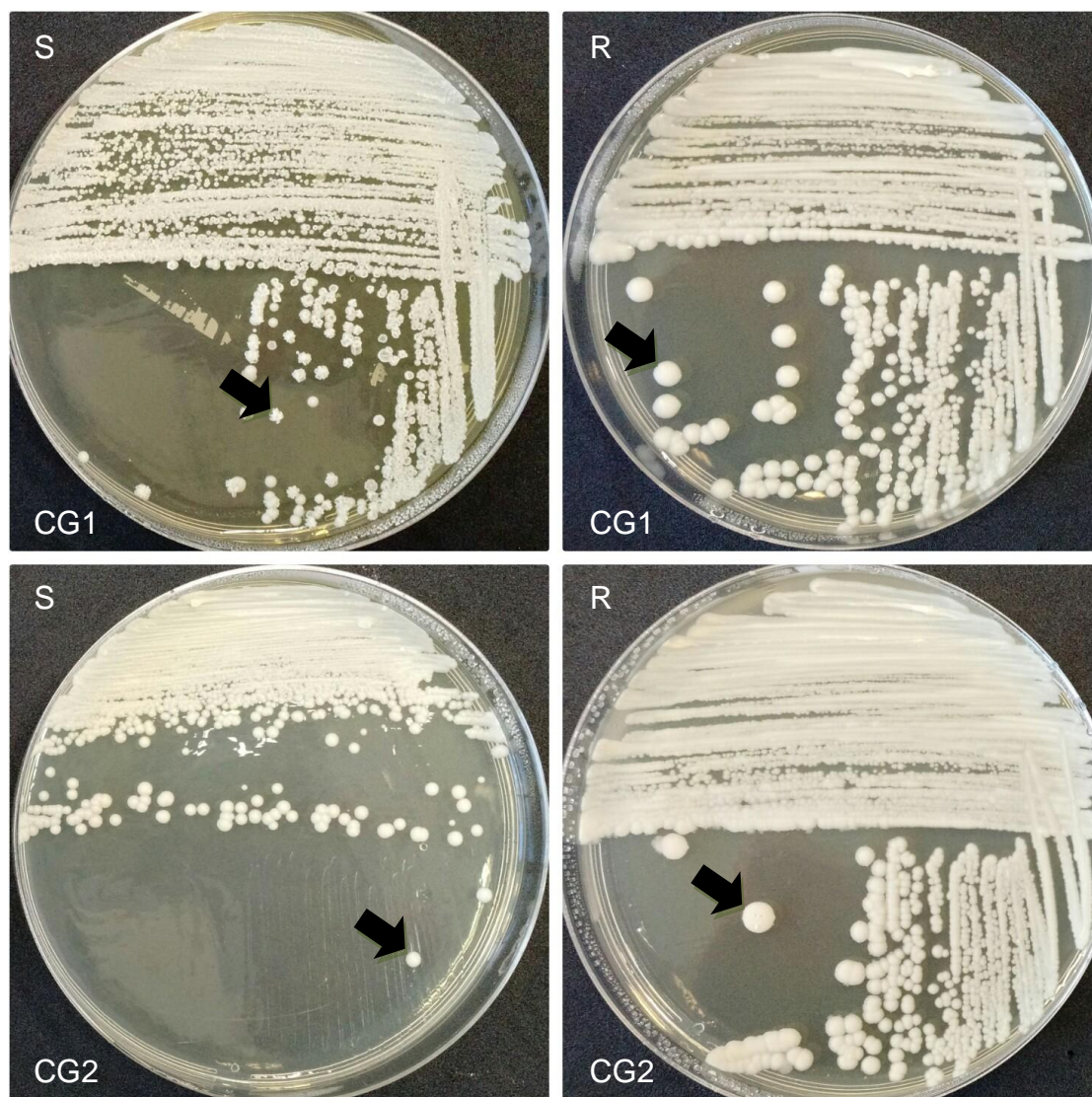
Além disso, um isolado de *C. tropicalis* (ATCC 750), dois isolados de *C. parapsilosis* (ATCC 22019 e RL27m) e todos os isolados de *C. guilliermondii* expostos à natamicina apresentaram também *Phenotypic switching* (Figura 1).

## 5.2 Resistência Cruzada

A fim de observar o desenvolvimento de resistência cruzada dos isolados cultivados em natamicina, testes de suscetibilidade com a anfotericina B foram realizados, conforme demonstrado na Tabela 5. Um total de quatro isolados expostos a natamicina apresentaram resistência cruzada à anfotericina B e doze isolados apresentaram susceptibilidade diminuída, sem alteração fenotípica. Todos os isolados de *C. albicans* diminuíram a sua susceptibilidade, sendo que dois permaneceram com fenótipo susceptível e um (ATCC 18804) tornou-se resistente. Entre os isolados de *C. krusei*, dois deles diminuíram a suscetibilidade sem alteração fenotípica e um se tornou resistente (RL52). Em relação aos isolados de *C. tropicalis*, um deles diminuiu sua suscetibilidade, porém mantendo o fenótipo, um manteve seu valor de CIM e outro se tornou resistente (72P). Similarmente, os isolados de *C. parapsilosis* e *C. lusitaniae* diminuíram a sua susceptibilidade sem alteração fenotípica. Entre os isolados de *C. guilliermondii*, um deles diminuiu sua suscetibilidade sem alteração fenotípica e um deles se tornou resistente (CGU01).







**FIGURA 3.** Alterações macromorfológicas (*Phenotypic switching*) de isolados de *C. tropicalis* ATCC 750 (CT), *C. parapsilosis* ATCC 22019 (CP1) e RL27m (CP2) e *C. guilliermondii* CGU01 (CG1) e CGU02 (CG2) antes (S) e após a indução da resistência (R), com exposição a concentrações crescentes de natamicina.

### 5.3 Detecção do Biofilme

A capacidade de formação de biofilme dos isolados foi realizada antes e após a indução de resistência com exposição a concentrações crescentes de natamicina, conforme exposto na Tabela 6. Dez isolados foram formadores de biofilme, tanto antes, quanto depois da indução da resistência, exceto os isolados de *C. krusei* ATCC 6258 e RL52, *C. tropicalis* ATCC 750 e *C. parapsilosis* RL20. Os isolados de *C. parapsilosis* ATCC 22019 e RL27m, *C. guilliermondii* CGU02

mostraram alterações no perfil de produção de biofilme, passando de não produtor de biofilme, antes da indução da resistência, para fraco produtor de biofilme, após a indução da resistência. Além disso, *C. guilliermondii* CGU01 apresentou mudança no perfil de produção de biofilme, passando de médio produtor biofilme, antes da indução da resistência, para fraco produtor de biofilme, após a indução da resistência.

