

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 19/12/2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Bianca Gottardo de Almeida

**One-Pot Synthesis and Antifungal Activity of Non-Toxic Silver-
Hydroxyapatite Nanocomposites against *Candida* Species**

São José do Rio Preto
2018

Bianca Gottardo de Almeida

One-Pot Synthesis and Antifungal Activity of Non-Toxic Silver-Hydroxyapatite Nanocomposites against *Candida* Species

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Diogo Paschoalini Volanti

São José do Rio Preto
2018

A447o

Almeida, Bianca Gottardo de

One-pot synthesis and antifungal activity of non-toxic silver-hydroxyapatite nanocomposites against *Candida* species / Bianca Gottardo de Almeida. -- São José do Rio Preto, 2018
54 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Diogo Paschoalini Volanti

1. materiais nanoestruturados. 2. síntese. 3. *Candida* spp. 4. concentração inibitória mínima. 5. micoses. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Bianca Gottardo de Almeida

One-Pot Synthesis and Antifungal Activity of Non-Toxic Silver-Hydroxyapatite Nanocomposites against *Candida* Species

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Diogo Paschoalini Volanti
UNESP– Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, *Campus* São José do Rio Preto.
Orientador

Prof^a. Dr^a. Carolina Colombelli Pacca
UNESP– Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, *Campus* São José do Rio Preto.

Prof^a. Dr^a. Márcia Maria Costa Nunes Soares
Instituto Adolfo Lutz - Laboratório de São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
19 de dezembro de 2018

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O impacto de doenças fúngicas e a resistência aos agentes antimicrobianos por fungos patogênicos tornou-se um desafio global para a saúde da população. No presente trabalho, a síntese de nanocompósitos a base de prata-hidroxiapatita (Ag-HAP), foram sintetizados por um método solvotérmico assistido por micro-ondas com diferentes concentrações de peso de prata, testadas contra espécies de *Candida* sensíveis e resistentes aos azólicos comumente utilizado na prática clínica. Estudos antifúngicos foram conduzidos por método de microdiluição – seguindo o protocolo M27 A3 - CLSI. Para todas as espécies de *Candida* testadas, a amostra Ag pura mostrou baixa atividade antifúngica quando comparada com as amostras combinadas de Ag-HAP, com claro efeito sinérgico, uma vez que a atividade antifúngica foi melhorada quando colocados juntos. O principal efeito inibitório foi observado em Ag4%-HAP e Ag8%-HAP contra *Candida krusei*, com concentração inibitória mínima (CIM) de 31,2µg / mL, seguido por *Candida parapsilosis stricto sensu* (62,5 µg / mL), *Candida tropicalis*, (62,5 µg / mL), *Candida glabrata* (125 µg / mL) e *Candida albicans* (125 µg / mL). Além disso, ensaios toxicológicos foram realizados com modelo *in vivo*, *Galleria mellonella* devido à similaridade de resposta imunológica e níveis de toxicidade entre mamíferos. O teste foi executado de duas maneiras: banho e inoculação de todos os nanocompósitos, com a mesma concentração utilizada nos testes de microdiluição. Todos NCs não apresentaram toxicidade para este modelo. A atividade antifúngica específica encontrada por análise quantitativa demonstra que os nanocompósitos agem de forma diferente conforme os alvos, considerando espécies de *Candida*. Estes resultados mostram um novo potencial antifúngico para aplicações tecnológicas e *coatings*.

Palavras-chave: materiais nanoestruturados, síntese, *Candida* spp, concentração inibitória mínima, micoses.

ABSTRACT

The impact of fungal diseases and the battle for antimicrobial agents against pathogenic fungi has emerged as a main global healthcare challenge. Here, the antifungal activity of silver-hydroxyapatite (Ag-HAP) nanocomposites (NCs) with different Ag concentrations synthesized by the one-pot microwave-assisted solvothermal method was evaluated against sensitive and resistant *Candida* species. Antifungal studies were conducted by microdilution method – protocol from the Clinical and Laboratory Standard Institute. The main inhibitory effect was seen to Ag4%-HAP against *Candida krusei*, with minimum inhibitory concentration (MIC) of 31.2 µg/mL, followed by *Candida parapsilosis* Sensu Stricto (62.5 µg/mL), *Candida tropicalis*, (62.5 µg/mL), *Candida glabrata* (125 µg/mL) and *Candida albicans* (125 µg/mL). Furthermore, the toxicity assay was performed in the *in vivo* model *Galleria mellonella*. The test was executed by bathing or inoculating with the same NCs concentration used in the previous microdilution tests. For both approaches, all NCs concentrations were not toxic to *G. mellonella*. The specific antifungal activity demonstrates that NCs act efficiently against species of *Candida*. These results show a potential antifungal application for well-designed nanostructured Ag-HAP composites.

