

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

Fernanda Cristina Possamai Rossatto

**Atividade antimicrobiana e antivirulência
de compostos provenientes de fonte natural**

Porto Alegre

2021

Fernanda Cristina Possamai Rossatto

Atividade antimicrobiana e antivirulência de compostos provenientes de fonte natural

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Biociências da Fundação Universidade
Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
como requisito para a obtenção do grau de
Doutor

Orientador(a): Dra. Karine Rigon Zimmer
Coorientador(a): Dr. Pedro Alves d'Azevedo

**Porto Alegre
2021**

Catlogação na Publicação

Possamai Rossatto, Fernanda Cristina Atividade antimicrobiana e antivirulência de compostos provenientes de fonte natural / Fernanda Cristina Possamai Rossatto. -- 2021.

222 f. : 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2021.

Orientador(a): Karine Rigon Zimmer ;
coorientador(a):

Pedro Alves d'Azevedo.

1. Microbiologia. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Atividade antivirulência. 4. Uva. I. Título.

INSTITUIÇÃO E FONTES FINANCIADORAS

Instituição:

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA);

Laboratório de Microbiologia Molecular da UFCSPA;

Laboratório de Biofilmes e Modelos Alternativos (Biomodal).

Fontes financiadoras:

Programa de Bolsas da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – bolsa de doutorado sanduíche no exterior;

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Dedico este trabalho aos meus pais, Jurema e Leo.

Ao meu irmão, Eduardo.

Ao meu namorado, Willian.

AGRADECIMENTOS

A Deus, maior fonte de força espiritual.

À minha orientadora, professora Dra. Karine Rigon Zimmer, pela confiança depositada em mim, paciência, aprendizado e pelo alicerce científico construído ao longo deste período. Obrigada pelos ensinamentos, incentivos e por sempre me auxiliar a desenvolver o meu potencial.

Ao meu coorientador, professor Dr. Pedro Alves d'Azevedo, pela oportunidade e por sempre manter as portas abertas para o meu desenvolvimento acadêmico. Obrigada por participar da construção do meu conhecimento desde a iniciação científica durante a graduação.

À CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche, e a todos os órgãos de fomento que permitiram a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da UFCSPA, pelo suporte, estrutura e conhecimentos adquiridos.

À toda equipe e colegas dos Laboratórios de Microbiologia Molecular e Laboratório de Cocos Gram-positivos, pelos momentos de trabalho, alegria e auxílio mútuo.

A todo o grupo Biomodal, pela amizade e trocas de conhecimento estabelecidas neste período. Grupo que levo no coração e considero como família. Aos queridos alunos de iniciação científica Camila, Nathasha e Dérik, obrigada por todo o auxílio, disposição em aprender e em me ensinar, e momentos divertidos que passamos juntos!

À professora Dra. Danielle Trentin e todo o grupo de pesquisa Bacmea pelas conexões e cooperações estabelecidas entre nossos grupos, foram muito proveitosas. Em especial, ao Hélber, pelas dicas sobre o manejo de *Galleria mellonella*.

À professora Dra. Marla, do laboratório de Farmacociências da UFCSPA, pela parceria nos projetos do grupo. Obrigada aos alunos Sabrina e Luiz, pelos aprendizados e trocas de conhecimento.

À professora Dra. Aline Rigon Zimmer, por todo o auxílio e por disponibilizar os espaços e materiais da Faculdade de Farmácia da UFRGS para condução de experimentos. Um agradecimento especial à querida Thaís Ruaro, sempre disponível em me ajudar.

Ao professor Eduardo Pilau e equipe da Universidade de Maringá, pela parceria nos ensaios de metabólica. Obrigada por serem sempre muito solícitos e dispostos a ensinar.

À professora Dra. Daiana Ávila e toda equipe do GBtoxCe da Unipampa. Muito obrigada pela oportunidade de aprender mais sobre *Caenorhabditis elegans*. A experiência que tive em Uruguiana foi não somente de crescimento profissional, mas pessoal. Foi uma das melhores experiências da minha vida. Pelo profissionalismo, dedicação e pelos inúmeros momentos divertidos que tive com todo o grupo. Um agradecimento especial às queridas Carol e Flávia. Obrigada pela parceria nos ensaios com *C. elegans*.

Ao professor Eleftherios Mylonakis, por ter proporcionado minha experiência de doutorado sanduiche, na qual tive a oportunidade de aprender muito sobre *drug discovery* e fungos. Pela simpatia, dedicação e conhecimento transmitidos. Pela gentileza e hospitalidade. Gratidão à toda equipe do departamento de Doenças Infecciosas do Rhode Island Hospital e Brown University. Um agradecimento especial à Dra. Iliana Escobar, pela amizade, contribuição, ensinamentos e parceria.

À vinícola Valduga, em especial ao enólogo Andrei Bellé, por ter gentilmente cedido as amostras de resíduo da uva.

Às minhas colegas de trabalho, pela paciência e por muito me ajudarem neste período do doutorado. Em especial, à amiga Sandra pelos momentos divertidos e força ante às aflições.

À Thayse, pela imensurável contribuição na minha jornada. Obrigada por ter me fortalecido nesse caminho e por ter feito a diferença na minha vida me ensinando tanto.

Aos meus pais, Jurema e Leo, e ao meu irmão Eduardo, pelos exemplos de vida, dedicação e força. Por todo o esforço e educação recebida. Gratidão pela paciência, por confiarem em mim, pelo apoio e carinho. Ao meu namorado Willian, por estar do meu lado sempre, pelo incentivo e companheirismo. Obrigada por acreditarem no meu sonho. Amo vocês.

Às minhas grandes amigas Carolina, Vanessa, Amanda, Eduarda, Géssica, Nathália, Priscila, Aline, Gabriela, Adriane, Eliese, Carol. Obrigada por sempre me estimularem, terem paciência, me alegrarem e tornarem meus dias melhores.

Obrigada a todos que, de algum modo, contribuíram para meu crescimento, seja ele científico e/ou pessoal. Vocês me ajudaram a me tornar quem sou hoje.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	13
RESUMO.....	15
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Antimicrobianos e resistência antimicrobiana	20
1.2. Estratégias antivirulência	23
1.3. Biofilmes microbianos	27
1.3.1. Formação do biofilme.....	30
1.3.2. Resistência do biofilme aos antimicrobianos	35
1.3.3. Impacto do biofilme nas indústrias e no ambiente hospitalar	38
1.4. Microrganismos de importância clínica	40
1.4.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	40
1.4.2. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	43
1.4.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	45
1.4.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48
1.4.5. <i>Candida</i> spp.....	51
1.5. Desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos e antivirulência	58
1.6. Compostos naturais como estratégias antimicrobianas e antivirulência	62
1.7. Uva	67
1.7.1. Resíduos da uva.....	71
2. OBJETIVOS	77

2.1. Objetivo geral.....	77
2.2. Objetivos específicos.....	77
3. RESULTADOS	79
3.1. Artigo I	79
3.2. Artigo II.....	146
3.3. Artigo III	173
4. DISCUSSÃO	183
5. CONCLUSÕES.....	189
6. PERSPECTIVAS.....	191
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	193
8. CURRÍCULO LATTES.....	212

LISTA DE ABREVIATURAS

AE: ácido elágico

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

CAPE: ácido cafeico fenetil éster

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

cKp: *classical Klebsiella pneumoniae*

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

ESBL: *Extended-Spectrum β -Lactamases*

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FQRP: *Pseudomonas aeruginosa* resistente às fluoroquinolonas

HIV: vírus da imunodeficiência humana

hvKp: *hypervirulent Klebsiella pneumoniae*

MRSA: *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*

MSCRAMM: *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBP: *Penicillin Binding Protein*

pH: Potencial Hidrogeniônico

PIA: *Polysaccharide Intercellular Adhesion*

SCC*mec*: cassete cromossômico estafilocócico *mec*

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

VRE: *Vancomycin-Resistant Enterococcus*

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Linha do tempo do desenvolvimento da resistência ao longo dos anos.

Figura 2. Número de antimicrobianos aprovados e evolução da resistência aos antimicrobianos ao longo das décadas. Conforme as bactérias se tornam mais resistentes aos antimicrobianos, a pesquisa de novas opções terapêuticas diminui e um número menor de novos antimicrobianos é aprovado. *Proporção de isolados clínicos que são resistentes aos antimicrobianos. MRSA, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. VRE, *Enterococcus* resistente à vancomicina. FQRP, *Pseudomonas aeruginosa* resistente às fluoroquinolonas.

Figura 3. Fatores de virulência microbianos alvos de agentes antivirulência.

Figura 4. Imagens de microscopia eletrônica de varredura demonstrando o processo de desenvolvimento de um biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*. As imagens A, B e C representam os tempos de incubação de 6, 24 e 48 horas, respectivamente, a 37°C, com magnificação de 22.000X.

Figura 5. Etapas da formação do biofilme. Inicialmente, células planctônicas se aderem reversivelmente a superfícies. Após adesão irreversível e formação de microcolônias, há o desenvolvimento do biofilme maduro bem estruturado pela matriz polimérica extracelular. O sistema de comunicação celular *quorum sensing* estabelece a manutenção e crescimento do biofilme, bem como, frente a determinadas condições ambientais, sua dispersão e retorno ao modo de vida planctônico.

Figura 6. Mecanismos de resistência do biofilme aos antimicrobianos.

Figura 7. Infecções relacionadas a dispositivos médicos e infecções crônicas associadas ao tecido do hospedeiro.

Figura 8. *S. aureus* no plasma humano na presença de proteína de ligação ao fibrinog extracelular e visualizado por microscopia eletrônica de varredura.

Figura 9. (a) Coloração de Gram de *S. epidermidis*, visualizado por microscopia de campo claro, magnificação de 1000x; (b) Microscopia eletrônica de varredura de *S. epidermidis*; (c) Biofilme de *S. epidermidis* em um substrato de titânio.

Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura de emissão de campo de biofilme proveniente de isolado clínico de *K. pneumoniae*.

Figura 11. a) Biofilme de *P. aeruginosa* na superfície de uma pedra, escala 10 μm . (b) Detalhe do biofilme mostrando a bactéria no seu formato bacilar e a matriz polimérica conectando as células bacterianas, escala 1 μm .

Figura 12. Ilustração e microscopia das morfologias de *C. albicans*: hifa verdadeira, pseudo-hifa e levedura.

Figura 13. Classificação botânica e estrutura do cacho da uva e suas partes.

Figura 14. Diagrama simplificado das etapas de elaboração de sucos e vinhos e seus respectivos resíduos gerados ao longo do processo.

Figura 15. Estruturas das principais classes de compostos fenólicos.

Figura 16. Principais compostos encontrados nas diferentes partes do resíduo da uva.

Figura 17. Estágios de desenvolvimento do nematoide *C. elegans*, desde eclosão do ovo até o adulto hermafrodita.

Figura 18. Injeção na última *pro-leg* de larva de *G. mellonella* e seu processo de melanização ao longo do tempo. Quanto mais melanizada a larva, mais escura ela estará. Larvas com processo completo de melanização estão mortas e servem como indicativo em ensaios de toxicidade e eficácia de compostos.

RESULTADOS

ARTIGO I

Figure 1. Effect of grape residue extracts on inhibition of biofilm formation and bacterial growth.

Figure 2. Effect of grape residue extracts on biofilm eradication.

Figure 3. Effect of fractions 8 and 11 on inhibition of biofilm formation and bacterial growth.

Figure 4. Mass spectral molecular networks used for neighborhood classification of secondary metabolites from the analysis of methanolic extracts, aqueous extracts and fractions F8 and F11.

Figure 5. Loading plot of the main components of the principal component analysis.

Figure 6. Score plots of the main components of the principal component analysis.

Figure 7. Survival rate after acute and chronic exposure to CR-M, FR-M and CR-W extracts at different concentrations in *C. elegans*.

Figure 8. Worms body length after acute and chronic exposure to CR-M, FR-M and CR-W extracts at different concentrations.

Figure 9. Surface area of worms after acute and chronic exposure to CR-M, FR-M and CR-W extracts at different concentrations.

Figure 10. Number of larvae during 4 days after acute and chronic exposure to CR-M, FR-M and CR-W extracts at different concentrations.

Figure 11. Brood size after acute and chronic exposure to CR-M, FR-M and CR-W extracts at different concentrations.

ARTIGO II

Figure 1. Time-kill curves obtained by incubating *C. auris* CAU-04 and *C. albicans* SC5314 strains with increasing concentrations of EA, CAPE and FLC.

Figure 2. Effect of EA and CAPE on proteinase and phospholipase production.

Figure 3. Inhibition of biofilm formation and eradication of mature biofilm by EA, CAPE, and FLC against *C. auris* CAU-04 and *C. albicans* SC5314 strains.

Figure 4. Fluorescence microscopy comparison of *C. auris* and *C. albicans* biofilms grown in the presence of CAPE and fluconazole.

Figure 5. Cytotoxicity of EA and CAPE in human red blood cells.

Figure 6. Effects of EA and CAPE on *C. auris* and *C. albicans* virulence using the cell line A549.

Figure 7. Kaplan–Meier survival curves of infected *G. mellonella* larva.

Figure 8. Kaplan–Meier survival curves of infected *C. elegans*.

Supplementary Figure S1: *C. albicans* filamentation assay.

Supplementary Figure S2: Toxicity of EA and CAPE and survival profile of *G. mellonella* when infected with *C. auris* and *C. albicans*.

DISCUSSÃO

Figura 19. Esquematização das etapas realizadas e perspectivas deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1. Lista de agentes antivirulência que foram aprovados ou estão em estágio de desenvolvimento.

Tabela 2. Fatores relacionados à adesão celular microbiana, formação e desenvolvimento de biofilmes.

Tabela 3. Exemplos de plantas com reconhecida atividade antimicrobiana.

Tabela 4. Principais classes de compostos oriundos de plantas com atividade antimicrobiana.

RESULTADOS

ARTIGO I

Table 1. Grape residues used in the study and their extraction yield percentage by ultrasound method.

Table 2. Antibacterial activity of grape residues extracts against clinical strains.

Table 3. Synergy analysis between grape residues extracts and antibiotics on *S. aureus* and *S. epidermidis* growth.

Table 4. Molecular diversity of grape residue extracts and fractions (F8 and F11).

Supplementary Table S1. Dose-response curve of dichloromethane and aqueous extracts against *S. aureus*, *S. epidermidis* and *K. pneumoniae*.

ARTIGO II

Table 1. Antifungal susceptibility of phenolic compounds against *Candida* spp.

Table 2. MIC values ($\mu\text{g/mL}$) of EA, CAPE and caspofungin against *C. auris* CAU-04 and *C. albicans* SC5314 and in the presence (+) and absence (-) of sorbitol (S).

Table 3. MIC values ($\mu\text{g/mL}$) of EA, CAPE, and amphotericin B against *C. auris* CAU-04 and *C. albicans* SC5314 and in the presence (+) and absence (-) of ergosterol.

Supplementary Table S1: *Candida* strains used in this study.

Supplementary Table S2: Antifungal susceptibility of antifungal agents against *Candida* spp.

Supplementary Table S3: Anti-biofilm activities of EA, CAPE and FLC against *Candida* isolates.

RESUMO

O resíduo do processamento da uva representa uma fonte importante de compostos renováveis, cuja atividade biológica permanece pouco estudada. Estes resíduos são produzidos em grandes quantidades, podendo causar danos ambientais. Neste sentido, a busca por compostos bioativos com propriedades antimicrobianas e antivirulência nesta matéria-prima é uma alternativa interessante. Uma série de metabolitos secundários – como os compostos fenólicos – são produzidos pela uva, exercendo funções protetivas contra agentes patogênicos. Eles são estratégias promissoras em virtude de sua diversidade estrutural e amplo espectro de propriedades biológicas. Em paralelo, há uma necessidade urgente por novas opções terapêuticas para o controle de infecções causadas por bactérias e fungos, principalmente infecções associadas a biofilmes, as quais são de difícil controle e tratamento. Por estas razões, o presente trabalho teve como objetivo principal a busca por estratégias antimicrobianas e antivirulência – com foco na pesquisa antibiofilme – no controle de infecções bacterianas e fúngicas. Numa primeira etapa, foi investigado o potencial de extratos e frações provenientes do resíduo da uva no controle de biofilmes bacterianos. Para este objetivo, três variedades de resíduos da uva foram coletadas: a uva branca Chardonnay (*Vitis vinifera*) e as uvas tintas Cabernet Franc (*Vitis vinifera*) e Bordô (*Vitis labrusca*). Extração assistida por ultrassom foi conduzida de forma exaustiva com diclorometano, metanol e água. Quatro modelos bacterianos foram utilizados: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. A atividade antimicrobiana foi mensurada pela obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) e por meio da leitura da OD_{620nm}. Possível efeito sinérgico foi verificado através de combinações entre os extratos e antimicrobianos convencionais. A atividade antibiofilme dos extratos a 5 mg/mL foi avaliada através da metodologia do cristal violeta. Os extratos apresentaram valor de CIM entre 1,25 mg/mL e 5 mg/mL contra os microrganismos testados e observou-se efeito sinérgico entre o extrato aquoso da uva Cabernet Franc e o antimicrobiano oxacilina, e extrato aquoso da uva Chardonnay e vancomicina contra os modelos Gram-positivos. O resíduo da uva Chardonnay extraído com diclorometano apresentou os melhores resultados para todas as bactérias testadas, inibindo a formação do biofilme sem inibir o crescimento bacteriano. Este extrato foi submetido à

cromatografia em coluna de fase normal. Duas frações apresentaram atividade antibiofilme, prevenindo a adesão de *S. aureus* e *S. epidermidis* à superfície de poliestireno em 80% a 0,62 mg/mL e inibindo o biofilme de *K. pneumoniae* em 25% a 0,31 mg/mL. As frações e extratos foram analisados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (UHPLC-ESI-MS/MS) e indicaram a presença de ácidos graxos, polifenóis, alcaloides e aminoácidos. Além disso, a toxicidade dos extratos foi avaliada em modelo invertebrado de *Caenorhabditis elegans*, demonstrando que os mesmos não afetaram a sobrevivência, tamanho e progenia do nematoide. Numa segunda etapa, os polifenóis ácido elágico (AE) e ácido cafeico fenetil éster (CAPE) foram avaliados quanto às suas atividades antifúngicas contra *Candida* spp. Para este propósito, os compostos puros foram adquiridos comercialmente e tiveram a atividade antifúngica contra *C. albicans* SC5314 e um painel de 10 isolados de *Candida auris* multirresistentes avaliada por microdiluição em caldo e por ensaio do *time-kill*. AE e CAPE apresentaram valores de CIM \leq 0,5 μ g/mL e entre 1 a 64 μ g/mL, respectivamente. AE apresentou efeito fungistático e CAPE fungicida para ambas as espécies de *Candida*. O mecanismo de ação dos compostos foi investigado pelo ensaio de proteção do sorbitol e pelo ensaio de ligação ao ergosterol, indicando provável ação sobre a parede celular fúngica. CAPE foi capaz de inibir a produção de fosfolipases, biofilmes e filamentação, além de inibir a adesão de *C. albicans* ou *C. auris* a células epiteliais do pulmão. AE e CAPE não foram tóxicos a hemácias em todas as concentrações testadas (até 64 μ g/mL), nem ao modelo *in vivo* de *Galleria mellonella* (até 128 mg/kg). Quando *G. mellonella* foi pré-tratada com AE ou CAPE (32 mg/kg) antes da infecção por *C. albicans* ou *C. auris*, a taxa de sobrevivência da larva foi significativamente prolongada, com uma taxa de sobrevivência de 44% para ambos os compostos. Além disso, AE, a 4 μ g/mL, prolongou em 40% a sobrevivência do nematoide *C. elegans* infectado com *C. albicans*. Em conjunto, estes resultados demonstram o potencial antibacteriano e antifúngico de metabólitos secundários de fonte natural, dentre eles, extratos e frações provenientes do resíduo da uva, e compostos da classe dos polifenóis. Em conclusão, compostos de origem natural representam uma fonte promissora de moléculas antimicrobianas e antivirulência. O desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos a partir destas fontes enseja amenizar a problemática da resistência antimicrobiana e da escassez de opções terapêuticas para o controle de infecções.

Palavras-chave: resíduo da uva; ácido elágico; ácido cafeico fenetil éster; atividade antimicrobiana; atividade antibiofilme; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*; *K. pneumoniae*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Candida albicans*; *Candida auris*.

ABSTRACT

Grape residue represents an important source of renewable compounds, whose biological activity remains little studied. These residues are produced in large quantities and can cause environmental damage. In this way, the search for bioactive compounds with antimicrobial properties in this raw material is an interesting alternative. A series of secondary metabolites – such as phenolic compounds – are produced by grapes, exerting protective functions against pathogens. They are promising strategies due to their structural diversity and broad spectrum of biological properties. In parallel, there is an urgent need for new therapeutic options for the control of infections caused by bacteria and fungi, especially biofilm-associated infections, which are difficult to control and treat. For these reasons, the aim of this study was to investigate antimicrobial and antivirulence strategies – focusing on antibiofilm activity – to control bacterial and fungal infections. In a first step, the potential of extracts and fractions from grape residue to control bacterial biofilms was investigated. For this purpose, three varieties of grape residues were collected: the white grape Chardonnay (*Vitis vinifera*) and the red grapes Cabernet Franc (*Vitis vinifera*) and Bordô (*Vitis labrusca*). Ultrasound-assisted extraction was conducted serially with dichloromethane, methanol and water. Four bacterial models were used: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial activity was measured by obtaining the minimum inhibitory concentration (MIC) and by reading the OD_{620nm}. A possible synergistic effect was verified through combinations between extracts and conventional antimicrobials. The antibiofilm activity of the extracts at 5 mg/mL was evaluated using the crystal violet methodology. The extracts presented MIC values ranging from 1.25 mg/mL to 5 mg/mL against the tested microorganisms and a synergistic effect was observed between the aqueous extract of Cabernet Franc grape and the antimicrobial oxacillin, and between aqueous extract of Chardonnay grape and vancomycin against Gram-positive models. The Chardonnay grape residue extracted with dichloromethane showed the best results for all tested bacteria, inhibiting biofilm formation without inhibiting bacterial growth. This extract was subjected to normal phase column chromatography. Two fractions showed antibiofilm activity, preventing adhesion of *S. aureus* and *S. epidermidis* to the polystyrene surface by 80% to 0.62 mg/mL, and inhibiting biofilm of *K. pneumoniae* by

25% at 0.31 mg/mL. Fractions and extracts were analyzed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UHPLC-ESI-MS/MS) and indicated the presence of fatty acids, polyphenols, alkaloids and amino acids. Furthermore, the toxicity of the extracts was evaluated in an invertebrate model of *Caenorhabditis elegans*, demonstrating that they did not affect nematode survival, body size and brood size. In the second step, the polyphenols ellagic acid (EA) and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) were evaluated for their antifungal activities against *Candida* spp. For this purpose, pure compounds were purchased and had their antifungal activity against *C. albicans* SC5314 and a panel of 10 multi-resistant *Candida auris* isolates evaluated by broth microdilution and time-kill assay. EA and CAPE had MIC values ≤ 0.5 $\mu\text{g/mL}$ and from 1 to 64 $\mu\text{g/mL}$, respectively. EA showed fungistatic and CAPE fungicidal effect for both *Candida* species. The mechanism of action of the compounds was investigated by the sorbitol protection assay and by the ergosterol binding assay, indicating a probable action on the fungal cell wall. CAPE was able to inhibit the production of fungal phospholipases, biofilm and filamentation, in addition to inhibiting the adhesion of *C. albicans* or *C. auris* to lung epithelial cells. EA and CAPE were not toxic to red blood cells at all concentrations tested (up to 64 $\mu\text{g/mL}$), nor to the *in vivo* model of *Galleria mellonella* (up to 128 mg/kg). When *G. mellonella* was pretreated with EA or CAPE (32 mg/kg) prior to *C. albicans* or *C. auris* infection, the larval survival rate was significantly prolonged, with a 44% survival rate for both the compounds. Furthermore, EA, at 4 $\mu\text{g/mL}$, prolonged the survival of the nematode *C. elegans* infected with *C. albicans* by 40%. Taken together, these results demonstrate the antibacterial and antifungal potential of secondary metabolites from natural sources, including extracts and fractions from grape residues, and polyphenolic compounds. In conclusion, compounds of natural origin represent a promising source of antimicrobial and antivirulence molecules. The development of novel antimicrobial agents from these sources aims to alleviate the problem of antimicrobial resistance and the scarcity of therapeutic options for infection control.

Keywords: grape residue; ellagic acid; caffeic acid phenethyl ester; antimicrobial activity; antibiofilm activity; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*; *K. pneumoniae*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Candida albicans*; *Candida auris*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Antimicrobianos e resistência antimicrobiana

A resistência aos antimicrobianos é um dos maiores desafios do século XXI. Esta crise tem-se acentuado desde 2017, com o caso de uma paciente que veio à óbito por uma infecção, cujo agente patogênico apresentava resistência a 26 antimicrobianos aprovados nos Estados Unidos (CHEN et al., 2017). Anualmente, morrem em média 700.000 indivíduos no mundo em decorrência de infecções causadas por microrganismos resistentes. Este cenário pode se agravar a 10 milhões de mortes anuais, mundialmente, em 2050, de acordo com estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2019). O impacto econômico também poderá se acentuar, considerando que se gasta anualmente mais de 20 bilhões de dólares para combater microrganismos resistentes somente nos Estados Unidos (STRATHDEE; DAVIES; MARCELIN, 2020).

A era moderna dos antimicrobianos iniciou-se com a descoberta da penicilina por Alexandre Fleming, em 1928 (SENGUPTA; CHATTOPADHYAY; GROSSART, 2013). Desde então, os antimicrobianos transformaram a Medicina e salvaram milhões de vidas. Entre 1935 e 2003, quatorze novas classes de antimicrobianos foram introduzidas, sendo que o período compreendido entre 1940 a 1960 foi conhecido como a “Era de Ouro dos Antimicrobianos”, em decorrência da grande quantidade de antimicrobianos lançados (SHRESTHA; ZAHRA; JR CANNADY, 2021; SILVA et al., 2016). Entretanto, nas últimas décadas, observou-se um hiato na descoberta de novos antimicrobianos. Além disso, quase todos novos antimicrobianos lançados são variações das classes de fármacos descobertos em décadas anteriores. Há um número pequeno de novos compostos em fase experimental clínica que podem dar um fim à essa lacuna, todavia, em muitos casos, o sucesso de seu desenvolvimento é incerto (SILVER, 2011). De fato, cerca de 60% das moléculas que entram na fase 3 de estudos clínicos são aprovadas. Atualmente, apenas 43 novos antimicrobianos estão em desenvolvimento em ensaios clínicos, sendo que 25% destes apresentam novo mecanismo de ação. Nenhum destes antimicrobianos é potencialmente ativo contra as maiores ameaças críticas definidas pela OMS (PEW CHARITABLE TRUSTS, 2021). As prováveis razões que levam a este vácuo no

lançamento de novos antimicrobianos incluem custos de produção, tempo de desenvolvimento e lucros inferiores a outros fármacos utilizados para tratamento de doenças crônicas (SHRESTHA; ZAHRA; JR CANNADY, 2021).

Em contrapartida à escassez de novos agentes antimicrobianos, o surgimento da resistência se tornou um problema substancial, limitando a efetividade daqueles em corrente uso (SENGUPTA; CHATTOPADHYAY; GROSSART, 2013). A resistência ocorre quando um microrganismo neutraliza um antimicrobiano, resultando em ineficiência do fármaco e infecções persistentes, com um aumento subsequente nos riscos de transmissão e mortalidade (HAY et al., 2018). A resistência apresentada pelo microrganismo pode ser intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca ocorre quando o microrganismo apresenta mecanismos de resistência inerentes, já a adquirida ocorre através de mutações nos próprios genes ou pela transmissão horizontal de genes via outros microrganismos, sejam eles comensais, patógenos humanos ou não-humanos. O repertório de possíveis mecanismos que conferem resistência ao patógeno inclui modificação química e quebra estrutural do agente antibacteriano, efluxo do mesmo, proteção ou mudanças específicas do alvo e diminuição da permeabilidade da membrana celular (SILVER, 2011). Os principais motivos que levam ao aumento da resistência são, além da falta de novos antimicrobianos com diferentes mecanismos de ação, uso desenfreado dos mesmos, falta de controle regulatório em alguns países, exposição recorrente a desinfetantes, uso inapropriado por humanos e animais, como, por exemplo, administração de antimicrobianos em caso de infecção viral e uso de promotores de crescimento na pecuária (HAY et al., 2018; PERAMAN et al., 2021).

A demanda por novos agentes antimicrobianos cresceu devido ao aumento da resistência, uma vez que se observa resistência a praticamente todos antimicrobianos que foram desenvolvidos. Muitos antimicrobianos que eram altamente eficientes no passado, se tornaram obsoletos nos últimos anos. Por isto, após décadas do primeiro tratamento com antimicrobiano, infecções bacterianas e fúngicas novamente representam uma ameaça de difícil controle (SENGUPTA; CHATTOPADHYAY; GROSSART, 2013; VENTOLA, 2015). Para compreensão da magnitude desta problemática, em 2013, a agência norte-americana *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) declarou que a sociedade vive numa “era pós-antibiótica” (CDC, 2013a) e, em 2014, a OMS alertou que a crise da resistência antibiótica está

se tornando perigosa (WHO, 2014). A Figura 1 ilustra, numa linha do tempo, os paralelos entre a descoberta de novos antimicrobianos e o advento da resistência aos mesmos.

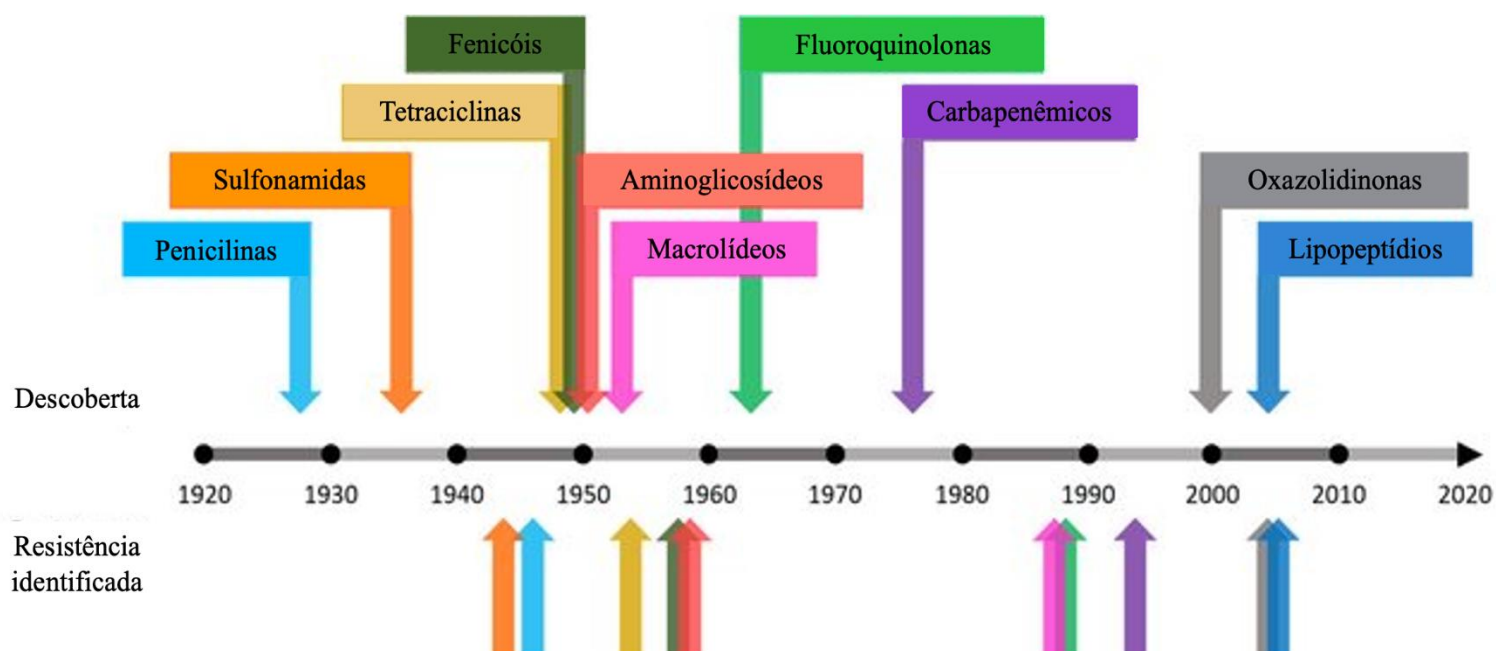


Figura 1. Linha do tempo do desenvolvimento da resistência ao longo dos anos (adaptado de ÁLVAREZ-MARTÍNEZ; BARRAJÓN-CATALÁN; MICOL, 2020).

O impacto das infecções associadas a patógenos resistentes se dá não somente no ambiente hospitalar, com quadros severos e persistentes, além dos altos índices de mortalidade e morbidade, mas também na comunidade de forma geral, setores agrícolas, ambientais e socioeconômicos (KHARE et al., 2021; MICHAEL; DOMINEY-HOWES; LABBATE, 2014). Considerando este panorama do aumento da resistência atrelado à diminuição do desenvolvimento de novos antimicrobianos ao longo dos anos (Figura 2), faz-se iminente a

busca e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, que sejam seguros e efetivos (COOPER; SHLAES, 2011).

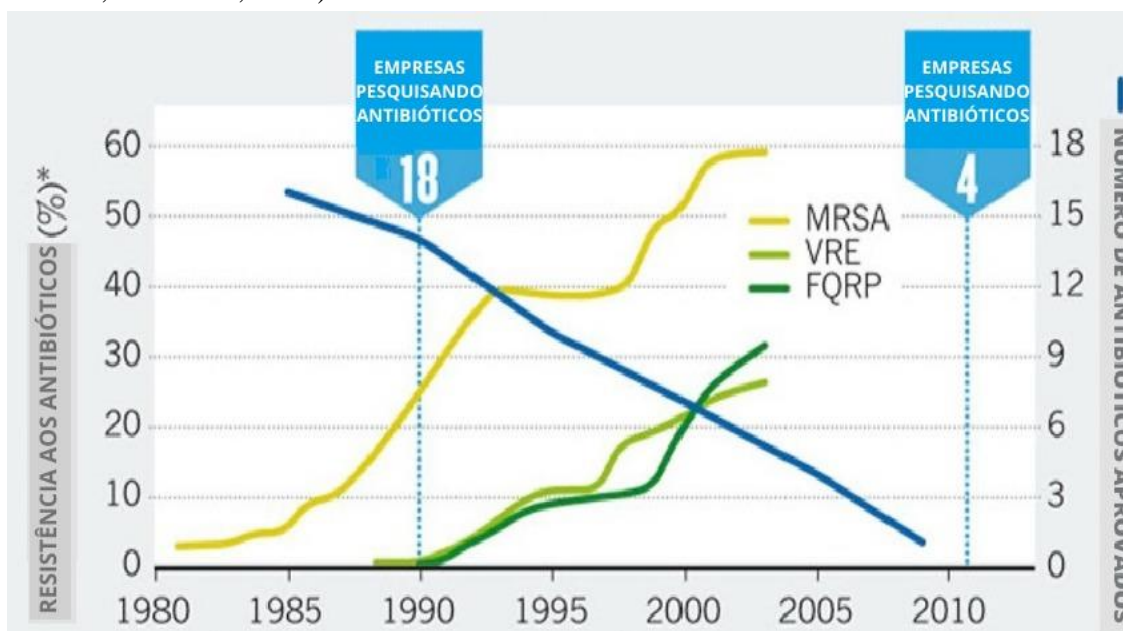


Figura 2. Número de antimicrobianos aprovados e evolução da resistência aos antimicrobianos ao longo das décadas. Conforme as bactérias se tornam mais resistentes aos antimicrobianos, a pesquisa de novas opções terapêuticas diminui e um número menor de novos antimicrobianos é aprovado. *Proporção de isolados clínicos que são resistentes aos antimicrobianos. MRSA, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. VRE, *Enterococcus* resistente à vancomicina. FQRP, *Pseudomonas aeruginosa* resistente às fluoroquinolonas (adaptado de COOPER; SHLAES, 2011).

1.2. Estratégias antivirulência

Na busca de novos agentes terapêuticos, uma série de estratégias têm sido exploradas, sejam elas compostos de origem natural ou moléculas quimicamente sintetizadas. Novas terapias incluem compostos antivirulência, peptídeos antimicrobianos e reposicionamento de fármacos (PACIOS et al., 2020). Dentre estas alternativas, o interesse por estratégias antivirulência tem crescido nos últimos anos. Os fatores de virulência são estruturas, produtos ou estratégias dos microrganismos que promovem doença através do dano direto ou indireto ao hospedeiro, ou ainda pela evasão do sistema imune. Dentre eles, pode-se citar toxinas,

substâncias adesinas, invasinas, pigmentos, surfactantes, cápsula, flagelo, sideróforos, fatores regulatórios como o *quorum sensing*, e biofilmes (DICKY; CHEUNG; OTTO, 2017; RASKO; SPERANDIO, 2010; WILSON, 2002). A Figura 3 demonstra alguns dos fatores de virulência microbianos que podem ser alvos de agentes antivirulência.

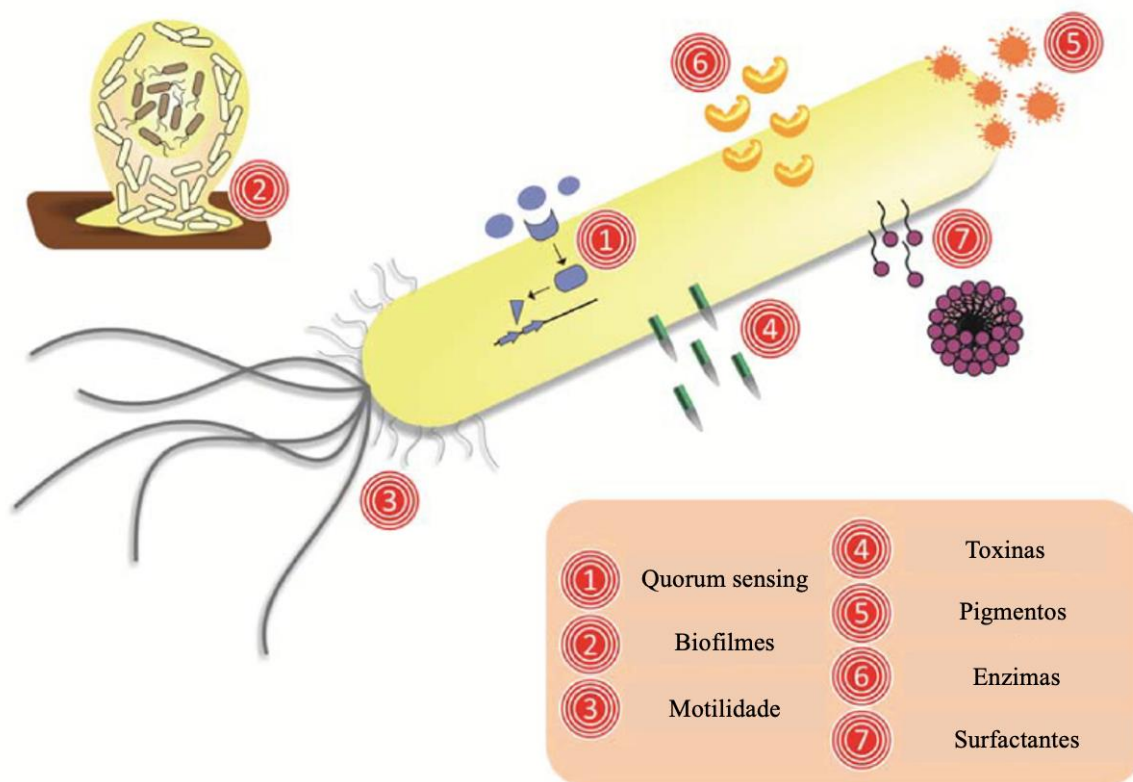


Figura 3. Fatores de virulência microbianos alvos de agentes antivirulência (adaptado de SILVA et al., 2016).

A terapia antivirulência tem como objetivo interferir nestes determinantes de virulência sem afetar o crescimento bacteriano ou fúngico. Isto significa que os compostos antivirulência focam na inibição ou neutralização dos fatores de virulência ao invés de vias centrais do crescimento ou viabilidade microbianos, tornando a infecção menos severa e, portanto, de maior controle pelo sistema imune do hospedeiro (DICKY; CHEUNG; OTTO, 2017; PACIOS et al., 2020; SILVA et al., 2016). Ainda, alterações na expressão de fatores de virulência, atrelada à manutenção das células em estado planctônico, pode tornar os microrganismos mais sensíveis

aos antimicrobianos. Além disso, esta terapia pode ser empregada potencialmente em combinação com agentes antimicrobianos, de modo a estabelecer um efeito sinérgico (HADJIFRANGISKOU; BRANNON, 2016; RASKO; SPERANDIO, 2010).

Compostos antivirulência apresentam uma série de vantagens frente aos antimicrobianos convencionais, uma vez que os fatores de virulência não são essenciais para a sobrevivência microbiana. Dentre elas, pode-se destacar: (i) redução da pressão seletiva e, portanto, contornando ou adiando o desenvolvimento da resistência; (ii) pequeno ou nenhum impacto sobre a microbiota do hospedeiro; (iii) capacidade de inativar o alvo rapidamente; (iv) aumento do repertório de alvos farmacológicos; (v) descoberta de diferentes e novos mecanismos de ação; (vi) possibilidade de uso em combinação com antimicrobianos ou contribuição da eficácia destes; (vii) alguns tipos de compostos antivirulência – inibidores do *quorum sensing* – são capazes de inibir a produção de múltiplos fatores de virulência (DICKEY; CHEUNG; OTTO, 2017; M CAMPOS; ANTUNES; FERREIRA, 2020; RASKO; SPERANDIO, 2010; SILVA et al., 2016; TOTSIKA, 2016).

Não obstante, a terapia antivirulência pode apresentar algumas limitações, incluindo: (i) necessidade de combinação para atingir múltiplos alvos ou fatores de virulência variáveis entre diferentes cepas; (ii) requerimento de rápida identificação do agente patogênico; (iii) atraso terapêutico no caso de alvos regulatórios ou biossintéticos; (iv) persistência do microrganismo após término do tratamento; (v) efeito terapêutico inferior a antimicrobianos; (vi) ineficácia em todas formas de doença pelo mesmo patógeno; (vii) espectro de ação restrito ou espécie-específico (DICKEY; CHEUNG; OTTO, 2017; RASKO; SPERANDIO, 2010; TOTSIKA, 2016).

Embora a maioria dos compostos antivirulência estudados esteja em estágio pré-clínico, alguns já foram aprovados para uso ou entraram em ensaios clínicos. Os compostos aprovados são atualmente limitados a bloqueadores de exotoxinas, enquanto que aqueles em ensaios clínicos são direcionados a adesinas ou ao *quorum sensing* (DICKEY; CHEUNG; OTTO, 2017). A Tabela 1 exemplifica alguns dos agentes antivirulência já aprovados para uso ou que se encontram em estágio de desenvolvimento.

Tabela 1. Lista de alguns agentes antivirulência que foram aprovados ou estão em estágio de desenvolvimento (adaptado de DICKEY; CHEUNG; OTTO, 2017; WHO, 2021).

Nome do composto	Alvo molecular	Microrganismo	Estágio de desenvolvimento
MEDI4893	α -toxina	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ensaio clínico de fase II
AR-301	α -toxina	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ensaio clínico de fase II
6e	SrtA	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ensaio pré-clínico, incluindo modelos animais
Savirina	AgrA	<i>Staphylococcus aureus</i>	Ensaio pré-clínico, incluindo modelos animais
GSK3882347	FimH	<i>Escherichia coli</i>	Ensaio clínico (fase 1)
MEDI3902	Psl and PcrV	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ensaio clínico de fases I e II
RS2-1G9	3-Oxo-C12-AHL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ensaio pré-clínico
E22	RhlR	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ensaio pré-clínico
mBTL	RhlR	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ensaio pré-clínico, eficácia em <i>C. elegans</i>
itc-12 e itc13	LasR	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ensaio pré-clínico
C30	LasR	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ensaio pré-clínico, incluindo modelos animais
OligoG (CF-5/20)	Rompe as redes poliméricas de mucina	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ensaio clínico (fase 2b)
Ftortiazinon (fluorothyazinona) + cefepime	Sistema de secreção tipo III	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ensaio clínico (fase 2)

KP3	MrkA	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ensaio pré-clínico, incluindo modelos animais
Virstatina	Desconhecido, mas diminui a formação de pili	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Ensaio pré-clínico
ZBzl-YAA5911	FsrC	<i>Enterococcus faecalis</i>	Ensaio pré-clínico, incluindo modelos animais
SMITB14	Lipoarabinomanana	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Ensaio pré-clínico, incluindo modelos animais
BabyBIG	BoNT sorotipos A e B	<i>Clostridium botulinum</i>	Aprovado para uso
BAT	BoNT sorotipos A-G	<i>Clostridium botulinum</i>	Aprovado para uso
Raxibacumab	Antígeno da toxina do antrax	<i>Bacillus anthracis</i>	Aprovado para uso
Obiltoxaximab	Antígeno da toxina do antrax	<i>Bacillus anthracis</i>	Aprovado para uso
Bezlotoxumab	TcdB	<i>Clostridium difficile</i>	Aprovado para uso

Dada a incipiência e apesar dos desafios da terapia antivirulência, acredita-se que seja uma questão de tempo até que fármacos antivirulência estejam amplamente disponíveis para uso clínico. A expansão desta estratégia constitui um passo importante no combate ao arsenal de virulência microbiano, representando um papel promissor para controle de microrganismos resistentes (TOTSIKA, 2016). Dentre os alvos da terapia antivirulência, estratégias antibiofilme tem ganhado considerável atenção nos últimos anos (MISHRA et al., 2020a).

1.3. Biofilmes microbianos

Por muito tempo acreditou-se que os microrganismos se encontravam dispersos pelo ambiente como células livres; todavia, já é amplamente aceito que a maioria deles vive primariamente na forma de biofilmes (GIAOURIS et al., 2015). Estima-se que cerca de 40 a 80% dos microrganismos na Terra residam em biofilmes (FLEMMING; WUERTZ, 2019). A formação de biofilme confere aos microrganismos uma capacidade de sobrevivência aumentada em diversos ambientes, principalmente quando comparada aos seus homólogos de vida livre ou planctônicos. Embora os primeiros relatos acerca deste modo de vida datam do século XVII, por meio das descobertas de Antonie Van Leeuwenhoek sobre animálculos que se desenvolviam sobre superfícies (JAIN et al., 2007), apenas em 1978 Costerton e colaboradores sugeriram o conceito de biofilme, que foi aprimorado, ao longo dos anos, com a descrição de seus aspectos peculiares (COSTERTON; GEESEY; CHENG, 1978; DONLAN, 2002).

Biofilme é conceitualmente definido como uma comunidade complexa e estruturada de microrganismos que se encontram aderidos entre si e podem estar aderidos à uma superfície biótica ou abiótica (COSTERTON, 1995). Estas células estão embebidas em uma matriz polimérica extracelular, composta majoritariamente de polissacarídeos, lipídios, proteínas e ácidos nucléicos (DNA extracelular). A matriz é uma espécie de estrutura física do biofilme, que, além de manter as células unidas, permite sua adesão a substratos e superfícies. Esta estrutura tridimensional também propicia um ambiente de troca de material genético entre os microrganismos. Nesta comunidade microbiana há a formação de agregados ou multicamadas de células, onde ocorre o contato intercelular, seja ele físico ou social. A espessura de um biofilme pode variar desde poucas camadas de células até múltiplas camadas envolvidas pelo meio polimérico aniônico viscoso altamente hidratado. Neste meio, os microrganismos apresentam diferentes níveis metabólicos e de expressão gênica ao longo de suas camadas, e estabelecem uma série de processos de comunicação celular, denominado *quorum sensing* (ARCHER et al., 2011; DONLAN, 2002; FLEMMING et al., 2016; KOO et al., 2017; SHARMA; MISBA; KHAN, 2019). A Figura 4 ilustra o processo de desenvolvimento de um biofilme.

