

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Mariane da Silva Fagundes

Composto com ligante de guanidina atua na cinética de crescimento de *Candida albicans*

Prof.^a Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira

Dourados - MS

2024

MARIANE DA SILVA FAGUNDES

Composto com ligante de guanidina atua na cinética de crescimento de *Candida albicans*

Projeto de TCC final apresentado como requisito avaliativo da disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso III, para o curso de Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

Orientadora: Kelly Mari Pires de Oliveira

DOURADOS - MS

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

F156c Fagundes, Mariane Da Silva

Composto com ligante de guanidina atua na cinética de crescimento de *Candida albicans* [recurso eletrônico] / Mariane Da Silva Fagundes. -- 2024.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Kelly Mari Pires de Oliveira.

TCC (Graduação em Biotecnologia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2024.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Infecções orais. 2. Guanidinas. 3. Novos antifúngicos. I. Oliveira, Kelly Mari Pires De. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

MARIANE DA SILVA FAGUNDES

**COMPOSTO COM LIGANTE DE GUANIDINA ATUA NA CINÉTICA DE
CRESCIMENTO DE *Candida albicans***

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado pela
Banca Examinadora como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia,
da Universidade Federal da Grande Dourados.

Aprovado em: 27/09/2024

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente



KELLY MARI PIRES DE OLIVEIRA

Data: 11/12/2024 10:20:33-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

KELLY MARI PIRES DE OLIVEIRA

Presidente

Documento assinado digitalmente



FERNANDA DE OLIVEIRA GALVAO SANTOS

Data: 08/12/2024 14:34:30-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

FERNANDA DE OLIVEIRA GALVÃO SANTOS

Membro

Documento assinado digitalmente



JOAO VICTOR DE ANDRADE DOS SANTOS

Data: 08/12/2024 22:13:50-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

JOÃO VICTOR DE ANDRADE DOS SANTOS

Membro

AGRADECIMENTOS

De todo o trabalho, no meu coração, esta página é a mais emocionante, pois retrata toda dedicação e carinho por aqueles que me ajudaram. Então não poderia ser diferente começar agradecer a Deus por me abençoar na minha jornada acadêmica durante a minha graduação e minha vida, por ter me dado força e saúde para seguir em frente. A Nossa Senhora por me guiar em cada decisão importante e me tranquilizar ao orar pelo meu futuro.

A minha família que sempre se mostrou presente em minha vida. A minha mãe Elisângela por ser a mulher mais forte e delicada que já pude conhecer, que me fez acreditar e jamais desistir. Ao meu pai Vanildo por me incentivar, ser um exemplo de persistência e me ouvir sobre os assuntos de Biotecnologia. Obrigada pelo esforço e pelas palavras de aconchego dos senhores, nunca esquecerei “se der errado filha, você tem um lar e pode voltar para casa”. A minha avó Vitalina pelas orações e colo, ao meu avô Pedro pelo apoio e incentivo. Ao meu tio Pedro Rogério por proporcionar momentos de descontração e conselhos. Ao meu irmão Marcos pelo encorajamento.

Agradeço a cada professor (a) que plantou o conhecimento em mim, desde o pré até o final da graduação por cada ensinamento e pelo cuidado, são fundamentais na minha formação e serei eternamente grata.

Em meio universitário, a maioria diz que os professores mal dão a aula e depois vão embora, mas a Prof^a. Dra. Kelly Mari sempre foi diferente, além de apresentar uma excelente didática, possui um afeto pelos estudantes, fazendo que sua aula fosse a mais esperada da semana. Minha sincera gratidão por me orientar ao longo deste percurso, sua paciência, compreensão e disposição foram essenciais para que eu conseguisse superar os desafios e concluir este trabalho. Agradeço também pelas oportunidades que me proporcionaram a evolução. Obrigada professora Kelly Mari!

Agradeço ao grupo GenMicro. Ao João, Cleison e Diana, obrigada por terem paciência e dedicação nos ensinamentos, por cada experiência que pude ter ao lado de vocês, são pessoas de coração enorme e especiais. A Stéfani pelo cuidado e auxílio com minhas dúvidas. A Pamella pela direção e discernimento em meu trabalho. A prof. Fabiana pela doçura e vasto conhecimento, tornando que todos que estejam no processo de pesquisa científica, ajam com sabedoria e calma. Aos meus colegas de iniciação científica, José Eduardo, Guilherme, Mariely e Williams, obrigada por dividirem o dia a dia e me ajudarem em todas as preparações e realizações de experimentos. Sem vocês, não seria possível finalizar este trabalho.

Obrigada à prof. Fernanda e doutorando João por aceitarem participar da banca de qualificação, a história e formação de vocês é uma grande inspiração.

Aos meus amigos de graduação, especialmente Marco, Emily e Mariana, vocês tornaram os dias mais leves, obrigada por cada momento de conversa, por cada trabalho apresentado, pelos lanches que dividimos, pelas risadas e principalmente, a parceria, seja em momentos bons ou ruins, vocês estiveram comigo. Construímos algo além da vida, pois é difícil encontrar pessoas que pensam diferente e mesmo assim, são suporte um do outro e apoiam-se. Agradeço por cada madrugada de estudos, por cada momento de felicidade ao nos encontrarmos para descansar e por cada momento família. Obrigada “primos”!

Agradeço também a minha fiel companheira de quatro patas, Zaya, que com sua companhia incondicional e seu afeto diário, trouxe momentos de alegria e leveza durante os momentos mais desafiadores deste trabalho. Sua presença constante me deu forças e me lembrou da importância de pausar e respirar, mesmo nas fases mais intensas. Obrigado por ser uma fonte de conforto e por estar sempre ao meu lado.

Agradeço a cada órgão institucional que financiou, disponibilizou material, proporcionou estrutura, com certeza fazem parte deste trabalho.

Para finalizar, agradeço a todos que fizeram parte deste processo, acredito que ninguém consegue nada sozinho, com amor e satisfação, sou grandemente grata.

RESUMO

A cavidade oral abriga uma microbiota diversa, incluindo a levedura *Candida albicans*, que é normalmente comensal, mas pode causar candidíase oral em indivíduos imunocomprometidos ou em situações de desequilíbrio, afetando a mucosa oral com lesões brancas ou avermelhadas. A terapêutica atual para essa condição inclui a clorexidina, um antisséptico de amplo espectro utilizado no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas. Embora a clorexidina seja eficaz em impedir o desenvolvimento de microrganismos, possui limitações, como a irritação oral e a despigmentação dentária. Ademais, o aumento das infecções fúngicas ressalta a urgência de alternativas terapêuticas. Assim, a guanidina é um composto orgânico estável que apresenta atividade antifúngica, sendo os compostos com ligantes de guanidina destacados por sua interação com alvos moleculares e potencial no combate a infecções. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial de um composto com ligante de guanidina contra *C. albicans* (ATCC 90028) e um isolado oral. Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada a técnica de microdiluição em caldo, avaliando as concentrações do composto com ligante de guanidina (AUD 1-98) de 0,39 a 50 µg/mL frente a *Candida albicans* (ATCC 90028) e o isolado oral (ISO 03), e determinando os valores de CIM e Concentração Fungicida mínima (CFM). Para a avaliação do crescimento cinético, em intervalos de 0, 4, 8, 12, 24, 28, 32, 36, 44 e 48 horas, o composto AUD 1-98 foi analisado nas concentrações de CIM e 2xCIM, e a clorexidina na concentração de CIM. Os resultados demonstraram que o composto AUD 1-98 apresenta CIM e CFM 50 µg/mL para *C. albicans* e o isolado oral. Em relação ao crescimento cinético, o composto AUD 1-98 foi fungicida contra os dois microrganismos testados na CIM e 2xCIM (morte de $< 3 \log_{10}$) e obteve uma redução de 100% na contagem de Unidade Formadora de Colônia (UFC)/mL. Em conclusão, o composto com ligante de guanidina tem atividade fungicida contra *C. albicans* e o isolado oral, revelando-se como um potencial para o desenvolvimento de novos antifúngicos. No entanto, estudos adicionais são necessários para explorar seu potencial terapêutico.

Palavras chaves: Infecções orais; Guanidinas; Novos antifúngicos.

ABSTRACT

The oral cavity harbors a diverse microbiota, including the yeast *Candida albicans*, which is usually commensal but can become pathogenic, causing oral candidiasis in immunocompromised individuals or under conditions of imbalance. This condition affects the oral mucosa with white or reddish lesions. Current treatment options include chlorhexidine, a broad-spectrum antiseptic commonly used to manage bacterial and fungal infections. Although chlorhexidine is effective in preventing microbial growth, it has limitations such as oral irritation and dental discoloration. Furthermore, the increasing prevalence of fungal infections highlights the urgent need for alternative therapies. In this context, guanidine, a stable organic compound with antifungal activity, has attracted attention. Compounds with guanidine ligands stand out due to their ability to interact with molecular targets and their potential to combat infections. This study aimed to investigate the antifungal potential of a guanidine-ligand compound against *C. albicans* (ATCC 90028) and an oral isolate. The broth microdilution method was used to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), evaluating concentrations of the guanidine-ligand compound (AUD 1-98) ranging from 0.39 to 50 µg/mL against *C. albicans* (ATCC 90028) and the oral isolate (ISO 03), and determining the MIC and Minimum Fungicidal Concentration (MFC). To assess kinetic growth at intervals of 0, 4, 8, 12, 24, 28, 32, 36, 44, and 48 hours, the compound AUD 1-98 was analyzed at MIC and 2xMIC concentrations, and chlorhexidine was tested at its MIC concentration. The results showed that AUD 1-98 presented MIC and MFC values of 50 µg/mL for both *C. albicans* and the oral isolate. Regarding kinetic growth, AUD 1-98 demonstrated fungicidal activity against both microorganisms at MIC and 2xMIC concentrations (with a reduction of <3 log₁₀) and achieved a 100% reduction in Colony-Forming Unit (CFU)/mL counts. In conclusion, the guanidine-ligand compound demonstrated fungicidal activity against *C. albicans* and the oral isolate, emerging as a promising candidate for the development of new antifungal agents. However, further studies are necessary to investigate its mechanisms of action and pharmacological safety profile.

Keywords: Oral infections; Guanidines; New antifungals.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Fig. 1. Ilustração de uma candidíase pseudomembranosa	13
Fig. 2. Ilustração de candidíase eritematosa	13
Fig. 3. Ilustração de candidíase hiperplásica crônica	14
Fig. 4. Ilustração dos gráficos de curva cinética	33

LISTA DE TABELAS

Tabela. 1. Resultado da Concentração Inibitória Mínima frente a <i>Candida albicans</i> e isolado oral	33
---	----

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

ATCC - <i>American Type Culture Collection</i>
CFM - Concentração fungicida mínima
CIM - Concentração inibitória mínima
CLSI - <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO - Dimetilsulfóxido
et al. - e outros
5-FC - 5-Fluorocitosina
°C - Graus Celsius
g - grama
h - horas
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
IFI - Infecções Fúngicas Invasivas
IFDs - Doenças Fúngicas Invasivas superficiais
nm - nanômetro
mg - miligrama
mL- mililitro
< - Menor
> - Maior
RAM - Resistência Antimicrobiana
% - porcentagem
sp. - espécie

spp. - espécies

TBF - Terbinafina

µg - micrograma

µL - microlitro

UFC - Unidade formadora de colônia

UFGD - Universidade Federal da Grande Dourados

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVOS.....	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1 Microbiota oral e infecções fúngicas.....	12
3.2 Desafios no diagnóstico de infecções fúngicas.....	15
3.3 Epidemiologia da incidência de candidemia.....	17
3.4 Antifúngicos tradicionais.....	18
3.5 Novas estratégias para tratamento.....	21
3.5.1 Propriedades da guanidina e seus derivados.....	23
4. METODOLOGIA.....	24
4.1 Obtenção da molécula química.....	24
4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	25
4.3 Avaliação da cinética de crescimento.....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
6. CONCLUSÃO.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

1. INTRODUÇÃO

A cavidade oral abriga a segunda microbiota mais abundante do corpo humano e nela existem diferentes espécies microbianas. Esses microrganismos vivem em um ecossistema onde o sistema imunológico de indivíduos saudáveis os sustenta em um equilíbrio dinâmico para prevenir infecções orais (THIYAHUDDIN et al., 2019). No entanto, pessoas com um sistema imunológico enfraquecido, seja por erros congênitos ou secundários a condições médicas, tornam-se mais propensas a infecções bacterianas, virais e/ou fúngicas graves (AL-MANEI et al., 2023).