**TABELA 5.** Valores de concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL, e o fenótipo da anfotericina B dos isolados de *C. albicans* (CA), *C. krusei* (CK), *C. tropicalis* (CT), *C. parapsilosis* (CP), *C. guilliermondii* (CG) e *C. lusitaniae* (CL) selvagens e após a indução da resistência a natamicina.

Espécies	Isolados	CIM da anfotericina B / Fenótipo	
		Inicial	Após exposição a concentrações crescentes de natamicina
CA	ATCC 18804	0,5/S	4/R
	CA01	0,5/S	1/S
	DEB05	0,5/S	1/S
CK	ATCC 6258	0,5/S	1/S
	CK03	0,0625/S	1/S
	RL52	1/S	2/R
CT	ATCC 750	0,25/S	1/S
	72P	0,625/S	2/R
	CT56	1/S	1/S
CP	ATCC 22019	0,25/S	1/S
	RL27m	0,5/S	1/S
	RL20	0,25/S	0,5/S
CG	CGU01	0,25/S	2/R
	CGU02	0,0625/S	1/S
CL	RL21	0,0625/S	0,5/S
	RL28	0,25/S	1/S
	RL30	0,125/S	1/S

S: suscetível; R: resistente

**TABELA 6.** Valores da detecção do biofilme dos isolados de *C. albicans* (CA), *C. krusei* (CK), *C. tropicalis* (CT), *C. parapsilosis* (CP), *C. guilliermondii* (CG) and *C. lusitaniae* (CL), antes e após a indução da resistência, com exposição a concentrações crescentes de natamicina.

Espécies	Isolados	Detecção do Biofilme	
		Inicial	Após exposição a concentrações crescentes de natamicina
<b>CA</b>	ATCC 18804	0,082/FPB	0,075/FPB
	CA01	0,075/FPB	0,086/FPB
	DEB05	0,093/FPB	0,091/FPB
<b>CK</b>	ATCC 6258	0,052/NPB	0,055/NPB
	CK03	0,086/FPB	0,090/FPB
	RL52	0,052/NPB	0,051/NPB
<b>CT</b>	ATCC 750	0,061/NPB	0,059/NPB
	72P	0,072/FPB	0,072/FPB
	CT56	0,106/FPB	0,087/FPB
<b>CP</b>	ATCC 22019	0,052/NPB	0,074/FPB
	RL27m	0,055/NPB	0,073/FPB
	RL20	0,050/NPB	0,061/NPB
<b>CG</b>	CGU01	0,205/MPB	0,125/FPB
	CGU02	0,066/NPB	0,083/FPB
<b>CL</b>	RL21	0,081/FPB	0,080/FPB
	RL28	0,104/FPB	0,085/FPB
	RL30	0,136/FPB	0,134/FPB

MPB: médio produtor de biofilme; FPB: fraco produtor de biofilme; NPB: não produtor de biofilme.

## 6. DISCUSSÃO

A resistência em *Candida* spp. tem sido investigada e relatada como consequência do uso aumentado de compostos antifúngicos (Arendrup, 2014), e isso resulta na expressão de isolados resistentes aos fármacos entre populações previamente suscetíveis (Huang & Kao 2012). Embora os macrolídeos polienos tenham sido os primeiros antifúngicos utilizados na terapia (Zotchev, 2003), existem poucos estudos relacionados ao desenvolvimento de resistência ou tolerância aos polienos (Barchiesi et al., 2004; Streekstra et al., 2016).

Os fungos são claramente adaptáveis e apresentam numerosos mecanismos que ajudam a proteger contra tensões celulares, tais como as encontradas após a exposição a um agente antifúngico. Ao se adaptarem a essas tensões, apresentam frequentemente elevação de suas CIM *in vitro*. O aumento da CIM geralmente é insuficiente para conferir resistência clínica. No entanto, essa adaptação estabiliza a célula na presença do antifúngico e permite o desenvolvimento de mecanismos de resistência a longo prazo, que então se manifestam como resistência clínica, resultando no avanço das infecções fúngicas (Perlin et al., 2015).

Os resultados do presente estudo destacam a capacidade de *C. tropicalis* (ATCC 750), *C. guilliermondii* (CGU02) e *C. lusitaniae* (RL21, RL28 e RL30) de adquirirem resistência *in vitro* à natamicina após exposição a este fármaco. Estes isolados aumentaram 2 vezes os seus valores de CIM tornando-se resistentes. Além disso, os isolados de *C. albicans* (ATCC 18804 e CA01), *C. krusei* (CK03), *C. tropicalis* (72P e CT56), *C. parapsilosis* (ATCC 22019, RL27m e RL20) e *C. guilliermondii* (CGU01) também aumentaram seus valores de CIM, entretanto mantiveram seu fenótipo suscetível a natamicina. Os valores de CIM obtidos desses e dos demais isolados, que foram de 16 µg/mL, demonstram uma baixa susceptibilidade, quase no limite da resistência, embora mantenham seus fenótipos suscetíveis (Tabela 3).

Além disso, verificamos que o isolado de *C. tropicalis* apresentou uma elevação de CIM após exposição a 12 µg/mL de natamicina. Já o isolado de *C. guilliermondii* apresentou uma elevação de CIM após exposição a 6 µg/mL de natamicina. O isolado de *C. lusitaniae* (RL21) apresentou uma elevação de CIM

após exposição a 12 µg/mL, enquanto os isolados de *C. lusitaniae* (RL28 e RL30) desenvolveram o fenótipo de resistência depois de expostos a 6 µg/mL de natamicina (Tabela 3).

Um estudo investigou a indução da tolerância ao polieno cultivando isolados de *C. tropicalis* em meio ágar contendo anfotericina B a uma concentração de 1,5 µg/mL. Os isolados testados mantiveram um padrão de suscetibilidade semelhante aos seus isolados originais e não apresentaram mutantes resistentes à anfotericina B. Entretanto, a maioria dos isolados utilizados neste estudo tornaram-se tolerantes e altamente tolerantes após o ensaio (Barchiesi et al., 2004).