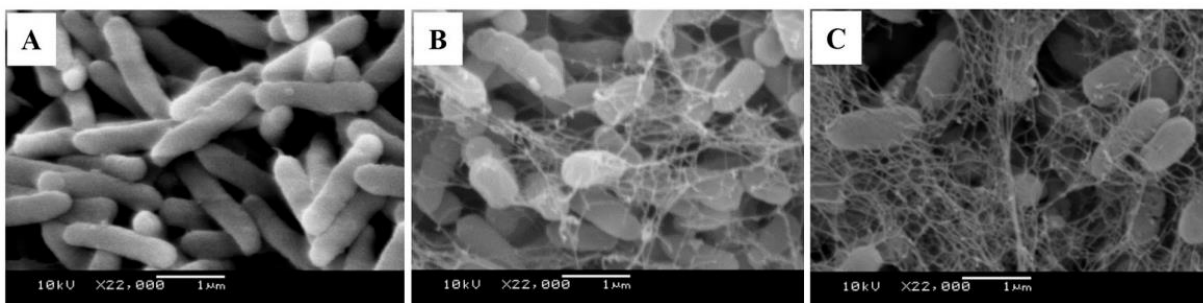


Figura 4. Imagens de microscopia eletrônica de varredura demonstrando o processo de desenvolvimento de um biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*. As imagens A, B e C representam os tempos de incubação de 6, 24 e 48 horas, respectivamente, a 37°C, com magnificação de 22.000X (retirado de TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

Os biofilmes proporcionam um ambiente de proteção aos microrganismos contra privação nutricional, valores anormais de pH, osmolaridade, temperatura, radiação, desidratação, pressão, predadores, forças mecânicas, antimicrobianos e sistema imune do hospedeiro (FUX et al., 2005; YIN et al., 2019). Adicionalmente, a habilidade dos microrganismos em formar essas comunidades microbianas fornece uma vantagem evolucionária que permite a maturação, aumento da taxa de sobrevivência e o estabelecimento de relações simbióticas por meio do microambiente do biofilme (GIAOURIS et al., 2015; LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2013; OTTO, 2013).

Biofilmes são um dos modos de vida mais distribuídos e bem sucedidos da vida na Terra, uma vez que eles conduzem uma série de processos biogeoquímicos (FLEMMING et al., 2016; PAERL; PINCKNEY, 1996) De fato, estima-se que biofilmes estejam presentes na Terra há 3,2 bilhões de anos (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004), ocupando os mais diversos nichos ambientais, desde rochas, rios de água doce, águas profundas e fontes termais (SHARMA; MISBA; KHAN, 2019). A aplicação biotecnológica dos biofilmes inclui filtração da água potável, degradação de resíduos sólidos e águas residuais, e produção de químicos industriais, tais como, ácido acético, etanol e butanol (QURESHI, 2009). Todavia, os biofilmes também podem ser responsáveis por contaminação e deterioração da qualidade da água, corrosão de equipamentos, além de servir como um reservatório de patógenos. Os biofilmes podem estar aderidos a uma série de substratos e materiais, sejam eles abióticos (incluindo

metais, vidro, plástico e dispositivos médicos, tais como válvulas, cateteres, marca-passos, e lentes de contato) ou bióticos (tecidos humano, animal e vegetal) (FLEMMING et al., 2016; SRINIVASAN et al., 2021).

Os biofilmes são sistemas complexos que possuem alta densidade de células e podem compreender apenas uma espécie microbiana ou múltiplas espécies (FLEMMING et al., 2016). Biofilmes multi-espécie podem compreender até mesmo microrganismos de diferentes níveis taxonômicos (O'TOOLE; KAPLAN; KOLTER, 2000). O termo biofilme polimicrobiano refere-se à combinação de microrganismos no biofilme, independentemente da filogenia. Bactérias e fungos são capazes de produzir biofilmes. Embora haja uma grande quantidade de organismos capazes de formar biofilmes, diferentes espécies compartilham processos e mecanismos em comum no desenvolvimento de um biofilme (GUZMÁN-SOTO et al., 2021).

1.3.1. Formação do biofilme

A formação do biofilme é um processo dinâmico e envolve fundamentalmente as seguintes etapas: adesão inicial reversível, adesão irreversível com início do desenvolvimento da arquitetura do biofilme, maturação e dispersão, como demonstra a Figura 5 (DUFOUR; LEUNG; LÉVESQUE, 2010).

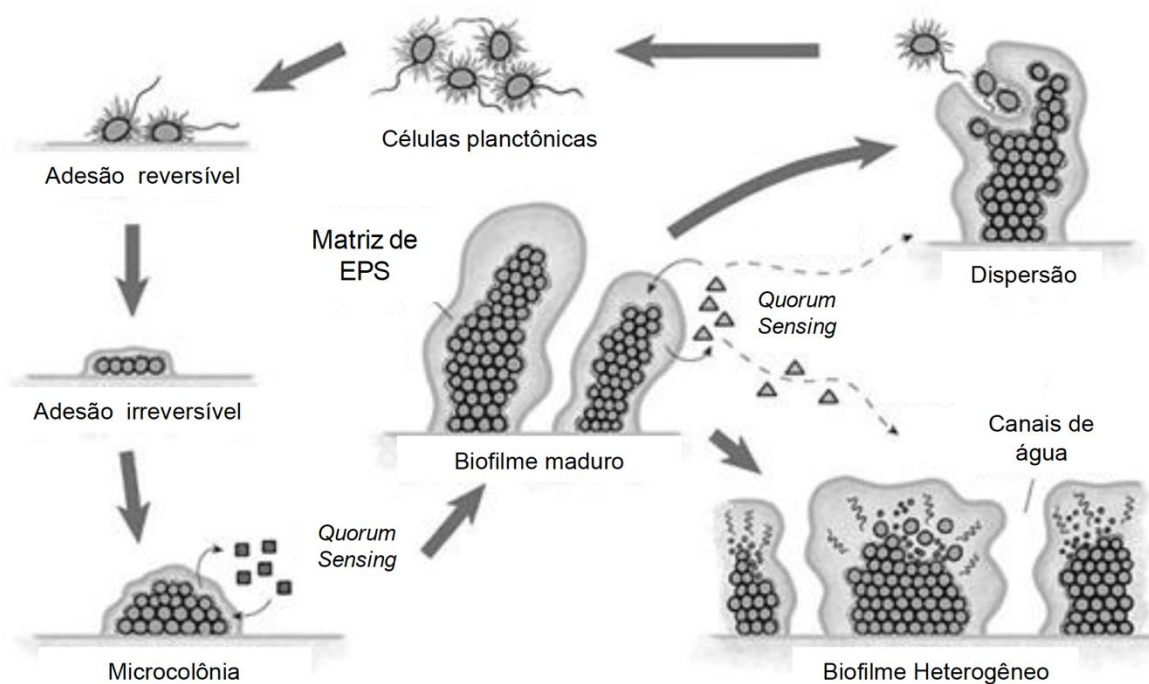


Figura 5. Etapas da formação do biofilme. Inicialmente, células planctônicas se aderem reversivelmente a superfícies. Após adesão irreversível e formação de microcolônias, há o desenvolvimento do biofilme maduro bem estruturado pela matriz polimérica extracelular. O sistema de comunicação celular *quorum sensing* estabelece a manutenção e crescimento do biofilme, bem como frente a determinadas condições ambientais, sua dispersão e retorno ao modo de vida planctônico (adaptado de HORTENSE MARTIN, 2015).

A primeira etapa de adesão inicial reversível das células microbianas à superfície biótica ou abiótica geralmente ocorre na presença de um filme condicionante tipicamente composto de moléculas orgânicas. O que leva o microrganismo a se mover em direção a uma superfície é o efeito de forças físicas e gravitacionais, além da percepção de mudanças nas propriedades físico-químicas ambientais (KIMKES; HEINEMANN, 2020). Esta adesão entre a superfície celular e o substrato é mediada por interações eletrostáticas, hidrofóbicas e van der Waals, que são instáveis e frequentemente causam retorno das células à fase líquida planctônica. Além disso, a presença de apêndices microbianos, como fímbrias, pili e flagelos, promove maior aderência via quimiotaxia ou motilidade (DUFOUR; LEUNG; LÉVESQUE, 2010; RUMBAUGH; SAUER,

2020). A presença destas adesinas auxilia na adesão à superfície; no caso de superfícies bióticas, elas se ligam a componentes do hospedeiro, como colágeno, fibrinogênio, fibronectina e receptores (GUZMÁN-SOTO et al., 2021). De forma geral, a adesão ocorre principalmente em superfícies rugosas, hidrofóbicas e cobertas por filmes condicionantes. Um aumento na velocidade do fluxo de líquido circundante e a concentração de nutrientes no local também podem interferir na adesão microbiana. A Tabela 2 exemplifica diferentes fatores que afetam a formação de biofilmes.

Tabela 2. Fatores relacionados à adesão celular microbiana, formação e desenvolvimento de biofilmes (adaptado de SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

Adesão à superfície	Fluido	Célula
Textura ou rugosidade	Velocidade do fluxo	Hidrofobicidade da superfície celular
Hidrofobicidade	pH	Apêndices extracelulares
Carga	Temperatura	Substâncias poliméricas extracelulares
Química da superfície	Cátions	Moléculas de sinalização
Filme condicionante	Presença de produtos antimicrobianos	
	Disponibilidade de nutrientes	

Quando as células interrompem a expressão de genes relacionados à locomoção e iniciam a produção da matriz, há a transição para a etapa de adesão irreversível. As ligações químicas estabelecidas são muito fortes e torna bastante complexa a remoção de um biofilme. As células se multiplicam e formam micro-colônias ou agregados celulares, formando as primeiras camadas que cobrem a superfície (GUZMÁN-SOTO et al., 2021; PALMER; FLINT; BROOKS, 2007). Conforme as micro-colônias vão sendo formadas, há acumulação de células

em multicamadas, causando um aumento na espessura do biofilme e transição de uma estrutura bidimensional para tridimensional (SU et al., 2012).

Um biofilme maduro é caracterizado pela presença de macro-colônias envoltas por canais de água que auxiliam na distribuição de nutrientes e moléculas sinalizadoras. Estas macro-colônias se formam quando múltiplas camadas de células se empilham, aumentando a espessura e dando origem à estrutura tridimensional do biofilme (DUFOUR; LEUNG; LÉVESQUE, 2010). Esta estrutura é altamente heterogênea; dependendo da composição química e espécie microbiana, o biofilme pode adquirir diferentes arquiteturas. De forma geral, a maioria dos biofilmes é constituída por aproximadamente 50-90% de matriz polimérica, sendo o restante composto por células microbianas (GUZMÁN-SOTO et al., 2021).

Como as células microbianas ocupam diferentes regiões em um biofilme maduro – seja desde mais próximo da superfície até em porções mais internas do biofilme –, observa-se a presença de diferentes gradientes e microambientes. Estes gradientes se referem a diferentes níveis de taxa de crescimento, concentração de oxigênio, pH e atividade metabólica. Por exemplo, microrganismos em porções mais internas do biofilme possuem reduzida atividade metabólica em decorrência da menor quantidade de nutrientes e oxigênio disponíveis, o que proporciona maior resistência a antimicrobianos convencionais que têm como alvo processos celulares microbianos como replicação do DNA ou tradução (DUFOUR; LEUNG; LÉVESQUE, 2010; GUZMÁN-SOTO et al., 2021; WILLIAMSON et al., 2012).

Além da diversidade metabólica, heterogeneidade genética também é encontrada em biofilmes, com a presença de subpopulações microbianas apresentando diferentes fenótipos. Dentre os fenótipos encontrados, células *persisters* representam uma grande problemática no controle de biofilmes. *Persisters* se encontram na fase estacionária do ciclo de vida, de crescimento lento ou dormentes, sem crescimento ou divisão, e com alta tolerância antibiótica. Além disso, estas populações são capazes de retomar o crescimento quando o agente estressor é removido. Esta característica proporciona não apenas a resistência a antimicrobianos e cronicidade da infecção, mas também facilita a dispersão e colonização (FISHER; GOLLAN; HELAINE, 2017; LEWIS, 2001, 2007).

Em um biofilme maduro, as comunidades microbianas estabelecem uma série de interações sociais, tais como: comunicação química (HOTTERBEEKX et al., 2017), cooperação

(LUO et al., 2021) e competição (FILKINS et al., 2015). As interações podem ser antagônicas, quando envolvem inibição do crescimento e competição por nutrientes, ou sinérgicas, quando espécies microbianas exercem benefícios sobre as outras (ELIAS; BANIN, 2012). Dentre estas interações, a comunicação célula-a-célula, também denominada de *quorum sensing*, estabelece e coordena diversos parâmetros relacionados ao biofilme, incluindo virulência, motilidade, produção de substâncias antibióticas, morfogênese, patogênese, conjugação, interações sociais, e a própria manutenção ou desagregação de um biofilme. Esta comunicação pode ocorrer entre microrganismos da mesma espécie e/ou interespecies. O *quorum sensing* é a modulação da expressão de genes em resposta a flutuações na densidade celular da população microbiana. Os microrganismos produzem e liberam moléculas sinalizadoras denominadas autoindutores em resposta a um aumento na densidade celular. Quando se atinge um limiar na concentração do autoindutor, há uma alteração na expressão gênica e, em consequência, regulação de uma série de atividades fisiológicas (DUFOUR; LEUNG; LÉVESQUE, 2010; GUZMÁN-SOTO et al., 2021; LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2013; MILLER; BASSLER, 2001).

Sob determinadas condições após um biofilme se tornar maduro, ocorre o desprendimento de células ou aglomerados de células do biofilme. Isto pode ocorrer como consequência de estresse mecânico ou pelo impacto do sistema imune do hospedeiro. Quando há alterações fisiológicas decorrentes do sensoriamento de moléculas sinalizadoras, em resposta a variações nos níveis de óxido nítrico, tensão de oxigênio, temperatura, e disponibilidade de nutrientes, ocorre a dispersão do biofilme. Neste caso, há a produção de enzimas que degradam componentes da matriz polimérica, rompimento de interações não-covalentes por surfactantes microbianos e morte celular, que causam cavidades no biofilme. Em adição, microrganismos móveis fazem uso desta capacidade para escapar do biofilme, através do aumento da expressão de genes relacionados com a síntese flagelar e locomoção. Além disso, genes de síntese de fímbrias e adesinas têm sua expressão diminuída. Por meio da dispersão, os microrganismos podem contaminar outras superfícies e repetir o ciclo de formação do biofilme (DUFOUR; LEUNG; LÉVESQUE, 2010; GUZMÁN-SOTO et al., 2021; RUMBAUGH; SAUER, 2020). É importante salientar que células dispersas apresentam, de forma geral, um fenótipo mais virulento e resistente do que o de células planctônicas; todavia, ainda em nível inferior aos seus

homólogos sésseis. Isto significa que as modificações que ocorrem no biofilme são parcialmente mantidas nas células microbianas que se rompem do mesmo (CHUA et al., 2014).

1.3.2. Resistência do biofilme aos antimicrobianos

A adesão microbiana e conseqüente formação de biofilme confere um papel relevante na patogênese e acarreta um grande impacto na saúde humana e nos setores econômicos, afetando desde o ambiente hospitalar, até indústrias de alimentos, naval, do petróleo, na agricultura e no tratamento de água e efluentes (DE CARVALHO, 2018; GALIÉ et al., 2018). Estima-se que cerca de 80% das infecções microbianas crônicas estejam relacionadas a biofilmes (SHARMA; MISBA; KHAN, 2019). As células microbianas sésseis são, de forma geral, 10 a 1000 vezes mais resistentes aos antimicrobianos do que seus homólogos de vida livre, dificultando o tratamento de infecções associadas a biofilmes (MAH; O'TOOLE, 2001; SHARMA; MISBA; KHAN, 2019).

De forma geral, os mecanismos de resistência têm a função de inibir um antimicrobiano de atingir um alvo. Em contrapartida, os mecanismos de tolerância atuam “desligando” o alvo (LEWIS, 2008). Os biofilmes microbianos são altamente recalcitrantes à terapia antimicrobiana devido a múltiplos mecanismos de resistência e tolerância. Estes mecanismos podem ser de origem intrínseca – decorrente da própria organização estrutural e funcional do biofilme – ou adquirida – através da transferência de fatores de resistência (OLIVARES et al., 2020). Há, pelo menos, três mecanismos intrínsecos que levam à suscetibilidade reduzida aos antimicrobianos pelas células em um biofilme: (i) matriz exercendo barreira física; (ii) diferentes taxas de crescimento celular; (iii) ambiente circundante ao biofilme (DONLAN, 2001b).

Primeiramente, a substância polimérica age como uma barreira física impedindo a entrada do agente antimicrobiano. A matriz retarda a difusão das moléculas antimicrobianas por meio de reações químicas ou limita sua taxa de transporte, principalmente na região periférica do biofilme. Interessantemente, a matriz polimérica é capaz de acumular moléculas antimicrobianas de até 25% de sua massa. A substância polimérica pode impedir a entrada não apenas de fármacos, mas também de componentes do próprio sistema imune do hospedeiro, que podem ter dificuldade em reconhecer e penetrar em um biofilme (DONLAN, 2001b; MAH;

O'TOOLE, 2001; SINGH et al., 2017; WATTERS et al., 2016). A matriz é capaz de proteger as células do biofilme contra moléculas grandes, como, por exemplo, lisozima. O exopolissacarídeo negativamente carregado da matriz é bastante eficaz em restringir a permeação de antimicrobianos positivamente carregados, tal como aminoglicosídeos (LEWIS, 2001).

Em segundo lugar, muitas células sésseis possuem taxas de crescimento reduzidas, sendo dormentes ou *persisters*, escapando da ação de antimicrobianos que têm como alvo fases ativas do crescimento microbiano, tais como, síntese proteica, de ácidos nucleicos ou da parede celular. É importante enfatizar que praticamente todos os antimicrobianos são mais efetivos em cessar o crescimento de células em fase ativa de metabolismo. Quando expostas a um agente antimicrobiano, *persisters* acabam, muitas vezes, sobrevivendo e podem até serem preservadas na presença de um antimicrobiano que inibe seu crescimento. Paradoxalmente, o antimicrobiano pode ajudar as células *persisters* a recalcitrarem. Em suma, nas situações em que o antimicrobiano consegue penetrar em um biofilme e erradicar a maior parte da população, geralmente resta uma pequena proporção de *persisters* sobreviventes. Se a concentração do agente antimicrobiano temporariamente diminui, ou os sintomas desaparecem devido à erradicação das células planctônicas e a terapia é descontinuada, as células *persisters* irão reconstruir o biofilme. Esta dinâmica explica a natureza recorrente de infecções associadas a biofilmes e a necessidade de uso prolongado de antibioticoterapia. Além disso, as células do biofilme são fisiologicamente distintas das células planctônicas e expressam fatores de proteção específicos, tais como bombas de efluxo, o que contribui para a resistência aumentada a antimicrobianos (DAVIES, 2003; LEWIS, 2001, 2007, 2008).

Em terceiro lugar, o ambiente em torno do biofilme pode propiciar condições que protegem os microrganismos. Por exemplo, em ambientes com menor quantidade de nutrientes, oxigênio, ou sob estresse oxidativo, respostas fisiológicas dos microrganismos por meio da indução ou repressão de genes fazem com que haja menor captação de antimicrobianos, tornando as células do biofilme mais resistentes ao antimicrobiano. Isto leva à formação de diferentes gradientes ao longo das camadas do biofilme e causa heterogeneidade fisiológica nas células em diferentes áreas geográficas do biofilme (DONLAN, 2001b).

Com relação à resistência adquirida, a presença de DNA extracelular participa no processo de resistência a antimicrobianos, uma vez que permite a transferência horizontal de genes de resistência. O DNA extracelular provém da autólise celular, que causa o extravasamento do conteúdo citoplasmático e, por consequência, do material genético microbiano, que pode conter genes de resistência. A transferência horizontal de genes também pode ocorrer através da transferência de plasmídeos via conjugação. Plasmídeos são DNA circulares extracromossômicos que codificam resistência a inúmeros agentes antimicrobianos. Este processo é mais eficiente em biofilmes do que em culturas planctônicas, em decorrência da natureza sésil e proximidade espacial das células em um biofilme. Classicamente, a recalcitrância de um biofilme era atribuída a fatores fenotípicos e não a mudanças genéticas permanentes. Todavia, há evidências de que as células sésseis acumulam mutações em taxas superiores às planctônicas, e estas mutações podem contribuir ao aumento da resistência antibiótica. Em adição, células sésseis estão mais inclinadas a mutações espontâneas devido ao aumento do estresse oxidativo endógeno do microambiente do biofilme, que contribui, por sua vez, no dano ao DNA (DONLAN, 2001; DONLAN; COSTERTON, 2002; HALL; MAH, 2017; SINGH et al., 2017). A Figura 6 apresenta os principais mecanismos propostos para explicar a resistência aumentada aos antimicrobianos por células sésseis.

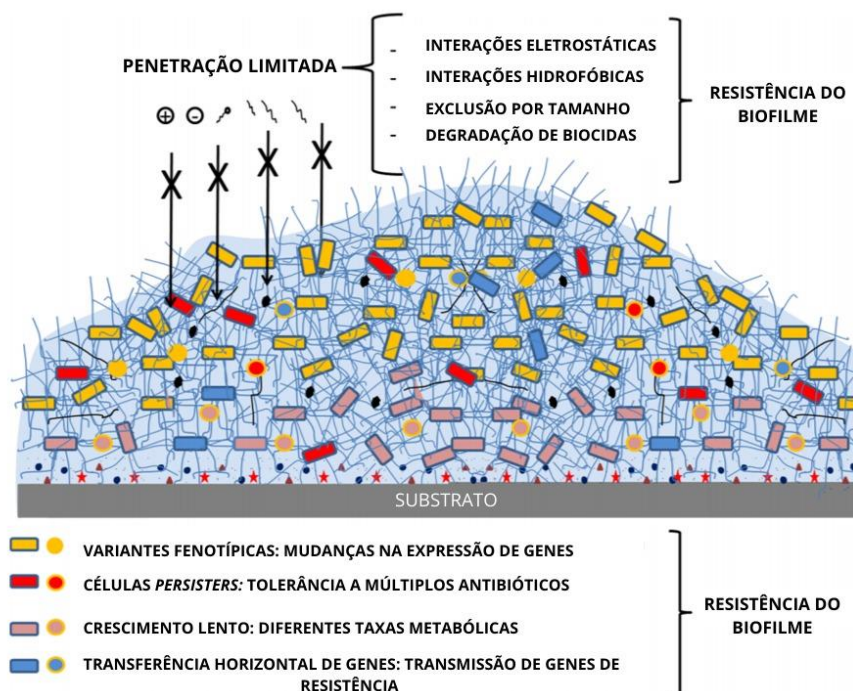


Figura 6. Mecanismos de resistência do biofilme aos antimicrobianos (adaptado de ABDALLAH et al., 2014).

1.3.3. Impacto do biofilme nas indústrias e no ambiente hospitalar

A persistência de microrganismos patogênicos em biofilmes, principalmente associados ao âmbito hospitalar e indústrias de alimentos, representa um grande risco de saúde pública. Nas indústrias de alimentos, estes microrganismos podem servir como um reservatório de contaminação, que pode ocorrer em qualquer etapa do processamento via manipuladores de alimentos, equipamentos contaminados e superfícies de preparação dos alimentos (ABDALLAH et al., 2014). A presença de biofilmes na indústria de alimentos tem sido associada à resistência a desinfetantes, redução de vida de prateleira dos alimentos e possível veiculação de microrganismos deteriorantes e patogênicos (COUGHLAN et al., 2016). Adicionalmente, a ocorrência de biofilmes reduz a transferência de calor e a eficiência operacional em equipamentos que exijam temperaturas controladas. Em sistemas de distribuição de água, por exemplo, pode haver formação de biofilme mesmo na presença de elevados índices de cloro. Além disso, os biofilmes podem resultar em aumento do consumo de energia, bloqueio

mecânico e aceleração da corrosão de superfícies metálicas (RODE et al., 2007; SHI; ZHU, 2009; SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010).

No ambiente hospitalar, microrganismos associados a biofilmes são veiculados por meio das mãos dos profissionais da saúde, superfícies e dispositivos contaminados, incluindo agulhas, instrumentos cirúrgicos, cateteres e endoscópios (WEBER; ANDERSON; RUTALA, 2013). Basicamente, as infecções associadas a biofilme podem estar relacionadas a biofilmes aderidos a dispositivos médicos ou diretamente no tecido do hospedeiro (LEBEAUX; GHIGO; BELOIN, 2014; SHARMA; MISBA; KHAN, 2019). Biofilmes presentes em próteses, válvulas, cateteres, implantes, lentes de contato, dispositivos intrauterinos e dentais podem acarretar infecções urinárias, de corrente sanguínea, do trato respiratório, entre outras (DONLAN, 2001a). As infecções relacionadas ao tecido do hospedeiro são geralmente crônicas, incluindo fibrose cística, osteomielite, otite, infecções decorrentes de ferimentos, infecções recorrentes do trato urinário, endocardite e periodontite (BURMØLLE et al., 2010). A Figura 7 demonstra os principais tipos de infecções relacionadas a dispositivos médicos e infecções crônicas associadas a biofilmes.

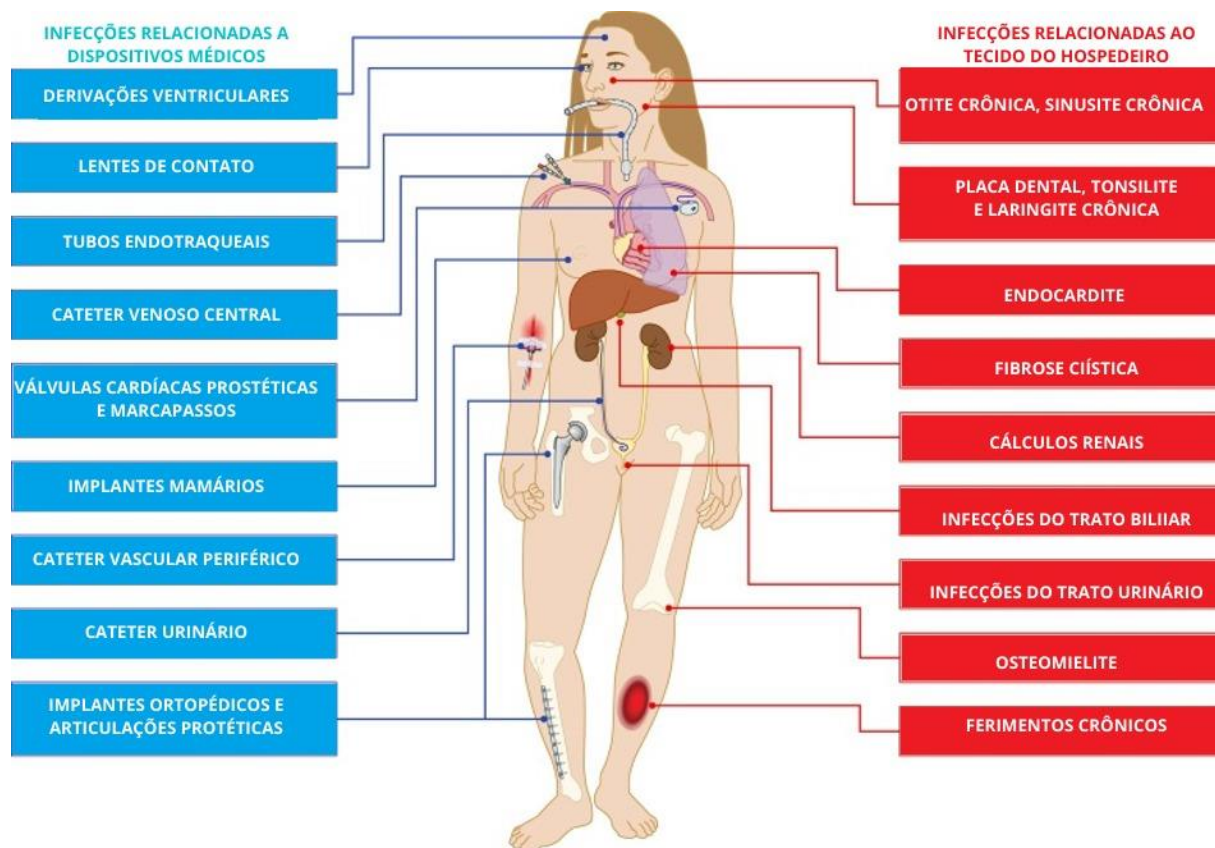


Figura 7. Infecções relacionadas a dispositivos médicos e infecções crônicas associadas ao tecido do hospedeiro (adaptado de LEBEAUX; GHIGO; BELOIN, 2014).

Dentre os patógenos formadores de biofilme mais comumente encontrados em infecções humanas, cabe destacar: as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, as bactérias Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, e o fungo leveduriforme *Candida* spp. (SCHULZE et al., 2021).

1.4. Microrganismos de importância clínica

1.4.1. *Staphylococcus aureus*

Dentre os microrganismos reconhecidamente formadores de biofilme de relevância clínica, *Staphylococcus aureus* é um dos principais representantes, exercendo protagonismo na persistência de muitas infecções crônicas. *S. aureus* é um estafilococo Gram-positivo ubíquo,

imóvel, catalase- e coagulase-positivo, anaeróbio facultativo, não esporulado (LEE et al., 2018). É encontrado na microbiota comensal humana, principalmente na mucosa nasal, em 20 a 25% da população. Estudos demonstram que colonização por esta bactéria pode estar relacionada a um risco maior de infecção (ARCHER et al., 2011; KLUYTMANS; VAN BELKUM; VERBRUGH, 1997; LISTER; HORSWILL, 2014).

A disseminação de *S. aureus* é comum e responsável por muitas das infecções adquiridas no ambiente hospitalar, podendo ser transferido para um indivíduo suscetível através do contato direto ou por meio de fômites. Embora esse microrganismo seja suscetível à alta temperatura e a soluções desinfetantes e antissépticas, são capazes de sobreviver em superfícies secas por longos períodos, fato este que contribui para a permanência e disseminação em hospitais e na comunidade (CHAIBENJAWONG; FOSTER, 2011; LOWY, 1998). Para dar início a um processo infeccioso, a cepa causadora da infecção pode ser oriunda do próprio indivíduo ou transferida a partir de outras pessoas ou objetos, principalmente quando ocorre quebra das barreiras de proteção naturais do indivíduo e/ou diminuição da imunidade do mesmo (GORDON; LOWY, 2008; LOWY, 1998).

S. aureus causa doença a partir da produção de toxinas ou da invasão direta e destruição tecidual, sendo capaz de induzir a formação de abscesso no local de inoculação e também se disseminar pela corrente sanguínea. Isto se deve aos seus inúmeros fatores de virulência, que podem estar ancorados à superfície celular bacteriana ou serem secretados para o meio extracelular. Dentre os principais fatores de virulência produzidos por este patógeno, destaca-se a produção de cápsula por algumas cepas, adesinas, hemolisinas e formação de biofilme. Algumas proteínas secretadas por *S. aureus* são capazes de se ligar aos anticorpos do hospedeiro e impedir a fagocitose, escapando da resposta imune (BECKER, 2018).

Dentre as principais manifestações clínicas, as infecções de pele são as mais frequentes, podendo a infecção ser na epiderme (por exemplo, impetigo), derme (como foliculite, furúnculo e carbúnculo) e tecido subcutâneo (como celulite, fascíte necrotizante) (BECKER, 2018). Este microrganismo também está associado a um amplo espectro de doenças sistêmicas relevantes, tais como, abscessos, síndrome do choque tóxico e bacteremia, que são geralmente causados pelas células planctônicas por meio da secreção de enzimas. Em contrapartida, infecções crônicas são associadas com a formação de biofilmes aderidos a implantes médicos e tecidos do

hospedeiro, podendo causar endocardite, osteomielite e infecções persistentes de feridas (LISTER; HORSWILL, 2014). *S. aureus* é o agente bacteriano mais comum isolado de infecções de corrente sanguínea, mundialmente (CAROLUS; VANDYCK; VAN DIJCK, 2019; TIAN; ZHANG; SUN, 2019). A Figura 8 demonstra *S. aureus* na corrente sanguínea.

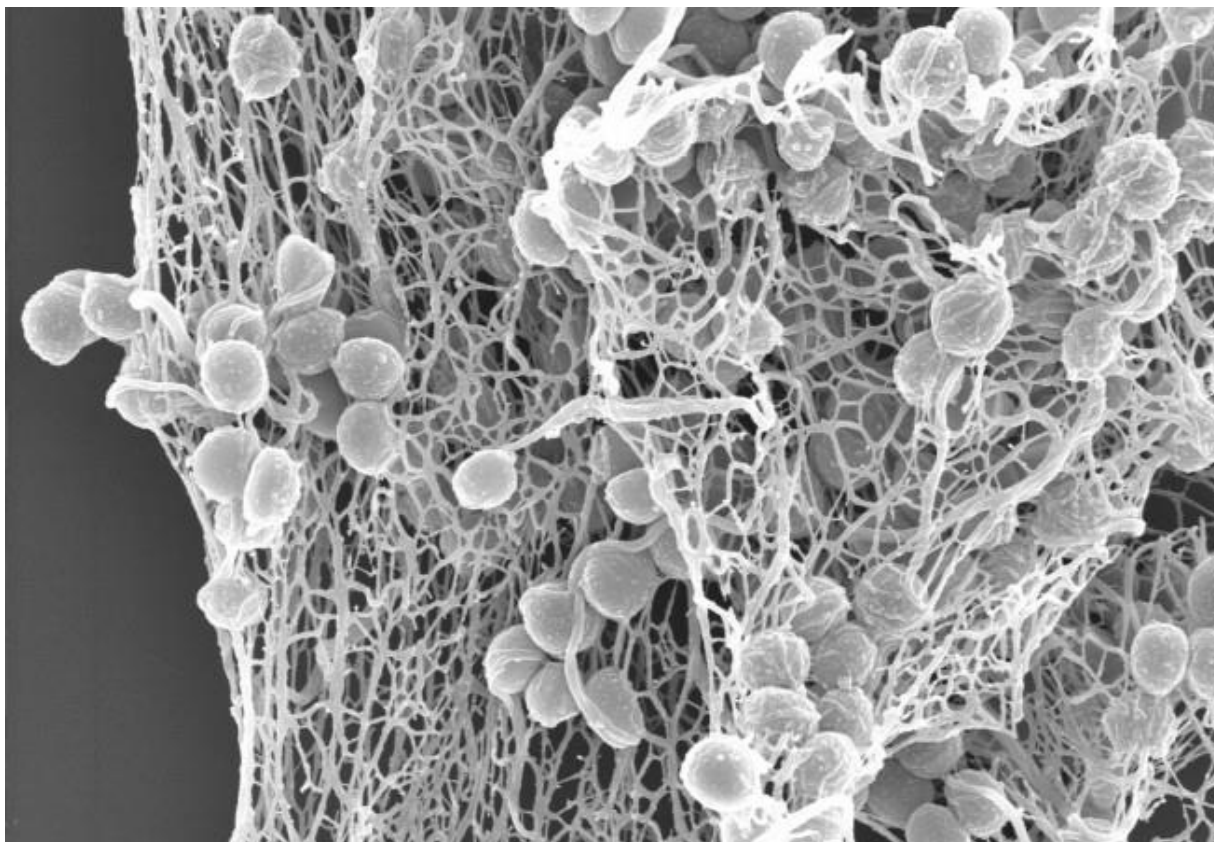


Figura 8. *S. aureus* no plasma humano na presença de proteína de ligação ao fibrinogênio extracelular e visualizado por microscopia eletrônica de varredura (retirado de UMC Utrecht, <<https://www.evasionutrecht.nl/portfolio/aureus-with-efb/>>, acesso em 5 de setembro de 2021).

Além do arsenal bem documentado de fatores de virulência, *S. aureus* pode apresentar resistência a múltiplos antimicrobianos. Desde o advento da penicilina, por volta dos anos 1940, não levou muito tempo para que os primeiros isolados resistentes fossem detectados, inicialmente em hospitais e subsequentemente, na comunidade. Para contornar o problema, foi lançada, na década de 60, uma penicilina semi-sintética: a meticilina. Entretanto, ainda na mesma década, surgiram as primeiras cepas resistentes à meticilina, denominadas de MRSA (da sigla em inglês: *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) (LOWY, 2003; PANTOSTI;

VENDITTI, 2009). Desde então, MRSA é um dos mais bem-sucedidos patógenos modernos. Com o avanço da disseminação de cepas MRSA mundialmente, o tratamento de escolha para infecções causadas por este microrganismo ficou praticamente restrito aos glicopeptídeos vancomicina e teicoplanina (HIRAMATSU, 2001; SHARIATI et al., 2020). Esta classe de antimicrobianos é eficaz contra a maioria das bactérias Gram-positivas, todavia pode apresentar efeitos nefrotóxicos e ototóxicos consideráveis (SCHILLING; NEUNER; REHM, 2011).

Em 1997, o primeiro caso de *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina foi reportado no Japão (HIRAMATSU, 1997). Em 2002, o primeiro caso de resistência plena foi detectado nos Estados Unidos (GOLDRICK, 2002). No Brasil, o primeiro caso de resistência plena à vancomicina foi relatado em 2014, a partir de um isolado MRSA sensível à vancomicina obtido de um paciente com infecção de corrente sanguínea. Após o paciente receber tratamento com antimicrobiano, o isolado tornou-se resistente (ROSSI et al., 2014). Há poucas opções terapêuticas sugeridas para esses isolados, tais como linezolida, daptomicina e tigeciclina. Como a prevalência deste microrganismo tem crescido, o monitoramento do tratamento, da resposta terapêutica e a adoção de medidas de controle apropriadas são altamente recomendadas e essenciais para prevenir sua disseminação. Devido ao aumento da tolerância antibiótica e persistência de *S. aureus* em biofilmes, infecções por este patógeno desafiam o tratamento com antimicrobianos (SHARIATI et al., 2020). Em virtude da resistência a múltiplos antimicrobianos, a OMS categorizou isolados de *S. aureus* resistentes à meticilina, e com resistência intermediária ou plena à vancomicina como de prioridade alta na busca de novas opções terapêuticas (WHO, 2017).

1.4.2. *Staphylococcus epidermidis*

Além de *S. aureus*, outras espécies incluídas no gênero *Staphylococcus* também se destacam por seu papel relevante no ambiente hospitalar e na capacidade de formação de biofilmes, dentre eles, a espécie *Staphylococcus epidermidis*. Basicamente, *S. epidermidis* pode ser distinguido de *S. aureus* por ser coagulase-negativo. *S. epidermidis* é um membro permanente da microbiota humana normal, sendo comumente encontrado na pele e em mucosas. Por meio da adesão aos tecidos do hospedeiro via adesinas, esse microrganismo é capaz de

estabelecer relações comensais com o ser humano, incluindo a proteção contra patógenos (OTTO, 2009; SABATÉ BRESCÓ et al., 2017).

O mecanismo que leva *S. epidermidis* a deixar de ser um microrganismo comensal e se tornar um patógeno ainda é pouco compreendido. Aproximadamente 80% do seu genoma bacteriano é composto de genes centrais, enquanto os 20% restantes são variáveis, indicando que *S. epidermidis* possui um repertório genético potencialmente ilimitado. Por esta razão, esta bactéria é capaz de se adaptar a diferentes nichos (BROWN; HORSWILL, 2020). Outra teoria sugere que linhagens patogênicas de *S. epidermidis* contêm um *cluster* (agrupamento de genes) que é capaz de produzir moléculas de parede celular que também são encontradas em *S. aureus*. Isto acarreta no aumento da sobrevivência de *S. epidermidis* na corrente sanguínea e eleva a taxa de morte de camundongos com sintomas de sepse. Além disso, há facilitação da troca de material genético entre *S. epidermidis* e *S. aureus*, sugerindo uma rota para disseminação de genes de virulência (DU et al., 2021).

Devido à capacidade de formar biofilme em dispositivos médicos, *S. epidermidis* tem emergido como um relevante patógeno oportunista em pacientes que fazem uso destes aparelhos. Estima-se que *S. epidermidis* seja responsável por aproximadamente 20% de todas as infecções ortopédicas relacionadas a dispositivos médicos, aumentando esta taxa para até 50% no caso de infecções tardias (SABATÉ BRESCÓ et al., 2017). *Staphylococcus epidermidis* é um dos principais agentes etiológicos de infecções associadas a dispositivos médicos, tais como cateter intravenoso central e periférico. Além disso, este patógeno pode estar envolvido em infecções protéticas, de enxerto vascular, e de dispositivos cardíacos (OTTO, 2009). A Figura 9 mostra em detalhes *S. epidermidis*.

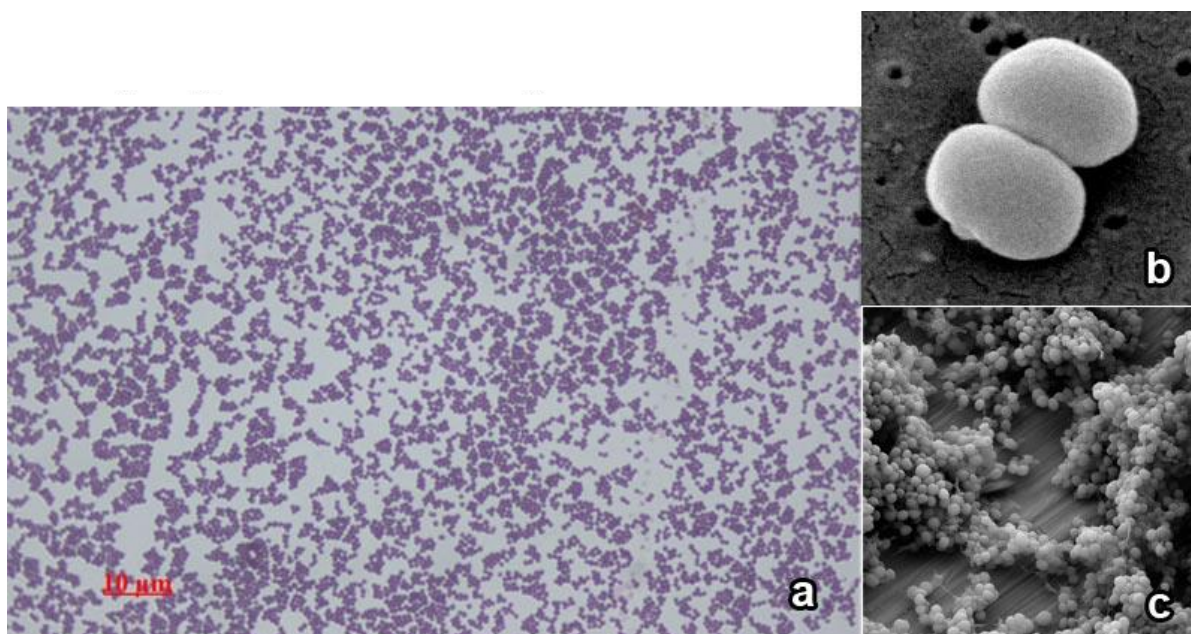


Figura 9. (a) Coloração de Gram de *S. epidermidis*, visualizado por microscopia de campo claro, magnificação de 1000x; (b) Microscopia eletrônica de varredura de *S. epidermidis*; (c) Biofilme de *S. epidermidis* em um substrato de titânio (retirado de Microbe Notes, < <https://microbenotes.com/staphylococcus-epidermidis/>>, acesso em 5 de setembro de 2021).

Os fatores de virulência mais significantes deste microrganismo incluem aqueles relacionados à formação de biofilme, dentre eles, diversas proteínas relacionadas com as etapas de (i) adesão inicial: adesinas AtlE e Aae, ácidos teicóicos, ligantes à fibronectina Embp e SdrG, ligante ao colágeno SdrF, ligante à elastina Ebp; (ii) agregação intercelular: Bap, Aap, Embp, ácidos teicóicos, e PIA (da sigla em inglês: *Polysaccharide Intercellular Adhesion*), que é um componente da matriz polimérica com função de adesina e protege contra a fagocitose; (iii) toxinas: modulinas solúveis em fenol, que são capazes de lisar eritrócitos e hemácias, além de ativar a resposta inflamatória do hospedeiro; entre outros. Algumas destas proteínas de *S. epidermidis* são denominadas de MSCRAMM (da sigla em inglês: *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules*), e possuem função crucial na persistência em superfícies do hospedeiro durante colonização e infecção. Estas moléculas exercem função adesiva, permitindo a ligação a componentes do hospedeiro, tais como, fibrinogênio, fibronectina e colágeno (OTTO, 2012, 2014).

Concernente à resistência antibiótica das células planctônicas, a resistência à meticilina é amplamente encontrada em isolados hospitalares, variando entre 75 a 90% dos isolados (DIEKEMA et al., 2001). Também se observa, ainda que em menor extensão, resistência a aminoglicosídeos e macrolídeos. Altos níveis de resistência à vancomicina e aos novos antimicrobianos (linezolida, daptomicina e tigeciclina) são raros ou ainda não foram reportados. Não obstante, a maior preocupação com relação a *S. epidermidis* é a tolerância aos antimicrobianos nos biofilmes; além de ser reconhecido como um dos principais microrganismos relacionados a esta forma de vida sésil (OTTO, 2012; ROGERS; FEY; RUPP, 2009).

1.4.3. *Klebsiella pneumoniae*

A bactéria Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* pertence à ordem Enterobacteriales, que inclui também *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., dentre outros. Esta família compreende bacilos não-esporulados, anaeróbios facultativos, fermentadores da glicose. *K. pneumoniae* é uma bactéria imóvel, encapsulada e extremamente resiliente. Membros desta família são amplamente distribuídos no ambiente, podendo viver na superfície de mucosas, orofaringe e no trato gastrointestinal de humanos e animais, no solo, em plantas e água (MORALES-LÓPEZ et al., 2019; PACZOSA; MECSAS, 2016; WANG et al., 2020).

Uma vez que *K. pneumoniae* consegue penetrar em outros tecidos ou na corrente sanguínea, causa infecções severas e de difícil controle. Dentre as principais doenças relacionadas a este patógeno, destaca-se pneumonia, bacteremia, meningite, abscessos, infecções do trato urinário, dentre outras. Este microrganismo é especialmente problemático em neonatos, idosos e pacientes imunocomprometidos (BENGOECHEA; SA PESSOA, 2019; PACZOSA; MECSAS, 2016; WANG et al., 2020). A taxa de mortalidade em indivíduos com infecções de corrente sanguínea por *K. pneumoniae* é bastante alta, atingindo em torno de 50% dos casos (DURDU et al., 2016). Os principais fatores de virulência reconhecidos em *K. pneumoniae* incluem cápsula, fímbrias, lipopolissacarídeo, sideróforos e capacidade de formação de biofilme (PACZOSA; MECSAS, 2016). *K. pneumoniae* é frequentemente associada a infecções urinárias associadas ao uso de cateter. A capacidade de se aderir a superfícies é mediada pela cápsula e por fímbrias do tipo 1 e 3. Além disso, mecanismos regulatórios do *quorum sensing* também participam deste processo (DONELLI; VUOTTO, 2014). A Figura 10 demonstra o biofilme de *K. pneumoniae*.

