



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

ROBERTO SALLUM

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE CRISTAIS DE TUNGSTATO
DE PRATA (Ag_2WO_4) CONTRA *Candida albicans*.

UBERABA

2025

ROBERTO SALLUM

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE CRISTAIS DE TUNGSTATO DE
PRATA (Ag_2WO_4) CONTRA *Candida albicans*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências (Ciências Fisiológicas), área de Concentração Parasitologia, Imunologia e Microbiologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientador: Prof^{or}. Dr. Anderson Assunção Andrade.

UBERABA

2025

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade
Federal do Triângulo Mineiro**

- S167a Sallum, Roberto
Atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de cristais de tungstato de prata
(Ag 2 WO 4) contra *Candida albicans* / Roberto Sallum. -- 2025.
67 f. : il., fig., graf., tab.
- Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) -- Universidade
Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2025
Orientador: Prof. Dr. Anderson Assunção Andrade
1. Antifúngicos. 2. Leveduras. 3. *Candida albicans*. I. Andrade, Anderson
Assunção. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.
- CDU 615.282.84

ROBERTO SALLUM

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE CRISTAIS DE TUNGSTATO DE PRATA (Ag₂WO₄) CONTRA *Candida albicans*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências (Ciências Fisiológicas), área de Concentração II - Parasitologia, Imunologia E Microbiologia (Linha de Pesquisa: Biologia De Fungos E Bactérias) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Uberaba, 07 de novembro de 2025.

Prof^{or}. Dr. Anderson Assunção Andrade - Orientador

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof^a. Dr^a. Iara Rossi Gonçalves – Titular Externo

Universidade Federal de Uberlândia

Prof^{or}. Dr. Leonardo Eurípedes de Andrade e Silva – Titular Interno

Universidade Federal do Triângulo Mineiro



Documento assinado eletronicamente por **ANDERSON ASSUNCAO ANDRADE**, Professor do Magistério Superior, em 11/11/2025, às 14:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024](#).



Documento assinado eletronicamente por **LEONARDO EURIPEDES DE ANDRADE E SILVA**, Técnico-Administrativo em Educação, em 13/11/2025, às 09:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024](#).



Documento assinado eletronicamente por **IARA ROSSI GONÇALVES**, Usuário Externo, em 13/11/2025, às 17:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 215, de 16 de julho de 2024](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.uftm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1630241** e o código CRC **362724EE**.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

AGADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me proporcionar a realização desta pesquisa, dando – me força e coragem para vencer todos os desafios que a vida me presenteia.

Agradeço aos pais da minha avó, Melia Jarjoura Ayoub Daher e Taufic Jreiger Daher, aos pais de meu avô, Esper Elias Sallum e Amélia Abraão Sallum, meus avós, Jalile Taufic Daher Sallum e Chiab Esper Sallum e a seus filhos Saleh Chiab Sallum, Esper Chiab Sallum, Sulaima Daher Sallum, Waded Sallum e Semiah Daher Sallum da Cunha, seu marido Juscelino Cunha e filhos, Amim Daher Sallum Cunha e Cristine Daher Sallum da Cunha, os quais deram – me força, esperança e luz. E continuam iluminando meus caminhos.

Também agradeço aos colaboradores, principalmente ao meu orientador Anderson Assunção Andrade.

RESUMO

Candida albicans continua sendo a causa mais prevalente de candidíase invasiva e é reconhecida como um patógeno fúngico prioritário crítico devido à sua prevalência clínica global, altas taxas de mortalidade e aumento da resistência antifúngica. Neste estudo *in vitro* e *in vivo*, investigamos a atividade antifúngica de microcristais de α -Ag₂WO₄ contra *C. albicans*. Os cristais exibiram forte atividade, com baixa MIC (3,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e efeito fungicida (6,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados demonstraram a supressão acentuada da transição levedura – hifa, mesmo em concentrações subinibitórias, também demonstraram a inibição da formação de biofilme de maneira dependente da concentração. O pré – tratamento de superfícies abióticas com α -Ag₂WO₄ preveniu eficazmente a adesão fúngica e a maturação do biofilme, com inibição completa alcançada a 10 mg mL⁻¹. No entanto, nenhum efeito sinérgico com o fluconazol foi detectado, também, a análise *in vivo* usando *Galleria mellonella* demonstrou eficácia limitada, pois o tratamento falhou em proteger as larvas da infecção por *C. albicans*, apesar da baixa toxicidade. Essas descobertas demonstram que embora os cristais de α -Ag₂WO₄ possam ter potencial restrito como agentes antifúngicos sistêmicos, eles representam uma estratégia promissora para prevenir infecções associadas ao uso de dispositivos biomédicos, visando o combate à adesão e ao desenvolvimento de biofilme em superfícies abióticas.

Palavras - chave: *Candida albicans*; tungstato de prata; atividade antifúngica; biofilme; transição levedura - hifa; agentes antiaderente.

ABSTRACT

Candida albicans remains the most prevalent cause of invasive candidiasis and is recognized as a critical priority fungal pathogen given its global clinical burden, high mortality rates, and rising antifungal resistance. Here, we investigated the antifungal activity of α -Ag₂WO₄ microcrystals against *C. albicans* *in vitro* and *in vivo*. The crystals exhibited strong activity, with low MIC (3,125 μ g mL⁻¹) and fungicidal effect (6,25 μ g mL⁻¹). They markedly suppressed the yeast–hypha transition, even at sub-inhibitory concentrations, and inhibited biofilm formation in a concentration-dependent manner. Pre-treatment of abiotic surfaces with α -Ag₂WO₄ effectively prevented fungal adhesion and biofilm maturation, with complete inhibition achieved at 10 mg mL⁻¹. However, no synergistic effect with fluconazole was detected, and *in vivo* analysis using *Galleria mellonella* showed limited efficacy, as treatment failed to protect larvae from *C. albicans* infection despite low toxicity. These findings highlight that while α -Ag₂WO₄ crystals may have restricted potential as systemic antifungal agents, they represent a promising strategy to prevent device-associated infections by targeting adhesion and biofilm development on abiotic surfaces.

Keywords: *Candida albicans*; silver tungstate; antifungal activity; biofilm; yeast – hypha transition; antiadhesion agents.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Padrão de difração de raios X (XRD) de cristais de α -Ag₂WO₄. Os picos de difração mais intensos são demonstrados com seus índices de Miller. 61
- Figura 2. Inibição da transição levedura-hifã de *Candida albicans* por cristais de α -Ag₂WO₄. (A–B) Controle (células não tratadas); (C–D) células expostas a ½ MIC (1,56 µg mL⁻¹); (E–F) células expostas a MIC (3,125 µg mL⁻¹); (G–H) células tratadas com fluconazole (MIC = 0,25 µg mL⁻¹). Imagens adquiridas com objetivas de 40× (painéis esquerdos) e 100× (painéis direitos). 62
- Figura 3. Efeito dos cristais de α -Ag₂WO₄ em biofilmes de *Candida albicans*. (A) Inibição da formação de biofilme após 24 h de incubação na presença de concentrações crescentes de cristais de α -Ag₂WO₄. (B) Redução de biofilmes pré-formados após 24 h de tratamento com cristais de α -Ag₂WO₄. Os dados são expressos como porcentagem de inibição em relação aos controles não tratados. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em comparação com os respectivos controles (**p* < 0,05, ANOVA one-way seguida do teste post hoc de Bonferroni). 63
- Figura 4. Efeito de superfícies revestidas com α -Ag₂WO₄ na formação de biofilme de *Candida albicans*. (A) Inibição quantitativa da atividade metabólica do biofilme avaliada pelo ensaio de redução do MTT após 24 h. (B) Imagens microscópicas representativas de biofilmes corados com azul de algodão em superfícies de placas de Petri pré-revestidas: (a) controle (água); (b) 0,01 mg mL⁻¹; (c) 0,1 mg mL⁻¹; (d) 1,0 mg mL⁻¹. Imagens adquiridas com 40× de magnitude. 64
- Figura 5. Sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* após tratamento com cristais de α -Ag₂WO₄ e infecção por *Candida albicans*. As curvas de sobrevivência de Kaplan–Meier mostram quatro grupos: G1, controle com salina; G2, cristais de α -Ag₂WO₄ (0,1 mg mL⁻¹; 4 mg kg⁻¹); G3, *C. albicans* (1 × 10⁶ CFU por larva); E G4, *C. albicans* + cristais α -Ag₂WO₄ (0,1 mg mL⁻¹; 4 mg kg⁻¹). A tabela resume os tempos médios de sobrevivência, porcentagens de sobrevivência e Hazard ratios. As comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas com o teste Log-rank (Mantel–Cox) test (*p* < 0,05). 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AmB	Anfotericina B
ATCC [®]	American Type Culture Collection
ATV	Agitador em Vórtice para Tubos
BHI	Meio de Infusão Cerebro - Coração
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	Centímetro
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetracético
EMBRAPA	Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – Minas Gerais
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais
FIC	Índice da Fração de Concentração Inibitória
FLC	Fluconazol
g	Gramma
°C	Grau Celsius
h	Hora
ICBN	Instituto de Ciências Biológicas e Naturais
L	Litro
MFC	Concentração Fungicida Mínima
mg/dia	Miligrama por Dia
mg/Kg	Miligrama por Kilograma
mg/L	Miligrama por Litro
MIC	Concentração Inibitória Mínima
μL	Micro litro
μm	Micrômetro
mL	Mililitro
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2-5 difeniltetrazol bromado
nm	Nanômetro
p-NPGB	p – nitrofenil p’ – guanidino benzoato
%	Porcentagem
PTU	Feniltioureia
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
SDB	Meio Sabourauds Dextrose Broth
TSA	Teste de Susceptibilidade a Antimicrobianos
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFC/larva	Unidade Formadora de Colônia por Larva
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por Mililitro
UFTM	Universidade Federal Do Triângulo Mineiro
YPD	Meio Yeast, Peptone, Dextrose

LISTA DE SÍMBOLOS

XX

TM

®

Século Vinte

Marca Registrada

Marca Registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	ANTIMICÓTICOS E O TUNGSTATO DE PRATA	13
1.1.1	Metal óxido de tungstato de prata	18
1.2	AS CANDIDÍASES	20
1.3	O PRINCIPAL AGENTE ETIOLÓGICO	23
1.4	MODELO EXPERIMENTAL INVERTEBRADO	24
	REFERÊNCIAS	33
	APÊNDICE A - ARTIGO SUBMETIDO: In vitro and in vivo antifungal activity of silver tungstate (Ag₂WO₄) crystals against Candida albicans	43
	APÊNDICE B - LISTA DE PARTICIPAÇÃO DE COAUTORES	66
	ANEXO A - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO	68
	ANEXO B - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO (CONTINUAÇÃO)	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 ANTIMICÓTICOS E O TUNGSTATO DE PRATA

Piraccine BM, Sisti A e Tosti A (2009) ¹ determinaram a incidência de recorrências de onicomicose causada por dermatófitos em pacientes curados, ou seja, com completa cura clínica e negativos nos testes micológicos após 12 meses de tratamento sistêmico, com terbinafina ou itraconazol, e utilizaram método profilático, com amorolfina contida em esmalte para unhas, no combate à doença, constatando que: Dos 14 pacientes tratados com itraconazol, 5 sofreram recorrência da doença e dos 59 pacientes tratados com terbinafina, 7 sofreram recorrência; Dos 12 que sofreram recorrência, 6 (3 trataram com itraconazol e 3 com terbinafina) fizeram uso de amorolfina após a cura. Por fim, apesar de terem um número limitado de pacientes, as pesquisadoras sugeriram que o tratamento sistêmico inicialmente utilizado, embora com bons resultados, poderiam favorecer o risco de recorrência da doença e o uso contínuo de amorolfina após a cura não é capaz de prevenir a recorrência da doença.

Já outro estudo com pacientes curados de onicomicose após uso de terbinafina oral ou itraconazol, em que 48,8 % deles sofreram recorrência, foram realizados métodos profiláticos de terapias antifúngicas tópicas, que foram a terbinafina em spray, amorolfina, bifonazol ou ciclopirox olamina para avaliar a prevenção de recorrências, a qual apenas 33 % dos pacientes com uso profilático tiveram elas, sendo demonstrado uma diminuição na probabilidade de recorrência em 13 vezes quando usado a amorolfina, de 38 vezes para o bifonazol, 24 para a terbinafina em spray e 33 para a ciclopirox olamina. ²

Os antifúngicos tópicos também são recomendados no tratamento de vulvovaginite causada pelos agentes etiológicos do subfilo *Saccharomycotina* (aqueles genericamente e anteriormente classificados no gênero *Candida*) como por exemplo o fluconazol, que também pode ser administrado por via oral. Outro exemplo, quando não há resolução da vulvovaginite perante os azóis, no caso de ser *Nakaseomyces glabrata* (*Candida glabrata*) o agente etiológico, recomendam – se os usos tópicos intravaginais de ácido bórico, administrado em capsulas gelatinosas ou o de supositórios contendo nistatina. ³

Dois antifúngicos tópicos [que também podem atuar na via oral] são recomendados em doença leve de candidíase na orofaringe, o clotrimazol em trouxas ou o miconazol em adesivos na superfície da mucosa sobre a fossa do dente canino. Tem – se como alternativa para o tratamento nesse quadro clínico a nistatina em suspensão ou em pastilhas. ³

As opções mais comuns, em uso na rotina clínica, de antifúngicos sistêmicos para infecções fúngicas invasivas, principalmente candidíase invasiva, incluem as seguintes classes de medicamentos: Os polienos (anfotericina B deoxicolato, anfotericina B lipossomal, anfotericina B em complexo lipídico e anfotericina B em dispersão coloidal são alguns exemplos); Os triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol, sendo este menos frequente); E as equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina), sendo estas últimas adotadas como primeira escolha contra candidemia.³⁻⁵

Acrescentaram - se outros medicamentos como as alilaminas, a flucitosina e novas formulações, como a anfotericina B coclear, com formulação em estrutura lipídica e nanopartículas de cristais. E uma nova formulação de itraconazol apresentando super biodisponibilidade. Também, os tetrazol e ibrexafungerp, e outros novos agentes antifúngicos, como olorofim, fosmanogepix, MGCD290, T - 2307 e VL – 2397, vem sendo desenvolvidos.⁶

Uma classe antiga, os polienos, sendo a anfotericina B⁷ o único exemplo desta classe que é amplamente utilizado em infecções sistêmicas, principalmente candidíase invasiva, em que pacientes, não neutropênicos, caso apresente intolerância ou disponibilidade limitada a outros antifúngicos ou infecções com patógenos resistentes aos demais antifúngicos, são tratados com ela, cuja função tem como mecanismo de ação a ligação ao ergosterol, o principal esterol na membrana da célula fúngica, promovendo assim a lise celular por meio da formação de canais na membrana, aumentando a sua permeabilidade. Apesar de agir diretamente no ergosterol, sua formulação lipídica é pouco atrativa como alternativa no combate à candidemia, em pacientes neutropênicos, devido sua toxicidade. Apesar disso, a anfotericina B deoxicolato e a lipossomal são recomendadas para neonatos com candidíase disseminada e no sistema nervoso central, respectivamente. E sua formulação lipídica, ou a equinocandina, por várias semanas, seguida de terapia oral por fluconazol, para pacientes não acometidos por *Candida* spp. [espécies anteriormente e genericamente reunidas no gênero *Candida* que estão classificadas no subfilo *Saccharomycotina*] resistentes ao fluconazol, são indicadas para candidíase hepatoesplênica. Já para pacientes que apresentam cistite sintomática ou pielonefrite ocorrida por via ascendente causadas pela *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*) é recomendada a anfotericina B deoxicolato.^{3,8}

A flucitosina, cuja aprovação foi na década de 1960, é um análogo de pirimidina que interfere, principalmente, na síntese de ácidos nucleicos dos fungos do gênero *Candida* e

Cryptococcus. Ela é convertida por uma citosina deaminase, ausente em humanos, para 5 – fluorouracil, não tóxico para o paciente, em que afeta o metabolismo de RNA e DNA. E é usada por via oral e associada com outra terapia antifúngica, como por exemplo, no tratamento de meningite criptocócica em que associam – se com polienos.⁹ Também associa – se com anfotericina B lipossomal, ou só equinocandinas em altas doses, para o tratamento de infecções intravasculares e endocardites causadas por *Candida* spp. [espécies anteriormente e genericamente reunidas no gênero *Candida* que estão classificadas no subfilo *Saccharomycotina*]. Também, quando estas são resistentes ao fluconazol e ao voriconazol, em coriorretinite, pode associar, ou não, a anfotericina B lipossomal com a flucitosina. Esta mesma associação, ou o fluconazol com ou sem a flucitosina [desde que a *Candida* sp. (espécie anteriormente e genericamente reunidas no gênero *Candida* que está classificada no subfilo *Saccharomycotina*) seja susceptível ao fluconazol e à flucitosina], pode ocorrer no tratamento de candidíase no sistema nervoso central.^{3,10} Para os casos de cistites sintomáticas causadas por *N. glabrata* (*C. glabrata*) resistente ao fluconazol é recomendada a flucitosina ou a anfotericina B deoxicolato. A associação, ou não, entre flucitosina e anfotericina B deoxicolato, caso haja resistência ao fluconazol pela *N. glabrata* (*C. glabrata*), também é recomendada em pielonefrite causada por infecção na via ascendente.³