*C. lusitaniae* e *C. guilliermondii* são intrinsecamente menos suscetíveis aos polienos ou "tolerantes aos polienos" do que outras espécies de *Candida* (Krcmery & Barnes, 2002; Savini et al., 2010). Um estudo *in vitro* demonstrou que, ao contrário de outras espécies de *Candida*, os isolados de *C. lusitaniae* geraram linhagens resistentes a anfotericina B a partir de colônias previamente susceptíveis. As colônias individuais foram diluídas e subcultivadas em ágar sem anfotericina B e com anfotericina B a 0,15 µg/mL. Em algumas dessas linhagens o fenótipo resistente manteve-se estável (Yoon et al., 1999).

Outro estudo expôs um isolado de *C. albicans* a concentrações crescentes de anfotericina B para gerar um isolado altamente resistente. A estabilidade do fenótipo resistente foi testada cultivando-se o isolado resistente em caldo sem fármaco e determinou-se que o isolado perdeu o seu fenótipo algum tempo após a terceira passagem (Barker et al., 2004).

Em relação à estabilidade da resistência desenvolvida pelos isolados, observamos que, quando os isolados foram cultivados em meio sólido e livre de natamicina por 30 dias, as CIMs para alguns isolados reverteram para valores mais baixos. O isolado de *C. tropicalis* (ATCC 750) perdeu seu fenótipo de resistência, assim como o isolado de *C. guilliermondii* (CGU02) e os três isolados de *C. lusitaniae* (RL21, RL28 e RL30). O isolado de *C. tropicalis* (CT56) também diminuiu o seu valor de CIM após o subcultivo em meio livre de natamicina, de 16µg/mL para 8 µg/mL, mantendo seu fenótipo suscetível (Tabela 3).

O potencial de virulência de um determinado isolado de *Candida* spp. resulta na possibilidade de alteração na forma macromorfológica. O tipo de alteração macromorfológica (*Phenotypic Switching*) mais estudado é a mudança branca-

opaca, ou seja, a mudança de colônias brancas, redondas ou ovais, com uma superfície lisa (fase branca) para colônias cinzentas, alongadas, ásperas e duas vezes maiores (fase opaca), ou vice-versa, dependendo das mudanças nas condições ambientais. Cada uma destas fases diferem na sua capacidade de colonização pois, a fase branca tem sido associada a infecções intravenosas e renais, enquanto a fase escura tem sido encontrada sobre a pele (Modrzewska & Kurnatowski, 2013).

No presente estudo, dentre as cepas que adquiriram resistência, *C. tropicalis* (ATCC 750) e *C. guilliermondii* (CGU02) demonstraram *Phenotypic Switching* em suas colônias (Tabela 3 / Figura 1). O *Phenotypic Switching*, em resposta a diferentes sinais ambientais, é uma característica típica das leveduras (Palková & Váchová, 2016), permitindo que os microrganismos se adaptem a um microambiente em constante mudança (Jain et al., 2008). É definido como a emergência espontânea de colônias com morfologia alterada e representa um dos vários mecanismos pelos quais a "heterogeneidade fenotípica" pode ser alcançada em uma população fúngica (Jain et al., 2008), permitindo a sobrevivência do mais apto em seu novo ambiente de crescimento (Jayatilake, 2011). Isto facilita a adaptação no hospedeiro (Jain et al., 2008) e tem um efeito direto sobre a virulência de *Candida* spp. (Jayatilake, 2011).

Um trabalho recente avaliou a capacidade de *C. guilliermondii* sofrer *Phenotypic Switching*, e verificou a mudança de cor em algumas colônias, que passaram de brancas para marrons. Este fato foi associado ao aumento da resistência a antifúngicos, pois as colônias de *C. guilliermondii* com o fenótipo alterado exibiram 20 vezes mais resistência à anfotericina B (Lastauskiene et al., 2015).

Embora as cepas de *C. parapsilosis* (ATCC 22019 e RL27m) e *C. guilliermondii* (CGU01) não tenham desenvolvido resistência após exposição à natamicina, também apresentaram *Phenotypic Switching* em suas colônias (Tabela 3 / Figura 1). Esse fenômeno também tem sido associado a estresse (Huang, 2012) e neste caso provavelmente ocorreu devido às condições estressantes sofridas durante o procedimento de indução de resistência.

Streekstra et al. (2016) estudaram o possível desenvolvimento de tolerância contra a natamicina. Vinte espécies fúngicas foram submetidas a



concentrações crescentes desse antifúngico, apresentando aumento na CIM de 13 dos 20 isolados testados, embora o intervalo dessa CIM, antes e depois do ensaio, não tenha mudado significativamente. Ao contrário do presente estudo, oito isolados mostraram um aumento na tolerância após o ensaio, porém nenhum desses isolados mostraram resistência. A *C. parapsilosis* mostrou um aumento de 60-80% na tolerância após o ensaio. O efeito do ensaio sobre a morfologia dos isolados foi variável e assim como nesse estudo, alguns isolados apresentaram *Phenotypic Switching*, mesmo sem desenvolvimento de resistência. *Aspergillus ochraceus* apresentou colônias menores com formação anterior de conídios e *Fusarium oxysporum* também produziu colônias menores, com liberação de um exsudato púrpura no meio ágar. *Fusarium solani* apresentou colônias marcadamente menores, enquanto *Geotrichum candidum* exibiu um padrão de crescimento ligeiramente alterado. *C. albicans* exibiu colônias menores em comparação com o controle e *Trichoderma aggressivum* mostrou uma menor formação de esporos, enquanto os dois isolados de *Aspergillus terreus* mostraram uma alteração na aparência da colônia (Streekstra et al., 2016).

A resistência cruzada é definida como a resistência que ocorre em duas ou mais substâncias antifúngicas de uma classe química semelhante, com um modo de ação semelhante, e que pode desenvolver-se em organismos que foram expostos à mesma substância ou a uma substância similar (Lackner, 2015). Além disso, a resistência cruzada é especificada em fenótipos *in vitro* e pode estar associada a resultados *in vivo*, falhas terapêuticas, pior resultado clínico, avanço de infecções fúngicas, múltiplas mudanças de regimes de tratamento e aumento dos custos em cuidados de saúde (Lackner, 2015).