Keywords: nanostructured materials, one-pot synthesis, *Candida* spp, minimum inhibitory concentration, mycoses.

SUMÁRIO

Capítulo 1	8
1. Introdução e Revisão de Literatura	8
2. Objetivos.....	13
2.1 Objetivos Específicos	13
Capítulo 2: Revised Manuscript	14
1. Introduction	16
2. Experimental section	18
2.1 Materials.....	18
2.2 Syntheses of Ag-HAP NCs.....	18
2.3 Characterization	18
2.4 Antifungal susceptibility testing.....	19
2.5 Toxicity test <i>in vivo</i>	20
3. Results and discussion	22
4. Conclusion	34
References	36
Supporting information material	46
Capítulo 3	51
3. Conclusões	51
4. Referências	52

CAPÍTULO 1

1 – INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Nas últimas décadas, infecções relacionadas aos fungos, mesmo que não sejam tão frequentes quanto às bacterianas ou virais, têm recebido especial atenção pelo aumento do número de novos casos (HUFFNAGLE; NOVERR, 2013; NETEA et al., 2015). Estima-se que, mundialmente, 1,7 bilhão de indivíduos estão acometidos por algum tipo de infecção fúngica, que varia desde superficiais até invasivas, podendo ser de caráter agudo a crônico (SPITZER; ROBBINS; WRIGHT, 2017). O número de mortes anuais associadas a esses tipos de infecções fúngicas é de mais de 1,5 milhão, sendo similar às taxas de mortalidade relacionadas à tuberculose e três vezes mais do que a da malária (BONGOMIN et al., 2017).

A maior parte dos processos infecciosos ocasionados por fungos são de natureza oportunista, ou seja, ocorrem quando há um déficit no sistema imunológico do hospedeiro. Outros fatores, como: tratamento com quimioterápicos, transplante de órgãos, uso dispositivos médicos sintéticos, doenças de base como lúpus e diabetes, entre outros, podem ser fatores predisponentes para desencadear a patogênese fúngica (BROWN et al., 2012).

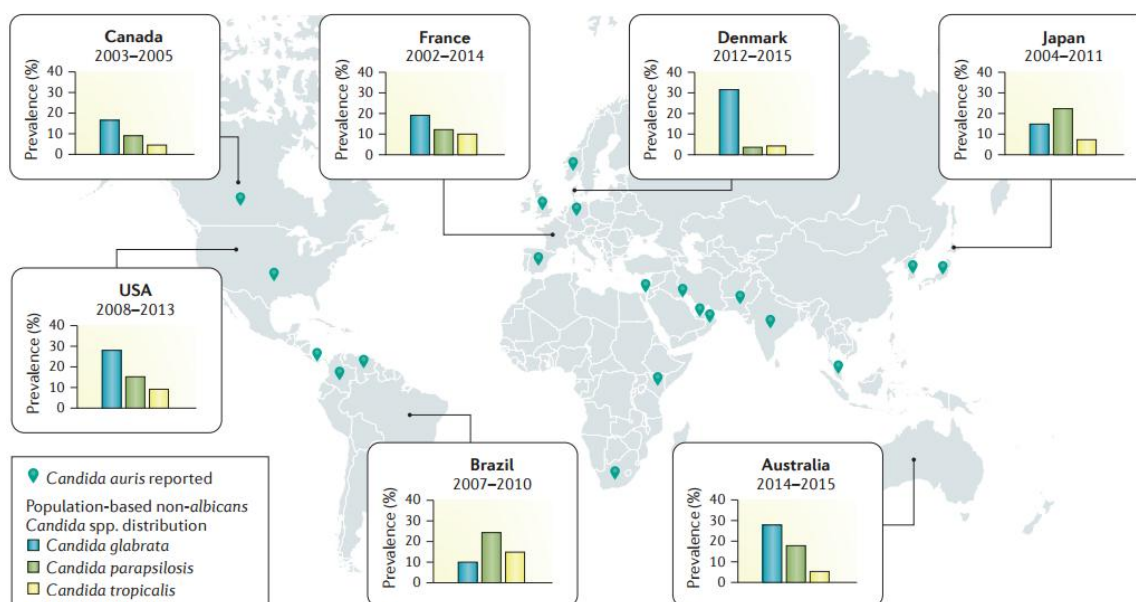
Dentre a variedade de micro-organismos potencialmente patogênicos, destaca-se a *Candida*. Este gênero leveduriforme composto por aproximadamente 200 espécies é amplamente disperso na natureza e faz parte da microbiota humana típica, presente, por exemplo, na cavidade bucal, orofaringe, pele, mucosa vaginal, secreções brônquicas, urina e fezes (MAYER; WILSON; HUBE, 2013). No âmbito hospitalar, é o microrganismo mais comum de infecção fúngica. Neste contexto, as espécies mais frequentes são: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (WHALEY et al., 2017).