A primeira lista de fungos “patógenos prioritários” foi divulgada pela Organização Mundial da Saúde em 2022, com um alerta de que algumas espécies estão cada vez mais resistentes aos medicamentos e se tornando mais disseminadas, entre as quais está a espécie *Candida albicans* (WHO, 2022). A *C. albicans* é um microrganismo patobiótico onipresente, um membro da flora comensal, que pode causar infecções graves (CIUREA et al., 2020). E infecções invasivas oportunistas causadas por *Candida* representam uma grande ameaça à saúde pública, conhecidas como candidíase, afetam especialmente indivíduos imunocomprometidos, pessoas saudáveis com dispositivos médicos implantados ou maus hábitos de higiene (KUNYEIT et al., 2019).

Entre as espécies de *Candida*, *Candida albicans* é o agente etiológico mais predominante das infecções, manifestando-se como manchas brancas e cremosas na língua e na parte interna das bochechas, essas lesões podem causar sintomas como vermelhidão, dor, alteração do paladar e desconforto ou dor ao comer ou engolir, e esfregar ou raspar as lesões pode levar a um pequeno sangramento (TALAPKO et al., 2021). Embora a infecção normalmente tenha como alvo a mucosa oral, ela pode se espalhar para a orofaringe e esôfago em casos mais graves (BALEF et al., 2024).

Nesse contexto, um dos métodos de tratamento adotados para essas infecções é o uso da clorexidina. A clorexidina é um potente agente antisséptico que tem sido usado desde a década de 1950, é amplamente utilizado em ambientes de saúde na lavagem das mãos, banho de pacientes, tratamento de gengivite, antisepsia da pele e outras aplicações antimicrobianas. É pouco solúvel em água e, portanto, geralmente é formulada com acetato ou gluconato para formar sais solúveis em água (HASHEMI et al., 2019). No entanto, as reações adversas cutâneas comuns à clorexidina como dermatite alérgica de contato ou urticária, erupção medicamentosa fixa e fotossensibilidade limitam seu uso. Ainda, reações cutâneas foram associadas à sensibilização oral por enxaguatórios bucais contendo clorexidina (KOTSAILIDI et al., 2020).

Diante dessas limitações, o cenário antifúngico se encontra comprometido, necessitando do desenvolvimento de novos antimicrobianos. Neste sentido, compostos com ligantes biológicos de interesse, como as guanidinas, tornam-se alternativas promissoras. As guanidinas são compostos orgânicos, encontrados em plantas, animais e urina como produto do metabolismo proteico. Estão presentes em várias moléculas biológicas importantes, como arginina, agmatina, creatina, guanina e diversos alcaloides naturais (GOMES et al., 2023). No design de fármacos, a guanidina é crucial devido à sua capacidade de formar interações não covalentes com proteínas e outros alvos moleculares, como ligações de hidrogênio e interações cátion- π , facilitando o reconhecimento molecular. Além disso, sua habilidade de atuar tanto como ácido quanto como base amplia suas aplicações na medicina (RAUF et al., 2014; ALONSO-MORENO et al., 2014).

Considerando a necessidade do desenvolvimento de novas terapêuticas antimicrobianas e o potencial biológico dos compostos com ligantes de guanidina, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de um composto com ligante de guanidina no controle do desenvolvimento de *C. albicans*.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral: Determinar a atividade antifúngica do composto com ligante de guanidina frente a *Candida albicans*.

2.2 Específicos:

- Avaliar a concentração inibitória e fungicida mínima do composto com ligante de guanidina frente um isolado oral e ATCC de *Candida albicans*;
- Avaliar a curva de crescimento cinético de *C. albicans* e do isolado oral após o tratamento com o composto com ligante de guanidina.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Microbiota oral e infecções fúngicas

A cavidade oral é a principal porta de entrada para dois sistemas vitais, o gastrointestinal e o respiratório. Ela é constituída pelos dentes, mucosa bucal, sublingual e gengival, palato mole e duro e língua. Possui uma microbiota grande e diversificada, abrigando inúmeros microrganismos que incluem bactérias, fungos, vírus e protozoários (KUNATH et al., 2024). Existe uma homeostase entre essa microbiota e o hospedeiro, que forma um ambiente com dinâmica específica, e desempenha um papel fundamental na manutenção da saúde bucal, bem como da saúde sistêmica (LAMONT et al., 2018).

A ruptura desse equilíbrio por vários fatores resulta em uma disbiose, permitindo a sobrevivência e o estabelecimento de uma comunidade polimicrobiana mais virulenta, prejudicando as respostas imunes eficientes. Posteriormente, esses eventos podem se manifestar clinicamente como doenças infecciosas bucais (LAMONT et al., 2018). A maioria das infecções fúngicas orais (micoses orais) são resultantes de condições oportunistas, cuja diminuição da resistência do hospedeiro permite a iniciação e progressão de condições patogênicas através da colonização local na cavidade oral (MASUR; READ, 2015). A frequência dessas micoses aumentou notavelmente em todo o mundo com o uso crescente de medicamentos imunossupressores e infecções virais de imunodeficiência (SEDGHIZADEH et al., 2017).

As condições micológicas orais variam de infecções fúngicas superficiais a profundas, sendo as superficiais com destaque para a candidíase mais frequentemente diagnosticadas e relatadas (SANTOSH et al., 2021; SAMARANAYAKE et al., 2009). As infecções fúngicas superficiais geralmente estão associadas a desconforto oral, dor, sensação de queimação, parageusia e aversão à comida. Enquanto as profundas são caracterizadas pela disseminação de patógenos para áreas mais profundas do tecido e geralmente estão associadas a uma apresentação clínica agressiva, como ulceração e perfuração em áreas ósseas (CARMELLO et al., 2016). Os principais patógenos fúngicos nosocomiais são *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Mucorales*, *Fusarium* spp., e outros fungos filamentosos, como *Scedosporium* spp. (RICHARDSON; LASS-FLÖRL, 2008).

Devido ao número crescente de infecções e mortes a cada ano, os patógenos fúngicos são considerados uma ameaça crescente à saúde humana. Os fungos são responsáveis por 1,5 milhão de fatalidades anuais e infectaram um terço da população, esses números excedem as taxas de mortalidade de doenças graves, como malária, tuberculose e câncer de mama (KOLLATH et al., 2018). O rápido aumento das infecções fúngicas é frequentemente associado às mudanças climáticas, à virulência dos patógenos e ao crescente número de pacientes imunocomprometidos em todo o mundo. Apenas algumas centenas (cerca de 300 espécies) das estimadas 3,5 a 5,1 milhões de espécies de fungos estão ligadas a doenças fúngicas humanas (THAMBUGALA et al., 2024).

Com destaque para as espécies de *Candida*, que fazem parte da microbiota normal da mucosa da cavidade oral, do sistema gastrointestinal e dos tratos geniturinários. *C. albicans* é o fungo comensal inofensivo mais prevalente (aproximadamente 60–70% dos microrganismos isolados da cavidade oral), seguido por outras espécies de *Candida* não-*albicans*, como *Nakaseomyces glabrata*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. parapsilosis stricto sensu*, *C.*

krusei ou *Pichia kudriavzevii* e *C. tropicalis* (WIENCH et al., 2021). Em contraste, outra espécie identificada como *Candida auris*, apresenta alto risco à saúde humana devido às suas infecções invasivas e graves, desde sua primeira identificação em 2009, surtos de *C. auris* têm sido relatados em diversos serviços de saúde, levantando grandes preocupações devido à sua frequente alta resistência a antifúngicos e rápida transmissão em ambientes hospitalares (ALFOUZAN et al., 2020).

A candidíase oral é classificada em formas pseudomembranosa, eritematosa e hiperplásica. A aparência clínica pode variar em diferentes formas. A candidíase pseudomembranosa é o tipo mais frequente, que apresenta placas raspáveis brancas ou amarelas na mucosa oral, ocasionada pela descamação dos queratinócitos pela levedura (Figura 1). A candidíase pseudomembranosa pode ser aguda ou crônica. A forma pseudomembranosa da candidíase oral é constantemente observada em pacientes com desregulação imunológica ou medicações imunossupressoras (SANTOSH et al., 2021).

Figura 1. Candidíase pseudomembranosa



Fonte: (OK et al., 2020)

A categoria eritematosa pode ser aguda ou crônica. Na qual o palato e o dorso da língua são os locais mais comuns e geralmente se apresentam como áreas atrofiadas da mucosa oral, caracterizando-se como manchas eritematosas. Comumente é encontrada em indivíduos sob corticosteroides ou antibióticos de amplo espectro (SITHEEQUE et al., 2003).

Figura 2. Imagem clínica mostra candidíase atrófica aguda: lesões eritematosas no palato.



Fonte: (MEIRA et al., 2017)

A candidíase hiperplásica crônica, também chamada de leucoplasia por *Candida*, geralmente surge na mucosa bucal anterior proximal às comissuras anteriores (área retrocomissural), mas também pode ocorrer na língua lateral, que é o segundo local mais comum de ocorrência. Os pacientes apresentam leucoplasias bem demarcadas ou placas brancas fissuradas elevadas que não podem ser removidas por raspagem suave (Figura 3) (VILA et al., 2020).

Figura 3. Candidíase hiperplásica crônica



Fonte: (PATIL et al., 2015)

3.2 Desafios no diagnóstico de infecções fúngicas

Em consequência da resistência elevada dos microrganismos e inúmeras terapias utilizando antibióticos ou imunossupressores, o diagnóstico preciso de uma infecção fúngica enfrenta obstáculos no cenário atual. Dentre isto, o isolamento de espécies de *Candida* por

métodos baseados em cultura continua sendo o padrão-ouro para o diagnóstico, embora a sensibilidade desse método varie entre o tipo de infecção e a carga fúngica. A sensibilidade das hemoculturas com sistemas automatizados de hemocultura para infecções da corrente sanguínea com ou sem infecções profundas pode chegar a 75% (CLANCY; NGUYEN, 2013).

No entanto, a sensibilidade é muito menor em casos de candidemia intermitente (infecção na corrente sanguínea causada por *Candida*) e candidíase profunda sem candidemia. Nesses casos, a sensibilidade cai entre 21% e 71%, com uma sensibilidade geral de cerca de 50%. Enquanto o tempo médio de resposta para culturas de sangue e tecidos é de 2 a 3 dias, a identificação em nível de espécie usando técnicas tradicionais pode levar muito mais tempo. Devido a isto, os ensaios moleculares diagnósticos baseados em cultura, incluindo a espectrometria de massa por dessorção/ionização a laser assistida por matriz com tempo de voo, diminuiriam esse tempo. No entanto, eles ainda requerem o isolamento de patógenos usando um meio de cultura sólido (BARROS et al., 2023).