E outra classe, no início da década de 1970, Nyfeler R e Keller – Schierlein W (1974)¹¹ verificaram a atividade antimicrobiana de uma equinocandina, que é antibiótico do complexo polipeptídico, contra *Aspergillus nidulans*. E na primeira década de 2000, aprovados pelo **Food and Drug Administration**, a caspofungina, anidulafungina e a micafungina foram os primeiros antimicrobianos dessa classe a serem utilizados na prática clínica¹², que juntamente com a rezafungina, são fortemente recomendadas como tratamento de primeira escolha contra candidemia¹⁰, tendo suas ações inibidoras da síntese de 1,3 – β - D - glucano na parede celular fúngica, em *C. albicans*, promovendo a mudança morfológica da parede celular com sua perda de viabilidade.¹³

As equinocandinas são indicadas como medicamentos de primeira escolha no combate à candidíase invasiva quando os azóis de via oral tiverem seus usos inviabilizados.⁵ Quando as equinocandinas estiverem inviáveis, no tratamento de candidemia, ou a infecção for por *Candida* spp. [espécies anteriormente e genericamente reunidas no gênero *Candida* que estão classificadas no subfilo *Saccharomycotina*] resistentes a elas, os usos de anfotericina B lipossomal, voriconazol e fluconazol são fortemente, moderadamente e marginalmente recomendados, respectivamente.¹⁰ Elas são também recomendadas para o tratamento

empírico de pacientes em choque séptico ¹⁰ e de pacientes não neutropênicos, em UTI, suspeitos de terem candidíase invasiva. Contudo, o fluconazol é tratamento empírico alternativo para pacientes com suspeita de candidíase invasiva sem colonização de *Candida* spp. [espécies anteriormente e genericamente reunidas no gênero *Candida* que estão classificadas no subfilo *Saccharomycotina*] resistentes aos azóis e sem exposição prévia a esses. Acrescentando, além do fluconazol [para infecções com *C. albicans* sensíveis aos azóis], intravenoso ou oral, que é recurso alternativo às equinocandinas, estas estão entre as primeiras escolhas contra candidemia em fase inicial para pacientes neutropênicos e não neutropênicos. ³ Também, não só a caspofungina, mas a anidulafungina e a micafungina destacam – se em relações à anfotericina B e à flucitosina no combate à candidemia causada por *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), a qual é menos sensível a estes dois últimos antifúngicos, além disso, ela apresenta resistência a muitos antimicrobianos. ¹⁴ Apesar disso, a anfotericina B, também o voriconazol, são recomendados para pacientes não neutropênicos com candidemia causada por este patógeno. ³

Até 1981, as terapias antifúngicas para infecções invasivas eram limitadas e tinham um efeito citotóxico considerável, sendo esse período de estagnação superado com a introdução do cetoconazol, que foi usado como terapia nas micoses que não apresentavam riscos à vida. No entanto ele foi superado nos anos seguintes pelos triazóis. ¹⁵

Os triazóis, os quais são, posaconazol e itraconazol (de baixa biodisponibilidade), voriconazol e fluconazol (de maior biodisponibilidade), têm maiores aplicabilidades na rotina clínica, sendo os antifúngicos de primeira escolha para muitas micoses sistêmicas. Na candidíase invasiva, os triazóis apresentam menor atividade contra *N. glabrata* (*C. glabrata*) e *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), sendo as outras espécies mais sensíveis a eles. O posaconazol é de amplo espectro e é o antifúngico de primeira escolha na profilaxia para pacientes neutropênicos e transplantados de células troncos hematopoiéticas, bem como no combate às recidivas de aspergilose, enquanto que o voriconazol é usado nos tratamentos da aspergilose invasiva pulmonar, na coriorretinite causada por *Candida* spp. [espécies anteriormente e genericamente reunidas no gênero *Candida* que estão classificadas no subfilo *Saccharomycotina*] sensíveis a esse antifúngico, em que o fluconazol também é recomendado. E no agravamento da coriorretinite, com vitrite, é recomendado adicionar a anfotericina B deoxicolato, junto com o fluconazol e o voriconazol, no tratamento. Além disso, para o tratamento de ceratite são recomendados o fluconazol e os polienos anfotericina B ou natamicina. ^{3,10} Já o itraconazol é usado contra fungos demáceos e micoses superficiais,

no entanto, também é recomendado o seu uso, incluindo o voriconazol, ou o posaconazol ou a anfotericina B deoxicolato em suspensão, na candidíase invasiva, refratária ao fluconazol, quando acomete a orofaringe. Já quando acomete o esôfago e a doença é refratária ao fluconazol, recomendam – se, além das equinocandinas e anfotericina B deoxicolato, o itraconazol e o voriconazol. O fluconazol é um profilático para pacientes transplantados, bem como para aqueles que foram submetidos às cirurgias abdominais, desde que eles não tenham sido expostos recentemente aos azóis e os hospitais não estejam incluídos nos mapas epidemiológicos das infecções causadas por *Candida* spp. [espécies anteriormente e genericamente reunidas no gênero *Candida* que estão classificadas no subfilo *Saccharomycotina*] resistentes aos azóis, também é recomendada a sua profilaxia, para até 7 dias, em pacientes neutropênicos sob quimioterapia contra leucemia mieloide e síndrome mielodisplásica ¹⁰, e é eficaz no tratamento de muitas micoses superficial e sistêmicas, as quais têm – se como exemplo: O combate a candidíase invasiva em neonatos que não fizeram uso profilático deste antifúngico; Infecções intravasculares e endocardites, desde que *Candida* spp. [espécies anteriormente e genericamente reunidas no gênero *Candida* que estão classificadas no subfilo *Saccharomycotina*] seja sensível a esse antifúngico e o paciente demonstre estabilidade clínica; Para endocardites, também, são recomendados moderadamente um azol com equinocandina ou esta com anfotericina B lipossomal; ^{3,10} Na pielonefrite causada por infecções por via ascendente, desde que *Candida* spp. [espécies anteriormente e genericamente reunidas no gênero *Candida* que estão classificadas no subfilo *Saccharomycotina*] seja sensível ao fluconazol; Em infecções osteoarticulares e artrites sépticas também usa – se o fluconazol, ou equinocandinas; Em doença moderada para severa na candidíase orofaríngea e esofagiana é recomendado o fluconazol por via oral, porém, para pacientes com candidíases esofagiana impossibilitados de receber o medicamento por via oral, recomendam – se as equinocandinas ou o fluconazol intravenoso ^{3,16}, o qual bloqueia a síntese de ergosterol na membrana plasmática do fungo com a inibição da síntese de lanosterol 14 α – demetilase, propiciando assim o acúmulo de metilesterol na membrana fúngica, a ruptura celular dessa membrana, a inibição da replicação celular e a inibição do crescimento fúngico.

9,17

Slavin MA *et al.* (1995) ¹⁸ realizaram uma pesquisa prospectiva para investigar a eficácia e a toxicidade do fluconazol em transplantados de medula óssea, evidenciando que o uso profilático de fluconazol propiciou a diminuição da infecção fúngica sistêmica em relação ao grupo de transplantados que fizeram uso de placebo, além de prevenir a infecção sistêmica

por *C. albicans* no grupo tratado com fluconazol. Também, evidenciaram a diminuição de infecções fúngicas superficiais e não houve relato clínico de toxicidade no grupo tratado com fluconazol, sendo demonstrado um aumento da sobrevivência dos transplantados quando realizada a profilaxia.

As alilaminas, como exemplo as terbinafinas, têm como alvo antifúngico a síntese do ergosterol por meio da inibição da esqualeno epoxidase, visto que essa via, em mamíferos, sofre pouca influência desse agente antifúngico e tendo bons resultados nos testes de susceptibilidade, sendo, portanto, uma boa candidata para ser a primeira escolha terapêutica contra fungos filamentosos, demáceos e algumas leveduras, além de serem importantes no combate contra recidivas e por terem usos orais e tópicos. Apesar de não ter bons resultados em modelos experimentais murinos em infecções causada por esporotricose, candidíase, feohifomicose, aspergilose pulmonar e infecção criptocócica pulmonar, a terbinafina apresentou excelentes resultados *in vitro*.¹⁹

Uma situação preocupante é o aumento de *Candida* spp. [espécies anteriormente e genericamente reunidas no gênero *Candida* que estão classificadas no subfilo *Saccharomycotina*] resistentes aos antifúngicos disponíveis à população. Com isso, cada vez mais necessitam – se do desenvolvimento criterioso de novos medicamentos visando suprir com rapidez as necessidades globais para o combate aos patógenos fúngicos dos grupos prioritários.^{20,21}

1.1.1 Óxido de metal tungstato de prata

O tungstato de prata, introduzido como uma nova família de antimicrobianos por ter potencial uso no tratamento de água e nas aplicações biomédicas, vem demonstrando grande progresso nos estudos científicos.²²

A família dos materiais inorgânicos, os quais contêm combinações de ligações (links) iônicas, covalentes e metálicas, tem um grande potencial de aplicabilidade tecnológica.^{23,24} Dentro dessa grande família, especificamente dentro dessa família de semicondutores, a família dos óxidos de tungstênio ternários [de fórmula geral MWO_4 ; Ou família dos tungstatos] tem sido visada devido sua vanguarda nas Ciências Aplicadas, sendo utilizada em muitas áreas.²⁴⁻²⁷

O polimorfo de tungstato de prata (Ag_2WO_4) pode apresentar três morfologias distintas quando modificada a estabilidade energética nas superfícies, culminando nos surgimentos das formas α , β e γ . E a formação de cada morfologia inclui etapas de nucleação [que é um processo cineticamente controlado durante a formação de pequenos aglomerados no início das formas metaestáveis até formarem núcleos estáveis] e de crescimento. Além disso, cada processo de cristalização envolve sequências de etapas complexas que incluem a formação de unidades primárias, via dissolução, hidratação / desidratação, nucleação e crescimento dos cristais. Por fim, cada estrutura cristalina determina as propriedades das formas de tungstato de prata, impactando diretamente no desempenho das propriedades funcionais.²⁸

O $\alpha - \text{Ag}_2\text{WO}_4$ apresenta uma complexa estrutura tridimensional de nível atômico baixo e em sua estrutura os átomos de prata, tungstênio e oxigênio variam de posição devido ao esticamento, encurtamento e dobramento de suas ligações (W - O; Ag - O; O - Ag - O; O - W - O), sendo caracterizado por uma rede de estruturas octaédricas (WO_6 e AgO_6), tetraédrica (AgO_4), bipirâmide pentagonal (AgO_7) e clusters angulares (AgO_2) que atuam como blocos de encaixe para produzirem um campo cristalino fraco.^{23,24}

Esse semicondutor, quando analisado pela imagem de microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo, apresentou uma forma semelhante a um bastonete [porém ao utilizar soluções aquosas nas sínteses e caracterizações desse aglomerado de nanoesferas, bastonetes, este apresentou uma forma semelhante a uma flor]²², de aproximadamente 1 μm de comprimento, 140 nm de largura e 120 nm de espessura, além disso, apresenta um aumento nas ligações de nanopartículas metálicas unidas a uma estrutura semicondutora proporcionando uma gama de aplicabilidade por causa da segregação da prata. Com isso, dentre algumas aplicações têm - se: Efeito fotocatalise devido à flexibilidade dos links e ângulos que influenciam no comportamento carreador, excitador e transferência de cargas [principalmente a mudança de íons oxigênio nas extremidades], bem como em reações redox; Bactericida e fungicida, devido ao rearranjo dos átomos de prata que promovem uma maior estabilidade, e atividade [a qual é modulada pela mudança na forma da estrutura molecular promovida pelas distorções nos links e ângulos], nos sítios terminais de prata e oxigênio que podem favorecer interações eletrônicas e criação de sítios nos substratos vinculados ao O_2 e à H_2O , culminando na formação de radicais reativos, OH e O_2H ; E sensor de ozônio e de acetona.^{23,27-35}

1.2 AS CANDIDÍASES

Geograficamente, existem diferenças na distribuição de *Candida* spp. [espécies anteriormente e genericamente reunidas no gênero *Candida* que estão classificadas no subfiló *Saccharomycotina*], como: *N. glabrata* (*C. glabrata*) é mais comum no hemisfério norte, enquanto *C. parapsilosis* (Complexo *Parapsilosis*), e *C. tropicalis* são mais presentes no hemisfério sul; Todavia, *C. albicans* é amplamente predominante em ambos os lados do oceano Atlântico.^{36,37} Portanto, pode – se dizer que a prevalência por *Candida* spp. [espécies anteriormente e genericamente reunidas no gênero *Candida* que estão classificadas no subfiló *Saccharomycotina*] é quase mundial.³⁸

No entanto, ao contrário das plataformas FungiScope™ (marca protegida pela Universidade de Cologne, Alemanha; Registro utilizado por membros de 66 países) que monitora as infecções fúngicas invasivas³⁹, incluída no estudo CANDIDA III promovido pela CEMM (Confederação Europeia de Micologia Médica) que englobou 20 países⁵ e CandReg (registro utilizado pela Confederação composta por 28 países) usada para o monitoramento da candidíase invasiva⁴⁰, muitos países não têm um sistema de vigilância efetivo para o combate às doenças fúngicas, sendo limitadas as notificações de incidência e prevalência das doenças, assim como os dados de resistência fúngica aos antimicrobianos.⁴¹

Estando entre os 19 patógenos listados, pela Organização Mundial da Saúde, em 3 grupos prioritários, a *C. albicans* encontra – se no grupo crítico, cujos grupos são classificados de acordo com a presença de resistência aos antimicrobianos, acesso ao diagnóstico, tratamento, presença de sequelas e complicações, mortalidade e incidência anual. Nesse grupo também encontram – se o complexo *Cryptococcus neoformans*, *Candidozyma auris* (*Candida auris*) e *Aspergillus fumigatus*.²⁰

As infecções fúngicas representam um grande exemplo de doenças emergentes negligenciadas que se destacam cada vez mais devido às suas altas taxas de prevalência e de incidência, apesar desta taxa de incidência e da mortalidade serem imprecisas, estimam - se que mais de 1,5 milhões de mortes anuais são causadas por infecções fúngicas invasivas e a candidíase invasiva representa 995 mil mortes anualmente, mas estimam – se que menos de 742 mil pessoas morrem anualmente de candidíase invasiva, já que as estimativas desta e da candidemia costumam ser as mesmas, pois 90 % dos pacientes com candidemia são

diagnosticados, portanto, tratados, mais apenas 20 % dos pacientes com candidíase invasiva, apresentando cultura de sangue negativa, são diagnosticados e tratados.^{42,43}

Um estudo retrospectivo, 2012 – 2022, realizado no sudeste brasileiro, na cidade de Uberaba, onde foram coletados de pacientes [maioria mulheres, 55,9 % e com mediana de 40 anos] com suspeitas clínicas de dermatomicoses, em que 1.327 (57,1 %) amostras foram confirmadas para infecção fúngica, sendo que *C. parapsilosis* (Complexo *Parapsilosis*) e *C. albicans* obtiveram maiores prevalências nas amostras de mãos e faces.⁴⁴

Existem pelo menos quinze *Candida* spp. * [espécies anteriormente e genericamente reunidas no gênero *Candida* que estão classificadas no subfilo *Saccharomycotina*] distintas que causam doenças em humanos e mais de 95 % das candidíases sistêmicas têm sua etiologia em seis patógenos: *N. glabrata* (*C. glabrata*) [*Torulopsis glabrata* foi isolada em 1894 por Berlese, descrita em humanos por Anderson HW (1917)⁴⁶ e considerada saprófita não patogêna por muito tempo]^{† 53}, *C. parapsilosis* (Complexo *Parapsilosis*), *C. tropicalis*, *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), *Candidozyma auris* (*C. auris*) e *C. albicans*.^{3,54}

Candida albicans é o mais importante patógeno oportunista em Unidades de Terapias Intensivas (UTIs), que juntamente com outros principais agentes etiológicos, *N. glabrata* (*C. glabrata*), *C. parapsilosis* (Complexo *Parapsilosis*), *C. tropicalis*, *P. kudriavzevii* (*C. krusei*) e *Candidozyma auris* (*C. auris*), causam candidemia, a qual acomete o sistema nervoso central, sanguíneo e órgãos como pulmões, fígado, rins, baço, olhos e válvulas cardíacas de pessoas imunocomprometidas. Também é causa de infecções na pele e na mucosa de pessoas imunocompetentes.^{5,10,36,55}

Candida albicans, foi sugerido por Vrioni G e Matsiota – Bernard P (2001)⁵⁶, ter uma origem endógena na doença que pode tornar – se candidemia, a qual foi evidenciada na avaliação de 17 isolados clínicos (utilizando 4 diferentes primers) de pacientes internados

*Conforme Mezzare A e Fuentefria AM (2012)⁴⁵ existem cerca de 80 *Candida* spp. [espécies anteriormente e genericamente reunidas no gênero *Candida* que estão classificadas no subfilo *Saccharomycotina*], como exemplo, *C. albicans*, *Meyerozyma guilliermondii* (*C. guilliermondii*), *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), *C. parapsilosis* (Complexo *Parapsilosis*), *C. tropicalis*, *Kluyveromyces marxianus* (*C. kefir*), *Clavispora lusitanae* (*C. lusitanae*), *K. marxianus* (*C. pseudotropicalis*), *C. dubliniensis* e *N. glabrata* (*C. glabrata*), as quais já foram isoladas como agentes etiológicos da candidíase que pode manifestar – se nas formas superficial, cutânea, subcutânea, mucosa, cutaneomucosa e sistêmica e apresentar manifestação alérgica.