Candida albicans ainda é a espécie mais frequente, o que é evidenciado por estudos nos Estados Unidos, Europa e Oriente Médio (CLEVELAND et al., 2015; KLINGSPOR et al., 2015; SHARIFZADEH et al., 2013). Fatores de virulência, tais como: dimorfismo, expressão de adesinas e invasinas na

superfície celular, formação de biofilmes, e secreção de enzimas hidrolíticas, são características desse espécie (KULLBERG; ARENDRUP, 2011).

A incidência de infecções causadas por espécies de *Candida* não-albicans vem aumentando constantemente nos últimos anos. Importantes diferenças geográficas na distribuição dessas espécies e padrões de suscetibilidade antifúngica, *in vitro*, podem ser observados (Figura 1) (PAPPAS et al., 2018).

Figura 1 – Variações geográficas na distribuição de espécies de *Candida*. Globalmente, *Candida albicans* é a espécie mais prevalente associada com candidíase invasiva; no entanto, a distribuição de *Candida* não-albicans pode variar, como demonstrado na figura. Dados são apresentados da Austrália, Brasil, Canadá, Dinamarca, França, Japão e Estados Unidos.



Fonte: Pappas et al. 2018.

Atualmente, há um grande problema relacionado ao tratamento dessas infecções, uma vez que as drogas disponíveis tem custos elevados, e apresentam efeitos tóxicos aos pacientes. Além disso, a administração de doses inadequadas pode promover a seleção de cepas resistentes (SANTOS et al., 2018). Muitos estudos documentaram a capacidade dessas espécies em desenvolver alta resistência aos azólicos, classes mais comuns de antifúngicos utilizados na prática clínica (LOPEZ-RIBOT et al., 2017), cujo mecanismo de ação envolve o bloqueio da síntese do ergosterol, importante constituinte da membrana celular dos fungos (SANTOS et al., 2018).

Na maioria das infecções por *C. albicans*, o antifúngico mais comumente prescrito é o fluconazol (PAUL; MOYE-ROWLEY, 2014; WHALEY et al., 2017) no entanto, diversos mecanismos de resistência são observados, sendo a regulação do gene ERG e bomba de efluxo mediadores-chave da resistência a essa classe de fármacos (FLOWERS et al., 2012).

Algumas das espécies não-albicans, como *C. glabrata* e *C. krusei*, frequentemente apresentam perfis de resistência aos antifúngicos (DIEKEMA et al., 2012). *Candida glabrata*, por exemplo, possui a capacidade de absorver esteróis exógenos e crescer com esteróis que não sejam o ergosterol na membrana celular. Esse mecanismo permite a evasão do micro-organismo frente ao tratamento com azol, adquirindo assim, resistência (WHALEY et al., 2017).