Outros testes de diagnóstico molecular podem avaliar a espécie diretamente da amostra de hemocultura, ao contrário de esperar pelo isolamento em meio sólido, resultando em menor tempo para identificação em nível de espécie. O painel de identificação de hemocultura FilmArray (BioFire Diagnostics LLC, Salt Lake City, UT) pode identificar 24 agentes etiológicos da sepse, incluindo 6 espécies de *Candida* (*C. albicans*, *Nakaseomyces glabrata*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. parapsilosis stricto sensu*, *C. auris*, *C. krusei* ou *Pichia kudriavzevii*). A sensibilidade e a especificidade para identificar esses patógenos são de 97,1%–99,9% e 99,9%–100%, respectivamente (SALIMNIA et al., 2016). Outra plataforma, o ensaio de hibridização *in situ* fluorescente de ácido nucleico peptídico (PNA FISH), foi descrita pela primeira vez em 2002 e foi projetada para identificar *C. albicans* e *C. glabrata* com sensibilidades de 98,7% e 100%, respectivamente, e especificidade de 100% para ambos os componentes (SHEPARD et al., 2008).

Com a dificuldade de diagnóstico e tratamento rápidos e precisos, notavelmente para prevenir epidemias, é evidente que as organizações de saúde pública precisam considerar as infecções fúngicas sistêmicas como um problema contemporâneo e real, como já observado anteriormente em outros modelos de doenças infecciosas. Além disso, como essas infecções são menos conhecidas e causadas por patógenos pouco estudados, representam maior risco à saúde pública, devendo concentrar maior atenção (RODRIGUES; NOSANCHUK, 2020).

3.3 Epidemiologia da incidência de candidemia

Em ambientes hospitalares, a candidemia continua a ser a infecção fúngica invasiva mais comum, com alta taxa de morbidade e mortalidade (AGNELLI et al., 2022). A epidemiologia da candidemia depende da região geográfica, período, tipo de inquérito e população envolvida (BITAR et al., 2014). Na América do Norte, Norte da Europa e Norte da China, a levedura *C. albicans* é seguida pela *C. glabrata* como a causa mais comum de candidemia, em contraste com a maior prevalência de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* do que a *C. glabrata* no sul da Europa e na América Latina. Embora *C. albicans* seja relatada como a principal causa de candidemia em todo o mundo, vários relatos da Índia indicaram *C. tropicalis* como a espécie causadora de candidemia mais prevalente (GOEMAERE et al., 2017).

Além disso, as taxas de mortalidade também são notavelmente mais altas nos países da América Latina quando comparadas à Europa Ocidental, chegando a 58,9% em uma série recente de 21 anos de candidemia no Brasil, em comparação com 20,2% em um estudo multicêntrico da Espanha. Infelizmente, particularmente no Brasil, as tendências de mortalidade pouco mudaram nos últimos vinte anos (YAPAR, 2014; BRAGA et al., 2018).

O risco de contrair uma infecção fúngica é muito elevado para indivíduos imunocomprometidos, e o cenário se complica ainda mais com o aumento contínuo no número desses pacientes. Desse modo, o crescimento da população de indivíduos imunocomprometidos pode ser atribuído a vários fatores: em primeiro lugar, o rápido aumento de pacientes com vírus da imunodeficiência humana (HIV) (quase 2 milhões de novos casos de infecção por HIV a cada ano). Em segundo lugar, o uso crescente de medicamentos imunossupressores devido a transplantes de órgãos ou cirurgias (KUMAR; SRIVASTAVA, 2023).

Neste contexto, as evidências cumulativas desde que os primeiros casos de síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) foram relatados na década de 1980, mostram que pacientes infectados com o HIV são mais suscetíveis a infecções fúngicas invasivas (IFI). Pacientes infectados pelo HIV apresentam falha na resposta imunológica antifúngica, devido aos efeitos do vírus nas linhagens celulares linfocitoides e mieloides e na resposta inata e adaptativa. O HIV prejudica o sistema imunológico ao esgotar as células T de memória CD4+, reduzindo assim a população de células T efectoras (ARMSTRONG-JAMES et al., 2014). Apesar de sua suscetibilidade à IFI causada por fungos adquiridos, vários achados sugerem que a infecção pelo HIV promove uma mudança na microbiota fúngica comensal que pode levar a outras infecções. A candidíase orofaríngea (OPC) é a doença oportunista mais

comum encontrada na cavidade oral e garganta de pacientes infectados pelo HIV, e está fortemente associada a contagens de linfócitos T CD4+ abaixo de 200 células/mm³ (SODRÉ et al., 2020).

Além da AIDS e HIV, outras doenças favorecem o crescimento de infecções fúngicas, dentre elas, o câncer. O número de casos de câncer está se intensificando anualmente, resultando em pacientes com resposta imunológica comprometida (devido aos efeitos colaterais da quimioterapia e radioterapia), tornando-os propensos a infecções fúngicas (WARGO et al., 2015). Adicionalmente, há um progresso persistente na quantidade de partos prematuros ou na população de neonatos com sistemas imunológicos pouco desenvolvidos. Esses neonatos, sem um sistema imunológico bem desenvolvido, estão em alta vulnerabilidade de contrair infecções fúngicas, ampliando assim a carga fúngica na sociedade (KUMAR; SRIVASTAVA, 2023; SWANSON et al., 2014).

Outro fator causador do aumento de infecções é o COVID-19, com o advento da pandemia de COVID-19, houve um aumento no número de pacientes em unidades de terapia intensiva. Uma porcentagem de pacientes com COVID-19 é grave o suficiente para exigir acompanhamento na UTI, onde o risco de candidemia é alto. Dados epidemiológicos mostram que pacientes de UTI com COVID-19 apresentam maior incidência de candidemia, resultando em maiores taxas de mortalidade em comparação com aqueles sem COVID-19 (WU, MCGOOGAN, 2020). No Brasil, um estudo comparou a incidência de candidemia em pacientes com e sem diagnóstico de COVID-19 em dois hospitais, e o resultado foi um aumento na incidência densidade (ID) por 1000 pacientes-dia de 1,43 (hospital 1) e 1,15 (hospital 2) em pacientes sem COVID-19 para 11,83 (hospital 1) e 10,23 (hospital 2) em pacientes com a infecção (RICHE et al., 2020). Outra amostra brasileira comparou um período pré-pandêmico com um período pandêmico em 2020 e encontrou um aumento na ID de candidemia de 1,54/1000 pacientes-dia para 7,44/1000 pacientes-dia (NUCCI et al., 2021).

3.4 Antifúngicos tradicionais

Os fungos causam diversas doenças em humanos, variando de síndromes alérgicas a doenças fúngicas invasivas (IFDs) superficiais, desfigurantes e potencialmente fatais, que juntas afetam mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo. Historicamente, o tratamento tem se baseado fortemente em apenas quatro classes de medicamentos antifúngicos de ação sistêmica: os polienos, os azóis, as equinocandinas e o análogo da pirimidina 5-flucitosina. No entanto, os fungos respondem rapidamente ao ataque químico e a falha no tratamento é um resultado comum. Essa falha é atribuída a uma interação entre defeitos imunológicos

subjacentes do hospedeiro, propriedades dos medicamentos antifúngicos (farmacocinética, farmacodinâmica e interações medicamentosas) e características dos fungos, incluindo morfologias celulares diversas, tolerância aos antifúngicos e resistência aos antifúngicos (FISHER et al., 2022).

Os primeiros antifúngicos descritos na literatura surgiram na década de 1950 abrangendo a classe dos polienos, com essas descobertas de substâncias com potenciais eficazes contra inúmeras infecções fúngicas, a indústria farmacêutica e os pesquisadores foram se aprimorando e atualmente os antifúngicos podem ser divididos em seis grupos principais: azóis, equinocandinas, polienos, análogos de pirimidina, alilaminas e inibidores mitóticos (CARMO et al., 2023).

Compostos azólicos como fluconazol, cetoconazol, voriconazol e posaconazol realizam o bloqueio da enzima citocromo P450 esterol 14 α -desmetilase, que converte lanosterol em ergosterol. O ergosterol é um componente essencial da membrana celular dos fungos. A falta de ergosterol na membrana celular prejudica a estrutura e a função da célula fúngica, resultando em disfunções que podem comprometer a sua sobrevivência. Esta enzima é codificada pelo gene ERG11 em leveduras e por Cyp51 em fungos. A inibição da enzima esterol 14 α -desmetilase faz com que seja fungistático em leveduras e fungicida em fungos (PAPPAS et al., 2016; PFALLER, 2012). A resistência contra os azólicos se dá principalmente por meio do aumento dos mecanismos de efluxo de medicamentos ou por alterações na via de síntese do esterol, em espécies de *Candida* a resistência é advinda da regulação positiva dos transportadores de medicamentos, a superexpressão ou modificação do alvo do medicamento e alterações celulares induzidas pelo estresse (COWEN et al., 2015).

O grupo equinocandinas sendo eles como anidulafungina, caspofungina e micafungina, são lipopeptídeos que inibem a glucana sintase, uma enzima essencial na biossíntese da parede celular. Esses compostos são amplamente utilizados com alta frequência em tratamentos de candidíase, aumentando assim, o risco de resistência antimicrobiana. Em espécies de *Candida*, a resistência às equinocandinas surge exclusivamente de mutações nos genes FKS, que codificam as subunidades catalíticas da glucana sintase (CLEVELAND et al., 2012). Na qual está relacionada à substituição de aminoácidos em duas regiões específicas de ponto quente de FKS1 em todas as espécies de *Candida* e FKS2 em *Candida glabrata* (KHALIFA et al., 2020; KHALIFA et al., 2021). Outro fator determinante para aquisição da resistência ocorre por exposição às equinocandinas que podem induzir estresse da parede celular ao inibir a β -glucana sintase. Essa inibição ativa indiretamente vias a jusante, como

Ca^{2+} /calcineurina e HSP90/mTOR, que desempenham papéis na tolerância aos medicamentos (FISHER et al., 2022).

Os polienos como a nistatina e anfotericina B funcionam ligando-se ao ergosterol, um esterol exclusivo dos fungos, na membrana plasmática. Essa ligação forma canais dependentes da concentração que causam a morte celular ao permitir que íons e outros conteúdos celulares vazem. Entretanto, por mais que sua eficácia seja considerada favorável, atualmente é utilizado como tratamento de segunda opção, devido à capacidade de toxicidade renal (PERLIN et al., 2017; ANDERSON et al., 2014). A resistência aos polienos ocorre por meio de uma redução no conteúdo de ergosterol na membrana celular. Essa resistência é tipicamente causada por mutações de perda de função em genes envolvidos na biossíntese de ergosterol, particularmente em espécies de *Aspergillus* e *Candida*. Em *C. albicans*, a resistência pode surgir da perda dupla do gene ERG3 (KHALIFA et al., 2024).

Substâncias análogas à pirimidina como a 5-Fluorocitosina (5-FC), foram um dos primeiros agentes antifúngicos sintetizados na década de 1950, o composto tem sido usado desde 1968 para tratar criptococose e candidíase humanas. O 5-FC é ativo contra leveduras ascomicetas e basidiomicetas, e alguns fungos filamentosos hialinos e melanizados. O uso de 5-FC como monoterapia, no entanto, é restrito pelo rápido surgimento de resistência e é recomendado apenas para alguns casos de cromoblastomicose e infecção do trato urinário inferior não complicada devido a espécies de *Candida* resistentes ao fluconazol (PAPPAS et al., 2016). Porém, quando administrado em combinação com anfotericina B, o 5-FC se tornou o padrão ouro para o tratamento de meningite criptocócica e infecções complexas por *Candida* (MOURAD, 2018). Embora a resistência ao 5-FC seja de consciência popular, a base genética da regulação da resistência permanece sendo um desafio que precisa de mais estudos para compreensão dos mecanismos de resistência.