† Lembrando que *N. glabrata* (*C. glabrata*) é colonizadora de mucosa; Também, *C. parapsilosis* (Complexo *Parapsilosis*), da pele e mucosa; *C. tropicalis*, além de ser um fungo ambiental também faz parte do microbioma.⁴⁷ E *C. albicans* é microrganismo comensal que coloniza os tratos geniturinário e gastrointestinal, bem como as micobiotas oral e conjuntival.^{48–52}

em UTIs francesas durante 4 meses. Além disso, evidenciaram que *C. tropicalis*, 16 isolados clínicos, tinha origem também exógena e *C. parapsilosis* (Complexo *Parapsilosis*), 10 isolados, tinha origem ambiental.

Normalmente *C. albicans* apresenta uma origem endógena nos pacientes ^{47,56,57}, mais essa espécie tem grande importância na transmissão entre pessoas e é relevante considerar o ambiente hospitalar como carreador desse patógeno, sendo abordados esses questionamentos na pesquisa epidemiológica prospectiva de Robert F *et al.* (1995) ⁵⁸ com 41 pacientes em UTIs equipadas para tratamento de queimaduras, durante 9 meses, e que foram evidenciadas uma origem exógena na transmissão da *C. albicans*.

Estudos envolvendo características clínicas de candidemia ocasionada por espécies diferentes de *C. albicans* não são intensamente realizados, o que motivaram Gumbo T *et al.* (1999) ⁵³ a fazerem uma pesquisa retrospectiva das características clínicas, tratamentos e seus resultados para todos os pacientes diagnosticados com fungemia causada por *N. glabrata* (*C. glabrata*) e hospitalizados durante 7 anos em **The Cleveland Clinic Foundation**, constatando uma média de idade de 62 anos entre os 148 pacientes, os quais, em sua maioria apresentavam câncer ou doença coronariana, além disso, como fator de predisposição ao desenvolvimento de fungemia, em sua maioria, constataram o uso de cateteres venosos centrais, hiperalimentação ou uso de antimicrobianos. Acrescentando, como fonte inicial de fungemia constaram com mais frequência infecções abdominais e que a maior mortalidade estava associada aos pacientes com sepses, em UTIs, além de terem seus diagnósticos indiretos contendo culturas polimicrobianas com: staphylococci coagulase – negativa, enterococci e *C. albicans*.

Desde as duas últimas décadas, um constante aumento de casos de candidemia vem sendo reportado nas UTIs de muitos países devido ao crescimento da população idosa e de pacientes imunossuprimidos, que estão acometidos por espécies não *C. albicans*, como a *Candidozyma auris* (*C. auris*), a qual apresenta resistência à multidrogas, também, o aumento do uso abusivo de equinocandinas e do fluconazol tem contribuído para o surgimento de patógenos, como *C. albicans*, *N. glabrata* (*C. glabrata*) e *C. parapsilosis* (Complexo *Parapsilosis*) resistentes a estes antimicrobianos, as quais são responsáveis pelo crescente número de casos de candidíase sistêmica e favorecimento da elevação das taxas de mortalidade. ^{10,59} Além disso, o uso de antibacterianos de amplo espectro, corticosteroides, quimioterápicos, uso prolongado de cateteres intravasculares, a diálise, a oxigenação por

membrana extracorpórea, transplantes, doenças crônicas, doenças autoimunes, síndrome da imunodeficiência adquirida, neutropenia, hipoalbuminemia, obesidade, alcoolismo, traumas cirúrgicos, grandes procedimentos cirúrgicos, queimaduras, próteses e o nascimento prematuro contribuem para o aumento das infecções fúngicas invasivas, especialmente a candidíase invasiva.^{5,39,40,55,60}

O diagnóstico precoce na candidíase sistêmica, cujas manifestações clínicas são candidemia, candidíase disseminada e infecções em órgãos, requer muitas vezes a realização de testes sorológicos, que em conjunto com a terapia antifúngica precoce, faz o curso da doença ser controlado, aumentando a sobrevida dos pacientes.^{10,61}

O avanço científico vem disponibilizando muitas estratégias para o combate às infecções fúngicas invasivas, no entanto, os imensos esforços da biociência em fornecer uma ampla estratégia [principalmente medicamentos e a quimioterapia] ao combate às diversas doenças graves tornam os humanos susceptíveis a essas infecções fúngicas. Também, a humanidade não desenvolveu um diagnóstico eficiente que atenda as demandas das populações e nem várias modalidades terapêuticas para combater as epidemias fúngicas.⁴⁷

1.3 O PRINCIPAL AGENTE ETIOLÓGICO

Candida albicans (Robin CP, 1923; in Berkhout, 1923) *, de classificação taxonômica no domínio *Eukaryota*, rank *Opisthokonta*, reino *Fungi*, sub - reino *Dikarya*, filo *Ascomycota*, rank *Saccharomyceta*, subfilo *Saccharomycotina*, classe *Pichiomycetes*, ordem *Serinales*, família *Debaryomycetaceae*, clado *Candida / Lodderomyces* e gênero *Candida*, o qual contem mais de 40 espécies e foi primeiramente conhecida como *Saccharomyces albicans* (Robin CP, 1877)⁶⁶ e por *Monilia albicans* até 1923 (Kidd SE, Abdolrasouli A e Hagen F, 2023)⁶⁵, sendo diploide, apresentando genes ortólogos que assemelham - se aos genes dos ‘mating – type’ loci de outros fungos, inclusive aos de *Saccharomyces cerevisiae*,

*De acordo com Wittacker (1969), *Candida albicans*, cujo ancestral foi um fungo não liquenizado⁶², foi classificada no super – reino *Eucarionte*, reino *Fungi*, filo *Deuteromycota*, classe *Blastomycetes*, ordem *Moniliales*, família *Moniliaceae* e gênero *Candida*, o qual contem mais de 80 espécies⁴⁵, mas a falta de consenso⁶³ também favoreceu outra classificação, sendo colocada no grupo de fungos mitospóricos, anamorfos ou imperfeitos e classe *Blastomycetes*⁶⁴, por fim, a atual proposta⁶⁵ mantém a *C. albicans* no clado *Candida / Lodderomyces*.

os quais são responsáveis pela expressão gênica relacionada ao ciclo sexual e responsáveis pelas codificações gênicas tanto dos feromônios, quanto dos receptores destes. Embora não estando muito determinada suas funções, tudo indica que *C. albicans* tem um ciclo sexual completo em mamíferos, isto é, recombinação gênica surgindo fungos tetraploides originando células filhas diploides que compartilham genes paternos, também apresenta reprodução assexuada por brotamento, originando células filhas, e por conjugação, fundindo os tubos germinativos para originar corpos leveduriformes e células filhas também diploides.^{67–69} Contêm quitina e glicoproteínas, (1, 3) – e (1, 6) – β - D – glucanas, na parede celular, sendo um fungo polimórfico, leveduriforme, formando blastoconídios, que pode ter forma esférica, ou filamentosos, formando hifas verdadeiras, pseudohifas e clamidósporos, as quais expressam características estruturais próprias que influenciam diretamente no processo evolutivo da patogênese da candidíase. Portanto, é um patógeno oportunista podendo causar tanto infecções persistentes nas mucosas quanto infecções sistêmicas, acometendo principalmente pessoas imunocomprometidas.^{38,47,68,70,71} Sendo assim, o agravamento da doença também depende da resposta imunológica do indivíduo e de fatores gênicos e proteicos da *C. albicans*, cuja linhagem WO – 1, pesquisada no projeto *Candida* Genome Database, apresenta particularidades patogênicas, na virulência e na resistência aos antimicrobianos quando comparada a outras *Candida* spp. [espécies anteriormente e genericamente reunidas no gênero *Candida* que estão classificadas no subfilo *Saccharomycotina*], sendo necessárias pesquisas sobre interações patógeno – hospedeiro para a melhor compreensão da patogênese da doença.^{47,70–74}

Sendo o principal microambiente da *C. albicans* o intestino, pesquisas associando este microrganismo com esse hábitat em modelos murinos têm demonstrado que o fungo ao mudar sua expressão gênica e seu controle epigenético, controlando a fase claro – opaca *, intensificando a expressão gênica no ‘mating type – like‘ locus, ele passa a aumentar sua atividade reprodutiva, com isso, promovendo um grande crescimento populacional na superfície do tecido que culmina na invasão de tecidos adjacentes devido ao aumento da virulência.^{47,57,67–69,77}

1.4 MODELO EXPERIMENTAL INVERTEBRADO

*Fase claro – opaca divide – se em: Fase clara, em que a levedura tem a morfologia oval e clara, com o predomínio de colônias comensais; E fase opaca, a qual a levedura tem a morfologia alongada e escura, com colônias aptas para a reprodução e de caráter infectante.^{57,75,76}

O Tratado de Amsterdã, ratificado em 2010, consolidou as regras para a utilização de animais nas pesquisas europeias. Entrando em consenso ao uso de animais que deverá ser justificado após a concordância e a prática de três princípios (3 Rs), os quais já estavam em uso após 1957 e que são: reduzir o número de animais; refinar os protocolos para o melhor conforto do animal e amenizar a dor; e restaurar os animais por outros modelos experimentais, os quais não tenham tantas dificuldades em seguir os princípios bioéticos. Acrescentando aos problemas voltados à legislação, questões orçamentárias, o tempo de duração do ciclo biológico, ou da reprodução e a manutenção do criadouro, esses desafios levaram à procura de modelos alternativos, como o uso de *Galleria mellonella*, para substituir os mamíferos nas pesquisas.⁷⁸⁻⁸¹

Pesquisas correlacionando genomas humanos e de invertebrados mostraram que estes assemelham - se aos genes humanos que codificam, por exemplo, proteínas envolvidas no reconhecimento de patógenos ou na tradução gênica. Com isso, invertebrados como *Drosophila melanogaster* M., *Blattella germanica* L., *Culex quinquefasciatus* S., *Bombyx mori* L. e *Galleria mellonella* L. vêm sendo utilizados como modelos experimentais *in vivo* para avaliarem a eficácia de antimicrobianos, para compreender os mecanismos da imunidade inata no hospedeiro e a virulência de microrganismos, além de identificarem moléculas bioativas (com atividade anticâncer, antiviral e antimicrobiana), avaliar a toxicidade de conservantes de alimentos e em pesquisas agrícolas.^{73,80,82-85}

Dentre esses modelos invertebrados, a *G. mellonella* tem se destacado e representa uma forte ferramenta em estudos pré – clínicos, ocupando um lugar intermediário entre estudos *in vitro* e pesquisas com modelos vertebrados, além disso, apresenta uma alta utilidade em diversos centros de pesquisa, sendo usada pela primeira vez há oitenta e cinco anos.^{78,80,84-86}

Götz P, Matha V e Vilcinskas A (1997)⁸⁷ ampliaram o uso desse modelo para estudos com infecções fúngicas relacionando à resposta celular de plasmócitos aos metabolitos secundários oriundos de *Metarhizium anizopliae*, demonstrando as alterações morfológicas nessas células imunes.

E Cotter G, Doyle S e Kavanagh K (2000)⁸⁸, utilizaram *G. mellonella* para avaliar as patogenidades das espécies *C. albicans*, *N. glabrata* (*C. glabrata*), *C. tropicalis*, *K. marxianus* (*C. pseudotropicalis*), *P. kudriavzevii* (*C. krusei*) e *C. parapsilosis* (Complexo *Parapsilosis*). Então constataram uma evidente diferença de mortalidade larval perante as

espécies e suas linhagens. Também evidenciaram a grande patogenicidade da cepa *C. albicans* MEN e a pequena patogenicidade nas infecções com *Saccharomyces cerevisiae*.

Souza AC *et al.* (2015) ⁸⁹ utilizaram a *G. mellonella* para demonstrarem a resistência de cepas de *C. parapsilosis* (*C. parapsilosis sensu stricto*), cujos isolados foram obtidos durante um surto de candidemia no Brasil, que juntamente com experimentos *in vitro* e moleculares constataram sua resistência perante o fluconazol, sendo demonstrado mutações e superexpressão no gene ERG11 e superexpressões nos genes CDR1 e MDR1, comprovando suas ações em conjunto na característica de resistência, além de demonstrar o alto poder de disseminação nosocomial dessas cepas. Já Campos - Silva R *et al.* (2019) ⁹⁰ propuseram o uso da *G. mellonella* para avaliar antimicrobianos que atuem contra biofilmes de *Staphylococcus aureus* em superfícies de cerdas de escovas dentárias que são inseridas na larva, as quais mimetizam próteses médicas.

A espécie *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758), de classificação taxonômica, domínio *Eukaryota*, rank *Opisthokonta*, reino *Metazoa*, rank *Eumetazoa*, rank *Bilateria*, rank *Protostomia*, rank *Ecdysozoa*, rank *Panarthropoda*, filo *Arthropoda*, rank *Mandibulata*, rank *Pancrustacea*, subfilo *Hexapoda*, classe *Insecta*, rank *Dicondylia*, subclasse *Pterygota*, infraclasse *Neoptera*, cohort *Endopterygota*, superordem *Amphiesmenoptera*, ordem *Lepidoptera*, subordem *Glossata*, infraordem *Neolepidoptera*, parvordem *Heteroneura*, rank *Ditrysia*, rank *Obtectomera*, superfamília *Pyraloidea*, família *Pyalidae*, subfamília *Galleriinae* e gênero *Galleria*. ⁶⁶

Essa mariposa é holometábola desenvolvendo – se em ovo, larva, pupa e adulto. Os ovos podem ser ovais, brancos ou rosa claro, com desenvolvimento variando por volta de oito dias para tornarem - se larvas de primeiro instar, as quais podem alcançar o sétimo instar. As larvas são geralmente opacas e de cor branca, podendo medir cerca de 3 cm de comprimento e alcançar 0,5 g de massa. O próximo estágio é a pupa, que pode demorar até oito semanas para tornar - se mariposa. As mariposas são cinzentas, sendo a fêmea maior, a qual pode botar de 50 a 150 ovos. Já os machos são menores, de cor mais clara. Além disso, o ciclo de vida é rápido, com alta taxa de reprodução, alta adaptabilidade sob temperatura a 37 °C e apresenta baixo custo na criação. ^{73,80,83,85,91}

Cardoso AC *et al.* (2007) ⁹², constataram a necessidade de sincronização conjunta entre a periodicidade das larvas com o desenvolvimento da pesquisa envolvendo nematóides entomopatogênicos. Sendo assim, esses cientistas pesquisaram os efeitos de diferentes

temperaturas sobre os estágios imaturos de *G. mellonella* para um melhor manejo das criações em laboratórios. No experimento esses insetos se desenvolveram mais rapidamente em 32 °C e obtiveram maiores sobrevivências nos estágios embrionário e de pupa, em 27 °C e 22 °C, respectivamente.

Já Fuchs BB *et al.* (2010) ⁹³ enfatizam que as larvas se desenvolvem entre as temperaturas de 25 e 37 °C, sendo assim, estando dentro da temperatura corporal humana em que os patógenos destes se desenvolvem melhor, além dessa variação estar dentro da temperatura do habitat e do nicho ecológico dos fungos.

Pesquisas têm demonstrado que a qualidade da dieta pode afetar a fecundidade, o ciclo de vida e a resposta imune perante os microrganismos, já que os alimentos fornecem energia para a manutenção das funções fisiológicas no organismo do inseto. ^{91,94,95}

Nomura É e Gobbi N (2004) ⁹⁶ verificando que o parasitóide *Apanteles galleriae* tem preferência parasitária à *Achroia grisella*, também pesquisaram *G. mellonella*, constatando que apesar de uma menor taxa de viabilidade larval da *A. grisella*, quando criadas com dieta natural ou artificial, em relação à *G. mellonella*, não apresentaram diferenças significativas na taxa de viabilidade pupal e nem nos períodos de desenvolvimentos larval e pupal, quando comparadas com as *G. mellonella* em ambas dietas. No entanto, as larvas de *G. mellonella*, quando infectadas, apresentaram baixa taxa de mortalidade e menor período de desenvolvimento do parasitóide, quando criadas com dieta artificial e quando comparadas às *A. grisella* criadas com as duas dietas.

De Castro IRD e Andrade AA (2021) ⁹⁷ criaram *G. mellonella* com três dietas diferentes para avaliarem o ciclo de vida e a susceptibilidade de suas larvas perante a infecção por *C. albicans*, demonstrando que apesar de não ter diferenças significativas no tempo de duração dos ciclos de vidas e gerando larvas saudáveis, quando comparadas as três dietas, houve diferenças significativas em: Ao comparar o ganho de massa, observaram que as larvas criadas com ração de cão ganharam maiores massas durante grande parte do tempo dos ciclos larvais, quando comparadas às larvas criadas com ração artificial com mel; Ao comparar a sobrevivência larval, as larvas criadas com ração de cão obtiveram uma menor mortalidade em relação às larvas criadas com as dietas com ou sem mel; E ao comparar a quantidade de hemócitos na hemolinfa das larvas, evidenciaram uma maior quantidade de hemócitos nas larvas criadas com ração artificial com mel, quando comparadas as larvas criadas com ração de cão.