No presente estudo, os isolados de *C. albicans* (ATCC 18804), *C. krusei* (RL52), *C. tropicalis* (72P) e *C. guilliermondii* (CGU01) apresentaram resistência cruzada à anfotericina B após indução da resistência à natamicina, embora não tenham se tornado resistentes à natamicina. A resistência à anfotericina B pode afetar o tratamento clínico, uma vez que é utilizada para tratar infecções fúngicas graves com risco de morte (Dalhoff & Levy, 2015). Streekstra et al. (2016) testaram uma seleção de isolados para resistência cruzada à anfotericina B e nistatina. Os isolados foram selecionados com base num aumento da CIM após exposição a concentrações crescentes de natamicina. *F. solani*, *Neosartorya*

*spinosa*, *Trichosporon asahii*, *G. candidum*, *Colletotrichum musae* e *F. oxysporum* não apresentaram aumento da CIM para anfotericina B e nistatina. A única exceção foi *A. ochraceus* que apresentou uma CIM triplicada para a nistatina e a anfotericina B (Streekstra et al., 2016).

Comparando com dados da literatura que expõem extensivamente a formação de biofilme bacteriano, escassa importância tem sido dada aos biofilmes fúngicos de importância clínica (Fischbach & Walsh, 2009). Biofilmes são grupos microbianos altamente estruturados e hidratados, formados por células sésseis congregadas em uma matriz polimérica extracelular (contendo DNA, polissacarídeos). As células sésseis (biofilme) geralmente exibem-se de forma mais resistentes aos agentes antimicrobianos e este considerável aumento da resistência tem um impacto relevante no tratamento de biofilmes relacionados a infecções fúngicas, sobretudo as ocasionadas por espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. Krusei*) (Nett et al., 2007; Modrzewska & Kurnatowski, 2013; Sardi et al., 2014). Podem ser formados a partir de uma ou mais espécies, sobre a superfície do tecido hospedeiro, bem como em plásticos, incluindo lentes de contato, implantes médicos e próteses dentárias (Modrzewska & Kurnatowski, 2013). A resistência aos antifúngicos é uma particularidade dos biofilmes de *Candida* spp. e muitas vezes está associada com o aumento da densidade de células e inatividade metabólica das mesmas (Nett et al., 2007).

Em relação à formação de biofilme, realizada pelo método do cristal violeta, os isolados de *C. parapsilosis* (ATCC 22019 e RL27m) e *C. guilliermondii* (CGU02) apresentaram modificações em seus perfis de produção de biofilme, aumentando as suas capacidades de formação de biofilmes, após a indução de resistência a natamicina. Além disso, *C. guilliermondii* (CGU01) também apresentou modificação no seu perfil de produção de biofilme, após a indução da resistência a natamicina, o qual passou de médio formador de biofilme para fraco formador de biofilme. Esse resultado está provavelmente relacionado com a conhecida heterogeneidade dos biofilmes fúngicos. Essa heterogeneidade dos biofilmes pode causar subpopulações de células mais tolerantes ou mais resistentes às drogas dentro de um biofilme ou diferentes respostas e fenótipos dentro de uma população geneticamente idêntica de células (LaFleur, 2011).

Esses isolados que modificaram as suas capacidades de formação de biofilmes também apresentaram *Phenotypic Switching* em suas colônias. Esse fenômeno afeta a capacidade de adesão dos isolados e a formação de biofilmes (Modrzewska & Kurnatowski, 2013), corroborando de forma satisfatória com o presente estudo.

França et al. (2011) também verificaram, em seu estudo, uma maior produção de biofilme por *C. tropicalis* gerada por fenótipos mutados, ou seja, que sofreram *Phenotypic Switching*, comparado aos fenótipos não mutados (França et al., 2011). Da mesma forma, Moralez et al. (2014) observaram uma maior produção de biofilme por *C. tropicalis* gerada pelos fenótipos mutados (crepe e rugoso), comparados ao fenótipo não mutado e as outros morfotipos obtidos (Moralez et al., 2014).

Um estudo recente comparou a formação de biofilme entre as células brancas e as células opacas de *C. albicans*, a 25° C em meio contendo glicose e aminoácidos, e revelou que as células opacas formaram biofilmes robustos, enquanto que as células brancas não aderiram de maneira eficiente ao substrato ou formaram biofilmes. Essas células brancas constituem a forma padrão de *C. albicans* no hospedeiro, entretanto as células opacas representam um estado celular metabolicamente mais especializado, exibindo maior aptidão que as células brancas sob condições seletivas (Ene et al., 2016).

Individualmente ou em conjunto, estas mudanças fenotípicas são indicativas de microrganismos com maior propensão a causar infecções e até mesmo, driblar a terapia (Searles et al., 2011).

## 7. CONCLUSÕES

✓ A natamicina é capaz de induzir a resistência em isolados de *Candida* e isso pode estar relacionado com a susceptibilidade desses isolados quase no limite da susceptibilidade, mesmo antes da exposição à natamicina;

✓ A resistência adquirida a natamicina é instável, visto que os isolados resistentes perderam seu fenótipo de resistência depois de subcultivo em meio livre de natamicina por 30 dias;

✓ A diminuição da suscetibilidade dos isolados expostos a natamicina foi verificada em anfotericina B, e a resistência cruzada foi evidenciada em alguns isolados;

✓ Alguns isolados expostos a natamicina foram capazes de formar biofilme e em três isolados, evidencia-se uma mudança no perfil de formação de biofilme, visto que esses isolados passaram a formar mais biofilme após a indução de resistência a natamicina;

✓ Alguns isolados apresentaram alterações fenotípicas em suas colônias e essas alterações foram relacionadas, em alguns casos, a uma maior produção de biofilme e, portanto, maior virulência;

✓ Tendo em vista os resultados mencionados, ressalta-se a importância do monitoramento da natamicina aditivada nos alimentos, uma vez que seus níveis residuais em concentrações elevadas podem exercer uma pressão seletiva sobre espécies de *Candida* constituintes da microbiota comensal humana gastrointestinal, no que tange a sua virulência e resistência.

## 8. PERSPECTIVAS

✓ Avaliar a associação sinérgica de natamicina com outros compostos, naturais ou sintéticos, objetivando reduzir as concentrações usuais de natamicina como conservante antifúngico em produtos alimentícios.