Já a *Candida krusei* é intrinsecamente resistente ao fluconazol, embora o mecanismo preciso ainda não é totalmente compreendido. Vários estudos têm atribuído a resistência intrínseca de *C. krusei* aos azólicos à atividade de bomba de efluxo e reduzida acumulação do fármaco (KATIYAR; EDLIND, 2001)(LAMPING et al., 2009). Azólicos mais recentes, como o voriconazol, possuem atividade fungicida em frente a *C. krusei*; no entanto, perfis de resistência também já foram reportados (KRISHNASAMY et al., 2018; RICARDO et al., 2014)

Em relação a ação de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, elas são naturalmente suscetíveis a maioria dos agentes antifúngicos. No entanto, a resistência adquirida pode ocorrer, especialmente para o fluconazol (XIAO et al., 2015).

Com relação a outros antifúngicos, apenas uma nova classe foi introduzida nos últimos 30 anos, as equinocandinas (SPITZER; ROBBINS; WRIGHT, 2017). No entanto, resistência a essa classe também já foi relatada em *Candida* (WHALEY et al., 2017).

Diante do exposto, a busca por alternativas eficazes e viáveis aos medicamentos antimicrobianos tradicionais torna-se extremamente relevante. No cenário atual, pesquisas por novas estratégias de combate e controle de doenças microbianas buscam por novas fontes de moléculas bioativas, que exerçam sua ação, com poucos efeitos colaterais (BEYTH et al., 2017;

FERNANDO; GUNASEKARA; HOLTON, 2018; LAKSHMINARAYANAN et al., 2018).

A nanotecnologia está relacionada à caracterização, produção e aplicações de estruturas, dispositivos e sistemas, controlando-se a forma e o tamanho em escala nanométrica. Com sua popularização, nanopartículas (NPs) podem ser sintetizadas de variadas formas a fim de atingir o produto de acordo com sua aplicabilidade, como por exemplo na agricultura, microeletrônica, biomedicina. (AARTHI et al., 2018; KUMAR; YADAV, 2009; LARA et al., 2018)

Baseado nisso, sistemas nanoestruturados, tais como, nanopartículas poliméricas, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas e cristais líquidos, são capazes de promover a liberação e veiculação de princípios bioativos com atividade antimicrobiana (QIN et al., 2017). A aplicabilidade destes sistemas de liberação de fármacos, além de otimizar a solubilização de compostos, podem potencializar a ação terapêutica dos mesmos (CHERAGHI et al., 2017). Suas vantagens sobre fármacos convencionais também incluem seu tamanho reduzido, diferentes mecanismos de ação, redução de toxicidade e alta biocompatibilidade (GONZÁLEZ et al., 2018). Quando combinadas com NPs de prata (Ag), por exemplo, esses compostos têm demonstrado alta atividade em relação ao controle de doenças bacterianas e fúngicas (XIE et al., 2014). Esses compostos, quando associados à hidroxiapatita (HAP, $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})]$), por ser um componente natural da estrutura dos ossos e dentes, aumentam a biocompatibilidade, podendo ser uma alternativa viável para tratamento de infecções, inclusive aquelas causadas por micro-organismos resistentes (MOCANU et al., 2014; XIONG et al., 2016).

Estudos correlacionando nanopartículas de prata (como potente antimicrobiano), combinado a outros compostos (hidroxiapatita, grafeno, ouro) têm sido alvo de investigação, com diferentes formas de sínteses e objetivos de aplicação.

Mocanu et al. (2014) sintetizaram uma hidroxiapatita complexa com nanopartículas de zinco, prata e ouro, para revestimento de implantes ortopédicos e dentários ou utilizados como cimentos ósseos em aplicações cirúrgicas. As nanopartículas de prata e hidroxiapatita foram incorporadas em

compósitos de matriz polimérica apresentando atividade antimicrobiana contra cinco espécies patogênicas: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp.*, *Bacillus cereus*, e *Candida albicans*.

Já no estudo de Xie et al. (2014), nanopartículas de hidroxiapatita decorada com prata foram sintetizadas com a finalidade de revestir superfícies de implantes metálicos para melhorar a osteoindutividade e propriedades antibacterianas contra cepas de *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli*, com a finalidade de ser implantado na engenharia de ossos.

Xiong et al. (2016) sintetizaram nanofios de hidroxiapatita decorada com prata para a preparação de um novo tipo de papel inorgânico altamente flexível, com propriedade antibacteriana para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, como um biomaterial funcional promissor.