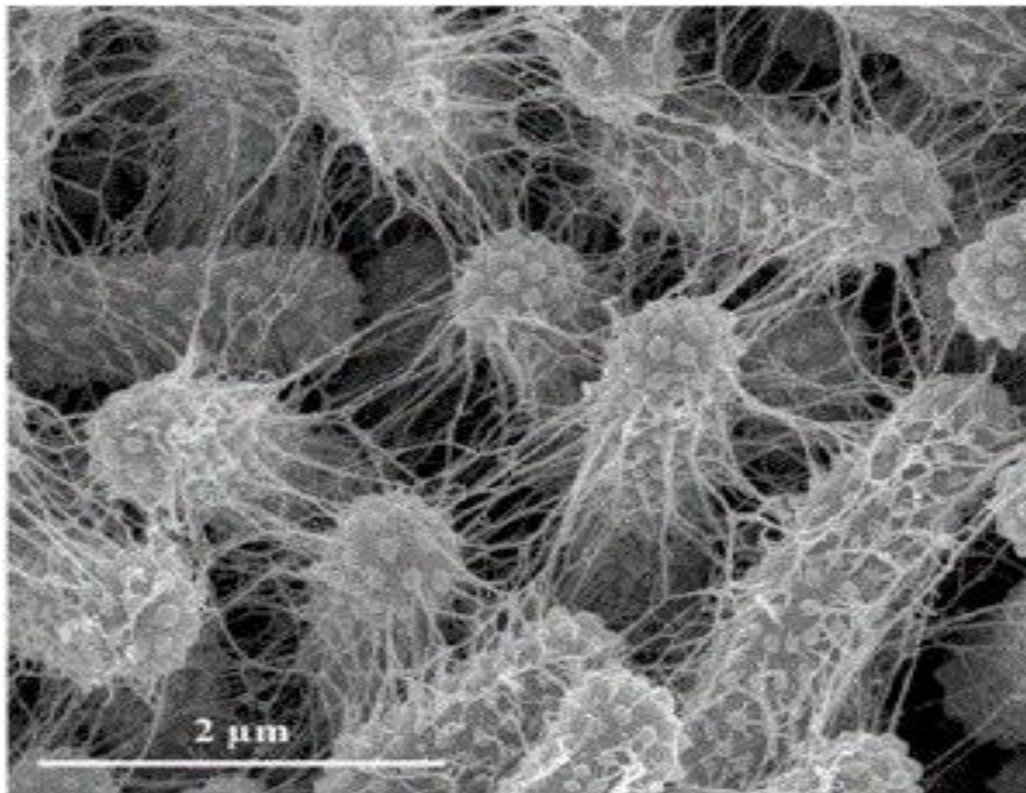


Figura 10. Microscopia eletrônica de varredura de biofilme de *K. pneumoniae* após 48 horas de desenvolvimento. Magnificação de 20000 vezes (retirado de BALESTRINO et al., 2008).

Este patógeno é especialmente preocupante por sua capacidade de adquirir traços genéticos que os tornam hipervirulento (hvKp) e/ou resistente aos antimicrobianos (PACZOSA; MECSAS, 2016). Diferentemente de cepas de *K. pneumoniae* clássicas (cKp), que causam infecções predominantemente em pacientes imunocomprometidos no ambiente hospitalar, a maioria das infecções causada por linhagens hipervirulentas são adquiridas na comunidade, incluindo indivíduos saudáveis de qualquer idade. Além disso, este patótipo é geralmente capaz de causar infecções em múltiplos sítios corporais e/ou em locais incomuns, que são frequentemente acompanhadas de sepse e disseminação metastática. O principal sintoma relacionado à hvKp é abscesso hepático na ausência de doença do trato biliar (RUSSO; MARR, 2019; WYRES; LAM; HOLT, 2020).

Os genes de virulência de hvKp estão presentes em plasmídeos e em elementos genéticos móveis cromossomais. Alguns biomarcadores diferenciam hvKp de cKp, dentre eles a

produção de sideróforos. Ferro é um recurso limitado que é requerido por *K. pneumoniae* e deve ser adquirido do ambiente. Este metal é sequestrado pelo hospedeiro durante o processo infeccioso como parte da resposta imune não-específica. Para obter este metal, *K. pneumoniae* secreta sideróforos, que são moléculas que possuem mais afinidade ao ferro do que as proteínas quelantes de ferro do hospedeiro. Sideróforos são capazes não somente de captar o ferro destas proteínas, mas também de captar ferro do ambiente. O patógeno é capaz de produzir diversos sideróforos, o que facilita a colonização de diferentes tecidos e evita a neutralização desses pelo hospedeiro. Além da produção de sideróforos, hvKp pode demonstrar hipermucoviscosidade, em decorrência da produção de cápsula aumentada (CHOBY; HOWARD-ANDERSON; WEISS, 2020; RUSSO; MARR, 2019).

K. pneumoniae é intrinsecamente resistente às penicilinas, e membros da população frequentemente carregam resistência adquirida a múltiplos antimicrobianos. (WYRES; LAM; HOLT, 2020). Dois maiores tipos de resistência antibiótica são comumente observados em *K. pneumoniae*. Um mecanismo envolve a expressão de β -lactamases de espectro estendido (ESBL, da sigla em inglês: *Extended-Spectrum β -Lactamases*), que confere à bactéria resistência às cefalosporinas e monobactâmicos. O outro mecanismo de resistência é a expressão de carbapenemases por *K. pneumoniae*, que torna a bactéria resistente a quase todos β -lactâmicos disponíveis, incluindo os carbapenêmicos. Estas cepas de *K. pneumoniae* são reconhecidas como patógenos de prioridade crítica na busca de novos antimicrobianos (WHO, 2017).

1.4.4. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo ubíquo, móvel via um ou mais flagelos polares. É um microrganismo aeróbio não-fermentador, que deriva sua energia via oxidação ao invés da fermentação de carboidratos. Além disso, é capaz de crescer anaerobicamente, usando nitrato como acceptor de elétrons. Esta bactéria é caracterizada pela produção de pigmentos: piocianina (que confere coloração verde-azulada), piorubina (cor castanho-avermelhada) e pioverdina (cor amarelo-esverdeada). Mais de 90% dos isolados produzem piocianina, cuja produção aumenta conforme a taxa de crescimento do

microrganismo diminui. *Pseudomonas aeruginosa* caracteriza-se por sua grande capacidade de adaptação, tendo em vista que consegue resistir a altas concentrações de sal, antissépticos e a muitos antimicrobianos. De fato, este microrganismo pode ser encontrado em vegetação, águas residuais, potável, e marinha, solo, e em ambientes úmidos de forma geral. Por ser amplamente distribuída, *P. aeruginosa* pode também ser encontrada na pele e no trato gastrointestinal de indivíduos, como integrante comensal (BARON, 1996; SPAGNOLO; SARTINI; CRISTINA, 2021).

Este patógeno oportunista causa ampla gama de infecções severas, particularmente em indivíduos imunocomprometidos. Estas infecções geralmente são caracterizadas por intensa resposta de neutrófilos, resultando em danos pronunciados nos tecidos do hospedeiro. As infecções variam de endocardite, septicemia, meningite, infecções crônicas do pulmão, e endoftalmite. É de particular importância em pacientes com fibrose cística, queimaduras severas e com neutropenia – muitas vezes decorrente de quadros de câncer, pós-cirúrgico, e como consequência de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). As infecções agudas geralmente são resultado de trauma direto, como dano ao epitélio devido à intubação, enquanto infecções crônicas decorrem, de forma geral, da resposta imune ineficaz do hospedeiro (GELLATLY; HANCOCK, 2013; MICHALSKA; WOLF, 2015; THI; WIBOWO; REHM, 2020).

P. aeruginosa é um dos microrganismos mais típicos em biofilmes (SPAGNOLO; SARTINI; CRISTINA, 2021). Os principais fatores de virulência que contribuem para infecção por *P. aeruginosa* incluem uma série de fatores de aderência – dentre eles pili e flagelo –, exotoxinas, elastases, ramnolipídios e polissacarídeos. As elastases são proteases que interagem com o sistema imune do hospedeiro e causam invasão tecidual; sendo que *P. aeruginosa* produz as elastases LasA e LasB. Os ramnolipídios são biossurfactantes que têm um papel crucial na neutralização dos neutrófilos. Também, estão envolvidos na formação e manutenção das microcolônias no biofilme de *P. aeruginosa* (CIOFU; TOLKER-NIELSEN, 2019; HU et al., 2021; LI et al., 2019; PAMP; TOLKER-NIELSEN, 2007; THI; WIBOWO; REHM, 2020). Dentre os polissacarídeos, destacam-se alginato, Pel e Psl, que estão envolvidos na adesão a superfícies, formação e estabilização da arquitetura do biofilme. Alginato é predominantemente produzido em biofilmes de *P. aeruginosa* mucoides, exercendo função de proteção contra a

fagocitose e opsonização, além de impedir a difusão de antimicrobianos no interior de biofilmes (THI; WIBOWO; REHM, 2020). Além disso, a produção de piocianina confere a esta bactéria a capacidade de romper a cadeia transportadora de elétrons, respiração celular e metabolismo de energia do hospedeiro (HU et al., 2021). A Figura 11 mostra um biofilme de *P. aeruginosa*.

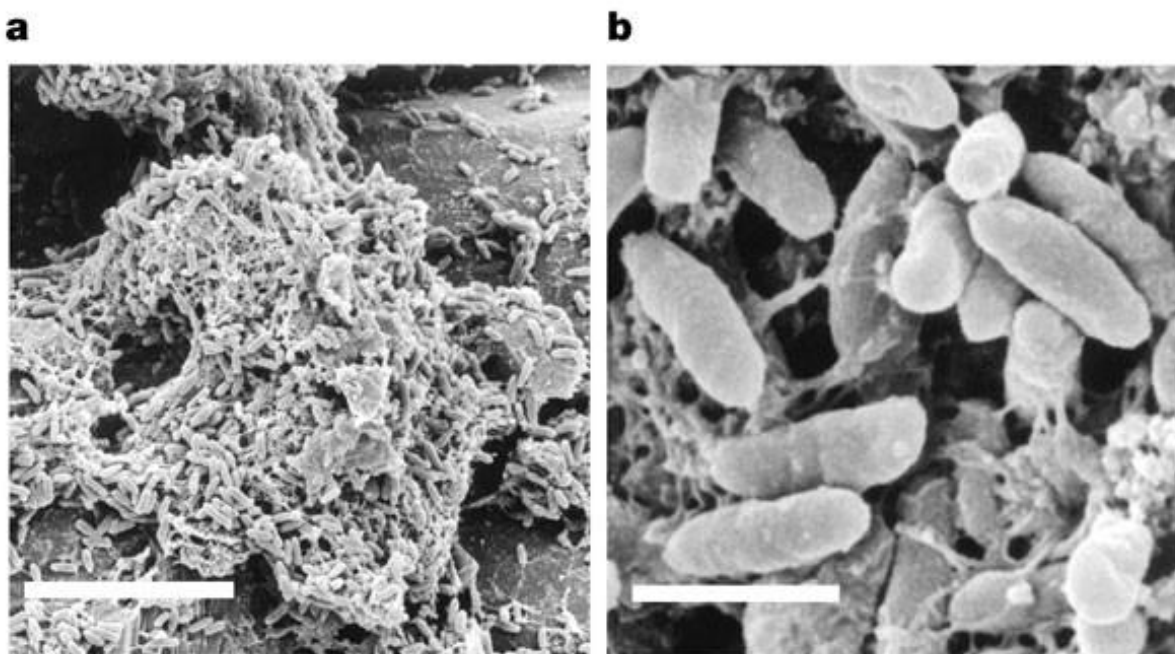


Figura 11. (a) Biofilme de *P. aeruginosa* na superfície de uma pedra, escala 10 μm . (b) Detalhe do biofilme mostrando a bactéria no seu formato bacilar e a matriz polimérica conectando as células bacterianas, escala 1 μm (retirado de WHITELEY et al., 2001).

P. aeruginosa apresenta resistência a diversos antimicrobianos, dentre eles aminoglicosídeos, quinolonas e β -lactâmicos. Esta bactéria conta um arsenal de mecanismos, sejam eles de resistência intrínseca ou adquirida, que lhes permite conferir resistência a antimicrobianos, tais como, baixa permeabilidade da membrana externa, expressão de bombas de efluxo, produção de enzimas que degradam antimicrobianos, transferência horizontal de genes de resistência, além da própria formação de biofilme que serve como uma barreira física (PANG et al., 2019). Além dos microrganismos resistentes já mencionados – *S. aureus* (prioridade alta) e *K. pneumoniae* (prioridade crítica) –, *P. aeruginosa* é considerada uma das mais preocupantes bactérias e é, portanto, listada como patógeno de prioridade crítica para

pesquisa e desenvolvimento de novas opções terapêuticas, que são urgentemente requeridas (WHO, 2017).

1.4.5. *Candida* spp.

Entre os mais de 8,7 milhões de seres eucariotos identificados no planeta, os fungos compreendem aproximadamente 611.000 espécies, totalizando cerca de 7% de todas espécies eucarióticas. Entretanto, apenas 600 espécies de fungo são capazes de causar infecções em humanos (MORA et al., 2011). O gênero *Candida* inclui em torno de 150 espécies, sendo que aproximadamente 20 são reconhecidas como patógenos, enquanto a maioria é comensal de humanos (RICHARDSON; HO; NAGLIK, 2018a). A maioria das infecções é causada por *Candida albicans*, entretanto, infecções por outras espécies têm se tornado mais frequentes. Dentre as principais espécies de *Candida* não-*albicans*, destacam-se *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, e a emergente *Candida auris* (KULLBERG; ARENDRUP, 2015; MCCARTY; PAPPAS, 2016; PAPPAS et al., 2018).

Candida spp. é um fungo leveduriforme unicelular que coloniza diversos sítios anatômicos do ser humano, incluindo pele, cavidade oral, trato gastrointestinal, e região genital. *C. albicans* pode ser encontrada como integrante da microbiota normal em aproximadamente 50% dos indivíduos saudáveis (ODDS, 1987). Este fungo pode se tornar oportunista e causar infecções de origem endógena ou exógena. Infecção de origem endógena decorre da contaminação pelo próprio microrganismo comensal, enquanto infecção de origem exógena é transmitida através de outros indivíduos, do ambiente hospitalar, ou de superfícies contaminadas. Alterações na microbiota do hospedeiro (como no uso de antimicrobianos), modificações na resposta imune do hospedeiro (no caso de terapia imunossupressora, infecção por outro microrganismo) ou variações no ambiente local (mudanças de pH, de conteúdo nutricional, quebra da barreira cutânea) contribuem para infecções por *Candida* spp. (MBA; NWEZE, 2020; NOBILE; JOHNSON, 2015).

Infecções por *Candida* spp. são especialmente problemáticas em pacientes imunossuprimidos, como no caso de pacientes com AIDS, e em indivíduos que fazem uso de dispositivos médicos (NOBILE; JOHNSON, 2015). As infecções podem ser classificadas em

superficiais e sistêmicas. A primeira causa quadros leves de prognóstico geralmente favorável, enquanto que a segunda é caracterizada por condições severas, tais como candidemia (presença do fungo na corrente sanguínea), meningite, endocardite, e podendo tornar-se candidíase invasiva. Candidíase invasiva refere-se à presença de *Candida* spp. na corrente sanguínea, causando infecções profundas, como abscessos intra-abdominais, peritonite e osteomielite, com ou sem candidemia presente. Nestes casos, a taxa de mortalidade associada pode exceder 70%. *Candida* spp. é o quarto maior agente etiológico de infecções de corrente sanguínea no mundo, que também incluem *S. aureus*, *Staphylococcus* coagulase-negativos, e *Enterococcus* spp. (MBA; NWEZE, 2020; PAPPAS et al., 2018). De fato, *Candida* spp. é responsável por cerca de 17% de todas infecções em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) do mundo (VINCENT, 2009). Além disso, aproximadamente 50% dos episódios de candidemia ocorrem em UTI, refletindo a complexidade desta doença associada à infecção (PAPPAS et al., 2018).

C. albicans é uma levedura dimórfica, ou seja, que apresenta pelo menos duas formas morfológicas (TSUI; KONG; JABRA-RIZK, 2016). Na forma leveduriforme, que é encontrada na maioria das condições *in vitro*, as células são redondas ou ovais, unicelulares, e podem estar associadas à colonização assintomática do hospedeiro ou se disseminar. Pseudo-hifas são células alongadas, elípticas, multicelulares, com constrições nos sítios septais, ou seja, após o brotamento, as leveduras não se separam. Hifas são células multicelulares tubulares que se formam de uma célula leveduriforme não-germinada, sem constrição entre a célula mãe e o filamento. O processo de transição morfológica de células leveduriformes em hifas se denomina filamentação (CHEN et al., 2020). A Figura 12 ilustra as morfologias de *C. albicans*: hifa verdadeira, pseudo-hifa e levedura.

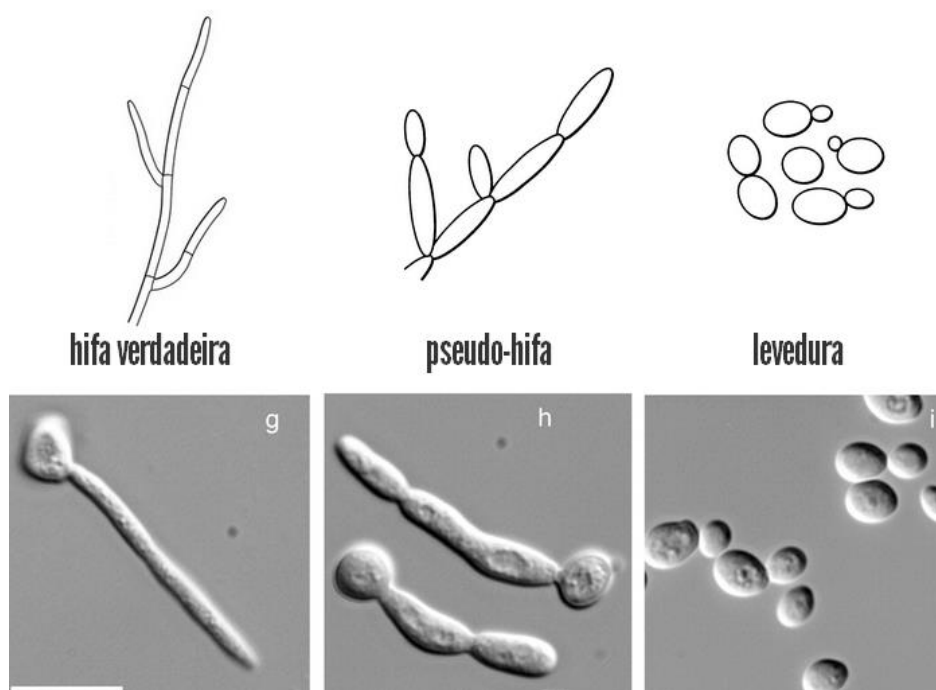


Figura 12. Ilustração e microscopia das morfologias de *C. albicans*: hifa verdadeira, pseudo-hifa e levedura (retirado de Biomedicina padrão, <<https://www.biomedicinapadrao.com.br/2016/06/como-diferenciar-uma-hifa-de-uma-pseudo.html>>, acesso em 12 de julho de 2021).

As hifas participam do processo de patogênese deste fungo, causando dano ao tecido do hospedeiro através da invasão de células epiteliais e também fazem parte do processo de formação do biofilme (CHEN et al., 2020). As hifas de *C. albicans* secretam candidalísina, que, além de causar dano ao tecido epitelial, regula a capacidade imunoestimulatória das mesmas (CIUREA et al., 2020). Além de *C. albicans*, outras espécies de *Candida* também são capazes de formar hifas verdadeiras, como *Candida dubliniensis* e *C. tropicalis* (PATHIRANA et al., 2019; RICHARDSON; HO; NAGLIK, 2018). Embora acreditava-se que *C. auris* fosse uma espécie incapaz de formar hifas, recentemente foi detectado a presença de filamentos (YUE et al., 2018). Geralmente, a produção de hifas se dá sob determinadas condições ambientais, tais como, presença de soro, exposição a altos níveis de dióxido de carbono, de N-acetilglicosamina, e determinadas temperaturas (a 37°C para algumas espécies). Em adição, este fenótipo pode ser

estimulado na presença da matriz polimérica do biofilme ou no ambiente celular do hospedeiro (CHEN et al., 2020; YUE et al., 2018).

Candida spp. secretam uma série de enzimas hidrolíticas extracelulares, dentre elas, hemolisinas, proteinases e fosfolipases (MBA; NWEZE, 2020). As hemolisinas secretadas causam a lise dos eritrócitos do hospedeiro, liberando o ferro necessário para o metabolismo do fungo (FURLANETO et al., 2018). Proteinases são enzimas que degradam proteínas. Existem quatro categorias de proteinases: serina, aspartil, cisteína e metaloproteinase. *Candida* spp. secreta aspartil proteinase, que atua na penetração do tecido do hospedeiro via degradação de substratos fisiológicos, dentre eles, albumina, imunoglobulinas, e proteínas da pele. Também, as proteinases participam de reações de inibição da fagocitose e de respostas inflamatórias (HUBE; NAGLIK, 2001; MBA; NWEZE, 2020). As fosfolipases catalisam a quebra de fosfolipídios em ácidos graxos e outras substâncias lipofílicas. Com a quebra deste componente da membrana, ocorre lise celular (MBA; NWEZE, 2020).

Além do processo de filamentação e da secreção de enzimas, a patogênese de *Candida* spp. acontece por meio da produção de adesinas e invasinas, flexibilidade metabólica, adaptação às condições do ambiente e formação de biofilme. De fato, a maioria das doenças causadas por este patógeno está relacionada com a formação de biofilme. Cateteres urinário e central venoso, marca-passos, válvulas cardíacas e lentes de contato são materiais passíveis de adesão por *Candida* spp. Uma vez aderida, a levedura apresenta potencial de se disseminar via corrente sanguínea para outros tecidos do hospedeiro e causar infecções sistêmicas invasivas (NOBILE; JOHNSON, 2015). Depende da espécie de *Candida*, diferentes componentes podem fazer parte do biofilme. No caso de *C. albicans*, o biofilme contém numerosas hifas envoltas ao longo da matriz polimérica (CIUREA et al., 2020). Embora não seja completamente elucidado, a regulação do biofilme de *Candida* spp. envolve uma série de mecanismos. A produção de farnesol por *C. albicans*, um produto metabólico da síntese de mevalonato, foi a primeira molécula do *quorum sensing* descoberta em eucariotos. Esta molécula inibe a filamentação e formação de biofilme fúngicos. Em contrapartida, a molécula tirosol estimula a transição de levedura a hifa e, por conseguinte, a formação de biofilme (KRUPPA, 2009; NICKERSON; ATKIN; HORNBY, 2006; RAMAGE et al., 2002).

Biofilmes de *Candida* spp. dificultam o tratamento com antifúngicos. Além disso, a proximidade evolucionária entre humanos e fungos limita o número de alvos que podem ser explorados para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, se comparado com bactérias (PIERCE et al., 2013). Atualmente, existem três classes majoritárias de antifúngicos disponíveis: azóis, equinocandinas e polienos. Os azóis, como fluconazol, cetoconazol e miconazol, são agentes fungistáticos, isto é, inibem o crescimento dos fungos, sem matá-los. Estes antifúngicos atuam bloqueando a biossíntese do ergosterol na membrana plasmática, tendo como alvo a enzima lanosterol 14 alfa-demetilase, codificada pelo gene *erg11*, resultando na inibição da conversão do lanosterol em ergosterol. Os lipopeptídeos equinocandinas, que incluem caspofungin, micafungina e anidulafungina, atuam em nível de parede celular fúngica, apresentando ação fungicida dependendo da concentração e do fungo. Estes antifúngicos agem como inibidores não-competitivos da beta-1,3-glucana sintase, que é requerida para a síntese das beta-glucanas. Defeitos na síntese de componentes da parede celular afetam a integridade das células fúngicas, resultando em estresse celular. Polienos, como anfotericina B e nistatina, ligam-se diretamente ao ergosterol das membranas fúngicas, causando a formação de poros na membrana, resultando em perda do balanço iônico e morte celular. Embora esta classe tenha propriedade fungicida, ou seja, causa morte fúngica, os polienos possuem diversos efeitos colaterais que limitam seu uso, como nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (PIERCE et al., 2013; PRASAD; SHAH; RAWAL, 2016).

Desde o advento dos polienos em 1950, estes agentes foram considerados padrão-ouro na terapia antifúngica por muitas décadas. Devido à toxicidade destes compostos, foram substituídos pelos azóis em 1980, classe com maior aplicação para controle de infecções fúngicas e com maior segurança de uso. Entretanto, a emergência de isolados de *Candida* spp. resistentes à esta classe restringiu seu uso. A introdução das equinocandinas tornou-se uma alternativa, tendo em vista que foi a primeira classe de antifúngicos com ação em um alvo específico dos fungos – a parede celular -, que não é encontrado em células mamíferas. Embora as equinocandinas também sejam seguras para uso, resistência a estes agentes tem sido observada. A resistência aos antifúngicos é observada em diversas espécies de *Candida*. Dentre elas, *C. auris* se destaca como um organismo multirresistente, restringindo as opções atualmente

disponíveis (JEFFERY-SMITH et al., 2017; PIERCE et al., 2013; PRASAD; SHAH; RAWAL, 2016; VEDIYAPPAN; ROSSIGNOL; D'ENFERT, 2010).

1.4.5.1. *Candida auris*

Candida auris foi descrita pela primeira vez em 2009, em um hospital de Tóquio, no Japão, a partir do canal auditivo externo de uma paciente de 70 anos. Análises indicaram uma espécie do gênero *Candida*, com estreita relação com *Candida haemulonii* e *Candida pseudohaemulonni*, que foi denominada de *C. auris* (SATO et al., 2009). Os primeiros casos de candidemia por esta espécie foram descritos na Coreia do Sul, em 2011 (KIM et al., 2009). Desde então, o número de infecções invasivas por este patógeno tem aumentado. A emergência de *C. auris* modificou a epidemiologia de candidemia em muitos países, até mesmo ultrapassando *C. albicans* no número de casos em alguns hospitais da África do Sul (VAN SCHALKWYK et al., 2019).

Interessantemente, a emergência deste patógeno se deu em três continentes de forma simultânea e independente, uma vez que os isolados eram geneticamente não-relatados. Pelo menos quatro clados foram identificados: clado I (sul da Ásia), clado II (leste asiático), clado III (africano) e clado IV (América do Sul) (LOCKHART et al., 2017). Embora a emergência de *C. auris* concomitantemente por todo o planeta não seja completamente compreendida, teorias sugerem que fatores evolutivos, antropogênicos e até mesmo uma possível origem cósmica possa contribuir para estes eventos (JACKSON et al., 2019; SHARMA; CHAKRABARTI, 2020; STEELE et al., 2020). Além das investigações acerca da origem histórica deste patógeno, questionamentos são evidenciados acerca de seu destino. Possíveis relações entre aquecimento global e a emergência de *C. auris* têm sido alvo de estudos, uma vez que esta levedura é capaz de crescer bem em temperaturas próximas de 40°C, que são geralmente elevadas para outras espécies fúngicas (HOFER, 2019).

C. auris destaca-se como um fungo emergente que representa uma séria ameaça à saúde pública. Importaneamente, a disseminação deste patógeno tem alarmado a comunidade científica, uma vez que *C. auris* pode apresentar resistência a múltiplos antifúngicos, limitando as opções terapêuticas e dificultando o tratamento dos pacientes. Uma série de fatores justificam

esta problemática e tornam este microrganismo único e desafiador. Primeiramente, a alta taxa de transmissibilidade e potencial de disseminação tem causado uma série de surtos em numerosos hospitais no mundo inteiro (BORMAN; SZEKELY; JOHNSON, 2016; VALLABHANENI et al., 2017a). Em segundo lugar, infecções por *C. auris* causam um grande espectro de manifestações clínicas associadas a taxas de mortalidade altas, de até 70% (BORMAN; SZEKELY; JOHNSON, 2016; CORTEGIANI et al., 2018). Terceiro, este microrganismo é capaz de sobreviver e proliferar por semanas em superfícies secas ou úmidas (KEAN et al., 2020; SPIVAK; HANSON, 2017). Em quarto lugar, a dificuldade da correta identificação deste fungo em laboratórios clínicos constitui um desafio. *C. auris* pode ser identificado erroneamente como *C. haemulonii* ou *C. parapsilosis* em laboratórios que não realizam identificação por técnicas de biologia molecular ou métodos automatizados. Ensaios convencionais de microbiologia básica não são capazes de identificar *C. auris*, o que compromete o diagnóstico, principalmente em países em desenvolvimento (PASQUALOTTO; SUKIENNIK; MEIS, 2019; SPIVAK; HANSON, 2017). Em quinto lugar, infecções por *C. auris* são associadas por altos índices de falha terapêutica e resistência a múltiplos antifúngicos. De fato, é frequente a suscetibilidade reduzida de *C. auris* a azóis e equinocandinas (LEE et al., 2011; ROSSATO; COLOMBO, 2018). Em sexto lugar, o sucesso deste patógeno resulta de seus diversos atributos e fatores de virulência, dentre eles resistência a estresses ambientais e agentes antifúngicos, capacidade de formação de biofilmes e aderência a superfícies, fenótipos agregativos e não-agregativos, e produção de enzimas extracelulares como proteinases, fosfolipases e hemolisinas (BORMAN; SZEKELY; JOHNSON, 2016; KEAN et al., 2020; LARKIN et al., 2017; MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

Em 2016, foram reportados nos Estados Unidos os primeiros sete casos de *C. auris* (VALLABHANENI et al., 2017). Na América Latina, o primeiro caso foi reportado na Venezuela, entre 2012 e 2013. Isolados de *C. auris* foram detectados na corrente sanguínea de 18 pacientes admitidos em um centro médico (CALVO et al., 2016). No Brasil, em dezembro de 2020, o primeiro caso de *C. auris* foi relatado na cidade de Salvador, na Bahia. Dois pacientes – uma mulher de 74 anos e um homem de 59 anos – apresentavam colonização por *C. auris* e estavam em UTI com diagnóstico de síndrome respiratória aguda severa em decorrência de infecção pelo vírus do SARS-CoV-2, agente etiológico do coronavírus (COVID-19). Ambos os

pacientes possuíam comorbidades e fizeram uso de antibioticoterapia. O indivíduo do sexo masculino recebeu tratamento empírico com anidulafungina e teve alta hospitalar após 49 dias de internação, enquanto com a paciente do sexo feminino veio a óbito após mais de dois meses de internação (DE ALMEIDA et al., 2021). Com a pandemia do COVID-19, inúmeros hospitais tiveram sua capacidade colapsada em decorrência do grande número de internações, principalmente em UTI. Simultaneamente, surtos de infecção por *C. auris* ocorreram em virtude da transmissão nosocomial através de fômites e via contato de profissionais da saúde. Na Índia, entre abril e julho de 2020, 15 pacientes com COVID-19 apresentaram candidemia, sendo que *C. auris* foi o agente etiológico em dois terços dos casos. Nestes casos, 60% vieram a óbito. Todos os isolados eram resistentes ao fluconazol e 40% à anfotericina B. Além disso, 30% ($n = 3$) dos isolados de *C. auris* eram resistentes a três classes de antifúngicos (CHOWDHARY et al., 2020).

Considerando que o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos é restringido pelo limitado número de alvos seletivos em fungos, há uma necessidade urgente por novos candidatos antifúngicos, incluindo aqueles que têm como alvo fatores de virulência. Em adição, poucos estudos envolvem a compreensão dos fatores de virulência e da patogênese de infecções por *C. auris*, em virtude de sua identificação e investigação ainda muito incipientes, mas que demandam mais pesquisas em decorrência da grande emergência e relevância no meio científico e na comunidade médica (AHMAD; MOLEPO; PATEL, 2016; DUBEY; SINGLA, 2019; FISHER et al., 2018; GAUWERKY; BORELLI; KORTING, 2009; SRIVASTAVA; SINGLA; DUBEY, 2018).

1.5.Desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos e antivirulência

A investigação de novos agentes antimicrobianos e antivirulência, sejam eles de origem natural ou sintética, requer uma série de ensaios para avaliação de sua eficácia e toxicidade *in vitro* e, posteriormente, em modelos animais, para então serem conduzidos ensaios clínicos em humanos, até sua disponibilização para uso. As primeiras etapas de estudo nas quais ocorrem os ensaios *in vitro* e em modelos animais é denominada etapa pré-clínica. Esta fase é caracterizada pela seleção dos experimentos que definirão o sucesso na inibição do crescimento microbiano

ou de fatores de virulência mesmo na ausência de morte, no caso de estratégias antivirulência. Neste sentido, faz-se necessária a escolha de modelos animais que possam adequadamente avaliar o desempenho de novos agentes biológicos (THEURETZBACHER et al., 2020).

O uso de modelos mamíferos é comumente adotado para estudos de infecção, devido à similaridade com humanos no que concerne ao metabolismo, temperatura corporal e resposta imune. Não obstante, estes modelos são onerosos e laboriosos. Além disso, grandes preocupações éticas e regras cada vez mais estritas tornam prolongado o tempo de autorização para estes tipos de estudos. Desta forma, a seleção de modelos alternativos é fundamental para pesquisas microbiológicas. O primeiro modelo invertebrado a ser proposto foi o nematoide *Caenorhabditis elegans*, seguido pela mosca-das-frutas *Drosophila melanogaster* e, mais recentemente, a larva da traça da cera *Galleria mellonella* (CUTULI et al., 2019).

C. elegans é um nematoide de vida livre, transparente, de 1 mm de comprimento e 50 µm de largura, hermafrodita (em sua maioria) com capacidade de autofecundação e de gerar progenia de 300 larvas geneticamente idênticas. O verme vive em torno de 2 a 3 semanas quando alimentado de *Escherichia coli* auxotrófica OP50. Quando alimentado de microrganismo patogênico, ocorrem evidentes mudanças em seu fenótipo, incluindo acumulação do patógeno no intestino, formação de biofilme na cutícula e/ou intestino, inchaço da cauda e longevidade diminuída para 1,5 a 7 dias (EWBANK; ZUGASTI, 2011; KALETTA; HENGARTNER, 2006). Inúmeros patógenos humanos também causam doença e morte em *C. elegans*, incluindo *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Candida* spp. (BREGER et al., 2007; EWBANK; ZUGASTI, 2011; KIM et al., 2017). Além disso, muitos fatores de virulência microbianos requeridos para infecção em *C. elegans* correlacionam com aqueles envolvidos na patogênese em mamíferos. Quando exposto a patógenos, *C. elegans* é capaz de ativar mecanismos protetivos de resposta imune inata, envolvendo vias de sinalização específicas e causando a produção e liberação de moléculas de defesa. Estas vias são altamente conservadas e semelhantes às encontradas em humanos, incluindo a via da proteína quinase p38, e a via de sinalização da insulina (KIM, 2002). Interessantemente, *C. elegans* pode ser recuperado de uma infecção não apenas pela inibição do crescimento microbiano, mas também pela inibição de fatores de virulência ou aprimoramento de seu sistema imune. Devido a estas características, *C. elegans* se apresenta como um excelente modelo para identificação não apenas de antimicrobianos convencionais,

mas também de agentes antivirulência ou imunomodulatórios, enquanto permite avaliar simultaneamente a eficácia dos mesmos e sua toxicidade (KIM et al., 2017; LEUNG et al., 2008). A Figura 17 mostra os estágios de desenvolvimento de *C. elegans*.

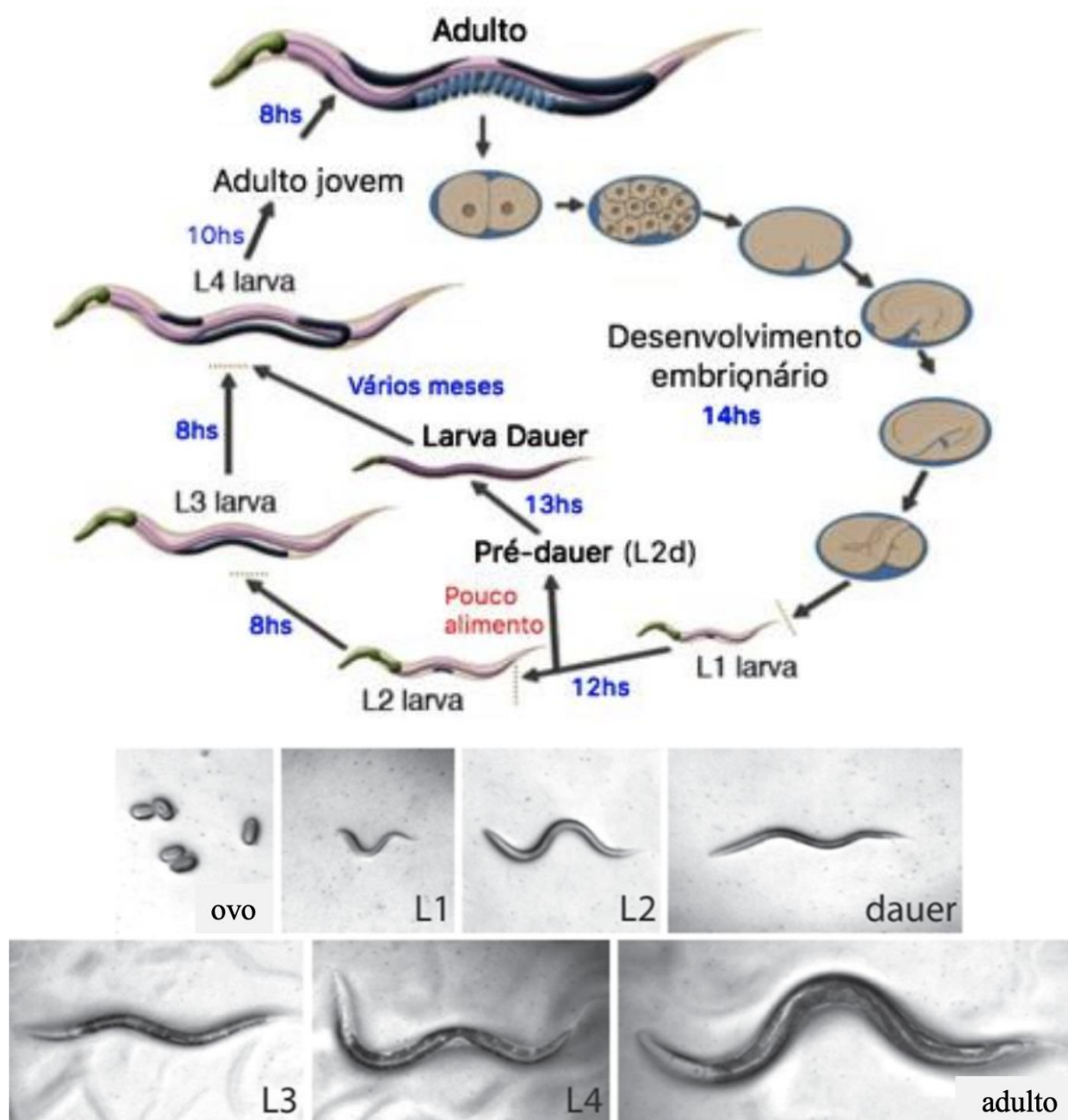


Figura 17. Estágios de desenvolvimento do nematoide *C. elegans*, desde eclosão do ovo até adulto hermafrodita (adaptado de *Developmental Neurobiology Laboratory*, <

<http://www.sfu.ca/biology/faculty/hutter/hutterlab/research/Celegans.html>>, acesso em 10 de setembro de 2021).

Além do nematoide *C. elegans*, outro modelo invertebrado tem sido cada vez mais utilizado no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, a larva *G. mellonella* (JUNQUEIRA; MYLONAKIS; BORGHI, 2021). A traça da cera é um inseto lepidóptero que naturalmente infesta colmeias. *G. mellonella* se desenvolve através de quatro estágios distintos: ovo, larva, pupa e adulto. As larvas são opacas, amareladas a brancas, com 3 cm de comprimento e massa variando entre 300 a 500 mg. Quando sofrem metamorfose, se tornam traças acinzentadas. Embora a temperatura ideal de desenvolvimento seja entre 29 a 33°C, as larvas podem sobreviver a temperatura fisiológica de mamíferos (37°C). De fato, vários fatores de virulência microbianos que são dependentes da temperatura podem ser estudados neste modelo animal. Além disso, *G. mellonella* possui células de defesa semelhantes às encontradas em humanos, com capacidade de fagocitose, chamados hemócitos (CUTULI et al., 2019; DESBOIS; COOTE, 2012). Outra vantagem deste modelo é a possibilidade de injetar concentrações conhecidas do patógeno e/ou do agente antimicrobiano diretamente na hemocele. Para os estudos experimentais se utiliza o último estágio larval, que se desenvolve a partir do ovo após 5 semanas. Após a infecção com o microrganismo através de injeção na última “*pro-leg*”, a virulência microbiana pode ser verificada em até 5 dias através da observação da sobrevivência da larva ao longo dos dias por meio da resposta ao toque e pela melanização. Quando ocorre a melanização completa, ou seja, a larva se torna totalmente enegrecida, indica a morte da mesma (FUCHS et al., 2010; TSAI; LOH; PROFT, 2016). A Figura 18 mostra injeção em larva de *G. mellonella* e seu processo de melanização.

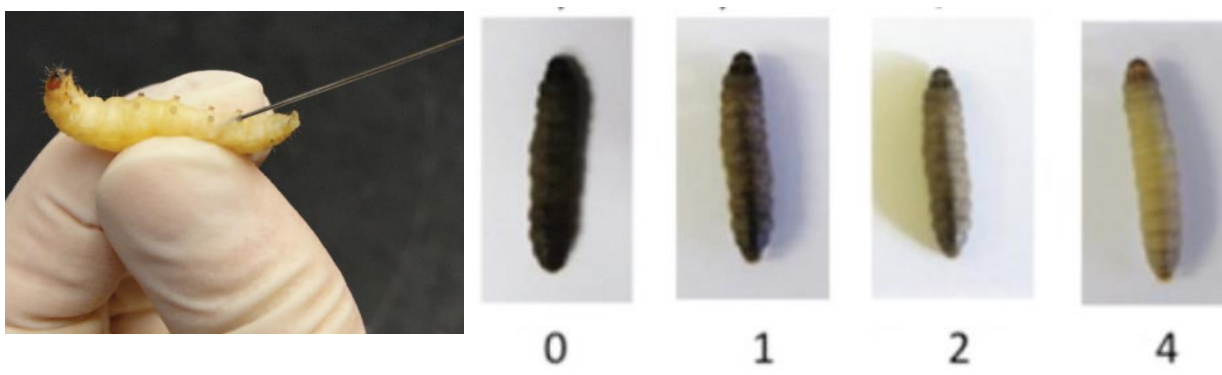


Figura 18. Injeção na última *pro-leg* de larva de *G. mellonella* e seu processo de melanização ao longo do tempo. Quanto mais melanizada a larva, mais escura ela estará. Larvas com processo completo de melanização estão mortas e servem como indicativo em ensaios de toxicidade e eficácia de compostos (retirado de FUCHS et al., 2010; TSAI; LOH; PROFT, 2016).

Assim como nos estudos envolvendo *C. elegans* em que uma série de microrganismos patogênicos também já foram inoculados, em *G. mellonella* são capazes de causar doença e morte, tais como, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *Candida* spp. Por estas razões, *G. mellonella* é um modelo bastante eficaz para estudos de novos agentes antimicrobianos e sua toxicidade (CUTULI et al., 2019; LI et al., 2013).

1.6. Compostos naturais como estratégias antimicrobianas e antivirulência

A história da descoberta de antimicrobianos ao longo das eras experimentou sucessivos períodos de transição. Os períodos envolveram desde a era de ouro da antibioticoterapia, por volta das décadas de 50 até meados da década de 70, através da descoberta de numerosos antibióticos (de origem natural), que transitou para a era da medicina química, através do lançamento de antimicrobianos de origem sintética, agentes de amplo espectro e da triagem de um grande número de compostos por métodos automatizados, até a fase atual, baseada no foco em alvos específicos, mas que tem apresentado baixa taxa de sucesso. Prenuncia-se, para as próximas décadas, a era da descoberta de compostos não-convencionais, por meio do uso de abordagens múltiplas, da escolha de novas estratégias de controle microbiano, e do uso de alvos em modelos *in vivo* (BROWN; WRIGHT, 2016).

Produtos de origem natural são, ainda, a principal fonte de compostos antimicrobianos. Estima-se que existam entre 250.000 e 500.000 de espécies de plantas no planeta Terra (BORRIS, 1996). Cerca de 20.000 espécies de plantas apresentam potencial de uso na medicina e no consumo humano e animal. Contudo, apenas uma pequena proporção (menos de 10%) do total de moléculas bioativas na natureza tem sido explorada como objeto de estudo farmacológico (ATANASOV et al., 2015; CHEESMAN et al., 2017). Por esta razão, diferentes estratégias podem ser empregadas para impulsionar esta classe de moléculas e favorecer a

emergência de uma segunda era de ouro da antibioticoterapia (DÍAZ-NUÑEZ; GARCÍA-CONTRERAS; CASTILLO-JUÁREZ, 2021).

Buscar propriedades curativas em plantas é uma prática adotada desde antigamente. Hipócrates já havia estudado mais de 400 plantas medicinais, datado do final do século V a.C. De fato, plantas têm sido utilizadas como recurso terapêutico por praticamente toda população mundial (COWAN, 1999; JI; LI; ZHANG, 2009). O interesse em produtos naturais pela comunidade científica tem aumentado exponencialmente (KHAMENEH et al., 2019). No banco de dados *PubMed*, quando se pesquisa o tópico “*antimicrobial activity AND medicinal plants*”, encontra-se menos de 50 artigos publicados por ano entre os períodos de 1949 e 1990, 1269 artigos no período compreendido entre 1991 e 2000, 2111 artigos no período de 2001 a 2010, e 4436 artigos entre 2011 e 2020 (pesquisa realizada em 15 de agosto de 2021). Entre 2005 e 2010, um total de 19 fármacos baseados em produtos naturais foram aprovados para comercialização, sendo 7 classificados como produtos naturais, 10 como produtos naturais semi-sintéticos e 2 como derivados de produtos naturais. Destes 19 fármacos, um tem ação antifúngica (anidulafungina) e cinco antibacteriana (doripenem, tigeciclina, retapamulina, telavancina e aztreonam monobactâmico) (MISHRA; TIWARI, 2011).

Cerca de 25 a 50% dos fármacos atuais são derivados de plantas, entretanto, poucos são utilizados com função antimicrobiana, uma vez que, com frequência, os estudos se destinam à pesquisa de novos antimicrobianos em fontes bacterianas ou fúngicas. Não obstante, o interesse por este tipo de atividade a partir de plantas tem provocado uma inclinação na comunidade científica para esta área (COWAN, 1999). Extratos e compostos provenientes de plantas têm sido investigados como agentes naturais antimicrobianos e de controle de fatores de virulência – incluindo biofilmes (BRIDIER et al., 2015). As plantas produzem uma série de metabólitos secundários ou fitoquímicos, que atuam como uma linha de defesa protegendo contra estresses bióticos e abióticos, tais como radiação ultravioleta, herbívoros, microrganismos e insetos no ambiente. Além disso, muitos produtos naturais são entidades químicas dotadas de características únicas, incluindo estruturas complexas que não podem ser facilmente obtidas por vias sintéticas, e que podem culminar em mecanismos de ação totalmente diferentes, em comparação aos antimicrobianos convencionais (SILVA et al., 2016). A Tabela 3 exemplifica algumas plantas que apresentam atividade antimicrobiana previamente descrita na literatura.