## 9. REFERÊNCIAS

### Artigos:

- Acker HV, Dijck PV, Coenye T. 2014. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. *Trends Microbiol.* 22(6):326-333.
- Aguirre JPB, Hamid AMR. 2015. Amphotericin B deoxycholate versus liposomal amphotericin B: effects on kidney function (Review). *Cochrane Database Syst Rev.* 11:1-60.
- Albataineh MT, Sutton DA, Fothergill AW, Wiederhold NP. 2016. Update from the Laboratory Clinical Identification and Susceptibility Testing of Fungi and Trends in Antifungal Resistance. *Infect Dis Clin N Am.* 30:13–35.
- Alburquenque C, Beltrán S, Olivares R, Falconer MA, Amaro J, Fuentes M, Tapia CV. 2013. Distribución de especies y perfil de susceptibilidad de aislados de *Candida* spp: la importancia de vigilar también cepas de la comunidad. *Rev Chilena Infectol.* 30(3):244-251.
- Aparicio JF, Barreales EG, Payero TD, Vicente CM, Pedro A, Santos-Aberturas J. 2016. Biotechnological production and application of the antibiotic pimaricin: biosynthesis and its regulation. *App Microbiol Biotechnol.* 100:61-78.
- Aparicio JF, Mendes MV, Antón N, Recio E, Martín JF. 2004. Polyene Macrolide Antibiotic Biosynthesis. *Curr Med Chem.* 11(12):1643-1656.
- Arendrup MC. 2010. Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care.* 16:445–452.
- Arendrup MC. Update on antifungal resistance in *Aspergillus* and *Candida*. *Clin Microbiol Infect.* 20(6):42–48.
- Baginski M, Sternal K, Czub J, Borowski E. 2005. Molecular modelling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic. *Acta Biochim Pol.* 52(3):655–658.
- Banjara N, Suhr MJ, Hallen-Adams HE. 2015. Diversity of Yeast and Mold Species from a Variety of Cheese Types. *Curr Microbiol.* 70:792–800.
- Barchiesi F, Maracci M, Baldassarri I, Spreghini E, Giannini D, Scalise G. 2004. Tolerance to amphotericin B in clinical isolates of *Candida tropicalis*. *Diagn Micr Infec Dis.* 50:179–185.
- Barker KS, Crisp S, Wiederhold N, Lewis RE, Bareither B, Bassetti M, Mikulska M, Viscoli C. 2010. Bench-to-bedside review: Therapeutic management of invasive candidiasis in the intensive care unit. *Crit Care.* 14(6):244.
- Bazán-Mora E, Sánchez-Paredes E, Córdoba-Martínez E, Hernández-Hernández F, Manzano-Gayosso P, López-Martínez R. 2001. Hallazgo de *candida albicans* en manos de manejadores de alimentos. *Rev Mex Patol Clin.* 48(1):37-41.
- Belakhov VV, Garabadzhiu AV. 2015. Polyene Macrolide Antibiotics: Mechanisms of Inactivation, Ways of Stabilization, and Methods of Disposal of Unusable Drugs (Review). *Rus J Gen Chem.* 85(13):2985–3001.
- Bergamo VZ, Donato RK, Dalla Lana DF, Donato KJZ, Ortega GG, Schrekker HS, Fuentefria AM. 2015. Imidazolium salts as antifungal agents: strong antibiofilm activity against multidrug-resistant *Candida tropicalis* isolates. *Lett Appl Microbiol.* 60(1):66-71.

- Bhatta RS, Chandasanab H, Rathib C, Kumara D, Chhonkera YS, Jain GK. 2011. Bioanalytical method development and validation of natamycin in rabbit tears and its application to ocular pharmacokinetic studies. *J Pharm Biomed Anal.* 54:1096–1100.
- Bonhomme J, D'enfert C. 2013. *Candida albicans* biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment. *Curr Opin Microbiol.* 16:398–403.
- Brandt ME, Lockhart SR. 2012. Recent Taxonomic Developments with *Candida* and Other Opportunistic Yeasts. *Curr Fungal Infect Rep.* 6:170–177.
- Caffrey P, De Poire E, Sheehan J, Sweeney P. 2016. Polyene macrolide biosynthesis in streptomycetes and related bacteria: recent advances from genome sequencing and experimental studies. *Appl Microbiol Biotechnol.* 100:3893–3908.
- Clinical And Laboratory Standards Institute. 2008. M27-A3: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition, Wayne.
- Crawshaw WM, Macdonald NR, Duncan G. 2005. Outbreak of *Candida rugosa* mastitis in a dairy herd after intramammary antibiotic treatment. *Vet Rec.* 156:812-813.
- Criseo G, Scordino F, Romeo O. 2015. Current methods for identifying clinically important cryptic *Candida* species. *J Microbiol Methods.* 111:50–56.
- Cuenca-Estrella M. 2014. Antifungal drug resistance mechanisms in pathogenic fungi: from bench to bedside. *Clin Microbiol Infect.* 20(6):54–59.
- Dalhoff AAH, Levy SB. 2015. Does use of the polyene natamycin as a food preservative jeopardise the clinical efficacy of amphotericin B? A word concern. *Int J Antimicrob Agents.* 45:564-567.
- Delaloye J, Calandra T. 2014. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. *Virulence.* 5(1):161–169.
- Delarze E, Sanglard D. 2015. Defining the frontiers between antifungal resistance, tolerance and the concept of persistence. *Drug Resist Updat.* 23:12–19.
- Delavenne E, Mounier J, Asmani K, Jany J, Barbier G, Blay GL. 2011. Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. *Int J Food Microbiol.* 151:247–251.
- Doi AM, Pignatari ACC, Edmond MB, Marra AR, Camargo LFA, Siqueira RA, Da Mota VP, Colombo AL. 2016. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. *PLoS ONE.* 11(1):1 - 9.
- Dühring S, Germerodt S, Skerka C, Zipfel PF, Dandekar T, Schuster S. 2015. Host-pathogen interactions between the human innate immune system and *Candida albicans*— understanding and modeling defense and evasion strategies. *Front Microbiol.* 6(625):1-18.
- Dworecka-Kaszak B, Krutkiewicz A, Szopa D, Kleczkowski M, Biegńska M. 2012. High Prevalence of *Candida* Yeast in Milk Samples from Cows Suffering from Mastitis in Poland. *ScientificWorldJournal.* 2012:1-5.
- Ece G, Samlioglu P, Akkoçlu G, Atalay S, Kose S. 2012. The Evaluation of the Distribution of Yeast like Fungi '*Candida* Species' at a Tertiary Care Center in Western Turkey. *Int J Med Sci.* 9(7):617-620.
- Eckstein J, Barbuch R, Bard M, Rogers PD. 2004. Genome-wide expression profiling reveals genes associated with amphotericin B and fluconazole resistance in experimentally induced antifungal resistant isolates of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother.* 54:376–385.

