

Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento  
Mestrado em Engenharia Biomédica

Victor Mendes de Siqueira

**ESTUDO DO EFEITO DO COMPOSTO p,p'-Methoxi-disseleneto de difenila  
(MeOPhSe)<sub>2</sub> SOBRE *Candida krusei***

São José dos Campos, SP  
2021

Victor Mendes de Siqueira

**ESTUDO DO EFEITO DO COMPOSTO p,p'-Methoxi-disseleneto de difenila  
(MeOPhSe)<sub>2</sub> SOBRE *Candida krusei***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Engenharia Biomédica como complementação dos créditos necessários para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maricilia Silva Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto-Silva

São José dos Campos, SP

2021

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Siqueira, Victor Mendes de  
Estudo do efeito do composto p,p'-Methoxi-disseleneto de  
difênila (MeOPhSe)<sub>2</sub> sobre *Candida krusei* / Victor Mendes de  
Siqueira; orientadora, Profa. Dra. Maricilia Silva Costa;  
co-orientador Prof. Dr. Carlos Alberto-Silva. - São José dos  
Campos, SP, 2021.  
1 CD-ROM, 70 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Vale do  
Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Biomédica.

Inclui referências

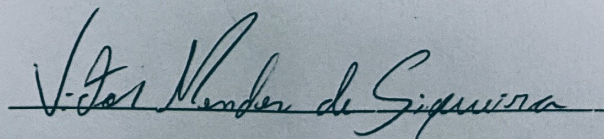
1. Engenharia Biomédica. 2. *Candida*. 3. Adesão celular. 4.  
Biofilmes. I. Costa, Profa. Dra. Maricilia Silva, orient. II.  
Alberto-Silva, Prof. Dr. Carlos, co-orient. III. Universidade do  
Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia  
Biomédica. IV. Título.

Eu, Victor Mendes de Siqueira, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em  
outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o  
usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado  
respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de  
propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e  
profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 2 de Setembro de 2021.



Autor(a) da Obra

**VICTOR MENDES DE SIQUEIRA**

**“ESTUDO DO EFEITO DO COMPOSTO *p,p'*- Metoxi-disseleneto de difenila SOBRE  
*Candida krusei*”.**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, pela seguinte banca examinadora:

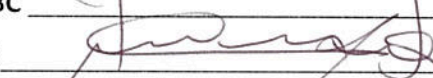
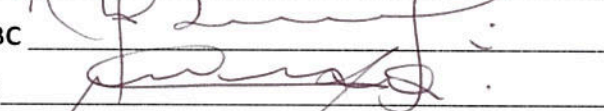
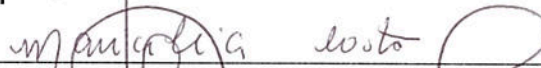
PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> ANDREZA RIBEIRO SIMIONI

PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> MARICILIA SILVA COSTA

PROF. DR. CARLOS ALBERTO SILVA - UFABC

PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> JULIANA FERREIRA STRIXINO

PROF. DR. JOSÉ ANTONIO SILVA JUNIOR – Uninove



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 21 de junho de 2021.

## Estudo do efeito do composto p,p'-Methoxi-disseleneto de difenila (MeOPhSe)<sub>2</sub> sobre *Candida krusei*

### RESUMO

A *Candida krusei* é uma espécie do gênero *Candida* que possui resistência intrínseca a antifúngicos comumente utilizados para a profilaxia e tratamento de infecções fúngicas, principalmente da classe dos azóis, como o fluconazol. Embora a *C. krusei* apresente uma baixa incidência, de aproximadamente 4 % dos casos em pacientes com doenças hematológicas, por conta de sua resistência aos tratamentos convencionais, o quadro clínico do paciente costuma rapidamente se agravar. O presente estudo teve como objetivo estudar o efeito do composto organocalcogênio p,p'-Methoxi-disseleneto de difenila (MeOPhSe)<sub>2</sub> sobre *C. krusei*. Foram realizados ensaios para a determinação do efeito do composto sobre o crescimento celular, a cinética de crescimento, a formação de biofilme e a adesão de *C. krusei* em células HeLa. Ainda, foi avaliada a toxicidade do composto (MeOPhSe)<sub>2</sub>, tanto em células HeLa, como em células Vero. Foi observada uma inibição de mais de 95% do crescimento de *C. krusei* na presença do composto (MeOPhSe)<sub>2</sub>. O composto foi capaz de reduzir a formação de biofilmes em torno de 76% e alterar a curva de crescimento de *C. krusei*, prolongando a fase de latência (LAG) e reduzindo o número de células viáveis. Ainda, foi observada uma diminuição da capacidade de adesão de *C. krusei* em células HeLa, sendo que em concentrações de até 10 µmol.L<sup>-1</sup> o composto não apresentou efeito citotóxico, tanto em células HeLa, como em células Vero. Estes resultados demonstram o potencial do composto (MeOPhSe)<sub>2</sub> como uma promissora terapia antifúngica.

**Palavras-Chave:** *Candida krusei*. Adesão celular. Biofilme. (MeOPhSe)<sub>2</sub>. Composto Organocalcogênio.

## Study of the effect of compound p,p'-methoxyl-diphenyl diselenide (MeOPhSe)<sub>2</sub> on *Candida krusei*

### ABSTRACT

*Candida krusei* is a species of the *Candida* genus that has intrinsic resistance to antifungal agents commonly used for the prophylaxis and treatment of fungal infections, mainly from the azole class, such as fluconazole. Although *C. krusei* has a low incidence, of approximately 4% of cases in patients with hematological diseases, due to its resistance to conventional treatments, the patient's clinical condition tends to rapidly worsen. The present study aimed to study the effect of the organochalcogen compound p,p'-Methoxyl-diphenyl diselenide (MeOPhSe)<sub>2</sub> on *C. krusei*. Assays were carried out to determine the effect of the compound on cell growth, growth kinetics, biofilm formation and adhesion of *C. krusei* to HeLa cells. Furthermore, the toxicity of the compound (MeOPhSe)<sub>2</sub> was evaluated, both in HeLa cells and in Vero cells. More than 95% inhibition of *C. krusei* growth was observed in the presence of the compound (MeOPhSe)<sub>2</sub>. The compound was able to reduce the formation of biofilms around 76% and change the growth curve of *C. krusei*, prolonging the latency phase (LAG) and reducing the number of viable cells. Moreover, a decrease in the adhesion capacity of *C. krusei* in HeLa cells was observed, and at concentrations of up to 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  the compound did not show a cytotoxic effect, both in HeLa cells and in Vero cells. These results demonstrate the potential of the compound (MeOPhSe)<sub>2</sub> as a promising antifungal therapy.

**Keywords:** *Candida krusei*. Cell adhesion. Biofilm. (MeOPhSe)<sub>2</sub>. Compound. Organochalcogen.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha família, que sempre me incentivou e apoiou em todas minhas escolhas.

A minha esposa que mesmo internada, se preocupava mais comigo do que com ela mesma.

A minhas amigas e parceiras de laboratório, Bruna e Juliene, que foram como irmãs mais velhas, tiveram paciência, me passaram muito conhecimento e me ensinaram que ninguém faz nada sozinho.

A minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maricilia Silva Costa, por ser como uma mãe pra mim, por todos os puxões de orelha e por todos os conselhos e suporte que me ajudaram a manter o foco e não desistir nos momentos mais sensíveis.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Carlos Alberto-Silva, por toda ajuda com os experimentos, todas as explicações e também por ter aceitado esse desafio.

Ao meu amigo e colega de trabalho, Rafael, por todas as vezes que me ajudou com as responsabilidades da rotina.

A todos os meus amigos, pela compreensão que tiveram durante esses anos onde acabei me distanciando.

Aos professores e funcionários da UNIVAP e a FVE que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse seguir adiante, e que tornaram essa jornada possível.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do composto p,p'-Methoxi-disseleneto de difenila (MeOPhSe) <sub>2</sub> .....	35
Figura 2 - Efeito de diferentes concentrações do composto (MeOPhSe) <sub>2</sub> sobre o crescimento de <i>C. krusei</i> .....	41
Figura 3 - Efeito de diferentes concentrações do composto (MeOPhSe) <sub>2</sub> sobre a formação de biofilme. ....	42
Figura 4 - Biofilme de <i>C. krusei</i> 10 <sup>7</sup> - grupo controle após 24 horas. ....	43
Figura 5 - Biofilme <i>C. krusei</i> 10 <sup>7</sup> - grupo tratado com 10 µmol.L <sup>-1</sup> de (MeOPhSe) <sub>2</sub> após 24 horas. ....	43
Figura 6 - Biofilme <i>C. krusei</i> 10 <sup>7</sup> - grupo tratado com 20 µmol.L <sup>-1</sup> de (MeOPhSe) <sub>2</sub> após 24 horas. ....	44
Figura 7 - Curva de cinética de crescimento em 40 horas; comparação <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> ; (MeOPhSe) <sub>2</sub> 1 µmol.L <sup>-1</sup> . ....	45
Figura 8 - Curva de cinética de crescimento em 40 horas; comparação <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> ; (MeOPhSe) <sub>2</sub> 2 µmol.L <sup>-1</sup> . ....	45
Figura 9 - Curva de cinética de crescimento em 40 horas; comparação <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> ; (MeOPhSe) <sub>2</sub> 5 µmol.L <sup>-1</sup> . ....	46
Figura 10 - Curva de cinética de crescimento em 40 horas; comparação <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> ; (MeOPhSe) <sub>2</sub> 10 µmol.L <sup>-1</sup> . ....	46
Figura 11 - Curva de cinética de crescimento em 40 horas; comparação <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> ; (MeOPhSe) <sub>2</sub> 20 µmol.L <sup>-1</sup> . ....	47
Figura 12 - Efeito do composto (MeOPhSe) <sub>2</sub> em diferentes concentrações (2, 5, 10 e 20 µmol.L <sup>-1</sup> ) na adesão de <i>C. krusei</i> sobre células HeLa.....	48
Figura 13 - Efeito do composto (MeOPhSe) <sub>2</sub> em diferentes concentrações (2, 5, 10 e 20 µmol.L <sup>-1</sup> ) na adesão de <i>C. albicans</i> sobre células HeLa.....	48
Figura 14 - Toxicidade do composto (MeOPhSe) <sub>2</sub> sobre células HeLa em diferentes concentrações (2, 5, 10 e 20 µmol.L <sup>-1</sup> ) no período de 1.5 horas.....	49
Figura 15 - Toxicidade do composto (MeOPhSe) <sub>2</sub> sobre células HeLa em diferentes concentrações (2, 5, 10 e 20 µmol.L <sup>-1</sup> ) no período de 6 horas. ....	50

Figura 16 - Toxicidade do composto (MeOPhSe) <sub>2</sub> sobre células HeLa em diferentes concentrações (2, 5, 10 e 20 µmol.L <sup>-1</sup> ) no período de 24 horas. ....	50
Figura 17 - Toxicidade do composto (MeOPhSe) <sub>2</sub> sobre células HeLa em diferentes concentrações (2, 5, 10 e 20 µmol.L <sup>-1</sup> ) no período de 48 horas. ....	51
Figura 18 - Toxicidade do composto (MeOPhSe) <sub>2</sub> sobre células Vero em diferentes concentrações (2, 5, 10 e 20 µmol.L <sup>-1</sup> ) no período de 1.5 horas. ....	51
Figura 19 - Toxicidade do composto (MeOPhSe) <sub>2</sub> sobre células Vero em diferentes concentrações (2, 5, 10 e 20 µmol.L <sup>-1</sup> ) no período de 6 horas. ....	52
Figura 20 - Toxicidade do composto (MeOPhSe) <sub>2</sub> sobre células Vero em diferentes concentrações (2, 5, 10 e 20 µmol.L <sup>-1</sup> ) no período de 6 horas. ....	52
Figura 21 - Toxicidade do composto (MeOPhSe) <sub>2</sub> sobre células Vero em diferentes concentrações (2, 5, 10 e 20 µmol.L <sup>-1</sup> ) no período de 6 horas. ....	53

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	11
2.1 FUNGOS .....	11
2.2 GÊNERO <i>Candida</i> .....	13
2.3 <i>Candida krusei</i> .....	15
2.4 INFECÇÕES .....	18
2.5 INFECÇÕES POR <i>Candida spp</i> .....	21
2.6 BIOFILME .....	25
2.7 ANTIFÚNGICOS .....	28
2.8 RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS .....	30
2.9 COMPOSTOS ORGANOCALCOGÊNIOS .....	34
2.10 SELÊNIO .....	34
2.11 p,p'-Methoxi-disseleneto de difenila (MeOPhSe) <sub>2</sub> .....	35
3 OBJETIVOS GERAIS .....	36
3.1 Objetivos específicos .....	36
4 METODOLOGIA .....	37
4.1 Organismos e condições de crescimento .....	37
4.2 Efeito do composto (MeOPhSe) <sub>2</sub> sobre o crescimento de <i>C. krusei</i> .....	37
4.3 Efeito do composto (MeOPhSe) <sub>2</sub> sobre a cinética de crescimento de <i>C. krusei</i> .....	37
4.4 Efeito do composto (MeOPhSe) <sub>2</sub> sobre a formação de biofilme por <i>C. krusei</i> .....	38
4.5 Efeito do composto (MeOPhSe) <sub>2</sub> sobre adesão de <i>C. krusei</i> sobre células HeLa .....	38
4.6 Ensaio da toxicidade do composto (MeOPhSe) <sub>2</sub> em células HeLa e Vero ..	39
4.7 Análise estatística .....	40
5 RESULTADOS .....	41
6 DISCUSSÃO .....	54
7 CONCLUSÃO .....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	59

## 1 INTRODUÇÃO

Embora haja aproximadamente 80 mil espécies de fungos catalogadas, menos de 400 são importantes do ponto de vista clínico, e aproximadamente 50 são responsáveis por cerca de 90% das infecções fúngicas, dentre eles, fungos do gênero *Candida* (BROOKS *et al.*, 2013). Estudos indicam que cerca de 30% das infecções nosocomiais são decorrentes de espécies de *Candida não-albicans* e que esse cenário vêm aumentando com o passar dos anos, decorrente da atenção voltada às espécies mais patogênicas. Sendo assim, é notável um aumento nos relatos de *C. krusei* no decorrer dos anos (FALAGAS, 2010; OLIVEIRA, 2014; CASTRO, 2016). Entretanto, segundo Pfaller e colaboradores (2014) a espécie *C. krusei* vem sendo reconhecida como um patógeno fúngico resistente a uma ampla gama de antifúngicos, sobretudo por conta da resistência ao fluconazol, o que resulta em um crescimento no número de infecções por essa espécie.