Tabela 3. Exemplos de plantas com reconhecida atividade antimicrobiana (adaptado de Cowan, 1999; Khameneh *et al.*, 2019).

Nome comum	Nome científico	Composto ou classe	Atividade antimicrobiana
Açafrão	<i>Curcuma longa</i>	Curcumina	Bactérias, protozoários
Alcaçuz	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Glabrol	<i>S. aureus</i> , <i>M. tuberculosis</i>
Alho	<i>Allium sativum</i>	Alicia, ajoene	Geral
Ashwagandha	<i>Withania somniferum</i>	Withafarina A	Bactérias, fungos
Caju	<i>Anacardium pulsatilla</i>	Ácido salicílico	<i>Propionibacterium acnes</i>
Camomila	<i>Matricaria chamomilla</i>	Ácido antêmico	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>S. aureus</i>
Cânhamo	<i>Cannabis sativa</i>	Ácido β -resercíclico	Bactérias, vírus
Cebola	<i>Allium cepa</i>	Alicina	Bactérias, <i>Candida</i> spp.
Chá verde	<i>Camellia sinensis</i>	Catequina	Geral
Coca	<i>Erythroxylum coca</i>	Cocaína	Cocos Gram-positivos e Gram-negativos
Cranberry	<i>Vaccinium</i> spp.	Frutose	Bactérias
Dente de alho	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol	Geral
Eucalipto	<i>Eucalyptus globulus</i>	Taninos	Bactérias, vírus

Eucalipto	<i>Eucalyptus globulus</i>	Tanino	Bactérias, fungos
Ginseng	<i>Panax notoginseng</i>	Saponina	<i>E. coli</i> , <i>Sporothrix schenckii</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Trichophyton</i>
Lúpulo	<i>Humulus lupulus</i>	Lupulona, humulona	Geral
Maçã	<i>Malus sylvestris</i>	Floretina	Geral
Manjeriço	<i>Ocimum basilicum</i>	Óleos essenciais	Bactérias
Óleo de oliva	<i>Olea europaea</i>	Hexanal	Geral
Papoula	<i>Papaver somniferum</i>	Ópio	Geral
Pimenta preta	<i>Piper nigrum</i>	Piperina	Fungos, <i>Lactobacillus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
Segurelha-das-montanhas	<i>Satureja montana</i>	Carvacrol	Geral
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i>	Ácido cafeico, timol, taninos	Vírus, bactérias, fungos
Valeriana	<i>Valeriana officinalis</i>	Óleos essenciais	Geral

De forma geral, existem sete classes de compostos naturais que podem ser explorados quanto às atividades antimicrobianas e antivirulência: compostos fenólicos, óleos essenciais, terpenos, lectinas, alcaloides, polipeptídeos e poliacetilenos (YONG; DYKES; CHOO, 2019). No grupo dos compostos fenólicos, existem subclasses que incluem ácidos fenólicos, quinonas, flavonoides, flavonas, flavonóis, taninos e cumarinas (MISHRA et al., 2020; TRENTIN et al., 2011). Diversos solventes podem ser utilizados para extração destes compostos naturais, incluindo diclorometano, acetona, éter, clorofórmio, etanol, metanol e água. Via de regra, nos extratos obtidos a partir do diclorometano, pode-se encontrar terpenos; em extratos metanólicos, antocianinas, terpenos, saponinas, taninos, flavonas; em extratos etanólicos, taninos,

poliacetilenos, flavonóis, terpenoides, esteróis, alcaloides; em extratos aquosos, antocianinas, taninos, saponinas, terpenoides, polipeptídeos, lectinas (COWAN, 1999). Na Tabela 4 há alguns exemplos de classes de compostos provenientes de plantas que apresentam atividade antimicrobiana.

Tabela 4. Principais classes de compostos oriundos de plantas com atividade antimicrobiana (adaptado de Khameneh *et al.*, 2019).

Classe	Composto	Mecanismo de ação	Microrganismo	Resultados
Alcalóides	Piperina	Inibidor de bombas de efluxo	<i>S. aureus</i> e MRSA	Em modelo <i>in vitro</i>
	Reserpina	Inibidor de bombas de efluxo	<i>Staphylococcus</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp. and <i>Micrococcus</i> sp.	Redução da concentração inibitória mínima de antimicrobianos
	Berberina	Inibidor da divisão celular, inibidor da síntese de DNA e proteínas	<i>Escherichia coli</i> <i>Candida albicans</i>	Em modelo <i>in vitro</i>
Organossulfurados	Alicina	Inibidor da enzima sulfidril dependente, inibidor da síntese de DNA e proteínas	<i>S. epidermidis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i>	-
	Ajoene	Inibidor da enzima sulfidril dependente	<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Streptoproteus</i> , <i>Staphylococcus</i> and <i>E. coli</i>	-
Polifenóis	Resveratrol	Inibidor de bombas de efluxo	<i>Mycobacterium smegmatis</i> , <i>Campylobacter jejuni</i>	Redução da concentração inibitória de antimicrobianos contra isolados resistentes
	Luteolina	Inibidor de bombas de efluxo	<i>Mycobacterium</i> spp.	Redução da concentração

			inibitória de antimicrobianos contra isolados resistentes
Kaempferol	Inibidor de bombas de efluxo	MRSA, <i>C. albicans</i>	Redução da concentração inibitória de antimicrobianos contra isolados resistentes
Quercetina	Inibidor de bombas de efluxo	<i>S. aureus</i>	-
Ácido p-cumárico	Dano à membrana citoplasmática	<i>Oenococcus oeni</i> and <i>Lactobacillus hilgardii</i>	-
Apigenina	Enzima d-alanina:d-alanina ligase	<i>Helicobacter pylori</i> , <i>E. coli</i>	-
Curcumina	Enzima sortase A	<i>S. aureus</i>	-
Farnesol	Membrana citoplasmática	<i>S. aureus</i>	-
Timol	Inibidor de bombas de efluxo, membrana citoplasmática	<i>C. glabrata</i> , <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i>	Sinergismo com fluconazol
Carvacrol	Inibidor de bombas de efluxo, membrana citoplasmática	<i>E. coli</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>	-
Eugenol	Membrana citoplasmática	<i>H. pylori</i> , MRSA, <i>P. aeruginosa</i>	Atua em biofilmes

1.7. Uva

O cultivo de uvas (*Vitis* sp.) é uma das mais tradicionais atividades agrícolas no mundo, com mais de 70 milhões de toneladas produzidas por ano, a nível mundial, ocupando uma área de 7,5 milhões de hectares (GONÇALVES; LORENZO; TRINDADE, 2021). Seu fruto, a uva, pode ser consumido *in natura* ou processado, principalmente na forma de vinhos e sucos. Cerca

de 75% da produção mundial de uva é destinada para a indústria vinícola, que é responsável pelo processamento da fruta e geração de seus resíduos. A Europa detém a maior produção mundial (43,1%), seguido da Ásia (28,4%), Américas (20%), África (5,8%) e Oceania (2,7%) (SILVA et al., 2021). De acordo com a FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), os maiores produtores mundiais de uva são Itália, França, China, Estados Unidos e Espanha, sendo que o Brasil representa o décimo-terceiro maior produtor. Em 2018, foram produzidas quase 1,5 milhões de toneladas de uvas no Brasil, sendo que metade da produção é destinada para consumo *in natura* e o restante é processado em vinho (42% em vinhos de mesa e 7% em vinhos finos), sucos (49%) e em outros derivados (2%). O Rio Grande do Sul, maior estado produtor, detém cerca de 90% da produção nacional (BARCIA et al., 2015a, 2015b; BERES et al., 2017; MAPA, 2015; MARTINS, 2016; MATTOS et al., 2017).

A videira se apresenta como arbusto sarmentoso e trepador, sendo classificada na família *Vitaceae* gênero *Vitis*. Aproximadamente 10.000 variedades de uvas existem no mundo, sendo cerca de 5000 pertencentes à espécie *Vitis vinifera*, 2000 *Vitis labrusca*, além das híbridas. A espécie *Vitis vinifera*, de origem europeia, é geralmente utilizada para a produção de vinhos finos. Já as espécies *Vitis labrusca* e *Vitis bourquina*, denominadas tipos americanos, são usualmente empregadas para consumo *in natura* ou como base para vinhos de mesa. O fruto da uva apresenta-se na forma de bagas de formato esférico, alongado, oval, globoso, entre outros. Sua tonalidade varia de esverdeada, amarelada, rosada, vermelho, roxo e preto-azulada. As bagas apresentam-se dispostas em cachos sustentados por estrutura herbácea ligno-celulósica denominada engaco ou haste, e podem conter até quatro sementes. A baga é constituída do epicarpo e sementes. O pericarpo pode ser subdividido em epicarpo e endocarpo, o primeiro vulgarmente denominado casca representa de 5 a 12% do peso da baga, enquanto que o endocarpo ou polpa 64-90%. As sementes constituem mais de 10% do peso das bagas. A Figura 13 mostra as estruturas do cacho da uva e suas partes (CRUZ, 2013).

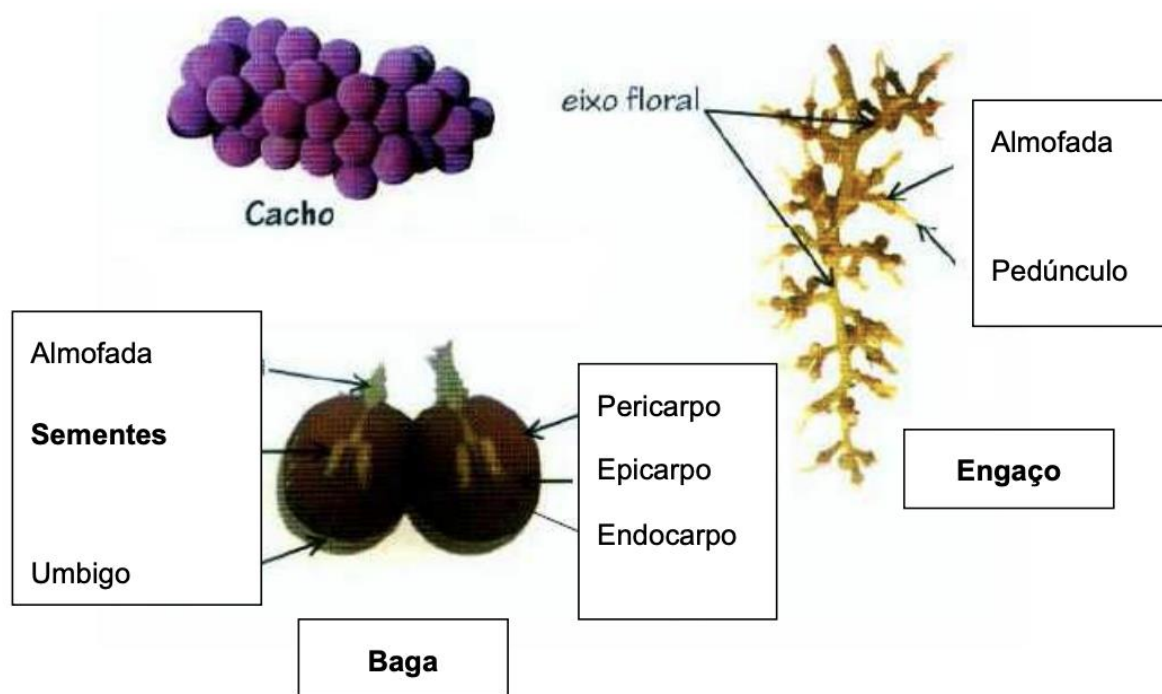


Figura 13. Classificação botânica e estrutura do cacho da uva e suas partes (retirado de CRUZ, 2013).

Ao longo do processo de vinificação, uma série de etapas ocorrem, variando conforme o tipo de uva e tipo de produto a ser elaborado. De forma geral, a primeira etapa envolve a remoção das folhas e engaço. A fruta é então esmagada para liberação do sumo através da maceração. A maceração facilita a extração de nutrientes e aromas por meio do contato do sumo com a casca, polpa e sementes da uva por um tempo determinado. No caso de uvas brancas, a maceração pode ou não ocorrer e, caso ocorra, é mantida por mínimo tempo. No caso de uvas tintas, a maceração é prolongada e acontece simultaneamente à fermentação alcoólica. A fermentação alcoólica tem como objetivo converter os açúcares da uva, principalmente a glicose, (substrato, doador de elétrons) em álcool etílico (produto, receptor de elétrons) e gás carbônico. Após o processo fermentativo, sucedem-se etapas de trasfegas, estabilização e filtração do vinho para remoção de materiais dissolvidos, correção de aromas e para aumentar a clarificação e estabilidade do produto final. Ao longo do processamento, há a geração de resíduos em diferentes etapas (JACKSON, 2008). A Figura 14 demonstra as etapas de elaboração de sucos e vinhos.

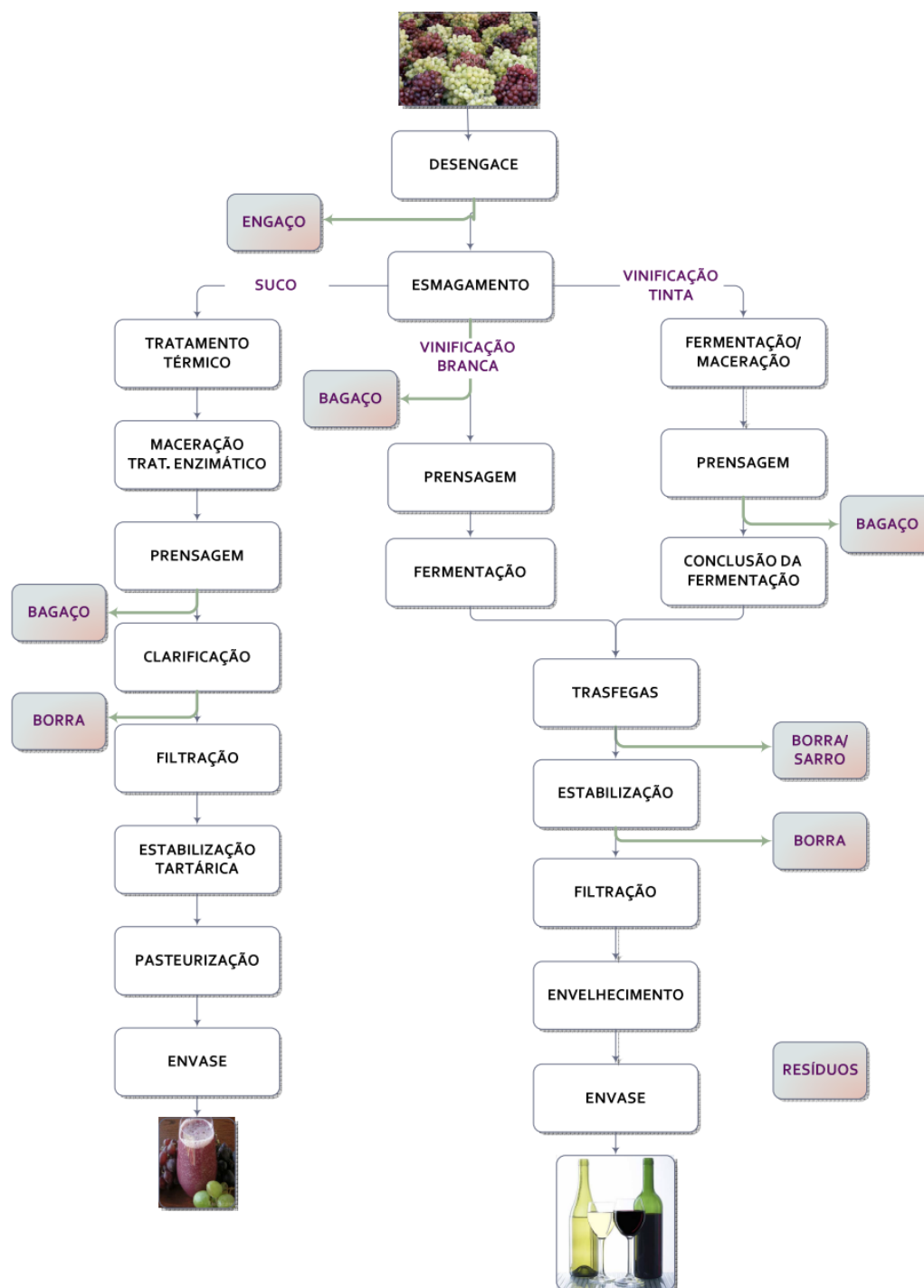


Figura 14. Diagrama simplificado das etapas de elaboração de sucos e vinhos e seus respectivos resíduos gerados ao longo do processo (retirado de CRUZ, 2013).

1.7.1. Resíduos da uva

Após a extração da polpa da uva, o bagaço e engaços remanescentes são geralmente direcionados à compostagem ou descartados em áreas abertas, podendo causar problemas ambientais (TEIXEIRA et al., 2014). A produção de vinho implica na geração de enormes quantidades de subprodutos, que consistem basicamente em resíduos orgânicos, águas residuais, e resíduos inorgânicos. Os danos envolvidos incluem poluição da água, degradação do solo, danos à vegetação, uso de energia, emissão de gases de efeito estufa e odores. Além disso, os resíduos resistem à degradação biológica devido ao baixo pH e alto conteúdo de substâncias antibacterianas e fitotóxicas (SILVA et al., 2021).

A cada ano, a produção mundial de sucos e vinhos gera em torno de 10 milhões de toneladas de resíduos. Na produção de 100 litros de vinho obtém-se aproximadamente 30 quilogramas de resíduos, correspondendo de 20 a 30% da massa original da uva. Destes 30 quilogramas, 18 quilogramas são de bagaço e o restante de engaço. O bagaço pode ser composto, dependendo do tipo de processamento, de sementes e cascas. Na produção brasileira, 40% das uvas processadas tornam-se resíduos, gerando quase 60 milhões de quilogramas de bagaço. Estes resíduos contêm compostos como polifenóis, ácidos graxos, ácidos cinâmico e benzoico e outros compostos que não foram totalmente extraídos durante o processo de fabricação do vinho e que são de interesse para as indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética (GONÇALVES; LORENZO; TRINDADE, 2021; MARTINS, 2016).

Os resíduos agroindustriais representam, de forma geral, uma fonte importante de recursos renováveis do planeta, embora não haja um procedimento unificado de descarte considerado ideal (SHIRAHIGUE; CECCATO-ANTONINI, 2020). A crescente demanda por modos de produção sustentáveis, por ambos os consumidores e agências reguladoras, requer a implementação de processos mais eficientes, atrelado ao reaproveitamento e reciclagem de seus subprodutos (SILVA et al., 2021). Além da deterioração do meio ambiente, o acúmulo deste tipo de biomassa em grandes quantidades resulta na perda de um material valioso. Estes resíduos possuem elevada quantidade de compostos fenólicos bioativos devido à ineficiente extração durante seu processamento. Por isto, são considerados fontes potenciais de propriedades

antioxidantes interessantes para indústrias farmacêutica e de alimentos, com possíveis aplicações tecnológicas como compostos antimicrobianos, antioxidantes, anti-inflamatórios, antitumorais, e aditivos alimentares. Apesar do seu valor significativo, usualmente esses resíduos são comumente subexplorados, e o seu valor potencial como produto natural é frequentemente perdido (KUSCH et al., 2015; MARTINS, 2016; SHIRAHIGUE; CECCATO-ANTONINI, 2020).

1.7.1.1. Composição do resíduo da uva

A composição química da uva é influenciada pelas condições ambientais (tipo de solo, clima), fatores vitícolas (tempo de colheita, variedade de uva, fertilização, maturação), e técnicas de processamento. As uvas possuem altos níveis de compostos fenólicos, que pertencem a uma classe de moléculas com grande diversidade estrutural, caracterizada pela presença de um anel aromático, tendo um ou mais grupos hidroxil diretamente ligado ao anel. Os compostos fenólicos representam 70% dos compostos bioativos encontrados em frutas. São metabólitos secundários que não necessariamente participam de vias de crescimento e reprodução da planta, portanto, sua natureza e concentração variam significativamente. Entretanto, também podem desempenhar funções hormonais, como inibidores de reações enzimáticas e reguladores de crescimento (SILVA et al., 2021).

Estes compostos, que são fenóis simples ou polifenóis, podem ser classificados em flavonoides e não-flavonoides. Os flavonoides consistem em dois anéis fenólicos, ligados por um centro pirano (contendo oxigênio), descrito como C6-C3-C6. Variações nesta estrutura resultam em classes como antocianidinas ou antocianinas, flavonóis, 3-flavanois, flavonas, chalconas. Geralmente são encontrados na casca de uvas tintas e proporcionam a cor típica deste tipo de uva. Embora a composição de uvas brancas não difira tanto de uvas tintas, apresentam concentrações menores de polifenóis, particularmente antocianinas (devido menor pigmentação da casca). Os compostos não-flavonoides (C6-C2-C6) consistem em ácidos fenólicos (derivados dos ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzoicos), estilbenos, cumarinas e lignanas (BARCIA et al., 2015a; SILVA et al., 2021). A Figura 15 mostra as estruturas das principais classes de compostos fenólicos.

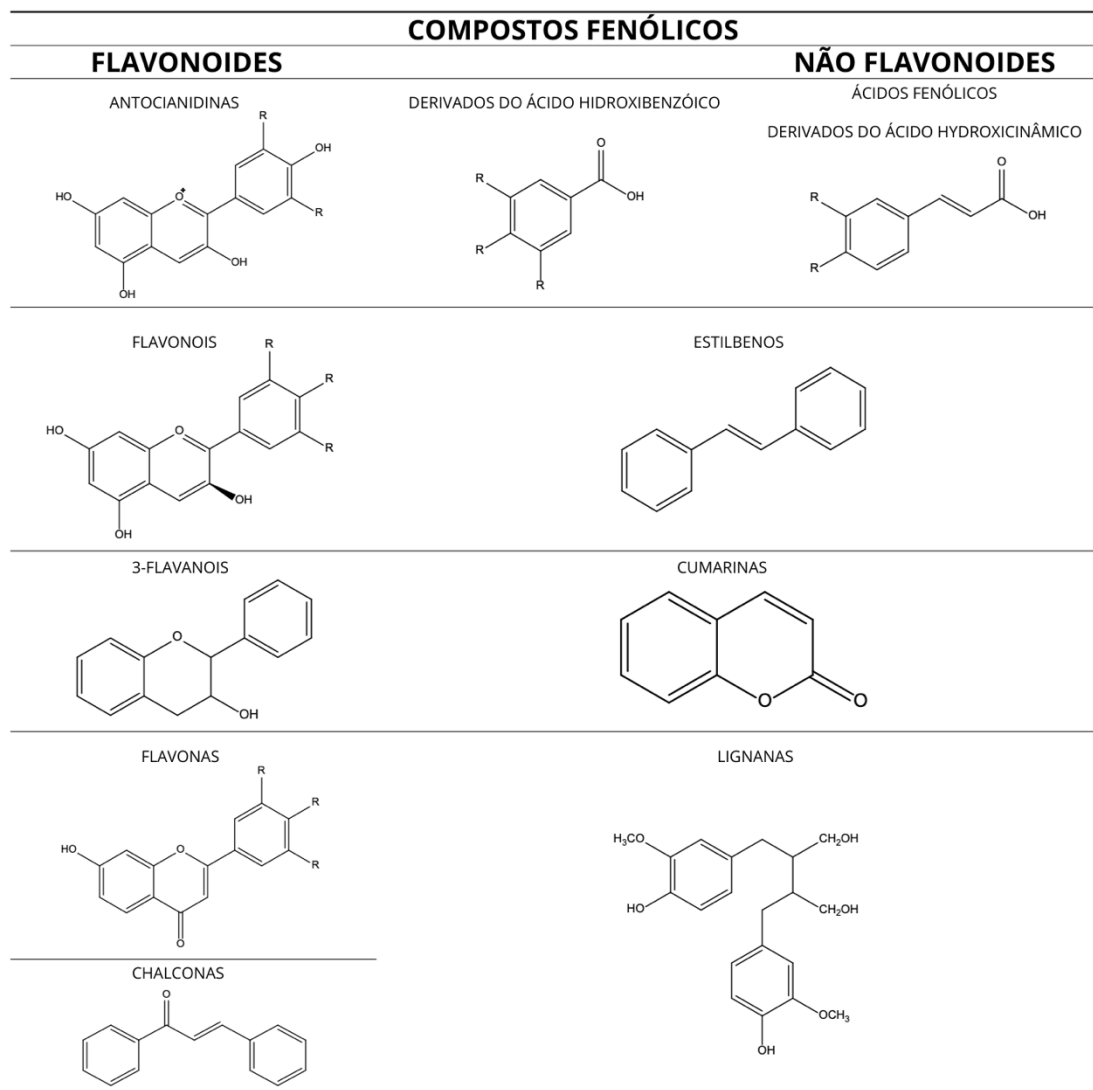


Figura 15. Estruturas das principais classes de compostos fenólicos (retirado de SILVA et al., 2021).

A casca da uva tinta corresponde a 52-56% da matéria seca da uva, enquanto que a casca da uva branca corresponde a 17-28%. Os polifenóis se localizam na camada interna da casca, que contém grandes quantidades de flavanóis, antocianinas, flavonóis, estilbenos, e ácidos fenólicos. Pode ser encontrado ácido elágico, miricetina, quercetina e resveratrol. As antocianinas mais abundantes são malvidina-3-O-glicosídeo e peonidina-3-O-glicosídeo. A

casca também contém polissacarídeos (20% celulose e 12% hemicelulose), pectinas (20%), proantocianidinas insolúveis (15%) e proteínas (5-12%) (SILVA et al., 2021; SLOBODNÍKOVÁ et al., 2016).

As sementes representam cerca de 5% da massa da uva e de 38 a 52% da matéria seca do resíduo da uva. Estima-se que 3 milhões de toneladas de sementes de uva são geradas pela indústria vitícola anualmente. As cascas possuem alto teor de fibras (40%), proteínas (11%), lipídios (16%) e polifenóis como taninos (7%), carboidratos e minerais. A semente é rica ácido linoleico, resveratrol, epicatequina, catequina, ácido gálico, ácido cafeico, ácido siríngico, ácido 4-hidroxibenzoico e ácido protocatecuico (SILVA et al., 2021).

O engaço representa 14% da massa dos resíduos sólidos do processo de vinificação. Caracteriza-se pela presença de materiais lignocelulósicos, como lignina (17-26%), celulose (20-30%) e hemicelulose (3-20%). Os taninos que ali se encontram são condensados com lignina. Também pode estar presente no engaço polissacarídeos, como glicose, xilose, manose e galactose. O engaço é composto por cerca de 6% de compostos fenólicos, como 3-flavanóis, ácidos hidroxibenzoicos, flavonóis (como quecertina) e estilbenos. Os taninos representam aproximadamente 80% dos polifenóis do engaço (SILVA et al., 2021).

A figura 16 exemplifica os principais compostos encontrados nas diferentes partes do resíduo da uva.

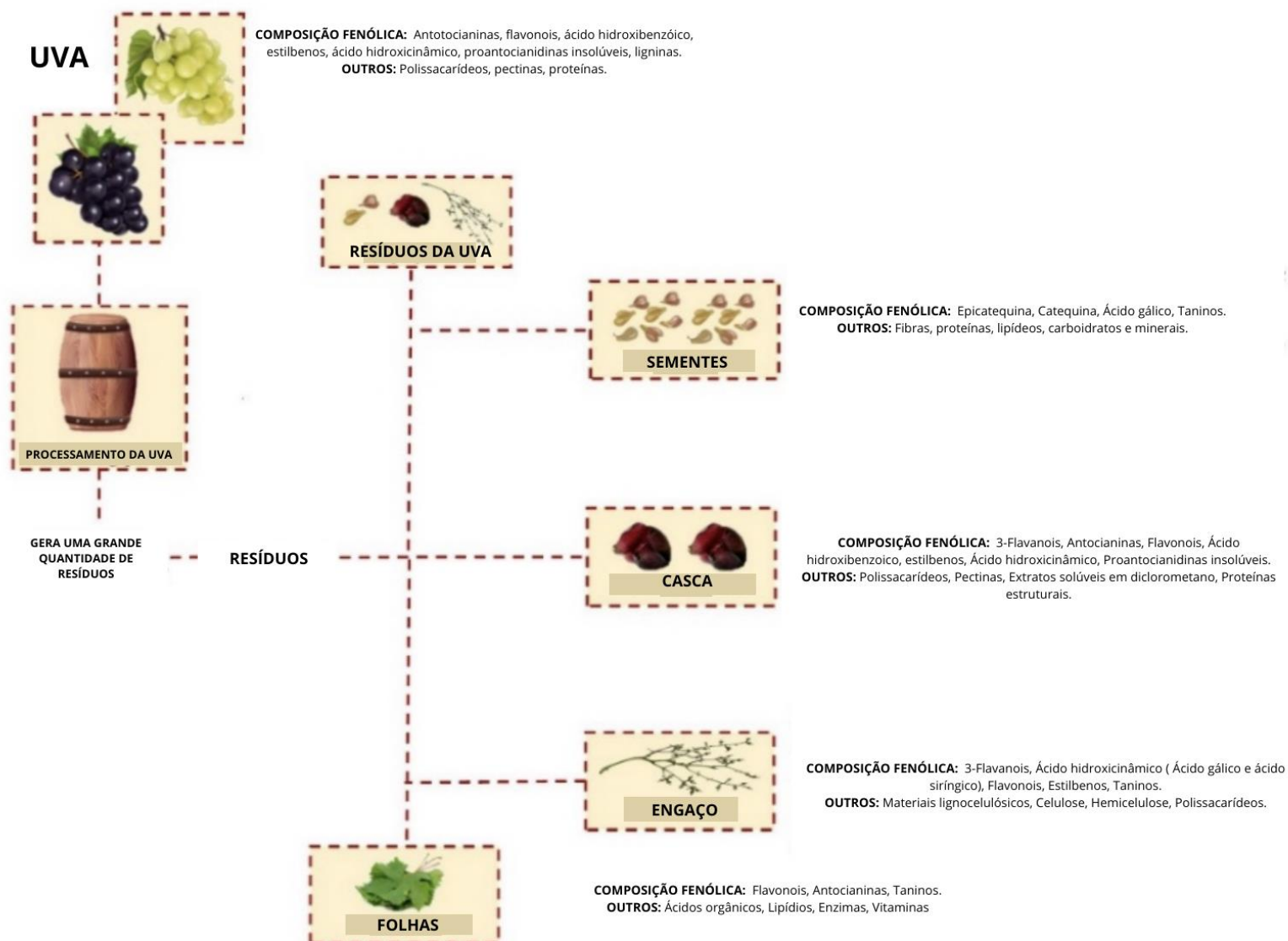


Figura 16. Principais compostos encontrados nas diferentes partes do resíduo da uva (adaptado de SILVA et al., 2021).

Paralelo às reconhecidas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antitumorais, antienvhecimento, os resíduos de processamento da uva têm atividades antimicrobiana, antivirulência e antibiofilme relatadas (KARYGIANNI et al., 2016). No que concerne à ação

antimicrobiana, estes compostos atuam inibindo a síntese de ácidos nucleicos, bloqueiam o metabolismo energético e causam danos à parede celular e à membrana citoplasmática, diminuindo a fluidez de membranas de microrganismos patogênicos. Também, interferem no equilíbrio iônico, diminuem o gradiente de prótons requerido para a fosforilação oxidativa, atuam na regulação da expressão gênica, e podem atenuar a virulência microbiana (SILVA et al., 2021). Sua atividade antibiofilme também já foi comprovada, uma série de estudos reporta acerca da sua eficiência sobre a inibição ou dispersão de biofilmes, embora nem sempre os mecanismos sejam elucidados (LEE et al., 2013; SLOBODNÍKOVÁ et al., 2016). Além disso, relatos na literatura citam a eficiência de resíduos do processamento da uva sobre a inibição de biofilmes orais multi-espécie (KARYGIANNI et al., 2016). Neste sentido, resíduos do processamento da uva representam uma fonte promissora de compostos com atividades antimicrobiana e antivirulência potenciais, que podem ser mais investigados a fim de proporcionar novas alternativas no controle de infecções por microrganismos resistentes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo principal a busca por potenciais moléculas antimicrobianas e anti-virulência para controle de patógenos de relevância clínica.

2.2. Objetivos específicos

Artigo I

- Investigar, em resíduos do processamento da uva, extratos com atividades antimicrobiana e antibiofilme contra os modelos bacterianos *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603 e *Pseudomonas aeruginosa* PA14;
- Realizar o fracionamento bio guiado do extrato bioativo com atividade antibiofilme mais promissora;
- Analisar a composição química dos extratos e frações por metabolômica;
- Investigar a toxicidade dos extratos em modelo invertebrado de *Caenorhabditis elegans*.

Artigo II

- Investigar compostos fenólicos com atividade antifúngica contra *Candida* spp., incluindo um painel de isolados multirresistentes de *Candida auris*;
- Elucidar potenciais mecanismos de ação envolvidos na atividade antifúngica;
- Avaliar o potencial antivirulência destes compostos sobre a capacidade de produção de enzimas, filamentação e formação de biofilmes fúngicos;
- Investigar o efeito destes compostos em células humanas infectadas com *Candida* spp.;
- Verificar a toxicidade destes compostos em eritrócitos;
- Estudar o efeito protetivo destes compostos contra infecção por *Candida* spp. em modelo invertebrado de *Galleria mellonella*;

- Analisar o efeito protetivo destes compostos contra infecção por *Candida albicans* em modelo invertebrado de *C. elegans*.

Artigo III

- Elencar os principais efeitos de coinfeções causadas por *Candida* spp. em pacientes infectados pelo vírus SARS-CoV-2, causador da doença COVID-19;
- Estabelecer uma relação dos principais fatores relacionados a estas coinfeccoes fúngicas.

3. RESULTADOS

3.1. Artigo I

Grape residues as a source of antimicrobial and antibiofilm compounds

Manuscrito a ser submetido no periódico **Industrial Crops and Products**.

Endereço eletrônico do periódico: <https://www.elsevier.com/journals/industrial-crops-and-products/0926-6690/guide-for-authors>

Fator de impacto: 5.645 (2020).

Omitido – em processo de submissão à revista.

3.2. Artigo II

Antifungal activity of the phenolic compounds ellagic acid and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) against drug-resistant *Candida auris*.

Manuscrito publicado no periódico **Journal of Fungi**.

Endereço eletrônico do periódico: <https://www.mdpi.com/journal/jof/instructions>

Fator de impacto: 5.816.

Article

Antifungal Activity of the Phenolic Compounds Ellagic Acid (EA) and Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) against Drug-Resistant *Candida auris*

Fernanda Cristina Possamai Rossatto ¹, Nagendran Tharmalingam ², Iliana E. Escobar ², Pedro Alves d'Azevedo ¹, Karine Rigon Zimmer ¹ and Eleftherios Mylonakis ^{2,*}

¹ Laboratory of Biofilms and Alternative Models, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre 90050-170, RS, Brazil; fernandapr@ufcspa.edu.br (F.C.P.R.); pedro_dazevedo@yahoo.com.br (P.A.d.); karinerz@ufcspa.edu.br (K.R.Z.)

² Division of Infectious Diseases, Rhode Island Hospital, Warren Alpert Medical School at Brown University, 593 Eddy Street, P.O. Box 328/330, Providence, RI 02903, USA; nagendran_tharmalingam@brown.edu (N.T.); iliana_escobar@brown.edu (I.E.E.)

* Correspondence: emylonakis@lifespan.org; Tel.: +1-401-444-7845; Fax: +1-401-444-8179



Citation: Possamai Rossatto, F.C.; Tharmalingam, N.; Escobar, I.E.; d'Azevedo, P.A.; Zimmer, K.R.; Mylonakis, E. Antifungal Activity of the Phenolic Compounds Ellagic Acid (EA) and Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) against Drug-Resistant *Candida auris*. *J. Fungi* **2021**, *7*, 763. <https://doi.org/10.3390/jof7090763>

Academic Editor: Renátó Kovács

Received: 20 August 2021

Accepted: 6 September 2021

Published: 15 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Candida auris* is an emerging healthcare-associated fungal pathogen that has become a serious global health threat. Current treatment options are limited due to drug resistance. New therapeutic strategies are required to target this organism and its pathogenicity. Plant polyphenols are structurally diverse compounds that present a vast range of biological properties. In the present study, plant-derived molecules ellagic acid (EA) and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) were investigated for their antifungal and antivirulence activities against *Candida auris*. We also tested against *C. albicans*. The minimum inhibitory concentration (MIC) for EA ranged from 0.125 to 0.25 µg/mL and for CAPE ranged from 1 to 64 µg/mL against drug-resistant *C. auris* strains. Killing kinetics determined that after 4 h treatment with CAPE, there was a complete reduction of viable *C. auris* cells compared to fluconazole. Both compounds might act by modifying the fungal cell wall. CAPE significantly reduced the biomass and the metabolic activity of *C. auris* biofilm and impaired *C. auris* adhesion to cultured human epithelial cells. Furthermore, both compounds prolonged the survival rate of *Galleria mellonella* infected by *C. auris* ($p = 0.0088$ for EA at 32 mg/kg and $p = 0.0028$ for CAPE at 4 mg/kg). In addition, EA at 4 µg/mL prolonged the survival of *C. albicans*-infected *Caenorhabditis elegans* ($p < 0.0001$). CAPE was not able to prolong the survival of *C. albicans*-infected *C. elegans*. These findings highlight the antifungal and antivirulence effects of EA and CAPE against *C. auris*, and warrant further investigation as novel antifungal agents against drug-resistant infections.

Keywords: *Candida auris*; ellagic acid; CAPE; antifungals; antivirulence; biofilm

1. Introduction

Fungal infections are responsible for high mortality and morbidity, especially among immunocompromised patients, and their incidence has risen in the last few decades [1–3]. *Candida* spp. remain the most common cause of invasive fungal infections, and candidiasis is ranked as the fourth leading cause of bloodstream infections in the United States [2,4–6]. Among *Candida* spp., *Candida auris* has emerged as a highly drug-resistant pathogen in recent years, while *Candida albicans* is associated with more than 50% of human candidiasis [2,7]. *C. auris* was first described in 2009 as an isolate from the ear canal of a patient in Japan [8]. The first candidemia cases were described in South Korea, in 2011 [9]. Since then, invasive infections have increased, even outcompeting the most common fungal pathogen *C. albicans* at many centers in some countries [10]. Unlike *C. albicans*, this emerging pathogen can live on surfaces outside the human body, further complicating the management of these infections by healthcare facilities [11]. Furthermore, what makes *C. auris* uniquely

challenging is a combination of the following: (i) widespread outbreaks in numerous hospitals worldwide due to its high transmissibility [11,12]; (ii) broad spectrum of clinical manifestations associated with a high mortality rate up to 70% [12,13]; (iii) ability to survive and proliferate for weeks either on dry or moist surfaces [14,15]; (iv) difficulty in correctly identifying *C. auris*, since this yeast can be misidentified as *Candida haemulonii* or *Candida parapsilosis* in laboratories that do not perform identification through molecular biology or MALDI-TOF techniques [14]; and (v) high rate of therapeutic failure and multidrug-resistance [16,17]. In fact, *C. auris* frequently present reduced susceptibility to azoles and echinocandin drugs [14]. Despite many studies addressing therapeutic approaches to treat *C. albicans* infections, few have attempted to investigate their antifungal activity against *C. auris* [7,12,17]. The success of *C. auris* as a pathogen results from their diverse virulence factors and fitness attributes, such as antifungal drug and environmental stress resistance, adherence and biofilm formation, and production of the extracellular hydrolytic enzymes proteinase and phospholipase [15,18]. However, the knowledge on *C. auris* virulence remains scarce, and further studies are required to investigate antivirulence strategies [19–23]. Considering that the development of new antifungal agents is restricted by the limited number of selective drug targets in yeast, there is an urgent need for novel antifungal candidates, including those targeting virulence factors [7,24–27].

Plants have traditionally served as a rich source for antimicrobial compounds due to secondary metabolites production. These metabolites are generally used as defense mechanisms against insects, herbivores, and microorganisms [28]. Among these compounds, polyphenols have protective properties on human health, mainly antioxidant, anti-inflammatory, anticancer, and antimicrobial [28,29]. Among these polyphenols, caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and ellagic acid (EA) have been shown to have a wide range of biological activities. CAPE is one of the significant components of propolis. This compound presents immunomodulatory activity, inhibiting two key transcription factors involved in T-cell activation [30,31]. EA is a hydrolyzable tannin present in some plants such as pomegranates, nuts, and berries. The gut microbiota transforms EA to produce urolithins, bioavailable metabolites that can exert anti-inflammatory and anticarcinogenic effects [32]. These compounds have already demonstrated potential antifungal activity against *Candida* spp. [33–37], however, their mechanisms of action, synergism with antifungals, and in vivo studies still need to be investigated. Additionally, few studies report the effect of different plant-derived compounds on regulating processes involved in fungal virulence-related mechanisms, such as filamentation, biofilm formation, and production of extracellular enzymes [37–43]. In this respect, polyphenols have recently gained attention. After all, they display structural diversity and uniqueness in functional modes of action, rendering them promising options to counteract the emergence of *C. auris* drug resistance [44].

This work aims to investigate the antifungal activity of polyphenols from different classes against a more comprehensive panel of drug-resistant *C. auris* isolates. In addition, the study examined antivirulence activities, compound toxicity, a potential mechanism of action, and efficacy using the *Caenorhabditis elegans* and *Galleria mellonella* model hosts. According to our knowledge, the effect of polyphenols against *C. auris*, and its virulence factors, are for the first time elucidated here.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Caffeic acid (CA), caftaric acid (CF), ellagic acid (EA), epigallocatechin gallate (EGCG), engeletin (ENG), polydatin (also known as piceid or resveratrol-3-O-glucoside) (PD), amphotericin B (AMB), caspofungin (CPF), fluconazole (FLC) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) (Tocris (Bristol, UK) were used in this study and were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) or water at 10 mg/mL. RPMI 1640 (L-glutamine without sodium bicarbonate) (Sigma-Aldrich, MO, USA) at pH 7.0 with 0.165 M morpholinepropanesulfonic acid (MOPS; Sigma-Aldrich, MO, USA) was used as the test medium.

2.2. Strains and Culture Conditions

The *Candida* strains used in this work were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and the Centers for Disease Control and Prevention Antibiotic Resistance Isolate Bank (CDC, Atlanta, GA, USA). They included a panel of 10 *C. auris* isolates (designated AR-BANK#0381 to AR-BANK#0390) (CAU-01 to CAU-10), as well as the wild-type strains *C. albicans* strain SC5314 (ATCC MYA-2876) (CAL), *Candida glabrata* ATCC 90030 (CG), *Candida krusei* ATCC 6258 (CK), *C. parapsilosis* ATCC 22019 (CP), and *Candida tropicalis* ATCC 13803, listed in Supplementary Table S1. Glycerol stocks were grown on yeast extract-peptone-dextrose agar (YPD, Research Products International, IL, USA) at 37 °C for 24 h.

2.3. Minimum Inhibitory Concentration

The broth microdilution assay was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of antifungals and polyphenols against the *Candida* strains according to the Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) document M27-A2 [45] in 96-well flat-bottom microtiter plates (Corning no. 353072). Briefly, colonies of each strain were inoculated in 5 mL of YPD overnight at 37 °C in an orbital shaker at 225 rpm. The cells were harvested by centrifugation at 2700 × *g* for 5 min, washed twice with sterile phosphate-buffered saline (PBS), and the final inoculum size was adjusted by hemocytometer to 1.0 × 10³ cells/mL in RPMI 1640. Antifungal agents and compounds were serially diluted in 50 µL, and 50 µL of cells were added. The concentration range tested was from 128 to 0.06 µg/mL for phenolic compounds. The plates were incubated at 37 °C for 24 h. Amphotericin B, caspofungin and fluconazole belong to the three major classes of antifungal agents (polyenes, echinocandins and azoles, respectively), and were used as positive controls. The concentration range tested was from 128 to 0.06 µg/mL for AMB and CPF, and 256 to 0.125 µg/mL for FLC. The least concentration of the compound that inhibited the visible growth was considered the MIC, and the most active compounds were selected and used for further studies.

2.4. Time-Kill Curves

A time-to-kill kinetics assay was used to investigate the -cidal or -static nature of compound [46]. CAPE, EA, and fluconazole (control) were tested at various concentrations (0, 1, 2, 4, 8 × MIC respectively). Log-phase cultures of *C. auris* CAU-04 or *C. albicans* SC5314 (10⁶ cells/mL) in RPMI 1640 with or without test compound were tested at 37 °C with agitation (225 rpm). At predetermined time points (0, 4, 8, 12, 24, 48 h), 50 µL aliquots were obtained from each solution, serially diluted in sterile water, and 5 µL were plated on YPD plates for 48 h at 37 °C for determination of colony-forming unit (CFU) counts. The fungicidal activity was defined as a ≥3-log₁₀ (99.9%) reduction in numbers of CFU from the starting inoculum and fungistatic activity as a <99.9% reduction in growth from the starting inoculum [47].

2.5. Checkerboard Microdilution Assay

The interactions of EA and CAPE with amphotericin B, caspofungin, and fluconazole against isolates *C. auris* CAU-04 or *C. albicans* SC5314 were investigated by using the guidelines of CLSI reference technique [45], modified for a broth microdilution checkerboard procedure. The results obtained from the checkerboard assay were analyzed by the non-parametric approach of fractional inhibitory concentration (FICI), calculated according to the equation: ΣFIC = FICA + FICB, where FICA is the MIC of the combination/the MIC of drug A alone and FICB is the MIC of the combination/the MIC of drug B alone. The interpretation of FICI values was carried out as follows: synergy for FICI ≤ 0.5, indifference for FICI > 0.5 to 4.0, and antagonism for FICI ≥ 4.0 [48].

2.6. Mechanism of Action

2.6.1. Sorbitol Protection Assay

The effect of EA and CAPE on the integrity of the fungal cell wall was evaluated by sorbitol protection assay. In brief, MIC values were determined after 2 and 7 days by the standard broth microdilution as described above in the absence and presence of 0.8 M sorbitol (Sigma-Aldrich, MO, USA) added to RPMI 1640. Caspofungin was used as a positive control [49].

2.6.2. Ergosterol Binding Assay

The ergosterol binding assay was conducted to assess if the compounds bind to the fungal membrane sterols. In brief, MIC values were determined after 48 h following the guidelines of CLSI as explained above, in the absence and presence of different concentrations of ergosterol (Sigma-Aldrich, MO, USA) added to the assay medium (0, 50, 100, 150, 200, and 250 µg/mL). Amphotericin B was used as a positive control [49].

2.7. Virulence Factors

2.7.1. Proteinase

The proteinase agar clearance assay was performed according to Yousuf et al. (2011) [50]. EA and CAPE were added to *C. auris* CAU-04 or *C. albicans* SC5314 inoculum in PBS (1×10^6 cells/mL) at different concentrations. Aliquots of 2 µL were placed at equidistant points on proteinase agar plates and incubated at 37 °C for 3 days. Visible clear zones around the colonies indicated proteinase production by *Candida* strains. Proteinase activity (Pz value) was measured in terms of the ratio of the diameter of the colony to the diameter of the colony plus zone of precipitation. Values of Pz = 1 means that the test strain is negative for proteinase production.

2.7.2. Phospholipase

The phospholipase assay was performed according to Yousuf et al. (2011) [50] using the egg yolk plates. EA and CAPE were added to *C. auris* CAU-04 or *C. albicans* SC5314 inoculum in PBS (1×10^6 cells/mL) at different concentrations, and an aliquot of 2 µL was placed at equidistant points on phospholipase agar plates and incubated at 37 °C for 7 days. Visible precipitation zones around the colonies indicated phospholipase production by *Candida* strains. Phospholipase activity (Pz value) was measured as described above.