O cloridrato de terbinafina (TBF) é uma alilamina sintética cujo mecanismo de ação consiste na inibição da enzima esqualeno epoxidase que participa da primeira etapa da síntese do ergosterol, interferindo na função da membrana fúngica e levando à morte celular. O TBF tem sido utilizado com sucesso no tratamento de infecções fúngicas da pele e incorporado em formas de gel, creme e solução (DOS SANTOS et al., 2023). O TBF tem dificuldade em permear a barreira cutânea, e tal característica resulta no acúmulo do fármaco no estrato córneo (SC) após aplicação na pele, sendo sua baixa permeabilidade cutânea uma limitação para o tratamento (KARRI et al., 2015; DOS SANTOS et al., 2023).

A griseofulvina, um produto metabólico do *Penicillium griseofulvum*, possui efeito sobre dermatofitose e o com desenvolvimento de uma formulação oral bem-sucedida que tem

sido usada até hoje para o tratamento de tinea capitis e outras formas de dermatofitose e onicomicose. A griseofulvina se liga à tubulina e inibe a montagem dos microtúbulos e a formação do fuso mitótico, atuando como um fármaco fungistático contra as espécies *Trichophyton*, *microsporum* e *Epidermophyton* (CARMO et al., 2023). No entanto, é ineficaz no tratamento de infecções associadas a fungos dimórficos, leveduras (*Malassezia* e *Candida*). A griseofulvina é absorvida pelo trato gastrointestinal e atinge as estruturas queratinizadas da pele, justificando seu sucesso no tratamento de dermatofitoses e onicomicoses. Considerando os efeitos adversos e as interações medicamentosas perigosas, o uso da griseofulvina é, na maioria dos casos, substituído por terbinafina e azóis (ARIS et al., 2022).

Ainda, há também os agentes antissépticos com atividade antifúngica, como a clorexidina. A clorexidina é um desinfetante catiônico biguanida, disponível como gluconato, cloridrato e acetato (ZHENG et al., 2022). É encontrada comercialmente como um enxaguatório bucal de 0,2% p/v, um spray oral de 0,2% p/v e um gel dental de 1% p/v. No entanto, todos eles têm um curto tempo de retenção na cavidade oral. Sua atividade antifúngica é obtida por meio da ligação de cátions da clorexidina à carga de superfície aniônica da parede celular fúngica, levando a uma diminuição na capacidade de adesão, à perda da integridade estrutural e, finalmente, à ruptura da parede celular (AL-ANI et al., 2021).

Além disso, o enxaguatório bucal com clorexidina tem sido amplamente utilizado na odontologia desde sua introdução. O consumo deste enxaguatório bucal destrói o biofilme microbiano (placa), reduzindo assim a inflamação. A clorexidina tem a capacidade de matar uma ampla gama de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos aeróbicos e anaeróbicos (JAMES et al., 2017; GELANO et al., 2019). Entretanto, melhorar a qualidade de vida relacionada à saúde bucal é um dos fatores considerados na pesquisa sobre enxaguatórios bucais, dentro deste contexto os relatórios indicaram que o uso prolongado de enxaguatório bucal de clorexidina pode estar associado a efeitos colaterais, como irritação na boca, pigmentação dos dentes, carga na língua e comprometimento do paladar (NAVABI et al., 2024). Neste tocante, visa-se uma necessidade de encontrar alternativas novas mais eficazes no controle fúngico.

3.5 Novas estratégias para tratamento

A resistência antimicrobiana (RAM) é reconhecida como um dos maiores desafios globais da atualidade, dificultando o tratamento de infecções e representando uma ameaça

crescente à saúde pública. Entre os fatores que agravam essa situação, destaca-se a falta de conscientização da população, que contribui para o uso inadequado de medicamentos. Nesse sentido, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reforça a necessidade de campanhas educativas e ações de sensibilização como medidas fundamentais para conter a progressão desse problema (ALZAHARAN et al., 2024). Com o passar das décadas, a RAM tem impulsionado o surgimento de patógenos multirresistentes, intensificando as dificuldades no manejo de infecções. Embora a resistência possa ocorrer naturalmente, práticas como o uso indiscriminado de antimicrobianos e a negligência em medidas de prevenção e controle de infecções em ambientes de saúde são apontadas como fatores críticos para sua aceleração (ANAND et al., 2019; BUISING et al., 2024).

Além disso, a partir da década de 1960, a descoberta de novos antimicrobianos, incluindo antifúngicos, sofreu uma desaceleração significativa. Para enfrentar o desafio da resistência microbiana nesse período, investiu-se em modificações químicas de moléculas existentes, dando início à chamada "era da química medicinal". Essas alterações ampliaram temporariamente a eficácia dos medicamentos, mas também estimularam a adaptação dos microrganismos, culminando no surgimento de cepas resistentes. Nas últimas três décadas, apenas duas novas classes de antibióticos foram introduzidas no mercado, enquanto o desenvolvimento de antifúngicos enfrenta obstáculos ainda maiores. Esse cenário reflete o avanço da chamada "era da resistência" (FINK, UCHMAN, 2021). Neste contexto, há uma demanda crescente para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos que sejam capazes de diminuir o uso de antifúngicos e enfrentar o desenvolvimento de resistência.

Em vista disso, alguns estudos atuais trazem alternativas para possíveis novos fármacos. Azadi et al. (2024) exploraram o potencial da nanotecnologia em novos fármacos antimicrobianos, destacando a eficácia antifúngica do $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2/\text{Schiff-base}/(\text{II})$ MNPs contra várias cepas de *Candida*, com inibição significativa em baixas concentrações. Silva et al. (2024) demonstraram que peptídeos antimicrobianos inibem o crescimento de *Candida albicans* e outras espécies, induzindo permeabilização da membrana e produção de espécies reativas de oxigênio, sem toxicidade para células de mamíferos. Guimarães et al. (2021) revisaram o potencial de plantas medicinais, como *Allium sativum* e óleos essenciais, na redução de biofilmes de *Candida*, destacando compostos com propriedades antimicrobianas. El-Newary et al. (2023) mostraram que o suco de *Chenopodium murale* tem efeito antifúngico em candidíase oral, aumentando a resposta imunológica em ratos.

Paralelamente, o desenvolvimento de compostos antimicrobianos advindo da síntese primorosa de compostos químicos permite o desenvolvimento de medicamentos com

atividade biológica potencializada e diminuição de efeitos colaterais. Compostos orgânicos heterocíclicos contendo S, O₂ e N₂ são moléculas orgânicas de grande importância com excelentes usos em indústrias, farmácia, sensoriamento, medicamentos, embalagens de alimentos, bem como outras áreas (MOHAMMAD ABU-TAWEEL et al., 2022; KABI et al., 2022). Esses compostos orgânicos podem se organizar através de múltiplos íons metálicos, bem como quelatos estáveis projetados que mostram um papel influente nas indústrias, medicina e agricultura. Entre esses compostos, temos as guanidinas que podem ser descritas como o análogo nitrogenado do ácido carbônico e como bases orgânicas fortes protonadas em condições fisiológicas. Ademais, por conta das extraordinárias características doadoras da guanidina, eles podem estabilizar diversos metais com vários estados de oxidação que lhes fornecem uma valiosa química bio-inorgânica (ABU-DIEF et al., 2024; KIM et al., 2021).

3.5.1 Propriedades da guanidina e seus derivados

Guanidinas são uma classe importante de compostos orgânicos, cujos fragmentos são incorporados em substâncias naturais e sintéticas que possuem atividade fisiológica. Recentemente, o interesse em moléculas sintéticas contendo guanidina aumentou extremamente, e agora, derivados de guanidina são amplamente usados em química farmacêutica/médica, catálise, química supramolecular e química de materiais (MARTYNOVICH et al., 2024). O fragmento de guanidina (ou similar) altamente básico forma ligações de coordenação e de hidrogênio com metais e ácidos (ADAMOVICH et al., 2021; PACKIARAJ et al., 2015).

As guanidinas e seus derivados apresentam simultaneamente uma função amina e uma função imina, o que facilita a compreensão do seu caráter *N*-nucleofílico e eletrofílico. Assim, a função amina é responsável pelo caráter *N*-nucleofílico e pelas reações de alquilação e acilação. O caráter eletrofílico é encarregado pela função imina, importante em sistemas catalíticos e em casos de compostos com fortes propriedades nucleofílicas (DROZDOV & KOTOV, 2021; YUAN et al., 2017). A guanidina é considerada como uma molécula estável, em razão da reação de protonação, o cátion guanidínio é formado mudando sua carga positiva por meio de formas de ressonância. Desta maneira, explica a estabilidade da guanidina, sendo quase idêntica aos compostos aromáticos, com seus seis elétrons π em orbitais de ligação, o que é chamado de sistema de deslocalização π . A deslocalização do par solitário de elétrons do nitrogênio faz com que a guanidina seja um excelente ligante para complexação de metais, ligação de hidrogênio e interação com moléculas deficientes em elétrons (YAMADA et al., 2009).

Como citado anteriormente, as guanidinas possuem ressonância e derivados, isso justifica suas fortes propriedades básicas denominadas de superbases ou esponjas de prótons dada a alta basicidade de Bronsted. Eles são de fato mais fortes do que outros compostos de nitrogênio, sendo amplamente explorados em várias reações catalisadas por bases (ALONSO-MORENO et al., 2014; YAMADA et al., 2009). Essas superbases e seus sais são, portanto, elementos químicos muito valiosos, utilizados como catalisadores em síntese orgânica e em muitas outras reações clássicas. Além da basicidade de Bronsted, as guanidinas podem ser bases de Lewis eficientes, bem como doadores e aceptadores de ligações de hidrogênio, enquanto os sais de guanídio apresentam uma acidez de Bronsted fraca e são doadores catiônicos de ligações de hidrogênio (ISHIKAWA, 2009).

As funcionalidades da guanidina são encontradas em uma variedade de compostos naturais, seja na forma cíclica ou como grupos terminais de substituintes pendentes (MURTAZA et al., 2012). Conforme observado na literatura, existem estudos com os portadores de guanidina que apresentam diversas atividades biológicas, sendo assim, com potencial de se tornarem agentes terapêuticos, como: antitumoral, antibacteriana, antifúngica, antiprotozoária e antiviral (SHAW et al., 2015). Como um grupo funcional comum, a guanidina foi identificada no projeto e desenvolvimento de agentes antibacterianos e o grupo guanidina também é encontrado em antibióticos existentes, como estreptomicina, trimetoprima e clorexidina. Atualmente, vários compostos de guanidina foram relatados como agentes antimicrobianos promissores, incluindo H-BDF e NCL195 (LI et al., 2023).

Um trabalho de grande relevância realizado por Baugh (2022), fez um compilado sobre os estudos que apresentaram atividade antifúngica contra patógenos humanos que em sua composição química possuíam compostos de guanidina entre 2004 e 2022. O estudo demonstrou que a forte basicidade das guanidinas nas moléculas parece ser vantajosa, possivelmente devido à interação com a parede celular fúngica carregada negativamente. Entretanto, muitos desses compostos ainda carecem de dados de citotoxicidade e informações detalhadas sobre seus mecanismos de ação, o que seria extremamente útil.

4. METODOLOGIA

4.1 Obtenção da molécula química

O complexo foi sintetizado e caracterizado no Department of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, University of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska 68198, United States.

4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do composto foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo de acordo com as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute M27-A3 (CLSI, 2008). Realizou-se a avaliação da atividade antifúngica do composto com ligante de guanidina frente a cepa padrão de *Candida* sp. oriunda da *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, EUA): *C. albicans* (ATCC 90028). Utilizou-se também um isolado da mucosa oral oriundo de indivíduos com HIV/AIDS identificado como ISO 03, obtido do banco micológico do Laboratório de Pesquisa microbiológica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. A pesquisa foi conduzida com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS, sob o parecer CAAE 30746214.30000.0021. A suspensão das leveduras foi preparada em solução salina estéril (0,9% NaCl) e foram padronizadas no espectrofotômetro à 530 nm para as leveduras, condizente com uma concentração de $2,5 \times 10^6$ UFC/mL.