De acordo com Mohandas e Ballal (2011), a formação de biofilmes é um dos fatores com relação direta para a virulência de várias espécies de *Candida* clinicamente relevantes e grande parte desses organismos patogênicos desenvolveu uma série de fatores e meios específicos para colaborar na colonização, patogênese e invasão. Esses autores ainda citam que um outro fator importante a ser apontado, é que a capacidade da formação de biofilmes está intimamente ligada à natureza da patogenicidade, e precisa ser considerada como um dos fatores decisivos de virulência em infecções fúngicas, contribuindo para manter os fungos como patógenos e comensais, driblando os mecanismos do sistema imunológico do hospedeiro, resistindo à pressão competitiva de outras formas de vida e ao tratamento antifúngico. Entende-se que a formação de biofilmes gera problemas clínicos preocupantes por aumentar consideravelmente a resistência aos tratamentos antifúngicos e que os mecanismos de ação responsáveis por essa resistência apresentada pelos biofilmes não é totalmente conhecido, contudo uma hipótese bastante aceita para explicar essa resistência, é o fato de que a presença da matriz restringe a penetração e a ação das drogas por uma barreira de difusão (NETT *et al.*, 2011).

Situações de cirurgias, queimaduras de 2º e 3º grau, administração de antibióticos de amplo espectro e agentes imunossupressores de maneira equivocada, e períodos de grande permanência em Unidade de Tratamento Intensiva, costumam ser elencados como os maiores fatores de risco para candidíase invasiva (RICHARDSON, 2003; SPAMPINATO *et al.*, 2013). As taxas de incidência e casos de resistência de espécies de *Candida não-albicans*, salientam a importância e a necessidade de mais estudos na área, como corroborado por vários autores (OLIVEIRA *et al.*, 2014; CASTRO, 2016; PFALLER *et al.*, 2017). Assim sendo, o desenvolvimento de novas formas de terapias antifúngicas que possam agir de maneira mais eficaz, principalmente contra infecções fúngicas ligadas direta ou indiretamente a formação de biofilmes, se torna uma necessidade juntamente com o aumento de estudos que possam auxiliar na compreensão dos mecanismos de ação ligados ao biofilme fúngico.

Compostos organocalcogênicos, especialmente os que possuem selênio (Se) são comumente descritos como agentes farmacológicos potentes, devido a importância desse elemento em organismos (MORETTO *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2009). O composto utilizado neste trabalho foi o p,p'-Methoxi-disseleneto de difenila (MeOPhSe)<sub>2</sub> que é sintetizado a partir do composto disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub>, com a adição de mais dois grupos metoxila. Machado (2013) demonstrou em seu estudo que o composto (MeOPhSe)<sub>2</sub> possui capacidade de inibição superior ao (PhSe)<sub>2</sub> no crescimento de *C. albicans in vitro*, sendo assim, o presente estudo irá relatar o efeito do composto (MeOPhSe)<sub>2</sub> sobre *C. krusei*, visto que não há na literatura estudos relacionando o composto com essa espécie de *Candida*, com a intenção de elucidar algumas questões e contribuir como base para estudos futuros na área de tratamentos antifúngicos, norteados trabalhos posteriores.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 FUNGOS

Os fungos são organismos eucarióticos que evoluíram de maneira associada com os indivíduos do reino animal. Cada célula dos fungos possui pelo menos um núcleo protegido por uma membrana nuclear, organelas secretoras, mitocôndrias e retículo endoplasmático, são aeróbios obrigatoriamente ou facultativamente. Grande parte dos fungos apresentam uma rígida parede celular de longas cadeias de polissacarídeos e lipídeos. São capazes de degradar uma série de substratos orgânicos, por meio de enzimas quimiotrópicas e secretoras, de maneira passiva ou por transporte ativo (BROOKS *et al.*, 2013). Os fungos podem se desenvolver de duas formas: bolores e/ ou leveduras. Na forma de bolor, o crescimento ocorre pela produção filamentar de colônias multicelulares. Essas colônias são formadas por hifas, que são tubulações cilíndricas ramificadas, com diâmetro entre 2 e 10  $\mu\text{m}$ . Em muitos casos, essas hifas podem penetrar no substrato, e passar a absorver os certos nutrientes (BROOKS *et al.*, 2013). Já as leveduras, são células únicas, normalmente em formato elipsóide/ esférico com diâmetro entre 3 e 15  $\mu\text{m}$ . Majoritariamente, as leveduras podem se reproduzir por brotamento e algumas espécies geram botões que se alongam. O processo de brotamento desenvolve correntes de leveduras alongadas, as pseudo-hifas (KÖHLER *et al.*, 2017). Colônias de leveduras costumam ser opacas, macias, com coloração creme esbranquiçada e diâmetro variando entre 1 e 3 mm normalmente. As leveduras costumam ser identificadas por meio de testes bioquímicos e análises morfológicas, já que grande parte das leveduras possuem colônia e morfologia bastante características. Existem espécies de fungos que são dimórficas, que dependendo das condições ambientais onde se encontram, são capazes de crescer tanto como bolor quanto como levedura (KÖHLER *et al.*, 2017).

Embora superficialmente pareçam com hifas, pseudo-hifas são distintas e não podem ser confundidas; pseudo-hifas são cadeias de leveduras alongadas que retém constrições nas junções entre as adjacências, enquanto as hifas são muito parecidas com “tubos”, com lados paralelos ao longo da célula, podendo formar caminhos para a célula fúngica se espalhar (SUDBERY, 2001; DOERING *et al.*,

2017). Várias espécies de fungos possuem uma grande influência sobre animais e vegetais. Segundo Fischer (2012), os fungos possuem um elevado impacto sobre a extinção de espécies, distúrbios nos ecossistemas e na segurança alimentar. Apesar de existirem cerca de 80 mil espécies catalogadas de fungos, menos de 400 espécies são importantes do ponto de vista clínico, e aproximadamente 50 delas são responsáveis por mais de 90% das infecções fúngicas (BROOKS *et al.*, 2013; DOERING *et al.*, 2017). A ideia de que *C. krusei* poderia causar algum tipo de patologia em seres humanos foi proposta cerca de 73 anos depois da descoberta do gênero *Candida*, por Castellani (CASTELLANI, 1912). A partir daí, esse organismo geralmente foi reconhecido como um comensal em animais de sangue quente e normalmente com baixa virulência e patogenicidade (SAMARANAYAKE, 1994; KÖHLER *et al.*, 2017).

## 2.2 GÊNERO *Candida*

É fato que as infecções fúngicas já se provaram de extrema gravidade, principalmente em casos de indivíduos imunocomprometidos e/ou hospitalizados, é fato também que a área das fungemias é escassa de estudos relativos à análise e identificação clara dos patógenos, formas de tratamento, resistência às drogas, ciclo de vida, metabolismo, mecanismos de ação e qualquer dado que possa vir a contribuir com o progresso de novas drogas e protocolos para facilitar o tratamento e minimizar os danos causados por essas infecções. O gênero *Candida*, inicialmente, eram todas as espécies de leveduras que eram capazes de formar hifas e/ou pseudo-hifas e que não havia indícios de esporos sexuais observados (PAPON *et al.*, 2013). No passado o gênero *Candida* abrangia várias espécies, que eram agrupadas de acordo com suas características de reprodução. Entretanto, classificar as leveduras dessa maneira, resultou numa divisão desarranjada e inexata, onde grande parte das espécies estavam inseridas em mais de um gênero (reproduções sexuadas e assexuadas) (KUKAMOTO *et al.*, 2020). Vários estudos tentaram definir o parentesco e as relações entre *Candida sp.*, entretanto, como se trata de um grupo muito heterogêneo, as classificações sofriam com controvérsias e imprecisões (HARPF *et al.*, 2020).

As espécies de *Candida* representam, de fato, um grupo polifilético originário do subfilo *Saccharomycotina*, de acordo com análises filogenéticas mais recentes (PAPON *et al.*, 2013). Mesmo os estudos apontando que alguns nós na árvore filogenética (os clados WGD e CTG) são difíceis de compreender, os da escala do genoma Suh e colaboradores (2006), indicam que o subfilo *Saccharomycotina* abrange a classe *Saccharomycetes* e apenas uma ordem, a dos *Saccharomycetales*; ordem essa onde se encontram incluídas as famílias que englobam as espécies do gênero *Candida*. Os fungos, cujo ciclo sexual ainda não havia sido muito bem estudado, eram colocados numa “categoria de espera” nomeada *deuteromiceto* (SUH *et al.*, 2006). Muitos dos fungos classificados como *deuteromicetos*, eram fases anamórficas dos *ascomicetos* e *basidiomicetos*, e essa classificação só foi possível por meio do sequenciamento de RNAr, onde uma análise mais profunda possibilitou novas descobertas. Os esporos podem ser sexuais ou assexuais. Os esporos sexuais são gerados a partir da união de do núcleo de linhagens distintas de uma mesma espécie; já os assexuais, são formados

por hifas. Assim que esses esporos germinam, transformam-se em organismos geneticamente idênticos aos dos pais. Alguns ascomicetos, devido a essa característica, perderam essa capacidade de reprodução sexuada, e esses fungos assexuais são denominados anamorfos. (TORTORA *et al.*; 2016).

Os fungos são capazes de gerar diferentes esporos assexuais, de acordo com a espécie do indivíduo. Um dos produtos da *Candida albicans*, é o *clamidoconídio*, um esporo de paredes espessas formado pelo alargamento no interior de algumas hifas e em seus segmentos (TORTORA *et al.*; 2016). Assim sendo, quando o assunto é infecção fúngica, existe a necessidade de desenvolvimento das mais variadas formas de tratamento e prevenção, o que torna ainda mais complicado e enigmático se considerarmos as diversidades genéticas e a classificação, muitas vezes ambígua e imprecisa, desses microrganismos.

### 2.3 *Candida krusei*

Descobertas a partir de um indivíduo com tifo, as leveduras do gênero *Candida* foram descritas primeiramente por Langenbeck em 1839 (LANGENBECK, 1839), entretanto a ideia de que *C. krusei* poderia causar algum tipo de patologia em seres humanos foi proposta cerca de 73 anos depois da descoberta do gênero *Candida*, por Castellani (CASTELLANI, 1912). A partir daí, esses organismos foram classificados como comensais em animais de sangue quente e normalmente com baixa virulência (GÓMEZ-GAVIRIA *et al.*, 2020). A espécie *C. krusei* possui leveduras cilíndricas que chegam a ter 25 µm de comprimento, normalmente com formato similar a um grão de arroz, contrastante com o formato de outras espécies do gênero *Candida*; outra característica que difere de outras espécies, é a presença de reprodução sexuada (GÓMEZ-GAVIRIA *et al.*, 2020). Estudos indicam que cerca de 30% das infecções hospitalares são decorrentes de espécies de *Candida* não-albicans e que sua ocorrência vem crescendo com o passar dos anos, decorrente da atenção voltada majoritariamente às espécies mais patogênicas e mais prejudiciais para a saúde. Sendo assim, é notável um aumento nos relatos de *C. krusei* no decorrer dos anos (FALAGAS, 2010; OLIVEIRA, 2014; CASTRO, 2016; HARPF *et al.*, 2020). Douglass e seus colaboradores (2018) citam que mesmo não sendo comum na flora humana habitual, a *C. krusei* às vezes é transportada pelo intestino de indivíduos saudáveis. Nas últimas décadas, a *C. krusei* se mostrou como um patógeno hospitalar ocasional, com frequência de isolamento normalmente baixa, sendo cerca de 4% dos casos em pacientes com doenças hematológicas malignas submetidos ou não a um transplante de medula óssea (COLOMBO e GUIMARÃES, 2003; STANISZEWSKA, 2020). Segundo Pfaller e colaboradores (2014) a espécie *C. krusei* vem sendo reconhecida como um patógeno fúngico com resistência a uma ampla gama de antifúngicos, sobretudo por conta da resistência ao fluconazol e a pouca sensibilidade a anfotericina B e 5-fluorocitosina, o que resulta em um crescimento no número de infecções por *C. krusei*.