Galleria mellonella possui uma resposta imune inata bastante eficaz no combate aos patógenos, sendo dividida entre componentes celulares, os quais são subpopulações de tipos celulares, compostos por pelo menos 6 tipos celulares comumente conhecidos como hemócitos, que são prohemócitos, oenocitóides, esferulócitos, granulócitos, plasmatócitos* e coagulócitos, os quais possuem alto poder de aderência e fagocítico†. Também tem componentes humorais como peptídeos antimicrobianos (por exemplo, gallerimicina, galiomicina, cecropina, cobatoxina, moricina, hemolina e gloverina), enzimas líticas, vias de sinalizações transducionais, regulação transcripcional da expressão gênica do sistema imune e produção de moléculas efetores (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio). Além do tegumento quitinoso, o qual tem a função de uma barreira aos patógenos. Além da

*Price CD e Ratcliffe NA (1974)⁹⁸ capturaram 28 insetos (15 ordens) e coletaram as hemolinhas das larvas ou dos adultos e após coloração Giemsa as células foram observadas em microscópio óptico, sob contraste de fase, verificando 6 tipos celulares, os quais são prohemócitos, plasmatócitos, granulócitos, esferulócitos, cistócitos e oenocitóides, constatando: Todos continham os 3 primeiros tipos celulares; Os insetos das ordens *Orthoptera* e *Tricoptera* e *Clitumnus extradentatus*, *Aschena grandis* e *Rhodnius prolixus* não continham esferulócitos; Insetos das ordens *Lepidoptera*, *Diptera*, *Thysanura* e *Hymenoptera* e *Dysdercus cingulatus* não continham cistócitos; Os das ordens *Dermaptera*, *Dictyoptera*, *Hemiptera*, *Isoptera*, *Neuroptera*, *Orthoptera*, *Phasmida*, *Plecoptera* e *Libellula quadrimaculata* e *Apis mellifera* não continham oenocitóides; Também, utilizando microscopia eletrônica, sugeriram que esses tipos celulares são diferentes estágios de desenvolvimento de um tipo celular básico (o hemócito) ou de um estágio para outro.

† Bergin D, Brennan M e Kavanagh K (2003)⁹⁹ observaram variações na densidade de hemócitos e na carga fúngica em larvas de *G. mellonella* visando analisar a patogenicidade fúngica e a resposta imune perante às infecções, concluindo que estes parâmetros, densidade de hemócitos e a carga fúngica, são inversamente relacionados, além disso, as cepas fúngicas patogênicas conseguiram proliferar – se causando a morte larval, em relação a menos patogênica, a qual foi morta com uma resposta imune larval eficaz; E Tojo S *et al.* (2000)¹⁰⁰ demonstraram que os poderes fagocíticos e aderentes de granulócitos e plasmatócitos [principais células fagocíticas na defesa antibacteriana e antifúngica]¹⁰¹ sofrem influências nas presenças, em diferentes concentrações, de ácido etileno diamino tetracético (EDTA), cloreto de cálcio (CaCl_2), p – nitrofenil p' – guanidino benzoato (p - NPGB) ou feniltiourea (PTU), sendo que apenas o CaCl_2 aumentou a aderência e a atividade fagocítica dos plasmatócitos e o resultado oposto obteve – se com o EDTA, também, o p – NPGB teve efeito inibitório na aderência e na atividade fagocítica dos granulócitos; Campbell JS *et al.* (2024)¹⁰² utilizaram a citometria de fluxo e a microscopia confocal para avaliar, *in vivo* e *ex vivo*, a função fagocitária de hemócitos de *G. mellonella* infectando – as com *Escherichia coli*, expressando no cromossomo o encode mCherry, e *C. albicans*, também, ambos conjugados com biopartículas Phrodo™ Red Succinimidyl Ester e com diferentes inóculos dos patógenos, ou analisando apenas biopartículas Phrodo™ Red Zimosan, constatando: A confiabilidade desse modelo invertebrado ao comparar com estudos *in vitro* utilizando macrófagos murinos, isso quando a cultura para *C. albicans* foi suplementada com glicose e / ou lactato, além de apontar para o não procedimento de centrifugação de hemócitos, para o melhoramento da acurácia desse modelo quando a função fagocitária é visada; A formação de clusters conforme o tamanho celular e a complexidade intracelular, evidenciando que não se pode dividir as subpopulações de hemócitos utilizando apenas os dois parâmetros; A degradação do Zimosan pelo sistema fagocitário hemocitário a partir de 24 h após a injeção (hpi) nas larvas; O aumento significativo de hemócitos fagocitando, em 1 hpi, quando aumentados os inóculos de mCherry *E. coli*, obtendo um pico de 80%, já com Phrodo™ Red SE *C. albicans*, em 2 hpi, obteve um pico de 48,10 % aumentando os inóculos [isso é devido ao maior tamanho e patogenicidade de *C. albicans*].

fagocitose, outros processos imunes envolvidos na defesa do inseto são: A nodulação *, a qual os patógenos são mortos por aprisionamento em agregados de hemócitos; A melanização, iniciada após o reconhecimento do patógeno e atuando no processo de nodulação, é produzida pela cascata de fenoloxidase; E a produção de peptídeos antimicrobianos capazes de imobilizar e destruir os agentes invasores. O hemocele tem papel importante no sistema imune, pois é nele que a hemolinfa está contida e nela esses componentes imunes estão presentes [também estão nos tecidos e órgãos], além dela participar dos transportes de nutrientes e resíduos. O sistema imune inato desse invertebrado apresenta uma similaridade † com o dos vertebrados, tornando esse modelo experimental bastante promissor em pesquisas que visam novos antimicrobianos, também, nos estudos de interações parasito – hospedeiro, em que as interações dos hemócitos com patógenos ainda não estão bem esclarecidas por causa da escassez de pesquisas devido à complexidade para os experimentos envolvendo as diferentes subpopulações de hemócitos. ^{73,78,91,93,98,99,101–108}

García – Carnero LC *et al.* (2020) ⁷² utilizaram cepas mutantes de *C. tropicalis* ao inocular em *G. mellonella* para pesquisar a virulência delas, constatando que a disruptura na via de glicosilação de proteínas, consequência da mutação, causa uma redução no poder de letalidade dessas cepas podendo reduzir a carga fúngica nas larvas. Além disso, avaliaram outros parâmetros, como: Quantidade de hemócitos, em que houve diminuição nas larvas infectadas com a cepa selvagem, com isso, associaram essa diminuição no início da infecção com a alta mortalidade; Atividade da fenoloxidase e produção de melanina, as quais foram menores nas larvas infectadas com as cepas mutantes; E o índice de toxicidade devido à liberação de lactato desidrogenase na hemolinfa, o qual foi baixo nas infecções com as cepas mutantes, associando essa diminuição com cepas menos virulentas. Também, pesquisaram os

* Walters JB e Ratcliffe NA (1983) ¹⁰¹ demonstram que a nodulação, que é a formação de agregados de hemócitos melanizados, é a principal defesa da *G. mellonella* contra patógenos, cuja formação nodular pode resultar na morte do patógeno por meio da ativação de mecanismos antimicrobianos, ou no aprisionamento dele mantendo – o neutralizado, porém este pode evadir – se e causar a morte larval; Avaliando a infecção com *E. coli* cepa NCIB 10233, não patogênica, e *Bacillus cereus* cepa NCTC 2599, patogênico, verificaram uma maior produção de nódulos quando a infecção foi pela cepa patogênica e constataram que esta conseguiu evadir – se do processo nodular, resultando em maior multiplicação na hemolinfa e morte larval.

† Gallorini M *et al.* (2024) ¹⁰³, utilizando a citometria de fluxo para analisar hemócitos de *G. mellonella*, monócitos e macrófagos, ambos de humanos, foram sensibilizadas com lipopolissacarídeo de *E. coli* e foram evidenciadas as associações entre os marcadores de superfícies celulares presentes em processos infecciosos (CD 14, CD 44, CD 80, CD 163 e CD 200), também, os grupos larvais foram inoculados com *Staphylococcus aureus* e vancomicina. Com isso foi possível averiguar a expressão fenotípica e quantificar essas células no período de 24 h, verificando o papel funcional dessas células no processo infeccioso com ou sem tratamento e suas similaridades com macrófagos, já que CD 80 polariza para o padrão de macrófagos M1 e CD 163 para M2, nos humanos.

mesmos parâmetros em isolados clínicos de *C. tropicalis*, acrescentando com os resultados anteriores. Também, pesquisaram *Candida* spp. [espécies anteriormente e genericamente reunidas no gênero *Candida* que estão classificadas no subfiló *Saccharomycotina*], sendo que *C. albicans*, *Candidozyma auris* (*C. auris*) e *C. tropicalis* causaram uma mortalidade larval mais precoce e o contrário observaram em *C. metapsilosis*, *P. kudriavzevii* (*C. krusei*) e *Meyerozyma guilliermondii* (*C. guilliermondii*); *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis* foram os grupos intermediários. Acrescentando os resultados, já que os grupos de mortalidades precoce e intermediária obtiveram redução no número de hemócitos e aumento dos valores dos demais parâmetros. E o inverso foi observado nos grupos de mortalidades tardias.

Também, Marcos – Zambrano LJ *et al.* (2020)¹⁰⁹ avaliaram as virulências de *C. albicans* e *C. tropicalis*, que foram alta, *N. glabrata* (*C. glabrata*) e *C. parapsilosis*, intermediária, e *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), baixa, em amostras isoladas de pacientes com candidemia, as quais foram submetidas na análise histopatológica das larvas e observados processos invasivos, cujas características foram dependentes das espécies e das virulências. O mesmo observaram em infecções com cepas da mesma espécie, obtendo: Em infecções com *C. albicans*, os grupos infectados com as cepas de baixa virulência apresentaram formações de nódulos menores e abundância de hemócitos evidenciando uma resposta imune efetiva, enquanto as infecções com cepas de alta virulência promoveram uma invasão tecidual logo no primeiro dia após a infecção, estimulando um intenso processo de melanização com presença de grandes nódulos e mortalidade larval no segundo dia após a infecção; Já nas infecções com cepas de alta virulência de *C. tropicalis*, observaram intensa invasão tecidual e necrose do tecido adiposo larvais independente do tempo de infecção, enquanto nas larvas inoculadas com cepas de baixa virulência observaram apenas grande número de nódulos; Para os grupos infectados com cepas de baixa virulência de *C. parapsilosis*, apenas apresentaram pequenos nódulos, no entanto, para os infectados com cepas de alta virulência observaram a presença de grandes nódulos, melanização em tecidos vitais, parcial necrose no tecido adiposo e invasão tecidual no segundo dia após a infecção; Quando foram infectados com cepas de baixa virulência de *N. glabrata* (*C. glabrata*) apresentaram grande melanização com presença de pequenos nódulos, contudo, sob infecções com cepas altamente virulentas observaram grande melanização, invasão no tecido adiposo e necroses; Todavia, para as larvas infectadas com *P. kudriavzevii* (*C. krusei*) os resultados foram semelhantes e evidenciando grandes hemócitos e pouca melanização.

Com o uso do excelente modelo *G. mellonella*, já consolidado na ciência, de ótimo custo – benefício ¹¹⁰ e nova ferramenta na abordagem em pesquisa pré - clínica ⁷⁸, além disso, o uso desse recurso para realizar screening ⁹³ proporcionará resultados que nortearão outras pesquisas para as etapas de escolhas de alvos terapêuticos.

REFERÊNCIAS*

* De acordo com o Estilo Vancouver.

1. Piraccini BM, Sisti A, Tosti A. Long - term follow - up of toenail onychomycosis caused by dermatophytes after successful treatment with systemic antifungal agents. *J Am Acad Dermatol*. 2010; 62 (3): 411 – 4.
2. Shemer A, Gupta AK, Kamshov A, Babaev M, Farhi R, Daniel CR, et al. Topical antifungal treatment prevents recurrence of toenail onychomycosis following cure. *Dermatol Ther [Internet]*. 2017 [citado 26 de junho de 2025]; 30 (5).
3. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky - Zeichner L, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2016; 62 (4): e1 – 50.
4. Roemer T, Krysan DJ. Antifungal Drug Development: Challenges, Unmet Clinical Needs, and New Approaches. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014; 4 (5): a019703.
5. Hoenigl M, Salmanton - García J, Egger M, Gangneux JP, Bicanic T, Arikan - Akdagli S, et al. Guideline adherence and survival of patients with candidaemia in Europe: Results from the ECMM *Candida* III multinational European observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2023; 23 (6): 751 – 61.
6. Gintjee TJ, Donnelley MA, Thompson GR. Aspiring Antifungals: Review of Current Antifungal Pipeline Developments. *J Fungi*. 2020; 6 (1): 28.
7. Donovan R, Gold W, Pagano JF, Stout HA. Amphotericins A and B, antifungal antibiotics produced by a *Streptomyces*. I. In vitro studies. *Antibiot Annu*. 1956 de 1955; 3: 579 – 86.
8. Gray KC, Palacios DS, Dailey I, Endo MM, Uno BE, Wilcock BC, et al. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109 (7): 2234 – 9.
9. Perfect JR. The antifungal pipeline: A reality check. *Nat Rev Drug Discov*. 2017; 16 (9): 603 – 16.
10. Cornely OA, Sprute R, Bassetti M, Chen SCA, Groll AH, Kurzai O, et al. Global guideline for the diagnosis and management of candidiasis: An initiative of the ECMM in cooperation with ISHAM and ASM. *Lancet Infect Dis*. 2025; 25 (5): e280 – 93.
11. Nyfeler R, Keller - Schierlein W. [Metabolites of microorganisms. 143. Echinocandin B, a novel polypeptide - antibiotic from *Aspergillus nidulans* var. *echinulatus*: Isolation and structural components]. *Helv Chim Acta*. 1974; 57 (8): 2459 – 77.
12. Mukherjee PK, Sheehan D, Puzniak L, Schlamm H, Ghannoum MA. Echinocandins: Are they all the same? *J Chemother Florence Italy*. 2011; 23 (6): 319 – 25.
13. Bowman JC, Hicks PS, Kurtz MB, Rosen H, Schmatz DM, Liberator PA, et al. The Antifungal Echinocandin Caspofungin Acetate Kills Growing Cells of *Aspergillus fumigatus* In Vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46 (9): 3001 – 12.

14. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Nagy E, Dobiasova S, et al. *Candida krusei*, a Multidrug - Resistant Opportunistic Fungal Pathogen: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol*. 2008; 46 (2): 515 – 21.
15. Allen D, Wilson D, Drew R, Perfect J. Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015; 13 (6): 787 – 98.
16. Lass - Flörl C. Triazole antifungal agents in invasive fungal infections: A comparative review. *Drugs*. 2011; 71 (18): 2405 – 19.
17. Mohr J, Johnson M, Cooper T, Lewis JS, Ostrosky - Zeichner L. Current options in antifungal pharmacotherapy. *Pharmacotherapy*. 2008; 28 (5): 614 – 45.
18. Slavin MA, Osborne B, Adams R, Levenstein MJ, Schoch HG, Feldman AR, et al. Efficacy and safety of fluconazole prophylaxis for fungal infections after marrow transplantation - A prospective, randomized, double - blind study. *J Infect Dis*. 1995; 171 (6): 1545 – 52.
19. Balfour JA, Faulds D. Terbinafine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in superficial mycoses. *Drugs*. 1992; 43 (2): 259 – 84.
20. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action [Internet]. World Health Organization. 2022 [citado 4 de julho de 2024]. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>
21. Charnaud S, Moorthy V, Reeder J, Ross AL. WHO target product profiles to shape global research and development. *Bull World Health Organ*. 2023; 101 (05): 326 – 30.
22. de Foggi CC, de Oliveira RC, Fabbro MT, Vergani CE, Andres J, Longo E, et al. Tuning the Morphological, Optical, and Antimicrobial Properties of α -Ag₂WO₄ Microcrystals Using Different Solvents. *Cryst Growth Des*. 2017; 17 (12): 6239 – 46.
23. Foggi CC, Fabbro MT, Santos LPS, De Santana YVB, Vergani CE, Machado AL, et al. Synthesis and evaluation of α -Ag₂WO₄ as novel antifungal agent. *Chem Phys Lett*. 2017; 674: 125 – 9.
24. Janáky C, Rajeshwar K, De Tacconi NR, Chanmanee W, Huda MN. Tungsten - based oxide semiconductors for solar hydrogen generation. *Catal Today*. 2013; 199: 53 – 64.
25. Selvamani M, Krishnamoorthy G, Ramadoss M, Sivakumar PK, Settu M, Ranganathan S, et al. Ag@Ag₈W₄O₁₆ nanoroasted rice beads with photocatalytic, antibacterial and anticancer activity. *Mater Sci Eng C*. 2016; 60: 109 – 18.
26. Heyer O, Hollmann N, Klassen I, Jodlauk S, Bohatý L, Becker P, et al. A new multiferroic material: MnWO₄. *J Phys Condens Matter*. 2006; 18 (39): L471.
27. Assis M, Cordoncillo E, Torres - Mendieta R, Beltrán-Mir H, Mínguez - Vega G, Oliveira R, et al. Towards the scale - up of the formation of nanoparticles on α -Ag₂WO₄ with bactericidal properties by femtosecond laser irradiation. *Sci Rep*. 2018; 8: 1884.