O composto com ligante de guanidina foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) sendo esta menor que 5%, com a submissão a diluições sucessivas (1:2) em microplacas de 96 poços contendo o meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640), nas concentrações de 0,39 a 50 µg/mL. Os controles negativos (composto com ligante de guanidina e RPMI-1640) e positivos (inóculo e meio de cultura RPMI-1640) foram inseridos nas microplacas. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24h. A leitura foi realizada visualmente e determinou-se a CIM como a menor concentração que reduziu 100% do crescimento fúngico para o composto AUD 1-98 quando comparado aos controles positivos. Estes ensaios foram realizados em triplicata em momentos diferentes.

Após a determinação da CIM, a atividade fungicida do composto AUD 1-98 foi avaliada. Uma alíquota de 10 µL dos poços que apresentaram CIM foi transferida para placas de Petri contendo ágar Sabouraud. As placas foram incubadas a 37°C por 24-48 h. A menor concentração que não apresentou crescimento de unidade formadora de colônia (UFC) foi considerada como a concentração fungicida mínima (CFM).

4.3 Avaliação da cinética de crescimento

O ensaio de cinética de crescimento de *C. albicans* ATCC 90028 e ISO 03 foi realizado de acordo com a metodologia de Klepser et al. (1998) com modificações. Após agitação por um minuto em vórtex, 100 µL do caldo contendo o inóculo foram transferidos para 5 mL de solução salina (0,85%). O inóculo foi ajustado para uma concentração de $2,5 \times$

10^6 células/mL, com base na contagem realizada na câmara de Neubauer.

Sendo então diluídas 1:50 e 1:20 no meio RPMI-1640. Posteriormente, foi realizado o cálculo das concentrações de CIM e 2xCIM para o composto AUD 1-98 de acordo com a fórmula:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Para a clorexidina foi realizada a diluição de 1:100 para atingir a concentração correspondente a 0,12%, posteriormente foi feito o cálculo da fórmula acima para a sua concentração de CIM (4,68 mg/mL). Os tubos de uso foram preparados com 1 mL do inóculo 1:20 + 1 mL do tratamento. Em seguida, após o plaqueamento do tempo 0 h, os tubos foram incubados no *Shaker* com agitação de 100 rpm a 37° C. As leveduras em meio RPMI-1640 serviram como controle positivo individualmente, e o meio RPMI-1640 sozinho serviu como controle negativo para o ensaio.

Em cada intervalo de tempo (0, 4, 8, 12, 24, 28, 32, 36, 44 e 48 h), diluições seriadas foram realizadas com adição de 100 µL de cada tratamento e controle em 900 µL de solução salina estéril (0,85%). Posteriormente, alíquotas de 10 µL das diluições foram plaqueadas em *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) em triplicata e incubadas a 37° C por 24h. A contagem de células viáveis foi realizada e os resultados foram expressos em células/mL. A atividade fungicida do composto AUD 1-98 foi considerada como sendo $< 3 \log_{10}$ em UFC/mL em comparação com o controle positivo (Klepser et al., 1998).

O ensaio foi executado em três momentos diferentes. A análise estatística foi avaliada perante o gráfico de curva de morte feito no programa Prism - GraphPad versão 9.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que o composto AUD 1-98 apresentou CIM no valor de 50 µg/mL frente *C. albicans* ATCC e o isolado oral (Tabela 1).

Tabela 1 - Efeito do composto com ligante de guanidina na Concentração Inibitória Mínima frente a ATCC 90028 e isolado oral.

Cepas	CIM (µg/mL)		CFM (µg/mL)
	AUD 1-98	CLO	AUD 1-98
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	50	4,68	50
Isolado oral ISO 03	50	4,68	50

CIM: Concentração inibitória mínima; CFM: Concentração fungicida mínima; AUD 1-98: composto com ligante de guanidina; CLO: clorexidina.

Embora os fungos tenham um impacto negativo significativo na saúde humana, apenas algumas classes de medicamentos antifúngicos estão disponíveis atualmente para tratar essas infecções. Em geral, o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos tem sido lento, em grande parte devido à natureza eucariótica das células fúngicas, aos desafios associados à permeabilidade de compostos através da parede e membrana celular fúngica e ao interesse limitado da indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos antifúngicos. De fato, uma nova classe de antifúngicos não entrou na prática clínica desde meados dos anos 2000 (ROEMER, KRYSAN, 2014; REVIE et al., 2018; PERLIN et al., 2017; LEE et al., 2021).

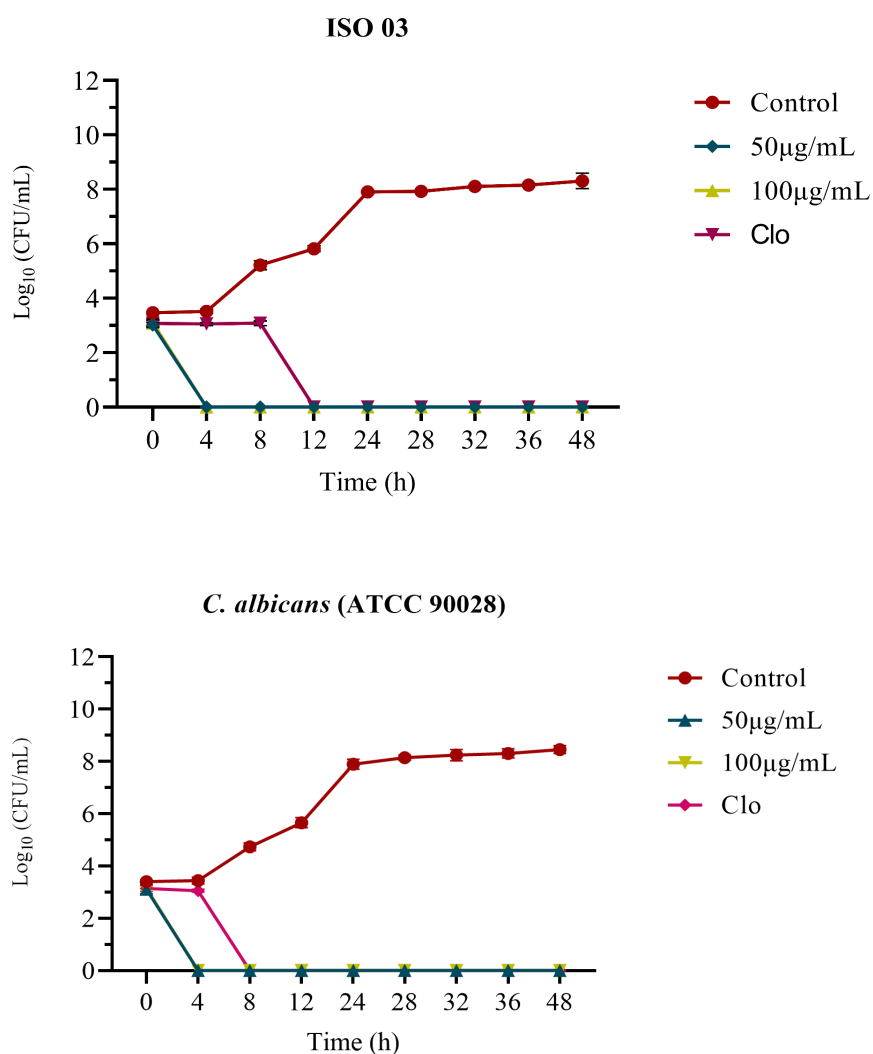
Diante disso, a descoberta de novos agentes terapêuticos capazes de combater microrganismos de diferentes famílias pode fornecer uma opção promissora para tratar doenças infecciosas modernas. Em particular, compostos contendo guanidina surgem como antimicrobianos promissores que são ativos contra diversas bactérias e leveduras, como por exemplo a isopropoxibenzeno guanidina, um ligante que tem alvo moleculares antimicrobianos capazes de causar danos a membrana citoplasmática facilitando a mecanismo de inibição (KIM et al., 2021).

O CIM e a CFM do composto AUD 1-98 no valor de 50 µg/mL para *C. albicans* e ISO 03 foram elevados quando comparado com outros compostos contendo o ligante de guanidina relatados na literatura. O estudo de Grinco et al. (2024) observou que o grupo ligantes de guanidina preniladas com fragmentos labdânicos apresentaram CIM frente a *C. albicans* com variação de resultados entre 16 µg/mL e 8 µg/mL. Outro trabalho realizado por Cho et al. (2020) apresentou uma modificação química em homopolímeros de policarbonato guanidinilado contendo atividade antimicrobiana, o valor de CIM encontrado para *C. albicans* foi de 40 µg/mL.

A diferença nos valores de CIM pode estar relacionada com a composição estrutural de cada composto e à interação sinérgica entre seus constituintes, a alteração na cadeia química do composto guanidina com a ativação do grupo carboxila e interação com a base guanidina destacado no estudo de Grinco et al. (2024) e a adição de mais carbonos no trabalho de Cho et al. (2020), justificam que essas características estruturais e as interações químicas específicas influenciam diretamente a capacidade dos compostos de se ligarem aos alvos biológicos e assim, potencializam a atividade antimicrobiana. No caso do composto AUD 1-98, a ausência de tais modificações podem explicar a CIM mais alta observada.

Os resultados do estudo cinético corroboraram com os encontrados no ensaio de microdiluição em caldo. De acordo com a Figura 4, é possível observar que a concentração de CIM e 2xCIM da AUD 1-98 a partir do tempo de 4h exibiram atividade fungicida tanto para a cepa ATCC quanto para o isolado oral. A clorexidina apresentou atividade fungicida a partir das 8 h na concentração de CIM. Em contraste, o controle positivo iniciou seu crescimento a partir do tempo de 4 h e aumentou gradativamente.

Figura 4. Curva cinética de crescimento de *Candida albicans* e isolado oral



Fonte: Autoral, 2024.

Os estudos de crescimento cinético descrevem as interações fármaco-microrganismo de uma forma mais dimensional por uma integração dinâmica de concentração e tempo, sendo uma abordagem mais racional do que o valor clássico de CIM (GIL-ALONSO et al., 2019). Neste trabalho, ambas curvas cinéticas de crescimento demonstraram que o composto é fungicida na concentração de CIM e 2xCIM a partir de 4 h frente às leveduras, indicando que

a concentração de CIM e CFM definidas anteriormente realmente possuem capacidade de inibir 100% do crescimento dos microrganismos testados.

Comparando com os dados disponíveis na literatura, o composto AUD 1-98 se destaca por sua atividade uma vez que não está combinado com outros antifúngicos e não detém de modificações estruturais químicas, Scorneaux et al. (2017) comparou um composto inibidor com alterações químicas com outros antifúngicos, como o fluconazol e relatou inibição de 50 e 90% contra espécies de *Candida*, exibindo assim, resultado inferior ao composto AUD 1-98. O tempo de resposta mais rápido pode ser decisivo em infecções fúngicas graves, pois um controle mais ágil diminui o risco de progressão da doença, como por exemplo a anfotericina B e o fluconazol que levam à morte celular, embora eficazes, o tempo de ação pode variar entre 12 e 24 horas (ZHOU, REYNOLDS, 2024). Portanto, o composto AUD 1-98 mostra-se vantajoso com ação a partir de 4 horas.

A atividade antifúngica do composto AUD 1-98 possivelmente ocorre em razão da composição de moléculas contendo ligantes de guanidina possuírem habilidade de infiltrar em membranas e paredes celulares. Antonopolis (2018) e seus colaboradores afirmam que o guanidínio e seus derivados têm sido de amplo interesse em pesquisa por décadas, atribuídos à sua atividade antimicrobiana e capacidade de ligação/penetração na membrana. Outros derivados de guanidina apresentam atividade antifúngica através da inibição de uma enzima alvo na via de biossíntese do ergosterol, quando há a interação de um composto com o ergosterol a estrutura da membrana celular é prejudicada, fazendo com que perca a sua função (KATO et al., 2021).