2.7.3. Induction of Fungal Filamentation

The ability of hyphae formation by *C. auris* CAU-04 or *C. albicans* SC5314 was assessed by De Barros et al., (2018) [51]. In 24-well plates (Corning no. 3527, NY, USA), one milliliter of distilled water supplemented with 10% fetal bovine serum was mixed with 50 µL of brain heart infusion broth (BHI, Sigma-Aldrich, MO, USA) and 50 µL of either PBS (control group) or phenolic compound. Then, 100 µL of a *Candida* suspension (final concentration: 10^6 cells/mL) were added and the plates were incubated for 24 h at 37 °C. Aliquots of 50 µL were transferred onto a glass slide and observed under a light microscope (40×). Ten microscopic fields per slide were chosen randomly to quantify the hyphae. The following score was used for the number of hyphae per microscopic field: score 0 (no hyphae), score 1 (1–3 hyphae), score 2 (4–10 hyphae), score 3 (11–20 hyphae), score 4 (more than 20 hyphae).

2.7.4. Biofilm Inhibition and Disruption

The ability of CAPE and EA to prevent fungal biofilm formation and eradicate a mature biofilm were investigated as previously reported with minor modifications [52,53]. Total biofilm biomass was measured using crystal violet (CV), while metabolic activity was measured by 2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) method. Overnight suspensions of *C. auris* CAU-04 or *C. albicans* SC5314 were centrifuged ($4000 \times g$ for 5 min), washed twice with PBS, and adjusted to 2×10^6 cells/mL in RPMI1640. Aliquots (50 µL) of fungal suspensions were transferred to each well of the

microtiter plate. To determine the inhibition of biofilm formation, 50 μL of compounds or fluconazole were serially diluted, and each plate was incubated for 24 h at 37 °C. Following incubation, the biofilms were assessed using the CV and XTT methodologies.

To assess the ability of compounds to disrupt a mature biofilm, the fungal inoculum was prepared as described above (adjusted to 1×10^6 cells/mL) and aliquots (100 μL) were placed in each well. After 24 h of incubation at 37 °C, the cells were washed twice with PBS to remove planktonic yeast, and compounds or fluconazole were serially diluted. The plates were incubated for 24 h at 37 °C, and the biofilm was measured by CV and XTT methodologies. The minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC₅₀) and minimum biofilm eradication concentration (MBEC₅₀) were defined as the minimum concentration leading to a 50% reduction of biofilm formation and 50% disruption of mature biofilm compared to the control sample, respectively.

Quantification of Biofilm Biomass

The biofilm biomass was quantified using the crystal violet assay with minor modifications [54]. Each well was washed twice with PBS to remove nonadherent cells, air-dried for 45 min, and stained with 100 μL of 0.4% aqueous crystal violet solution (Sigma-Aldrich, MO, USA) for 15 min. Any excess CV was removed by washing with sterile water before adding 100 μL of absolute ethanol to release the dye from the biofilm. After 30 min, the absorbance was measured at 570 nm (SpectraMax M2, Molecular Devices, CA, USA), and the biofilm inhibition was calculated.

Quantification of Metabolic Activity

The metabolic activity was quantified using a colorimetric assay based on the reduction of XTT, a tetrazolium salt, according to Khan et al. (2017) with minor modifications [54]. Following biofilm formation, the wells were washed twice with PBS. Afterward, 79 μL of PBS, 20 μL of XTT, and 1 μL of menadione were added to each prewashed well. The plates were incubated in the dark for 3 h at 37 °C. The absorbance was measured at 490 nm.

Live/Dead Staining Assay

To detect the influence of CAPE on the vitality of *C. auris* CAU-04 or *C. albicans* SC5314 inside biofilms, live/dead staining was conducted. Briefly, after the washings with PBS, the biofilms were stained with live/dead staining solution (5 μM SYTO9 and 30 μM propidium iodide) and incubated for 30 min in the dark. The cells were rinsed with PBS and observed using a fluorescent microscope, and images were captured [55].

2.8. Hemolysis Assay

Hemolysis was determined as described by Tharmalingam et al. (2019) [55]. In a 96-well plate, 50 μL of polyphenols were serially diluted in PBS and added to 50 μL of 4% human erythrocytes suspended in PBS. Triton-X (0.002–1.0%) was used as reference sample. The plate was incubated at 37 °C for 1 h and then centrifuged at $500 \times g$ for 5 min. The supernatant from each well was transferred to a new plate, and the absorbance was read at 540 nm.

2.9. Adherence Assay with A549 Cells

A549-lung cancer cell lines were used for the measurement of adhesion ability. The A549 cells were maintained in DMEM with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. The cells were seeded in six-well plates, 24 h before infection. The MOI of 25 was used to infect the A549 cells. After 2 h of infection, test compounds ($1 \times$, $4 \times$ MIC) were added in a 5% CO₂ incubator. After 22 h, the cells were washed and lysed with 0.02% of SDS in DMEM, and the CFU count was carried out.

2.10. *Galleria mellonella* Assays

2.10.1. Toxicity

Killing assays using the alternative host *Galleria mellonella* were performed as previously described [56,57]. Sixteen randomly chosen *G. mellonella* (Vanderhorst Wholesale, OH, USA) with bodyweights of approximately 300 mg were used for each test group. We initially determined the sublethal concentrations of EA and CAPE. The compounds were inoculated into *G. mellonella* through the inferior left proleg at varying concentrations. Larvae were kept on petri dishes at 37 °C and monitored for survival over five days. Death was defined as a complete loss of mobility and lack of response to a physical stimulus using a plastic pipette tip.

2.10.2. Infection Rescue Assay

We first injected different concentrations of each pathogen into the larvae to find the LD₁₀₀ dose, and the curve was plotted. For the killing assay, larvae were inoculated with the drug on the inferior left proleg, followed by the lethal dose of the pathogen on the inferior right proleg. Different drug dosages were tested in the assay for each agent. After injections, larvae were incubated at 37 °C in plastic containers, and the number of dead larvae was scored daily over 5 days.

2.11. *C. elegans*-*C. albicans* Infection Assay

The *Caenorhabditis elegans* strain *glp-4;sek-1* (AU37) was maintained on *Escherichia coli* OP50 lawns that were spread on nematode growth medium agar plates and incubated at 15 °C. For the *C. elegans*-*C. albicans* killing assay, worms were synchronized and grown to the young adult stage by incubating 24 h at 15 °C and 72 h at 25 °C. Worms were collected and washed three times with PBS in 50 mL tubes using gravity to pellet worms. Washed worms were then transferred to a *C. albicans* lawn grown on a BHI plate (grown overnight at 37 °C). Worms on *C. albicans*/BHI plate were incubated at 25 °C for 4 h and then washed 4 times with PBS. In a six-well plate, 30–75 worms were dispensed into each well containing desired drug concentration diluted in 20% BHI and 45 µg/mL kanamycin to a total volume of 2 mL. Worms were incubated at 25 °C and scored daily for dead worms for a total of 6 days. A worm was considered dead when it failed to respond to a gentle touch with a platinum wire picker.

2.12. Statistical Analysis

The Student's *t*-test was used to compare the results from the time-kill and virulence factors assays. Kruskal–Wallis was used to compare the scores obtained in the filamentation assay. The Kaplan–Meier survival curves of *G. mellonella* and *C. elegans* were determined and the log-rank test evaluated the statistical significance. All tests were performed using GraphPad Prism 8 statistical software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) and a *p*-value of ≤0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. CAPE and EA Show Antifungal Activity against *C. auris*

We initially evaluated the antifungal activity of seven polyphenols against a *Candida* spp. panel, including a number of *C. auris* isolates, which exhibited high-level resistance to fluconazole (Supplementary Table S2). Engeletin and polydatin did not show efficacy toward any of the *Candida* spp. (up to the highest tested concentration of 128 µg/mL), while caftaric acid only showed moderate effect toward CG and CAU-01 with a MIC of 16 µg/mL and 128 µg/mL, respectively (Table 1). To our knowledge, this is the first study to evaluate the antifungal activity of caftaric acid, engeletin, and polydatin against *Candida* spp. EA and CAPE showed the lowest MIC values of all compounds screened (Table 1). EA exhibited low MIC values against all *Candida* strains (MIC ≤ 0.5 µg/mL). MIC values of CAPE ranged from 1 to 64 µg/mL. Thus, we further pursued EA and CAPE as lead compounds.

Table 1. Antifungal susceptibility of phenolic compounds against *Candida* spp.

Strains	MIC Values in µg/mL						
	Phenolic Compounds						
	CA	CAPE	CF	EA	EGCG	ENG	PD
<i>C. auris</i> CAU-01	4	1	128	0.125	1	>128	>128
<i>C. auris</i> CAU-02	64	8	>128	0.25	64	>128	>128
<i>C. auris</i> CAU-03	8	8	>128	0.25	16	>128	>128
<i>C. auris</i> CAU-04	64	16	>128	0.25	4	>128	>128
<i>C. auris</i> CAU-05	128	16	>128	0.25	32	>128	>128
<i>C. auris</i> CAU-06	128	32	>128	0.25	64	>128	>128
<i>C. auris</i> CAU-07	64	16	>128	0.25	32	>128	>128
<i>C. auris</i> CAU-08	128	16	>128	0.25	64	>128	>128
<i>C. auris</i> CAU-09	128	64	>128	0.25	64	>128	>128
<i>C. auris</i> CAU-10	128	64	>128	0.25	64	>128	>128
<i>C. albicans</i> CAL	>128	8	>128	0.5	16	>128	>128
<i>C. glabrata</i> CG	8	4	16	0.125	0.5	>128	>128
<i>C. krusei</i> CK	64	2	>128	0.125	2	>128	>128
<i>C. parapsilosis</i> CP	16	16	128	0.25	4	>128	>128
<i>C. tropicalis</i> CT	>128	32	>128	0.25	128	>128	>128

CA: caffeic acid, CAPE: caffeic acid phenethyl ester, CF: caftaric acid, EA: ellagic acid, EGCG: epigallocatechin gallate, ENG: engeletin, PD: polydatin.

Growth inhibition was measured using checkboard assays to explore potential interactions between EA and CAPE with clinical antifungals used to treat *Candida* infections (amphotericin B, caspofungin, fluconazole). Combinations of either EA or CAPE and the antifungal agent on *Candida* strains, showed indifferent interactions.

3.2. CAPE Is Fungicidal and EA Is Fungistatic toward *C. auris*

The killing kinetics assay was conducted to address whether EA and CAPE exhibit fungicidal or fungistatic activity against *C. auris* or *C. albicans* (Figure 1). Both *C. auris* or *C. albicans* were inhibited by EA concentration used in the study ($1 \times \text{MIC}$ – $8 \times \text{MIC}$) (Figure 1A,D), similar to the fungistatic effect observed with fluconazole (Figure 1C,F). Against *C. auris* CAU-04, CAPE exhibited fungicidal activity, rapidly reducing fungal viability below the detection limit within 4 h, at $4 \times$ and $8 \times \text{MIC}$ (64 – $128 \mu\text{g/mL}$) (Figure 1B). The same effect occurred in *C. albicans* cells when treated with CAPE at $8 \times \text{MIC}$ ($64 \mu\text{g/mL}$) (Figure 1E).

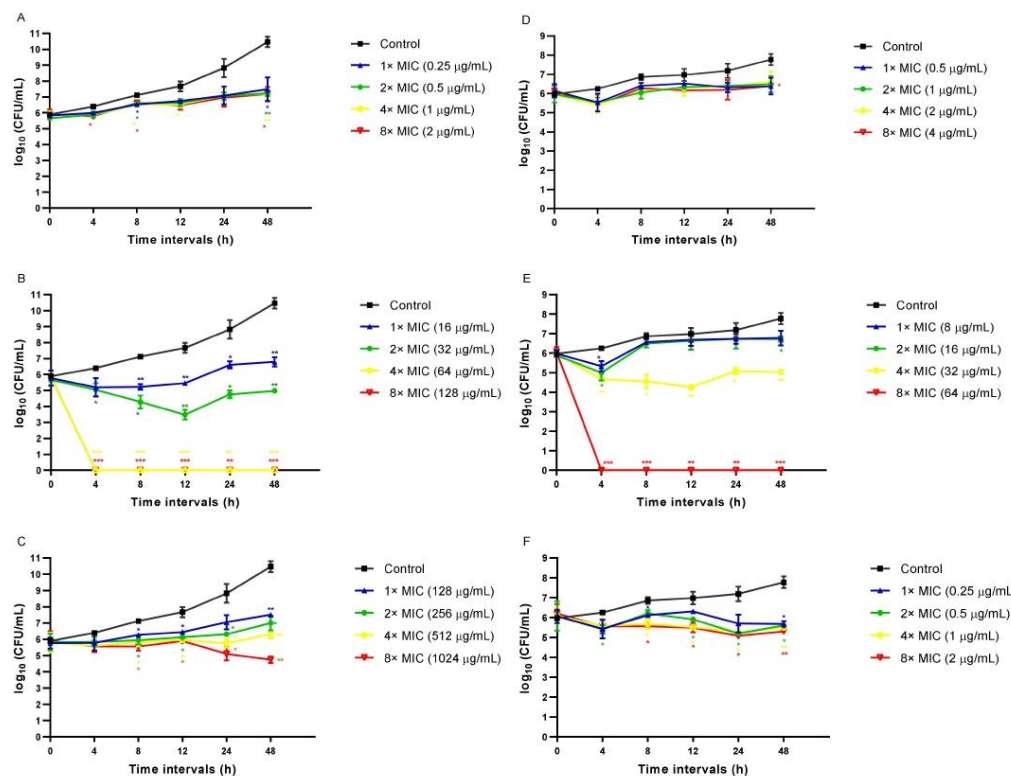


Figure 1. Time-kill curves obtained by incubating *C. auris* CAU-04 (A–C) and *C. albicans* SC5314 (D–F) strains with increasing concentrations of EA (A,D), CAPE (B,E) and FLC (C,F). Data represent the mean (\pm standard deviation, SD) of three independent experiments, and each one was carried out with triplicate determinations. For all experimental points, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$ were obtained for control versus treated samples.

3.3. EA and CAPE May Affect Fungal Cell Wall

Sorbitol is an osmotic protectant used for stabilizing fungal protoplasts, thereby providing a suitable environment for the cell wall biosynthesis pathway [58]. For this reason, an increase in MIC values is expected when a mechanism of action (MOA) is through cell wall damage [58]. The sorbitol protection assay was performed to test the effect of compounds on the fungal cell wall integrity. When *C. auris* or *C. albicans* were treated with EA or CAPE in a medium supplemented with sorbitol, MIC increased after seven days of incubation compared to MIC in a medium without sorbitol (Table 2). The MIC values of EA and CAPE increased 128-fold and twofold for both *C. auris* or *C. albicans*, respectively. MIC values of caspofungin (positive control) increased fourfold and 32-fold against *C. auris* CAU-04 or *C. albicans* SC5314 respectively.

Table 2. MIC values ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of EA, CAPE and caspofungin against *C. auris* CAU-04 and *C. albicans* SC5314 and in the presence (+) and absence (–) of sorbitol (S).

Strain	MIC EA				MIC CAPE				MIC CPF (Control)			
	Day 2		Day 7		Day 2		Day 7		Day 2		Day 7	
	(–) S	(+) S	(–) S	(+) S	(–) S	(+) S	(–) S	(+) S	(–) S	(+) S	(–) S	(+) S
CAU	0.25	32	2	256	16	32	32	64	16	64	64	256
CAL	0.5	0.5	0.5	64	8	16	32	64	0.125	8	0.25	8

The ability of the tested compounds to bind to ergosterol was also investigated through ergosterol binding assay. No variations in MIC were observed for compounds in this assay, suggesting that EA and CAPE would not act by binding to fungal ergosterol (Table 3). As expected, a 4–128-fold increase of MIC values was observed for amphotericin B (positive control).

Table 3. MIC values ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of EA, CAPE, and amphotericin B against *C. auris* CAU-04 and *C. albicans* SC5314 and in the presence (+) and absence (–) of ergosterol.

Strain	Drug	Ergosterol Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)					
		0	50	100	150	200	250
CAU	EA	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
	CAPE	16	16	16	16	16	16
	AMB (control)	0.5	4	8	16	32	64
CAL	EA	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	CAPE	8	8	8	8	8	8
	AMB (control)	0.5	2	4	8	16	32

3.4. Effect of EA and CAPE on Proteinase and Phospholipase Production

Figure 2 summarizes the proteinase and phospholipase secretion results by *C. auris* CAU-04 and *C. albicans* SC5314 following exposure to different EA and CAPE concentrations. Our results show that both compounds could not inhibit *Candida* proteinase production at all concentrations tested (Figure 2A). EA significantly reduced the phospholipase production in *C. auris*, since there was no zone of precipitation around the fungal colonies. *C. auris* exposed to at least 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CAPE ($2\times$ MIC) had decreased phospholipase secretions. No significant phospholipase inhibition was observed after either EA or CAPE exposure in *C. albicans* (Figure 2B).

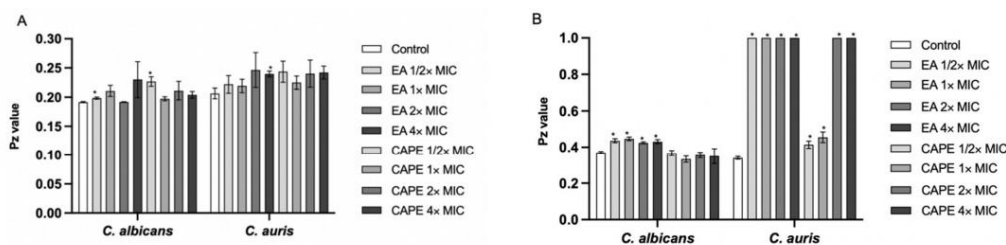


Figure 2. Effect of EA and CAPE on proteinase and phospholipase production. (A) Effect on proteinase secretion by *C. auris* CAU-04 and *C. albicans* SC5314 when exposed to different EA and CAPE concentrations. (B) Effect on phospholipase secretion by *C. auris* CAU-04 and *C. albicans* SC5314 when exposed to different concentrations of EA and CAPE. * $p < 0.05$.

3.5. CAPE Inhibits Hyphal Development in *C. albicans*

A hyphae-inducing RPMI medium was used to examine hyphal inhibition by EA and CAPE. In the filamentation assay, *C. auris* was unable to produce hyphae under test conditions but we observed many *C. albicans* hyphae in the control groups with PBS after 24 h (Supplementary Figure S1A). CAPE demonstrated excellent ability to reduce hyphae production at all concentrations. When *C. albicans* was cultured with CAPE at 1× MIC (8 µg/mL), a hyphae reduction was found ($p = 0.0238$). CAPE at 2× MIC (16 µg/mL) completely suppressed yeast-to-hyphal conversion ($p < 0.0079$). However, EA treatment did not cause any statistically significant reduction in hyphae formation (Supplementary Figure S1A). Furthermore, we confirmed that this activity was not due to the direct killing of *C. albicans* by EA and CAPE by measuring CFU/mL (Supplementary Figure S1B). The microscopic analysis of filamentation demonstrated that the EA at 2 µg/mL led to a discrete reduction in the quantity of hyphae formation. When *C. albicans* was cultured with CAPE at 16 µg/mL, fungal cells grew by budding, whereas control large hyphal cells were observed (Supplementary Figure S1C).

3.6. Effect of EA and CAPE on *C. auris* and *C. albicans* Biofilms

We investigated whether EA and CAPE could prevent biofilm production and disrupt preformed *Candida* biofilms (Figure 3). The ability of EA and CAPE to inhibit biofilm formation was determined (Figure 3A,B,E,F). Regarding the inhibition of biofilm formation assay using CV, CAPE exhibited a dose-dependent inhibition of both *C. auris* and *C. albicans* biofilms. When tested against *C. auris*, CAPE was effective at 64 µg/mL (4× MIC), reducing biofilm by 53% ($p = 0.0023$), while fluconazole, at the same concentration, reduced biofilm formation by 21% (Figure 3A). Interestingly, CAPE was able to reduce the biofilm formation at subinhibitory levels. CAPE at $\frac{1}{4}$ × MIC (2 µg/mL) reduced biofilm formation by 48% against *C. albicans*, relative to the untreated control ($p = 0.0178$) (Figure 3E). EA was ineffective at all concentrations tested. The metabolic activity of *Candida* was measured using the XTT reduction assay. Consistent with the CV results, CAPE exhibited an inhibitory effect on biofilm formation by *C. auris* and *C. albicans*, reducing the metabolic activity of sessile cells in a dose-dependent manner (Figure 3B,F). CAPE at 64 µg/mL reduced metabolic activity of *C. auris* by 85% ($p = 0.0019$) while fluconazole, at the same concentration, was ineffective (Figure 3B). The ability of EA and CAPE to disrupt mature biofilm was also measured (Figure 3C,D,G,H). CAPE reduced metabolic activity by 79.6% (at 32 µg/mL) and 90.5% (at 64 µg/mL) ($p < 0.001$) against *C. auris*, relative to the untreated control (Figure 3D). CAPE was effective at reducing metabolic activity only at high concentrations, where the compound at 64 µg/mL reduced metabolic activity of *C. albicans* by 85.4% ($p = 0.007$) (Figure 3H). In contrast, the total biomass was not reduced by CAPE (Figure 3C,G). Fluconazole was used as a control and did not cause any disruption in *C. auris* or *C. albicans* mature biofilms at all tested concentrations.

The minimum concentrations leading to a 50% reduction of biofilm formation and 50% disruption of mature biofilm, MBIC₅₀ and MBEC₅₀, respectively, were determined by quantifying the total biomass and the metabolic activity, using the CV and the XTT assay (Supplementary Table S3). Consistent with its antifungal activity against planktonic cells, CAPE exhibited an inhibitory effect on biofilm formation of both *C. auris* or *C. albicans* with MBIC₅₀ values of 32 µg/mL or 8 µg/mL against *C. auris* or *C. albicans*, respectively, in the XTT assay; and values of 64 µg/mL or 32 µg/mL using the CV assay. CAPE also showed activity against mature biofilms with MBEC₅₀ values of 32 µg/mL or 64 µg/mL against *C. auris* or *C. albicans*, respectively, in the XTT assay. The MBEC₅₀ was higher for both strains (>64 µg/mL) in the CV assay. On the other hand, EA did not demonstrate antibiofilm activity against *C. auris* or *C. albicans*, with an MBIC₅₀ and MBEC₅₀ higher than 64 µg/mL for both methodologies.

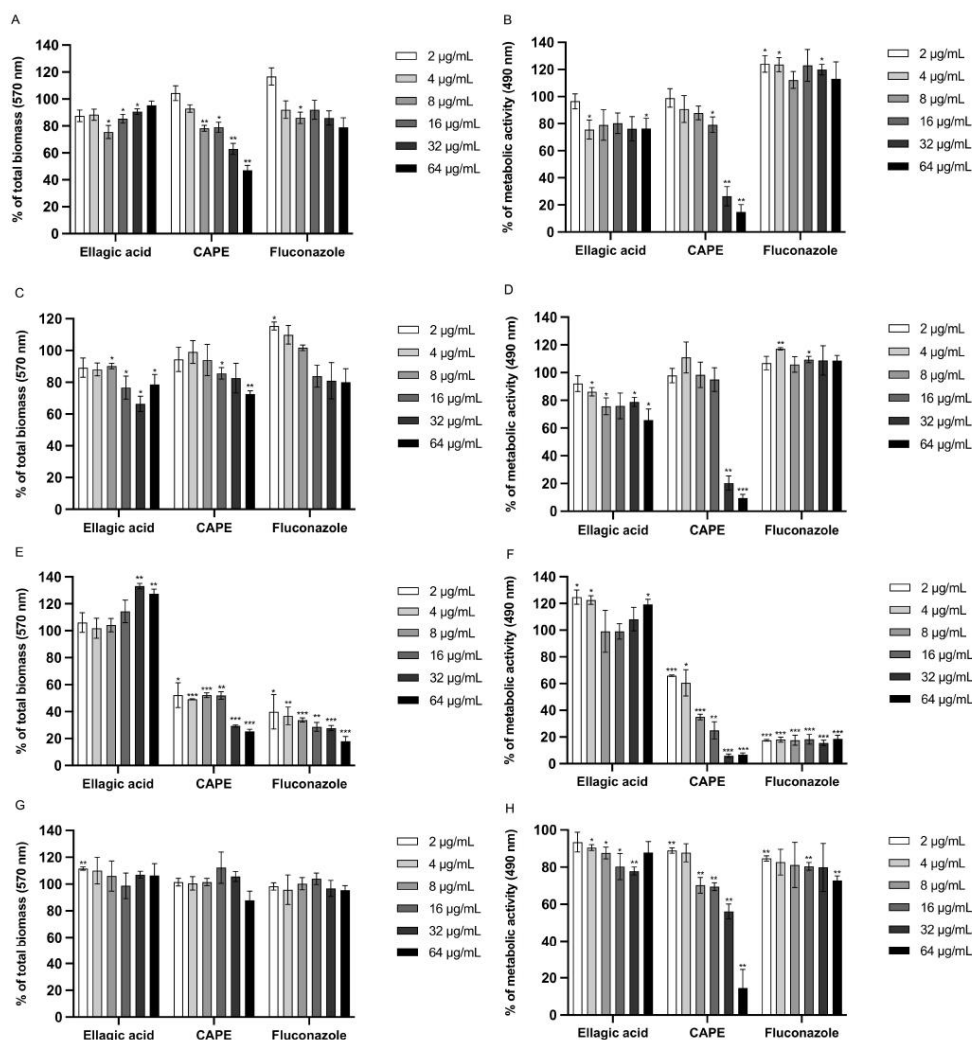


Figure 3. Inhibition of biofilm formation (A,B,E,F) and eradication of mature biofilm (C,D,G,H) by EA, CAPE, and FLC against *C. auris* CAU-04 (A–D) and *C. albicans* SC5314 (E–H) strains. Two different methodologies were used to quantify biofilm: crystal violet assay (A,C,E,G), which measures biofilm total biomass, and XTT assay (B,D,F,H), which measures metabolic activity. Data represent the mean (\pm standard deviation, SD) of three independent experiments, and each one was carried out with triplicate determinations. For all experimental points, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ or *** $p < 0.001$ were obtained for treated samples versus control (100% of biofilm formation and metabolic activity).

Since CAPE presented antibiofilm activity, we performed live/dead staining of cells after biofilm formation to differentiate viable versus dead cells, according to manufacturer instructions (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The kit contains two fluorescent probes, SYTO9, and propidium iodide (PI). The live cells absorb dye SYTO9, therefore emitting green light, while dead cells absorb PI, thus emitting red light. To

evaluate the viability of yeast cells after treatment with CAPE, fluorescence microscopy images were acquired after 24 h of biofilm formation. As shown in Figure 4, the *C. auris* biofilm was predominately composed of budding yeasts and occasional pseudohyphae. In contrast, the biofilm of *C. albicans* consisted of a network of hyphae and budding yeasts cells connected at several points. DMSO-treated fungal cells (control) were stained green, while CAPE-pretreated fungal cells ($2\times$ MIC) were stained red, suggesting that pretreatment with CAPE killed those cells attached to the surface. CAPE also inhibited the yeast-to-hyphae conversion, corroborating the filamentation results (Supplementary Figure S1). In addition, CAPE decreased biofilm formation since the density of cells attached was lower than the control for both strains. Our data indicate that CAPE inhibited biofilm formation by reducing the rate of its development. When *C. auris* was treated with fluconazole, most cells were alive, supporting with XTT assay results (Figure 3).

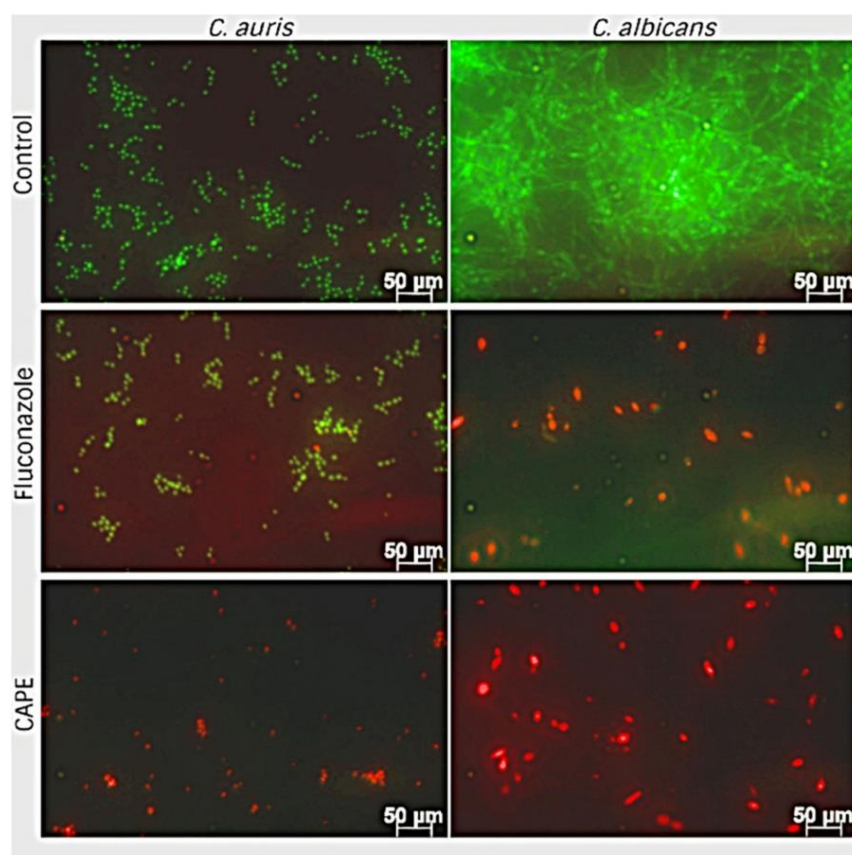


Figure 4. Fluorescence microscopy comparison of *C. auris* and *C. albicans* biofilms grown in the presence of CAPE and fluconazole. Images taken in two different channels (red and green) were overlapped. *C. auris* and *C. albicans* biofilms were treated with CAPE $2\times$ MIC ($32\ \mu\text{g}/\text{mL}$ and $16\ \mu\text{g}/\text{mL}$, respectively) and fluconazole ($32\ \mu\text{g}/\text{mL}$ and $16\ \mu\text{g}/\text{mL}$, respectively).

3.7. Toxicity of EA and CAPE on Human Red Blood Cells (hRBC)

Mammalian erythrocytes are an excellent model to evaluate the cytotoxicity of molecules by measuring cellular damage [59,60]. Hemolysis assay disclosed that all tested concentrations of EA and CAPE did not cause any damage to the human erythrocyte membrane. We used Triton-X as a positive hemolytic agent (Figure 5).

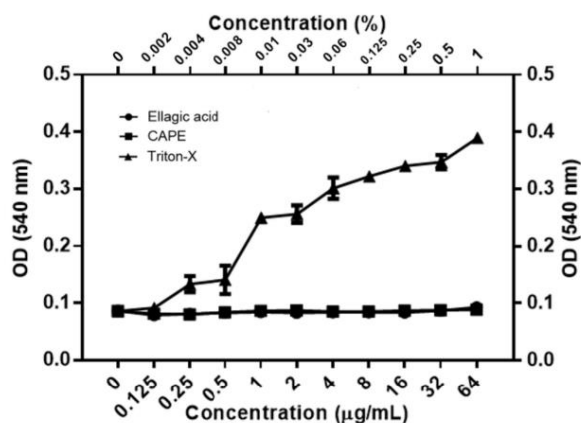


Figure 5. Cytotoxicity of EA and CAPE in human red blood cells. Triton-X was used as a positive control. Data represent the mean \pm SD ($n = 3$).

3.8. CAPE Inhibits Adhesion of *C. auris* and *C. albicans* on A549 Cells

The ability to adhere to epithelial cells contributes to the first step in *Candida* spp. colonization or infection [61]. For this reason, we also tested how the candidate compounds would affect both *C. auris* or *C. albicans* adherence to human lung epithelial A549 cells by measuring the total viable count. After 22 h of infection, the A549 cells were washed, and the fungal-adhered cells were enumerated. At 1 \times MIC, both compounds did not potentially inhibit fungal adhesion (Figure 6). However, at 4 \times MIC concentration, CAPE potentially inhibited *C. auris* and *C. albicans* adherence as demonstrated by the total viable count. (Figure 6).

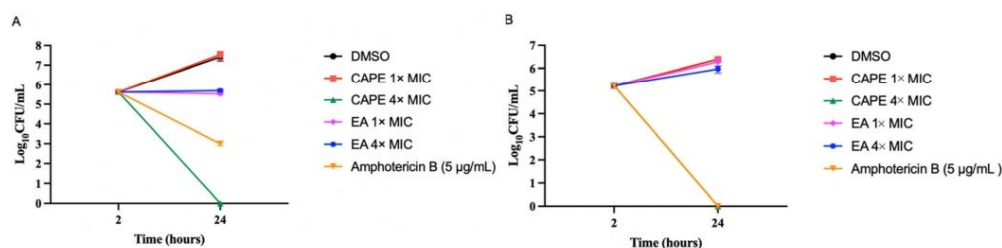


Figure 6. Effects of EA and CAPE on *C. auris* (A) and *C. albicans* (B) virulence using the cell line A549. The results are reported in log CFU/mL. The compounds were dissolved in DMSO, and the amount of DMSO used as the solvent for the compounds was used as a control. Amphotericin B was used as a positive control.

3.9. EA and CAPE Protect *Galleria mellonella* Larvae from *Candida* spp. Infection

First, we evaluated the acute systemic toxicity of compounds in *G. mellonella*. The larvae were injected with varying EA and CAPE concentrations, and their survival was monitored for 5 days. Both compounds did not exert toxic effects on the larvae when administered at those concentrations, up to 128 mg/kg (Supplementary Figure S2A). These results corroborate with our previous *in vitro* data where we demonstrated that EA and CAPE were not toxic towards human red blood cells (Figure 5). *G. mellonella* showed a different survival profile depending on the fungal strains they were infected with (Supplementary Figure S2B,C).

Different concentrations of EA and CAPE were injected into the larvae at 2 h before infection. In the control group, infection with *C. auris* or *C. albicans* caused death in 100% of the larvae within 5 days (Figure 7). After infection with *C. auris*, the groups of larvae pretreated with EA at 32 mg/kg demonstrated an increase in survival of 44% when compared to the control group ($p = 0.0088$) (Figure 7A). Surprisingly, the lowest concentration of CAPE tested (4 mg/kg) led to the highest increase in *G. mellonella* survival after infection with *C. auris*, with a larvae survival of 37.5% ($p = 0.0028$) (Figure 7B). This may be explained by solubility problems of CAPE at high concentrations or fungal stress responses during host infection after pretreatment with high concentrations of CAPE. When the larvae were pretreated with either EA or CAPE (32 mg/kg) before *C. albicans* infections, the survival rate of *G. mellonella* larvae was significantly prolonged, with an approximate larvae survival of 44% for both compounds ($p = 0.0023$ for EA and $p = 0.0034$ for CAPE) (Figure 7C,D). Fluconazole at 1 mg/kg protected *G. mellonella* from *C. albicans* infection ($p < 0.0001$) (Figure 7C,D). However, it was not effective against the fluconazole-resistant *C. auris* strain, resulting in 87.5% death after five days (Figure 7A,B).

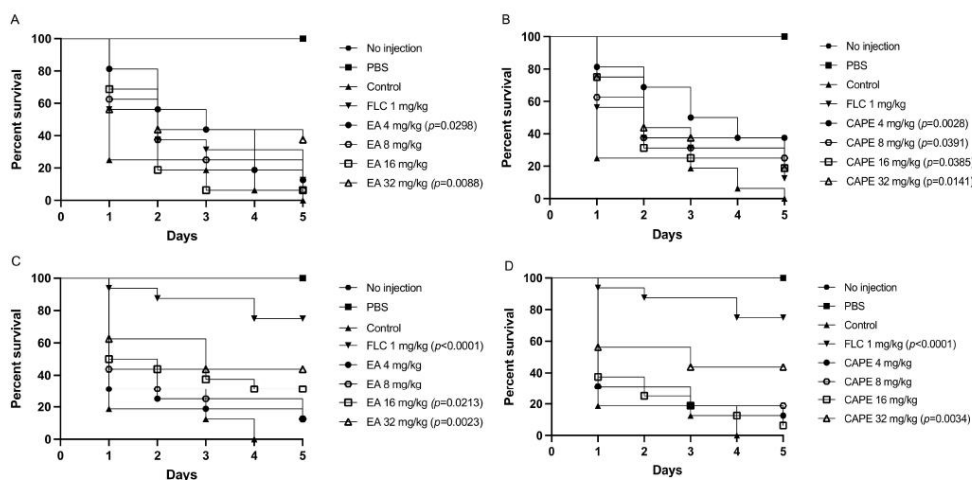


Figure 7. Kaplan–Meier survival curves of infected *G. mellonella* larva. (A,B) Survival of *G. mellonella* larvae infected with *C. auris* and treated with different doses of EA or CAPE, respectively, 2 h prior the infection. (C,D) Survival of *G. mellonella* larvae infected with *C. albicans* and treated with different doses of EA or CAPE, respectively, 2 h prior the infection.

3.10. EA Protects *C. elegans* from *C. albicans* Infection

Finally, to further evaluate EA and CAPE as potential anti-infective compounds against *Candida* spp., we tested both compounds in a second invertebrate model, *C. elegans*. The infection of *C. elegans* by *C. albicans* resulted in a reduction of worm viability. At six days postinfection, the survival ratio of this group was 24%, while the uninfected animals

showed 98% survival on this day (Figure 8). However, when the animals were treated with 4 µg/mL EA, the survival of worms was approximately 40% ($p < 0.0001$). Surprisingly, CAPE up to 128 µg/mL did not significantly increase the viability of *C. elegans* compared with the control group.

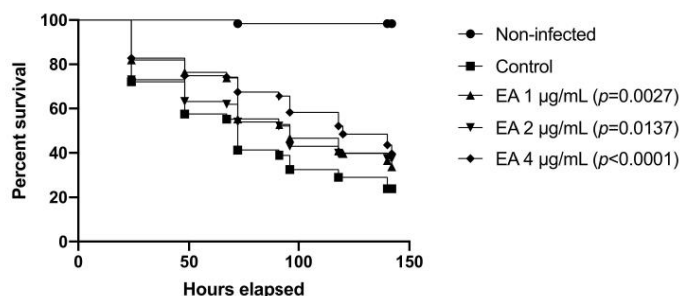


Figure 8. Kaplan–Meier survival curves of infected *C. elegans*. EA protects *C. elegans* larvae from *C. albicans* infection after 150 h.

4. Discussion

Candidiasis is a significant healthcare problem worldwide. The limited number of antifungal drugs combined with the development of resistance to these agents presents a challenge to treat *Candida* spp. infections [7,13]. Among *Candida* spp., *C. auris* has emerged as a global health threat. It causes highly invasive infections with high mortality rates in hospitalized patients, especially those with comorbidities and immunosuppression [13–15]. A high percentage of *C. auris* isolates have shown resistance to one or more of the three major antifungal drugs (azoles, echinocandins, polyenes), making the treatment challenging [14]. Thus, novel therapeutic approaches are needed to treat *C. auris* infections, including the use of naturally-occurring agents. Medicinal plants are rich in diverse chemical structures, which warrants more thorough investigation as potential novel antifungal agents [27]. Polyphenols are naturally occurring secondary plant metabolites and are generally involved in defense against ultraviolet radiation or aggression by pathogens [29].

This study assessed the activity of seven plant derived polyphenols against *C. auris* mainly and *C. albicans*. The results demonstrated that polyphenol ellagic acid and caffeic acid phenethyl ester are more effective and present antifungal against *C. auris* and *C. albicans*. The effect of these compounds on the virulence attributes were also investigated. CAPE presented anti-adhesives properties and inhibited fungal filamentation. Besides having low MIC, at subinhibitory concentration, ellagic acid inhibited phospholipase production by *C. auris*. Both compounds were not toxic to human erythrocytes and the invertebrate larva *G. mellonella*. In addition, both compounds were able to prolong the larvae survival after infection with *C. auris* or *C. albicans*. EA was also able to protect *C. elegans* against *C. albicans* infection.

The MIC results of this study demonstrated the antifungal activity of EA and CAPE against *Candida* spp., including a panel of 10 *C. auris* isolates. To our knowledge, this is the first study to evaluate the antifungal activity of EA and CAPE against *C. auris*. Both compounds were active against *C. auris* fluconazole-resistant strains, including those also resistant to caspofungin or amphotericin B. *C. auris* CAU-04 displays resistance to two different classes antifungals: azoles (fluconazole) and echinocandins (caspofungin). It is noteworthy that an echinocandin drug is recommended initial therapy to treat *C. auris* infection [62]. Brighenti et al. (2017) showed that EA is effective against *C. albicans* ATCC 18804, with a MIC value of 3.2 µg/mL [63], supporting our observations. CAPE was also effective against *C. albicans*, presenting MIC values ranging 32–64 µg/mL, similar to our findings [30,64].

Interestingly, some studies report that the high quantity of polyphenols present in all plant parts can explain most of the antifungal effects of diverse plant extracts. Several of these polyphenols are identified as ellagic acid and caffeic acid derivatives [65–71]. Rangkadilok et al. (2012) showed that ellagic acid displayed the most potent antifungal activity among polyphenols detected in longan seed extracts [72]. Gatto et al. (2020) reported that the ethyl acetate fraction of stems of *Myrcia hatschbachii* inhibited the growth of *C. albicans* at 15.6 µg/mL, displaying fungistatic action. This fraction presented high quantity of phenolic compounds in its composition, considering that the main compounds identified by nuclear magnetic resonance were ellagic and 3-O-methyl ellagic acids [73]. Freires et al. (2016) demonstrated that the antifungal potential of propolis extracts may be related to the presence of flavonoids such as CAPE in their chemical composition, suggesting that the mechanism of action is related to disruption of fungal cell wall [65]. The anti-*Candida* activity of natural products that have phenolic acids in their compositions is probably due to the precipitation of proteins and the antioxidant capacity of these compounds which renders modifications in the metabolism of the pathogens [74].

Ellagic acid and CAPE present low solubility in water and limited permeability, which can interfere their bioavailability [75]. For this reason, pharmaceutical delivery of these molecules can be improved to overcome these problems. Some studies have proposed different carriers for these compounds without interfering with their inhibitory effect against *Candida* spp. [76–78]. Sampaio et al. (2021) evaluated ellagic acid-cyclodextrin complexes for antifungal activity. They found that the MIC of the complex was 25 µg/mL against *C. albicans* 18804 and 48 h-biofilms were inhibited at 250 µg/mL [76]. Saelo et al. (2016) investigated the MIC of CAPE nanoparticles (NP) against *C. albicans* TISTR 5779 and found that CAPE-NP might kill pathogens better than CAPE, with a MIC value of 700 µg/mL, while CAPE alone presented a MIC of 1400 µg/mL [77]. Furthermore, structural analogs can be synthesized to increase their efficacy [79]. De Vita et al. (2016) designed a new series of cinnamoyl ester and amide derivatives preserving the cinnamoyl moiety and removing the hydroxyl groups of caffeic acid to obtain an improved chemical stability. The most active compound showed more than 50% biofilm inhibition at 2 µg/mL against *C. albicans* ATCC 10231 [79].

We also tested the synergistic effect between EA and CAPE with antifungals through checkboard assays. However, all combinations evidenced indifferent interactions. These results are in contrast with the previous findings by Sun et al. (2018), where CAPE synergistically enhanced the antifungal activity of fluconazole against resistant *C. albicans* [80]. Furthermore, the synergistic effect between CAPE and caspofungin against *C. albicans* through disrupting iron homeostasis has already been described [80]. These differences can be related to different growth conditions, purity of the compounds, and origin of the strains.

Based on the MIC values of EA and CAPE in media with and without sorbitol, our findings indicate that these compounds might affect the fungal cell wall. A similar study was performed by Silva Junior et al. (2010), which found that the MIC of EA against *Saccharomyces cerevisiae* was raised from 62 to 250 µg/mL (fourfold) in the presence of sorbitol 0.8 M, suggesting that EA may act by modifying the fungal cell wall [58]. A possible effect on the *C. albicans* cell wall has been shown for caffeic acid derivatives, which may interfere with 1,3-β-glucan synthase, an enzyme unique to fungi [81]. While the mode of action of caffeic acid derivatives has been previously described, our study is the first to gain insight into the mechanism of action of caffeic acid phenethyl ester and ellagic acid on both *C. auris* and *C. albicans*. However, further investigations are needed to understand their specific role on fungal cell walls.

Virulence of *C. auris* and *C. albicans* depends on their ability to secrete tissue-damaging hydrolytic enzymes, adhere to host tissues, and change its morphological form from budding yeast to hyphal filaments as in the case of *C. albicans* [50]. For these reasons, we investigated whether EA and CAPE might present antivirulence properties, including inhibition of enzymes secretion, filamentation, and biofilm formation. There are two promi-

ment families of hydrolytic enzymes produced by *Candida* spp.: the secretory aspartyl proteinases and phospholipases. These enzymes degrade physiological substrates such as immunoglobulins and albumin, damage host cell membranes, and are involved in counteracting the host immune response by blocking phagocytosis and intracellular killing [50]. EA and CAPE did not inhibit proteinase production by both *C. auris* or *C. albicans* however, these polyphenols were able to reduce phospholipase production by *C. auris*. *C. auris* cells exposed to sublethal concentration of EA ($\frac{1}{2} \times$ MIC) were found to have no secretion of phospholipase.

The ability to form hyphae is a crucial step in *Candida* pathogenesis, since hyphae are involved in adherence, early stages of invasion and penetration into the host tissues [41]. *C. auris* could not produce hyphae under in vitro conditions used in this study; however, *C. albicans* SC5314 produced numerous hyphae. Some environmental factors, such as serum, are potent inducers of *C. albicans* filamentation [51]. In our study, we used serum to induce filamentation, however, it was recently determined that this factor does not induce filamentous growth in *C. auris* [82]. *C. auris* has the potential to undergo filamentation under certain unidentified conditions, but environmental conditions and genetic triggers for filament formation remain elusive [82,83] and the switch between typical yeast, filamentation-competent yeast and filamentous cells may be temperature-dependent and facilitated by passage through a mammalian body [82]. As we learn more about the filamentation in *C. auris*, different growth conditions can be tested to further stimulate *C. auris* filamentation, and thus evaluate the inhibitory effect of EA and CAPE on *C. auris* filamentation. Since passage through mouse or *G. mellonella* induces the filamentous morphology [82,84], a whole animal model can be used for the study of disseminated *C. auris* candidiasis after understanding the pharmacokinetics and pharmacodynamic of EA and CAPE. Our data revealed that CAPE significantly inhibited the transition of cells from budding yeast to hyphae in *C. albicans*, thus preventing one of the initial stages of infection. CAPE at $2 \times$ MIC (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) completely suppressed yeast-to-hyphal conversion without interfering with fungal growth. Microscopic images confirmed that CAPE inhibited hyphae formation, in agreement with other studies [85].