28. Alvarez-Roca R, Gouveia AF, de Foggi CC, Lemos PS, Gracia L, da Silva LF, et al. Selective Synthesis of α -, β -, and γ -Ag₂WO₄ Polymorphs: Promising Platforms for Photocatalytic and Antibacterial Materials. *Inorg Chem*. 2021; 60 (2): 1062 – 79.
29. da Silva LF, Catto AC, Avansi W, Cavalcante LS, Andrés J, Aguir K, et al. A novel ozone gas sensor based on one - dimensional (1D) α -Ag₂WO₄ nanostructures. *Nanoscale*. 2014; 6 (8): 4058 – 62.
30. Da Silva LF, Catto AC, Avansi W, Cavalcante LS, Mastelaro VR, Andrés J, et al. Acetone gas sensor based on α -Ag₂WO₄ nanorods obtained via a microwave-assisted hydrothermal route. *J Alloys Compd*. 2016; 683: 186 – 90.
31. Lin Z, Li J, Zheng Z, Yan J, Liu P, Wang C, et al. Electronic Reconstruction of α -Ag₂WO₄ Nanorods for Visible-Light Photocatalysis. *ACS Nano*. 2015; 9 (7): 7256 – 65.
32. Roca RA, Sczancoski JC, Nogueira IC, Fabbro MT, Alves HC, Gracia L, et al. Facet - dependent photocatalytic and antibacterial properties of α -Ag₂ WO₄ crystals: Combining experimental data and theoretical insights. *Catal Sci Technol*. 2015; 5 (8): 4091 – 107.
33. Zhang R, Cui H, Yang X, Tang H, Liu H, Li Y. Facile hydrothermal synthesis and photocatalytic activity of rod - like nanosized silver tungstate. *Micro Nano Lett*. 2012; 7 (12): 1285 – 8.
34. Longo VM, De Foggi CC, Ferrer MM, Gouveia AF, André RS, Avansi W, et al. Potentiated Electron Transference in α -Ag₂ WO₄ Microcrystals with Ag Nanofilaments as Microbial Agent. *J Phys Chem A*. 2014; 118 (31): 5769 – 78.
35. Dutta DP, Singh A, Ballal A, Tyagi AK. High Adsorption Capacity for Cationic Dye Removal and Antibacterial Properties of Sonochemically Synthesized Ag₂ WO₄ Nanorods. *Eur J Inorg Chem*. 2014; 2014 (33): 5724 – 32.
36. Arendrup MC. Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care*. 2010; 16 (5): 445 – 52.
37. Arendrup MC, Bruun B, Christensen JJ, Fuursted K, Johansen HK, Kjældgaard P, et al. National Surveillance of Fungemia in Denmark (2004 to 2009). *J Clin Microbiol*. 2011; 49 (1): 325 – 34.
38. Vazquez JA, Sobel JD. Mucosal candidiasis. *Infect Dis Clin North Am*. 2002; 16 (4): 793 – 820.
39. Seidel D, Durán Graeff LA, Vehreschild MJGT, Wisplinghoff H, Ziegler M, Vehreschild JJ, et al. FungiScope™ - Global Emerging Fungal Infection Registry. *Mycoses*. 2017; 60 (8): 508 – 16.
40. Koehler P, Arendrup MC, Arikan - Akdagli S, Bassetti M, Bretagne S, Klingspor L, et al. ECMM CandiReg - A ready to use platform for outbreaks and epidemiological studies. *Mycoses*. 2019; 62 (10): 920 – 7.

41. Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS). GLASS early implementation protocol for inclusion of *Candida* spp. [Internet]. World Health Organization. 2019 [citado 4 de julho de 2024]. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-WSI-AMR-2019.4>
42. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and Multi - National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. J Fungi Basel Switz. 2017; 3 (4): 57.
43. Denning DW. Global incidence and mortality of severe fungal disease. Lancet Infect Dis. 2024; 24 (7): e428 – 38.
44. de Oliveira AGMG, de Oliveira DBC, de Oliveira GF. A 10 - year survey of dermatomycoses in Uberaba, southeast Brazil. Acta Biol Bras. 2024; 7 (2): 103 – 17.
45. Mezzare A, Fuentefria AM. Micologia no laboratório clínico [Internet]. 1º ed. Barueri, SP: Manole; 2012 [citado 31 de janeiro de 2025]. 181 p. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788520451762/pageid/4>
46. Anderson HW. Yeast - Like Fungi of the Human Intestinal Tract. J Infect Dis. 1917; 21 (4): 341 – 86.
47. Köhler JR, Hube B, Puccia R, Casadevall A, Perfect JR. Fungi that Infect Humans. Microbiol Spectr [Internet]. junho de 2017; 5 (3). Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/microbiolspec.funk-0014-2016>
48. Aggor FEY, Break TJ, Trevejo-Nuñez G, Whibley N, Coleman BM, Bailey RD, et al. Oral epithelial IL – 22 / STAT3 signaling licenses IL – 17 - mediated immunity to oral mucosal candidiasis. Sci Immunol. 2020; 5 (48): eaba0570.
49. Nash AK, Auchtung TA, Wong MC, Smith DP, Gesell JR, Ross MC, et al. The gut mycobiome of the Human Microbiome Project healthy cohort. Microbiome. 2017; 5: 153.
50. Jackson BE, Wilhelmus KR, Mitchell BM. Genetically - Regulated Filamentation Contributes to *Candida albicans* Virulence During Corneal Infection. Microb Pathog. 2007; 42 (2 – 3): 88 – 93.
51. Malani AN, Kauffman CA. *Candida* urinary tract infections: Treatment options. Expert Rev Anti Infect Ther. 2007; 5 (2): 277 – 84.
52. Rosenbach A, Dignard D, Pierce JV, Whiteway M, Kumamoto CA. Adaptations of *Candida albicans* for Growth in the Mammalian Intestinal Tract. Eukaryot Cell. 2010; 9 (7): 1075 – 86.
53. Gumbo T, Isada CM, Hall G, Karafa MT, Gordon SM. *Candida glabrata* Fungemia. Clinical features of 139 patients. Medicine (Baltimore). 1999; 78 (4): 220 – 7.
54. McCarty TP, White CM, Pappas PG. Candidemia and Invasive Candidiasis. Infect Dis Clin North Am. 2021; 35 (2): 389 – 413.

55. Pfaller M, Neofytos D, Diekema D, Azie N, Meier - Kriesche HU, Quan SP, et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004 - 2008. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012; 74 (4): 323 – 31.
56. Vrieni G, Matsiota-Bernard P. Molecular typing of *Candida* isolates from patients hospitalized in an intensive care unit. *J Infect*. 2001; 42 (1): 50 – 6.
57. Pande K, Chen C, Noble SM. Passage through the mammalian gut triggers a phenotypic switch that promotes *Candida albicans* commensalism. *Nat Genet*. 2013; 45 (9): 1088 – 91.
58. Robert F, Lebreton F, Bougnoux ME, Paugam A, Wassermann D, Schlotterer M, et al. Use of random amplified polymorphic DNA as a typing method for *Candida albicans* in epidemiological surveillance of a burn unit. *J Clin Microbiol*. 1995; 33 (9): 2366 – 71.
59. Soulountsi V, Schizodimos T, Kotoulas SC. Deciphering the epidemiology of invasive candidiasis in the intensive care unit: Is it possible? *Infection*. 2021; 49 (6): 1107 – 31.
60. Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, et al. A Prospective Observational Study of Candidemia: Epidemiology, Therapy, and Influences on Mortality in Hospitalized Adult and Pediatric Patients. *Clin Infect Dis*. 2003; 37 (5): 634 – 43.
61. Andes DR, Safdar N, Baddley JW, Playford G, Reboli AC, Rex JH, et al. Impact of Treatment Strategy on Outcomes in Patients with Candidemia and Other Forms of Invasive Candidiasis: A Patient - Level Quantitative Review of Randomized Trials. *Clin Infect Dis*. 2012; 54 (8): 1110 – 22.
62. Lutzoni F, Pagel M, Reeb V. Major fungal lineages are derived from lichen symbiotic ancestors. *Nature*. 2001; 411 (6840): 937 – 40.
63. Hawksworth DL, Crous PW, Redhead SA, Reynolds DR, Samson RA, Seifert KA, et al. The Amsterdam Declaration on Fungal Nomenclature. *IMA Fungus Glob Mycol J*. 2011; 2 (1): 105 – 12.
64. Zaitz C. *Compêndio de Micologia Médica* [Internet]. 2º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010 [citado 4 de fevereiro de 2025]. 423 p. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/978-85-277-1962-9/pageid/5>
65. Kidd SE, Abdolrasouli A, Hagen F. Fungal Nomenclature: Managing Change is the Name of the Game. *Open Forum Infect Dis*. 2023; 10 (1): ofac559.
66. Schoch CL, Ciufo S, Domrachev M, Hottel CL, Kannan S, Khovanskaya R, et al. NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. *Database J Biol Databases Curation*. 2020; 2020: baaa062.
67. Lockhart SR, Daniels KJ, Zhao R, Wessels D, Soll DR. Cell Biology of Mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2003; 2 (1): 49 – 61.

68. Hull CM, Raisner RM, Johnson AD. Evidence for mating of the “asexual” yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science*. 2000; 289 (5477): 307 – 10.
69. Magee BB, Magee PT. Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL α and MTL α strains. *Science*. 2000; 289 (5477): 310 – 3.
70. Borman AM. Of mice and men and larvae: *Galleria mellonella* to model the early host - pathogen interactions after fungal infection. *Virulence*. 2017; 9 (1): 9 – 12.
71. Costanzo MC, Arnaud MB, Skrzypek MS, Binkley G, Lane C, Miyasato SR, et al. The *Candida* Genome Database: Facilitating research on *Candida albicans* molecular biology. *FEMS Yeast Res*. 2006; 6 (5): 671 – 84.
72. García - Carnero LC, Clavijo - Giraldo DM, Gómez - Gaviria M, Lozoya - Pérez NE, Tamez - Castrellón AK, López - Ramírez LA, et al. Early Virulence Predictors during the *Candida* Species – *Galleria mellonella* Interaction. *J Fungi*. 2020; 6 (3): 152.
73. Trevijano - Contador N, Zaragoza O. Immune Response of *Galleria mellonella* against Human Fungal Pathogens. *J Fungi*. 2018; 5 (1): 3.
74. Rossoni RD, Fuchs BB, de Barros PP, Velloso M dos S, Jorge AOC, Junqueira JC, et al. *Lactobacillus paracasei* modulates the immune system of *Galleria mellonella* and protects against *Candida albicans* infection. *PLoS ONE*. 2017; 12 (3): e0173332.
75. Bennett RJ, Johnson AD. Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle. *Annu Rev Microbiol*. 2005; 59 (1): 233 – 55.
76. Slutsky B, Staebell M, Anderson J, Risen L, Pfaller M, Soll DR. “White - opaque transition”: a second high - frequency switching system in *Candida albicans*. *J Bacteriol*. 1987; 169 (1): 189 – 97.
77. Noble SM, Johnson AD. Strains and Strategies for Large - Scale Gene Deletion Studies of the Diploid Human Fungal Pathogen *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*. 2005; 4 (2): 298 – 309.
78. Wright CL, Kavanagh O. *Galleria mellonella* as a Novel In Vivo Model to Screen Natural Product - Derived Modulators of Innate Immunity. *ResearchGate*. 2022; 12 (6587): 16.
79. Fröhlich E, Loizou GD. Editorial: 3Rs - Strategies for reduction and refinement of animal studies. *Front Pharmacol*. 2023; 14: 1200965.
80. Serrano I, Verdial C, Tavares L, Oliveira M. The Virtuous *Galleria mellonella* Model for Scientific Experimentation. *Antibiotics*. 2023; 12 (3): 505.
81. Tsai CJY, Loh JMS, Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*. 2016; 7 (3): 214 – 29.
82. Lindegren JE, Valero KA, Mackey BE. Simple In Vivo Production and Storage Methods for *Steinernema carpocapsae* Infective Juveniles. *J Nematol*. 1993; 25 (2): 193 – 7.

83. Mikulak E, Gliniewicz A, Przygodzka M, Solecka J. *Galleria mellonella* L. as model organism used in biomedical and other studies. *Przegl Epidemiol*. 2018; 72 (1): 57 – 73.
84. Wojda I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Sci*. 2017; 24 (3): 342 – 57.
85. Wojda I, Staniec B, Sułek M, Kordaczuk J. The greater wax moth *Galleria mellonella*: biology and use in immune studies. *Pathog Dis*. 2020; 78 (9): ftaa057.
86. Ramarao N, Nielsen - Leroux C, Lereclus D. The Insect *Galleria mellonella* as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis. *J Vis Exp JoVE*. 2012; (70): 4392.
87. Götz P, Matha V, Vilcinskas A. Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J Insect Physiol*. 1997; 43 (12): 1149 – 59.
88. Cotter G, Doyle S, Kavanagh K. Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000; 27 (2): 163 – 9.
89. Souza ACR, Fuchs BB, Pinhati HMS, Siqueira RA, Hagen F, Meis JF, et al. *Candida parapsilosis* Resistance to Fluconazole: Molecular Mechanisms and In Vivo Impact in Infected *Galleria mellonella* Larvae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59 (10): 6581 – 7.
90. Campos-Silva R, Brust FR, Trentin DS, Macedo AJ. Alternative method in *Galleria mellonella* larvae to study biofilm infection and treatment. *Microb Pathog*. 2019; 137: 103756.
91. Cutuli MA, Petronio G, Vergalito F, Magnifico I, Pietrangelo L, Venditti N, et al. *Galleria mellonella* as a consolidated in vivo model hosts: New developments in antibacterial strategies and novel drug testing. *Virulence*. 2019; 10 (1): 527 – 41.
92. Cardoso AC, Prata MCDA, Furlong J, Prezoto F. Exigências térmicas de estágios imaturos de *Galleria mellonella* L. (*Lepidoptera: Pyralidae*). *Neotrop Entomol*. 2007; 36 (5): 657 – 61.
93. Fuchs BB, O'Brien E, Khoury JBE, Mylonakis E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence*. 2010; 1 (6): 475 – 82.
94. Jorjão AL, Oliveira LD, Scorzoni L, Figueiredo - Godoi LMA, Cristina A. Prata M, Jorge AOC, et al. From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies. *Virulence*. 2018; 9 (1): 383 – 9.
95. Pereira MF, Rossi CC. Overview of rearing and testing conditions and a guide for optimizing *Galleria mellonella* breeding and use in the laboratory for scientific purposes. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 2020; 128 (12): 607 – 20.
96. Nomura É, Gobbi N. Efeito da alimentação diferencial no ciclo de vida de *Achroia grisella* F. (*Lepidoptera: Pyralidae*) e *Galleria mellonella* L. (*Lepidoptera: Pyralidae*) e

- na capacidade de discriminação do parasitóide *Apanteles galleriae* W. (*Hymenoptera: Braconidae*) [Internet] [dissertação]. [Ribeirão Preto]: FFCLRP - USP; 2004. Disponível em:
https://dedalus.usp.br/F/SLXTCL2YH2G2FD1II3BTM5FFQSFHUB3AFKTM4UQU2GKKBK35VY-21810?func=full-set-set&set_number=006517&set_entry=000008&format=999
97. De Castro IRD, Andrade AA. Efeito de Diferentes Dietas no Ciclo de Vida de *Galleria mellonella* e na Suscetibilidade de suas Larvas à Infecção por *Candida albicans* [monografia]. [Uberaba]: UFTM; 2021.
 98. Price CD, Ratcliffe NA. A reappraisal of insect haemocyte classification by the examination of blood from fifteen insect orders. *Z Zellforsch Mikrosk Anat Vienna Austria* 1948. 1974; 147 (4): 537 – 49.
 99. Bergin D, Brennan M, Kavanagh K. Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes Infect.* 2003; 5 (15): 1389 – 95.
 100. Tojo S, Naganuma F, Arakawa K, Yokoo S. Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J Insect Physiol.* 2000; 46 (7): 1129 – 35.
 101. Walters B, Ratcliffe NA. Studies on the in vivo cellular reactions of insects: Fate of pathogenic and non – pathogenic bacteria in *Galleria mellonella* nodules. *J. Insect Physiol.* 1983; 29 (5): 417 - 424.
 102. Campbell JS, Pearce JC, Bebes A, Pradhan A, Yucel R, Brown AJP, et al. Characterising phagocytes and measuring phagocytosis from live *Galleria mellonella* larvae. *Virulence.* 2024; 15 (1): 2313413.
 103. Gallorini M, Marinacci B, Pellegrini B, Cataldi A, Dindo ML, Carradori S, et al. Immunophenotyping of hemocytes from infected *Galleria mellonella* larvae as an innovative tool for immune profiling, infection studies and drug screening. *Sci Rep.* 2024; 14 (1): 759.
 104. Genç TT, Kaya S, Günay M, Çakaloğlu Ç. Humoral immune response of *Galleria mellonella* after mono - and co - injection with *Hypericum perforatum* extract and *Candida albicans*. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand.* 2024; 132 (5): 358 – 70.
 105. Reis NF, de Jesus MCS, de Souza LCD, Alcântara LM, Rodrigues JA de C, Brito SCP, et al. *Sporothrix brasiliensis* Infection Modulates Antimicrobial Peptides and Stress Management Gene Expression in the Invertebrate Biomodel *Galleria mellonella*. *J Fungi Basel Switz.* 2023; 9 (11): 1053.
 106. Morton DB, Dunphy GB, Chadwick JS. Reactions of hemocytes of immune and non - immune *Galleria mellonella* larvae to *Proteus mirabilis*. *Dev Comp Immunol.* 1987; 11 (1): 47 – 55.