- Eddouzi J, Parker JE, Vale-Silva LA, Coste A, Ischer F, Kelly S, Manai M, Sanglard D. 2013. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Clinical *Candida* Species Isolated from Tunisian Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 57(7):3182–3193.
- El-Sharoud WM, Belloch C, Peris D, Querol A. 2009. Molecular Identification of Yeasts Associated with Traditional Egyptian Dairy Products. *J Food Sci.* 74(7):M341-M346.
- Ene IV, Lohse MB, Vladu AV, Morschhäuser J, Johnson AD, Bennett RJ. 2016. Phenotypic profiling reveals that *Candida albicans* opaque cells represent a metabolically specialized cell state compared to default white cells. *mBio.* 7(6):1-20.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2009. Scientific opinion on the use of natamycin (E 235) as a food additive. *EFSA Journal.* 7(12):331-335.
- Facchin S, Barbosa AC, Carmo LS, Silva MCC, Oliveira AL, Morais PB, Rosa CA. 2013. Yeasts and hygienic-sanitary microbial indicators in water buffalo mozzarella produced and commercialized in Minas Gerais, Brazil. *Braz J Microbiol.* 44(3):701-707.
- Fekete-Forgacs K, Gyure L, Lenkey B. 2000. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*. *Mycoses.* 43:273-279.
- Fernandes T, Silva S, Henriques M. 2015. *Candida tropicalis* biofilm's matrix— involvement on its resistance to amphotericin B. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 83(2):165–169.
- Fischbach MA, Walsh CT. 2009. Antibiotics for emerging pathogens. *Science.* 325(5944):1089-93.
- Fleet GH. 2007. Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. *Curr Opin Biotechnol.* 18(2):170–175.
- Fleet GH, Balia R. 2006. The public health and probiotic significance of yeasts in foods and beverages. *Yeasts in Food and Beverages.* Springer Berlin Heidelberg. 381-397.
- França EJJ, Andrade CGTJ, Furlaneto-Maiac L, Serpa R, Oliveira MT, Quesada RMB, Furlaneto MC. 2011. Ultrastructural architecture of colonies of different morphologies produced by phenotypic switching of a clinical strain of *Candida tropicalis* and biofilm formation by variant phenotypes. *Micron.* 42:726-732.
- Gaudie CM, Wragg PN, Barber AM. 2009. Outbreak of disease due to *Candida krusei* in a small dairy herd in the UK. *Vet Rec.* 165(18):535-537.
- Guarro J. 2012. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 30(1):33–39.
- Gupte M, Kulkarni P, Ganguli BN. 2002. Antifungal antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol.* 58:46–57.
- Gyawali R, Ibrahim SA. 2014. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control.* 46:412-429.
- Huang G. 2012. Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Virulence.* 3:251-261.
- Huang M, Kao KC. 2012. Population dynamics and the evolution of antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett.* 333:85–93.
- Jain N, Hasan F, Fries BC. 2008. Phenotypic Switching in Fungi. *Curr Fungal Infect Rep.* 2:180 – 188.
- Jayatilake JAMS. 2011. A Review of the Ultrastructural Features of Superficial Candidiasis. *Mycopathologia.* 171:235–250.
- Jensen RH. 2016. Resistance in human pathogenic yeasts and filamentous fungi: prevalence, underlying molecular mechanisms and link to the use of antifungals in humans and the environment. *Dan Med J.* 63(10):1-34.



- Jensen RH, Astvad KMT, Silva LV, Sanglard D, Jørgensen R, Nielsen KF, Mathiasen E G, Doroudian G, Perlin DS, Arendrup MC. 2015. Stepwise emergence of azole, echinocandin and amphotericin B multidrug resistance in vivo in *Candida albicans* orchestrated by multiple genetic alterations. *J Antimicrob Chemother.* 70(9):2551–2555.
- Juneja VK, Dwivedi HP, Yan X. 2012. Novel natural food antimicrobials. *Annu Rev Food Sci Technol.* 3:381-403.
- Klingspor L, Tortorano AM, Peman J, Willinger B, Hamal P, Sendid B, Velegraki A, Kibbler C, Meis JF, Sabino R, Ruhnke M, Arikian-Akdagli S, Salonen J, Dóczy I. 2015. Invasive *Candida* infections in surgical patients in intensive care units: a prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (2006–2008). *Clin Microbiol Infect.* 21(1):87.e1–87.e10.
- Kończakowska A, Kończakowski M. 2016. Drug resistance mechanisms and their regulation in non-*albicans Candida* species. *J Antimicrob Chemother.* 71(6):1438–1450.
- Krcmery V, Barnes AJ. 2002. Non-*albicans Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect.* 50(4):243-260.
- Lackner M, Martin-Vicente A, Lass-Flörl C. 2015. Multidrug- and Cross-Resistant *Candida*: the Looming Threat. *Curr Fungal Infect Rep.* 9:23–36.
- Lafleur MD. 2011. *Candida albicans* Biofilms, Heterogeneity and Antifungal Drug Tolerance. *Open Mycol J.* 5:21-28.
- Lalitha P, Vijaykumar R, Prajna NV, Fothergill AW. 2008. *In Vitro* Natamycin Susceptibility of Ocular Isolates of *Fusarium* and *Aspergillus* Species: Comparison of Commercially Formulated Natamycin Eye Drops to Pharmaceutical-Grade Powder. *J Clin Microbiol.* 46(10):3477–3478.
- Lastauskiene E, Cepulyte J, Girkontaite I, Zinkeviciene A. 2015. Phenotypic Switching of *Candida guilliermondii* is Associated with Pseudohyphae Formation and Antifungal Resistance. *Mycopathologia.* 179:205–211.
- Lima CDLC, Lima LA, Cerqueira MMOP, Ferreira EG, Rosa CA. 2009. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 61(1):266-272.
- Loeffler J, Stevens DA. 2003. Antifungal drug resistance. *Clin Infect Dis.* 36(1):S31-S41.
- Madden KS, Mosa FA, Whiting A. 2014. Non-isoprenoid polyene natural products – structures and synthetic strategies. *Org Biomol Chem.* 12:7877–7899.
- Maroszyńska M, Kunicka-Styczyńska A, Rajkowska K, Maroszyńska I. 2013. Antibiotics sensitivity of *Candida* clinical and food-borne isolates. *Acta Biochim Pol.* 60(4):719–724.
- Martins N, Ferreira ICFR, Barros L, Silva S, Henriques M. 2014. Candidiasis: Predisposing Factors, Prevention, Diagnosis and Alternative Treatment. *Mycopathologia.* 177:223–240.
- Mayer FL, Wilson D, Hube B. 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 4(2):119-128.
- Méan M, Marchetti O, Calandra T. 2008. Bench-to-bedside review: *Candida* infections in the intensive care unit. *Crit Care.* 12(1):204.
- Miceli MH, Díaz JA, Lee SA. 2011. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis.* 11:142–51.
- Modrzewska B, Kurnatowski P. 2013. Selected pathogenic characteristics of fungi from the genus *Candida*. *Ann Parasitol.* 59(2):57–66.