De acordo com Staniszevska (2020), o aumento nos casos de *C. krusei*, está associado principalmente com o uso profilático de fluconazol, devido a uma análise superficial da patologia. Esses pesquisadores ainda relatam que o fluconazol não possui capacidade de inibição e supressão significativa em casos de infecções por *C. krusei*, inclusive os fatores que levaram à essa colonização, infecção

sistêmica e invasão do tecido são muito mal compreendidos pelos profissionais da saúde. O polissacarídeo  $\alpha$ -Dmannose, constituinte da parede celular em espécies do gênero *Candida*, funciona como antígeno, com cadeias laterais, ramificado e é um dos responsáveis por algumas diferenças morfológicas encontradas entre as espécies de *Candida* (STAINSZEWSKA, 2020).

Segundos Mba e Nweze (2020), a parede celular da *C. krusei* consiste de: uma camada externa de materiais floculantes e irregulares, uma camada de elétrons com mais densidade, uma região granulosa, uma região com granulações menores, uma estreita e densa camada de grânulos finos e uma última camada fora da membrana celular com grânulos escassos. Essa camada mais externa de materiais floculantes costumam aparecer de maneira abundante como extensões extracelulares, principalmente no decorrer do crescimento das colônias em meio sólido (JOSHI; WHEELER; GAVIN, 1975; MBA; NWEZE, 2020). Gómez-Gaviria e seus colaboradores (2020) e Köhler e colaboradores (2017) enfatizam a preocupação com relação às espécies de *Candida não-albicans*, indicando que por vários anos praticamente todos os relatos de candidemia eram ocasionadas por *C. albicans*, porém ao longo das últimas décadas, *Candida tropicalis* se mostrou no papel de um importante patógeno (principalmente entre os pacientes com câncer) e recentemente, outras espécies de *Candida* foram reveladas sendo uma proporção maior de candidemias, e entre os patógenos emergentes mais frequentes está a *C. krusei*, especialmente entre paciente com leucemia. Esses pesquisadores ainda apontam que a *C. krusei* é particularmente resistente ao fluconazol, e grande parte das infecções motivadas por esse organismo tem relação direta com o uso desse antifúngico de maneira terapêutica ou profilática, e a grande maioria das instituições possuem pouca experiência com fungemias provocadas por essa espécie de *Candida* (KÖHLER *et al.*, 2017; GÓMEZ-GAVIRIA *et al.*, 2020). PRATES *et al.* (2008) indicam a relevância clínica da *C. krusei* e, simultaneamente com HALLEN-ADAMS & SUHR (2016), demonstram preocupação com a crescente incidência de infecções nosocomiais de *C. krusei*, principalmente em unidades de tratamento intensivo (UTIs) e entre pacientes neutropênicos, em conjunto com o prognóstico equivocado dos pacientes, enfatizam a urgência de ferramentas epidemiológicas para análise e identificação do potencial de fungemias de *C. krusei*. Em estudos realizados no Brasil, Arrua e colaboradores (2015), revelaram a importância e o crescimento das infecções fúngicas causadas por espécies *não-albicans*. Os relatos

citam que os indivíduos mais atingidos eram adultos do sexo feminino, sendo mais frequente a incidência de *C. krusei* e *C. tropicalis*. Segundo Pfaller e colaboradores (2014), a quarta espécie de *Candida* não-albicans mais comum associada a candidemia nos Estados Unidos da América (EUA) é a *C. krusei*. Além disso, o número de cepas isoladas de *C. krusei* encontradas nessas infecções aumentou muito com o tempo (PFALLER *et al.*, 2014). Sobretudo, pacientes recém operados de cirurgias muito invasivas e/ou com transplante de medula óssea e com neoplasias hematológicas mostraram-se estar em estado de maior risco de infecções por *C. krusei* (PFALLER *et al.*, 2008; STANISZEWSKA, 2020). Recentemente, Douglass e seus colaboradores (2018), mencionam que por conta de sua resistência natural ao fluconazol, a *C. krusei* se torna um preocupante patógeno pois seu mecanismo de resistência a esse antifúngico não é totalmente elucidado, porém parece haver duas possíveis causas: as bombas de efluxo de drogas (Abc1 e Abc11) são expressas, e a enzima que sintetiza o ergosterol (Erg11), tem uma afinidade atipicamente baixa para o fluconazol. A micafungina, e outras equinocandinas, são atualmente as drogas escolhidas e recomendadas para o tratamento de infecções fúngicas causadas por *C. krusei*, entretanto algumas cepas resistentes à equinocandinas foram relatadas, tendo mutações específicas no gene FKS1, trazendo a necessidade pela busca de meios alternativos para o tratamento de infecções fúngicas (DOUGLASS *et al.*, 2018; HARPF *et al.*, 2020).

## 2.4 INFECÇÕES

Durante a maior parte da vida, humanos e outras espécies convivem com diversos microrganismos a sua volta de maneira harmônica, porém devido a alterações no sistema imune e/ou concentrações de agentes patogênicos em densidades extremamente altas, infecções podem surgir e conseqüentemente causar danos ao indivíduo. Grande parte das infecções podem passar despercebidas, entretanto, os agentes causadores da infecção podem desencadear uma resposta do organismo que leva a sintomas clínicos, situação denominada de doença infecciosa. Vírus, parasitas, bactérias, fungos e protozoários são exemplos conhecidos por causar diversas doenças infecciosas, dentre elas, doenças causadas por vírus (viroses) costumam ser mais frequentes (WISPLINGHOFF, 2003). Apesar disso Wisplinghoff (2003) ressalta que as estratégias comumente utilizadas para controle de infecções bacterianas em pacientes em recuperação proporcionaram aos fungos tornarem-se agente patogênicos com maior relevância em ambiente pouco favorável para o metabolismo das bactérias. As infecções oportunistas vêm acontecendo em um número crescente de indivíduos, muito disso se dá pelo aumento nos grupos de risco, incluindo receptores de transplantes, pacientes com câncer, pacientes em tratamento de neoplasias ou indivíduos que passam por tratamento imunossupressor. Desse modo, abordagens terapêuticas cada vez mais novas e intensivas estão resultando em níveis mais extremos de imunossupressão por períodos mais prolongados. Da mesma forma, tecnologias terapêuticas mais agressivas em UTIs e o aumento no uso de técnicas invasivas, acabam por resultar no aumento da sobrevivência dos paciente, por outro lado ampliou significativamente o número de indivíduos, por maior período, dentro do grupo de risco das infecções causadas por fungos patogênicos (RICHARDSON, 2005; BEN-AMI et al., 2013).

Micoses, é como são conhecidas as infecções fúngicas, e a grande maioria dos fungos com potenciais patogênicos costumam ser exógenos e possuem a água, solo e detritos orgânicos como seu habitat natural. Candidíases e dermatofitoses, são as micoses com maior incidência relatada, são extremamente adaptados para sobreviverem no organismo humano, uma vez que estão presentes na microbiota (HALLENN-ADAMS; SUHR, 2016). As micoses costumam ser classificadas da seguinte maneira: cutâneas, superficiais, subcutâneas e sistêmicas, quando há invasão de órgãos internos. Micoses sistêmicas normalmente são causadas por

fungos endêmicos, que na maioria das vezes são patógenos primários ou por patógenos oportunistas onipresentes. Entretanto, existe uma certa sobreposição entre os grupos, já que as infecções sistêmicas também demonstram manifestações subcutâneas. Grande parte dos indivíduos que apresentam infecções oportunistas, costumam possuir doenças já presentes em seus organismos devido ao comprometimento do sistema imunológico, podendo tornar o quadro ainda mais preocupante (BLACKWELL *et al.*, 2011; BROOKS; CARROLL, 2013). As infecções fúngicas invasivas costumam ser raras no decorrer da maior fração da história da humanidade, estima-se algo próximo de 5 milhões de espécies de fungos no mundo, e os fungos passíveis de infectar humanos saudáveis fazem parte de um grupo extremamente restrito, entretanto, menos de 1 a cada 10000 representam esse risco de infecção (O'BRIEN; JACKSON; VILGALYS, 2005; BLACKWELL *et al.*, 2011). Contudo, o grande aumento no número de infecções fúngicas invasivas nas últimas duas décadas levantou um sério desafio para os pesquisadores e profissionais da saúde de todo o globo. A mortalidade de indivíduos infectados é muito grande, sendo superior a 90%, apontam alguns estudos (RICHARDSON, 2005; HARPF *et al.*, 2020). Contrapondo essas informações, as mortes ocasionadas de infecções fúngicas e os efeitos que essas infecções possuem na saúde humana, não são devidamente reconhecidas e até mesmo costumam ser ignoradas com frequência (BLACKWELL *et al.*, 2011). Segundo Brown e colaboradores (2012), a Organização Mundial da Saúde (OMS), por exemplo, não possui programas específicos voltados a infecções fúngicas, e grande parte das agências de saúde pública, com raríssimas exceções pontuais, condicionam quase nenhuma vigilância a esse tipo de infecção. Grande parte das pessoas, no decorrer de suas vidas, sofrerão algum tipo de infecção fúngica superficial que normalmente são simples de curar, entretanto milhões de pessoas ao redor do globo adquirem infecções fúngicas complicadas de curar e até mesmo de diagnosticar (BROWN *et al.*, 2012). Dentro dos 10 patógenos mais comumente encontrados em pacientes de UTI se encontram algumas leveduras (WISPLINGHOFF, 2003).

Angus e seus colaboradores (2006) mencionam que o número de sepsis graves na América Latina relatadas, por ser muito baixo, acabam contribuindo para uma escassez de dados, por outro lado alguns estudos citados pelos mesmos pesquisadores, relatam as taxas de ocorrência de sepse grave em UTIs, sendo o trato respiratório maior fonte de infecções. O estudo "Brazilian sepsis

epidemiological study- BASE study” de Silva e colaboradores (2004), revela que o índice de ocorrência de sepse grave no Brasil é de aproximadamente 27% em paciente após 24 horas de internação; e que a origem da infecção se dá por trato pulmonar ou respiratório a 65,6%. Angus *et al.* (2006) revela em seu estudo que nos achados microbiológicos de UTIs analisados, *Candida sp.* e outros fungos correspondiam a cerca de 10% dos isolados, tendo o restante com predominância de cocos gram-positivos e bacilos gram-negativos. Carvalho e seus colaboradores (2010), relatam que a causa mais frequente de óbitos em UTIs no Brasil, se deve a evolução do quadro de sepse grave para choque séptico, e que a existência de *Candida sp.* é condizente com outros estudos realizados em diferentes regiões da América. De acordo com Sales Junior *et al.* (2006), há um aumento crescente no número de infecções fúngicas no Brasil, observado e confirmado quando comparado a estudos realizados na Europa e nos Estados Unidos da América (EUA). Dentre esses estudos, Martin e seus colaboradores (2003) evidenciaram sobre a epidemiologia de sepse nos EUA no período de 1979 a 2000, onde existiu um aumento significativo da incidência na população, durante esses anos analisados, tendo os casos de sepse causadas por origem fúngica um aumento de 207% nas décadas analisadas. Este problema acompanha a humanidade há muito tempo, e alguns fungos são amplamente reconhecidos por serem agentes patogênicos à diversas espécies, não sendo exclusividade apenas de animais (FISHER *et al.*, 2012). As infecções fúngicas mais frequentes relatadas, tem como causa, espécies do fungo filamentosos *Aspergillus* e espécies do gênero *Candida* (DOERING *et al.*, 2017).

## 2.5 INFECÇÕES POR *Candida spp.*

Espécies de *Candida* costumam viver como organismos comensais (trato geniturinário, trato gastrointestinal e na flora conjuntival e oral) fazendo parte da flora comum dos seres humanos e podem ser encontradas na maioria dos indivíduos dessa maneira. Entre 20% e 80% dos adultos saudáveis possuem em seu trato gastrointestinal espécies do gênero *Candida*, e cerca de 20% a 30% das mulheres adultas possuem colonização vaginal de *Candida spp* (KUMAMOTO *et al.*, 2020). Entretanto, essas espécies de *Candida* só se tornam patogênicas no caso de uma modificação no equilíbrio da flora, ou se o sistema imunológico estiver comprometido por alguma razão. Essas infecções fúngicas, podem ser superficiais e afetar pele e/ou mucosas ou podem cair na corrente sanguínea e originar uma infecção sistêmica. Cirurgias, queimaduras de 2º e 3º grau, administração de antibióticos de amplo espectro e agentes imunossupressores, de maneira equivocada, e períodos de grande permanência em UTIs, costumam ser elencados como os maiores fatores de risco para candidíase invasiva (RICHARDSON, 2003; SPAMPINATO *et al.*, 2013; HALLENN-ADAMS; SUHR, 2016; KUMAMOTO *et al.*, 2020). Devido ao número restrito de antifúngicos eficientes, o crescente número de infecções fúngicas por *Candida*, pode ser decorrente do aumento de indivíduos em situação de risco; pacientes transplantados, indivíduos submetidos a tratamentos imunossupressores e neoplasias malignas, representam uma boa parcela desse grupo de risco em ascensão, salientando cada vez mais a necessidade de agentes melhores e inovadores que visem os processos biológicos fundamentais e/ou determinantes patogênicos (NAGLIK *et al.* 2003; RICHARDSON, 2005; CAMPOY; ADRIO, 2017). Quimioterapia antineoplásica, hemodiálise, nutrição parenteral, transplante de órgão e catéteres venosos centrais, são grandes avanços que contribuem para o aumento de sobrevida e melhora no tratamento de pacientes, entretanto esses métodos podem contribuir para uma possível invasão e colonização fúngica. Além da *Candida albicans*, outras espécies encontradas em indivíduos saudáveis incluem *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* (HALLENN-ADAMS; SUHR, 2016). Essas espécies citadas acima, são responsáveis por mais de 90% das infecções fúngicas invasivas, a pesar de que a espécie predominante pode variar de acordo com a localização geográfica, da população e

dos locais clínicos do paciente (MICELI, 2011; PFALLER *et al.*, 2011; MIKULSKA *et al.* 2012; MACCALLUM, 2012).