107. Pereira TC, de Barros PP, Fugisaki LR de O, Rossoni RD, Ribeiro F de C, de Menezes RT, et al. Recent Advances in the Use of *Galleria mellonella* Model to Study Immune Responses against Human Pathogens. J Fungi. 2018; 4 (4): 128.
108. Senior NJ, Titball RW. Isolation and primary culture of *Galleria mellonella* hemocytes for infection studies. F1000Research. 2021; 9: 1392.
109. Marcos - Zambrano LJ, Bordallo - Cardona MÁ, Borghi E, Falleni M, Tosi D, Muñoz P, et al. *Candida* isolates causing candidemia show different degrees of virulence in *Galleria mellonella*. Med Mycol. 2020; 58 (1): 83 – 92.
110. Marena GD, Thomaz L, Nosanchuk JD, Taborda CP. *Galleria mellonella* as an Invertebrate Model for Studying Fungal Infections. J Fungi Basel Switz. 2025; 11 (2): 157.
111. OXFORD UP. ScholarOne Manuscripts [Internet]. Letters in Applied Microbiology. 2022 [citado 20 de outubro de 2025]. Disponível em: <https://mc.manuscriptcentral.com/lamicro>

APÊNDICES

APÊNDICE A – ARTIGO SUBMETIDO: *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of silver tungstate (Ag₂WO₄) crystals against *Candida albicans*

Roberto Sallum^{1†}, Júlia Leão Frolidi^{1†}, Diego Batista Carneiro de Oliveira^{1†}, Gabriel Antônio Nogueira Nascentes², Robson Tadeu Soares de Oliveira Junior³, Anderson Assunção Andrade^{1*}

¹Microbiology Research Laboratory, Institute of Biological and Natural Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro - UFTM, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

³Federal Institute of Education, Science and Technology of Triângulo Mineiro – IFTM, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

³Biochemistry Laboratory, Institute of Biological and Natural Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro - UFTM, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.

[†]These authors contributed equally to this work

Running head: α -Ag₂WO₄ microcrystals Against *Candida albicans*

***Corresponding author:**

Anderson Assunção Andrade, Ph.D.

Laboratório de Pesquisa em Microbiologia

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia

Instituto de Ciências Biológicas e Naturais

Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

Praça Manoel Terra 330 – Abadia, Uberaba, MG, 38025-015, Brazil.

E-mail: anderson.andrade@uftm.edu.br ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9569-6503>

ABSTRACT

Candida albicans remains the most prevalent cause of invasive candidiasis and is recognized as a critical priority fungal pathogen given its global clinical burden, high mortality rates, and rising antifungal resistance. Here, we investigated the antifungal activity of α -Ag₂WO₄ microcrystals against *C. albicans* *in vitro* and *in vivo*. The crystals exhibited strong activity, with low MIC (3.125 μ g mL⁻¹) and fungicidal effect (6.25 μ g mL⁻¹). They markedly suppressed the yeast–hypha transition, even at sub-inhibitory concentrations, and inhibited biofilm formation in a concentration-dependent manner. Pre-treatment of abiotic surfaces with α -Ag₂WO₄ effectively prevented fungal adhesion and biofilm maturation, with complete inhibition achieved at 10 mg mL⁻¹. However, no synergistic effect with fluconazole was detected, and *in vivo* analysis using *Galleria mellonella* showed limited efficacy, as treatment failed to protect larvae from *C. albicans* infection despite low toxicity. These findings highlight that while α -Ag₂WO₄ crystals may have restricted potential as systemic antifungal agents, they represent a promising strategy to prevent device-associated infections by targeting adhesion and biofilm development on abiotic surfaces.

Keywords: *Candida albicans*; silver tungstate; antifungal activity; biofilm; yeast–hypha transition; antiadhesion agents.

Impact Statement: This study demonstrates that α -Ag₂WO₄ microcrystals effectively inhibit *Candida albicans* virulence traits, including biofilm formation, hyphal development, and adhesion to abiotic surfaces. Despite their limited *in vivo* efficacy, these findings support their potential application as antifungal coatings for medical devices, addressing a major challenge in preventing device-associated infections.

INTRODUCTION

Fungal infections represent a major global health concern, causing an estimated 1.7 million deaths annually (Bongomin et al., 2017). Systemic mycoses are particularly severe, with high mortality rates among vulnerable populations, including transplant recipients, patients undergoing chemotherapy, individuals with diabetes mellitus or renal failure, those with HIV/AIDS, the elderly, hospitalized patients, and individuals affected by viral pandemics such as SARS-CoV-2. In these groups, the incidence of fungal infections has risen considerably, often involving resistant species, thereby underscoring the urgent need for novel antifungal strategies (Arastehfar et al., 2020; Pfaller et al., 2022).

Among fungal pathogens, *Candida albicans* remains one of the leading etiological agents of human mycoses worldwide (Bongomin et al., 2017). Its pathogenic success is strongly linked to the ability to form biofilms, which enhance protection against host defenses and antifungal agents, while also facilitating colonization and dissemination (Kaur and Nobile, 2023). Morphological plasticity, particularly the yeast-to-hyphae transition, further contributes to virulence and antifungal resistance (Costa-de-Oliveira and Rodrigues, 2020). Biofilm formation on abiotic surfaces, including medical devices such as catheters, prosthetic valves, and ventilatory equipment, is of particular concern as it frequently leads to persistent bloodstream infections (Tornero-Gutiérrez et al., 2023).

Despite the clinical importance of candidiasis, therapeutic options remain limited. The available antifungal classes are few, often associated with high costs, toxicity, or prolonged administration, and are increasingly undermined by the emergence of resistant isolates (Zhu et al., 2024). Amphotericin B, although effective, is restricted to intravenous use and causes considerable nephrotoxicity, while fluconazole, despite being widely prescribed, suffers from resistance and tolerability issues (Ahmadi et al., 2022; Ivanov et al., 2022). These limitations highlight the urgent need for new antifungal compounds with alternative mechanisms of action.

Metal-containing materials have gained attention as promising antimicrobial candidates, with silver-based compounds being extensively investigated due to their broad-spectrum activity and successful medical applications (Nowack et al., 2011; Chatterjee et al., 2023). In this context, silver tungstate (Ag_2WO_4) has recently emerged as a potential antifungal agent. Foggi et al. (2017) first demonstrated the antifungal activity of Ag_2WO_4

microcrystals against *C. albicans*, while Pimentel et al. (2022) further confirmed their inhibitory effects on biofilm formation and morphological transition. However, these studies were limited to *in vitro* conditions. Moreover, little is known about whether Ag_2WO_4 can prevent fungal adhesion to abiotic surfaces or exert protective effects *in vivo*.

Here, we report the antifungal activity of $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ crystals against *C. albicans*, with emphasis on their ability to inhibit adhesion and biofilm formation on abiotic surfaces, impair the yeast-to-hyphae transition, and their performance in the *Galleria mellonella* infection model. This study provides new insights into the antifungal potential of $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ and contributes to the development of innovative strategies to combat *Candida* infections.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

Reference strains of *Candida albicans* (ATCC 14053), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), and *Escherichia coli* (ATCC 35218) were used to assess the antimicrobial activity of $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ crystals. Strains were stored in Brain Heart Infusion (BHI) broth supplemented with glycerol at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ and subcultured at least twice at $37\text{ }^\circ\text{C}$ prior to use in the assays. Bacterial strains were included in the study to evaluate the antifungal selectivity of $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ crystals.

Synthesis of $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ Crystals

Silver nitrate (AgNO_3 , 99.995%, Sigma-Aldrich), sodium tungstate ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99.995%, Sigma-Aldrich), and distilled water were used in the synthesis. All reagents were of analytical grade and employed without further purification. $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ crystals were prepared by the coprecipitation method described by Alvarez-Roca et al. (2021). Briefly, 50 mL of a Na_2WO_4 solution (1.0 mmol L^{-1}) were slowly added to 50 mL of an AgNO_3 solution (2.0 mmol L^{-1}) under vigorous stirring (approximately 30 rpm) at $25\text{ }^\circ\text{C}$ for 4 h. A yellow

suspension initially formed, which transformed into a white precipitate within a few minutes. The crystals were separated by decantation, washed sequentially with deionized water and acetone, and dried at 70 °C for 24 h.

Characterization of α -Ag₂WO₄ Microcrystals

The crystalline structure of α -Ag₂WO₄ was confirmed by X-ray diffraction (XRD) using a Shimadzu XRD-6000 diffractometer (Japan). Diffractograms were recorded over a 2θ range of 10–80°, with a scan rate of 1° min⁻¹, a step size of 0.02°, and Cu K α radiation (λ = 1.5418 Å).

Antifungal susceptibility assay

The susceptibility profile of *C. albicans* to α -Ag₂WO₄ crystals was determined by the broth microdilution method in 96-well microtiter plates according to the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) guidelines for yeasts (M27-A3), using RPMI 1640 medium (Himedia Laboratories®) buffered with 0.165 mol L⁻¹ morpholinopropanesulfonic acid (MOPS; Sigma-Aldrich®) at pH 7.0. A stock solution of α -Ag₂WO₄ crystals was prepared at 1 mg mL⁻¹ in double-distilled water, and final concentrations in the microtiter plates ranged from 0.39 to 200.00 µg mL⁻¹. Fluconazole (FLC; Pfizer®) was used as the reference antifungal control.

C. albicans (ATCC 14053) was cultured on Sabouraud agar at 37 °C for 24 h prior to inoculum preparation. Colonies were suspended in sterile saline (0.9%), and the cell density was adjusted to 1 × 10⁶ CFU mL⁻¹ by counting in a Neubauer chamber. This suspension was diluted 1:50 in saline and subsequently 1:20 in RPMI, resulting in a final concentration of 1 × 10³ CFU mL⁻¹. Aliquots of 100 µl of this inoculum were added to wells containing 100 µl of α -Ag₂WO₄ crystal dilutions, yielding a final inoculum density of 0.5 × 10³ CFU mL⁻¹. FLC was tested at concentrations ranging from 0.125 to 64 µg mL⁻¹. Each plate included positive controls (fungal inoculum without treatment) and negative controls (medium only). Plates were incubated at 37 °C for 24 h. The minimum inhibitory concentration (MIC) was

determined visually as the lowest concentration of α -Ag₂WO₄ crystals that completely inhibited visible growth relative to controls. For FLC, the MIC endpoint was defined as the lowest concentration producing a $\geq 50\%$ reduction in growth compared with the positive control. All assays were performed in duplicate and repeated in at least two independent experiments.

Minimum fungicidal concentration (MFC)

MFC values were determined by plating 100 μ L aliquots from wells that showed no visible growth in the MIC assay onto Sabouraud agar plates, followed by incubation at 37 °C for 24 h. The lowest concentration of α -Ag₂WO₄ crystals that resulted in $\geq 99.9\%$ reduction in CFU compared with the initial inoculum was recorded as the MFC (Canton et al., 2003).

Antibacterial susceptibility assay

The susceptibility profiles of *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) and *Escherichia coli* (ATCC 35218) to α -Ag₂WO₄ crystals were determined by the broth microdilution method following CLSI guidelines (M100-2021), using Mueller-Hinton (MH) broth (Himedia Laboratories®). Gentamicin (Schering-Plough®) and oxacillin (Schering-Plough®) were included as antibacterial controls.

Bacteria were subcultured on BHI agar (Himedia Laboratories®) and incubated at 37 °C for 24 h. Colonies were suspended in sterile saline (0.9%), and the turbidity was adjusted to 0.5 McFarland ($\sim 1.5 \times 10^8$ CFU mL⁻¹), verified spectrophotometrically at 625 nm (absorbance 0.08–0.10). The suspension was diluted 1:20 in MH broth, and 20 μ L of this dilution were added to wells of 96-well plates containing 180 μ L of α -Ag₂WO₄ crystals at different concentrations prepared in MH broth. Final concentrations of α -Ag₂WO₄ crystals ranged from 0.48 to 250.00 μ g mL⁻¹. Plates were incubated at 37 °C for 24 h, and the MIC was determined visually as the lowest concentration of α -Ag₂WO₄ crystals or antibacterial control that completely inhibited visible bacterial growth compared with positive controls.

Checkerboard assay

The interaction between α -Ag₂WO₄ crystals and FLC was assessed using the checkerboard microdilution method to determine the fractional inhibitory concentration (FIC) index. The FIC for each compound was calculated as the MIC of the compound in combination divided by the MIC of the compound alone. The sum of the FIC values (Σ FIC) was then used to classify the interaction as synergistic (≤ 0.5), partially synergistic (>0.5 to <1.0), additive ($=1$), indifferent (>1.0 to <4.0), or antagonistic (≥ 4.0) (Alanís-Ríos et al., 2022).

Inhibition of the Yeast-to-Hyphae Transition

The effect of α -Ag₂WO₄ crystals on the yeast–hypha transition of *C. albicans* was evaluated according to the method described by Toenjes et al. (2005), with modifications. The reference strain *C. albicans* ATCC 14053 was used. The assay was performed in sterile microtubes (final volume of 400 μ L) under the same conditions used for minimum inhibitory concentration (MIC) determination, except for the reaction vessel. Four experimental groups were established: Control: fungal inoculum only; α -Ag₂WO₄ at MIC with fungal inoculum; α -Ag₂WO₄ at $\frac{1}{2}$ MIC (1.56 μ g mL⁻¹) with fungal inoculum; Fluconazole at MIC (0.25 μ g mL⁻¹) with fungal inoculum.

All microtubes were incubated at 37 °C for 24 h, centrifuged at 3000 $\times$ g for 3 min, and 10 μ L of the pellet was mounted on a glass slide with a coverslip for microscopic examination.

The assay was performed in duplicate and repeated in independent experiments. The presence and extent of hyphal formation were assessed by visual comparison with the untreated control.

Biofilm Inhibition and Eradication Assay

The effect of α -Ag₂WO₄ crystals on *C. albicans* biofilms was assessed by the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] reduction assay, following the protocol described by de Oliveira et al. (2019). Two experimental conditions were evaluated: inhibition of biofilm formation and activity against preformed biofilms.

For the biofilm formation assay, 100 μ L of standardized fungal suspension (1.0×10^6 CFU mL⁻¹ in RPMI 1640) were dispensed into wells of a sterile 96-well microtiter plate in the presence of α -Ag₂WO₄ crystals. Plates were incubated at 37 °C for 24 h.

For the preformed biofilm assay, 100 μ L of the fungal suspension were added to the wells and incubated for 24 h at 37 °C to allow biofilm establishment. After washing with PBS to remove planktonic cells, the wells were treated with α -Ag₂WO₄ crystals and further incubated for 24 h under the same conditions.

In both assays, biofilm metabolic activity was quantified by adding MTT solution to a final concentration of 0.5 mg mL⁻¹, followed by incubation in the dark for 3 h at 37 °C. The supernatant was then discarded, and 100 μ L of dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich®) were added to each well to solubilize the formazan crystals. After homogenization and 15 min incubation at room temperature, absorbance was measured at 490 nm using a microplate reader (Thermoplate Reader®).

Crystal concentrations ranged from ½MIC to 10MIC, depending on the analysis. All experiments were performed in triplicate, and data were expressed as mean absorbance values. Statistical significance was determined using two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test, with $p < 0.05$ considered significant. Analyses were performed with GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software®).

Biofilm Formation on α -Ag₂WO₄-Coated Surfaces

The effect of α -Ag₂WO₄ crystals on the adhesion and biofilm development of *C. albicans* was evaluated using pre-coated Petri dish surfaces. Suspensions of α -Ag₂WO₄ crystals were prepared in distilled water at concentrations of 10, 1, 0.1, 0.01, and 0.001 mg mL⁻¹. Aliquots of 50 μ L of each suspension were applied onto circular areas (~1 cm diameter) previously marked on the bottom of a sterile Petri dish. Six experimental areas were prepared: (i) distilled water (control); (ii) α -Ag₂WO₄, 10 mg mL⁻¹; (iii) α -Ag₂WO₄, 1 mg mL⁻¹; (iv) α -

Ag_2WO_4 , 0.1 mg mL⁻¹; (v) $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, 0.01 mg mL⁻¹; (vi) $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$, and 0.001 mg mL⁻¹. The plates were incubated at 37 °C until complete drying of the suspensions. After drying, the surfaces were gently washed with distilled water to remove excess crystals.

For biofilm formation, 100 μL of a standardized *C. albicans* inoculum (5×10^6 cells mL⁻¹ in RPMI 1640 medium) were added to each treated area, and the plates were incubated at 37 °C. To prevent desiccation, the inoculated Petri dishes were placed inside a sealed glass chamber containing water-soaked cotton. After ~5 h of incubation, an additional 50 μL of RPMI medium were added to each area, and incubation was continued under the same conditions until 24 h.

Following incubation, the surfaces were gently washed three times with distilled water to remove non-adherent cells. The areas were then fixed with methanol (enough to cover the treated regions) for 20 min at room temperature, followed by air-drying. Biofilms were stained with cotton blue for 10 min, and excess dye was carefully removed. Microscopic examination and imaging of the adherent biofilms and hyphal formation were performed using a light microscope at 40 $\times$ magnification.

***Galleria mellonella* Breeding, Manipulation, and Infection Assay**

For the evaluation of acute toxicity and protective effects of $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ crystals against *C. albicans* infection, larvae without pigmentation changes and weighing 0.250 ± 0.010 g were randomly selected and allocated into groups of 10 individuals.

For the acute toxicity assay, larvae were injected with 10 μL of $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ crystal suspensions (0.1, 0.01, and 0.001 mg mL⁻¹) directly into the hemocoel through the last left proleg, using a Hamilton® syringe. Considering the standardized larval weight, the administered doses corresponded to 4.0, 0.4, and 0.04 mg kg⁻¹, respectively. Control larvae received only sterile water.

