

Viabilidade Celular de Espécies do Gênero *Candida* na Presença de Diferentes Substratos Queratínicos

Cell Viability of Species of the Genus *Candida* in the Presence of Different Keratin Substrates

Jamylly Audrey Cordeiro Felix¹
Michelle Moreira de Oliveira²
Claudio José dos Santos Júnior³
Aryanna Kelly Pinheiro Souza⁴

RESUMO

Introdução: As leveduras do gênero *Candida* são relatadas pela literatura especializada como sendo os fungos oportunistas mais comumente isolados de mucosas em culturas de indivíduos normais. **Objetivo:** Avaliar a viabilidade celular de espécies de *Candida* na presença de diferentes substratos de queratina. **Métodos:** Trata-se de estudo do tipo laboratorial-experimental. A amostra foi composta por fragmentos dos seguintes dos substratos queratínicos: unhas, crina de cavalo e penas de frango e de *Candida albicans*; *C. parapsilosis*; *C. glabrata*; e *C. krusei*. Para a detecção da atividade queratinofílica foi montado um sistema de câmara úmida e na avaliação da viabilidade celular e cinética de crescimento foi utilizada a contagem em câmara de Neubauer. **Resultados:** Relacionando à viabilidade celular tendo a unha, crina e pena como substratos de degradação, foi possível observar que a *C. krusei*, *C. albicans* e *C. parapsilosis* obtiveram características semelhantes, com diminuição no crescimento conforme o tempo. Já a *C. glabrata* obteve seu crescimento exponencial após as 48h, demonstrando uma evolução ao longo do tempo com viabilidade superior em comparação às outras espécies ao fim dos experimentos. **Conclusão:** A *C. glabrata* foi a levedura que mais conseguiu adaptar-se aos substratos de queratina, alterando também sua micromorfologia, essa espécie só se desenvolveu totalmente com clamidósporos expressivos após 48h, diferentemente das espécies *C. krusei*, *C. albicans* e *C. parapsilosis*, que em 48h já se apresentavam desenvolvidas.

DESCRIPTORIOS

Candida. Espécies de *Candida*. *Candida albicans*. *Candida non-albicans*. Queratina.

ABSTRACT

Introduction: *Candida* yeasts are reported in the specialized literature as the opportunistic fungi most commonly isolated from mucosa in cultures of normal individuals. **Objective:** To evaluate the cell viability of *Candida* species in the presence of different keratin substrates. **Methods:** This is a laboratory-experimental study. The sample consisted of fragments of the following keratin substrates: nails, horsehair and feathers from chicken and *Candida albicans*; *C. parapsilosis*; *C. glabrata*; and *C. krusei*. For the detection of keratinophilic activity, a wet camera system was set up and in the evaluation of cell viability and growth kinetics, Neubauer chamber counting was used. **Results:** Relating to cell viability with the nail, mane and feather as degradation substrates, it was observed that *C. krusei*, *C. albicans* and *C. parapsilosis* had similar characteristics, with a decrease in growth over time. *C. glabrata* obtained its exponential growth after 48h, demonstrating an evolution over time with superior viability compared to other species at the end of the experiments. **Conclusion:** *C. glabrata* was the yeast that best managed to adapt to keratin substrates, also changing its micromorphology, this species only developed fully with expressive chlamydospores after 48 hours, unlike the species *C. krusei*, *C. albicans* and *C. parapsilosis*, which developed within 48 hours.

DESCRIPTORS

Candida. *Candida* species. *Candida albicans*. *Candida non-albicans*. Keratin.

¹ Biomédica. Centro Universitário Cesmac. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3289-0832>

² Biomédica. Centro Universitário Cesmac. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1269-0681>.

³ Médico. Mestre em Ensino em Saúde e Tecnologia. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2853-1968>

⁴ Biomédica. Mestre em Ciências da Saúde. Docente do Centro Universitário Cesmac. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1235-9144>

As leveduras do gênero *Candida* são relacionadas pela literatura especializada como sendo os fungos oportunistas mais comumente isolados de mucosas em culturas de indivíduos normais. Esses micro-organismos são considerados, igualmente, como os agentes de leveduroses mais prevalentes no grupo das agentes fúngicas que acometem os seres humanos^{1,2}.

Em pacientes imunodeprimidos, esses oportunistas podem cursar com um quadro clínico infeccioso conhecido como candidíase ou candidose, podendo acometer diversos sítios anatômicos do organismo humano. Entre as infecções invasivas, é importante citar a relevância clínica dos casos de infecção de corrente sanguínea, progressão conhecida como candidemia^{2,3}.

A espécie *C. albicans* é a mais frequente, responsável por 50 a 70% de todas as infecções invasivas por este patógeno^{4,5}. No entanto, espécies não-*albicans* como *C. glabrata*, *C. krusei*, e *C. tropicalis* passaram a ser responsáveis por parte significativa da candidose clínica e dos quadros de infecções invasivas e, por tal motivo, ganharam importante atenção das áreas de microbiologia aplicada, clínica médica e infectologia^{6,7}.

Uma variedade de estudos aponta mudanças no perfil epidemiológico das infecções causadas por *Candida* sp.^{6,8}. Além da *C. albicans*, as espécies não-*albicans* têm ocorrido em alta frequência nos serviços médicos que tratam do diagnóstico e da terapêutica de infecções oportunistas. Estas últimas apresentam características

particulares de infecção, suscetibilidade e expressão de fatores de virulência, sendo de importância o estudo da patogenia causada por cada uma delas⁹.

A despeito da maior frequência dessas infecções acometendo os indivíduos, são poucos os micro-organismos capazes de desenvolver micose de pele e de unha. Este fato é decorrente das estruturas epidérmicas queratinizadas presentes na pele, que conferem resistência e proteção em defesa aos patógenos. As espécies de *Candida* e os fungos dermatófitos estão entre os poucos patógenos capazes de causarem infecções nestes sítios¹⁰.