De acordo com Wisplinghoff e colaboradores (2004), a infecção sanguínea causada por *Candida sp.* (candidemia), é comumente citada como sendo a quarta infecção sanguínea mais comum nos EUA, e vem se tornando uma complicação crescente para profissionais atuantes em hospitais de cuidados terciários ao redor do globo. Além de causar sepse tardia, os fatores de risco incluem: Permanência em unidade de Tratamento Intensivo por mais de 72 horas, terapia antibiótica de amplo espectro, terapia imunossupressoras, procedimentos invasivos e nutrição parenteral. Magil e colaboradores (2014) realizaram um estudo analisando 183 centros médicos dos EUA e classificaram as infecções fúngicas por *Candida sp.* como sendo a causa mais frequente de infecções sanguíneas. Estudos realizados com diversas populações, indicam que a taxa de ocorrência de candidemias pode variar entre 2 e 14 casos a cada 100 mil indivíduos (ARENDRUP *et al.*, 2010; CLEVELAND *et al.*, 2015). Um dos maiores desafios para hospitais terciários no mundo todo, é a candidemia (infecção na corrente sanguínea causada por *Candida sp.*) por conta de sua alta taxa de mortalidade em curtos períodos; nos hospitais públicos terciários brasileiros, aproximadamente 2,5 casos a cada 1000 internações sofrem com candidemias (COLOMBO *et al.*, 2013).

Mesmo com avanços no tratamento médico de pacientes em estado crítico, a candidemia se mostra como um grande desafio, uma vez que é de difícil diagnóstico, leva a hospitalização por longos períodos e possui mortalidade acima de 50%, e sua ocorrência costuma variar de região para região, sem falar no fator financeiro que costuma ser uma barreira para os sistemas de saúde. Nota-se que apesar de *C. albicans* ainda ser considerada como o principal patógeno ligado a candidemia, as infecções fúngicas por espécies de *Candida* não-*albicans* estão em ascensão na maioria das regiões, apesar de haver relatos de taxas em declínio em algumas áreas após inserção de melhorias no gerenciamento de doenças e na higiene (NUCCI *et al.*, 2013; WILLE *et al.*, 2013; BASSETTI *et al.*, 2014; COLOMBO *et al.*, 2014; GRADEL *et al.*, 2014; LORTHOLARY *et al.*, 2014; MAGILL *et al.*, 2014; CLEVELAND *et al.*, 2015; DOI *et al.*, 2016; CASTRO, 2016). De acordo com Silva e colaboradores (2002) houve um breve aumento no número das espécies de *Candida* não-*albicans* entre os anos de 1984, 1990 e 1997; sendo as principais espécies de maior interesse: *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. parapsilosis*

e *C. tropicalis*. No ano de 1963, eram conhecidas apenas cinco espécies de *Candida* com potencial patogênico em humanos, sendo elas: *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea* e *C. tropicalis*, entretanto, no ano de 2003 já estavam catalogadas cerca de 17 espécies de *Candida* como agentes causais de algum tipo de infecção fúngica superficial ou invasiva em humanos (COLOMBO e GUIMARÃES, 2003). Houve um aumento significativo no número de casos de infecções nosocomiais de espécies não-albicans no decorrer dos anos, principalmente em 2009 e 2010 (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Segundo Pfaller e seus colaboradores (2017), as espécies de *Candida* de maior interesse clínico são: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, sendo no trato respiratório o local onde majoritariamente ocorre o maior número de infecções, além da colonização do trato intestinal (inicialmente inofensiva), superfícies mucosas e pele (RICHARDSON, 2005; BEN-AMI *et al.*, 2013), podendo ser facilitada por diversos processos fisiológicos, patológicos e/ou traumáticos, expandindo para imunossupressão por inúmeras causas, como desnutrição, neutropenia e quimioterapia antineoplásica (MALUCHE *et al.* 2008; HALLEN-ADAMS; SUHR, 2016). KAUR *et al.* (2016) descreve sobre espécies de *Candida* não-albicans, emergentes, e como essas espécies são resistentes aos antifúngicos comumente utilizados em UTIs; indicando que dentre as amostras identificadas, 36,7% dos casos de colonização por *Candida*, eram de *C. albicans* e 63,3%, de espécies não-albicans. Ainda nesse estudo, é retratado que há predominância de *C. albicans* na urina, traqueia, cateteres, drenagens endotraqueais e abdominais, sendo na urina, a predominância das espécies não-albicans de *Candida* (KAUR *et al.*, 2016). Outras pesquisas (ERNST *et al.*, 2000; WISSING *et al.*, 2013) deixam claro que a maior parte dos pacientes (cerca de 77%) tinham um ou mais fatores de risco durante o diagnóstico de candidíase. Dentre os elementos de risco mais comuns nesses pacientes, dispositivos residenciais lidera o ranking em 98% dos casos, seguido de terapias antibióticas prolongadas (64%), cirurgias (58%), estadia maior que uma semana em hospitais (42%), uso de imunossupressores (36%), diabetes mellitus (32%), envolvimento do sistema de órgãos múltiplos (30%), trauma e peritonite (18%), pneumonia (16%), tuberculose (14%), tabagismo (12%), cirurgias prévias, comprometimento neurológico e malignidade (10% cada), insuficiência renal (6%) e por fim doenças cardíacas (4%). Além do mais, a susceptibilidade antifúngica apontou que

aproximadamente 7,8% dos isolados possuíam resistência à anfotericina B, e 37,8% ao fluconazol (WISSING *et al.*, 2013; GÓMEZ-GAVIRIA *et al.*, 2020). Esse mesmo estudo compreende a questão da resistência aos antifúngicos, sendo a *C. krusei* 100% resistente a esse fármaco por conta de sua resistência peculiar aos azóis e pouquíssima sensibilidade a outros antifúngicos, como anfotericina B, por exemplo (GÓMEZ-GAVIRIA *et al.*, 2020).

## 2.6 BIOFILME

Quando fixado a um substrato inerte com nutrição adequada e se não houver perturbação, as células fúngicas se multiplicam e colonizam a superfície formando finas camadas. Biofilme é uma comunidade de microrganismos e todos as matrizes extracelulares fixados em uma superfície (PFALLER, 1996). Normalmente, o desenvolvimento de um biofilme possui quatro etapas: a adesão do microrganismo a superfície abiótica ou biótica (primeira etapa), a formação de pequenas colônias e organização celular (segunda etapa), secreção de matriz extracelular de polissacarídeos e maturação em uma estrutura disposta de maneira tridimensional (terceira etapa), e por fim, a disseminação de células do biofilme (quarta etapa) (CHANDRA, 2001; SENEVIRATNE; JIN; SAMARANAYAKE, 2008). De acordo com Ramage (2009), os biofilmes são capazes de fornecerem um ambiente firme e preservado para as células fúngicas e comumente atuam como receptáculos para fontes infecciosas. O primeiro biofilme a ser estudado foi um biofilme de uma placa dentária, porém há suposições de que uma proporção significativa de infecções humanas possui ligação com biofilmes (POTERA, 1999). Grande parte das infecções sistêmicas estão ligadas direta ou indiretamente a implantes, visto que diversas populações microbianas aderentes são encontradas na superfície de cateteres, próteses, válvulas cardíacas e substituições articulares (DONLAN, 2001). De acordo com Mohandas e Ballal (2011) e Mba & Nweze (2020), a formação de biofilmes é um dos fatores com relação direta para a virulência de várias espécies de *Candida* clinicamente relevantes e grande parte desses organismos patogênicos desenvolveu uma série de fatores e meios específicos para colaborar na colonização, patogênese e invasão. Esses autores ainda comentam que um outro fator importante a ser considerado, é que a capacidade da formação de biofilmes está intimamente ligada à natureza da patogenicidade, e precisa ser considerada como um dos fatores decisivos de virulência durante as infecções fúngicas, auxiliando a manter o papel dos fungos como patógenos e comensais, driblando os mecanismos do sistema imunológico do hospedeiro, resistindo à pressão competitiva de outras formas de vida e ao tratamento antifúngico. Os mecanismos utilizados pelos microrganismos para associados ao biofilme para causar doenças em humanos ainda são mal compreendidos, mas há a ideia de que sigam a algumas etapas: (1°) Liberação de células ou agregados dos biofilmes de

dispositivos médicos, acarretando em possíveis infecções sanguíneas e urinárias, (2°) produção de endotoxinas, (3°) resistência aos mecanismos do sistema imunológico do hospedeiro e (4°) fornecimento de um espaço para gerar organismos resistentes (DONLAN; COSTERTON, 2002). Donlan e Costerton (2002) também citam que, dentre os atributos fisiológicos desses microrganismos, há o fato dos biofilmes apresentarem características como taxa de crescimento alterada, fora a capacidade de transcrever genes que organismos planctônicos normalmente não fazem. Muitos estudos examinaram alguns dos mecanismos envolvidos na resistência ao biofilme de *Candida spp.*, mostrando que os componentes da matriz extracelular é considerado o mecanismo mais importante para a resistência de um biofilme (MOHANDAS e BALLAL, 2011; SILVA *et al.*, 2017; MBA; NWEZE., 2020). Contudo, diversos mecanismos importantes, como a densidade de células fúngicas, a regulação e ajustes das bombas de efluxo de fármacos no desenvolvimento do biofilme, a presença de células permanentes nos biofilmes, a regulação diferencial dos fármacos e seus alvos, a regulação de diferentes maneiras e mecanismos ainda não bem definidos atuam ainda mais aumentando a resistência de maneira muito superior ao esperado (SILVA *et al.*, 2017). Um estudo realizado por Pierce (2017) mostra que apesar da resistência ao biofilme seja multifatorial, um contribuinte importante para o aumento dos níveis de resistência exibido por biofilmes é a proteção que a matriz extracelular exerce, e a correlação entre a quantidade de matriz e os níveis de resistência contra antifúngicos. O fenômeno mais importante, clinicamente, das células do biofilme de *Candida*, é sua resistência aos agentes antifúngicos, e que quando em meio ao biofilme, essas mesmas células podem sobreviver por períodos prolongados mesmo em contato com concentrações mais elevadas de antifúngicos quando comparados com células planctônicas (PAPPAS *et al.*, 2009), e visto que grande parte dos agentes antifúngicos geralmente são ineficazes contra biofilmes, a terapia mais indicada para casos de infecções por biofilme de *Candida* de algum dispositivo médico, inclui a retirada de tal dispositivo, diminuindo parte da dificuldade com o tratamento e reduzindo possíveis gastos com cuidados de saúde (PAPPAS *et al.*, 2009; NETT *et al.*, 2011; KUMAMOTO *et al.*, 2020).

Entende-se que a formação de biofilmes gera problemas clínicos preocupantes por aumentar consideravelmente a resistência aos tratamentos antifúngicos e que os mecanismos de ação responsáveis por essa resistência

apresentada pelos biofilmes não são totalmente conhecidos. Contudo uma hipótese bastante aceita para explicar essa resistência, é o fato de que a presença da matriz restringe a penetração e a ação das drogas por uma barreira de difusão (NETT *et al.*, 2011); logo, somente as camadas mais externas, superficiais, estão em contato direto com doses realmente efetivas e letais desses agentes microbianos. As células planctônicas costumam depender de fatores genéticos irreversíveis para garantir um fenótipo resistente, sendo que os biofilmes conseguem resistir e perseverar por causa de sua disposição física e a densidade populacional da colônia, fornecendo um fenótipo resistente sem depender das alterações genéticas (RAMAGE *et al.*, 2012). Embora a *C. krusei* apresente a capacidade elevada de produzir um biofilme mais espesso e com diversas camadas de pseudo-hifas, agregadas à uma matriz de polímeros biológicos maior que de outras espécies (PANNANUSORN; FERNANDEZ; RÖMLING, 2013) essa adesão não acontece de maneira tão habitual assim em tecidos biológicos, diferente de outras espécies de *Candida*, que possuem essa afinidade maior com tais superfícies. Os trabalhos com *C. krusei* indicam que essa espécie possui menor virulência se comparado a outras espécies patogênicas de *Candida*, como *C. albicans*, embora apresente uma resistência intrínseca a alguns agentes antifúngicos (SAMARANAYAKE, 1994; HARPF *et al.*, 2020). Espécies como *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* possuem uma boa capacidade de formar biofilmes em superfícies de poliestireno sob condições anaeróbicas e aeróbicas, segundo dados comparativos entre as espécies (HAWSER; DOUGLAS, 1994; THEIN; SAMARANAYAKE, 2007), e as taxas de incidência e casos de resistência de espécies de *Candida* não-albicans, salientam a importância e a necessidade de mais estudos na área, como corroborado por vários autores (COLOMBO e GUIMARÃES, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2014; CASTRO, 2016; PFALLER *et al.*, 2017; HARPF *et al.*, 2020). Assim sendo, o desenvolvimento de novas formas de terapias antifúngicas que possam agir de maneira mais eficaz, principalmente contra infecções fúngicas ligadas direta ou indiretamente a formação de biofilmes, se torna uma necessidade juntamente com o aumento de estudos que possam auxiliar na compreensão dos mecanismos de ação ligados ao biofilme fúngico.