For the protective assay, larvae were distributed into four groups: G1: injected with sterile saline solution (control), G2: injected with $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ crystals (4.0 mg kg⁻¹) only; G3: infected with *C. albicans* (1.0×10^6 CFU per larva); and G4: infected with *C. albicans* (1.0×10^6 CFU per larva) and treated with $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ crystals (4.0 mg kg⁻¹).

After inoculation, larvae were incubated at 37 °C in the dark and monitored daily for 7 consecutive days. Larvae were considered dead when they failed to respond to gentle probing with sterile tweezers. All experiments were performed in independent replicates to ensure reproducibility.

Survival data were plotted as Kaplan–Meier curves and statistically analyzed using the Log-rank (Mantel–Cox) test, with a significance threshold of $p \leq 0.05$.

RESULTS

Characterization of α -Ag₂WO₄ Crystals

As shown in Figure 1, the X-ray diffraction (XRD) pattern of the synthesized material exhibited characteristic peaks at $2\theta = 10.96^\circ$, 16.66° , 30.34° , 31.58° , 32.86° , 45.32° , 54.68° , 57.86° , 65.96° , and 75.02° , corresponding to the (110), (101), (002), (231), (400), (402), (233), (352), (214), and (633) planes of the cubic phase of Ag₂WO₄ (JCPDS No. 34-0061). These results are in agreement with previous reports (Wu et al., 2020). The sharp and well-defined peaks indicate high crystallinity. The diffraction pattern confirms that the crystals possess an orthorhombic unit cell with Pn2n space group and C_{2v} point group symmetry, consistent with the ICSD No. 4165 crystallographic standard for the α -Ag₂WO₄ phase.

Antimicrobial activity of α -Ag₂WO₄ crystals

The antifungal susceptibility assay revealed that α -Ag₂WO₄ crystals were more active against *C. albicans* than against bacteria. The MIC for *C. albicans* was 3.125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and fungicidal activity was observed at 6.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, close to the MIC value. In contrast, antibacterial activity was detected only at higher concentrations, with MICs of 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for *E. coli* and 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for *S. aureus*.

Inhibition of yeast–hyphae transition

α -Ag₂WO₄ crystals strongly inhibited the yeast–hypha transition of *C. albicans* (Figure 2). At the MIC (3.125 $\mu\text{g mL}^{-1}$), viable cells were scarcely observed, and those remaining showed marked inhibition of hyphal formation (Figure 2E–F). Even at sub-inhibitory concentration ($\frac{1}{2}$ MIC; 1.56 $\mu\text{g mL}^{-1}$), hyphae were absent, and only blastoconidia and pseudohyphae were detected (Figure 2C–D). By contrast, fluconazole at its MIC (0.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) reduced fungal growth but did not prevent hyphal formation (Figure 2G–H), compared with the untreated control (Figure 2A–B).

Biofilm inhibition assay

Treatment with α -Ag₂WO₄ crystals reduced *C. albicans* biofilm formation in a concentration-dependent manner. In the biofilm formation assay, exposure to $\frac{1}{2}$ MIC, MIC, 2MIC, and 4MIC resulted in reductions of approximately 01%, 36%, 68%, and 73%, respectively, with statistically significant inhibition at 2MIC and 4MIC ($p < 0.05$; Figure 3A). In preformed biofilms, α -Ag₂WO₄ crystals reduced biofilm metabolic activity by 15% at MIC, 54% at 4MIC, and 61% at 10MIC, with significant inhibition observed at 4MIC and 10MIC ($p < 0.05$; Figure 3B).

Effect of α -Ag₂WO₄-coated surfaces on *Candida albicans* biofilm formation

The pre-treatment of abiotic surfaces with α -Ag₂WO₄ crystals significantly reduced *C. albicans* biofilm development in a concentration-dependent manner. Quantification by the MTT assay (Figure 4A) showed that treatment with α -Ag₂WO₄ crystals markedly reduced biofilm metabolic activity. Inhibition was ~55% at 0.01 mg mL⁻¹, increased to ~91% at both 0.1 and 1.0 mg mL⁻¹, and reached complete inhibition at 10 mg mL⁻¹.

Microscopic analysis of stained biofilms on Petri dish surfaces (Figure 4B) confirmed these results. The untreated control exhibited dense biofilm with extensive hyphal networks

(Figure 4B-a). Surfaces pre-coated with 0.01 mg mL^{-1} displayed visibly reduced biofilm density (Figure 4B-b), whereas at 0.1 and 1.0 mg mL^{-1} , only sparse cells were observed with a marked absence of hyphal structures (Figure 4B-c, d).

Interaction of $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ crystals with fluconazole

The interaction between $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ crystals and FLC was assessed using the checkerboard method. No synergistic activity was observed at any of the concentrations tested, with the combination classified as indifferent or antagonistic (data not shown). Consistently, *in vivo* analysis in *G. mellonella* showed that treatment with the combination of $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ crystals and FLC did not improve larval survival compared with FLC alone (data not shown), confirming the absence of synergistic effects.

Acute toxicity and in vivo action of $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ crystals

The acute toxicity of $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ crystals was evaluated in *G. mellonella* larvae. Doses of 0.04 , 0.4 , and 4 mg kg^{-1} were tested, corresponding to injections of $10 \text{ }\mu\text{l}$ of suspensions at 0.001 , 0.01 , and 0.1 mg mL^{-1} , respectively. The crystals exhibited low toxicity, with survival rates of 100% at 0.04 mg kg^{-1} ($10/10$), 85% at 0.4 mg kg^{-1} ($17/20$) (data not shown), and 95% at 4 mg kg^{-1} ($19/20$) (Figure 5). No signs of melanization or altered behavior (e.g., impaired motility) were observed in surviving larvae during the seven-day post-treatment period.

Based on these results, the dose of 4 mg kg^{-1} (0.1 mg mL^{-1} suspension) was selected to assess protective activity during *C. albicans* infection. Infected larvae (G3) showed 15% survival ($3/20$), with a mean survival time of $84.0 \pm 11.7 \text{ h}$. However, infected larvae treated with $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ crystals (G4) exhibited only 5% survival ($1/20$), with a mean survival time of $52.8 \pm 7.7 \text{ h}$ (Table 1). Notably, the treatment not only failed to protect but also worsened outcomes: survival was lower than in the infection-only group, and mortality was accelerated, with 80% of larvae dead within 48 h in the treated group, compared with 40% in the infection-only group (Figure 5).

DISCUSSION

Invasive fungal infections represent a growing clinical challenge, and among them, diseases caused by *Candida* species stand out as a major cause of morbidity and mortality in healthcare settings. Candidemia, in particular, ranks as the fourth most common cause of bloodstream infections in the United States, with mortality rates ranging from 10% to 20% (Bongomin et al., 2017; Pappas et al., 2016). Despite the increasing recognition of non-*albicans* *Candida* species, *C. albicans* remains the most prevalent pathogen. The World Health Organization (WHO) has classified *C. albicans* as a “critical priority” fungal pathogen, reflecting its persistently high clinical impact, including incidence, mortality, and increasing antifungal resistance (WHO, 2022). A key factor underlying its clinical impact is the ability to adhere to abiotic surfaces and form biofilms, which confer protection against host defenses and antifungal drugs, promote persistent colonization, and facilitate dissemination through the bloodstream (Nobile and Johnson, 2015; Kaur and Nobile, 2023).

In this context, there has been growing interest in developing novel antifungal agents that not only inhibit fungal growth but also target biofilm formation and adhesion. Silver tungstate (Ag_2WO_4) has emerged as a promising material due to its multifunctional properties and antimicrobial potential. Foggi et al. (2017) and Pimentel et al. (2022) reported that Ag_2WO_4 microcrystals exert significant antifungal activity against *C. albicans*, including reductions in viability and biofilm biomass. Álvarez-Roca et al. (2021) further advanced the field by characterizing the structural polymorphism of Ag_2WO_4 , which can crystallize in three different phases: orthorhombic (α), hexagonal (β), and cubic (γ). While the α phase is the most thermodynamically stable, their study demonstrated for the first time the antimicrobial capacity of the metastable phases, revealing that β - Ag_2WO_4 exhibited superior antibacterial activity, requiring half the concentration to eliminate methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* compared with α - Ag_2WO_4 . These findings underscore the importance of crystalline phase in determining antimicrobial performance. Our study focused exclusively on the α phase and demonstrated that it retains strong antifungal activity against *C. albicans*, including inhibition of biofilm development and suppression of hyphal transition.

Our results extend these observations by showing that α - Ag_2WO_4 not only exerts fungicidal activity at low MIC values but also markedly interferes with *C. albicans* virulence traits. The crystals effectively inhibited the yeast–hypha transition, a key morphological

switch for tissue invasion and biofilm maturation. Hyphal growth was absent even at sub-inhibitory concentrations, an effect not observed with fluconazole, which reduced fungal proliferation but failed to prevent hyphal formation. This suggests that α -Ag₂WO₄ acts through mechanisms distinct from azoles, possibly linked to oxidative stress induction and disruption of cell wall integrity, as previously hypothesized (Pimentel et al., 2022).

Beyond morphogenesis, α -Ag₂WO₄ strongly impaired biofilm formation and adhesion to abiotic surfaces. Inhibition was concentration dependent, with near-complete suppression of biofilm metabolic activity and architecture at higher doses. Microscopy confirmed dramatic structural changes, with sparse blastoconidia and complete absence of hyphal networks on treated surfaces. To our knowledge, this is the first demonstration that α -Ag₂WO₄ crystals can prevent *C. albicans* adhesion and colonization on abiotic substrates, a critical step in the pathogenesis of device-associated infections. These findings expand upon earlier studies (Foggi et al., 2017; Pimentel et al., 2022), highlighting the potential of silver tungstate not only as a fungicidal compound but also as a potent inhibitor of biofilm-associated virulence.

When tested in combination with fluconazole, however, α -Ag₂WO₄ did not exhibit synergistic effects. Checkerboard assays indicated only indifferent or antagonistic interactions, and *G. mellonella* survival experiments confirmed that co-administration with fluconazole did not improve outcomes compared with fluconazole alone. These results suggest limited potential for co-therapy with azoles, likely due to non-overlapping targets and possible antagonistic stress responses.

In vivo, α -Ag₂WO₄ crystals displayed low acute toxicity in *G. mellonella*, with high larval survival across tested doses and no observable signs of melanization or behavioral impairment. Despite this favorable safety profile, the crystals did not protect larvae from *C. albicans* infection. On the contrary, administration during infection was associated with accelerated mortality, indicating a lack of therapeutic benefit in this model. This discrepancy between potent *in vitro* activity and limited *in vivo* efficacy may reflect challenges related to solubility, bioavailability, or host-pathogen interactions (Stielow et al., 2023). It also underscores the need for further studies to elucidate pharmacokinetics and optimize delivery strategies, possibly through novel formulations or combination therapies with agents other than azoles.

Although α -Ag₂WO₄ crystals may have limited potential as systemic antifungal agents, their strong inhibition of *C. albicans* adhesion and biofilm formation on abiotic surfaces

suggests an alternative application as antifungal coatings for medical devices. Colonization of biomaterials such as catheters, prosthetic valves, and endotracheal tubes is a critical step in device-associated candidiasis. Strategies to counteract this process increasingly focus on surface modification using antimicrobial agents, particularly metallic compounds, which impair fungal adhesion and biofilm maturation through ion release and ROS generation (Tornero-Gutiérrez et al., 2023). In this context, α -Ag₂WO₄ combines the well-established antimicrobial activity of silver with the photocatalytic properties of tungstate (Álvarez-Roca et al., 2021), supporting its potential as a functional material for antifungal surface coatings.

In conclusion, α -Ag₂WO₄ crystals demonstrated strong antifungal activity against *C. albicans* in vitro, effectively inhibiting growth, suppressing the yeast–hypha transition, and preventing adhesion and biofilm formation on abiotic surfaces. While their limited efficacy *in vivo* and lack of synergy with fluconazole suggest restricted potential as systemic agents, their pronounced ability to interfere with adhesion and biofilm development highlights their promise as surface-active materials for antifungal coatings, particularly in the prevention of device-associated infections. Future studies should aim to elucidate the underlying mechanisms of action, optimize material formulations, and evaluate performance in relevant biomedical applications to fully explore the translational potential of α -Ag₂WO₄.

REFERENCES

Ahmadi A, Mohammadnejadi E, Karami P, Razzaghi-Asl N. Current Status and Structure Activity Relationship of Privileged Azoles as Antifungal Agents (2016-2020). *Int J Antimicrob Agents*. 2022;59(3):106518.

Alanís-Ríos SA, González GM, Andrade A, Becerril-García MA, Bonifaz A, Robledo-Leal ER, et al. Evaluation of the synergistic antifungal activity of micafungin and voriconazole plus sertraline against *Candida auris*. *Braz J Microbiol*. 2022;53(4):2003–8.

Álvarez-Roca R, Gouveia AF, de Foggi CC, Lemos PS, Gracia L, da Silva LF, Vergani CE, San-Miguel M, Longo E, Andrés J. Selective Synthesis of α -, β -, and γ -Ag₂WO₄

Polymorphs: Promising Platforms for Photocatalytic and Antibacterial Materials. *Inorg Chem.* 2021;60(2):1062-1079. doi: 10.1021/acs.inorgchem.0c03186.

Arastehfar A, Carvalho A, Nguyen MH, Hedayati MT, Netea MG, Perlin DS, et al. COVID-19-Associated Candidiasis (CAC): An Underestimated Complication in the Absence of Immunological Predispositions? *J Fungi (Basel)*. 2020;6(4):211.

Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *J Fungi (Basel)*. 2017;3(4):57.

Chatterjee K, Taneja J, Khullar S, Pandey AK. Antifungal activity of silver nanoparticles on fungal isolates from patients of suspected mucormycosis. *Int Microbiol.* 2023;26(1):143–7.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard-Third Edition, Document M27- A3 (2008a).

Costa-de-Oliveira S, Rodrigues AG. *Candida albicans* Antifungal Resistance and Tolerance in Bloodstream Infections: The Triad Yeast-Host-Antifungal. *Microorganisms.* 2020;8(2):154.

de Oliveira DBC, Silva LB, da Silva BV, Borges TC, Marques BC, Dos Santos MB, de Oliveira LF, Bolzani VS, Rodrigues ARA, Regasini LO, Andrade AA. A new acridone with antifungal properties against *Candida* spp. and dermatophytes, and antibiofilm activity against *C. albicans*. *J Appl Microbiol.* 2019;127(5):1362-1372. doi: 10.1111/jam.14381.

Foggi CC, Fabbro MT, Santos LPS, De Santana YVB, Vergani CE, Machado AL, et al. Synthesis and evaluation of α -Ag₂WO₄ as novel antifungal agent. *Chemical Physics Letters.* 2017;674:125–9.

Ivanov M, Ćirić A, Stojković D. Emerging Antifungal Targets and Strategies. *Int J Mol Sci.* 2022;23(5):2756.

Kaur J, Nobile CJ. Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol.* 2023;71:102237.

Nowack B, Krug HF, Height M. 120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers. *Environ Sci Technol.* 2011;45(4):1177–83.

Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 15 de fevereiro de 2016;62(4):e1–50.

Pfaller MA, Carvalhaes CG, DeVries S, Rhomberg PR, Castanheira M. Impact of COVID-19 on the antifungal susceptibility profiles of isolates collected in a global surveillance program that monitors invasive fungal infections. *Med Mycol.* 2022;60(5):myac028.

Pimentel BNA da S, Marin-Dett FH, Assis M, Barbugli PA, Longo E, Vergani CE. Antifungal Activity and Biocompatibility of α -AgVO₃, α -Ag₂WO₄, and β -Ag₂MoO₄ Using a Three-Dimensional Coculture Model of the Oral Mucosa. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10:826123.

Stielow M, Witczyńska A, Kubryń N, Fijałkowski Ł, Nowaczyk J, Nowaczyk A. The Bioavailability of Drugs-The Current State of Knowledge. *Molecules.* 2023;28(24):8038. doi: 10.3390/molecules28248038.

Toenjes KA, Munsee SM, Ibrahim AS, Jeffrey R, Edwards JE, Johnson DI. Small-Molecule Inhibitors of the Budded-to-Hyphal-Form Transition in the Pathogenic Yeast *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(3):963–72.

Tornero-Gutiérrez F, Ortiz-Ramírez JA, López-Romero E, Cuéllar-Cruz M. Materials used to prevent adhesion, growth, and biofilm formation of *Candida* species. *Med Mycol*. 2023;61(7):myad065. doi:10.1093/mmy/myad065.

WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action [Internet]. World Health Organization. 2022 [citado 4 de julho de 2024]. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>

Wu, G., Xing, W., Han, J., Li, P. Fabrication of silver-based visible-light-driven photocatalyst and degradation of organic pollutants in wastewater. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2020;29(01), 445-453.

Zhu X, Chen Y, Yu D, Fang W, Liao W, Pan W. Progress in the application of nanoparticles for the treatment of fungal infections: A review. *Mycology*. 2024;15(1):1–16.