Apesar da capacidade acometer tais regiões, na literatura médica há escassez de estudos que relatem a atividade queratinofílica de espécies de *Candida*, ou seja, a capacidade, por tais agentes, do consumo da queratina e da produção da enzima do tipo queratinase. Por não possuírem tal capacidade, essas leveduras são consideradas, por uma parcela de profissionais médicos, como parte da microbiota normal do indivíduo.

Esse estudo teve como objetivo avaliar a viabilidade celular de espécies de *Candida* na presença de diferentes substratos queratínicos. Trata-se de trabalho que apresenta relevância clínico-epidemiológica tendo em vista uma maior frequência clínica na identificação das espécies do gênero *Candida* nos serviços de saúde e que há grande interesse nos possíveis fatores envolvidos durante a interação levedura-célula hospedeira.

MÉTODOS

Trata-se de estudo do tipo laboratorial-experimental realizado no Laboratório de Micologia Clínica do *Campus I* do Centro Universitário CESMAC em Maceió-AL.

Procedimentos preliminares

A amostra foi composta por fragmentos dos seguintes dos substratos queratínicos: (a) unhas sadias cedidas pelo Laboratório de Micologia Clínica do Cesmac, armazenadas no naquele laboratório para fins de ensino e pesquisa, e que eram provenientes de indivíduos sadios, sem histórico de infecções atual ou pregressa de alterações ungueais; (b) penas de galinha cedidas pela empresa Avícola Nossa Senhora de Lourdes; e (c) crinas de cavalo doadas pelo Batalhão de

Cavalaria da Polícia Militar de Alagoas. Estes materiais foram lavados e deixados imersos por 24 horas em solução contendo hipoclorito de sódio 10% para remoção de impurezas e, em seguida, aquecidos em estufa a 100°C por 20 minutos; fragmentados; acondicionados em tubos de Eppendorf; e autoclavados a 121°C por 15 minutos. Foi realizado, por último, o controle de esterilização e fragmentos dos substratos foram inoculados em placas contendo Agar Sabouraud e Agar Mueller Hinton incubadas a 37°C por 48 horas. Não havendo crescimento de microrganismos, os substratos foram utilizados para realização dos testes experimentais.

Avaliação da atividade queratinofílica

Nas análises, foram utilizadas quatro

Figura 1. Lâminas dos fragmentos de unha, pena e crina após 48 horas para confirmação da aderência das espécies de *Candida* e degradação do substrato.

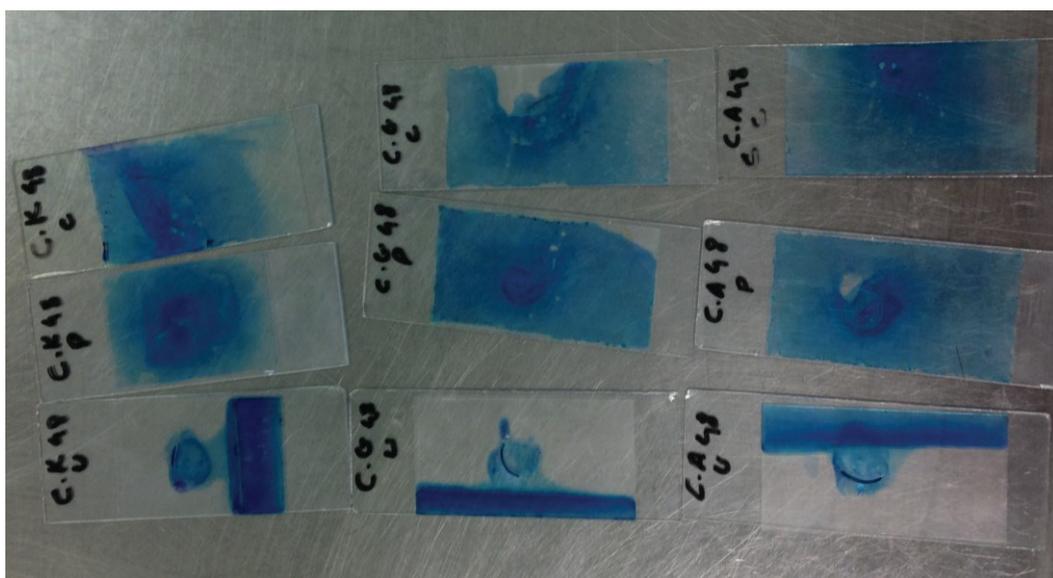
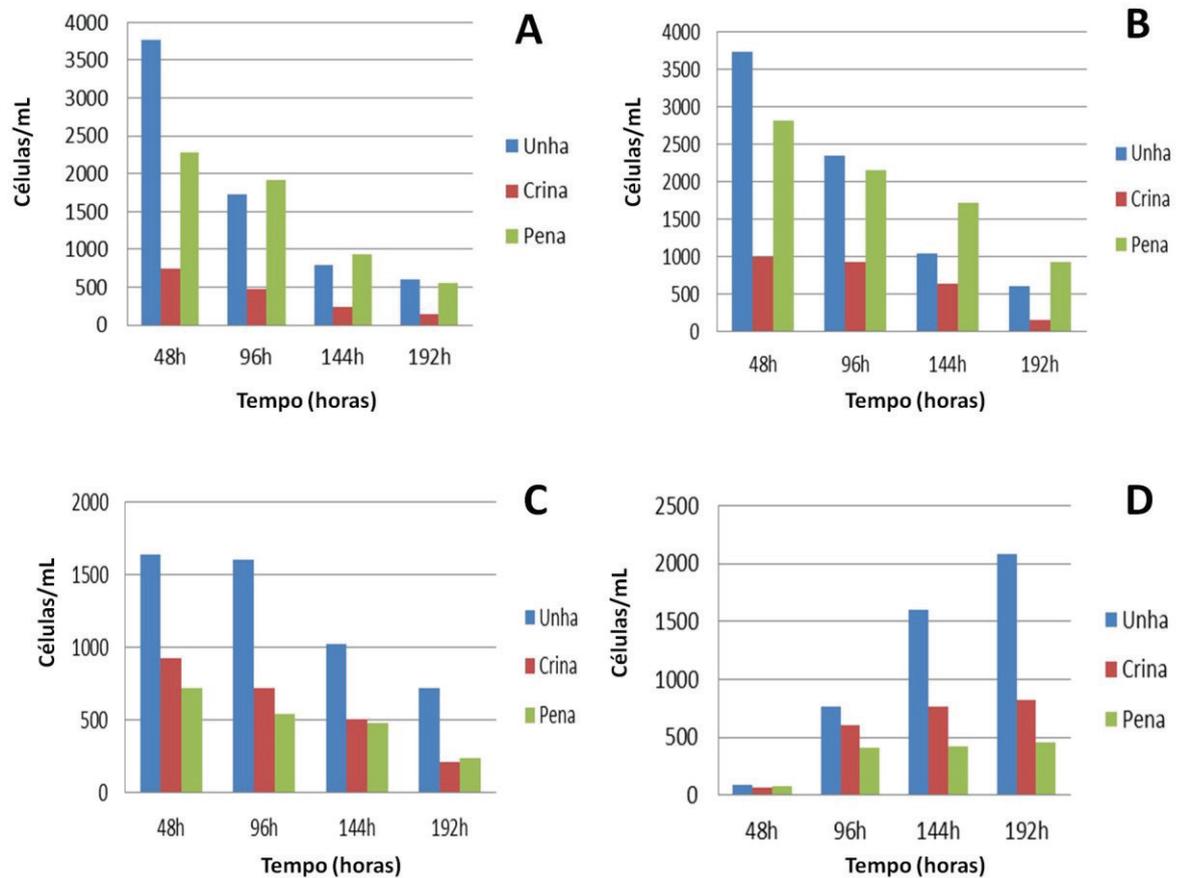