Candida spp. form biofilms, which protect them from external factors such as host immune system defenses and antifungal drugs. For this reason, resistance to antifungals is a hallmark phenotype of biofilms. Indeed, *Candida* biofilms present on medical devices often are recalcitrant to treatment with antifungals [19,23]. *Candida* spp. survive in several anatomically different sites, switch between yeast and hypha forms in response to environmental changes, and gradually form biofilm. Indeed, adhesion to biotic or abiotic surfaces is the inceptive phase of biofilm formation [86]. It is usually necessary to use higher concentrations of compounds than their MIC to be effective against *Candida* biofilms, since sessile cells are more resistant to antimicrobial agents than planktonic cells [76]. Besides its antifungal activity, we found that CAPE also presented antiadhesive properties against both *C. auris* and *C. albicans*. CAPE at $4 \times$ MIC reduced biofilm by 53% against *C. auris*, and, at $\frac{1}{4} \times$ MIC, reduced biofilm formation by 48% against *C. albicans* and fluconazole, at the same concentration, reduced biofilm by 21%. This result was expected since the *C. auris* strain employed showed resistance to fluconazole in MIC assays. Fluconazole is one of the first-line treatment options in several cases of invasive candidiasis [27]. In agreement with the biofilm results, CAPE impaired *C. auris* and *C. albicans* adhesion to cultured human epithelial cells at $4 \times$ MIC. Similar results were found by De Barros et al. (2021), which reported a reduction of 68.5% in the amount of total biomass of *C. albicans* biofilm when treated with CAPE at $5 \times$ MIC (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) [85]. De Vita et al. (2014) reported that caffeic acid derivatives could inhibit *C. albicans* ATCC 10231 biofilms. The synthesized esters 7, 8, and 10 presented MBIC₅₀ ranging from 16 to 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and MBEC₅₀ ranging from 64 to 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ at 24 h [37]. Breger et al. (2007) showed that CAPE strongly inhibited both *C. albicans* filamentation and biofilm formation. At 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CAPE inhibited *C. albicans* DAY185 biofilm formation, reducing biofilm biomass compared to the control [21]. CAPE also inhibited the formation of *Streptococcus mutans* biofilm and its metabolic activity in

mature biofilms [87]. For this reason, the antibiofilm activity of CAPE against both yeast and bacteria indicates its broad-spectrum antimicrobial potential.

Both compounds were not toxic to human erythrocytes at all concentrations tested. These findings agree with earlier studies that indicate the absence of toxicity of these compounds in RBC and demonstrate protective roles of phenolic compounds in damaged cells [88–90]. Based on these promising data, we interrogated EA and CAPE using two different in vivo invertebrate models: the wax moth larva *G. mellonella* and the nematode *C. elegans*. *G. mellonella* provides a facile model further to evaluate the toxicity and efficacy of antifungal agents, as it is a quick and economical experimental host to be used before more expensive mammalian models [91,92]. EA and CAPE, at all concentrations tested, were not toxic to the host. When the efficacy of both compounds was tested on candidiasis, both EA and CAPE were able to prolong larvae survival. When infected with *C. auris*, treatment with CAPE at 4 mg/kg increased the survival rate by 37.5%, 5 days postinfection. Next, we used the *C. elegans* model to evaluate the effects of EA and CAPE on *C. elegans* infected with *C. albicans*. *Candida* spp. establish a persistent lethal infection in *C. elegans*, as important components of *Candida* pathogenesis in mammals are also involved in nematode killing. In addition, *C. elegans* has proven useful for screening compounds for antifungal activity [21]. EA treatment at 4 µg/mL considerably protected *C. elegans* against *C. albicans* infection, prolonging larvae survival by 40% after 150 h postinfection.

A literature survey revealed that although the in vitro bioactivity of the compounds has already been described, the antifungal activity of EA and CAPE against *C. auris* in a *G. mellonella* model has not been reported previously. Furthermore, to the best of our knowledge, this is the first study that investigated the anti-*C. albicans* properties of EA using *C. elegans*. Our findings corroborate with previous studies using different invertebrate models, since the protective effect of EA on a *Drosophila melanogaster* model and the efficacy of CAPE on *G. mellonella* and *C. elegans* models have already been described against *C. albicans* [21,33,85]. EA had a protective effect on *Drosophila melanogaster* from infection with *C. albicans* SC5314. Survival rates of 45%, 33%, and 34% were observed for the groups that received 3.2, 6.4, and 32 µg/mL of EA, respectively [33]. De Barros et al. (2021) found that the survival rate of *G. mellonella* larvae was 44.5% when treated with CAPE at 5 mg/kg, accompanied by a 2.07-fold increase in the number of hemocytes and stimulation of the expression of antifungal peptide genes galiomicin and gallerimycin, suggesting both antifungal and immunomodulatory activities [85]. We found that CAPE was not effective to protect *C. elegans* against *C. albicans*. However, another study reported that CAPE at 33 µg/mL was effective in the *C. elegans*-*C. albicans* DAY185 assay [21]. This difference can be related to different *C. albicans* strains which were used in the study. Research involving these invertebrate models demonstrate a remarkable correlation between in vitro susceptibility testing results and in vivo drug efficacy in invertebrate models. Overall, this research contributes to elucidate both the antifungal and antivirulence activity of CAPE and the antifungal effect of EA against drug-resistant *C. auris*.

5. Conclusions

In conclusion, ellagic acid and caffeic acid phenethyl ester showed antifungal activities against several *Candida* spp. tested through fungistatic and fungicidal effects, respectively. Both compounds may affect the fungal cell wall and thus warrant further investigations to clarify their specific role. CAPE was also able to reduce biofilm formation and both compounds decreased phospholipase production of *C. auris*. In addition, CAPE inhibited the virulence factors of *C. albicans*, such as yeast-to-hyphal transition and biofilm formation. Both compounds were not toxic to human erythrocytes. The in vivo analysis revealed the anti-infective potential of EA and CAPE by protecting *G. mellonella* from the pathogenicity of *C. auris* and *C. albicans*. In addition, the survival of *C. albicans*-infected *C. elegans* was prolonged after treatment with ellagic acid. Structural analogs can be synthesized to increase their efficacy and pharmacological properties, and future work is needed to evaluate their effects in mammalian models. Taking into account the lack of treatment

options available for infections caused by multidrug-resistant *C. auris*, our findings indicate ellagic acid is a promising antifungal agent by inhibiting fungal growth, while CAPE inhibits virulence traits, including phospholipase secretion and fungal adhesion to surfaces.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jof7090763/s1>, Table S1: *Candida* strains used in this study. Table S2: Antifungal susceptibility of antifungal agents against *Candida* spp. Table S3: Anti-biofilm activities of EA, CAPE and FLC against *Candida* isolates. Figure S1: *C. albicans* filamentation assay. Figure S2: Toxicity of EA and CAPE and survival profile of *G. mellonella* when infected with *C. auris* and *C. albicans*.

Author Contributions: Conceptualization, E.M., and F.C.P.R.; methodology, F.C.P.R., N.T. and I.E.E.; software, F.C.P.R., N.T. and I.E.E.; validation, N.T. and E.M.; formal analysis, F.C.P.R., N.T., I.E.E., E.M., K.R.Z.; investigation, F.C.P.R., and N.T.; resources, E.M.; data curation, F.C.P.R., N.T. and I.E.E.; writing—original draft preparation, F.C.P.R.; writing—review and editing, F.C.P.R., N.T., I.E.E., P.A.d., K.R.Z. and E.M.; visualization, E.M.; supervision, E.M.; project administration, E.M.; funding acquisition, E.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was financed in part by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel—Brazil (CAPES)—Finance Code 001.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Dixon, D.M.; McNeil, M.M.; Cohen, M.L.; Gellin, B.G.; la Montagne, J.R. Fungal infections: A growing threat. *Public Health Rep.* **1996**, *111*, 226–235.
- Pfaller, M.A.; Diekema, D.J. Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **2007**, *20*, 133–163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bongomin, F.; Gago, S.; Oladele, R.; Denning, D. Global and multi-national prevalence of fungal diseases—Estimate precision. *J. Fungi* **2017**, *3*, 57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rueping, M.J.; Vehreschild, J.-J.; Cornely, O.A. Invasive candidiasis and candidemia: From current opinions to future perspectives. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2009**, *18*, 735–748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Brown, G.D.; Denning, D.W.; Gow, N.A.R.; Levitz, S.M.; Netea, M.G.; White, T.C. Hidden killers: Human fungal infections. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 165rv13. [[CrossRef](#)]
- Paramythiotou, E.; Frantzeskaki, F.; Flevari, A.; Armaganidis, A.; Dimopoulos, G. Invasive fungal infections in the ICU: How to approach, how to treat. *Molecules* **2014**, *19*, 1085–1119. [[CrossRef](#)]
- Dubey, A.K.; Singla, R.K. Perspectives on anti-*Candida* drug development. *Curr. Top. Med. Chem.* **2019**, *19*, 2375–2376. [[CrossRef](#)]
- Satoh, K.; Makimura, K.; Hasumi, Y.; Nishiyama, Y.; Uchida, K.; Yamaguchi, H. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol. Immunol.* **2009**, *53*, 41–44. [[CrossRef](#)]
- Kim, M.; Shin, J.H.; Sung, H.; Lee, K.; Kim, E.; Ryoo, N.; Lee, J.; Jung, S.; Park, K.H.; Kee, S.J.; et al. *Candida haemulonii* and closely related species at 5 university hospitals in Korea: Identification, antifungal susceptibility, and clinical features. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *48*, 57–61. [[CrossRef](#)]
- Van Schalkwyk, E.; Mpmbe, R.S.; Thomas, J.; Shuping, L.; Ismail, H.; Lowman, W.; Karstaedt, A.S.; Chibabhai, V.; Wadula, J.; Avenant, T.; et al. Epidemiologic shift in candidemia driven by *Candida auris*, South Africa, 2016–2017. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 1698–1707. [[CrossRef](#)]
- Vallabhaneni, S.; Kallen, A.; Tsay, S.; Chow, N.; Welsh, R.; Kerins, J.; Kemble, S.K.; Pacilli, M.; Black, S.R.; Landon, E.; et al. Investigation of the first seven reported cases of *Candida auris*, a globally emerging invasive, multidrug-resistant fungus—United States, May 2013–August 2016. *Am. J. Transpl.* **2017**, *17*, 296–299. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Borman, A.M.; Szekely, A.; Johnson, E.M. Comparative pathogenicity of United Kingdom isolates of the emerging pathogen *Candida auris* and other key pathogenic *Candida* species. *mSphere* **2016**, *1*, e00189–16. [[CrossRef](#)]
- Cortegiani, A.; Misseri, G.; Fasciana, T.; Giammanco, A.; Giarratano, A.; Chowdhary, A. Epidemiology, clinical characteristics, resistance, and treatment of infections by *Candida auris*. *J. Intensive Care* **2018**, *6*, 69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Spivak, E.S.; Hanson, K.E. *Candida auris*: An emerging fungal pathogen. *J. Clin. Microbiol.* **2017**, *56*, e01588–17. [[CrossRef](#)]
- Kean, R.; Brown, J.; Gulmez, D.; Ware, A.; Ramage, G. *Candida auris*: A decade of understanding of an enigmatic pathogenic yeast. *J. Fungi* **2020**, *6*, 30. [[CrossRef](#)]
- Lee, W.G.; Shin, J.H.; Uh, Y.; Kang, M.G.; Kim, S.H.; Park, K.H.; Jang, H.-C. First three reported cases of nosocomial fungemia caused by *Candida auris*. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 3139–3142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

17. Rossato, L.; Colombo, A.L. *Candida auris*: What have we learned about its mechanisms of pathogenicity? *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 3081. [\[CrossRef\]](#)
18. Mayer, F.L.; Wilson, D.; Hube, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* **2013**, *4*, 119–128. [\[CrossRef\]](#)
19. Cavalheiro, M.; Teixeira, M.C. *Candida* biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. *Front. Med.* **2018**, *5*, 28. [\[CrossRef\]](#)
20. Priya, A.; Pandian, S.K. Piperine impedes biofilm formation and hyphal morphogenesis of *Candida albicans*. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 756. [\[CrossRef\]](#)
21. Breger, J.; Fuchs, B.B.; Aperis, G.; Moy, T.I.; Ausubel, F.M.; Mylonakis, E. Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. *PLoS Pathog.* **2007**, *3*, e18. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Costerton, J.W. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* **1999**, *284*, 1318–1322. [\[CrossRef\]](#)
23. Ramage, G.; Saville, S.P.; Thomas, D.P.; López-Ribot, J.L. *Candida* biofilms: An update. *Eukaryot. Cell* **2005**, *4*, 633–638. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Srivastava, V.; Singla, R.K.; Dubey, A.K. Emerging virulence, drug resistance and future antifungal drugs for *Candida* pathogens. *Curr. Top. Med. Chem.* **2018**, *18*, 759–778. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Fisher, M.C.; Hawkins, N.J.; Sanglard, D.; Gurr, S.J. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science* **2018**, *360*, 739–742. [\[CrossRef\]](#)
26. Gauwerky, K.; Borelli, C.; Korting, H.C. Targeting virulence: A new paradigm for antifungals. *Drug Discov. Today* **2009**, *14*, 214–222. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Ahmad, A.; Molepo, J.; Patel, M. Challenges in the development of antifungal agents against *Candida*: Scope of phytochemical research. *Curr. Pharm. Des.* **2016**, *22*, 4135–4150. [\[CrossRef\]](#)
28. Daglia, M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2012**, *23*, 174–181. [\[CrossRef\]](#)
29. Pandey, K.B.; Rizvi, S.I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2009**, *2*, 270–278. [\[CrossRef\]](#)
30. Coleman, J.J.; Komura, T.; Munro, J.; Wu, M.P.; Busanelli, R.R.; Koehler, A.N.; Thomas, M.; Wagner, F.F.; Holson, E.B.; Mylonakis, E. Activity of caffeic acid phenethyl ester in *Caenorhabditis elegans*. *Future Med. Chem.* **2016**, *8*, 2033–2046. [\[CrossRef\]](#)
31. Pukkila-Worley, R.; Holson, E.; Wagner, F.; Mylonakis, E. Antifungal drug discovery through the study of invertebrate model hosts. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 1588–1595. [\[CrossRef\]](#)
32. Tomás-Barberán, F.A.; García-Villalba, R.; González-Sarrias, A.; Selma, M.v.; Espín, J.C. Ellagic acid metabolism by human gut microbiota: Consistent observation of three urolithin phenotypes in intervention trials, independent of food source, age, and health status. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 6535–6538. [\[CrossRef\]](#)
33. Da Graça Sampaio, A.; Gontijo, A.V.L.; Araujo, H.M.; Koga-Ito, C.Y. In vivo efficacy of ellagic acid against *Candida albicans* in a *Drosophila melanogaster* infection model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e01716–18. [\[CrossRef\]](#)
34. Chen, M.; Zhai, L.; Arendrup, M.C. In vitro activity of 23 tea extractions and epigallocatechin gallate against *Candida* species. *Med. Mycol.* **2015**, *53*, 194–198. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Houillé, B.; Papon, N.; Boudesocque, L.; Bourdeaud, E.; Besseau, S.; Courdavault, V.; Enguehard-Gueffier, C.; Delanoue, G.; Guérin, L.; Bouchara, J.-P.; et al. Antifungal activity of resveratrol derivatives against *Candida* species. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1658–1662. [\[CrossRef\]](#)
36. Ning, Y.; Ling, J.; Wu, C.D. Synergistic effects of tea catechin epigallocatechin gallate and antimycotics against oral *Candida* species. *Arch. Oral Biol.* **2015**, *60*, 1565–1570. [\[CrossRef\]](#)
37. De Vita, D.; Friggeri, L.; D’Auria, F.D.; Pandolfi, F.; Piccoli, F.; Panella, S.; Palamara, A.T.; Simonetti, G.; Scipione, L.; di Santo, R.; et al. Activity of caffeic acid derivatives against *Candida albicans* biofilm. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 1502–1505. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Manoharan, R.K.; Lee, J.-H.; Kim, Y.-G.; Lee, J. Alizarin and chryszin inhibit biofilm and hyphal formation by *Candida albicans*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 447. [\[CrossRef\]](#)
39. Zhong, H.; Hu, D.-D.; Hu, G.-H.; Su, J.; Bi, S.; Zhang, Z.-E.; Wang, Z.; Zhang, R.-L.; Xu, Z.; Jiang, Y.-Y.; et al. Activity of sanguinarine against *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e02259–16. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Sun, L.; Liao, K.; Wang, D. Effects of magnolol and honokiol on adhesion, yeast-hyphal transition, and formation of biofilm by *Candida albicans*. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0117695. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Li, Y.; Shan, M.; Li, S.; Wang, Y.; Yang, H.; Chen, Y.; Gu, B.; Zhu, Z. Teasaponin suppresses *Candida albicans* filamentation by reducing the level of intracellular cAMP. *Ann. Transl. Med.* **2020**, *8*, 175. [\[CrossRef\]](#)
42. Muthamil, S.; Prasath, K.G.; Priya, A.; Precilla, P.; Pandian, S.K. Global proteomic analysis deciphers the mechanism of action of plant derived oleic acid against *Candida albicans* virulence and biofilm formation. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 5113. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Evensen, N.A.; Braun, P.C. The effects of tea polyphenols on *Candida albicans*: Inhibition of biofilm formation and proteasome inactivation. *Can. J. Microbiol.* **2009**, *55*, 1033–1039. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Selem, D.; Pardi, V.; Murata, R.M. Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity in vitro. *Arch. Oral Biol.* **2017**, *76*, 76–83. [\[CrossRef\]](#)
45. Clinical & Laboratory Standards Institute. *M27-A4: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*, 4th ed.; CLSI: Wayne, PA, USA, 2017; ISBN 1562388274.

46. Rossoni, R.D.; de Barros, P.P.; do Carmo Mendonça, I.; Medina, R.P.; Silva, D.H.S.; Fuchs, B.B.; Junqueira, J.C.; Mylonakis, E. The postbiotic activity of *Lactobacillus paracasei* 28.4 against *Candida auris*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 397. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Scorneaux, B.; Angulo, D.; Borroto-Esoda, K.; Ghannoum, M.; Peel, M.; Wring, S. SCY-078 is fungicidal against *Candida* species in time-kill studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e01961. [\[CrossRef\]](#)
48. Odds, F.C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *52*, 1. [\[CrossRef\]](#)
49. Pippi, B.; Lopes, W.; Reginatto, P.; Silva, F.E.K.; Joaquim, A.R.; Alves, R.J.; Silveira, G.P.; Vainstein, M.H.; Andrade, S.F.; Fuentefria, A.M. New insights into the mechanism of antifungal action of 8-hydroxyquinolines. *Saudi Pharm. J.* **2019**, *27*, 41–48. [\[CrossRef\]](#)
50. Yousuf, S.; Ahmad, A.; Khan, A.; Manzoor, N.; Khan, L.A. Effect of garlic-derived allyl sulphides on morphogenesis and hydrolytic enzyme secretion in *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **2011**, *49*, 444–448. [\[CrossRef\]](#)
51. De Barros, P.P.; Scorzoni, L.; de Camargo Ribeiro, F.; de Oliveira Fugisaki, L.R.; Fuchs, B.B.; Mylonakis, E.; Jorge, A.O.C.; Junqueira, J.C.; Rossoni, R.D. *Lactobacillus paracasei* 28.4 reduces *in vitro* hyphae formation of *Candida albicans* and prevents the filamentation in an experimental model of *Caenorhabditis elegans*. *Microb. Pathog.* **2018**, *117*, 80–87. [\[CrossRef\]](#)
52. Mohammad, H.; Eldesouky, H.E.; Hazbun, T.; Mayhoub, A.S.; Selem, M.N. Identification of a phenylthiazole small molecule with dual antifungal and antibiofilm activity against *Candida albicans* and *Candida auris*. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 18941. [\[CrossRef\]](#)
53. Pierce, C.G.; Uppuluri, P.; Tristan, A.R.; Wormley, F.L.; Mowat, E.; Ramage, G.; Lopez-Ribot, J.L. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1494–1500. [\[CrossRef\]](#)
54. Khan, S.N.; Khan, S.; Iqbal, J.; Khan, R.; Khan, A.U. Enhanced killing and antibiofilm activity of encapsulated cinnamaldehyde against *Candida albicans*. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1641. [\[CrossRef\]](#)
55. Tharmalingam, N.; Khader, R.; Fuchs, B.B.; Mylonakis, E. The anti-virulence efficacy of 4-(1,3-dimethyl-2,3-dihydro-1H-benzimidazol-2-yl)phenol against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1557. [\[CrossRef\]](#)
56. Li, D.-D.; Deng, L.; Hu, G.-H.; Zhao, L.-X.; Hu, D.-D.; Jiang, Y.-Y.; Wang, Y. Using *Galleria mellonella*–*Candida albicans* infection model to evaluate antifungal agents. *Biol. Pharm. Bull.* **2013**, *36*, 1482–1487. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Rossoni, R.D.; Fuchs, B.B.; de Barros, P.P.; dos Santos Velloso, M.; Jorge, A.O.C.; Junqueira, J.C.; Mylonakis, E. *Lactobacillus paracasei* modulates the immune system of *Galleria mellonella* and protects against *Candida albicans* infection. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0173332. [\[CrossRef\]](#)
58. Junior, I.F.S.; Raimondi, M.; Zacchino, S.; Filho, V.C.; Noldin, V.F.; Rao, V.S.; Lima, J.C.S.; Martins, D.T.O. Evaluation of the antifungal activity and mode of action of *Lajfoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, stem-bark extracts, fractions and ellagic acid. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2010**, *20*. [\[CrossRef\]](#)
59. Pagano, M.; Faggio, C. The use of erythrocyte fragility to assess xenobiotic cytotoxicity. *Cell. Biochem. Funct.* **2015**, *33*, 351–355. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
60. Farag, M.R.; Alagawany, M. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity. *Chem. Biol. Interact.* **2018**, *279*, 73–83. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
61. Ichikawa, T.; Kutsumi, Y.; Sadanaga, J.; Ishikawa, M.; Sugita, D.; Ikeda, R. Adherence and cytotoxicity of *Candida* spp. to HaCaT and A549 cells. *Med. Mycol. J.* **2019**, *60*, 5–10. [\[CrossRef\]](#)
62. Arendrup, M.C.; Patterson, T.F. Multidrug-resistant *Candida*: Epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *J. Infect. Dis.* **2017**, *216*, S445–S451. [\[CrossRef\]](#)
63. Brighenti, F.L.; Salvador, M.J.; Gontijo, A.V.L.; Delbem, A.C.B.; Delbem, Á.C.B.; Soares, C.P.; de Oliveira, M.A.C.; Girondi, C.M.; Koga-Ito, C.Y. Plant extracts: Initial screening, identification of bioactive compounds and effect against *Candida albicans* biofilms. *Future Microbiol.* **2017**, *12*, 15–27. [\[CrossRef\]](#)
64. Sun, L.; Liao, K.; Hang, C. Caffeic acid phenethyl ester synergistically enhances the antifungal activity of fluconazole against resistant *Candida albicans*. *Phytomedicine* **2018**, *40*, 55–58. [\[CrossRef\]](#)
65. Freires, I.A.; Queiroz, V.C.P.P.; Furletti, V.F.; Ikegaki, M.; de Alencar, S.M.; Duarte, M.C.T.; Rosalen, P.L. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp. *J. Mycol. Med.* **2016**, *26*, 122–132. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Wang, S.S.; Wang, D.-M.; Pu, W.-J.; Li, D.-W. Phytochemical profiles, antioxidant and antimicrobial activities of three *Potentilla* species. *BMC Complement Altern. Med.* **2013**, *13*, 321. [\[CrossRef\]](#)
67. Costa, A.R.; de Lima Silva, J.; Lima, K.R.R.; Rocha, M.L.; Barros, L.M.; da Costa, J.G.M.; Boligon, A.A.; Kamdem, J.P.; Carneiro, J.N.P.; Leite, N.F.; et al. *Rhaphiodon echinus* (Nees & Mart.) Schauer: Chemical, toxicological activity and increased antibiotic activity of antifungal drug activity and antibacterial. *Microb. Pathog.* **2017**, *107*, 280–286. [\[CrossRef\]](#)
68. Fecker, R.; Buda, V.; Alexa, E.; Avram, S.; Pavel, I.Z.; Muntean, D.; Cocan, I.; Watz, C.; Minda, D.; Dehelean, C.A.; et al. Phytochemical and biological screening of *Oenothera biennis* L. hydroalcoholic extract. *Biomolecules* **2020**, *10*, 818. [\[CrossRef\]](#)
69. Fogliani, B.; Raharivelomanana, P.; Bianchini, J.-P.; Bourai“ma-Madjèbi, S.; Hnawia, E. Bioactive ellagitannins from *Cunonia macrophylla*, an endemic *Cunoniaceae* from New Caledonia. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 241–247. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
70. Li, X.-C.; Joshi, A.S.; ElSohly, H.N.; Khan, S.I.; Jacob, M.R.; Zhang, Z.; Khan, I.A.; Ferreira, D.; Walker, L.A.; Broedel, S.E.; et al. Fatty acid synthase inhibitors from plants: Isolation, structure elucidation, and SAR studies. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1909–1914. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
71. Phuong, N.N.M.; Le, T.T.; van Camp, J.; Raes, K. Evaluation of antimicrobial activity of rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) peel extracts. *Int. J. Food Microbiol.* **2020**, *321*, 108539. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

72. Rangkadilok, N.; Tongchusak, S.; Boonhok, R.; Chaiyaroj, S.C.; Junyaprasert, V.B.; Buajeeb, W.; Akanimane, J.; Raksasuk, T.; Suddhasthira, T.; Satayavivad, J. In vitro antifungal activities of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed extract. *Fitoterapia* **2012**, *83*, 545–553. [CrossRef] [PubMed]
73. Gatto, L.J.; Veiga, A.; Gribner, C.; Moura, P.F.; Rech, K.S.; Murakami, F.S.; de Fatima Gaspari Dias, J.; Miguel, O.G.; Miguel, M.D. *Myrcia hatschbachii*: Antifungal activity and structural elucidation of ellagic and 3-O-methyl ellagic acids. *Nat. Prod. Res.* **2020**, 1–4. [CrossRef] [PubMed]
74. De Araújo, A.R.; Iles, B.; de Melo Nogueira, K.; do Nascimento Dias, J.; Plácido, A.; Rodrigues, A.; Albuquerque, P.; Silva-Pereira, I.; Socodatto, R.; Portugal, C.C.; et al. Antifungal and anti-inflammatory potential of eschweilenol c-rich fraction derived from *Terminalia fagifolia* Mart. *J. Ethnopharmacol.* **2019**, *240*, 111941. [CrossRef]
75. Gontijo, A.V.; da Sampaio, A.G.; Koga-Ito, C.Y.; Salvador, M.J. Biopharmaceutical and antifungal properties of ellagic acid-cyclodextrin using an in vitro model of invasive candidiasis. *Future Microbiol.* **2019**, *14*, 957–967. [CrossRef] [PubMed]
76. Da Graça Sampaio, A.; Gontijo, A.V.L.; de Moraes Gouvêa Lima, G.; de Oliveira, M.A.C.; Lepesqueur, L.S.S.; Koga-Ito, C.Y. Ellagic acid-cyclodextrin complexes for the treatment of oral candidiasis. *Molecules* **2021**, *26*, 505. [CrossRef]
77. Saelo, S.; Assatarakul, K.; Sane, A.; Suppakul, P. Fabrication of novel bioactive cellulose-based films derived from caffeic acid phenethyl ester-loaded nanoparticles via a rapid expansion process: RESOLV. *J. Agric. Food Chem.* **2016**, *64*, 6694–6707. [CrossRef]
78. Savić, I.M.; Jocić, E.; Nikolić, V.D.; Popsavin, M.M.; Rakić, S.J.; Savić-Gajić, I.M. The effect of complexation with cyclodextrins on the antioxidant and antimicrobial activity of ellagic acid. *Pharm. Dev. Technol.* **2019**, *24*, 410–418. [CrossRef]
79. De Vita, D.; Simonetti, G.; Pandolfi, F.; Costi, R.; di Santo, R.; D'Auria, F.D.; Scipione, L. Exploring the anti-biofilm activity of cinnamic acid derivatives in *Candida albicans*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 5931–5935. [CrossRef]
80. Sun, L.; Hang, C.; Liao, K. Synergistic effect of caffeic acid phenethyl ester with caspofungin against *Candida albicans* is mediated by disrupting iron homeostasis. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *116*, 51–58. [CrossRef]
81. Ma, C.-M.; Abe, T.; Komiyama, T.; Wang, W.; Hattori, M.; Daneshmandi, M. Synthesis, Anti-Fungal and 1,3-β-D-glucan synthase inhibitory activities of caffeic and quinic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7009–7014. [CrossRef]
82. Yue, H.; Bing, J.; Zheng, Q.; Zhang, Y.; Hu, T.; Du, H.; Wang, H.; Huang, G. Filamentation in *Candida auris*, an emerging fungal pathogen of humans: Passage through the mammalian body induces a heritable phenotypic switch. *Emerg. Microbes Infect.* **2018**, *7*, 188. [CrossRef]
83. Fan, S.; Yue, H.; Zheng, Q.; Bing, J.; Tian, S.; Chen, J.; Ennis, C.L.; Nobile, C.J.; Huang, G.; Du, H. Filamentous growth is a general feature of *Candida auris* clinical isolates. *Med. Mycol.* **2021**, *59*, 734–740. [CrossRef]
84. Garcia-Bustos, V.; Ruiz-Sauri, A.; Ruiz-Gaitán, A.; Sigona-Giangreco, I.A.; Cabañero-Navalon, M.D.; Sabalza-Baztán, O.; Salavert-Lletí, M.; Tormo, M.Á.; Pemán, J. Characterization of the differential pathogenicity of *Candida auris* in a *Galleria mellonella* infection model. *Microbiol. Spectr.* **2021**, *9*, e0001321. [CrossRef]
85. De Barros, P.P.; Rossoni, R.D.; Garcia, M.T.; de Lima Kaminski, V.; Loures, F.V.; Fuchs, B.B.; Mylonakis, E.; Junqueira, J.C. The anti-biofilm efficacy of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in vitro and a murine model of oral candidiasis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 700305. [CrossRef]
86. Meng, L.; Sun, C.; Zhang, C.; Song, S.; Sun, X.; Ju, J.; Deng, Y. Efficacy of compounds isolated from *Streptomyces olivaceus* against the morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Mar. Drugs* **2019**, *17*, 442. [CrossRef] [PubMed]
87. Niu, Y.; Wang, K.; Zheng, S.; Wang, Y.; Ren, Q.; Li, H.; Ding, L.; Li, W.; Zhang, L. Antibacterial effect of caffeic acid phenethyl ester on cariogenic bacteria and *Streptococcus mutans* biofilms. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2020**, *64*, e00251-20. [CrossRef]
88. Fedeli, D.; Berrettini, M.; Gabryelak, T.; Falcioni, G. The Effect of some tannins on trout erythrocytes exposed to oxidative stress. *Mutat. Res.* **2004**, *563*, 89–96. [CrossRef]
89. Yilmaz, H.; Uz, E.; Gökalp, O.; Özçelik, N.; Çiçek, E.; Özer, M. Protective role of caffeic acid phenethyl ester and erdosteine on activities of purine-catabolizing enzymes and level of nitric oxide in red blood cells of isoniazid-administered rats. *Toxicol. Ind. Health* **2008**, *24*, 519–524. [CrossRef]
90. Colina, J.R.; Suwalsky, M.; Manrique-Moreno, M.; Petit, K.; Aguilar, L.F.; Jemiola-Rzeminska, M.; Strzalka, K. An in vitro study of the protective effect of caffeic acid on human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **2019**, *662*, 75–82. [CrossRef] [PubMed]
91. Desbois, A.P.; Coote, P.J. Utility of greater wax moth larva (*Galleria mellonella*) for evaluating the toxicity and efficacy of new antimicrobial agents. *Adv. Appl. Microbiol.* **2012**, *78*, 25–53. [CrossRef] [PubMed]
92. Fuchs, B.B.; Eby, J.; Nobile, C.J.; el Khoury, J.B.; Mitchell, A.P.; Mylonakis, E. Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. *Microbes. Infect.* **2010**, *12*, 488–496. [CrossRef] [PubMed]

Supplementary Materials

Table S1. *Candida* strains used in this study.

Strain	Description	Reference
CAU-01	AR-BANK#0381	CDC
CAU-02	AR-BANK#0382	CDC
CAU-03	AR-BANK#0383	CDC
CAU-04	AR-BANK#0384	CDC
CAU-05	AR-BANK#0385	CDC
CAU-06	AR-BANK#0386	CDC
CAU-07	AR-BANK#0387	CDC
CAU-08	AR-BANK#0388	CDC
CAU-09	AR-BANK#0389	CDC
CAU-10	AR-BANK#0390	CDC
CAL	WT	ATCC
CG	WT	ATCC
CK	WT	ATCC
CP	WT	ATCC
CT	WT	ATCC

CAU: *Candida auris*; CAL: *Candida albicans*; CG: *Candida glabrata*; CK: *Candida krusei*; CP: *Candida parapsilosis*; CT: *Candida tropicalis*; WT: Wild-type/

Table S2. Antifungal susceptibility of antifungal agents against *Candida* spp.

Strains	MIC values in $\mu\text{g/mL}$ (interpretation)		
	Antifungals		
	AMB	CPF	FLC
CAU-01	0.5 (S)	0.125 (S)	4 (S)
CAU-02	0.5 (S)	0.5 (S)	16 (S)
CAU-03	0.5 (S)	0.25 (S)	128 (R)
CAU-04	0.5 (S)	16 (R)	128 (R)
CAU-05	0.5 (S)	0.5 (S)	>256 (R)
CAU-06	0.5 (S)	0.5 (S)	>256 (R)
CAU-07	1 (S)	0.5 (S)	8 (S)
CAU-08	1 (S)	0.25 (S)	>256 (R)
CAU-09	4 (R)	0.5 (S)	256 (R)
CAU-10	4 (R)	0.5 (S)	>256 (R)
CAL	0.5 (-)	0.125 (S)	0.25 (S)
CG	0.5 (-)	0.25 (I)	8 (SDD)
CK	0.5 (-)	0.5 (I)	32 (-)
CP	0.25 (-)	0.5 (S)	1 (S)
CT	0.25 (-)	0.25 (S)	64 (R)

Classification based on CDC and CLSI guidelines. S: sensitive. I: intermediate R: resistant. SDD: susceptible dose dependent. Break-points for *C. albicans*: CPF ($S \leq 0.25$; $R > 0.5$) and FLC ($S \leq 2$; $R > 4$); *C. glabrata*: CPF ($S \leq 0.125$; $R > 0.25$) and FLC ($S \leq 32$ SDD; $R > 32$); *C. krusei*: CPF ($S \leq 0.25$; $R > 0.5$); *C. parapsilosis*: CPF and FLC ($S \leq 2$; $R > 4$); *C. tropicalis*: CPF ($S \leq 0.25$; $R > 0.5$) and FLC ($S \leq 2$; $R > 4$); *C. auris*: AMB and CPF ($S < 2$; $R \geq 2$), FLC ($S < 32$; $R \geq 32$).

AMB: amphotericin B, CPF: caspofungin, FLC: fluconazole.

Table S3. Anti-biofilm activities of EA, CAPE and FLC against *Candida* isolates.

Strain	Agent	MBIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) ¹ determined by the use of		MBEC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) ² determined by the use of	
		CV	XIT	CV	XIT
<i>C. auris</i> CAU-04	EA	>64	>64	>64	>64
	CAPE	64	32	>64	32

	Fluconazole	>64	>64	>64	>64
	EA	>64	>64	>64	>64
<i>C. albicans</i> SC5314	CAPE	32	8	>64	64
	Fluconazole	≤2	≤2	>64	>64

¹ MBIC₅₀: lowest concentration of the test compound that resulted in >50% inhibition of biofilm formation compared to the control,

² MBEC₅₀: The lowest concentration of the test compound resulted in >50% eradication of mature biofilm compared to the control.

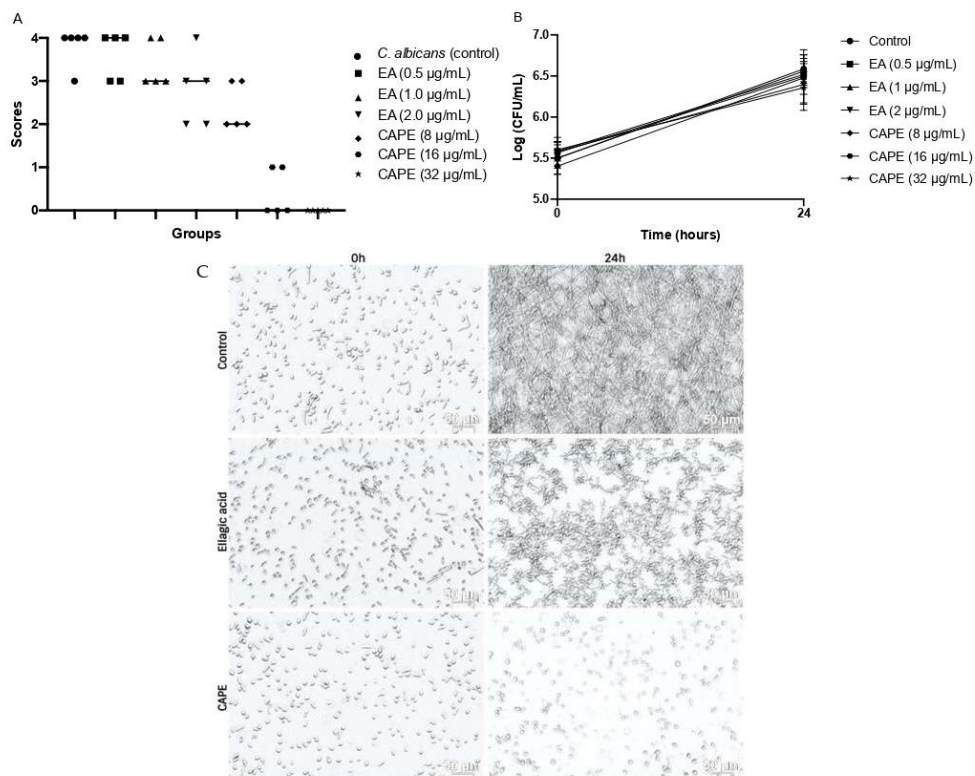


Figure S1. *C. albicans* filamentation assay. (A) Effects of EA and CAPE on *C. albicans* hyphal growth on liquid media. *C. albicans* was grown in RPMI-1640 medium in the presence of different concentrations of either EA or CAPE at 37°C for 24h. Median scores were obtained by hyphae counting of *C. albicans* alone (control group) and treatments (EA or CAPE). (B) Quantification of the CFU/mL (log) of *C. albicans* obtained in the non-treated control and experimental groups. No statistically significant differences were found. (C) Inhibitory effects of EA (4× MIC: 2 µg/mL) and CAPE (2× MIC: 16 µg/mL) on *C. albicans* filamentation. Aliquots were withdrawn and photographed using a bright field microscope.

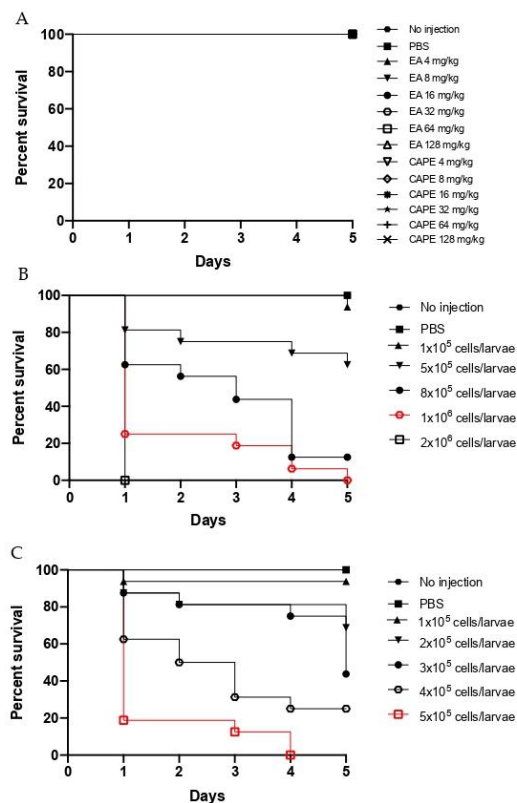


Figure S2. Toxicity of EA and CAPE and survival profile of *G. mellonella* when infected with *C. auris* and *C. albicans*. (A) Toxicity evaluation of EA and CAPE in *G. mellonella* model. No death was observed at the concentrations used. (B) Survival of *G. mellonella* larvae infected with different concentrations of *C. auris*. (C) Survival of *G. mellonella* larvae infected with different concentrations of *C. albicans*. The inoculum selected for further experiments are presented in red.

References

- Alonso, G.C.; Pavarina, A.C.; Sousa, T. v.; Klein, M.I. A quest to find good primers for gene expression analysis of *Candida albicans* from clinical samples. *Journal of Microbiological Methods* **2018**, *147*, doi:10.1016/j.mimet.2018.02.010.
- Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A2: *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard - Second Edition*. 1-51. 2002; National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002; ISBN 1562384694.
- Green, C.B.; Zhao, X.; Yeater, K.M.; Hoyer, L.L. Construction and Real-Time RT-PCR validation of *Candida albicans* PALS-GFP reporter strains and their use in flow cytometry analysis of *als* gene expression in budding and filamenting cells. *Microbiology* **2005**, *151*, doi:10.1099/mic.0.27696-0.
- Li, D.-D.; Deng, L.; Hu, G.-H.; Zhao, L.-X.; Hu, D.-D.; Jiang, Y.-Y.; Wang, Y. Using *Galleria mellonella*-*Candida albicans* infection model to evaluate antifungal agents. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **2013**, *36*, doi:10.1248/bpb.b13-00270.

5. Liang, R.; Cao, Y.; Zhou, Y.; Xu, Y.; Gao, P.; Dai, B.; Yang, F.; Tang, H.; Jiang, Y. Transcriptional response of *Candida albicans* biofilms following exposure to 2-amino-nonyl-6-methoxyl-tetralin muriate. *Acta Pharmacologica Sinica* **2010**, *31*, doi:10.1038/aps.2010.33.
6. Nailis, H.; Kuchariková, S.; Řičicová, M.; van Dijk, P.; Deforce, D.; Nelis, H.; Coenye, T. Real-Time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and -independent gene expression. *BMC Microbiology* **2010**, *10*, doi:10.1186/1471-2180-10-114.
7. Rossoni, R.D.; Fuchs, B.B.; de Barros, P.P.; Velloso, M. dos S.; Jorge, A.O.C.; Junqueira, J.C.; Mylonakis, E. *Lactobacillus paracasei* modulates the immune system of *Galleria mellonella* and protects against *Candida albicans* infection. *PLOS ONE* **2017**, *12*, doi:10.1371/journal.pone.0173332.

3.3. Artigo III

Fungal coinfections in the setting of COVID-19

Manuscrito a ser submetido no periódico **Journal of Fungi**.

Endereço eletrônico do periódico: <https://www.mdpi.com/journal/jof/instructions>

Fator de impacto: 5.816.

Omitido – em processo de submissão à revista.

DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como tema o estudo de potenciais moléculas com atividade antimicrobiana, além da busca por novas estratégias de controle de biofilmes microbianos. Neste sentido, foram abordadas duas estratégias para descoberta de novos agentes antimicrobianos e antibiofilme: (i) a investigação de fitoquímicos presentes no resíduo do processamento da uva com atividade de inibição do crescimento microbiano e atividades inibitória e erradicatória sobre biofilmes bacterianos; (ii) o estudo de compostos fenólicos de origem natural, provenientes de plantas, como agentes antifúngicos.

Na primeira etapa do trabalho, avaliou-se a atividade antimicrobiana e antibiofilme de extratos e frações do resíduo do processamento da uva. Plantas são fontes de uma série de metabólitos secundários que exercem função de proteção contra agentes agressores, tais como insetos, herbívoros e microrganismos (ATANASOV et al., 2015; PARTHASARATHY et al., 2021). Estes metabólitos pertencem a diferentes grupos químicos, incluindo alcaloides, terpenos, esteroides, saponinas, polifenóis (GÓRNIAK; BARTOSZEWSKI; KRÓLICZEWSKI, 2019; KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011; PANDEY; RIZVI, 2009). A uva foi escolhida por ser uma das frutas mais cultivadas no mundo e por ser amplamente utilizada no Brasil. Além disso, o estado do Rio Grande do Sul detém cerca de 90% da produção nacional, sendo, portanto, uma matéria-prima encontrada em grande quantidade (BARCIA et al., 2015a; MAPA, 2015). Além disso, a uva é rica em metabólitos secundários, principalmente compostos fenólicos, com reconhecidas propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antienvelhecimento e antimicrobiana (BERES et al., 2017; MARINA et al., 2017).

Nas etapas de processamento da uva nas indústrias para produção de sucos, vinhos e derivados, há a geração de uma grande quantidade de resíduos, que são geralmente descartados, sem destinação própria. Estes resíduos incluem partes da uva, como engaço, casca, e sementes, além de águas residuais e gases. Estes resíduos, além de serem produzidos em grandes quantidades, apresentam características poluentes e, portanto, dificultam seu descarte por meio de compostagem, incineração ou em aterros (BERES et al., 2017; HASSAN et al., 2019; KUSCH et al., 2015). Diante do panorama mundial que visa redução de custos e ações imediatas

de sustentabilidade ambiental, através de uma gestão integrada, os resíduos da uva representam fonte barata e interessante para recuperação de compostos valiosos. Neste sentido, a busca por compostos com atividade biológica se faz de extrema relevância (HASSAN et al., 2019; SILVA et al., 2021).

A emergência da resistência antimicrobiana tem levantado uma série de desafios no tratamento de doenças infecciosas. Considerando o aumento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos, somado ao declínio acentuado da descoberta de novas opções terapêuticas, é urgente a busca por fontes alternativas (HAY et al., 2018; MICHAEL; DOMINEY-HOWES; LABBATE, 2014; PERAMAN et al., 2021). Desta forma, a terapia antivirulência surge como uma ideia promissora no controle de infecções, uma vez que visa controlar fatores de virulência microbianos, sem causar a morte do microrganismo. Assim, o microrganismo se torna mais suscetível às defesas do hospedeiro e/ou antimicrobianos convencionais. Além disso, visa conter ou postergar o surgimento da resistência (DICKEY; CHEUNG; OTTO, 2017; RASKO; SPERANDIO, 2010).

Dentre os fatores de virulência microbianos reconhecidos, a formação de biofilmes é um dos mais relevantes. Biofilmes são comunidades microbianas nas quais os microrganismos se encontram aderidos entre si e podendo estar aderidos a uma superfície biótica ou abiótica (COSTERTON, 1995; DUFOUR; LEUNG; LÉVESQUE, 2010). A função de um biofilme é proteger os microrganismos que ali se encontram contra ambientes hostis. Entretanto, a grande problemática de um biofilme decorre de sua presença em cerca de 80% das infecções crônicas, além de suas células sésseis serem, de forma geral, de 10 a 1000 vezes mais resistentes do que seus homólogos de vida livre. Isto significa que biofilmes podem ser facilmente encontrados em dispositivos médicos e, uma vez aderidos a superfícies, seu controle e tratamento se torna muito mais complicado, comprometendo, por muitas vezes, o desfecho clínico dos pacientes e levando à óbito (DONLAN, 2002; DONLAN; COSTERTON, 2002; FLEMMING et al., 2016; YIN et al., 2019).

Desta forma, este estudo encontrou, a partir dos resíduos das uvas Chardonnay, Cabernet Franc e Bordô, extratos e frações com atividades antibiofilme. De cada uva, foram obtidos 3 extratos, a partir de extração assistida por ultrassom, com os seguintes solventes utilizados: diclorometano, metanol e água. Estes solventes, em virtude de suas polaridades, permitiam a

extração de diferentes constituintes, do mais apolar ao mais polar, nesta ordem. Os extratos foram testados quanto às atividades antimicrobiana e antibiofilme. Foram selecionados quatro modelos bacterianos reconhecidamente formadores de biofilme, sendo duas bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*) e duas bactérias Gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*).