- Mohammadi R, Mirhendi H, Rezaei-Matehkolaei A, Ghahri M, Shidfar MR, Jalalizand N, Makimura K. 2013. Molecular identification and distribution profile of *Candida* species isolated from Iranian patients. *Med Mycol.* 51(6):657–663.
- Morales ATP, França EJG, Furlaneto-Maia L, Quesada RMB, Furlaneto MC. 2014. Phenotypic switching in *Candida tropicalis*: association with modification of putative virulence attributes and antifungal drug sensitivity. *Medical Mycology.* 52:106-114.
- Narvhus JA, Gadaga TH. 2003. The role of interaction between yeasts and lactic acid bacteria in African fermented milks: a review. *Int J Food Microbiol.* 86(1-2):51–60.
- Negri M, Silva S, Henriques M, Oliveira R. 2012. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 31:1399–1412.
- Nett JE, Andes DR. 2016. Antifungal Agents Spectrum Of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. *Infect Dis Clin N Am.* 30(1):51–83.
- Nett J, Lincoln L, Marchillo K, Massey R, Holoyda K, Hoff B, Putative Role of {beta}- 1,3 Glucans in *Candida albicans* Biofilm Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 51(2):510-520.
- Ng KP, Kuan CS, Kaur H, Na SL, Atiya N, Velayuthan RD. 2015. *Candida* species epidemiology 2000–2013: a laboratory-based report. *Trop Med Int Health.* 20(11):1447–1453.
- Nosek J, Holesova Z, Kosa P, Attila Gacser A, Tomaska L. 2009. Biology and genetics of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Curr Genet.* 55:497–509.
- Neufeld PM, Melhem MSC, Szeszs MW, Ribeiro MD, Amorim ELT, Silva M, Lazéra MS. 2015. Nosocomial candidiasis in Rio de Janeiro State: Distribution and fluconazole susceptibility profile. *Braz J Microbiol.* 46(2):477-484.
- Palková Z, Váchová L. 2016. Yeast cell differentiation: Lessons from pathogenic and non-pathogenic yeasts. *Semin Cell Dev Bio.* 57:110–119.
- Paramythiotou E, Frantzeskaki F, Flevari A, Armaganidis A, Dimopoulos G. 2014. Invasive Fungal Infections in the ICU: How to Approach, How to Treat. *Molecules.* 19:1085-1119.
- Perlin DS, Shor E, Zhao Y. 2015. Update on Antifungal Drug Resistance. *Curr Clin Microbiol Rep.* 2(2):84–95.
- Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Nagy E, Dobiashova S, Rinaldi M, Barton R, Veselov A, and the Global Antifungal Surveillance Group. 2008. *Candida krusei*, a Multidrug-Resistant Opportunistic Fungal Pathogen: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol.* 46(2):515–521.
- Pfaller MA. 2012. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. *Am J Med.* 125(1A):S3–S13.
- Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, Horn DL, Reboli AC, Rotstein C, Franks B, Azie NE. 2014. Epidemiology and Outcomes of Invasive Candidiasis Due to Non-*albicans* Species of *Candida* in 2,496 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) Registry 2004–2008. *PLOS ONE.* 9(7):1-12.
- Pierce CG, Srinivasan A, Uppuluri P, Ramasubramanian AK, López-Ribot JL. 2013. Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. *Curr Opin Pharmacol.* 13:726–730.
- Pippi B, Lana AJD, Moraes RC, Guez CM, Machado M, De Oliveira LFS, Lino Von Poser G, Fuentefria AM. 2015. In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian Red Propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. *J Appl Microbiol.* 118(4):839-850.

- Poulain D. 2015. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Crit Rev Microbiol.* 41(2):208–217.
- Pradhan L, Sharma S, Nalamada S, Sahu SK, Das S, Garg P. 2011. Natamycin in the treatment of keratomycosis: Correlation of treatment outcome and *in vitro* susceptibility of fungal isolates. *Indian J Ophthalmol.* 59(6):512-4.
- Qiu S, Zhao GQ, Lin J, Wang X, Hu LT, Du ZD, Wang Q, Zhu CC. 2015. Natamycin in the treatment of fungal keratitis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Ophthalmol.* 8(3):597-602.
- Quindós G. 2014. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol.* 31(1):42–48.
- Ramage G, Mowat E, Jones B, Williams C, Lopez-Ribot J. 2009. Our Current Understanding of Fungal Biofilms. *Crit Rev Microbiol.* 35(4):340–355.
- Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. 2005. *Candida* Biofilms: an Update. *Eukaryotic Cell.* 4(4):633–638.
- Richardson JP, Moyes DL. 2015. Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection. *Virulence.* 6(4):327-337.
- Rodrigues D, Mezzari A, Fuentesfria AM. 2011. Candidúria: revisão atual. *RBPS, Fortaleza.* 24(2):142-150.
- Sandai D, Tabana YM, Ouweini AE, Ayodeji IO. 2016. Resistance of *Candida albicans* Biofilms to Drugs and the Host Immune System. *Jundishapur J Microbiol.* 9(11):e37385.
- Sanglard D. 2016. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. *Front Med.* 3(11):1-10.
- Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl, C. 2015. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses.* 58(2):2–13.
- Sardi JCO, Pitangui NS, Rodríguez-Arellanes G, Taylor ML, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJS. 2014. Highlights in pathogenic fungal biofilms. *Rev Iberoam Micol.* 31(1):22–29.
- Sav H, Ozdemir HG, Altinbas R, Kiraz N, Ilkit M, Seyedmousavi S. 2016. Virulence Attributes and Antifungal Susceptibility Profile of Opportunistic Fungi Isolated from Ophthalmic Infections. *Mycopathologia.* 181(9-10):653–661.
- Savini V, Catavittello C, Onofrillo D, Masciarelli G, Astolfi D, Balbinot A, Febbo F, D'amario C, D'antonio D. 2010. What do we know about *Candida guilliermondii*? A voyage throughout past and current literature about this emerging yeast. *Mycoses.* 54:434–441.
- Searles SC, Woolley CM, Petersen RA, Hyman LE, Nielsen-Preiss SM. 2011. Modeled Microgravity Increases Filamentation, Biofilm Formation, Phenotypic Switching, and Antimicrobial Resistance in *Candida albicans*. *Astrobiology.* 11(8):825-836.
- Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. 2011. Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. *Microbiol Mol Biol Rev.* 75(2):213–267.
- Sheppard DC, Howell PL. 2016. Biofilm Exopolysaccharides of Pathogenic Fungi: Lessons from Bacteria. *J Biol Chem.* 291(24):12529–12537.
- Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 36:288–305.
- Smits GJ, Brul S. 2005. Stress tolerance in fungi — to kill a spoilage yeast. *Curr Opin Biotechnol.* 16:225–230.