Figura 2. Viabilidade celular das espécies de *Candida* na presença dos substratos queratínicos em 48, 96, 144 e 192 horas de experimento.



Legenda: A – *Candida krusei*; B – *Candida albicans*; C – *Candida parapsilosis*; D – *Candida glabrata*.

amostras de diferentes espécies de *Candida* provenientes da identificação da Coleção de Culturas-URM/UFPE (*Candida albicans* URM5689; *C. parapsilosis* URM5583; *C. glabrata* URM5594; *C. krusei* URM1059). Para a detecção da atividade queratinofílica foi montado um sistema de câmara úmida utilizando placas de Petri de vidro de 90 x 15 mm. No interior destas placas foi colocado um papel filtro no tamanho do fundo da

placa e acondicionado sobre o papel uma placa de Kline de 12 escavações. Foram montados quatro sistemas de câmara úmida empacotados um a um em papel manilha e esterilizados em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Após, as placas foram incubadas em estufa de secagem a 100°C durante 20 minutos.

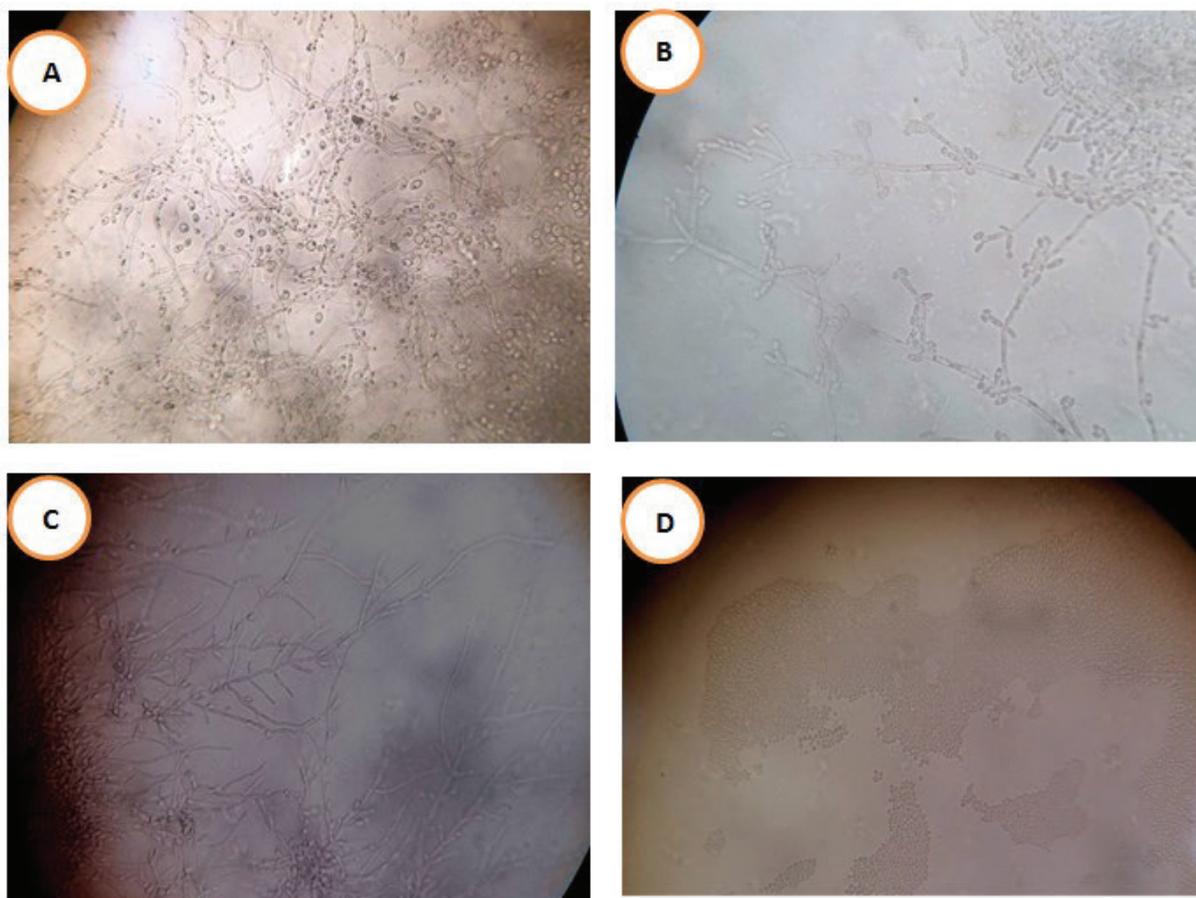
Para cada espécie de *Candida* foi usada uma placa de Kline, cada qual com

colunas de três escavações por horário, cada escavação contendo um tipo de substrato diferente. Foram transferidos cinco fragmentos de unha, crina e pena para cada escavação. Em seguida, foram preparadas quatro suspensões de 2 mL de solução salina esterilizada e cada espécie de *Candida foi* isolada e comparada com o tubo 0,5 da

escala de McFarland que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Após este procedimento, foram adicionados 0,5mL desta suspensão fúngica em cada poço que se encontrava cada substrato separadamente.