Os extratos aquosos dos resíduos das uvas Chardonnay (CR-W) e Cabernet Franc (FR-W) obtiveram os melhores resultados de inibição do crescimento microbiano das quatro bactérias, com valores de concentração inibitória mínima entre 1,25 e 5 mg/mL. Os extratos foram mais efetivos contra as bactérias Gram-positivas, em concordância com a literatura que reporta que bactérias Gram-negativas são mais resistentes a compostos provavelmente em virtude de sua membrana externa que é capaz de retê-los (EFENBERGER-SZMECHTYK; NOWAK; CZYZOWSKA, 2021). Uma série de estudos reportam acerca da atividade antimicrobiana de resíduos da uva, com valores semelhantes aos encontrados neste estudo (GÓMEZ-MEJÍA et al., 2021; SANHUEZA et al., 2017).

Além disso, os extratos CR-W e FR-W apresentaram sinergismo com antimicrobianos por meio do ensaio do *checkerboard*. O extrato CR-W apresentou efeito sinérgico com a vancomicina contra *S. aureus*, enquanto que o extrato FR-W demonstrou sinergismo com a oxacilina contra *S. aureus* e *S. epidermidis*. Sanhueza et al. (2017) encontrou sinergismo entre o extrato do resíduo da uva Cabernet Sauvignon e diversas classes de antimicrobianos (fluoroquinolonas, fenícolis, tetraciclina e beta-lactâmicos) (SANHUEZA et al., 2017). Entretanto, ainda não há dados científicos que suportam quais componentes do resíduo da uva são responsáveis por esta atividade e quais mecanismos envolvidos no efeito.

Em decorrência da importância dos biofilmes na patogênese microbiana, foi investigada a atividade antibiofilme dos extratos. O extrato do resíduo da uva Chardonnay extraído com diclorometano (CR-D), na concentração de 5 mg/mL, foi capaz de inibir biofilmes de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *K. pneumoniae* em 82%, 64% e 60%, respectivamente, sem causar inibição do crescimento microbiano. Ensaio de curva dose-resposta também foram realizados. Em concentrações mais baixas, também houve atividade, embora menor. Na concentração de 0,31 mg/mL, o extrato foi capaz de inibir o biofilme de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *K. pneumoniae* em 61%, 35% e 7%. Em virtude desta atividade, este extrato foi selecionado para etapas

subsequentes de purificação, através de cromatografia em coluna. Foram obtidas duas frações, que potencializaram o efeito antibiofilme do resíduo da uva, tendo em vista que a inibição do biofilme foi maior em uma concentração mais baixa. A fração F11 a 0,62 mg/mL inibiu o biofilme de *S. aureus* e *S. epidermidis* em 82 e 84%, respectivamente. A fração F8 a 0,31 mg/mL inibiu o biofilme de *K. pneumoniae* em 25%, sem inibir o crescimento bacteriano. A maioria dos estudos reportam a atividade antibiofilme de resíduos da uva contra patógenos orais (FURIGA; ROQUES; BADET, 2014; HANNIG et al., 2009; THIMOTHE et al., 2007). Contra patógenos hospitalares, alguns estudos demonstram o potencial antibiofilme de resíduos da uva em concentrações semelhantes às encontradas neste trabalho contra *S. aureus* e *P. aeruginosa* (AL-MOUSAWI et al., 2020; RAMADAN et al., 2017; XU et al., 2014).

Os mecanismos envolvidos na atividade antibiofilme do resíduo da uva ainda não é bem compreendido. Todavia, sugere-se que alguns dos componentes da uva podem interferir no metabolismo microbiano, afetar a integridade da parede celular, alterar a permeabilidade da membrana plasmática e influenciar a expressão gênica de alguns fatores regulatórios envolvidos na formação de biofilme, por meio de interferências na adesão bacteriana a superfícies, diminuição da motilidade e modulação do *quorum sensing* (ÁLVAREZ-MARTÍNEZ et al., 2020; BOUARAB-CHIBANE et al., 2019; GÓRNIK; BARTOSZEWSKI; KRÓLICZEWSKI, 2019; LAMBERT et al., 2001; SILVA et al., 2021).

Por esta razão, foram conduzidos ensaios de metabolômica por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UHPLC-ESI-MS/MS) para elucidação da composição química dos extratos e frações, com vistas à compreensão dos possíveis componentes do resíduo da uva envolvidos nas atividades biológicas. Uma série de pesquisas atribuem a atividade antimicrobiana do resíduo da uva ao seu conteúdo rico em compostos fenólicos (GARCÍA-LOMILLO et al., 2014; HASSAN et al., 2019; XU et al., 2016). Entretanto, pouco se sabe sobre a atividade antimicrobiana em extratos com composições diferentes. Os extratos metanólicos e aquosos apresentaram uma composição rica em ácidos fenólicos, antonininas, flavonóis, açúcares, aminoácidos e vitaminas e lipídios. As frações, por sua vez, apresentaram rica quantidade de lipídios, como ácidos graxos e esteróis.

Além disso, a toxicidade dos extratos foi testada no invertebrado *C. elegans*. Este nematoide é um modelo muito utilizado em pesquisas farmacológicas e toxicológicas em

decorrência de sua alta homologia com humanos (KALETTA; HENGARTNER, 2006). Nos ensaios de sobrevivência, tamanho corporal e tamanho da ninhada, não foi observado toxicidade dos extratos dos resíduos das uvas Chardonnay e Cabernet Franc extraídas com metanol e Chardonnay extraída com água. Em todos os ensaios, as larvas foram submetidas a exposições agudas e crônicas dos extratos em diferentes concentrações (de 2,50 a 6,25 mg/mL). Há uma escassez de estudos acerca da toxicidade de extratos do resíduo da uva. Alguns estudos apontam que o resíduo da uva exerce um efeito benéfico em *C. elegans*, prolongando sua longevidade, provavelmente em decorrência da ação antioxidante de seus constituintes (AYUDA-DURÁN et al., 2019; OZPINAR; OZPINAR; KARAKUS, 2017; TANG; HALLIWELL, 2010).

A partir destes resultados, pode-se inferir que o resíduo da uva é uma fonte promissora de compostos apresentando atividades antimicrobiana e antibiofilme contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos. Mais estudos são necessários para compreensão dos possíveis mecanismos de ação e elucidação se a atividade se deve a um sinergismo dos constituintes da uva ou de algum composto em específico. O efeito em modelos animais, incluindo mamíferos, também pode ser avaliado, a fim de corroborar os achados *in vitro* e em modelo invertebrado.

Os compostos fenólicos são um dos principais metabólitos secundários encontrados na uva e em seus resíduos (MARINA et al., 2017; XU et al., 2016). Em decorrência da diversidade estrutural e inúmeras possibilidades de modos de ação desta classe de compostos, os polifenóis representam uma opção conveniente na busca de novos agentes antimicrobianos (DAGLIA, 2012; SLOBODNÍKOVÁ et al., 2016). Dentre esta classe de compostos, o ácido elágico (AE) e o ácido cafeico fenetil éster (CAPE) são moléculas reconhecidas por sua ampla gama de atividades biológicas. O AE é um precursor de taninos hidrolisáveis presente em frutas vermelhas e nozes, que apresenta efeitos anti-inflamatórios e antitumorais (TOMÁS-BARBERÁN et al., 2014). CAPE é um dos principais constituintes da própolis e está envolvido em respostas imunomodulatórias por meio da ativação de células T (COLEMAN et al., 2016).

Além da atividade contra bactérias, a atividade antifúngica de polifenóis também pode ser encontrada (AHMAD; MOLEPO; PATEL, 2016; ÁLVAREZ-MARTÍNEZ et al., 2020; EVENSEN; BRAUN, 2009). O gênero *Candida* é o principal agente etiológico de infecções fúngicas, sendo que *C. albicans* é a espécie mais prevalente em infecções (BONGOMIN et al.,

2017; BROWN et al., 2012). Entretanto, *C. auris* tem emergido nos últimos anos como um importante patógeno, em virtude de sua multirresistência aos antifúngicos, capacidade de sobrevivência em superfícies por períodos prolongados, alta transmissibilidade, disseminação mundial, dificuldade de identificação laboratorial e alta taxa de mortalidade envolvida (BORMAN; SZEKELY; JOHNSON, 2016; CORTEGIANI et al., 2018; SPIVAK; HANSON, 2017; VALLABHANENI et al., 2017a). Por esta razão, este trabalho investigou a atividade antifúngica dos compostos fenólicos AE e CAPE contra *Candida* spp., incluindo um painel de *C. auris* multirresistente.

Ambos os compostos foram capazes de inibir o crescimento de *Candida* spp., sendo que o AE apresentou atividade fungistática e CAPE fungicida. O provável modo de ação é na parede celular fúngica, todavia, o alvo específico ainda necessita ser elucidado. CAPE também foi capaz de agir sobre fatores de virulência fúngicos, através da redução da filamentação de *C. albicans*, diminuição da produção de fosfolipases de *C. auris*, e inibição de biofilmes de *C. albicans* e *C. auris*. De fato, a inibição da adesão de *C. albicans* e *C. auris* a superfícies foi também demonstrada a partir do tratamento com CAPE em células epiteliais pulmonares A549. Ambos os compostos não foram tóxicos aos eritrócitos humanos, nem no modelo de *G. mellonella*. Pelo contrário, eles foram capazes de proteger a larva infectada com *C. albicans* ou *C. auris*. Além disso, o AE foi capaz de recuperar *C. elegans* infectado com *C. albicans*. Estes resultados demonstram a capacidade dos polifenóis AE e CAPE em controlar infecções fúngicas, por meio da inibição do crescimento de *Candida* spp. e do controle de seus fatores de virulência, que estão diretamente relacionados com a patogênese e doença no hospedeiro. Mais estudos podem ser conduzidos a fim de confirmar estes efeitos em modelos mamíferos e suas ações farmacocinéticas e farmacodinâmicas.

4. CONCLUSÕES

Artigo I

- Extratos e frações do resíduo do processamento da uva demonstram atividades antimicrobiana contra bactérias de relevância clínica: *S. aureus*, *S. epidermidis* e *K. pneumoniae*;
- Os resíduos das uvas Chardonnay, Bordô e Cabernet Franc apresentaram atividade antibiofilme contra as cepas bacterianas, sem causar toxicidade ao modelo de *C. elegans*;
- Constituintes do resíduo da uva podem apresentar sinergismo com antimicrobianos;
- Os extratos e frações dos resíduos de uva indicam a presença de uma ampla gama de compostos fenólicos, ácidos graxos, aminoácidos e alcaloides.

Artigo II

- Os compostos fenólicos ácido elágico e ácido cafeico fenetil éster apresentam atividade antifúngica contra *Candida* spp., incluindo isolados multirresistentes de *C. auris*;
- Ambos os compostos possivelmente atuam na parede celular fúngica;
- CAPE possui efeito antivirulência, uma vez que foi capaz de inibir uma série de fatores de virulência fúngicos, dentre eles, produção de fosfolípases, biofilmes e filamentação;
- Ambos os compostos não são tóxicos a eritrócitos humanos e ao modelo de *G. mellonella*;
- Ambos os compostos protegem *G. mellonella* contra infecção por *C. albicans* ou *C. auris*. O ácido elágico é capaz de proteger *C. elegans* contra infecção por *C. albicans*.

Artigo III

- O estado clínico de pacientes acometidos de COVID-19 predispõe inúmeros fatores de risco para o desenvolvimento de coinfeções fúngicas, tais como, hospitalização prolongada, ventilação mecânica e terapias com antibacterianos;
- A apresentação clínica da COVID-19 pode ser semelhante a quadros de sepse fúngica e pode, portanto, atrasar diagnóstico e tratamento adequados;

- Observa-se um aumento no número de surtos de infecções fúngicas diagnosticadas em unidades de tratamento intensivo;
- É imperativo o estabelecimento de um sistema de vigilância apropriado capaz de identificar e controlar coinfeções fúngicas, além do reforço das práticas preventivas de higiene, uso correto de dispositivos médicos implantáveis e adequada terapia antimicrobiana.

5. PERSPECTIVAS

A partir dos extratos, frações e compostos utilizados neste trabalho, tem-se como perspectiva investigar o mecanismo de ação específico dos mesmos. No caso dos extratos e frações do resíduo da uva, pretende-se avaliar se a atividade se deve a um efeito sinérgico dos constituintes dos mesmos ou se é em decorrência da ação específica de um composto. Para confirmar os efeitos biológicos, a ação dos mesmos em modelos mamíferos deve ser investigada. Além disso, também se tem como perspectiva modificações estruturais nas moléculas afim de potencializar as atividades antimicrobiana e antivirulência, bem como aprimorar seus aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos. A Figura 19 esquematiza as etapas realizadas neste trabalho, bem como as perspectivas futuras.

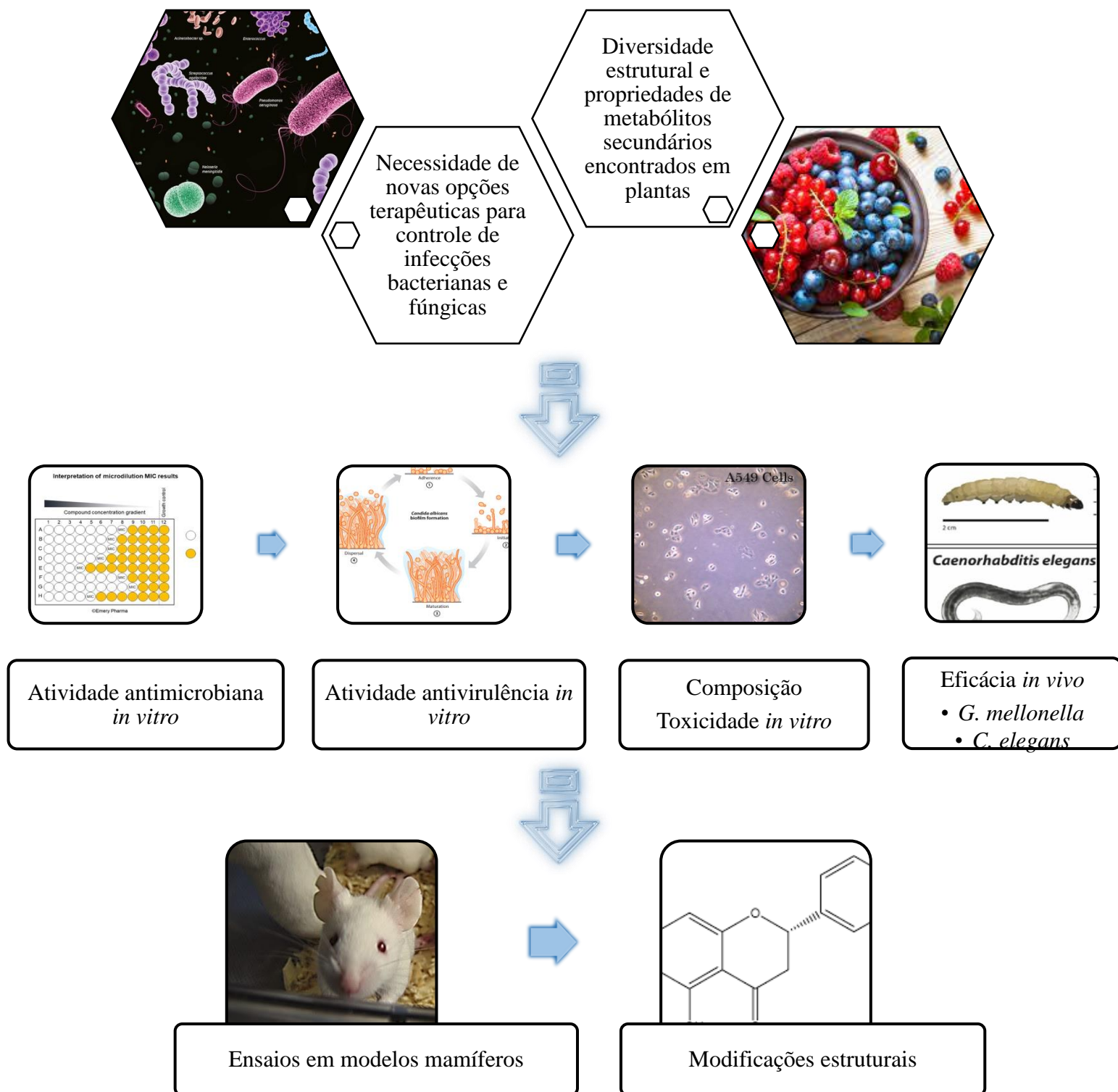


Figura 19. Esquemática das etapas realizadas e perspectivas deste trabalho.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, M. et al. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. **Archives of Microbiology**, v. 196, n. 7, 18 jul. 2014.

AHMAD, A.; MOLEPO, J.; PATEL, M. Challenges in the Development of Antifungal Agents Against *Candida*: Scope of Phytochemical Research. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 27, 16 ago. 2016.

AL-MOUSAWI, A. H. et al. Effect of Black Grape Seed Extract (*Vitis vinifera*) on Biofilm Formation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus haemolyticus*. **Current Microbiology**, v. 77, n. 2, 5 fev. 2020.

ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, F. J. et al. Antimicrobial Capacity of Plant Polyphenols against Gram-positive Bacteria: A Comprehensive Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 15, 2 jun. 2020.

ÁLVAREZ-MARTÍNEZ, F. J.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; MICOL, V. Tackling Antibiotic Resistance with Compounds of Natural Origin: A Comprehensive Review. **Biomedicines**, v. 8, n. 10, 11 out. 2020.

ARCHER, N. K. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms. **Virulence**, v. 2, n. 5, 27 set. 2011.

ARCIOLA, C. R. et al. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. **Biomaterials**, v. 33, n. 26, set. 2012.

ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, dez. 2015.

AYUDA-DURÁN, B. et al. Antioxidant Characterization and Biological Effects of Grape Pomace Extracts Supplementation in *Caenorhabditis elegans*. **Foods**, v. 8, n. 2, 15 fev. 2019.

BALESTRINO, D. et al. The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae in vitro* biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 685–701, mar. 2008.

BARCIA, M. T. et al. Vinification by-products and their phenolic compounds. **American Journal of Food Science and Technology**, v. 3, n. 4A, p. 18–23, 2015a.

- BARCIA, M. T. et al. Effect of drying methods on the phenolic content and antioxidant capacity of Brazilian winemaking byproducts and their stability over storage. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 66, n. 8, 17 nov. 2015b.
- BECKER, K. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. In: **Staphylococcus aureus**. [s.l.] Elsevier, 2018.
- BENGOECHEA, J. A.; SA PESSOA, J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, n. 2, 1 mar. 2019.
- BERES, C. et al. Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. **Waste Management**, v. 68, out. 2017.
- BONGOMIN, F. et al. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, 18 out. 2017.
- BORMAN, A. M.; SZEKELY, A.; JOHNSON, E. M. Comparative Pathogenicity of United Kingdom Isolates of the Emerging Pathogen *Candida auris* and Other Key Pathogenic *Candida* Species. **mSphere**, v. 1, n. 4, 31 ago. 2016.
- BORRIS, R. P. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, n. 1–3, abr. 1996.
- BOUARAB-CHIBANE, L. et al. Antibacterial Properties of Polyphenols: Characterization and QSAR (Quantitative Structure–Activity Relationship) Models. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 18 abr. 2019.
- BREGER, J. et al. Antifungal Chemical Compounds Identified Using a *C. elegans* Pathogenicity Assay. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 2, 2 fev. 2007.
- BROWN, E. D.; WRIGHT, G. D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. **Nature**, v. 529, n. 7586, 20 jan. 2016.
- BROWN, G. D. et al. Hidden Killers: Human Fungal Infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, 19 dez. 2012.
- BROWN, M. M.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus epidermidis*—Skin friend or foe? **PLOS Pathogens**, v. 16, n. 11, 12 nov. 2020.
- BURMØLLE, M. et al. Biofilms in chronic infections – a matter of opportunity – monospecies biofilms in multispecies infections. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 59, n. 3, ago. 2010.

- CALVO, B. et al. First report of *Candida auris* in America: Clinical and microbiological aspects of 18 episodes of candidemia. **Journal of Infection**, v. 73, n. 4, out. 2016.
- CAROLUS, H.; VAN DYCK, K.; VAN DIJCK, P. *Candida albicans* and *Staphylococcus* Species: A Threatening Twosome. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 18 set. 2019.
- CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States. **Available from: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>**, 2013.
- CHAIBENJAWONG, P.; FOSTER, S. J. Desiccation tolerance in *Staphylococcus aureus*. **Archives of Microbiology**, v. 193, n. 2, 19 fev. 2011.
- CHEESMAN, M. et al. Developing new antimicrobial therapies: Are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution? **Pharmacognosy Reviews**, v. 11, n. 22, 2017.
- CHEN, H. et al. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. **Virulence**, v. 11, n. 1, 1 jan. 2020.
- CHEN, L. et al. *Notes from the Field*: Pan-Resistant New Delhi Metallo-Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* — Washoe County, Nevada, 2016. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 66, n. 1, 13 jan. 2017.
- CHOBY, J. E.; HOWARD-ANDERSON, J.; WEISS, D. S. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* – clinical and molecular perspectives. **Journal of Internal Medicine**, v. 287, n. 3, 21 mar. 2020.
- CHOWDHARY, A. et al. Multidrug-Resistant *Candida auris* Infections in Critically Ill Coronavirus Disease Patients, India, April–July 2020. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 11, nov. 2020.
- CHUA, S. L. et al. Dispersed cells represent a distinct stage in the transition from bacterial biofilm to planktonic lifestyles. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, 17 dez. 2014.
- CIOFU, O.; TOLKER-NIELSEN, T. Tolerance and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial Agents—How *P. aeruginosa* Can Escape Antibiotics. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 3 maio 2019.
- CIUREA, C. N. et al. *Candida* and Candidiasis—Opportunism Versus Pathogenicity: A Review of the Virulence Traits. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, 6 jun. 2020.

- COLEMAN, J. J. et al. Activity of caffeic acid phenethyl ester in *Caenorhabditis elegans*. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 17, nov. 2016.
- COOPER, M. A.; SHLAES, D. Fix the antibiotics pipeline. **Nature**, v. 472, n. 7341, 6 abr. 2011.
- CORTEGIANI, A. et al. Epidemiology, clinical characteristics, resistance, and treatment of infections by *Candida auris*. **Journal of Intensive Care**, v. 6, n. 1, 29 dez. 2018.
- COSTERTON, J. Overview of microbial biofilms. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 15, n. 3, set. 1995.
- COSTERTON, J. W.; GEESEY, G. G.; CHENG, K.-J. How Bacteria Stick. **Scientific American**, v. 238, n. 1, jan. 1978.
- COUGHLAN, L. M. et al. New Weapons to Fight Old Enemies: Novel Strategies for the (Bio)control of Bacterial Biofilms in the Food Industry. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 18 out. 2016.
- COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, out. 1999.
- CRUZ, A. P. G. **RECUPERAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS A PARTIR DE RESÍDUOS DA INDÚSTRIA VITIVINÍCOLA**. Rio de Janeiro: [s.n.].
- CUTULI, M. A. et al. *Galleria mellonella* as a consolidated in vivo model hosts: New developments in antibacterial strategies and novel drug testing. **Virulence**, v. 10, n. 1, 1 jan. 2019.
- DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, abr. 2012.
- DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 2, fev. 2003.
- DE ALMEIDA, J. N. et al. Emergence of *Candida auris* in Brazil in a COVID-19 Intensive Care Unit. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 3, 17 mar. 2021.
- DE CARVALHO, C. C. C. R. Marine Biofilms: A Successful Microbial Strategy With Economic Implications. **Frontiers in Marine Science**, v. 5, 11 abr. 2018.
- DESBOIS, A. P.; COOTE, P. J. Utility of Greater Wax Moth Larva (*Galleria mellonella*) for Evaluating the Toxicity and Efficacy of New Antimicrobial Agents. In: [s.l: s.n.].

- DÍAZ-NUÑEZ, J. L.; GARCÍA-CONTRERAS, R.; CASTILLO-JUÁREZ, I. The New Antibacterial Properties of the Plants: Quo vadis Studies of Anti-virulence Phytochemicals? **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 7 maio 2021.
- DICKEY, S. W.; CHEUNG, G. Y. C.; OTTO, M. Different drugs for bad bugs: antivirulence strategies in the age of antibiotic resistance. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 7, 24 jul. 2017.
- DIEKEMA, D. J. et al. Survey of Infections Due to *Staphylococcus* Species: Frequency of Occurrence and Antimicrobial Susceptibility of Isolates Collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. s2, 15 maio 2001.
- DONELLI, G.; VUOTTO, C. Biofilm-based infections in long-term care facilities. **Future Microbiology**, v. 9, n. 2, fev. 2014.
- DONLAN, R. Biofilms and Device-Associated Infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, abr. 2001a.
- DONLAN, R. M. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 8, 15 out. 2001b.
- DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, set. 2002.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, abr. 2002.
- DU, X. et al. *Staphylococcus epidermidis* clones express *Staphylococcus aureus*-type wall teichoic acid to shift from a commensal to pathogen lifestyle. **Nature Microbiology**, v. 6, n. 6, 24 jun. 2021.
- DUBEY, A. K.; SINGLA, R. K. Perspectives on Anti-Candida Drug Development. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 26, 10 dez. 2019.
- DUFOUR, D.; LEUNG, V.; LÉVESQUE, C. M. Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. **Endodontic Topics**, v. 22, n. 1, mar. 2010.
- DURDU, B. et al. Mortality markers in nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, 28 dez. 2016.

- EFENBERGER-SZMECHTYK, M.; NOWAK, A.; CZYZOWSKA, A. Plant extracts rich in polyphenols: antibacterial agents and natural preservatives for meat and meat products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 1, 2 jan. 2021.
- ELIAS, S.; BANIN, E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 5, set. 2012.
- EVENSEN, N. A.; BRAUN, P. C. The effects of tea polyphenols on *Candida albicans*: inhibition of biofilm formation and proteasome inactivation. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 9, set. 2009.
- EWBANK, J. J.; ZUGASTI, O. C. *elegans*: model host and tool for antimicrobial drug discovery. **Disease Models & Mechanisms**, v. 4, n. 3, 1 maio 2011.
- FILKINS, L. M. et al. Coculture of *Staphylococcus aureus* with *Pseudomonas aeruginosa* Drives *S. aureus* towards Fermentative Metabolism and Reduced Viability in a Cystic Fibrosis Model. **Journal of Bacteriology**, v. 197, n. 14, 15 jul. 2015.
- FISHER, M. C. et al. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**, v. 360, n. 6390, 18 maio 2018.
- FISHER, R. A.; GOLLAN, B.; HELAINE, S. Persistent bacterial infections and persister cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 8, 22 ago. 2017.
- FLEMMING, H.-C. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, 11 set. 2016.
- FLEMMING, H.-C.; WUERTZ, S. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, 13 abr. 2019.
- FUCHS, B. B. et al. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. **Virulence**, v. 1, n. 6, 27 nov. 2010.
- FURIGA, A. et al. *In vitro* anti-bacterial and anti-adherence effects of natural polyphenolic compounds on oral bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 5, nov. 2008.
- FURIGA, A.; ROQUES, C.; BADET, C. Preventive effects of an original combination of grape seed polyphenols with amine fluoride on dental biofilm formation and oxidative damage by oral bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 4, abr. 2014.
- FURLANETO, M. C. et al. How much do we know about hemolytic capability of pathogenic *Candida* species? **Folia Microbiologica**, v. 63, n. 4, 15 jul. 2018.

- FUX, C. A. et al. Survival strategies of infectious biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 1, jan. 2005.
- GALIÉ, S. et al. Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 7 maio 2018.
- GARCÍA-LOMILLO, J. et al. Antioxidant and Antimicrobial Properties of Wine Byproducts and Their Potential Uses in the Food Industry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 52, 31 dez. 2014.
- GAUWERKY, K.; BORELLI, C.; KORTING, H. C. Targeting virulence: A new paradigm for antifungals. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 3–4, fev. 2009.
- GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathogens and Disease**, v. 67, n. 3, abr. 2013.
- GIAOURIS, E. et al. Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 20 ago. 2015.
- GOLDRICK, B. First Reported Case of VRSA in the United States. **AJN, American Journal of Nursing**, v. 102, n. 11, nov. 2002.
- GÓMEZ-MEJÍA, E. et al. Valorisation of black mulberry and grape seeds: Chemical characterization and bioactive potential. **Food Chemistry**, v. 337, fev. 2021.
- GONÇALVES, L. A.; LORENZO, J. M.; TRINDADE, M. A. Fruit and Agro-Industrial Waste Extracts as Potential Antimicrobials in Meat Products: A Brief Review. **Foods**, v. 10, n. 7, 25 jun. 2021.
- GORDON, R. J.; LOWY, F. D. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. S5, jun. 2008.
- GÓRNIAK, I.; BARTOSZEWSKI, R.; KRÓLICZEWSKI, J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 18, n. 1, 6 fev. 2019.
- GUZMÁN-SOTO, I. et al. Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in in vitro and in vivo biofilm models. **iScience**, v. 24, n. 5, maio 2021.
- HALL, C. W.; MAH, T.-F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, 1 maio 2017.
- HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, fev. 2004.

- HANNIG, C. et al. Polyphenolic beverages reduce initial bacterial adherence to enamel in situ. **Journal of Dentistry**, v. 37, n. 7, jul. 2009.
- HASSAN, Y. I. et al. Grape Pomace as a Promising Antimicrobial Alternative in Feed: A Critical Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 35, 4 set. 2019.
- HAY, S. I. et al. Measuring and mapping the global burden of antimicrobial resistance. **BMC Medicine**, v. 16, n. 1, 4 dez. 2018.
- HIRAMATSU, K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, n. 1, 1 jul. 1997.
- HIRAMATSU, K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 3, out. 2001.
- HOFER, U. *Candida auris*' potential link to climate change. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 10, 6 out. 2019.
- HOTTERBEEKX, A. et al. In vivo and In vitro Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* spp. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, 3 abr. 2017.
- HU, Y. et al. A Potential High-Risk Clone of *Pseudomonas aeruginosa* ST463. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 28 maio 2021.
- HUBE, B.; NAGLIK, J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**, v. 147, n. 8, 1 ago. 2001.
- JACKSON, B. R. et al. On the Origins of a Species: What Might Explain the Rise of *Candida auris*? **Journal of Fungi**, v. 5, n. 3, 6 jul. 2019.
- JACKSON, R. S. **Wine science: principles and applications**. Third edition ed. USA: Elsevier, 2008.
- JAIN, A. et al. Biofilms—A Microbial Life Perspective: A Critical Review. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 24, n. 5, 2007.
- Jl, H.; LI, X.; ZHANG, H. Natural products and drug discovery. **EMBO reports**, v. 10, n. 3, 20 mar. 2009.
- JUNQUEIRA, J. C.; MYLONAKIS, E.; BORGHI, E. *Galleria mellonella* experimental model: advances and future directions. **Pathogens and Disease**, v. 79, n. 5, 22 abr. 2021.
- KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 5, 21 maio 2006.

- KARYGIANNI, L. et al. Natural Antimicrobials and Oral Microorganisms: A Systematic Review on Herbal Interventions for the Eradication of Multispecies Oral Biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 14 jan. 2016.
- KEAN, R. et al. *Candida auris*: A Decade of Understanding of an Enigmatic Pathogenic Yeast. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, 26 fev. 2020.
- KHAMENEH, B. et al. Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 8, n. 1, 16 dez. 2019.
- KHARE, T. et al. Exploring Phytochemicals for Combating Antibiotic Resistance in Microbial Pathogens. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 21 jul. 2021.
- KIM, D. H. A Conserved p38 MAP Kinase Pathway in *Caenorhabditis elegans* Innate Immunity. **Science**, v. 297, n. 5581, 26 jul. 2002.
- KIM, M. et al. *Candida haemulonii* and Closely Related Species at 5 University Hospitals in Korea: Identification, Antifungal Susceptibility, and Clinical Features. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 6, 15 mar. 2009.
- KIM, W. et al. An update on the use of *C. elegans* for preclinical drug discovery: screening and identifying anti-infective drugs. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 12, n. 6, 3 jun. 2017.
- KIMKES, T. E. P.; HEINEMANN, M. How bacteria recognise and respond to surface contact. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 44, n. 1, 1 jan. 2020.
- KOO, H. et al. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 12, 25 dez. 2017.
- KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 3, jul. 2011.
- KRUPPA, M. Quorum sensing and *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 52, n. 1, jan. 2009.
- KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, M. C. Invasive Candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 15, 8 out. 2015.
- KUSCH, S. et al. Value-Added Utilization of Agro-Industrial Residues. In: **Advances in Food Biotechnology**. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2015.
- LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, 12 set. 2001.

- LARKIN, E. et al. The Emerging Pathogen *Candida auris*: Growth Phenotype, Virulence Factors, Activity of Antifungals, and Effect of SCY-078, a Novel Glucan Synthesis Inhibitor, on Growth Morphology and Biofilm Formation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 5, 21 maio 2017.
- LAVERTY, G.; GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. Biomolecular mechanisms of staphylococcal biofilm formation. **Future Microbiology**, v. 8, n. 4, abr. 2013.
- LEBEAUX, D.; GHIGO, J.-M.; BELOIN, C. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 3, set. 2014.
- LEE, A. S. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, 7 jun. 2018.
- LEE, J.-H. et al. Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. **Biofouling**, v. 29, n. 5, maio 2013.
- LEE, W. G. et al. First Three Reported Cases of Nosocomial Fungemia Caused by *Candida auris*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 9, set. 2011.
- LEUNG, M. C. K. et al. *Caenorhabditis elegans*: An Emerging Model in Biomedical and Environmental Toxicology. **Toxicological Sciences**, v. 106, n. 1, nov. 2008.
- LEWIS, K. Riddle of Biofilm Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, abr. 2001.
- LEWIS, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 1, 4 jan. 2007.
- LEWIS, K. Multidrug Tolerance of Biofilms and Persister Cells. In: [s.l: s.n.].
- LI, J. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Exoprotein-Induced Barrier Disruption Correlates With Elastase Activity and Marks Chronic Rhinosinusitis Severity. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, 27 fev. 2019.
- LISTER, J. L.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, 23 dez. 2014.
- LOCKHART, S. R. et al. Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 2, 15 jan. 2017.

- LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* Infections. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, 20 ago. 1998.
- LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 9, 1 maio 2003.
- LUO, Y. et al. Targeting *Candida albicans* in dual-species biofilms with antifungal treatment reduces *Staphylococcus aureus* and MRSA in vitro. **PLOS ONE**, v. 16, n. 4, 8 abr. 2021.
- M CAMPOS, J. C. DE; ANTUNES, L. C.; FERREIRA, R. B. Global priority pathogens: virulence, antimicrobial resistance and prospective treatment options. **Future Microbiology**, v. 15, n. 8, maio 2020.
- MAH, T.-F. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, jan. 2001.
- MAPA. **Desempenho da vitivinicultura brasileira em 2015. Retirado de:** <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/9952204/artigo-desempenho-da-vitivinicultura-brasileira-em-2015>> Acesso em: 18 ago 2021.
- MARINA, G. C. et al. Phytochemical importance and utilization potential of grape residue from wine production. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 5, 1 fev. 2017.
- MARTINS, I. M. **Biotransformação enzimática de resíduos de vinificação de uvas tinta e branca e seus efeitos antioxidante e anti-inflamatório in vitro**. Campinas: [s.n.].
- MATTOS, G. N. et al. Grape by-product extracts against microbial proliferation and lipid oxidation: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 4, mar. 2017.
- MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, 15 fev. 2013.
- MBA, I. E.; NWEZE, E. I. Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, n. 10, 6 out. 2020.
- MCCARTY, T. P.; PAPPAS, P. G. Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, mar. 2016.
- MICHAEL, C. A.; DOMINEY-HOWES, D.; LABBATE, M. The Antimicrobial Resistance Crisis: Causes, Consequences, and Management. **Frontiers in Public Health**, v. 2, 16 set. 2014.
- MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum Sensing in Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, n. 1, out. 2001.

- MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, out. 2011.
- MISHRA, R. et al. Natural Anti-biofilm Agents: Strategies to Control Biofilm-Forming Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 29 out. 2020.
- MORA, C. et al. How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? **PLoS Biology**, v. 9, n. 8, 23 ago. 2011.
- MORALES-LÓPEZ, S. et al. Enterobacteria in the 21st century: a review focused on taxonomic changes. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 13, n. 04, 30 abr. 2019.
- NICKERSON, K. W.; ATKIN, A. L.; HORNBY, J. M. Quorum Sensing in Dimorphic Fungi: Farnesol and Beyond. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, jun. 2006.
- NIH. **Research on microbial biofilms (PA-03-047)**.
- NOBILE, C. J.; JOHNSON, A. D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, n. 1, 15 out. 2015.
- ODDS, F. C. *Candida* Infections: An Overview. **CRC Critical Reviews in Microbiology**, v. 15, n. 1, 2 jan. 1987.
- OLIVARES, E. et al. Clinical Impact of Antibiotics for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 9 jan. 2020.
- O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm Formation as Microbial Development. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, n. 1, out. 2000.
- OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* — the “accidental” pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 8, ago. 2009.
- OTTO, M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 2, 19 mar. 2012.
- OTTO, M. Staphylococcal Infections: Mechanisms of Biofilm Maturation and Detachment as Critical Determinants of Pathogenicity. **Annual Review of Medicine**, v. 64, n. 1, 14 jan. 2013.
- OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* Pathogenesis. In: [s.l: s.n.].
- OZPINAR, H.; OZPINAR, N.; KARAKUS, S. The effects of erzincan grape (*Vitis vinifera* spp., Cimin) and benzothiazol on a *Caenorhabditis elegans* organism model. **Pharmacognosy Magazine**, v. 13, n. 50, 2017.

- PACIOS, O. et al. Strategies to Combat Multidrug-Resistant and Persistent Infectious Diseases. **Antibiotics**, v. 9, n. 2, 6 fev. 2020.
- PACZOSA, M. K.; MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, set. 2016.
- PAERL, H. W.; PINCKNEY, J. L. A mini-review of microbial consortia: Their roles in aquatic production and biogeochemical cycling. **Microbial Ecology**, v. 31, n. 3, 1996.
- PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 34, n. 9, 6 ago. 2007.
- PAMP, S. J.; TOLKER-NIELSEN, T. Multiple Roles of Biosurfactants in Structural Biofilm Development by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 6, 15 mar. 2007.
- PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 5, 2009.
- PANG, Z. et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 1, jan. 2019.
- PANTOSTI, A.; VENDITTI, M. What is MRSA? **European Respiratory Journal**, v. 34, n. 5, 1 nov. 2009.
- PAPPAS, P. G. et al. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, 7 jun. 2018.
- PARTHASARATHY, A. et al. Amino acid-derived defense metabolites from plants: A potential source to facilitate novel antimicrobial development. **Journal of Biological Chemistry**, v. 296, jan. 2021.
- PATHIRANA, R. U. et al. Filamentous Non-albicans *Candida* Species Adhere to *Candida albicans* and Benefit From Dual Biofilm Growth. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 31 maio 2019.
- PERAMAN, R. et al. Insights on recent approaches in drug discovery strategies and untapped drug targets against drug resistance. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 1, 3 dez. 2021.
- PEW CHARITABLE TRUSTS. Tracking the global pipeline of antibiotics in development, March 2021. 2021.

- PIERCE, C. G. et al. Antifungal therapy with an emphasis on biofilms. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, n. 5, out. 2013.
- PRASAD, R.; SHAH, A. H.; RAWAL, M. K. Antifungals: Mechanism of Action and Drug Resistance. In: [s.l.: s.n.].
- QURESHI, N. Beneficial biofilms: wastewater and other industrial applications * *Mention of trade names of commercial products in this article is solely for the purpose of providing scientific information and does not imply recommendation or endorsement by the United States Department of Agriculture. In: **Biofilms in the Food and Beverage Industries**. [s.l.] Elsevier, 2009.
- RAMADAN, E. M. et al. Antibacterial, antibiofilm and antitumor activities of grape and mulberry leaves ethanolic extracts towards bacterial clinical strains. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 62, n. 2, dez. 2017.
- RAMAGE, G. et al. Inhibition of *Candida albicans* Biofilm Formation by Farnesol, a Quorum-Sensing Molecule. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 11, nov. 2002.
- RASKO, D. A.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 2, 18 fev. 2010.
- RICHARDSON, J.; HO, J.; NAGLIK, J. Candida–Epithelial Interactions. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 1, 8 fev. 2018.
- RODE, T. M. et al. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, n. 3, maio 2007.
- ROGERS, K. L.; FEY, P. D.; RUPP, M. E. Coagulase-Negative Staphylococcal Infections. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 23, n. 1, mar. 2009.
- ROSSI, F. et al. Transferable Vancomycin Resistance in a Community-Associated MRSA Lineage. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 16, 17 abr. 2014.
- RUMBAUGH, K. P.; SAUER, K. Biofilm dispersion. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 10, 12 out. 2020.
- RUSSO, T. A.; MARR, C. M. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 3, 19 jun. 2019.

- SABATÉ BRESCÓ, M. et al. Pathogenic Mechanisms and Host Interactions in Staphylococcus epidermidis Device-Related Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2 ago. 2017.
- SANHUEZA, L. et al. Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. **PLOS ONE**, v. 12, n. 2, 24 fev. 2017.
- SATOH, K. et al. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. **Microbiology and Immunology**, v. 53, n. 1, jan. 2009.
- SCHILLING, A.; NEUNER, E.; REHM, S. J. Vancomycin: A 50-something-yearold antibiotic we still don't understand. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 78, n. 7, jul. 2011.
- SENGUPTA, S.; CHATTOPADHYAY, M. K.; GROSSART, H.-P. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, 2013.
- SHARIATI, A. et al. Global prevalence and distribution of vancomycin resistant, vancomycin intermediate and heterogeneously vancomycin intermediate Staphylococcus aureus clinical isolates: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 29 dez. 2020.
- SHARMA, D.; MISBA, L.; KHAN, A. U. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 8, n. 1, 16 dez. 2019.
- SHARMA, M.; CHAKRABARTI, A. On the Origin of Candida auris: Ancestor, Environmental Stresses, and Antiseptics. **mBio**, v. 11, n. 6, 22 dez. 2020.
- SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 9, set. 2009.
- SHIRAHIGUE, L. D.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Agro-industrial wastes as sources of bioactive compounds for food and fermentation industries. **Ciência Rural**, v. 50, n. 4, 2020.
- SHRESTHA, J.; ZAHRA, F.; JR CANNADY, P. Antimicrobial stewardship. **StatPearls**, 28 maio 2021.
- SILVA, A. et al. Valorization of Winemaking By-Products as a Novel Source of Antibacterial Properties: New Strategies to Fight Antibiotic Resistance. **Molecules**, v. 26, n. 8, 16 abr. 2021.
- SILVA, L. N. et al. Plant Natural Products Targeting Bacterial Virulence Factors. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 16, 24 ago. 2016.

- SILVER, L. L. Challenges of Antibacterial Discovery. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, jan. 2011.
- SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, maio 2010.
- SINGH, S. et al. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. **The Open Microbiology Journal**, v. 11, n. 1, 28 abr. 2017.
- SLOBODNÍKOVÁ, L. et al. Antibiofilm Activity of Plant Polyphenols. **Molecules**, v. 21, n. 12, 13 dez. 2016.
- SPAGNOLO, A. M.; SARTINI, M.; CRISTINA, M. L. Pseudomonas aeruginosa in the healthcare facility setting. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 32, n. 3, jul. 2021.
- SPIVAK, E. S.; HANSON, K. E. Candida auris: an Emerging Fungal Pathogen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 2, 22 nov. 2017.
- SRINIVASAN, R. et al. Bacterial Biofilm Inhibition: A Focused Review on Recent Therapeutic Strategies for Combating the Biofilm Mediated Infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 12 maio 2021.
- SRIVASTAVA, V.; SINGLA, R. K.; DUBEY, A. K. Emerging Virulence, Drug Resistance and Future Anti-fungal Drugs for Candida Pathogens. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 9, 31 jul. 2018.
- STEELE, E. J. et al. Origin of new emergent Coronavirus and Candida fungal diseases—Terrestrial or cosmic? In: [s.l: s.n.].
- STRATHDEE, S. A.; DAVIES, S. C.; MARCELIN, J. R. Confronting antimicrobial resistance beyond the COVID-19 pandemic and the 2020 US election. **The Lancet**, v. 396, n. 10257, out. 2020.
- SU, P.-T. et al. Bacterial Colony from Two-Dimensional Division to Three-Dimensional Development. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 14 nov. 2012.
- TANG, S. Y.; HALLIWELL, B. Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and Caenorhabditis elegans studies? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 394, n. 1, mar. 2010.
- TEIXEIRA, A. et al. Natural Bioactive Compounds from Winery By-Products as Health Promoters: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 9, 4 set. 2014.

- THEURETZBACHER, U. et al. The global preclinical antibacterial pipeline. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 5, 19 maio 2020.
- THI, M. T. T.; WIBOWO, D.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, 17 nov. 2020.
- THIMOTHE, J. et al. Chemical Characterization of Red Wine Grape (*Vitis vinifera* and *Vitis* Interspecific Hybrids) and Pomace Phenolic Extracts and Their Biological Activity against *Streptococcus mutans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 25, dez. 2007.
- TIAN, L.; ZHANG, Z.; SUN, Z. Antimicrobial resistance trends in bloodstream infections at a large teaching hospital in China: a 20-year surveillance study (1998-2017). **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 8, n. 1, 28 dez. 2019.
- TOMÁS-BARBERÁN, F. A. et al. Ellagic Acid Metabolism by Human Gut Microbiota: Consistent Observation of Three Urolithin Phenotypes in Intervention Trials, Independent of Food Source, Age, and Health Status. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 28, 16 jul. 2014.
- TOTSIKA, M. Benefits and Challenges of Antivirulence Antimicrobials at the Dawn of the Post-Antibiotic Era. **Drug Delivery Letters**, v. 6, n. 1, 18 out. 2016.
- TRENTIN, D. DA S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, set. 2011.
- TRENTIN, D. DA S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. **Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate**. 22. ed. Novo Hamburgo: Revista Liberato, 2013. v. 14
- TSAI, C. J.-Y.; LOH, J. M. S.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, 2 abr. 2016.
- TSUI, C.; KONG, E. F.; JABRA-RIZK, M. A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 4, jun. 2016.
- VALLABHANENI, S. et al. Investigation of the First Seven Reported Cases of *Candida auris*, a Globally Emerging Invasive, Multidrug-Resistant Fungus-United States, May 2013-August 2016. **American Journal of Transplantation**, v. 17, n. 1, jan. 2017.