Por sua vez, Gutierrez et al. (2018) sintetizaram nanopartículas monodispersas de prata com ouro, altamente reativas, com tamanhos menores que 5 nm. Neste estudo foi demonstrado alta atividade antifúngica frente a espécies de *Candida*: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, e *C. guilliermondii*, a fim de tratar doenças fúngicas em humanos, animais e plantas, ou para revestir superfícies cirúrgicas. No entanto, sua aplicabilidade é interferida pelo alto custo do ouro.

Vale ressaltar que nos estudos citados não houve avaliação da toxicidade dos compostos visando uma possível biomédica. Modelos invertebrados possibilitam demonstrar diferentes respostas toxicológicas ou inflamatórias sem empregar mamíferos (IGNASIAK; MAXWELL, 2017; POYNTON et al., 2018; TANGUAY, 2018).

O modelo em *Galleria mellonella* (Lepidoptera - Pyralidae) tem sido utilizada como um modelo essencial para mostrar a virulência de diferentes patógenos devido à alta similaridade de resposta imune e níveis de toxicidade entre mamíferos, afim de sintetizar novos tratamentos medicamentosos com alta aplicabilidade (IGNASIAK; MAXWELL, 2017).

CAPÍTULO 3

3- CONCLUSÃO

Este estudo mostra uma síntese em micro-ondas de nanocompósitos Ag-HAP não tóxicos com diferentes concentrações de peso de Ag NPs contra cinco cepas de *Candida*. De acordo com esses resultados, os nanobastões HAP funcionam como uma matriz não tóxica para atrair os fungos. Por outro lado, o Ag NPs atua como material fungicida que altera mecanismos biológicos dos microrganismos. Curiosamente, as amostras sintetizadas mostraram menores valores de concentração inibitória mínima contra *Candida krusei*, e também importante atividade contra outras espécies de *Candida*. O notável desempenho antifúngico mostrado pelos NCs pode ser atribuído à força de interação eletrostática entre Ag NPs e superfície da parede celular fúngica, com especificidade para alguns receptores. Ags NPs podem interagir com microorganismos, levando à redução da síntese protéica, ruptura da parede celular e membrana celular, consequentemente inibindo o brotamento celular. O efeito não tóxico *in vivo* pode ser devido a dispersão homogênea de Ag NPs na matriz de nanobastões HAP, que protegem o hospedeiro contra danos celulares. Esses dados abrem novas abordagens nanotecnológicas para nanocompósitos de Ag-HAP para controlar doenças fúngicas sem causar danos por toxicidade.

4- REFERÊNCIAS

AARTHI, A. et al. Detection and degradation of leachate in groundwater using ag modified Fe₃O₄nanoparticle as sensor. **Journal of Molecular Liquids**, v. 252, p. 97–102, 2018.

BEYTH, N. et al. **Antimicrobial nanoparticles in restorative composites**. Second Edition ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.

BONGOMIN, F. et al. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, p. 57, 2017.

BROWN, G. D. et al. Hidden killers: Human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, 2012.

CHERAGHI, M. et al. Heart targeted nanoliposomal/nanoparticles drug delivery: An updated review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 86, p. 316–323, 2017.

CLEVELAND, A. A. et al. Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008-2013: Results from population-based surveillance. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 2008–2013, 2015.

DIEKEMA, D. et al. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 1, p. 45–48, 2012.

FERNANDO, S.; GUNASEKARA, T.; HOLTON, J. Antimicrobial Nanoparticles: applications and mechanisms of action. **Sri Lankan Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 2, 2018.

FLOWERS, S. A. et al. Gain-of-function mutations in UPC2 are a frequent cause of ERG11 upregulation in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 10, p. 1289–1299, 2012.

GONZÁLEZ, B. et al. Mesoporous silica nanoparticles decorated with polycationic dendrimers for infection treatment. **Acta Biomaterialia**, v. 68, p. 261–271, 2018.

HUFFNAGLE, G.; NOVERR, M. C. The emerging world of the fungal microbiome. **Fungal Microbiome**, v. 18, n. 9, p. 1199–1216, 2013.