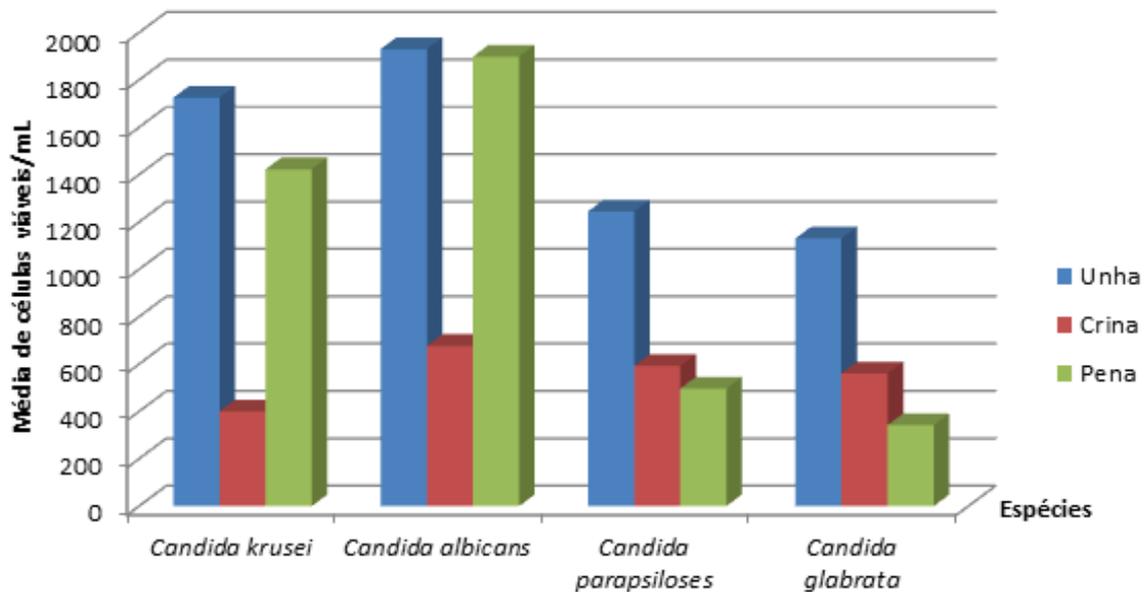
Em intervalos de dois dias, durante oito dias, um fragmento de cada substrato foi retirado, colocado sobre uma lâmina, corado

Figura 3. Micromorfologia da *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* em Agar Fubá as 48 horas de experimento.



Legenda: **A** – *Candida albicans* em Ágar fubá em 48h com presença de pseudohifa e clamidósporos terminais. **B** – *Candida krusei* em Ágar fubá em 48h com presença de pseudohifa alongada e clamidósporos. **C** – *Candida parapsilosis* em Ágar fubá em 48h com presença de pseudohifas gigantes e clamidósporos. **D** – *Candida glabrata* em Ágar fubá em 192h apresentando grande quantidade de clamidósporos.

Figura 4. Média de células viáveis das espécies de *Candida* na presença dos substratos queratínicos no Ensaio.



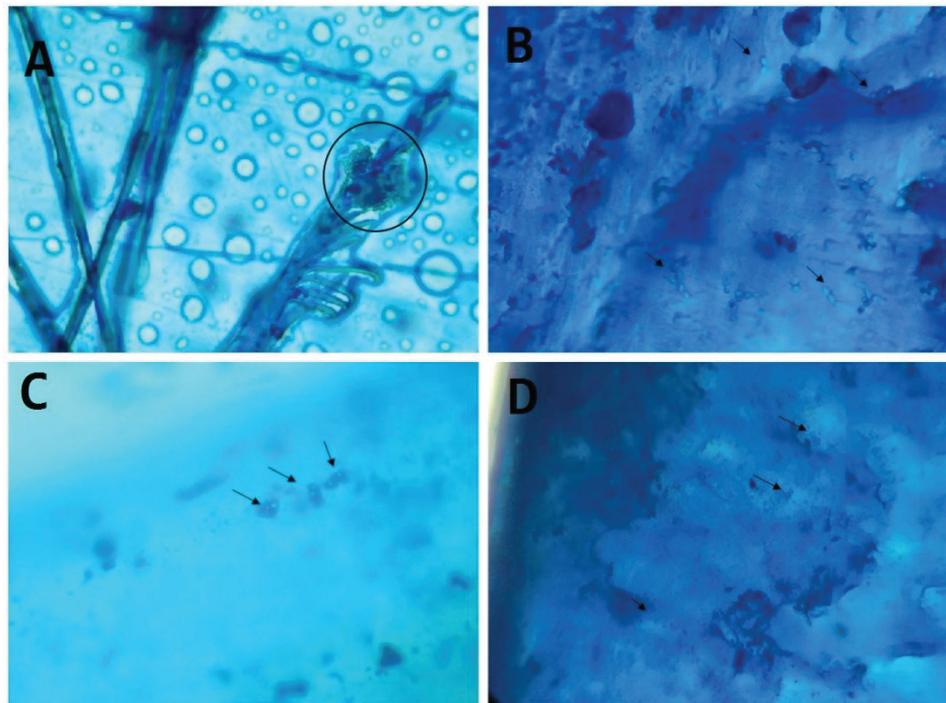
com azul de metileno, com suporte de uma lamínula, e observado em microscópio a fim de verificar o comprometimento de cada substrato e aderência quanto à colonização (Figura 1).