- VAN SCHALKWYK, E. et al. Epidemiologic Shift in Candidemia Driven by *Candida auris* , South Africa, 2016–20171. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 9, set. 2019.
- VEDIYAPPAN, G.; ROSSIGNOL, T.; D'ENFERT, C. Interaction of *Candida albicans* Biofilms with Antifungals: Transcriptional Response and Binding of Antifungals to Beta-Glucans. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 5, maio 2010.
- VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **Pharm Ther**, v. 40, p. 277–283, 2015.
- VINCENT, J.-L. International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. **JAMA**, v. 302, n. 21, 2 dez. 2009.
- WANG, G. et al. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 17, 28 ago. 2020.
- WATTERS, C. et al. Host Responses to Biofilm. In: [s.l: s.n.].
- WEBER, D. J.; ANDERSON, D.; RUTALA, W. A. The role of the surface environment in healthcare-associated infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 26, n. 4, ago. 2013.
- WHITELEY, M. et al. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Nature**, v. 413, n. 6858, out. 2001.
- WHO. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. **Available from: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>**. Geneva: World Health Organization, 2014.
- WHO. Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. Geneva: World Health Organization, 2017.
- WHO. No time to wait: securing the future from drug-resistant infections. Geneva: World Health Organization, p. 1–28, abr. 2019.
- WHO. 2020 Antibacterial agents in clinical and preclinical development: an overview and analysis. Geneva: World Health Organization, p. 1-76, 2021.
- WILLIAMSON, K. S. et al. Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Includes Expression of Ribosome Hibernation Factors in the Antibiotic-Tolerant Subpopulation and

- Hypoxia-Induced Stress Response in the Metabolically Active Population. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 8, 15 abr. 2012.
- WILSON, J. W. Mechanisms of bacterial pathogenicity. **Postgraduate Medical Journal**, v. 78, n. 918, 1 abr. 2002.
- WYRES, K. L.; LAM, M. M. C.; HOLT, K. E. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 6, 13 jun. 2020.
- XU, C. et al. Antioxidant, Antibacterial, and Antibiofilm Properties of Polyphenols from Muscadine Grape (*Vitis rotundifolia* Michx.) Pomace against Selected Foodborne Pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 28, 16 jul. 2014.
- XU, Y. et al. Phenolic compounds, antioxidant, and antibacterial properties of pomace extracts from four Virginia-grown grape varieties. **Food Science & Nutrition**, v. 4, n. 1, 7 jan. 2016.
- YIN, W. et al. Biofilms: The Microbial “Protective Clothing” in Extreme Environments. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 14, 12 jul. 2019.
- YONG, Y. Y.; DYKES, G. A.; CHOO, W. S. Biofilm formation by staphylococci in health-related environments and recent reports on their control using natural compounds. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 45, n. 2, 4 mar. 2019.
- YUE, H. et al. Filamentation in *Candida auris*, an emerging fungal pathogen of humans: passage through the mammalian body induces a heritable phenotypic switch. **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2018.

7. CURRÍCULO LATTES



Fernanda Cristina Possamai Rossatto

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2471611822509831>

ID Lattes: **2471611822509831**

Última atualização do currículo em 11/10/2021

Formada no curso técnico em Enologia pelo Centro Federal de Educação Tecnológica de Bento Gonçalves (2007). Bacharel em Biomedicina pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (2012), sendo bolsista de iniciação científica no laboratório de Microbiologia da UFCSPA. Habilitada em Análises Clínicas, Microbiologia de Alimentos e Microbiologia. Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (2015). Especialista em Microbiologia de Alimentos pela Universidade Feevale (2017). Atualmente é técnica em Alimentos e Laticínios e doutoranda em Biociências pela UFCSPA, com período sanduíche (12 meses) no departamento de Doenças Infecciosas no Rhode Island Hospital, Brown University, Estados Unidos. Tem experiência na área de Microbiologia, com ênfase na busca de compostos bioativos com atividades antimicrobianas e antibiofilme. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	Fernanda Cristina Possamai Rossatto
Nome em citações bibliográficas	ROSSATTO, F. C. P.;ROSSATTO, FERNANDA CRISTINA POSSAMAI;ROSSATTO, FERNANDA C.P.;POSSAMAI ROSSATTO, FERNANDA CRISTINA
Lattes iD	http://lattes.cnpq.br/2471611822509831

Endereço

Endereço Profissional	Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Rua Sarmento Leite, 245 Centro 90050-170 - Porto Alegre, RS - Brasil Telefone: (51) 33039000 Fax: (51) 33038810 URL da Homepage: http://www.ufcspa.edu.br/
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2017	Doutorado em andamento em BIOCÊNCIAS (Conceito CAPES 4). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil. com período sanduíche em Brown University (Orientador: Eleftherios Mylonakis). Orientador: Karine Zimmer Rigon. Coorientador: Pedro Alves d'Azevedo.
2013 - 2015	Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (Conceito CAPES 5). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil. Título: Avaliação da formação de biofilme por Staphylococcus sp. isolados de amostras clínicas e de alimentos sob diferentes condições de crescimento e análise da diversidade genética de estafilococos coagulase-negativos isolados de alimentos, Ano de Obtenção: 2015. Orientador: Ana Paula Guedes Frazzon.
2015 - 2017	Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil. Especialização em Microbiologia de Alimentos. (Carga Horária: 384h). Universidade Feevale, FEEVALE, Brasil. Título: Detecção de adenovírus em amostras ambientais de água e de alimentos oriundas de regiões de suinocultura intensiva do Vale do Taquari, Rio Grande do Sul. Orientador: Larissa Schemes Heinzelmann.

2013 interrompida	Graduação interrompida em 2015 em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil. Ano de interrupção: 2015
2009 - 2012	Graduação em Biomedicina. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSA, Brasil. Título: Avaliação da resistência a glicopeptídeos em amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> metilina-resistente (MRSA) isoladas em hospitais e unidades ambulatoriais da região metropolitana de Porto Alegre, RS, Brasil.. Orientador: Pedro Alves d'Azevedo.
2005 - 2007	Curso técnico/profissionalizante. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.

Formação Complementar

2021 - 2021	Extensão universitária em Didática. (Carga horária: 60h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.
2021 - 2021	Extensão universitária em Gastronomia: eventos. (Carga horária: 25h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.
2021 - 2021	Extensão universitária em Inglês. (Carga horária: 30h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.
2021 - 2021	Extensão universitária em Coronavírus: conceitos e cuidados. (Carga horária: 30h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.
2021 - 2021	Extensão universitária em Gerenciamento de resíduos. (Carga horária: 60h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.
2021 - 2021	Extensão universitária em Enoturismo e desenvolvimento regional. (Carga horária: 50h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.
2021 - 2021	Extensão universitária em Ética no serviço público. (Carga horária: 40h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.
2021 - 2021	Extensão universitária em Primeiros Socorros para Profissionais de Saúde. (Carga horária: 40h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.
2021 - 2021	Extensão universitária em Bebidas: conceitos e tipos. (Carga horária: 30h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.
2021 - 2021	Extensão universitária em Métodos de pesquisa: conceitos introdutórios. (Carga horária: 30h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.
2021 - 2021	Extensão universitária em Panificação. (Carga horária: 30h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.
2021 - 2021	Extensão universitária em Biologia. (Carga horária: 40h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.
2021 - 2021	Extensão universitária em Personalização do Ensino a partir de Metodologias Ativas. (Carga horária: 30h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.
2021 - 2021	Extensão universitária em Confeitaria. (Carga horária: 20h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.
2021 - 2021	Extensão universitária em Gastronomia: história. (Carga horária: 20h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.
2021 - 2021	Boas práticas de inspeção no gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde. (Carga horária: 6h). Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, Brasil.
2021 - 2021	CURSO IN COMPANY UFCSA - CURSO DE PREPARAÇÃO PARA O VOLUNTARIADO. (Carga horária: 6h). SESC - Administração Regional do Rio Grande do Sul, SESC/RS, Brasil.
2021 - 2021	Formação de facilitadores de aprendizagem. (Carga horária: 40h). Escola Nacional de Administração Pública, ENAP, Brasil.
2020 - 2020	Extensão universitária em Higiene e Controle de Qualidade de Alimentos. (Carga horária: 50h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.
2020 - 2020	Extensão universitária em Alimentação Saudável e Sustentável na Escola. (Carga horária: 30h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.
2020 - 2020	Extensão universitária em Legislação de Alimentos. (Carga horária: 30h). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.
2020 - 2020	Extensão universitária em Boas Práticas de Manipulação de Alimentos no Setor de Serviços Durante a Pa. (Carga horária: 30h).

2020 - 2020	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil. BIOSSEGURANÇA E PESQUISA EM TEMPOS DA COVID-19. (Carga horária: 2h).
2020 - 2020	Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil. Temos que dar aulas remotas... E agora?. (Carga horária: 10h).
2019 - 2019	Escola Nacional de Administração Pública, ENAP, Brasil. Oficina de Boas Práticas para Laboratórios - Turma A. (Carga horária: 90h).
2018 - 2018	Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil. TOEFL Preparation Course. (Carga horária: 90h).
2018 - 2018	International Language Academy of Canada, ILAC, Canadá. I Workshop Sul-Brasileiro de Microbiologia Clínica. (Carga horária: 15h).
2017 - 2018	Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil. Inglês. (Carga horária: 140h).
2017 - 2017	Wizard by Pearson, WIZARD, Brasil. Introdução à Bacteriologia Clínica. (Carga horária: 4h).
2017 - 2017	Gedallab - Laboratório de Microbiologia, GEDALLAB, Brasil. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas. (Carga horária: 15h).
2017 - 2017	Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil. Meios de Cultivo em Bacteriologia Clínica. (Carga horária: 4h).
2017 - 2017	Gedallab - Laboratório de Microbiologia, GEDALLAB, Brasil. Rede Nacional de Certificadores. (Carga horária: 30h).
2016 - 2016	Instituto Nacional de Estudos e Pesquisas Educacionais Anísio Teixeira, INEP/MEC, Brasil. Curso da Rede Nacional de Certificadores. (Carga horária: 30h).
2016 - 2016	Instituto Nacional de Estudos e Pesquisas Educacionais Anísio Teixeira, INEP/MEC, Brasil. PAD - Processo Administrativo Disciplinar. (Carga horária: 40h).
2016 - 2016	Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial - RS, SENAC/RS, Brasil. Brigada de Incêndio. (Carga horária: 20h).
2016 - 2016	Centro de Treinamento Padre Reus, CTPR, Brasil. Língua Portuguesa e Redação Oficial. (Carga horária: 40h).
2012 - 2016	Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial - RS, SENAC/RS, Brasil. Inglês. (Carga horária: 352h).
2011 - 2011	Associação Comunitária de Ensino de Línguas Estrangeiras, ACELE, Brasil. Líquidos Corporais. (Carga horária: 45h).
2011 - 2011	Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil. I Curso de Extensão em Uroanálise da UFCSPA. (Carga horária: 12h).
2009 - 2009	Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil. I Curso Teórico-Prático de Colheita de Sangue. (Carga horária: 12h).
	Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.

Vínculo institucional

2013 - 2013

Outras informações

Vínculo: Estágio Docente, Enquadramento Funcional: Estágio Docente
Estágio docente (bolsista CAPES), ministrou as aulas práticas da disciplina de Microbiologia, no segundo semestre de 2013, para a turma de Ciências Biológicas da UFRGS.

Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

Vínculo institucional

2015 - Atual

Outras informações

Vínculo: Servidor Público, Enquadramento Funcional: Técnico em Alimentos e Laticínios, Carga horária: 40
Técnica no Laboratório Complexo Alimentos (2015-atual). Preparação e acompanhamento das aulas práticas dos cursos de Tecnologia em Alimentos, Nutrição e Gastronomia. Técnica no Laboratório de Microbiologia (2018).

Vínculo institucional

2016 - 2017

Vínculo institucional

2010 - 2012

Vínculo institucional

2010 - 2010

Outras informações

Vínculo institucional

2010 - 2010

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Membro da Brigada de Incêndio

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20

Vínculo: Monitoria, Enquadramento Funcional: Monitora Voluntária, Carga horária: 10
Monitora da disciplina de Citologia para a turma de primeiro ano de Biomedicina.

Vínculo: Monitoria, Enquadramento Funcional: Monitora Voluntária, Carga horária: 10

Outras informações Monitora das disciplinas de Histologia e Embriologia para a turma de primeiro ano de Fisioterapia.

Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, FEPPS, Brasil.

Vínculo institucional

2012 - 2012

Outras informações

Vínculo: Estágio Obrigatório, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 30 Estagiária no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - Instituto de Pesquisas Biológicas/Laboratório Central do Estado (FEPPS/IPB-LACEN). Realiza análise microbiológica de água para consumo humano (análise de coliformes totais, Escherichia coli e bactérias heterotróficas) e amostras alimentícias (análise de Escherichia coli, Salmonella spp., Clostrídios sulfítos redutores, Staphylococcus coagulase-positivo, Bacillus cereus e Listeria monocytogenes).

Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, ISCMPA, Brasil.

Vínculo institucional

2012 - 2012

Outras informações

Vínculo: Estágio Obrigatório, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 30 Estagiária no Laboratório Central da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA). Atuação nos setores de Uroanálise e Parasitologia, Hematologia e Coagulação, Bacteriologia e Micologia, Imunologia e Bioquímica.

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul, IFRS, Brasil.

Vínculo institucional

2008 - 2008

Outras informações

Vínculo: Estágio Obrigatório, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 40 Práticas profissionais na cantina de vinificação e no laboratório de Enologia do CEFET-BG.

Vínculo institucional

2007 - 2007

Outras informações

Vínculo: Estágio Obrigatório, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 40 Práticas Profissionais na Cantina de Vinificação do CEFET-BG.

Projetos de pesquisa

2019 - Atual

Implementação de modelo in vivo de *Caenorhabditis elegans* para avaliação do potencial anti-virulência bacteriana e toxicidade de compostos da classe das dihidropirimidinonas

Descrição: Biofilmes bacterianos são reconhecidamente problemáticos em diferentes áreas, incluindo a indústria e a área clínica, estando presente em aproximadamente 80% de todas as infecções crônicas. Estes microrganismos vivendo na forma sésil são geralmente de difícil controle e tratamento, apresentando uma resistência a terapia antimicrobiana até 1000 vezes maior se comparado as células planctônicas. Sendo assim, a busca por estratégias de controle e tratamento de infecções envolvendo biofilmes é extremamente relevante. Nesse sentido, a terapia anti-virulência surge como uma alternativa atraente e promissora, tendo como alvo os fatores de virulência bacterianos, incluindo o biofilme, ao invés de atuar diretamente no crescimento dos microrganismos. Esta atenuação da virulência, atrelado à manutenção das células microbianas em estado de vida planctônico, torna os microrganismos mais sensíveis ao sistema imunológico do hospedeiro, bem como aos antibióticos. Neste contexto, há grande interesse na obtenção de novas moléculas com potencial atividade antibacteriana e anti-virulência utilizando metodologias sintéticas simples e diretas, que sejam biológica e economicamente viáveis, permitindo uma futura produção em grande escala. Dihidropirimidinonas (DHPMs) são moléculas heterocíclicas que tem se destacado nas últimas décadas por apresentarem amplo espectro de bioatividade, como por exemplo, atividade antiviral, anti-inflamatória, antibacteriana, anti-hipertensiva e até mesmo anticâncer. Adicionalmente, os compostos desta classe podem ser obtidos de forma direta através da Reação Multicomponente de Biginelli. Interessantemente, não há relato na literatura descrevendo atividade antibiofilme de dihidropirimidinonas, sendo esta inédita. Um dos principais obstáculos na identificação de compostos com potencial anti-virulência é a ausência de plataformas in vivo. Enquanto modelos mamíferos têm sido utilizados na busca de novos fármacos, a triagem de vários compostos se torna inviável por motivos éticos e econômicos. Considerando esta limitação, a utilização de um modelo alternativo invertebrado, como do nematódeo *Caenorhabditis elegans*, é apontada como uma ferramenta bastante interessante na descoberta de novos compostos anti-virulência e antimicrobianos. Este organismo tem provado ser um hospedeiro versátil para elucidação de aspectos celulares e moleculares de várias doenças infecciosas, já que muitos dos determinantes de virulência usados pelos patógenos para estabelecer infecção em humanos estão também envolvidos na morte do nematódeo. O aumento na popularidade de *C. elegans* como hospedeiro modelo é atribuído

- ao seu pequeno tamanho, simples anatomia, curto tempo de geração, alta fecundidade, genoma completamente sequenciado e a manutenção do verme no laboratório, a qual é relativamente fácil e não onerosa. Assim, a presente proposta prevê: (i) o desenvolvimento de uma plataforma in vivo para avaliação do potencial anti-virulência de compostos da classe das dihidropirimidinonas, o qual é de extrema necessidade levando em conta a resistência apresentada por bactérias na forma de biofilme à antibioticoterapia e às defesas imunes do hospedeiro, restando muitas vezes, pouquíssimas alternativas ao clínico; (ii) a investigação da interação patógeno-hospedeiro, com ênfase no entendimento de processos infecciosos em *C. elegans*; (iii) a investigação do potencial anti-virulência da classe das dihidropirimidinonas, a qual ainda não apresenta atividade deste tipo relatada na literatura; (iv) construção de uma quimioteca composta por cerca de 50 dihidropirimidinonas, as quais serão testadas in vitro no modelo de *C. elegans* quanto ao potencial anti-virulência/antimicrobiano (v) investigação dos mecanismos de ação dos compostos da classe das dihidropirimidinonas que apresentarem atividade anti-virulência/antimicrobiana...
- Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Doutorado: (1) .
- Integrantes: Fernanda Cristina Possamai Rossatto - Integrante / Karine Rigon Zimmer - Coordenador / Dérik Midon Martins - Integrante / Marla Narciso Godói Biajoli - Integrante / Rafael Andrade Cáceres - Integrante.
- 2016 - Atual**
- Resíduos agroindustriais como fonte de compostos antibiofilme e avaliação em *Caenorhabditis elegans*
- Descrição: Resíduos agroindustriais são abundantes na cadeia produtiva de matérias primas de origem vegetal ou animal. Portanto, representam uma fonte importante de recursos renováveis do planeta. A utilização de resíduos da agroindústria, além de proporcionar o desafio de novos produtos, busca igualmente, minimizar o problema da poluição ambiental. Esses resíduos podem ser reutilizados como matéria-prima para a busca de compostos com atividade biológica devido à sua rica composição em matéria orgânica acessível para aplicação com diferentes fins. No alvo destas pesquisas está o resíduo proveniente do processamento do arroz, soja e uva, os quais são gerados em grandes quantidades no Brasil. Estes se apresentam como matéria-prima interessante para aplicação inovadora, visto que seu potencial de atividade biológica ainda é pouco explorado, como por exemplo, fonte promissora de compostos antibiofilme. Biofilmes, comunidades de micro-organismos encapsuladas em uma matriz composta predominantemente de substância extracelular polimérica (EPS), têm recebido atenção considerável da comunidade científica nos últimos anos em razão da sua ubiquidade em ambientes naturais, clínicos e industriais. Há também grande preocupação com a resistência apresentada pelas bactérias que os constituem a antibióticos e ao sistema de defesa dos hospedeiros infectados. A busca de compostos antibiofilme é de grande valia devido à escassez alarmante de agentes capazes de controlar infecções envolvendo biofilmes. Além disso, há carência de dados na literatura demonstrando que fatores de virulência e mecanismos identificados in vitro têm relevância nos modelos de biofilme in vivo. O presente projeto visa à identificação de compostos antibiofilme a partir do resíduo do processamento de arroz, soja e uva e a avaliação das possíveis vias de ação destes compostos in vivo, utilizando como modelo de estudo o nematódeo *Caenorhabditis elegans*..
- Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Doutorado: (1) .
- Integrantes: Fernanda Cristina Possamai Rossatto - Integrante / Karine Rigon Zimmer - Coordenador.
- 2013 - 2015**
- Avaliação da formação de biofilme por *Staphylococcus* sp. isolados de amostras clínicas e de alimentos sob diferentes condições de crescimento e análise da diversidade genética de estafilococos coagulase-negativos isolados de alimentos
- Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (1) Doutorado: (1) .
- Integrantes: Fernanda Cristina Possamai Rossatto - Integrante / Ana Paula Guedes Frazzon - Coordenador.
- 2010 - 2012**
- Avaliação da resistência a glicopeptídeos em amostras de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA) isoladas em hospitais e unidades ambulatoriais da região metropolitana de Porto Alegre, RS, Brasil.
- Descrição: Devido à disseminação de *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (MRSA) mundialmente, a vancomicina tornou-se o antimicrobiano de escolha para o tratamento destas infecções. Todavia, no início dos anos 2000, relatos de *S. aureus* com reduzida susceptibilidade à vancomicina foram descritos em todo o mundo, e isto indica que a emergência de MRSA com resistência intermediária à vancomicina se tornou um problema mundial. A prevalência destas amostras no Brasil é desconhecida, uma vez que não há estudos sistemáticos dirigidos para detecção de resistência aos glicopeptídeos em

Staphylococcus aureus, apesar da ocorrência desta característica especial de resistência (susceptibilidade reduzida) já ter sido verificada e caracterizada no Brasil. Desta forma, a capacidade de identificar com precisão estes isolados é desafiadora e primordial para o êxito clínico..

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (2) / Doutorado: (2) .

Integrantes: Fernanda Cristina Possamai Rossatto - Integrante / Pedro Alves d'Azevedo - Coordenador / Juliana Caierão - Integrante / Letícia Auler Proença - Integrante.

Áreas de atuação

- | | |
|----|---|
| 1. | Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Microbiologia Clínica. |
| 2. | Grande área: Ciências Biológicas / Área: Microbiologia / Subárea: Microbiologia de Alimentos. |
| 3. | Grande área: Ciências da Saúde / Área: Medicina / Subárea: Análises Clínicas (Patologia Clínica). |

Idiomas

Português	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Inglês	Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
Espanhol	Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.
Italiano	Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.

Prêmios e títulos

2020	Destaque mérito popular V Biosciences Meeting Crossing Borders - apresentação "Investigação dos resíduos do processamento da uva sobre biofilmes bacterianos" da aluna Camila Almeida (co-orientação), UFCSPA.
2019	Destaque de sessão do Congresso UFCSPA: conectando saúde e sociedade. Aluna: Camila Almeida (co-orientação de iniciação científica), UFCSPA.
2011	2º lugar Premio Caio Márcio Figueredo Mendes, Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial.
2010	1º lugar Projeto Siemens Grandes Pesquisadores, Siemens healthCare Diagnostics.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica

- POSSAMAI ROSSATTO, FERNANDA CRISTINA**; THARMALINGAM, NAGENDRAN ; ESCOBAR, ILIANA E. ; D'AZEVEDO, PEDRO ALVES ; ZIMMER, KARINE RIGON ; MYLONAKIS, ELEFTHERIOS . Antifungal Activity of the Phenolic Compounds Ellagic Acid (EA) and Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) against Drug-Resistant Candida auris. JOURNAL OF FUNGI **JCR**, v. 7, p. 763, 2021.
- ESCOBAR, ILIANA E. ; **POSSAMAI ROSSATTO, FERNANDA CRISTINA** ; KIM, SOO MIN ; KANG, MIN HEE ; KIM, WOOSONG ; MYLONAKIS, ELEFTHERIOS . Repurposing Kinase Inhibitor Bay 11-7085 to Combat Staphylococcus aureus and Candida albicans Biofilms. Frontiers in Pharmacology **JCR**, v. 12, p. 1-16, 2021.
- COSTA, GÉSSICA A. ; **ROSSATTO, FERNANDA C.P.** ; MEDEIROS, ALINE W. ; CORREA, ANA PAULA F. ; BRANDELLI, ADRIANO ; FRAZZON, ANA PAULA G. ; MOTTA, AMANDA DE S. DA . Evaluation antibacterial and antibiofilm activity of the antimicrobial peptide P34 against Staphylococcus aureus and Enterococcus faecalis. ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIENCIAS **JCR**, v. 90, p. 73-84, 2018.
Citações: WEB OF SCIENCE™ 10
- ROSSATTO, FERNANDA CRISTINA POSSAMAI**; PINTO, JAQUELINE BECKER ; COSTA, G. A. ; FRAZZON, ANA PAULA GUEDES . In vitro biofilm formation ability of staphylococci under different growth conditions. International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research, v. 5, p. 12-19, 2017.

Citações: SCOPUS 1

5. PINTO, JAQUELINE BECKER ; **ROSSATTO, FERNANDA CRISTINA POSSAMAI** ; MARTINS, PAULA DALCIN ; FRAZZON, ANA PAULA GUEDES . Genetic relationships and virulence factors in *Staphylococcus aureus* isolated from raw poultry in South Brazil. *Annals of Microbiology JCR*, v. 65, p. 1933-1940, 2015.
Citações: WEB OF SCIENCE™ 4 | SCOPUS 3
6. **ROSSATTO, FERNANDA CRISTINA POSSAMAI**; PROENÇA, LETÍCIA AULER ; BECKER, ANA PAULA ; SILVEIRA, ALESSANDRO CONRADO DE OLIVEIRA ; CAIERÃO, JULIANA ; D'AZEVEDO, PEDRO ALVES . EVALUATION OF METHODS IN DETECTING VANCOMYCIN MIC AMONG MRSA ISOLATES AND THE CHANGES IN ACCURACY RELATED TO DIFFERENT MIC VALUES. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (Impresso) JCR*, v. 56, p. 469-472, 2014.
Citações: WEB OF SCIENCE™ 9 | SCOPUS 3
7. BECKER, A. P. ; CANTARELLI, V. V. ; **ROSSATTO, F. C. P.** ; INOUE, F. M. ; DIAS, C. ; DAZEVEDO, P. A. . Non-Multidrug-Resistant, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Causing Infection in Health-care Facilities in Southern Brazil. *JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY & DIAGNOSIS*, v. 3, p. 1000150, 2014.

Resumos publicados em anais de congressos

1. **ROSSATTO, F. C. P.**; D'AZEVEDO, PEDRO ALVES ; MYLONAKIS, E. ; ZIMMER, K. R. . Atividade antimicrobiana de compostos fenólicos contra o fungo *Candida*. In: V Biosciences Meeting ? Crossing Borders, 2020, Online. Anais do V Biosciences Meeting ? Crossing Borders, 2020.
2. SILVA, C. A. E. ; **ROSSATTO, F. C. P.** ; MARTINS, D. M. ; DREHER, M. P. ; UNGER, N. R. ; LIMA, M. M. S. M. ; ZIMMER, A. R. ; D'AZEVEDO, PEDRO ALVES ; ZIMMER, K. R. . Investigação dos resíduos do processamento da uva sobre biofilmes bacterianos. In: V Biosciences Meeting Crossing Borders, 2020, Online. Anais do V Biosciences Meeting Crossing Borders, 2020.
3. DREHER, M. P. ; **ROSSATTO, F. C. P.** ; ZIMMER, A. R. ; DAZEVEDO, P. A. ; ZIMMER, K. R. . Atividade antibiofilme do resíduo do processamento da uva (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*). In: I Congresso Latinoamericano de Biomedicina e Ciências do Laboratório, XIII Congresso Sulbrasileiro de Biomedicina, IV Congresso Catarinense de Biomedicina, 2019, Florianópolis. Anais do I Congresso Latinoamericano de Biomedicina e Ciências do Laboratório, XIII Congresso Sulbrasileiro de Biomedicina, IV Congresso Catarinense de Biomedicina, 2019.
4. GARCIA, V. O. ; ROSA, D. F. ; **ROSSATTO, F. C. P.** ; ZIMMER, K. R. ; GNOATTO, S. C. B. ; SILVEIRA, R. M. B. . Avaliação da atividade antibiofilme de extratos etanólicos de *Amauroderma schomburgkii* frente a *Staphylococcus epidermidis*. In: IX Congresso Brasileiro de Micologia, 2019, Manaus. Anais do IX Congresso Brasileiro de Micologia, 2019.
5. **ROSSATTO, F. C. P.**; MARTINS, D. M. ; DREHER, M. P. ; UNGER, N. R. ; LIMA, M. M. S. M. ; SILVA, C. A. E. ; ZIMMER, A. R. ; DAZEVEDO, P. A. ; ZIMMER, K. R. . Investigation of the effect of grape pomace on bacterial biofilms. In: IV Encontro do Programa de Pós-Graduação em Biociências, 2019, Porto Alegre. Anais do IV Encontro do Programa de Pós-Graduação em Biociências, 2019.
6. **ROSSATTO, F. C. P.**; SANTOS, S. S. ; UNGER, N. R. ; SILVA, C. A. E. ; ZIMMER, K. R. ; GODOI, M. N. . Antibiofilm activity of synthetic indoles derivatives. In: IV Encontro do Programa de Pós-Graduação em Biociências, 2019, Porto Alegre. Anais do IV Encontro do Programa de Pós-Graduação em Biociências, 2019.
7. SILVA, C. A. E. ; **ROSSATTO, F. C. P.** ; MARTINS, D. M. ; DREHER, M. P. ; UNGER, N. R. ; LIMA, M. M. S. M. ; ZIMMER, A. R. ; DAZEVEDO, P. A. ; ZIMMER, K. R. . Investigação do efeito de resíduos do processamento da uva sobre biofilmes bacterianos. In: Congresso UFCSPA: conectando saúde e sociedade, 2019, Porto Alegre. Congresso UFCSPA: conectando saúde e sociedade, 2019.
8. **ROSSATTO, F. C. P.**; ZIMMER, A. R. ; DAZEVEDO, P. A. ; ZIMMER, K. R. . Potencial de resíduos agroindustriais da uva (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*) como fonte de compostos antibiofilme. In: XI Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada, 2018, Porto Alegre. Anais do XI Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada, 2018.
9. **ROSSATTO, F. C. P.**; MARTINS, D. M. ; ZIMMER, A. R. ; DAZEVEDO, P. A. ; ZIMMER, K. R. . Atividade antibiofilme de resíduos agroindustriais da uva (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*) contra micro-organismos de importância médica e industrial. In: III Encontro do PPG Biociências & Encontro de Pesquisa em Biologia Celular, 2018, Porto Alegre. Anais do III Encontro do PPG Biociências & Encontro de Pesquisa em Biologia Celular, 2018.
10. **ROSSATTO, F. C. P.**; ZIMMER, K. R. ; DAZEVEDO, P. A. . Avaliação de Compostos com Atividade Antibiofilme sobre a Modulação Gênica em Isolados Clínicos. In: II Encontro do PPG Biociências da UFCSPA & Encontro de Pesquisa em Fisiologia do RS, 2017, Porto Alegre. Anais do II Encontro do PPG Biociências da UFCSPA & Encontro de Pesquisa em Fisiologia do RS, 2017.
11. BARONIO, M. ; COSTA, G. A. ; **ROSSATTO, F. C. P.** ; MEDEIROS, A. W. ; CORREA, A. P. F. ; BRANDELLI, A. ; FRAZZON, A. P. G. ; MOTTA, A. S. . Avaliação da atividade antibacteriana e antibiofilme do peptídeo antimicrobiano P34 contra *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*. In: XV Congresso Brasileiro de Biomedicina & III Congresso Internacional de Biomedicina, 2016, Bento Gonçalves. Anais do XV Congresso Brasileiro de Biomedicina & III Congresso Internacional de Biomedicina, 2016.
12. **ROSSATTO, F. C. P.**; COSTA, G. A. ; FERNANDES, B. P. ; PINTO, J. B. ; FRAZZON, A. P. G. . Avaliação da formação de biofilme por *Staphylococcus sp.* e diversidade genética de estafilococos coagulase-negativos isolados de alimentos. In: XV Congresso Brasileiro de Biomedicina & III Congresso Internacional de Biomedicina, 2016, Bento Gonçalves. Anais do XV Congresso Brasileiro de Biomedicina & III Congresso Internacional de Biomedicina, 2016.
13. **ROSSATTO, F. C. P.**; DE MOURA, T. M. ; COSTA, G. A. ; PINTO, J. B. ; FRAZZON, A. P. G. . Avaliação da formação de biofilme por *Staphylococcus sp.* e diversidade genética de estafilococos coagulase-negativos isolados de alimentos. In: 11 SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos, 2015, Campinas. Anais do Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos, 2015. v. 2.
14. COSTA, G. A. ; **ROSSATTO, F. C. P.** ; CORREA, A. P. F. ; MOTTA, A. S. . Avaliação do efeito do peptídeo antimicrobiano P34 sobre a formação de biofilmes por bactérias Gram-positivas provenientes de amostras alimentares. In: VII Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada, III Encontro Latino Americano de Microbiologia Aplicada, 2014, Porto Alegre. VII Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada, III Encontro Latino Americano de Microbiologia Aplicada, 2014.

15. **ROSSATTO, F. C. P.**; PINTO, J. B. ; COSTA, G. A. ; CHIOMENTO, G. ; FRAZZON, A. P. G. . Caracterização fenotípica e genotípica de Staphylococcus coagulase positivos e negativos isolados de frango e morcilha no Rio Grande do Sul, Brasil. In: VII Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada, III Encontro Latino Americano de Microbiologia Aplicada, 2014, Porto Alegre. VII Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada, III Encontro Latino Americano de Microbiologia Aplicada, 2014.
16. BECKER, A. P. ; CANTARELI, V. ; **ROSSATTO, F. C. P.** ; SILVA, M da ; DIAS, C. A. G. ; DAZEVEDO, P. A. . Non-multidrug-resistant MRSA from health-care facilities in Southern Brazil. In: 111th General Meeting American Society for Microbiology, 2011, New Orleans. Anais/Abstracts do 111th General Meeting American Society for Microbiology, 2011, 2011. v. 1. p. 1-1.
17. CAIERÃO, J ; **ROSSATTO, F. C. P.** ; BECKER, A. P. ; DAZEVEDO, P. A. . Comparison of Methods to detect vancomycin-nonsusceptible "staphylococcus aureus" methicillin-resistant in clinical isolates. In: 111th General Meeting American Society for Microbiology, 2011, New Orleans. Anais/Abstracts 111th General Meeting American Society for Microbiology, 2011. v. 1. p. 1-1.
18. **ROSSATTO, F. C. P.** ; CAIERÃO, J ; BECKER, A. P. ; PROENCA, L. A. ; SILVA, M. ; DAZEVEDO, P. A. . Detection of vancomycin MICs among methicillin-resistant S. aureus: a comparative study of phenotypic methods. In: II Congresso Latino-Americano de Resistência Microbiana, IX Sul Encontro de Controle de Infecção, VI Encontro Gaúcho de Microbiologia Aplicada ao Controle de Infecção e IV Jornada Gaúcha de Antimicrobianos, 2011, Gramado. Revista da AMRIGS, 2011. v. 55. p. 28-28.
19. **ROSSATTO, F. C. P.** ; CAIERÃO, J ; BECKER, A. P. ; PROENCA, L. A. ; SILVA, M. ; DAZEVEDO, P. A. . Análise das metodologias E-Test e MICE na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) à vancomicina em isolados clínicos de Staphylococcus aureus metilicina resistentes (MRSA). In: IV Congresso Internacional de Bioanálises; VII Congresso Sul-Brasileiro de Biomedicina e XI Semana Gaúcha de Biomedicina, 2011, Novo Hamburgo. IV Congresso Internacional de Bioanálises; VII Congresso Sul-Brasileiro de Biomedicina e XI Semana Gaúcha de Biomedicina, 2011. v. 1. p. 1-1.
20. DAZEVEDO, P. A. ; CAIERÃO, J ; BECKER, A. P. ; **ROSSATTO, F. C. P.** . Detecção da concentração inibitória mínima a vancomicina em Staphylococcus aureus metilicina resistentes através do teste de triagem em ágar, sistema automatizado MicroScan e do painel de vancomicina Probac. In: 45 Congresso Brasileiro de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial, 2011, Florianópolis. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, 2011. v. 47. p. 358-358.
21. **ROSSATTO, F. C. P.** ; CAIERÃO, J ; BECKER, A. P. ; PROENCA, L. A. ; DAZEVEDO, P. A. . Avaliação comparativa de metodologias fenotípicas na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) a vancomicina em isolados de Staphylococcus aureus metilicina resistentes (MRSA) em Porto Alegre, RS. In: 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011, Foz do Iguaçu. Microbiologia in foco, 2011. p. 164-164.
22. **ROSSATTO, F. C. P.** ; PROENCA, L. A. ; SILVA, M. ; CAIERÃO, J ; BECKER, A. P. ; DAZEVEDO, P. A. . Análise da performance do painel vancomicina da PROBAC na determinação da concentração inibitória mínima (MIC) à vancomicina em isolados clínicos de MRSA de Porto Alegre. In: V Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada, 2011, Porto Alegre. Anais do V Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada, 2011. p. 10-10.
23. **ROSSATTO, F. C. P.** ; PROENCA, L. A. ; SILVA, M. ; BECKER, A. P. ; CAIERÃO, J ; DAZEVEDO, P. A. . Detecção da Concentração Inibitória Mínima à Vancomicina em Isolados MRSA através do Teste de Triagem em Agar, Sistema Automatizado MicroScan e do Painel de Vancomicina PROBAC. In: IV Semana Científica da UFCSPA e I Semana de Tecnologia e Inovação, 2011, Porto Alegre. IV Semana Científica da UFCSPA e I Semana de Tecnologia e Inovação, 2011.
24. PROENCA, L. A. ; DAZEVEDO, P. A. ; **ROSSATTO, F. C. P.** ; Caierão, J. ; BECKER, A. P. ; SILVA, M. . Detecção da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de Vancomicina entre Staphylococcus aureus resistentes à metilicina: um estudo comparativo de métodos fenotípicos. In: IV Semana Científica da UFCSPA e I Semana de Tecnologia e Inovação, 2011, Porto Alegre. IV Semana Científica da UFCSPA e I Semana de Tecnologia e Inovação, 2011.
25. **ROSSATTO, F. C. P.** ; BECKER, A. P. ; LOPES, P. M. ; DIAS, C. A. G. ; DAZEVEDO, P. A. . Avaliação da sensibilidade ao ácido fusídico em isolados MRSA obtidos de pacientes colonizados e infectados de um hospital de Porto Alegre, RS. In: II Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2010, Florianópolis. Microbiologia in foco. v. 3. p. 53-53.

Apresentações de Trabalho

1. **ROSSATTO, F. C. P.**. Microbiologia e a Biomedicina. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).
2. **ROSSATTO, F. C. P.**. Avaliação da resistência a glicopeptídeos em amostras de Staphylococcus aureus metilicina-resistentes (MRSA) isoladas em hospitais e unidades ambulatoriais da região metropolitana de Porto Alegre, RS, Brasil. 2012. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
3. **ROSSATTO, F. C. P.**. Avaliação da resistência a glicopeptídeos em amostras de Staphylococcus aureus metilicina-resistentes (MRSA) isoladas em hospitais e unidades ambulatoriais da região metropolitana de Porto Alegre, RS, Brasil. 2011. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

Bancas

Participação em bancas de comissões julgadoras

Outras participações

1. **ROSSATTO, F. C. P.**. 35º MOSTRATEC. 2020. Fundação Escola Técnica Liberato Salzano Vieira da Cunha.
2. **ROSSATTO, F. C. P.**. Congresso UFCSPA: conectando saúde e sociedade. 2019. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

3. **ROSSATTO, F. C. P.**. 34º MOSTRATEC. 2019. Fundação Escola Técnica Liberato Salzano Vieira da Cunha.
4. **ROSSATTO, F. C. P.**. Avaliadora de Sessão de Apresentação de Trabalhos na IV Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. 2018. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. Conexão FEA - Salmonella em Alimentos. 2021. (Outra).
2. Fake news em saúde: como responsabilizar quem as divulga?. 2021. (Outra).
3. I SIMICRON - Simpósio de Microbiologia de Rondônia: saúde, ambiente e inovação. 2021. (Simpósio).
4. PET Curso Vegetarianismo. 2021. (Outra).
5. Processamento inicial de materiais clínicos para cultura de aeróbios e anaeróbios facultativos. 2021. (Outra).
6. Senac Corporativo Oportuniza - Programa Senac de Segurança de Alimentos e Gastronomia. 2021. (Outra).
7. Uso Racional de Medicamentos e Medicalização da Saúde Mental na Pandemia. 2021. (Outra).
8. VIII Encontro Paranaense de Engenharia de Alimentos (VIII EPEA) e VII Semana Acadêmica de Engenharia de Alimentos (VII SEMEA) Online. 2021. (Encontro).
9. V Seminário Internacional da Carreira Docente nas Profissões de Saúde. 2021. (Seminário).
10. Webinário Internacional de Ciência e Tecnologia em Alimentos. 2021. (Outra).
11. Workshop das Análises Clínicas. 2021. (Outra).
12. 2020 Social Biofilm Network Meeting. 2020. (Encontro).
13. Fontes alimentares alternativas. 2020. (Outra).
14. I Fórum de Bioquímica de Alimentos. 2020. (Outra).
15. III Workshop em Ciência e Tecnologia de Alimentos do PPGCTA e I Simpósio Internacional de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS. 2020. (Simpósio).
16. I Simpósio Internacional em Ciência e Tecnologia de Alimentos V Seminário em Inovação e Tecnologia na área de Alimentos. 2020. (Simpósio).
17. I Simpósio Pernambucano de C. elegans (I SIMPECe). 2020. (Simpósio).
18. Mesa redonda sobre o Guia Alimentar para a população brasileira: uma visão da Nutrição, Gastronomia e Tecnologia em Alimentos. 2020. (Outra).
19. Minicurso R para não programadores: analisando dados do TCGA. 2020. (Encontro).
20. Semana da Microbiologia: Microbiologia: atualidades e o mercado de trabalho. 2020. (Outra).
21. Semana Nacional da Microbiologia de Alimentos na Indústria. 2020. (Outra).
22. V Biosciences Meeting ? Crossing Borders. Atividade antimicrobiana de compostos fenólicos contra o fungo Candida. 2020. (Encontro).
23. IV Encontro do Programa de Pós-Graduação em Biociências. 2019. (Encontro).
24. Oficina de boas práticas para laboratórios. 2019. (Oficina).
25. UFCSPA Acolhe. Microbiologia. 2019. (Outra).
26. Uso Racional de Medicamentos: Discutindo o uso de antimicrobianos. 2019. (Outra).
27. I Seminário de Internacionalização. 2018. (Seminário).
28. XI Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada. Potencial de resíduos agroindustriais da uva (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*) como fonte de compostos antibiofilme. 2018. (Simpósio).
29. Curso MC03 - Investigação de Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (8 horas) - VIII Congresso Latinoamericano, XIV Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos e VI Encontro do Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal. 2017. (Outra).
30. II Encontro do PPG Biociências da UFCSPA & Encontro de Pesquisa em Fisiologia do RS. Avaliação de Compostos com Atividade Antibiofilme sobre a Modulação Gênica em Isolados Clínicos. 2017. (Encontro).
31. VIII Congresso Latinoamericano, XIV Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos e VI Encontro do Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal. 2017. (Congresso).
32. X Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada (SBMA) e IV Encontro Latino-Americano de Microbiologia Aplicada (ELAMA). 2017. (Simpósio).
33. Microbiologia: Experiência Internacional. Microbiologia: Experiência Internacional. 2016. (Outra).
34. 2º Workshop Adesão Microbiana e Superfícies. 2014. (Outra).
35. Aspectos clínicos, microbiológicos e epidemiológicos de microrganismos multiresistentes. 2014. (Outra).
36. I Curso de Bioinformática aplicado à Microbiologia. 2014. (Outra).
37. VII Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada, III Encontro Latino Americano de Microbiologia Aplicada. Caracterização fenotípica e genotípica de *Staphylococcus coagulase* positivos e negativos isolados de frango e morcilha no Rio Grande do Sul, Brasil. 2014. (Seminário).
38. 1 Ciclo de Seminários do Núcleo de Estudos em Microbiologia Aplicada/ NEMA. 20. 2013. (Seminário).
39. II Congresso Latino-Americano de Resistência Microbiana, IX Sul Encontro de Controle de Infecção, VI Encontro Gaúcho de Microbiologia Aplicada ao Controle de Infecção e IV Jornada Gaúcha de Antimicrobianos. Detection of vancomycin MICs among methicillin-resistant *S. aureus*: a comparative study of phenotypic methods. 2011. (Congresso).
- 40.

- IV Congresso Internacional de Bioanálises; VII Congresso Sul-Brasileiro de Biomedicina e XI Semana Gaúcha de Biomedicina. Análise das metodologias E-Test e MICE na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) à vancomicina em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* metilicina resistentes (MRSA). 2011. (Congresso).
41. IV Mini-Curso de Capacitação de Jovens Cientistas da UFCSPA. 2011. (Outra).
 42. IV Semana Científica da UFCSPA e I Semana de Tecnologia e Inovação. Detecção da Concentração Inibitória Mínima à Vancomicina em Isolados MRSA através do Teste de Triagem em Agar, Sistema Automatizado MicroScan e do Painel de Vancomicina PROBAC. 2011. (Outra).
 43. VII Jornada Acadêmica de Biomedicina UFCSPA e III Simpósio Habilitações da Biomedicina. 2011. (Simpósio).
 44. V Simpósio Brasileiro de Microbiologia Aplicada. Análise da performance do painel vancomicina da PROBAC na determinação da concentração inibitória mínima (MIC) à vancomicina em isolados clínicos de MRSA de Porto Alegre. 2011. (Simpósio).
 45. III Mini-Curso de Capacitação de Jovens Cientistas da UFCSPA. 2010. (Outra).
 46. III Semana Científica da UFCSPA. 2010. (Outra).
 47. I Ciclo de Palestras sobre Saúde e Meio Ambiente da UFCSPA. 2009. (Outra).
 48. III Curso de Abordagem às Emergências Cotidianas. 2009. (Oficina).
 49. V Jornada Acadêmica da Biomedicina e I Simpósio: Habilitação da Biomedicina da UFCSPA. 2009. (Simpósio).
 50. Palestra "Composição do Vinho e Saúde" na I Mostra Técnica do Centro Federal de Educação Tecnológica de Bento Gonçalves. 2005. (Outra).
 51. Palestra "Potencial da Serra Gaúcha para Elaboração de Espumantes" na I Mostra Técnica do Centro Federal de Educação Tecnológica de Bento Gonçalves. 2005. (Outra).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. **ROSSATTO, F. C. P.**. IV Encontro do Programa de Pós-Graduação em Biociências. 2019. (Outro).
2. **ROSSATTO, F. C. P.**. NEMA - Núcleo de Estudos em Microbiologia Aplicada. 2019. (Outro).
3. **ROSSATTO, FERNANDA C.P.**. NEMA - Microbiologia nas diferentes profissões da área da saúde. 2018. (Outro).
4. **ROSSATTO, F. C. P.**. I JORNADA ACADÊMICA DA TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. 2017. (Outro).
5. **ROSSATTO, FERNANDA CRISTINA POSSAMAI**. Monitora do Curso Prático de Produção de Cerveja da I Jornada Acadêmica da Tecnologia de Alimentos. 2017. (Outro).
6. **ROSSATTO, FERNANDA CRISTINA POSSAMAI**. Monitora do Curso de Leveduras da Cerveja da I Jornada Acadêmica da Tecnologia de Alimentos. 2017. (Outro).
7. **ROSSATTO, FERNANDA CRISTINA POSSAMAI**. Monitora do Curso de Fabricação de Chocolates da I Jornada Acadêmica da Tecnologia de Alimentos. 2017. (Outro).
8. **ROSSATTO, FERNANDA CRISTINA POSSAMAI**. Monitora do Curso Prático de Produtos sem Glúten da I Jornada Acadêmica da Tecnologia de Alimentos. 2017. (Outro).

Orientações

Orientações e supervisões em andamento

Iniciação científica

1. Natasha Rohenkohl Unger. Avaliação do potencial antibiofilme do resíduo do processamento da uva em *Caenorhabditis elegans*. Início: 2019. Iniciação científica (Graduando em Farmácia) - Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. (Orientador).
2. Camila Almeida Estacio Da Silva. Avaliação do potencial antibiofilme e da toxicidade de compostos da classe das dihidropirimidinonas em *Caenorhabditis elegans*. Início: 2019. Iniciação científica (Graduando em Biomedicina) - Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. (Orientador).

Orientações e supervisões concluídas

Iniciação científica

1. Milla Paim Dreher. Investigação de resíduos do processamento da uva sobre biofilmes bacterianos. 2019. Iniciação Científica. (Graduando em Biomedicina) - Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Orientador: Fernanda Cristina Possamai Rossatto.

Outras informações relevantes

Proficiente em língua inglesa (2013) e espanhola (2019) pela UFRGS. Funcionária homenageada da turma de Tecnologia de Alimentos, UFCSPA (2018). Curso de inglês (90 horas) em International Language Academy of Canada (ILAC), em Toronto/Canadá, nível proficiência (17) (2018). Bolsista CAPES - PDSE - doutorado sanduíche exterior, período de um ano (2019-2020).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 13/10/2021 às 10:06:53

[Imprimir currículo](#)