## 2.7 ANTIFÚNGICOS

Apesar da maior parte dessas infecções afetarem seriamente indivíduos com o sistema imunológico comprometido (por diversos motivos), pacientes com o sistema imune intacto também podem sofrer graves consequências. No caso de pacientes com o sistema imunológico comprometido, essa função imune do organismo não consegue realizar suas funções de maneira efetiva e auxiliar o término da infecção, então o tratamento passa a depender unicamente da eficácia dos antifúngicos (CAMPOY; ADRIO, 2017). Se compararmos com drogas antibacterianas, o número de agentes antifúngicos é limitado, e de eficiência mais baixa, com a criação de apenas uma nova classe de antifúngicos ao longo de 30 anos, as equinocandinas em 2002 (BRUTTS; KRYSAN, 2012). Observando a história das infecções hospitalares, é possível notar um predomínio de fungos do gênero *Candida* como agente patogênico causal. *Candida Albicans* sempre foi a espécie mais recorrente nos casos de infecções fúngicas hospitalares, cerca de 80 a 90 % das ocorrências (PFALLER *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2016). Entretanto, devido a emergência de outras espécies do gênero *Candida* como *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, por exemplo. A taxa de *C. albicans* em isolados vem diminuindo, apontando uma possível tendência causal das candidíases invasivas (DIEKEMA *et al.*, 2002; HIL *et al.*, 2015). Essa mudança na causa das infecções fúngicas invasivas pode ser consequência da maior vulnerabilidade de *Candida albicans* aos antifúngicos utilizados mais comumente, se comparada às espécies de *Candida* não-albicans, que mesmo com menor virulência, são menos vulneráveis aos antifúngicos convencionais (MARIO *et al.*, 2012; NUCCI *et al.*, 2013; DAGI *et al.*, 2016). O estudo de Mathew e Nath (2009), menciona que existem diversos agentes antimicóticos conhecidos, entretanto pacientes com quadros mais graves, com comorbidades e imunossuprimidos ainda permanecem difíceis de tratar, sendo as principais razões o diagnóstico tardio/equivocado, a toxicidade de drogas, a resistência aos antifúngicos e a biodisponibilidade dos fármacos. As interações com corticoides, estatinas e outras drogas, limitam muito o uso dos triazóis, tendo a necessidade de monitoramento do fármaco para evitar essas interações e possíveis toxicidades (DENNING; HOPE, 2010). ODDS *et al.* (2003) retratam em sua pesquisa, uma grande diversidade de alvos antifúngicos já existentes, entretanto, a maioria das classes de antifúngicos

focam, direta ou indiretamente, na parede e na membrana plasmática, esterol, ergosterol e sua biossíntese, sendo assim, a ação dessas drogas em outras localidades da célula, pode ser vista como um grande avanço para o desenvolvimento de tratamentos cada vez mais eficazes. Posaconazol, ravuconazol e voriconazol, são fármacos do grupo químico dos triazóis, um subconjunto dos azóis, classe antifúngica que mais se provou efetiva desde a década de 1960 no uso clínico. Já a anidulafungina, a caspofungina e a micafungina, são equinocandinas (sucessores da cilofungina, que fora descontinuada nos anos 80) (CAMPOY; ADRIO, 2017). As equinocandinas, diferentemente dos azóis, agem inibindo a ação de síntese de b-1,3-glucano da célula fúngica, se tratando de drogas utilizadas na clínica, esse é o primeiro alvo novo, em 2 décadas, desde a descoberta dos fármacos antifúngicos. Devido ao número limitado de classes de drogas antifúngicas, as opções de tratamento acabam se limitando (BENITEZ; CARVER, 2019). Segundo o relatório mundial de vigilância da resistência antimicrobiana da OMS, atualmente, só são utilizadas para tratamento de infecções fúngicas invasivas, três classes de antifúngicos (azóis, equinocandinas e polienos) (WHO, 2012), entretanto, alguns autores (GROLL *et al.*, 1998; DENNING; HOPE, 2010; BROWN *et al.*, 2012; KATHIRAVAN *et al.*, 2012; COWEN *et al.*, 2015) denotam que as cinco principais classes de antifúngicos são os azóis, polienos, alilaminas, flucitosina e equinocandinas. Azóis e alilaminas (inibem a biossíntese do ergosterol), polienos (criam poros na membrana plasmática quando se ligam ao ergosterol, danificando o metabolismo da célula), flucitosina (atuam na inibição de pirimidina e na síntese do DNA) e equinocandinas (inibem a síntese do b-1,3-glucano da parede celular) (DENNING; HOPE, 2010; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2015; COWEN *et al.*, 2015). Em seu estudo, MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER (2015) ressaltaram o índice de resistência, das espécies de *Candida* aos agentes antifúngicos sistemicamente ativos, sendo *C. krusei*, a mais resistente a maioria dos antifúngicos evidenciando ainda mais a necessidade da busca por novos tratamentos.

## 2.8 RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS

De acordo com REX e seus colaboradores (1997), o termo resistência é utilizado para descrever uma não sensibilidade de um certo microrganismo a um medicamento ou droga antimicrobiana. Castro *et al.* (2006) aponta que a resistência aos antifúngicos deriva de um processo de seleção natural. As infecções mais passíveis de sofrer a ação dos antifúngicos vão progressivamente sendo substituídas por infecções provenientes de cepas mais resistentes, entre as espécies de *Candida*, *C. albicans* é a mais suscetível, contrapondo a espécie mais resistente *C. krusei*. A resistência microbiológica é a não vulnerabilidade de um organismo a um agente antifúngico, mediante um teste de suscetibilidade *in vitro*, onde a concentração inibitória mínima do fármaco ultrapassa o ponto de ruptura de suscetibilidade para o organismo (BENITEZ; CARVER, 2019). Essa resistência pode se dar de duas maneiras: intrínseca (primária) ou adquirida (secundária). A resistência de *C. krusei* ao fluconazol e a de *Cryptococcus neoformans* as equinocandinas, são exemplos claros de resistência intrínseca, onde o organismo não necessita da exposição à droga para ser resistente, o que salienta muito a necessidade de identificação de espécies para melhora no tratamento. Já a resistência adquirida, desenvolve-se a partir de cepas que anteriormente eram suscetíveis às drogas, e com a alteração na expressão de certos genes conseguiram propagação dos organismos mais resistentes, um exemplo de resistência adquirida, são algumas cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol e outros antifúngicos que normalmente causariam danos a esses fungos. Quando uma infecção se mantém forte, mesmo em tratamento com antifúngicos de eficácia comprovada *in vitro*, estamos diante de uma resistência clínica (ALVES *et al.* 1997; MARICHAL *et al.*, 1999; SANGLARD e ODDS, 2002; KANAFANI e PERFECT, 2008). Alguns estudos concluem que anfotericina-B, caspofungina e fluconazol têm eficácia similar no tratamento de infecções fúngicas na corrente sanguínea por espécies de *Candida*, entretanto, com o aumento de cepas com grande resistência a esses fármacos, por exemplo *C. krusei*, evidenciam cada vez mais a necessidade de atenção e inovação no tratamento inicial (CAMPOY; ADRIO, 2017). Conforme as diretrizes recentes, muitos especialistas favorecem e indicam anfotericina-B como preferência no tratamento inicial em pacientes clinicamente instáveis ou severamente adoecidos, entretanto se tratando das complicações como a

resistência aos azóis, um período breve com anfotericina-B seguido do tratamento com fluconazol, sendo o isolado hipoteticamente suscetível, se tornou uma conduta clínica habitual. O tratamento de candidemia é conduzido pelo equilíbrio entre o risco de resistência ao fluconazol e a atividade de anfotericina-B contra os colaterais tóxicos, como insuficiência renal, associados ao uso da anfotericina-B como forma de tratamento (KULLBERG, B. J. *et al.*, 2005; CAMPOY; ADRIO, 2017; BENITEZ; CARVER, 2019). Quando *in vitro*, as equinocandinas demonstram uma boa atividade com *C. krusei*, que na clínica costuma ser tratada com altas concentrações de voriconazol. Mesmo assim, a resistência de *C. krusei* ao voriconazol e às equinocandinas vêm sendo relatado com uma certa frequência por diversos autores, uma vez que essa espécie de *Candida* manifesta uma possível adaptação para o desenvolvimento de resistência a antifúngicos, esse fato aumenta ainda mais a necessidade do monitoramento com relação a essa espécie (BARBEDO e SGARBI, 2010). Segundo Wingard (1995), ocorreu um aumento da incidência de fungemias causadas por *Candida krusei* em pacientes neutropênicos que foram expostos ao fluconazol por período prolongado. *C. krusei* se mostra mais sensível à anfotericina-B do que ao cetoconazol, itraconazol e fluconazol (CROCCO *et al.*, 2004). Segundo Ellis (2002), quando há diminuição ou alteração na membrana plasmática, no ergosterol ou alguma modificação no lipídio alvo constituinte da célula fúngica, pode haver uma queda na capacidade de ligação da anfotericina-B, ocasionando uma, rara, resistência a esse antifúngico. Assim sendo, algumas células podem sofrer uma mutação em sua via da biossíntese do ergosterol, passando a produzir algum composto similar, composto esse que possui afinidade de ligação reduzida à anfotericina-B (ELLIS, 2002). *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* são espécies suscetíveis à anfotericina-B, fluconazol e itraconazol pelo padrão geral (M27-A NCCLS), porém, espécies como *C. glabrata* e principalmente *C. krusei*, podem apresentar resistência a essas drogas (REX, 2000). De acordo com Sanglard e Odds (2002) e Pfaller e seus colaboradores (2011), cepas de *Candida krusei* são resistentes a fluconazol ou necessitam de dosagens muito maiores de azóis para obter o sucesso da terapia. Dessa forma, entende-se que dosagens maiores de anfotericina-B necessitem de ser administradas na clínica terapêutica em casos de infecções invasivas por *C. krusei*.

No estudo de Kaur *et al.* (2016) foi realizado um teste de resistência antifúngica, onde 37,8% das cepas de *Candida* apresentaram resistência ao

fluconazol. Desses isolados que apresentaram resistência, 35,3% eram *C. albicans* e os 64,7% restantes era espécies de *Candida não-albicans*, sendo *C. tropicalis* (68,2%), *C. krusei* e *C. glabrata* (13,6% cada) e *C. parapsilosis* (4,5%). Entretanto, somente 7,8% das cepas isoladas de *Candida* apresentaram alguma resistência à anfotericina-B, sendo que desses 7,8% com resistência, 71,4% eram de espécies de *Candida não-albicans*, com 40% de *C. krusei* (CAMPOY; ADRIO, 2017; BENITEZ; CARVER, 2019). Carrillo Muñoz *et al.* (1997) realizaram um estudo onde fora testado *in vitro* a vulnerabilidade, de 181 cepas de *Candida sp.* isoladas a partir da urina de 200 pacientes internados, aos antifúngicos e puderam concluir que todas as espécies analisadas (que foram encontradas nessas amostras), apresentaram sensibilidade à anfotericina-B. Conforme indicado por Lacaz e colaboradores (2002), apesar da eficácia no tratamento de candidose, a anfotericina-B gera efeitos colaterais agudos, como febre, náuseas e calafrios, e efeitos colaterais crônicos, sendo a nefrotoxicidade o efeito mais preocupante (BENITEZ; CARVER, 2019). Atualmente, é de conhecimento clínico e acadêmico inúmeros agentes antifúngicos, entretanto, indivíduos severamente afetados e/ou suscetíveis por alguma razão (tratamento de neoplasias, baixa de neutrófilos, sistema imunológico drasticamente comprometido), permanecem difíceis de tratar; as razões que mais aumenta essa dificuldade incluem a toxicidade dos fármacos, o diagnóstico demorado e/ou equivocado, o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos, a falta de formulações orais ou intravenosas e a biodisponibilidade dos fármacos (BENITEZ; CARVER, 2019). Apesar do problema da toxicidade ter sido salientado e abordado no desenvolvimento de agentes antifúngicos de amplo espectro, a resistência das células fúngicas continua sendo um desafio aos pesquisadores; mesmo com os avanços na medicina, o tratamento de grande parte das doenças causadas por fungos está longe de ser considerado satisfatório (MATHEW e NATH, 2009). Quadros de resistência ocorrem principalmente com fluconazol, mas vem ocorrendo com outros fármacos, como a anfotericina-B por exemplo, indicando a necessidade de pesquisas constantes relacionadas ao tratamento de infecções fúngicas (ERNST, 2000; WISSING *et al.* 2013). A resistência microbiana pode ser ocasionada por diversos fatores, sendo eles: uso indevido e/ou abusivo (com ou sem prescrição médica) de agentes antimicrobianos, aumento nas taxas de transmissão de microrganismos entre as localidades devido às viagens e contato entre povos, crescimento de pobreza em países de terceiro mundo e desenvolvimento de

mecanismos de adaptação em células microbianas (MARTÍNEZ, 2009). Diante dessa situação, estudos indicam que a resistência aos agentes microbianos por parte de alguns organismos, além de prejudicar o indivíduo em tratamento, também prejudica todo o ambiente onde ele está inserido, tendo como exemplo infecções hospitalares e surtos localizados de doenças microbianas (LEVY, 2005; LIVERMORE, 2005; MARTÍNEZ, 2009). Com a finalidade de aumentar a eficiência no combate às doenças fúngicas, uma boa opção como tratamento pode ser a utilização de compostos alternativos que possam apresentar atividade antifúngica.