IGNASIAK, K.; MAXWELL, A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. **BMC Research Notes**, v. 10, n. 1, p. 428, dez. 2017.

KATIYAR, S. K.; EDLIND, T. D. Identification and expression of multidrug

resistance-related ABC transporter genes in *Candida krusei*. **Medical Mycology**, v. 39, n. 1, p. 109–116, 2001.

KLINGSPOR, L. et al. Invasive *Candida* infections in surgical patients in intensive care units: A prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (2006-2008). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 1, p. 87.e1-87.e10, 2015.

KRISHNASAMY, L. et al. Molecular mechanisms of antifungal drug resistance in *Candida* species. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 12, n. 9, p. DE01-DE06, 2018.

KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, M. C. Invasive Candidiasis. **Journal of Physics A: Mathematical and Theoretical**, v. 44, n. 8, p. 85201, 25 fev. 2011.

KUMAR, V.; YADAV, S. K. Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, n. 2, p. 151–157, 2009.

LAKSHMINARAYANAN, R. et al. Recent Advances in the Development of Antimicrobial Nanoparticles for Combating Resistant Pathogens. **Advanced Healthcare Materials**, v. 7, n. 13, p. 1–13, 2018.

LAMPING, E. et al. *Abc1p* is a multidrug efflux transporter that tips the balance in favor of innate azole resistance in *Candida krusei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 354–369, 2009.

LARA, H. H. et al. Synergistic antifungal effect of chitosan-stabilized selenium nanoparticles synthesized by pulsed laser ablation in liquids against *Candida albicans* biofilms. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 2697–2708, 2018.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119–128, 2013.

MOCANU, A. et al. Synthesis; Characterization and antimicrobial effects of composites based on multi-substituted hydroxyapatite and silver nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 298, p. 225–235, 2014.

NETEA, M. G. et al. Immune defence against *Candida* fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 10, p. 630–642, 2015.

PAPPAS, P. G. et al. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 1445–1456, 2018.

PAUL, S.; MOYE-ROWLEY, W. S. Multidrug resistance in fungi: Regulation of transporter-encoding gene expression. **Frontiers in Physiology**, v. 5 APR, n. April, p. 1–14, 2014.

POYNTON, H. C. et al. The Toxicogenome of *Hyalella azteca*: A Model for

Sediment Ecotoxicology and Evolutionary Toxicology. **Environmental Science and Technology**, v. 52, n. 10, p. 6009–6022, 2018.

QIN, S. Y. et al. Drug self-delivery systems for cancer therapy. **Biomaterials**, v. 112, p. 234–247, 2017.

RICARDO, E. et al. In vivo and in vitro acquisition of resistance to voriconazole by *Candida krusei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4604–4611, 2014.

SANTOS, G. C. D. O. et al. *Candida* infections and therapeutic strategies: Mechanisms of action for traditional and alternative agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUL, p. 1–23, 2018.

SHARIFZADEH, A. et al. Oral microflora and their relation to risk factors in HIV+patients with oropharyngeal candidiasis. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 23, n. 2, p. 105–112, 2013.

SPITZER, M.; ROBBINS, N.; WRIGHT, G. D. Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections. **Virulence**, v. 8, n. 2, p. 169–185, 2017.

TANGUAY, R. L. The rise of zebrafish as a model for toxicology. **Toxicological Sciences**, v. 163, n. 1, p. 3–4, 2018.

WHALEY, S. G. et al. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JAN, p. 1–12, 2017.

XIAO, M. et al. Antifungal susceptibilities of *Candida glabrata* species complex, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* species complex and *Candida tropicalis* causing invasive candidiasis in China: 3 year national surveillance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 3, p. 802–810, 2015.

XIE, C. M. et al. Silver nanoparticles and growth factors incorporated hydroxyapatite coatings on metallic implant surfaces for enhancement of osteoinductivity and antibacterial properties. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 6, n. 11, p. 8580–8589, 2014.

XIONG, Z. C. et al. One-Step Synthesis of Silver Nanoparticle-Decorated Hydroxyapatite Nanowires for the Construction of Highly Flexible Free-Standing Paper with High Antibacterial Activity. **Chemistry - A European Journal**, v. 22, n. 32, p. 11093, 2016.