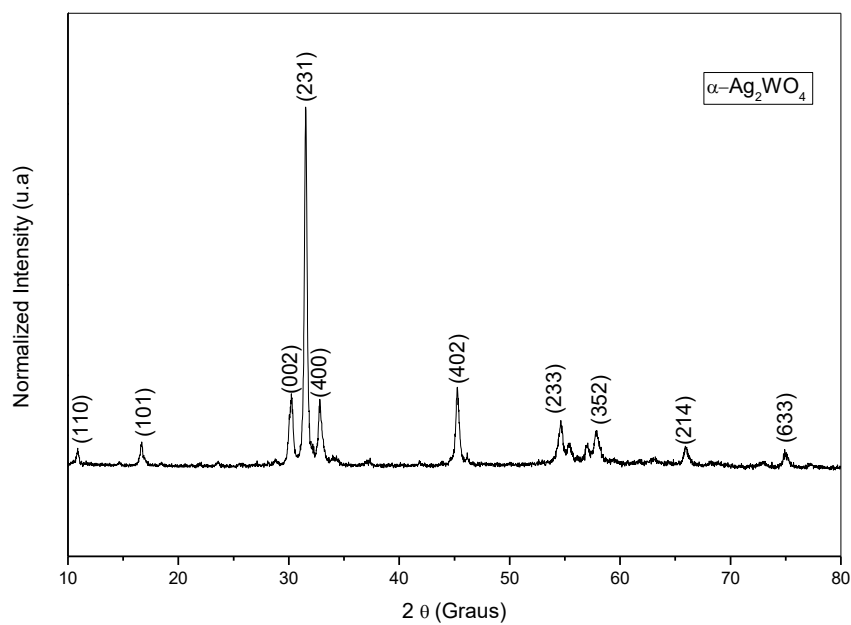
FIGURES

Figure 1. X-ray diffraction (XRD) pattern of $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ crystals. The most intense diffraction peaks are labeled with their corresponding Miller indices.

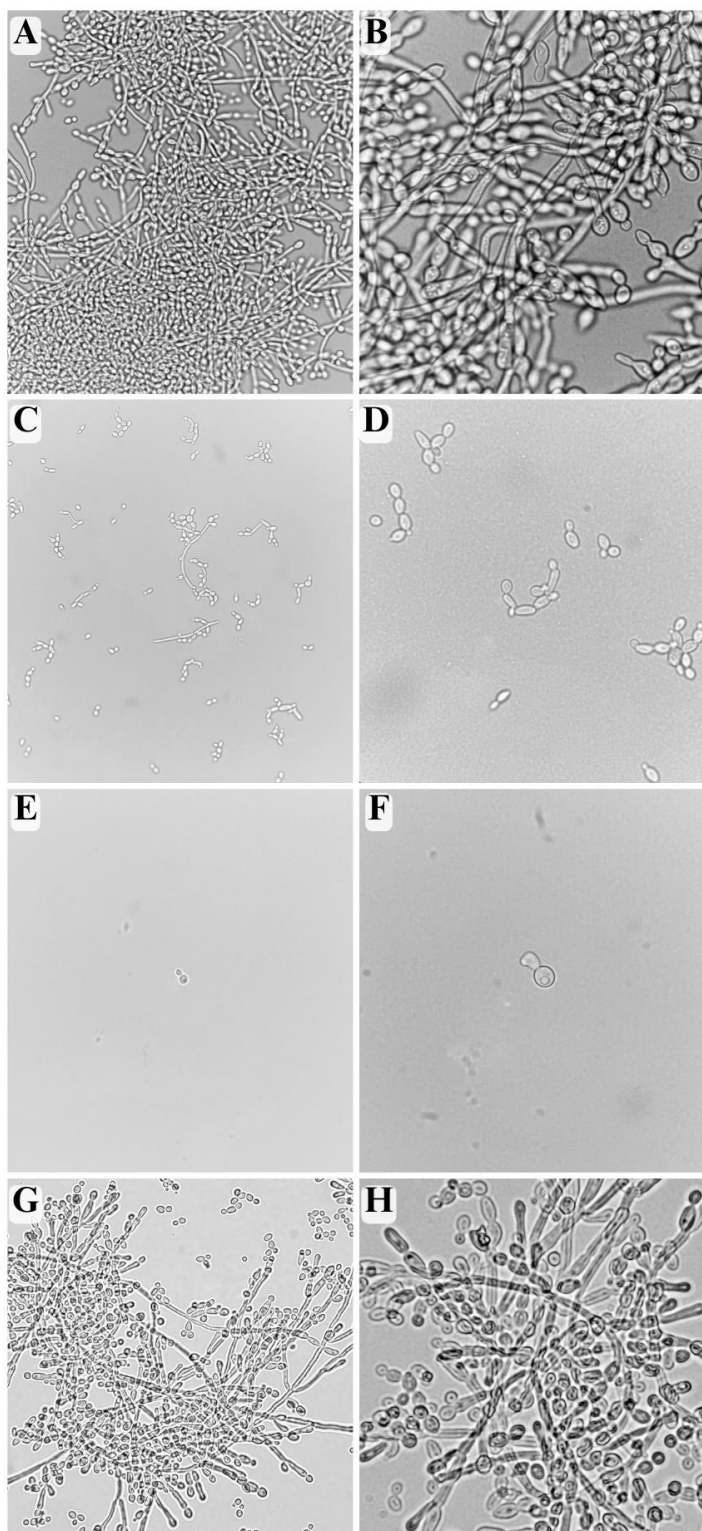


Figure 2. Inhibition of the yeast–hypha transition of *Candida albicans* by α - Ag_2WO_4 crystals. (A–B) Control (untreated cells); (C–D) cells exposed to $\frac{1}{2}\text{MIC}$ ($1.56 \mu\text{g mL}^{-1}$); (E–F) cells exposed to MIC ($3.125 \mu\text{g mL}^{-1}$); (G–H) cells treated with fluconazole (MIC = $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$). Images acquired with 40 $\times$ (left panels) and 100 $\times$ (right panels) objectives.

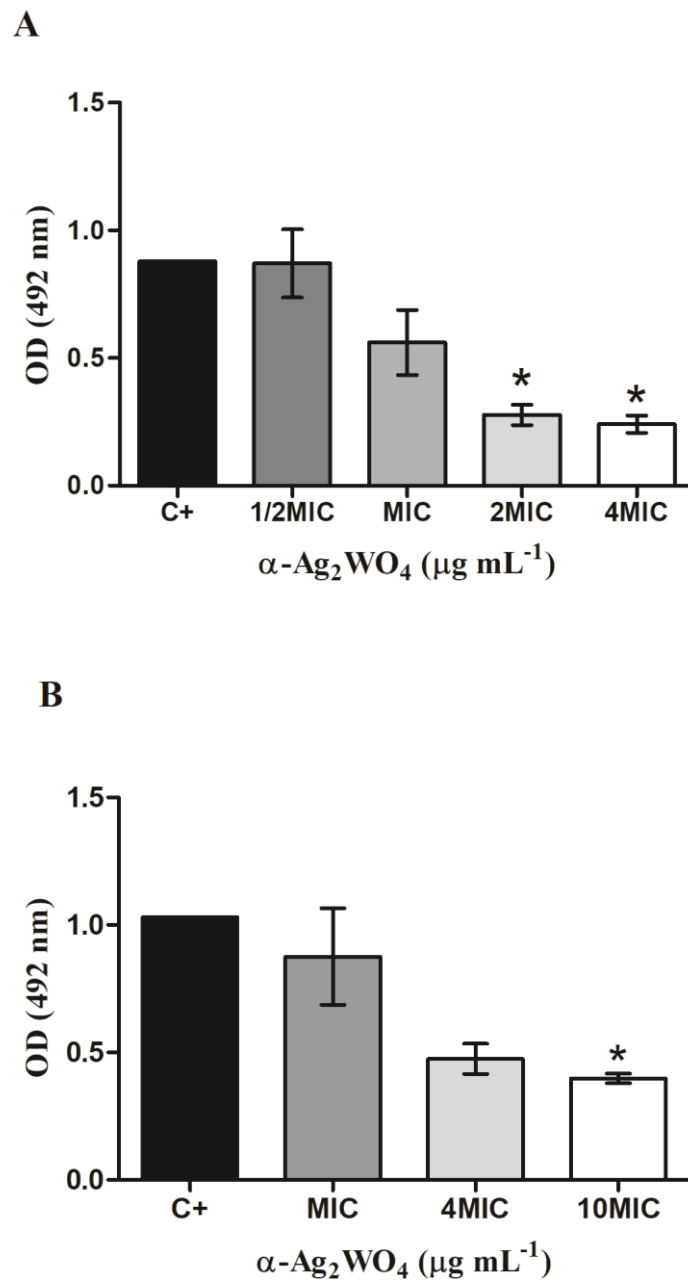


Figure 3. Effect of $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ crystals on *Candida albicans* biofilms. (A) Inhibition of biofilm formation after 24 h incubation in the presence of increasing concentrations of $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ crystals. (B) Reduction of preformed biofilms after 24 h treatment with $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ crystals. Data are expressed as percentage inhibition relative to untreated controls. Asterisks indicate statistically significant differences compared with the respective controls (* $p < 0.05$, one-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test).

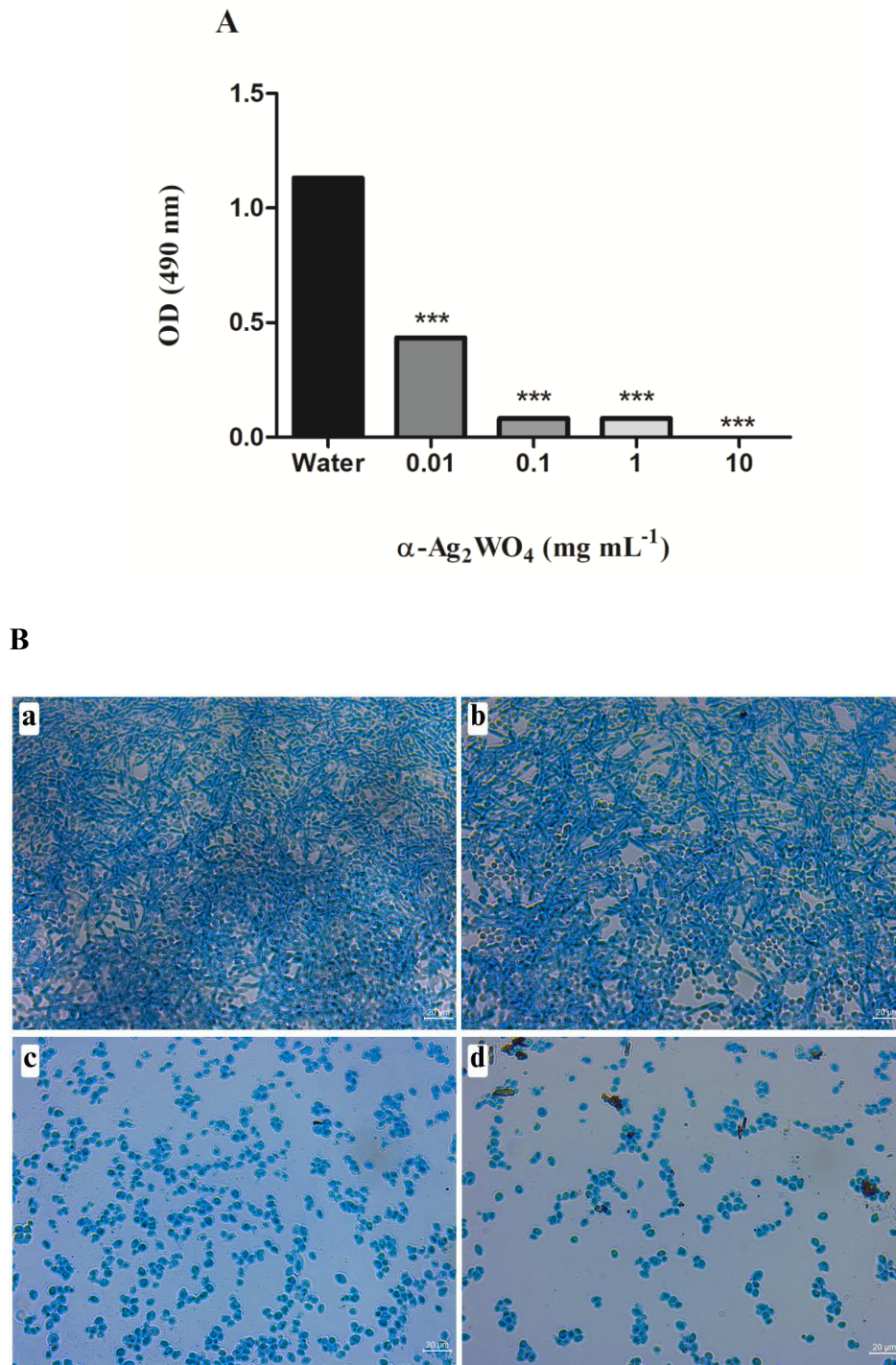


Figure 4. Effect of $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ -coated surfaces on *Candida albicans* biofilm formation. (A) Quantitative inhibition of biofilm metabolic activity assessed by the MTT reduction assay after 24 h. (B) Representative microscopic images of cotton blue-stained biofilms on pre-coated Petri dish surfaces: (a) control (water); (b) 0.01 mg mL⁻¹; (c) 0.1 mg mL⁻¹; (d) 1.0 mg mL⁻¹. Images acquired at 40 $\times$ magnification.

A

Groups	Average survival time (hours) ¹	Survival	p-value ^{2*}
G1 - Control (sterile water)	168 ± 0.0 a	20/20 (100%)	< 0.001
G2 - Ag ₂ WO ₄ (4 mg kg ⁻¹)	165.6 ± 2.3 a	19/20 (95.0%)	
G3 - <i>C. albicans</i> (1x10 ⁶ CFU mL ⁻¹)	84.0 ± 11.7 b	3/20 (15.0%)	
G4 - Ag ₂ WO ₄ (4 mg kg ⁻¹) + <i>C. albicans</i>	52.8 ± 7.7 c	1/20 (5.0%)	

B

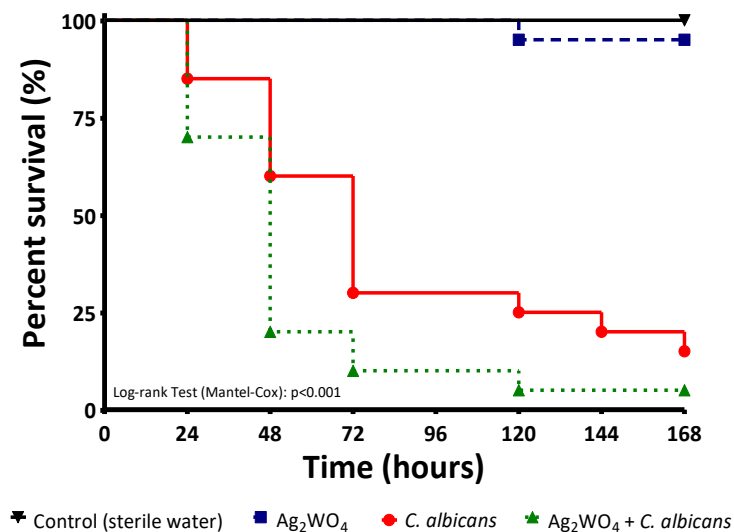


Figure 5. Survival of *Galleria mellonella* larvae following treatment with α -Ag₂WO₄ crystals and infection with *Candida albicans*. Kaplan–Meier survival curves show four groups: G1, saline control; G2, α -Ag₂WO₄ crystals (0.1 mg mL⁻¹; 4 mg kg⁻¹); G3, *C. albicans* (1 × 10⁶ CFU per larva); and G4, *C. albicans* + α -Ag₂WO₄ crystals (0.1 mg mL⁻¹; 4 mg kg⁻¹). The table summarizes mean survival times, survival percentages, and hazard ratios. Statistical comparisons between groups were performed with the Log-rank (Mantel–Cox) test ($p < 0.05$).

APÊNDICE B – LISTA DE PARTICIPAÇÃO DE COAUTORES

Em atendimento ao regulamento do PPGB, listamos abaixo a participação de cada co-autor, fora o mestrando e o orientador.

Júlia Leão Frolidi: Investigação.

Rita Avino: Investigação.

Diego Batista Carneiro de Oliveira: Investigação.

Robson Tadeu Soares de Oliveira Junior: Investigação.

Gabriel Antônio Nogueira Nascentes: Análise formal.

ANEXOS

ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

20/10/2025, 12:34

ScholarOne Manuscripts

Letters in Applied Microbiology

Home

Author

Review

DO NOT USE YOUR BROWSER BACK BUTTON. TO EXIT THIS PAGE, PLEASE CLOSE YOUR BROWSER WINDOW OR CLICK ON THE RETURN TO DASHBOARD BUTTON, IF AVAILABLE.

Submission Confirmation

Print

Thank you for your submission

Submitted to

Letters in Applied Microbiology

Manuscript ID

LAMICRO-2025-0466

Title

In vitro and in vivo antifungal activity of silver tungstate (α -Ag₂WO₄) microcrystals against Candida albicans

Authors

Sallum, Roberto

Froldi, Júlia

de Oliveira, Diego

Nascentes, Gabriel

Avino, Rita

Junior, Robson

Andrade, Anderson

Date Submitted

20-Oct-2025

Author Dashboard

ANEXO B - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO* (CONTINUAÇÃO)

20/10/2025, 12:34

ScholarOne Manuscripts

The Silverchair logo, featuring a stylized chair icon and the word "SILVERCHAI" in a serif font.

© Silverchair. All Rights Reserved
ScholarOne and Manuscript Central are registered trademarks of ScholarOne, Inc.

[Sign up to receive updates](#) | [System Requirements](#) | [Privacy Statement](#) | [Terms of Use](#) | [Cookies Settings](#) | [Accessibility](#)

* OXFORD UNIVERSITY PRESS (2022)¹¹¹