Esse mecanismo é especialmente importante em casos de resistência a antifúngicos convencionais, como os azóis, já que os compostos contendo guanidina oferecem uma via alternativa de inibição à levedura, potencialmente superando as limitações atuais dos tratamentos disponíveis (HATA et al., 2010). O potencial antifúngico evidenciado no composto com ligante de guanidina é atrativo devido a guanidina possuir diversas aplicações, especificamente antifúngicas, por ser um composto orgânico de fácil alteração estrutural, pode ser empregada como biguanidas, bis-guanidinoetil, guanil-hidrazona, macrocíclicos de amidinoureia, ferrocenilguanidina e entre outros derivados com ação antimicrobiana, a sua versatilidade permite compostos com capacidade de atuar em combinação ou não com antifúngicos existentes para gerar alternativas terapêuticas e lidar com cepas resistentes (KIM et al., 2021; GUL et al., 2014).

Apesar do potencial apresentado, para avançar no desenvolvimento dos compostos com ligantes de guanidina como novos agentes antifúngicos, é fundamental uma avaliação

aprofundada, como estudos de toxicidade e testes *in vivo*. Essas investigações são indispensáveis para estabelecer a viabilidade terapêutica dos compostos com ligantes de guanidina e para melhorar as opções de tratamento antifúngico disponíveis.

6. CONCLUSÃO

Desta forma, o estudo revelou que o composto AUD 1-98, que contém ligantes de guanidina, exibe uma atividade antifúngica notável frente *Candida albicans*. A ação do AUD 1-98, que demonstra efeito fungicida em 4 horas, é particularmente significativa no tratamento de infecções fúngicas graves, onde a celeridade é essencial para prevenir a progressão da doença. Embora a CIM do AUD 1-98 seja superior ao de outros ligantes de guanidina relatados, sua eficácia sem a necessidade de modificações estruturais complexas e sua ação o destaca como uma alternativa promissora. Os compostos com guanidina têm se mostrado eficazes na inibição de patógenos resistentes, oferecendo uma nova estratégia para o tratamento de infecções fúngicas. Entretanto, para validar completamente a viabilidade terapêutica do AUD 1-98 e de compostos semelhantes, são necessários estudos adicionais, incluindo avaliações de toxicidade e testes em modelos biológicos. Esses passos são fundamentais para aprimorar e expandir as opções de tratamento antifúngico disponíveis, oferecendo novas perspectivas para o combate a infecções fúngicas resistentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-DIEF, A. M., EL-DABEA, T., EL-KHATIB, R. M., et al. Fabrication, physicochemical characterization and theoretical studies of some new mixed ligands complexes based on N-(1H-benzimidazol-2-yl)-guanidine and 1, 10-phenanthroline: DNA interaction, biological applications and molecular docking approach. *Journal of molecular structure*, v. 1310, n. 138328, p. 138328, 2024. DOI: 10.1016/j.molstruc.2024.138328;

ADAMOVICH, S. N., FILATOVA, E. G., POZHIDAEV, Y. N., et al. Natural zeolite modified with 4-(3-triethoxysilylpropyl) thiosemicarbazide as an effective adsorbent for Cu(II), Co(II) and Ni(II). *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 129, p. 396–409, 2021. DOI: 10.1016/j.jtice.2021.09.014;

AGNELLI, C., VALERIO, M., BOUZA, E., et al. Prognostic factors of *Candida* spp. bloodstream infection in adults: A nine-year retrospective cohort study across tertiary hospitals in Brazil and Spain. *Lancet regional health. Americas*, v. 6, n. 100117, p. 100117, 2022. DOI: 10.1016/j.lana.2021.100117;

AGUIEIRAS, M. C. L., RESENDE, L. M., SOUZA, T. A. M., et al. Potent anti-*Candida* fraction isolated from capsicum chinense fruits contains an antimicrobial peptide that is similar to plant defensin and is able to inhibit the activity of different α -amylase enzymes. *Probiotics and antimicrobial proteins*, v. 13, n. 3, p. 862–872, 2021. DOI: 10.1007/s12602-020-09739-3;

AL-ANI, E., HILL, D., DOUDIN, K. Chlorhexidine mucoadhesive buccal tablets: The impact of formulation design on drug delivery and release kinetics using conventional and novel dissolution methods. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, v. 14, n. 6, p. 493, 2021. DOI: 10.3390/ph14060493;

ALFOUZAN, W., AHMAD, S., DHAR, R., et al. Molecular epidemiology of *Candida auris* outbreak in a major secondary-care hospital in Kuwait. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, v. 6, n. 4, p. 307, 2020. DOI: 10.3390/jof6040307;

AL-MANEI, K., SOBKOWIAK, M. J., NAGADIA, R. H., et al. Mycobiota profile of oral fungal infections in head and neck cancer patients receiving radiotherapy: A 6-year retrospective MALDI-TOF mass spectrometry study. *Oral oncology*, v. 146, n. 106556, p. 106556, 2023. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2023.106556;

ALONSO-MORENO, C., ANTIÑOLO, A., CARRILLO-HERMOSILLA, F., et al. Guanidines: from classical approaches to efficient catalytic syntheses. *Chemical Society reviews*, v. 43, n. 10, p. 3406–3425, 2014. DOI: 10.1039/c4cs00013g;

ALZHRANI, W. M., ALKLIKH, L. S., ALWAFI, E. B., et al. Awareness of antimicrobial resistance and appropriate handling of antibiotics by the public in Saudi Arabia: A cross-sectional study using a quiz game. *PEC innovation*, v. 5, n. 100318, p. 100318, 2024. DOI: 10.1016/j.pecinn.2024.100318;

ANAND, U. et al. A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: Potential avenues of biocompatible drug discovery. *Metabolites*, v. 9, n. 11, p. 258, 2019;

ANDERSON, T. M., CLAY, M. C., CIOFFI, A. G., et al. Amphotericin forms an

extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nature chemical biology*, v. 10, n. 5, p. 400–406, 2014. DOI: 10.1038/nchembio.1496. DOI: 10.1038/nchembio.1496;

ASHRAF, M. V. et al. Phytochemicals as antimicrobials: Prospecting Himalayan medicinal plants as source of alternate medicine to combat antimicrobial resistance. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland), v. 16, n. 6, p. 881, 2023;

ARMSTRONG-JAMES, D., MEINTJES, G., BROWN, G. D. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. *Trends in microbiology*, v. 22, n. 3, p. 120–127, 2014. DOI: 10.1016/j.tim.2014.01.001;

ARIS, P., WEI, Y., MOHAMADZADEH, M., et al. Griseofulvin: An updated overview of old and current knowledge. *Molecules* (Basel, Switzerland), v. 27, n. 20, p. 7034, 2022. DOI: 10.3390/molecules27207034;

AZADI, S., AZIZIPOUR, E., AMANI, A. M., et al. Antifungal activity of Fe₃O₄@SiO₂/Schiff-base/Cu(II) magnetic nanoparticles against pathogenic *Candida* species. *Scientific reports*, v. 14, n. 1, 2024. DOI: 10.1038/s41598-024-56512-5;

BALEF, S. S. H., HOSSEINI, S. S., ASGARI, N., et al. The inhibitory effects of carvacrol, nystatin, and their combination on oral candidiasis isolates. *BMC research notes*, v. 17, n. 1, 2024. DOI: 10.1186/s13104-024-06767-y;

BARROS, N., ROSENBLATT, R. E., PHIPPS, M. M., et al. Invasive fungal infections in liver diseases. *Hepatology communications*, v. 7, n. 9, 2023. DOI: 10.1097/HC9.0000000000000216;

BAUGH, S. D. P. Guanidine-containing antifungal agents against human-relevant fungal pathogens (2004–2022)—A review. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland), v. 8, n. 10, p. 1085, 2022. DOI: 10.3390/jof8101085;

BESCOS, R., ASHWORTH, A., CUTLER, C., et al. Effects of Chlorhexidine mouthwash on the oral microbiome. *Scientific reports*, v. 10, n. 1, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-61912-4.

BITAR, D., LORTHOLARY, O., LE STRAT, Y., et al. Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001–2010. *Emerging infectious diseases*, v. 20, n. 7, p. 1163–1169, 2014. DOI: 10.3201/eid2007.140087;

BRAGA, P. R., CRUZ, I. L., ORTIZ, I., et al. Secular trends of candidemia at a Brazilian tertiary care teaching hospital. *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, v. 22, n. 4, p. 273–277, 2018. DOI: 10.1016/j.bjid.2018.07.008;

BUISING, K., NAIDU, R., PRASAD, S., et al. Knowledge, attitudes, and readiness about critical antimicrobial resistant organisms among healthcare workers at colonial war memorial hospital in Fiji: a pre and post intervention study. *Antimicrobial resistance and infection control*, v. 13, n. 1, 2024. DOI: 10.1186/s13756-024-01439-9;

CARMELLO, J. C., ALVES, F., G. BASSO, F., et al. Treatment of oral candidiasis using photodithazine®- mediated photodynamic therapy *in vivo*. *PloS one*, v. 11, n. 6, p. e0156947,

2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0156947;

CARMO, A., ROCHA, M., PEREIRINHA, P., et al. Antifungals: From pharmacokinetics to clinical practice. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), v. 12, n. 5, p. 884, 2023. DOI: 10.3390/antibiotics12050884;

CHO, C. A., LIANG, C., PERERA, J., et al. Guanidinylated amphiphilic polycarbonates with enhanced antimicrobial activity by extending the length of the spacer arm and micelle self-assembly. *Macromolecular bioscience*, v. 20, n. 7, 2020. DOI: 10.1002/mabi.202000065;

CIUREA, C. N., KOSOVSKI, I.-B., MARE, A. D., et al. *Candida* and candidiasis-opportunism versus pathogenicity: A review of the virulence traits. *Microorganisms*, v. 8, n. 6, p. 857, 2020. DOI: 10.3390/microorganisms8060857.

CLANCY, C. J., NGUYEN, M. H. Finding the “missing 50%” of invasive candidiasis: How nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 56, n. 9, p. 1284–1292, 2013. DOI: 10.1093/cid/cit006;

CLEVELAND, A. A., FARLEY, M. M., HARRISON, L. H., et al. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: Results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008-2011. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 55, n. 10, p. 1352–1361, 2012. DOI: 10.1093/cid/cis697;

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. M27-A3. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard (3rd ed), 28 (2008).

COWEN, L. E., SANGLARD, D., HOWARD, S. J., et al. Mechanisms of antifungal drug resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 5, n. 7, p. a019752, 2015. DOI: 10.1101/cshperspect.a019752;

DOS SANTOS, F. L., ZILLES, J. C., MACHADO, A. U., et al. Polymeric nanocapsules containing ozonated oil and terbinafine hydrochloride as a potential treatment against dermatophytes. *AAPS PharmSciTech*, v. 24, n. 7, 2023. DOI: 10.1208/s12249-023-02657-x;

ENIKOLOPOV INSTITUTE OF SYNTHETIC POLYMERIC MATERIALS, RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES, UL. PROF SOYUZNAYA 70, MOSCOW, 117393 RUSSIA, DROZDOV, F. V., KOTOV, V. M., et al. Guanidine: A simple molecule with great potential: From catalysts to biocides and molecular glues. *INEOS OPEN*, 2021. DOI: 10.32931/io2030r;

ELLEPOLA, A. N. B., DASSANAYAKE, R. S., KHAN, Z. Impact of brief exposure to drugs with antifungal properties on the susceptibility of oral *Candida dubliniensis* isolates to lysozyme and lactoferrin. *Medical principles and practice: international journal of the Kuwait University, Health Science Centre*, v. 27, n. 6, p. 523–530, 2018. DOI: 10.1159/000493391;

EL-NEWARY, S. A., ABD ELKARIM, A. S., ABDELWAHED, N. A. M., et al. *Chenopodium murale* juice shows anti-fungal efficacy in experimental oral candidiasis in immunosuppressed rats in relation to its chemical profile. *Molecules* (Basel, Switzerland), v.