- Spanamberg A, Sanches EMC, Santurio JM, Ferreiro L. 2009. Mastite micótica em ruminantes causada por leveduras. *Ciência Rural*, Santa Maria. 39(1):282-290.
- Stelato MM, Concon MM, Shimada D, Srebernich SM. 2010. Contaminação fúngica em barras de cereais comercializadas. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 69(3):285-90.
- Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic S, Cirkovic I, Ruzicka FV. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 115(8):891-899.
- Storti LR, Pasquale G, Scomarim R, Galastri AL, Alterthum F, Gambale W, Paula CR. 2012. *Candida* spp. isolated from inpatients, the environment, and health practitioners in the Pediatric Unit at the University Hospital of the Jundiaí Medical College, State of São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 45(2):225-231.
- Streekstra H, Verkennis AEE, Jacobs R, Dekker A, Stark J, Dijksterhuis J. 2016. Fungal strains and the development of tolerance against natamycin. *Int J Food Microbiol*. 238:15–22.
- Tapia C, Correa N. 2015. *Candida parapsilosis* complex. *Rev Chilena Infectol*. 32(5):569-570.
- The Netherlands Organization For Applied Scientific Research (TNO). 2012. Literature study on antifungal resistance in general and natamycin resistance in particular. TNO report R10746.
- Turner SA, Butler G. 2014. The *Candida* Pathogenic Species Complex. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 4(9):1-17.
- U.S. Environmental Protection Agency (US EPA). 2016. Federal Food, Drug, and Cosmetic (FFDCA) Considerations for Natamycin. Washington, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs. 182-192.
- Wanderley L, Bianchin A, Teo CRPA, Fuentefria AM. 2013. Occurrence and pathogenicity of *Candida* spp. in unpasteurized cheese. *R bras Bioci*, Porto Alegre. 11(2):144-147.
- Welscher YM, Jones L, Richard M, Leeuwen V, Dijksterhuis J, Kruijff B, Eitzen G, Breukink E. 2010. Natamycin Inhibits Vacuole Fusion at the Priming Phase via a Specific Interaction with Ergosterol. *Antimicrob Agents Chemother*. 54(6):2618–2625.
- Welscher YM, Leeuwen MR, Kruijff B, Dijksterhuis J, Breukink E. 2012. Polyene antibiotic that inhibits membrane transport proteins. *PNAS*. 109(28):11156–11159.
- Welscher YM, Napel HHN, Balague MM, Souza CM, Riezman H, Kruijff B, Breukink E. 2008. Natamycin Blocks Fungal Growth by Binding Specifically to Ergosterol without Permeabilizing the Membrane. *J Biol Chem*. 283(10):6393–6401.
- World Health Organization Joint Expert Committee On Food Additives (WHO/JECFA). 2002. Evaluation of certain food additives and Contaminants, 57th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *WHO Food Additives Series*. 48:49-76.
- Wu Z, Liu Y, Feng X, Liu Y, Wang S, Zhu X, Chen Q, Pan S. 2014. Candidemia: incidence rates, type of species, and risk factors at a tertiary care academic hospital in China. *Int J Infect Dis*. 22:4–8.
- Yadav JSS, Bezawada J, Yan S, Tyagi RD, Surampalli RY. 2012. *Candida krusei*: biotechnological potentials and concerns about its safety. *Can J Microbiol*. 58:937–952.
- Yapar N. 2014. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag*. 10:95–105.

- Yoon SA, Vazquez JA, Steffan PE, Sobel JD, Akins RA. 1999. High-Frequency, In Vitro Reversible Switching of *Candida lusitanae* Clinical Isolates from Amphotericin B Susceptibility to Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(4):836–845.
- Zheng N, Wang Y, Hu D, Yan L, Jiang Y. 2015. The role of pattern recognition receptors in the innate recognition of *Candida albicans*. *Virulence.* 6(4):347-361.
- Zhou Y, Ren Y, Fan C, Shao H, Zhang Z, Mao W, Wei C, Ni H, Zhu Z, Hou X, Piao F, Cui Y. 2013. Survey of mycotic mastitis in dairy cows from Heilongjiang Province, China. *Trop Anim Health Prod.* 45:1709–1714.
- Zotchev SB. 2003. Polyene Macrolide Antibiotics and their Applications in Human Therapy. *Curr Med Chem.* 10(3):211-223.

#### Internet:

- Brasil. **Resolução CNS/MS nº 04, de 24 de novembro de 1988.** Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Resolucao\\_04\\_1988.pdf/7311a4d9-d5db-44d6-adbd-c7e6891d079d](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Resolucao_04_1988.pdf/7311a4d9-d5db-44d6-adbd-c7e6891d079d)>. Acesso em: 22 dez. 2016.
- Brasil. **Resolução RDC nº 28, de 23 de fevereiro de 2001.** Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_28\\_2001.pdf/3cece61-4ef8-4b85-aae2-f52177542895](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_28_2001.pdf/3cece61-4ef8-4b85-aae2-f52177542895)>. Acesso em: 22 dez. 2016.
- Campoy S, Adrio JL. 2016. **Antifungals.** *Biochem. Pharmacol.* Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.019>> . Acesso em: 30 dez. 2016.
- Food And Drug Administration (FDA). **Natamycin (pimaricin).** Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=172.155>>. Acesso em: 15 jan. 2017.
- Motoa G, Muñoz JS, Oñate J, Pallares CJ, Hernández C, Villegas MV. 2016. **Epidemiology of *Candida* isolates from Intensive Care Units in Colombia from 2010 to 2013.** *Rev Iberoam Micol.* Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2016.02.006>> Acesso em: 23 jan. 2017.
- Pu S, Niu S, Zhang C, Xu X, Qin M, Huang S, Zhang L. 2015. **Epidemiology, antifungal susceptibilities, and risk factors for invasive candidiasis from 2011 to 2013 in a teaching hospital in southwest China.** *J Microbiol Immunol Infect.* Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2015.01.005>>. Acesso em: 25 jan. 2017.