## 2.9 COMPOSTOS ORGANOCALCOGÊNIOS

Os compostos organocalcogênios são compostos não-metálicos sintéticos que possuem em sua composição átomos de calcogênio (elementos do grupo ou família 16 da tabela periódica, Oxigênio [O], Telúrio [Te], Enxofre [S], Selênio [Se], Polônio [Po] e Livermório [Lv]), por conta de suas propriedades biológicas esses compostos são importantes alvos de estudos toxicológicos em organismos, e vem gerando grandes resultados terapêuticos no cenário médico atual pelo fato de alguns desses elementos possuírem muita importância no organismo, e também por sua predisposição como agentes antitumorais (PETROGNANI; RODRIGUES; COMASSETTO, 1976; FISCHER, 2001; IBRAHIM *et al.*, 2012). Compostos organocalcogênios, especialmente os que possuem selênio são comumente descritos como agentes farmacológicos potentes (MORETTO *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2009).

## 2.10 SELÊNIO

O selênio (Se) foi descoberto pelo químico sueco J.J. Berzelius, no ano de 1817, e esse calcogênio apresenta-se em quatro estados de oxidação: selenato ( $\text{Se}^{+6}$ ), selenito ( $\text{Se}^{+4}$ ), selênio elementar ( $\text{Se}^0$ ) e seleneto ( $\text{Se}^{-2}$ ). Inclusive, o Se é um elemento presente como componente na estrutura de várias enzimas com propriedades antioxidantes, e por estar envolvido em diversas funções fisiológicas, a suplementação de Se é aceita e recomendada por profissionais da área. A Junta de Alimentação e Nutrição da Academia de Ciências dos Estados Unidos sugere uma ingestão diária entre 50  $\mu\text{g}$  e 200  $\mu\text{g}$  de Se, sua absorção acontece no trato gastrointestinal, principalmente no duodeno, seguido pelo jejuno e depois íleo, podendo ser absorvido, bem como, pelos tecidos cutâneos ou por inalação, podendo caracterizar uma possível intoxicação, dependendo da exposição (FLOHÉ; 1976; FOOD AND NUTRITIONAL BOARD, 1989; MULLERMANN, 1999; OLSZEWE, 2002; SANTOS *et al.*, 2009; JUNG e SEO, 2010). O interesse no desenvolvimento de compostos organocalcogênios contendo selênio em sua composição vem crescendo cada vez mais, uma vez que esses compostos possuem características antioxidantes, antitumorais, antimicrobianas e indutores de citocinas imunomoduladoras do sistema nervoso central (MACHADO *et al.*, 2009). O selênio é

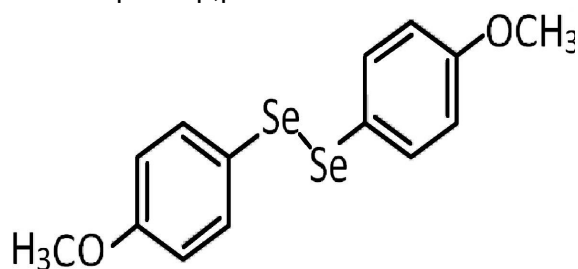
um elemento-traço essencial, componente de várias enzimas com ação antioxidante, em especial das isoformas da glutathiona peroxidase e do sistema tioredoxina redutase (FLOHÉ *et al.*, 1973; ENGMAN *et al.*, 1997). Esses sistemas possuem importantes papéis na defesa celular do organismo, preservando-o contra processos oxidativos (detoxificação de hidroperóxidos de hidrogênio ou lipídicos) e apresentam também características envolvidas na defesa contra peroxinitritos (SIES e ARTEEL, 2000; KLOTZ e SIES, 2003).

### 2.11 p,p'-Methoxi-disseleneto de difenila (MeOPhSe)<sub>2</sub>

O composto organocalcogênio p,p'-Methoxi-disseleneto de difenila (MeOPhSe)<sub>2</sub> (Figura 1) é sintetizado a partir do composto disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub>, com a adição de mais dois grupos metoxila. Esse composto demonstrou alta eficácia com efeitos antinociceptivos (analgésico) em testes com ratos, por meio de mecanismos de interação com o sistema nitrérgico (JESSE *et al.*, 2009), e apresentou efetividade na proteção de neurônios, quando submetidos a estresse oxidativo, em ratos e camundongos (PINTON *et al.*, 2013). Com relação aos fungos, MACHADO (2013) demonstrou em seu estudo que o composto (MeOPhSe)<sub>2</sub> possui capacidade de inibição superior ao (PhSe)<sub>2</sub> no crescimento de *Candida albicans in vitro*.

Rosseti *et al* (2010) demonstraram que o composto (MeOPhSe)<sub>2</sub> possui uma capacidade de inibir a formação de tubos germinativos e a capacidade de crescimento de *C. albicans in vitro*. Segundo Amorim e colaboradores (2018), o (MeOPhSe)<sub>2</sub> apresentou a capacidade de inibição de formação e a viabilidade de biofilmes de *C. albicans* em diferentes fases de desenvolvimento, corroborando com Rosseti e colaboradores (2010) quando classificam o composto (MeOPhSe)<sub>2</sub> como um promissor agente antifúngico.

Figura 1 - Estrutura do composto p,p'-Methoxi-disseleneto de difenila (MeOPhSe)<sub>2</sub>



Fonte: Próprio Autor

### 3 OBJETIVOS GERAIS

Esse trabalho teve como seu objetivo principal estudar o efeito do composto organocalcogênio p,p'-Methoxi-disseleneto de difenila (MeOPhSe)<sub>2</sub> sobre *Candida krusei*, tendo alguns objetivos específicos estabelecidos para melhora do desenvolvimento do projeto.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Estudar o efeito do composto (MeOPhSe)<sub>2</sub> sobre a cinética de crescimento da *C. krusei* e comparar os resultados com *C. albicans*.
- Estudar o efeito do composto (MeOPhSe)<sub>2</sub> sobre o crescimento de *C. krusei*.
- Estudar o efeito do composto (MeOPhSe)<sub>2</sub> sobre a formação de biofilme.
- Analisar a adesão da *C. krusei* após o tratamento com (MeOPhSe)<sub>2</sub> e comparar os resultados com *C. albicans*.
- Analisar a toxicidade do composto (MeOPhSe)<sub>2</sub> em células HeLa e Vero.

## 4 METODOLOGIA

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica Aplicada a Engenharia Biomédica, no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D), da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP).

### 4.1 Organismos e condições de crescimento

Para as condições de crescimento as culturas de *C. krusei* (ATCC 6258) foram semeadas em placas de petri contendo ágar Sabouraud dextrose (Merck) e posteriormente incubadas em estufa microbiológica com ar atmosférico (37 °C). Após 48 horas, foram retiradas amostras das colônias formadas para ressuspensão em solução fisiológica estéril (0,95% NaCl) e com densidade celular determinada em câmara de Neubauer na presença do corante vital azul de metileno.

### 4.2 Efeito do composto (MeOPhSe)<sub>2</sub> sobre o crescimento de *C. krusei*

Os ensaios foram realizados primeiramente preparando células de *C. krusei* em suspensão nas seguintes densidades celulares: 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> células viáveis/mL. Em seguida foram aliqüotados 970 µL de caldo Sabouraud dextrose em placas de microtitulação (24 “wells”), na sequência, adicionou-se DMSO 1 % (grupo controle) e 10 µL de cada concentração (0,5; 1; 2; 5; 10 e 20 µmol.L<sup>-1</sup>) de (MeOPhSe)<sub>2</sub> nos grupos de suas respectivas concentrações, finalizando com 20 µL da suspensão de células em cada grupo. As placas foram incubadas por aproximadamente 18 horas em estufa microbiológica em ar atmosférico (37 °C) e após esse período de incubação, a leitura do experimento foi analisada no leitor de microplacas Synergy HT Multi-Detection (Bio-Tek, Winooski, VT EUA) com absorbância determinada em 570 nm (OD<sub>570</sub>).

### 4.3 Efeito do composto (MeOPhSe)<sub>2</sub> sobre a cinética de crescimento de *C. krusei*

Foram preparadas as suspensões de *C. krusei* (10<sup>5</sup> células viáveis/mL) e posteriormente utilizou-se as concentrações de 1; 2; 5; 10 e 20 µmol.L<sup>-1</sup> do

composto (MeOPhSe)<sub>2</sub> em tubos de ensaio com caldo Sabouraud dextrose, obtendo volume final de 8 mL. No grupo controle se fez o uso de, além da suspensão celular, DMSO (solvente do composto, presente em todas as concentrações) com a concentração final de 1%. Em seguida todos os experimentos foram incubados em estufa microbiológica com ar atmosférico (37 °C).

As leituras dos resultados foram realizadas no tempo zero (imediatamente após o término do preparo), 2, 4, 6 horas e de 1 em 1 hora até completar o período de 40 horas. Foi aliqotado, em placas de microtitulação (96 “wells”), 100 µL para análise no leitor de microplacas Synergy HT Multi-Detection (Bio-Tek, Winooski, VT EUA) com absorbância determinada em 570 nm (OD<sub>570</sub>), todos os experimentos foram feitos em duplicata.

#### **4.4 Efeito do composto (MeOPhSe)<sub>2</sub> sobre a formação de biofilme de *C. krusei***

Preparou-se suspensões de *C. krusei* (10<sup>7</sup> células viáveis/mL) e, em seguida, em placas de microtitulação (96 “wells”) foram aliqotadas 50 µL da suspensão de *C. krusei* juntamente com RPMI-1640 estéril (130 µL) e DMSO 1% (grupo controle) ou concentrações de 2, 5, 10 e 20 µmol.L<sup>-1</sup> de (MeOPhSe)<sub>2</sub>. As placas foram incubadas por 24 horas para formação do biofilme (37°C). Após os diferentes tratamentos, para verificar a formação/viabilidade do biofilme, as células foram lavadas cuidadosamente uma vez com 100 µL de PBS estéril e foi aliqotado 100 µL de PBS, acrescidos de 20 µL de 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) (Molecular Probes) e Menadione na proporção de 4:1. As células foram incubadas por aproximadamente 2 horas em estufa microbiológica em ar atmosférico (37 °C) e após esse período de incubação, a leitura da placa foi realizada no leitor de microplacas Synergy HT Multi-Detection (Bio-Tek, Winooski, VT EUA) com absorbância determinada em 490 nm (OD<sub>490</sub>).

#### **4.5 Efeito do composto (MeOPhSe)<sub>2</sub> sobre adesão de *C. krusei* sobre células HeLa**

As células HeLa foram semeadas em placas de 96 poços, na densidade celular de  $5 \times 10^4$  células viáveis/mL e incubadas por 24 horas a  $37^\circ \text{C}$ . As células foram lavadas uma vez com meio DMEM suplementado com 1% de FBS e bloqueado com albumina de soro bovino a 1% (BSA). Em seguida, 200  $\mu\text{L}$  de meio DMEM suplementado com 1% de FBS, contendo suspensões de *C. krusei* (MOI de 5:1) pré-tratadas com diferentes concentrações de  $(\text{MeOPhSe})_2$  por 1 hora foram adicionados aos poços e incubados a  $37^\circ \text{C}$  por 30 minutos, em seguida. Após esse período, os poços foram lavados quatro vezes com PBS para que as células não aderidas fossem retiradas.

As células HeLa foram lisadas com 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada estéril e incubadas por 40 minutos a  $37^\circ \text{C}$ . Em seguida uma alíquota (20  $\mu\text{L}$ ) foi incubada em uma placa de 24 poços, contendo meio de caldo Sabouraud dextrose. Após 16 horas de incubação a  $37^\circ \text{C}$ , o crescimento celular foi analisado em 570 nm ( $\text{OD}_{570}$ ) usando o leitor SpectraMax (Molecular Devices, CA, EUA). A densidade óptica observada no crescimento de *C. krusei* no grupo controle foi considerada como 100% de adesão, servindo como base para calcular os outros valores.

#### **4.6 Ensaio da toxicidade do composto $(\text{MeOPhSe})_2$ em células HeLa e Vero**

Os efeitos citotóxicos do  $(\text{MeOPhSe})_2$  foram determinados pela coloração das células aderidas com corante cristal violeta. As células HeLa e Vero foram semeadas em placas de 96 poços, na densidade celular de  $2 \times 10^4$  e  $1 \times 10^4$  células por poço, respectivamente. As células foram tratadas com diferentes concentrações (2 a 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) de  $(\text{MeOPhSe})_2$ . As culturas foram mantidas a  $37^\circ \text{C}$  em atmosfera com 5% de  $\text{CO}_2$  e 95% de ar umidificado por 1,5, 6, 24 e 48 horas. Em seguida, o meio foi aspirado e as células foram coradas com solução de cristal violeta (0,5%) para coloração, lavadas cuidadosamente e secas ao ar. Em seguida, adicionou-se metanol (200  $\mu\text{L}$ ) a cada poço, e a absorbância foi medida a 570 nm usando um leitor SpectraMax (Molecular Devices, CA, EUA). A viabilidade celular foi calculada usando o grupo Controle como 100% de integridade.