Outro fragmento de cada substrato foi semeado em Ágar Sabouraud, sem antibiótico, contido em placas de Petri, a fim de se obter o controle positivo, comprovando assim a aderência da *Candida* ao substrato. Após 24 horas o fragmento foi retirado do controle positivo e inoculado em sistema de microcultivo em Agar fubá para avaliação da sua micromorfologia frente aos substratos presentes no meio. Ao término de cada dia, os fragmentos foram hidratados com solução

salina estéril, para manter úmida e evitar o ressecamento e morte das espécies.

Viabilidade celular e cinética de crescimento

Nesta etapa foi utilizada a contagem em câmara de Neubauer através dos seguintes procedimentos: em um tubo de vidro foram misturadas, com o auxílio de uma pipeta automática, 0,1mL da suspensão presente no poço que se desejava contar e 0,1mL da solução de azul de metileno. Após a homogeneização, foram retirados com o auxílio de uma pipeta de Pasteur uma pequena quantidade capaz de sobrenadar o quadrante presente na câmara Neubauer, colocada

Figura 5. Microscopia de cada substrato queratínico frente à *C. krusei*.

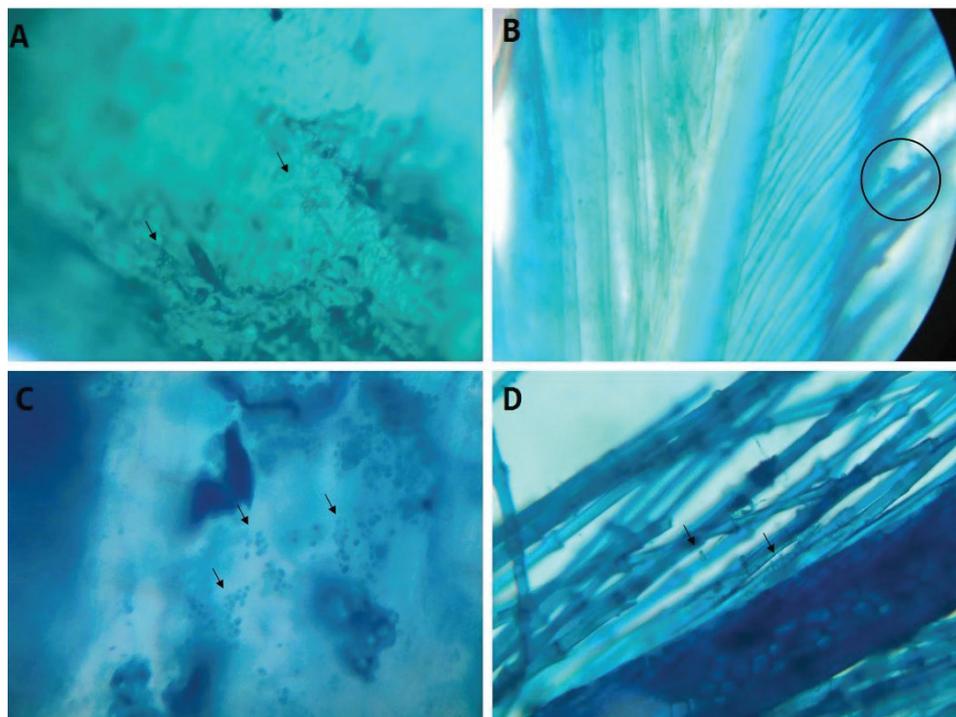
Legenda: **A** – Fragmento de pena no tempo de 48h com adesão de *C. krusei*; **B** – Fragmento de unha no tempo de 48h com *C. krusei* invadindo as lâminas ungueais; **C** – Fragmento de crina no tempo de 144h com *C. krusei* dentre as camadas; **D** – Fragmento de unha no tempo de 144h com *C. krusei* invadindo as lâminas ungueais.

entre a lâmina e a lamínula. As células sem capacidade de reprodução tomaram a cor azul acentuado – referente ao corante, ao contrário das células com maior atividade metabólica e capacidade de reprodução, que permaneceram incolores. Para avaliação da cinética de crescimento foi realizada o acompanhamento no intervalo de 48h durante 10 dias de incubação à 37°C. O valor celular por mL foi obtido através da equação: $N = (N_T / Q) \times D \times 1000$, onde: N – número de células por mL; N_T – número total de células contadas;

Q – número de quadrantes contados; D – fator de diluição utilizado.

RESULTADOS

Foi possível observar que, relacionando à viabilidade celular das espécies de *Candida*, tendo a unha, a crina e pena como substratos de degradação, a *C. krusei*, *C. albicans* e *C. parapsilosis* obtiveram características semelhantes, com redução no crescimento. Já a *C. glabrata* obteve aumento no seu

Figura 6. Microscopia de cada substrato queratínico frente à *C. albicans*.

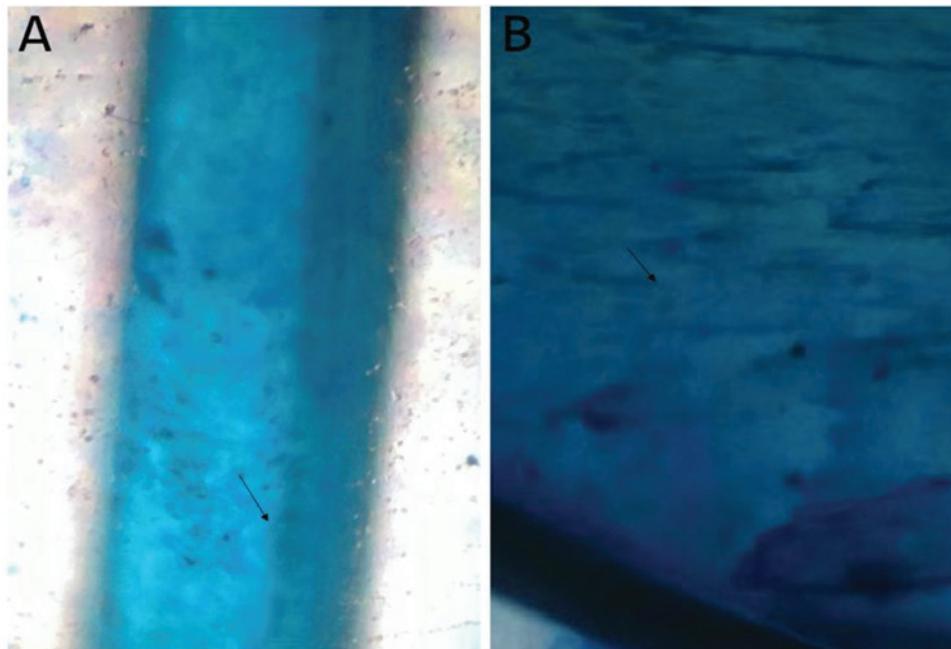
Legenda: **A** – Fragmento de unha no tempo de 48h com *C. albicans* invadindo as lâminas ungueais; **B** – Fragmento de pena no tempo de 96h com *C. albicans* aderida; **C** – Fragmento de crina no tempo de 144h com *C. albicans* invadindo as camadas; **D** – Fragmento de pena no tempo de 192h com *C. albicans* aderida.