28, n. 11, p. 4304, 2023. DOI: 10.3390/molecules28114304;

FISHER, M. C., ALASTRUEY-IZQUIERDO, A., BERMAN, J., et al. Tackling the emerging threat of antifungal resistance to human health. *Nature reviews. microbiology*, v. 20, n. 9, p. 557–571, 2022. DOI: 10.1038/s41579-022-00720-1;

FINK, K., UCHMAN, M. Boron cluster compounds as new chemical leads for antimicrobial therapy. *Coordination chemistry reviews*, v. 431, n. 213684, p. 213684, 2021. DOI: 10.1016/j.ccr.2020.213684;

GELANO, T. F., BACHA, Y. D., ABATE, D. Effect of chlorhexidine cord application on prevention of neonatal sepsis in developing countries: Systematic review and meta-analysis. *International journal of health sciences*, v. 13, n. 1, p. 40–51, 2019;

GIL-ALONSO, S., QUINDÓS, G., CANTÓN, E., et al. Killing kinetics of anidulafungin, caspofungin and micafungin against *Candida parapsilosis* species complex: Evaluation of the fungicidal activity. *Revista iberoamericana de micología*, v. 36, n. 1, p. 24–29, 2019. DOI: 10.1016/j.riam.2018.12.001;

GRINCO, M., MORARESCU, O., LEMBO, F., et al. Synthesis and antimicrobial properties of guanidine-functionalized labdane type diterpenoids. *European journal of medicinal chemistry*, v. 264, n. 115981, p. 115981, 2024. DOI: 10.1016/j.ejmech.2023.115981;

GOEMAERE, B., BECKER, P., VAN WIJNGAERDEN, E., et al. Increasing candidaemia incidence from 2004 to 2015 with a shift in epidemiology in patients preexposed to antifungals. *Mycoses*, v. 61, n. 2, p. 127–133, 2018. DOI: 10.1111/myc.12714;

GOMES, A. R., VARELA, C. L., PIRES, A. S., et al. Synthetic and natural guanidine derivatives as antitumor and antimicrobial agents: A review. *Bioorganic chemistry*, v. 138, n. 106600, p. 106600, 2023. DOI: 10.1016/j.bioorg.2023.106600;

GUIMARÃES, R., MILHO, C., LIBERAL, Â., et al. Antibiofilm potential of medicinal plants against *Candida* spp. Oral biofilms: A review. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, v. 10, n. 9, p. 1142, 2021. DOI: 10.3390/antibiotics10091142;

GUL, R., RAUF, M. K., BADSHAH, A., et al. Ferrocene-based guanidine derivatives: In vitro antimicrobial, DNA binding and docking supported urease inhibition studies. *European journal of medicinal chemistry*, v. 85, p. 438–449, 2014. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.07.109;

GUPTA, A. K., ELEWSKI, B., JOSEPH, W. S., et al. Treatment of onychomycosis in an era of antifungal resistance: Role for antifungal stewardship and topical antifungal agents. *Mycoses*, v. 67, n. 1, 2024. DOI: 10.1111/myc.13683;

HASHEMI, M. M., HOLDEN, B. S., COBURN, J., et al. Proteomic analysis of resistance of gram-negative bacteria to chlorhexidine and impacts on susceptibility to colistin, antimicrobial peptides, and ceragenins. *Frontiers in microbiology*, v. 10, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00210;

HATA, M., ISHII, Y., WATANABE, E., et al. Inhibition of ergosterol synthesis by novel antifungal compounds targeting C-14 reductase. *Medical mycology: official publication of the*

International Society for Human and Animal Mycology, v. 48, n. 4, p. 613–621, 2010. DOI: 10.3109/13693780903390208;

ISHIKAWA, T. (Org.). Superbases for organic synthesis: Guanidines, amidines, phosphazenes and related organocatalysts. . [S.l.], Wiley. 2009. DOI: 10.1002/9780470740859;

JAMES, P., WORTHINGTON, H. V., PARNELL, C., et al. Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. The Cochrane library, v. 2021, n. 12, 2017. DOI: 10.1002/14651858.cd008676.pub2;

KABI, A. K., SRAVANI, S., GUJJARAPPA, R., et al. An introduction on evolution of azole derivatives in medicinal chemistry. Materials Horizons: From Nature to Nanomaterials, Singapore, Springer Singapore, 2022. p. 79–99.

KANAFANI, Z. A., PERFECT, J. R. Resistance to antifungal agents: Mechanisms and clinical impact. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America, v. 46, n. 1, p. 120–128, 2008. DOI: 10.1086/524071;

KARRI, V. V. S. N. R., RAMAN, S. K., KUPPUSAMY, G., et al. Terbinafine hydrochloride loaded nanoemulsion based gel for topical application. Journal of pharmaceutical investigation, v. 45, n. 1, p. 79–89, 2015. DOI: 10.1007/s40005-014-0149-9;

KATO, I., UKAI, Y., KONDO, N., et al. Identification of thiazoyl guanidine derivatives as novel antifungal agents inhibiting ergosterol biosynthesis for treatment of invasive fungal infections. Journal of medicinal chemistry, v. 64, n. 14, p. 10482–10496, 2021. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c00883;

KHALIFA, H. O., OREIBY, A., ABDELHAMID, M. A. A., et al. Biomimetic antifungal materials: Countering the challenge of multidrug-resistant fungi. Biomimetics (Basel, Switzerland), v. 9, n. 7, p. 425, 2024b. DOI: 10.3390/biomimetics9070425;

KHALIFA, H. O., ARAI, T., MAJIMA, H., et al. Genetic basis of azole and echinocandin resistance in clinical *Candida glabrata* in Japan. Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 64, n. 9, 2020. DOI: 10.1128/aac.00783-20;

KHALIFA, H. O., ARAI, T., MAJIMA, H., et al. Evaluation of Surveyor nuclease for rapid identification of FKS genes mutations in *Candida glabrata*. Journal of infection and chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy, v. 27, n. 6, p. 834–839, 2021. DOI: 10.1016/j.jiac.2021.01.016;

KHWAZA, V., ADERIBIGBE, B. A. Antifungal activities of natural products and their hybrid molecules. Pharmaceutics, v. 15, n. 12, p. 2673, 2023. DOI: 10.3390/pharmaceutics15122673;

KIM, S.-H., SEMENYA, D., CASTAGNOLO, D. Antimicrobial drugs bearing guanidine moieties: A review. European journal of medicinal chemistry, v. 216, n. 113293, p. 113293, 2021. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113293;

KIM, J. M., AHN, Y., LIPUMA, J. J., et al. Survival and susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex in chlorhexidine gluconate and benzalkonium chloride. Journal of industrial

microbiology & biotechnology, v. 42, n. 6, p. 905–913, 2015. DOI: 10.1007/s10295-015-1605-x;

KLEPSE, M. E.; ERNST, E. J.; LEWIS, R. E.; ERNST, M. E.; PFALLER, M. A. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: Proposal for standardized methods. Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 42, n. 5, p. 1207–1212, 1998. DOI 10.1128/aac.42.5.1207;

KOEHBACH, J., CRAIK, D. J. The vast structural diversity of antimicrobial peptides. Trends in pharmacological sciences, v. 40, n. 7, p. 517–528, 2019. DOI: 10.1016/j.tips.2019.04.012;

KOLLATH, D. R., DE MELO TEIXEIRA, M., BARKER, B. M. Advances in genomics of human fungal pathogens. Population Genomics: microorganisms. Cham, Springer International Publishing, 2018. p. 159–206;

KOTSAILIDI, E. A., KALOGIROU, E.-M., micHELOGIANNAKIS, D., et al. Hypersensitivity reaction of the gingiva to chlorhexidine: case report and literature review. Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology, v. 130, n. 2, p. 156- 160.e1, 2020. DOI: 10.1016/j.oool.2020.04.814;

KUMAR, R., SRIVASTAVA, V. Application of anti-fungal vaccines as a tool against emerging anti-fungal resistance. Frontiers in fungal biology, v. 4, 2023. DOI: 10.3389/ffunb.2023.1241539;

KUNATH, B. J., DE RUDDER, C., LACZNY, C. C., et al. The oral–gut microbiome axis in health and disease. Nature reviews. microbiology, 2024. DOI: 10.1038/s41579-024-01075-5;

KUNYEIT, L., KURREY, N. K., ANU-APPAIAH, K. A., et al. Probiotic yeasts inhibit virulence of non -*albicans* *Candida* species. mBio, v. 10, n. 5, 2019. DOI: 10.1128/mbio.02307-19;

LAMONT, R. J., KOO, H., HAJISHENGALLIS, G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. Nature reviews. microbiology, v. 16, n. 12, p. 745–759, 2018. DOI: 10.1038/s41579-018-0089-x;

LEE, Y., PUUMALA, E., ROBBINS, N., et al. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. Chemical reviews, v. 121, n. 6, p. 3390–3411, 2021. DOI: 10.1021/acs.chemrev.0c00199;

LI, J., ZHANG, X., HAN, N., et al. Mechanism of action of isopropoxy benzene guanidine against multidrug-resistant pathogens. microbiology spectrum, v. 11, n. 1, 2023. DOI: 10.1128/spectrum.03469-22. DOI: 10.1128/spectrum.03469-22;

MARTYNOVICH, E. F., LAZAREVA, N. L., RAKEVICH, A. L., et al. Synthesis, structure, spectral and luminescence studies of novel guanidinium aryl(oxy)(sulfanyl)(sulfonyl)acetates. Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy, v. 323, n. 124862, p. 124862, 2024. DOI: 10.1016/j.saa.2024.124862;

MASUR, H., READ, S. W. Opportunistic infections and mortality: Still room for improvement. The journal of infectious diseases, v. 212, n. 9, p. 1348–1350, 2015. DOI:

10.1093/infdis/jiv236;

MEURMAN, J. H., PÄRNÄNEN, P., KARI, K., et al. Effect of amine fluoride–stannous fluoride preparations on oral yeasts in the elderly: a randomised placebo-controlled trial. *Gerodontology*, v. 26, n. 3, p. 202–209, 2009. DOI: 10.1111/j.1741-2358.2008.00246.x;

MOHAMMAD ABU-TAWEEL, G., IBRAHIM, M. M., KHAN, S., et al. Medicinal importance and chemosensing applications of pyridine derivatives: A review. *Critical reviews in analytical chemistry*, v. 54, n. 3, p. 599–616, 2022. DOI: 10.1080/10408347.2022.2089839;

MOURAD, A., PERFECT, J. R. Present and future therapy of *Cryptococcus* infections. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland), v. 4, n. 3, p. 79, 2018. DOI: 10.3390/jof4030079;

MOYES, D. L.; RICHARDSON, J. P.; NAGLIK, J. R. *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. *Virulence*, v. 6, n. 4, p. 338–346, 2015.