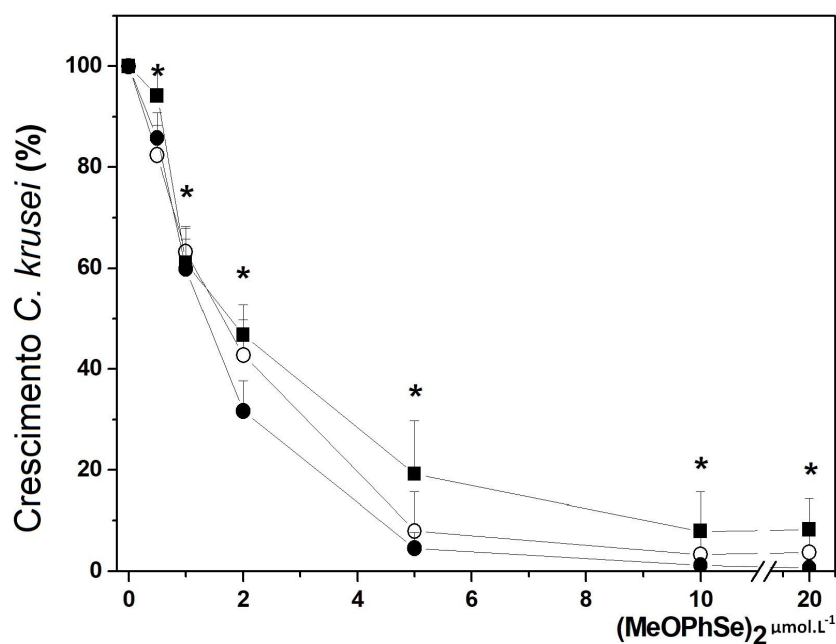
#### **4.7 Análise Estatística**

Os valores foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. As diferenças estatísticas foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) e post hoc de comparação com o teste de Tukey-Kramer. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 5 RESULTADOS

Foram realizados ensaios para analisar os efeitos do composto (MeOPhSe)<sub>2</sub> sobre o crescimento de *C. krusei*. Foi observada uma inibição de *C. krusei* de maneira dose dependente. Na figura 2 é possível observar que já na concentração de 1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  ocorre uma pequena inibição, porém essa inibição se torna expressiva a partir de 5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , quando ocorre uma inibição de crescimento de aproximadamente 95 % na densidade celular de  $10^4$  células viáveis/mL. Nas demais densidades celulares ( $10^5$  e  $10^6$  células viáveis/mL) houve redução próxima de 80 %, já nas concentrações de 10 e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  a inibição foi superior a 98% nas densidades de  $10^4$  e  $10^5$  células viáveis/mL, e de 95% na densidade celular de  $10^6$  células viáveis/mL.

Figura 2 - Efeitos de diferentes concentrações do composto (MeOPhSe)<sub>2</sub> sobre o crescimento de *C. krusei*.



**Legenda:** (■) densidade celular de  $1 \times 10^6$  células viáveis/mL; (○) densidade celular de  $1 \times 10^5$  células viáveis/mL; (●) densidade celular de  $1 \times 10^4$  células viáveis/mL; \* $p < 0,05$  relativo ao controle como estatisticamente significativo

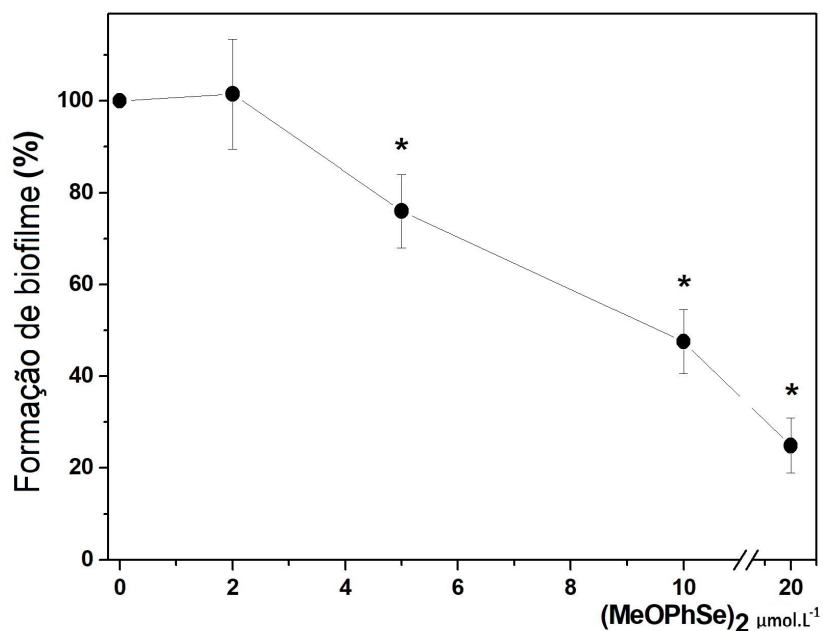
Fonte: Autor.

Nos testes para avaliar a formação do biofilme houve uma significativa

redução na capacidade de formação do biofilme de aproximadamente 76, 47.5 e 24.8 % nas concentrações de 20, 10 e 5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectivamente (figura 3).

Pode-se observar no grupo controle (figura 4) o grande número de filamentos e células em um biofilme de 24 horas. Já nas figuras 5 (10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e 6 (20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), nota-se a redução no número de células e a diminuição na quantidade de filamentos, tendo na maior concentração (20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) uma drástica redução de filamentos e conseqüentemente um enfraquecimento do biofilme.

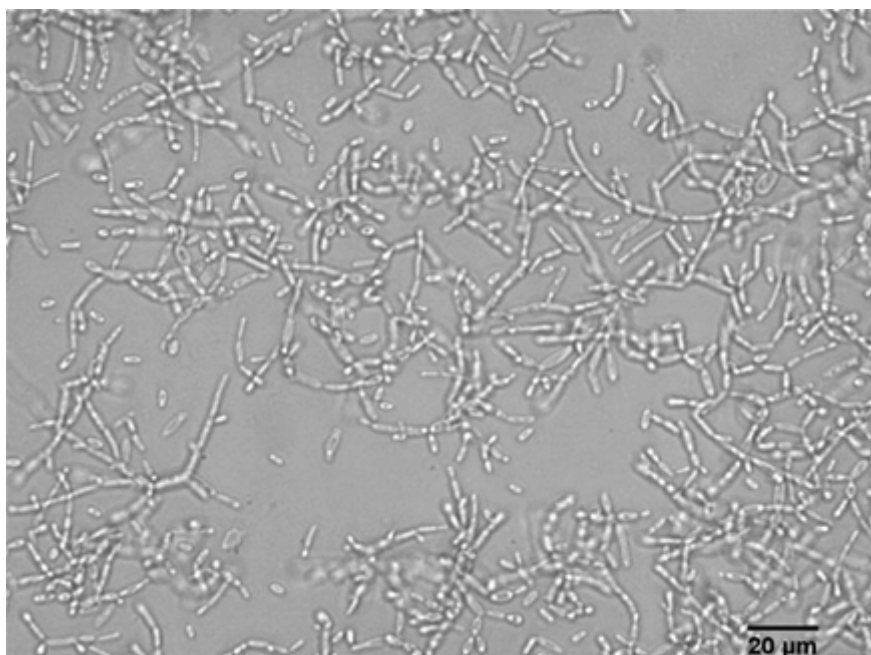
Figura 3 - Efeito de diferentes concentrações do composto  $(\text{MeOPhSe})_2$  sobre a formação de biofilme



**Legenda:** \* $p$  0,05 relativo ao controle como estatisticamente significativo

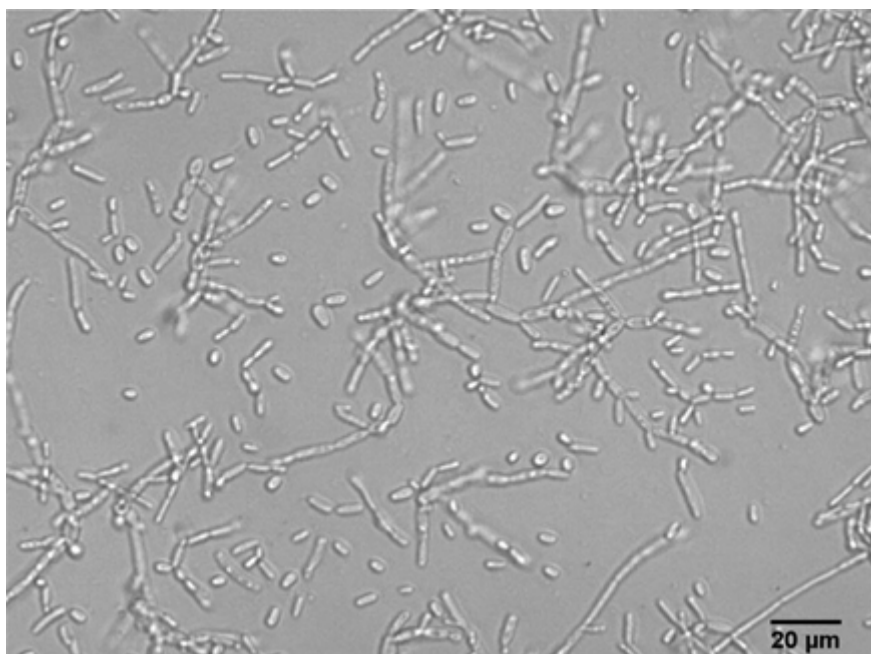
Fonte: Autor.

Figura 4 - Biofilme de *C. krusei*  $10^7$ - grupo controle após 24 horas.



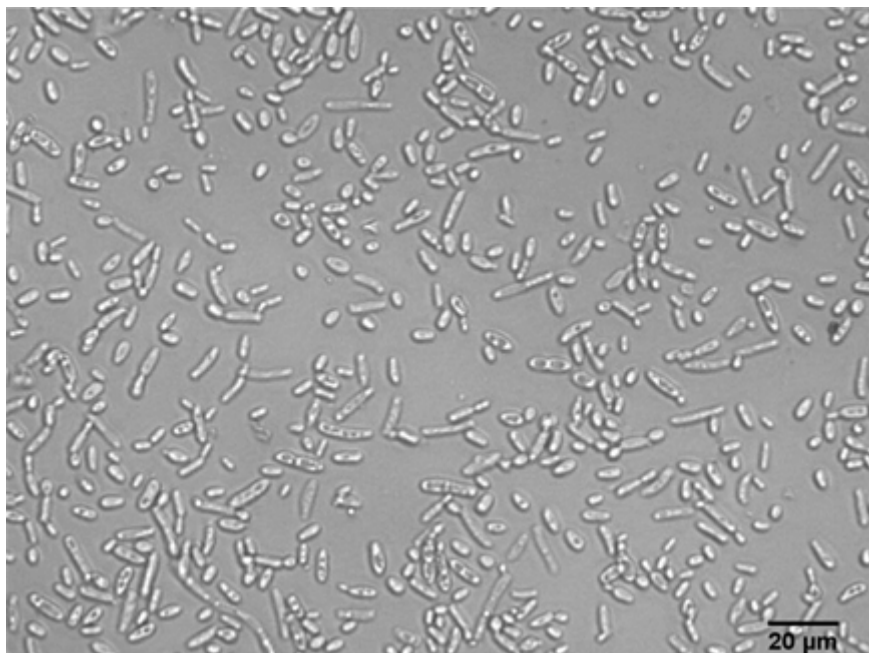
Fonte: Autor.

Figura 5 - Biofilme *C. krusei*  $10^7$ - grupo tratado com  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $(\text{MeOPhSe})_2$  após 24 horas.



Fonte: Autor.

Figura 6 - Biofilme *C. krusei*  $10^7$ - grupo tratado com  $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $(\text{MeOPhSe})_2$  após 24 horas.



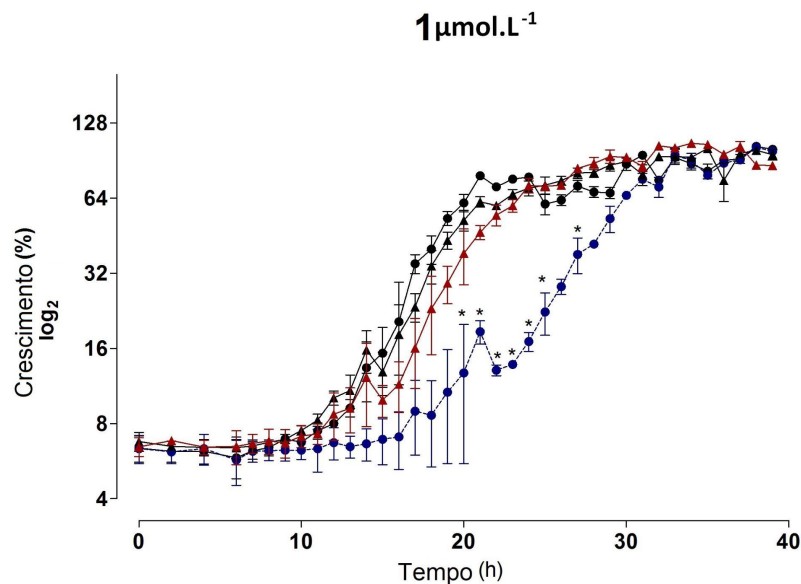
Fonte: Autor.