crescimento nas mesmas condições. Esses resultados estão evidenciados nos gráficos da Figura 2 e na avaliação da micromorfológica (Figura 3).

Na avaliação da micromorfologia das espécies, a *C. albicans*, a *C. krusei* e a *C. parapsilosis* apresentaram maior desenvolvimento nos fragmentos às 48 horas. Em contraste, a *C. glabrata* ao percorrer esse mesmo tempo da pesquisa, apresentou apenas diferença na quantidade de clamidósporos.

A Figura 4 mostra a média aritmética do número de células viáveis das espécies de *Candida* estudadas no tempo predito do experimento. A *C. albicans* obteve média de 1931, 677 e 1899 células viáveis nos substratos de unha, crina e pena, nessa ordem. A *C. krusei* teve média 1726, 401, 1423, a *C. parapsilosis* de 1245, 592 e 497 e a *C. glabrata* com 1130, 561 e 342, respectivamente.

As espécies de *Candida* apresentaram diferentes comportamentos frente aos

Figura 7. Microscopia de cada substrato queratínico frente à *C. parapsilosis*.

Legenda: **A** – Fragmento de crina no tempo de 96h, com *C. parapsilosis* dentre as camadas; **B** – Fragmento de unha no tempo de 96h com *C. parapsilosis* invadindo as lâminas ungueais.

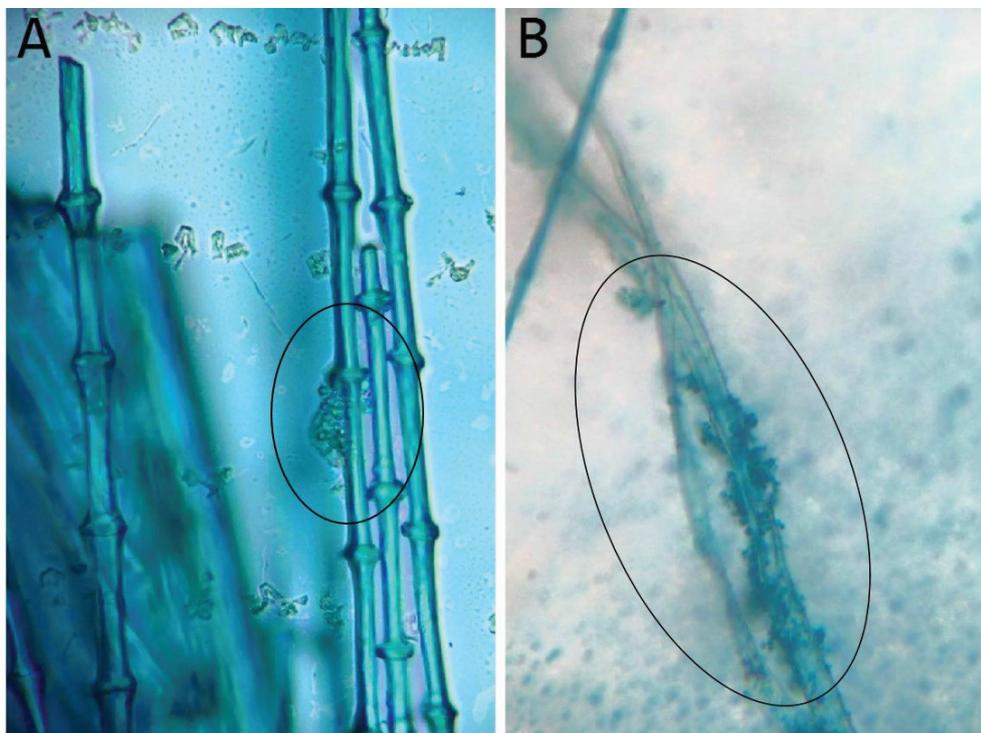
substratos queratínicos. Na pena de galinha houve apenas uma aderência na raque. Na unha e crina de cavalo as espécies conseguiram invadir o substrato. Esses achados estão ilustrados nas Figuras 5, 6, 7 e 8.

DISCUSSÃO

Neste trabalho, avaliamos a viabilidade celular de espécies de *Candida* na presença de diferentes substratos queratínicos. A queratina é uma macromolécula com função estrutural e de proteção, sendo a principal constituinte de unhas, chifres, cabelo, cascos,

lã, penas, pele e outras estruturas epidérmicas de muitos pássaros, mamíferos, répteis e anfíbios¹¹⁻¹². Essa proteína apresenta alta estabilidade mecânica devido à composição e configuração molecular dos seus aminoácidos que causam rigidez estrutural. A estrutura estável e rígida e a baixa solubilidade devem-se a presença de alto teor de cistina, formando pontes de dissulfeto intracadeia e intercadeia¹³. A estrutura da queratina é dividida em rígida e leve de acordo com o teor de cisteína, que é o produto da cistina. A do tipo rígida contém muitos resíduos, sendo deste grupo penas, pelos, crina e unhas¹⁴. A leve apresenta poucos resíduos na constituição e é

Figura 8. Microscopia de cada substrato queratínico frente à *C. glabrata*.