MURTAZA, G., RAUF, M. K., BADSHAH, A., et al. Synthesis, structural characterization and in vitro biological screening of some homoleptic copper(II) complexes with substituted guanidines. *European journal of medicinal chemistry*, v. 48, p. 26–35, 2012. DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.11.029;

NAVABI, N., AFSHARI, Z., KAMYABI, H., et al. Side effects and short effects of using three common mouthwashes on oral health and quality of life: A quasi-experimental study. *International journal of dental hygiene*, v. 22, n. 3, p. 681–688, 2024. DOI: 10.1111/idh.12761;

NICOLA, A. M., ALBUQUERQUE, P., PAES, H. C., et al. Antifungal drugs: New insights in research & development. *Pharmacology & therapeutics*, v. 195, p. 21–38, 2019. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2018.10.008;

NUCCI, M., BARREIROS, G., GUIMARÃES, L. F., et al. Increased incidence of candidemia in a tertiary care hospital with the COVID-19 pandemic. *Mycoses*, v. 64, n. 2, p. 152–156, 2021. DOI: 10.1111/myc.13225;

OK, S.-M., HO, D., LYND, T., et al. *Candida* infection associated with salivary gland—A narrative review. *Journal of clinical medicine*, v. 10, n. 1, p. 97, 2020. DOI: 10.3390/jcm10010097;

PACKIARAJ, S., PUSHPAVENI, A., SENTHIL, C., et al. Preparation, thermal behavior, luminescent properties, and crystal structures of aminoguanidinium 2,n-pyridine-dicarboxylate (n = 3, 4, 5, and 6) salts. *Journal of thermal analysis and calorimetry*, v. 119, n. 1, p. 15–25, 2015. DOI: 10.1007/s10973-014-4098-3;

PAPPAS, P. G., KAUFFMAN, C. A., ANDES, D. R., et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the infectious diseases society of America. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, v. 62, n. 4, p. e1–e50, 2016. DOI: 10.1093/cid/civ933;

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and consequences

for treatment. The American journal of medicine, v. 125, n. 1, p. S3–S13, 2012. DOI: 10.1016/j.amjmed.2011.11.001;

PATIL, S., RAO, R. S., MAJUMDAR, B., et al. Clinical appearance of oral *Candida* infection and therapeutic strategies. Frontiers in microbiology, v. 6, 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01391;

PERLIN, D. S., RAUTEMAA-RICHARDSON, R., ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. The Lancet infectious diseases, v. 17, n. 12, p. e383–e392, 2017. DOI: 10.1016/s1473-3099(17)30316-x;

RAJENDRA SANTOSH, A. B., MUDDANA, K., BAKKI, S. R. Fungal infections of oral cavity: Diagnosis, management, and association with COVID-19. SN comprehensive clinical medicine, v. 3, n. 6, p. 1373–1384, 2021. DOI: 10.1007/s42399-021-00873-9;

RAUF, M. K., IMTIAZ-UD-DIN, BADSHAH, A. Novel approaches to screening guanidine derivatives. Expert opinion on drug discovery, v. 9, n. 1, p. 39–53, 2014. DOI: 10.1517/17460441.2013.857308;

REVIE, N. M., IYER, K. R., ROBBINS, N., et al. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. Current opinion in microbiology, v. 45, p. 70–76, 2018. DOI: 10.1016/j.mib.2018.02.005;

RICHARDSON, M., LASS-FLÖRL, C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. Clinical microbiology and infection, v. 14, p. 5–24, 2008. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2008.01978.x;

RICHE, C. V. W., CASSOL, R., PASQUALOTTO, A. C. Is the frequency of candidemia increasing in COVID-19 patients receiving corticosteroids?. Journal of fungi (Basel, Switzerland), v. 6, n. 4, p. 286, 2020. DOI: 10.3390/jof6040286;

ROEMER, T., KRYSAN, D. J. Antifungal drug development: Challenges, unmet clinical needs, and new approaches. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, v. 4, n. 5, p. a019703–a019703, 2014. DOI: 10.1101/cshperspect.a019703;

RODRIGUES, M. L., NOSANCHUK, J. D. Fungal diseases as neglected pathogens: A wake-up call to public health officials. PLoS neglected tropical diseases, v. 14, n. 2, p. e0007964, 2020. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007964;

SALIMNIA, H., FAIRFAX, M. R., LEPHART, P. R., et al. Evaluation of the FilmArray blood culture identification panel: Results of a multicenter controlled trial. Journal of clinical microbiology, v. 54, n. 3, p. 687–698, 2016. DOI: 10.1128/jcm.01679-15;

SANTOS, V., MEIRA, H., DE OLIVEIRA, B., et al. Oral candidiasis: A retrospective study of 276 Brazilian patients. Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP, v. 21, n. 3, p. 351, 2017. DOI: 10.4103/jomfp.jomfp_77_16;

SAMARANAYAKE, L. P., KEUNG LEUNG, W., JIN, L. Oral mucosal fungal infections. Periodontology 2000, v. 49, n. 1, p. 39–59, 2009. DOI: 10.1111/j.1600-0757.2008.00291.x;

SCORNEAUX, B., ANGULO, D., BORROTO-ESODA, K., et al. SCY-078 is fungicidal against *Candida* species in time-kill studies. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 61, n. 3, 2017. DOI: 10.1128/aac.01961-16;

SODRÉ, C. S., RODRIGUES, P. M. G., VIEIRA, M. S., et al. Oral mycobiome identification in atopic dermatitis, leukemia, and HIV patients – a systematic review. *Journal of oral microbiology*, v. 12, n. 1, p. 1807179, 2020. DOI: 10.1080/20002297.2020.1807179;

SEDGHIZADEH, P. P., MAHABADY, S., ALLEN, C. M. Opportunistic oral infections. *Dental clinics of North America*, v. 61, n. 2, p. 389–400, 2017. DOI: 10.1016/j.cden.2016.12.007;

SHEPARD, J. R., ADDISON, R. M., ALEXANDER, B. D., et al. Multicenter Evaluation of the *Candida albicans* / *Candida glabrata* Peptide Nucleic Acid Fluorescent In Situ Hybridization Method for Simultaneous Dual-Color Identification of *C. albicans* and *C. glabrata* Directly from Blood Culture Bottles. *Journal of clinical microbiology*, v. 46, n. 1, p. 50–55, 2008. DOI: 10.1128/jcm.01385-07;

SINGH, A., SINGH, J. V., RANA, A., et al. Monocarbonyl curcumin-based molecular hybrids as potent antibacterial agents. *ACS omega*, v. 4, n. 7, p. 11673–11684, 2019. DOI: 10.1021/acsomega.9b01109;

SITHEEQUE, M. A. M., SAMARANAYAKE, L. P. Chronic hyperplastic candidosis/candidiasis (candidal leukoplakia). *Critical reviews in oral biology and medicine: an official publication of the American Association of Oral Biologists*, v. 14, n. 4, p. 253–267, 2003. DOI: 10.1177/154411130301400403;

SILVA, M. S. da, TAVEIRA, G. B., SILVA GEBARA, R. da, et al. Understanding the mechanism of action of protease inhibitors in controlling the growth of the *Candida* Genus: potential candidates for development of new antifungal molecules. *Archives of microbiology*, v. 206, n. 6, 2024. DOI: 10.1007/s00203-024-03993-7;

SHAW, J. W., GRAYSON, D. H., ROZAS, I. Synthesis of guanidines and some of their biological applications. *Topics in Heterocyclic Chemistry*, Cham, Springer International Publishing, 2015. p. 1–51;

SHINO, B., PEEDIKAYIL, F. C., JAIPRAKASH, S. R., et al. Comparison of antimicrobial activity of chlorhexidine, coconut oil, probiotics, and ketoconazole on *Candida albicans* isolated in children with early childhood caries: An in vitro study. *Scientifica*, v. 2016, p. 1–5, 2016. DOI: 10.1155/2016/7061587;

SMITH, D. J., GOLD, J. A. W., BENEDICT, K., et al. Public health research priorities for fungal diseases: A multidisciplinary approach to save lives. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, v. 9, n. 8, p. 820, 2023. DOI: 10.3390/jof9080820;

SUSHMA, R., SATHE, T., FARIAS, A., et al. Nature cures. An alternative herbal formulation as a denture cleanser. *Annals of African medicine*, v. 16, n. 1, p. 6, 2017. DOI: 10.4103/aam.aam_43_16;

SWANSON, J. R., GURKA, M. J., KAUFMAN, D. A. Risk factors for invasive fungal infection in premature infants: Enhancing a targeted prevention approach. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, v. 3, n. 1, p. 49–56, 2014. DOI: 10.1093/jpids/pit068;

TALAPKO, J., JUZBAŠIĆ, M., MATIJEVIĆ, T., *et al.* *Candida albicans*—the virulence factors and clinical manifestations of infection. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland), v. 7, n. 2, p. 79, 2021. DOI: 10.3390/jof7020079;

THAMBUGALA, K. M., DARANAGAMA, D. A., TENNAKOON, D. S., *et al.* Humans vs. Fungi: An overview of fungal pathogens against humans. *Pathogens*, v. 13, n. 5, p. 426, 2024. DOI: 10.3390/pathogens13050426;

THIYAHUDDIN, N. M., LAMPING, E., RICH, A. M., *et al.* Yeast species in the oral cavities of older people: A comparison between people living in their own homes and those in rest homes. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland), v. 5, n. 2, p. 30, 2019. DOI: 10.3390/jof5020030;

VAOU, N. *et al.* Towards advances in medicinal plant antimicrobial activity: A review study on challenges and future perspectives. *microorganisms*, v. 9, n. 10, p. 2041, 2021;

VILA, T., SULTAN, A. S., MONTELONGO-JAUREGUI, D., *et al.* Oral candidiasis: A disease of opportunity. *Journal of fungi* (Basel, Switzerland), v. 6, n. 1, p. 15, 2020. DOI: 10.3390/jof6010015;

WANG, J., WANG, Y., LI, Z., *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of substituted guanidine indole derivatives as potential inhibitors of HIV-1 tat-TAR interaction. *Medicinal chemistry* (Sharīqah (United Arab Emirates)), v. 10, n. 7, p. 738–746, 2013. DOI: 10.2174/1573406410666140306151815;

WARGO, J. A., REUBEN, A., COOPER, Z. A., *et al.* Immune effects of chemotherapy, radiation, and targeted therapy and opportunities for combination with immunotherapy. *Seminars in oncology*, v. 42, n. 4, p. 601–616, 2015. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2015.05.007;

WIENCH, R., SKABA, D., MATYS, J., *et al.* Efficacy of toluidine blue—mediated antimicrobial photodynamic therapy on *Candida* spp. A systematic review. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), v. 10, n. 4, p. 349, 2021. DOI: 10.3390/antibiotics10040349;

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

WU, Z., MCGOOGAN, J. M. Characteristics of and important lessons from the Coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: Summary of a report of 72 314 cases from the Chinese center for disease control and prevention. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, v. 323, n. 13, p. 1239, 2020. DOI: 10.1001/jama.2020.2648;

YAMADA, T., LIU, X., ENGLERT, U., *et al.* Solid-state structure of free base guanidine achieved at last. *Chemistry* (Weinheim an der Bergstrasse, Germany), v. 15, n. 23, p. 5651–5655, 2009. DOI: 10.1002/chem.200900508;

YAPAR, N. Department of Infectious Diseases and Clinical microbiology, Dokuz Eylül

University, Mithatpasa Street, Turkey; Copyright 2014 Elsevier B.V., All rights reserved.

YUAN, J., LI, M., JI, N., et al. Recent progress in chiral guanidine-catalyzed michael reactions. *Current organic chemistry*, v. 21, n. 13, p. 1205–1226, 2017. DOI: 10.2174/1385272821666170127153759;

ZHENG, X., ZHANG, X., ZHOU, B., et al. Clinical characteristics, tolerance mechanisms, and molecular epidemiology of reduced susceptibility to chlorhexidine among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a teaching hospital in China. *International journal of antimicrobial agents*, v. 60, n. 1, p. 106605, 2022. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2022.106605.

ZHOU, Y., REYNOLDS, T. Innovations in antifungal drug discovery among cell envelope synthesis enzymes through structural insights. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, v. 10, n. 3, p. 171, 2024. DOI: 10.3390/jof10030171.