Legenda: **A** – Fragmento de pena no tempo de 48h com *C. glabrata* aderida; **B** – Fragmento de pena no tempo de 96h com *C. glabrata* aderida.

encontrada na pele^{13,15}. Materiais queratinosos são insolúveis e resistentes à degradação por enzimas proteolíticas como tripsina, pepsina e papaína^{16,17}.

Espécies de *Candida* tem a habilidade de produzir enzimas hidrolíticas extracelulares^{9,18,19}. Ao mesmo tempo, sabe-se que a procura por micro-organismos produtores de queratinase tem sido uma constante, uma vez que essa enzima possui um grande espectro de aplicação. Alguns micro-organismos apresentam produção constitutiva de queratinase, como a *Candida albicans*^{20,21}. As queratinases são enzimas proteolíticas que demonstram a capacidade

de degradar substratos queratinolíticos. São, ademais, importantes por hidrolisarem cabelo, penas, colágenos e desobstruírem sistemas de esgoto durante o tratamento de águas residuais²². Estas enzimas têm se tornado de grande importância nos últimos anos, apresentando aplicações potenciais na degradação de substratos ricos em queratina como bioprodutos gerados principalmente por processos da agroindústria, como por exemplo, as penas de galinha descartadas pela indústria avícola. Também são aplicadas nas indústrias de alimentos, têxteis, de couro, na medicina, em cosméticos e no processamento industrial de aves domésticas¹⁶. Dentre

os fatores predisponentes das infecções humanas por espécies do gênero *Candida*, destaca-se a importância das peptidases, cujo papel fisiológico durante a interação microrganismo-célula hospedeira pode ser a degradação de mucosas, facilitando a invasão do patógeno, hidrólise de proteínas do hospedeiro com fins nutricionais e a degradação de proteínas envolvidas no sistema de defesa do hospedeiro¹⁹.

Neste estudo, identificamos que, quando comparado o número de células viáveis com relação ao tempo de experimento, foi possível observar que a *C. krusei* entre 48 e 96 horas obteve uma redução relevante do número de células fúngicas, e que entre 144 e 192 horas a essa diferença foi menor. Para a *C. albicans* houve uma importante redução no primeiro intervalo, assim como entre as 144 e 192 horas. No caso da *C. parapsilosis*, a diferença na redução foi menos significativa no primeiro lapso temporal, tornando-se mais importante no decorrer da pesquisa. Ambas as três espécies tiveram uma maior adaptação no primeiro tempo do experimento, porém com tentativa de manter-se em desenvolvimento, resultado este demonstrado pela menor redução do número de células fúngicas viáveis ao longo do experimento.

A *C. glabrata*, quarta espécie, seguiu caminho oposto às outras três, tendo crescimento ao invés de decréscimo após as 48 horas e ao longo do decorrer do experimento. Esse achado pode ser expressão de uma espécie que se adaptou ao meio fornecido com provável adaptação

nas horas iniciais do ensaio, seguido com desenvolvimento de forma sua estrutura morfológica no decorrer do estudo. Esta diferença na cinética de crescimento refletiu também no microcultivo em Agar Fubá, em que as espécies *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* tiveram maior desenvolvimento decorridas 48 horas dos ensaios, em oposição a *C. glabrata*.

Nessa análise, com base na média de células fúngicas viáveis, mesmo com a *C. glabrata* se adaptando melhor ao substrato, a espécie de maior viabilidade foi a *C. albicans* com média de 1931, 677 e 1899 de células viáveis nos substratos de unha, crina e pena, respectivamente, confirmando assim o que a literatura médica relata sobre a *C. albicans* ser a espécie de maior frequência em infecções e na colonização humana^{4,5}. A *C. krusei* teve média 1726, 401, 1423, a *C. parapsilosis* com 1245, 592 e 497, de células viáveis nos substratos de unha, crina e pena, respectivamente. A adaptação da *C. glabrata* aos substratos foi ao longo do tempo de experimento tendo menores médias de células viáveis com 1130, 561 e 342 nos substratos de unha, crina e pena, respectivamente.

Espécies de *Candida* não-*albicans* apresentam aderência e propriedades hidrofóbicas significativamente superiores a *C. albicans*²³. As razões para emergência das espécies não-*albicans* não são completamente entendidas, mas sabe-se que algumas condições podem aumentar o risco de desenvolvimento de candidemia por estas espécies^{24,27-31}. Atualmente, diversos estudos

apontam mudanças epidemiológicas das infecções causadas por *Candida spp.* com expressivo aumento de espécies de *Candida não-albicans*⁴⁻⁷.

Como foi possível observar, as espécies de *Candida* testadas obtiveram comportamentos diferentes nos substratos fornecidos. Na unha houve apenas uma aderência na raque, que corresponde à parte central da estrutura da unha que contém queratina de maior rigidez dificultando a penetração das espécies. Já na unha e crina as espécies conseguiram invadir o substrato devido a sua estrutura de lâmina e escama que facilitam a invasão das espécies a procura de queratina. Relacionando a invasão ou aderência com a média de células viáveis, identificamos que quanto mais células presentes na contagem pela câmara de Neubauer mais células foram encontradas presentes na lâmina do substrato.

Os resultados aqui apresentados apresentam grande importância, vez que se analisou a afinidade de espécies do gênero *Candida* por queratina e que, na literatura médica, há escassez de estudos que relatem a atividade queratinofílica desse grupo de patógenos.

CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que a *C. krusei*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* possuem afinidade por substratos de queratina conseguindo manter células viáveis até 192 horas de estudo. A *C. glabrata* foi a levedura que conseguiu se adaptar ao substrato de queratina, em especial a unha, tendo um crescimento exponencial. Estudos mais aprofundados devem ser realizados para tentar identificar a produção de enzimas do tipo queratinases por *C. glabrata*.

REFERÊNCIAS

1. Santos Júnior CJ, Rodrigues DKB, Dantas RDS, Souza AKP. Atividade antifúngica de isolados clínicos de *Candida não-albicans* aos óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) e *Eucalyptus globulus* (eucalipto-comum). *Medicina (Ribeirão Preto)*. 2021;54(1):e-168684.
2. Gonzalez-Lara MF, Ostrosky-Zeichner L. Invasive Candidiasis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2020;41(1):3–12.
3. Ozturk I, Tunçel A, Yurt F, Biyiklioglu Z, Ince M, Ocakoglu K. Antifungal photodynamic activities of phthalocyanine derivatives on *Candida albicans*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2020;30.
4. Colombo AL, Guimarães T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida spp.* *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(5):599–607.
5. Mímica LMJ, Ueda SMY, Martino MDV, Navarini A, Martini IJ. Diagnóstico de infecção por *Candida*: Avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. *J Bras Patol e Med Lab*. 2009;45(1):17–23.
6. Sadeghi G, Ebrahimi-Rad M, Mousavi SF, Shams-Ghahfarokhi M, Razzaghi-Abyaneh M. Emergence of non-*Candida albicans* species: Epidemiology, phylogeny and fluconazole susceptibility profile. *J Mycol Med*. 2018;28(1):51–8.

7. Dadar M, Tiwari R, Karthik K, Chakraborty S, Shahali Y, Dhama K. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. Vol. 117, *Microbial Pathogenesis*. Academic Press; 2018. p. 128–38.
8. Lima GME, Nunes M de O, Chang MR, Tsujisaki RA de S, Nunes J de O, Taira CL, et al. Identification and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from the urine of patients in a university hospital in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2017;59:75.
9. Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol*. 2001;9(12):591–6.
10. Specian AFL. Produção de proteases por isolados clínico de *Candida parapsilosis* em presença de substratos queratínicos. Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual de Londrina, 2011.
11. Busson B, Engström P, Doucet J. Existence of various structural zones in keratinous tissues revealed by X-ray microdiffraction. *J Synchrotron Radiat*. 1999;6(5):1021–30.
12. Riessen S, Antranikian G. Isolation of *Thermoanaerobacter keratinophilus* sp. nov., a novel thermophilic, anaerobic bacterium with keratinolytic activity. *Extremophiles*. 2001;5(6):399–408.
13. Schrooyen PMM, Dijkstra PJ, Oberthür RC, Bantjes A, Feijen J. Partially carboxymethylated feather keratins. 2. Thermal and mechanical properties of films. *J Agric Food Chem*. 2001;49(1):221–30.
14. Hood CM, Healy MG. Bioconversion of waste keratins: wool and feathers. *Resour Conserv Recycl*. 1994;11(1–4):179–88.
15. Voet D, Voet JG. Three-dimensional structure of protein. *Stiefel Journal Biochemistry*. Wiley: New York; 1995.
16. Farag AM, Hassan MA. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme Microb Technol*. 2004;34(2):85–93.
17. Williams CM, Richter CS, Mackenzie JM, Shih JCH. Isolation, Identification, and Characterization of a Feather-Degrading Bacterium. *Appl Env Microbiol*. 1990;56(6):1509–15.
18. Gokce G, Cerikcioglu N, Yagci A. Acid proteinase, phospholipase, and biofilm production of *Candida* species isolated from blood cultures. *Mycopathologia*. 2007 Dec;164(6):265–9.
19. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003;67(3):400–28.
20. Kapica L, Blank F. Growth of *Candida Albicans* on Keratin as Sole Source of Nitrogen. *Dermatology*. 1957;115(2):81–105.
21. Kapica L, Blank F. Growth of *Candida parapsilosis* with keratin as sole source of nitrogen. *Dermatology*. 1958;117(6):433–54.
22. Chitte RR, Nalawade VK, Dey S. Keratinolytic activity from the broth of a feather-degrading thermophilic *Streptomyces thermoviolaceus* strain SD8. *Lett Appl Microbiol*. 1999;28(2):131–6.
23. Pinheiro Souza AK, do Nascimento JPM, Santos Araújo MA dos, Pedrosa KP da S, Tenorio BM, Pires LLS, et al. Airborne Fungi in Neonatal Intensive Care Unit of a Public Hospital in Brazil. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 2019;8(12):1210–9.
24. Tamura NK, Negri MFN, Bonassoli LA, Svidzinski TIE. Virulence factors for *Candida* spp recovered from intravascular catheters and hospital workers' hands. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40(1):91–3.
25. Joshi SG, Tejashwini MM, Revati N, Sridevi R, Roma D. Isolation, identification and characterization of a feather degrading bacterium. *Int J Poult Sci*. 2007;6(9):689–93.
26. Colombo AL, Guimarães T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(5):599–607.
27. Wingard JR. Importance of *Candida* species other than *C. Albicans* as pathogens in oncology patients. *Clin Infect Dis*. 1995;20(1):115–25.
28. Girmenia C, Martine P, De Bernardis F, Gentile G, Boccanera M, Monaco M, et al. Rising incidence of *Candida parapsilosis* fungemia in patients with hematologic malignancies: Clinical aspects, predisposing factors, and differential pathogenicity of the causative strains. *Clin Infect Dis*. 1996;23(3):506–14.
29. Marr KA, Seidel K, White TC, Bowden RA. Candidemia in Allogeneic Blood and Marrow Transplant Recipients: Evolution of Risk Factors after the Adoption of Prophylactic Fluconazole. *J Infect Dis*. 2000;181(1):309–16.
30. Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, Hajjeh RA, Gaynes RP. Secular trend of hospital-acquired Candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis*. 2002;35(5):627–30.
31. Clark TA, Slavinski SA, Morgan J, Lott T, Arthington-

Skaggs BA, Brandt ME, et al. Epidemiologic and molecular characterization of an outbreak of *Candida parapsilosis* bloodstream infections in a community hospital. *J Clin Microbiol.* 2004;42(10):4468–72.

CORRESPONDÊNCIA

Aryanna Kelly Pinheiro Souza
E-mail: aryannakelly@gmail.com.