Também foi verificado o efeito sobre a cinética de crescimento utilizando diferentes concentrações ( $1, 2, 5, 10$  e  $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) de  $(\text{MeOPhSe})_2$  e comparando *C. krusei* e *C. albicans*. Durante os teste, foi possível observar que nas concentrações de  $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $(\text{MeOPhSe})_2$  (Figura 7 e 8) a cinética de crescimento da *C. krusei* praticamente não sofreu alterações durante as 40 horas, permanecendo apenas por um período maior na fase de LAG; diferente do observado com a *C. albicans* que na concentração de  $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$  do composto  $(\text{MeOPhSe})_2$ , além do prolongamento da fase de LAG sofreu uma diminuição na quantidade de células durante as 40 horas.

Já nas concentrações acima de  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $(\text{MeOPhSe})_2$  (Figuras 9, 10 e 11) a *C. albicans* permaneceu na fase de LAG por todo o período de 40 horas. Por outro lado, a *C. krusei* nas concentrações de  $5, 10$  e  $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$  do composto  $(\text{MeOPhSe})_2$  sofreu um prolongamento da fase de LAG de acordo com o aumento da concentração. Nas concentrações de  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e  $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$  as curvas se assemelham, com exceção de que na concentração de  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  há uma pequena fase estacionária, já com  $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$  a curva muda da fase exponencial

diretamente para a fase de declínio.

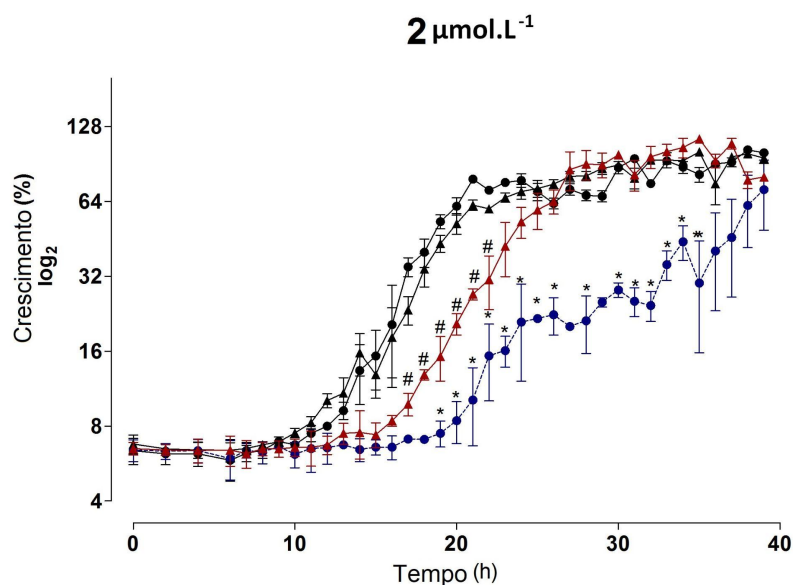
Figura 7 - Curva de cinética de crescimento em 40 horas; comparação *C. albicans* e *C. krusei*; (MeOPhSe)<sub>2</sub> 1 µmol.L<sup>-1</sup>.



**Legenda:** (●) *C. albicans* grupo controle; (●) *C. albicans* tratada com (MeOPhSe)<sub>2</sub>; (▲) *C. krusei* grupo controle; (▲) *C. krusei* tratada com (MeOPhSe)<sub>2</sub>; \**p* < 0,05 relativo ao controle como estatisticamente significativo; #*p* < 0,05 como estatisticamente significativo entre *C. albicans* e *C. krusei*.

Fonte: Autor.

Figura 8 - Curva de cinética de crescimento em 40 horas; comparação *C. albicans* e *C. krusei*; (MeOPhSe)<sub>2</sub> 2 µmol.L<sup>-1</sup>.

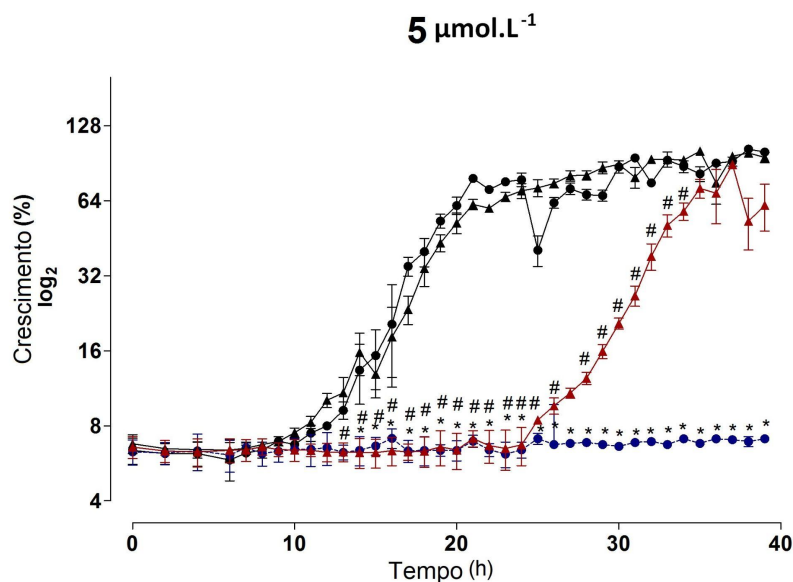


**Legenda:** (●) *C. albicans* grupo controle; (●) *C. albicans* tratada com (MeOPhSe)<sub>2</sub>; (▲) *C. krusei* grupo controle; (▲) *C. krusei* tratada com (MeOPhSe)<sub>2</sub>; \**p* < 0,05 relativo ao controle como estatisticamente significativo; #*p* < 0,05 como estatisticamente significativo

entre *C. albicans* e *C. krusei*.

Fonte: Autor.

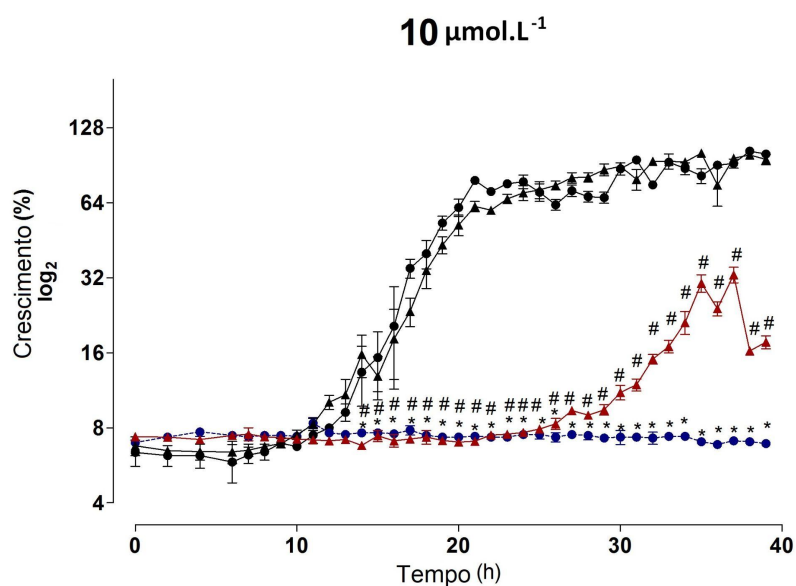
Figura 9 - Curva de cinética de crescimento em 40 horas; comparação *C. albicans* e *C. krusei*; (MeOPhSe)<sub>2</sub> 5 µmol.L<sup>-1</sup>.



**Legenda:** (●) *C. albicans* grupo controle; (●) *C. albicans* tratada com (MeOPhSe)<sub>2</sub>; (▲) *C. krusei* grupo controle; (▲) *C. krusei* tratada com (MeOPhSe)<sub>2</sub>; \**p* < 0,05 relativo ao controle como estatisticamente significativo; #*p* < 0,05 como estatisticamente significativo entre *C. albicans* e *C. krusei*.

Fonte: Autor.

Figura 10 - Curva de cinética de crescimento em 40 horas; comparação *C. albicans* e *C. krusei*; (MeOPhSe)<sub>2</sub> 10 µmol.L<sup>-1</sup>.

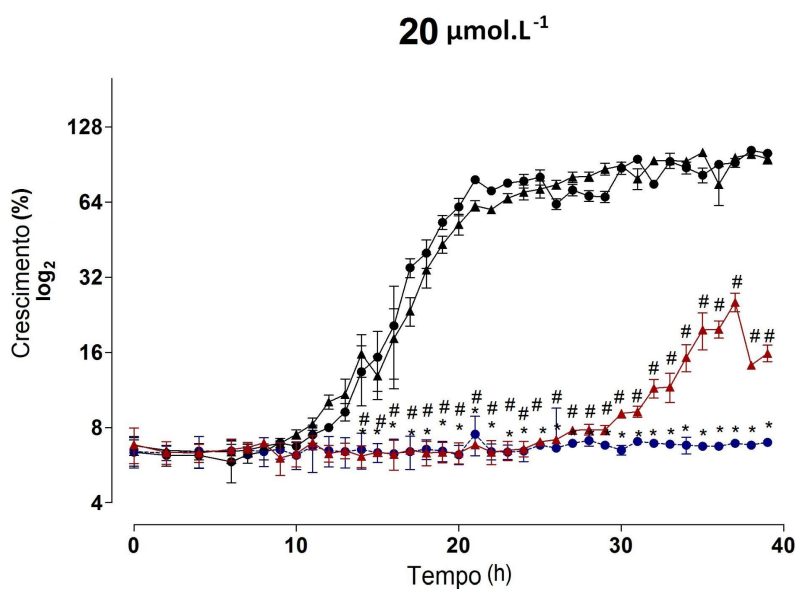


**Legenda:** (●) *C. albicans* grupo controle; (●) *C. albicans* tratada com (MeOPhSe)<sub>2</sub>; (▲) *C.*

*krusei* grupo controle; (▲) *C. krusei* tratada com (MeOPhSe)<sub>2</sub>; \**p* < 0,05 relativo ao controle como estatisticamente significativo; #*p* < 0,05 como estatisticamente significativo entre *C. albicans* e *C. krusei*.

Fonte: Autor.

Figura 11 - Curva de cinética de crescimento em 40 horas; comparação *C. albicans* e *C. krusei*; (MeOPhSe)<sub>2</sub> 20 µmol.L<sup>-1</sup>.

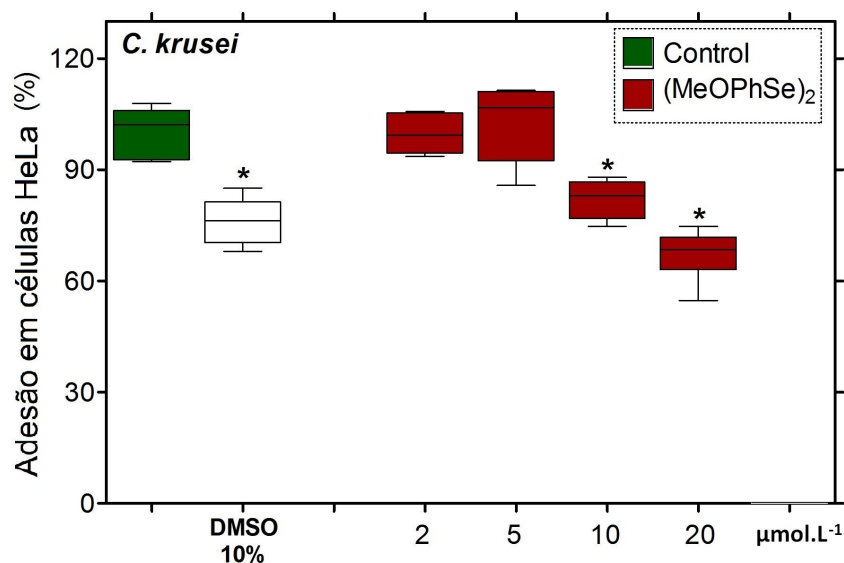


**Legenda:** (●) *C. albicans* grupo controle; (●) *C. albicans* tratada com (MeOPhSe)<sub>2</sub>; (▲) *C. krusei* grupo controle; (▲) *C. krusei* tratada com (MeOPhSe)<sub>2</sub>; \**p* < 0,05 relativo ao controle como estatisticamente significativo; #*p* < 0,05 como estatisticamente significativo entre *C. albicans* e *C. krusei*.

Fonte: Autor.

Os efeitos inibitórios do (MeOPhSe)<sub>2</sub> na adesão de *C. krusei* em células HeLa (Figura 12) foram observados como sendo dependentes da concentração do composto. A porcentagem de *C. krusei* que aderiu às células HeLa foi consideravelmente menor do que o grupo controle, após a exposição a 10 e 20 µmol.L<sup>-1</sup> (*p*= 0,043 e *p*= 0,016, respectivamente), sendo que nas concentrações de 2 e 5 µmol.L<sup>-1</sup> não foi notada nenhuma alteração significativa. Observa-se (Figura 13) que a *C. albicans* apresenta um comportamento semelhante porém com uma maior sensibilidade ao composto já que a inibição é visível a partir da concentração de 5 µmol.L<sup>-1</sup>.

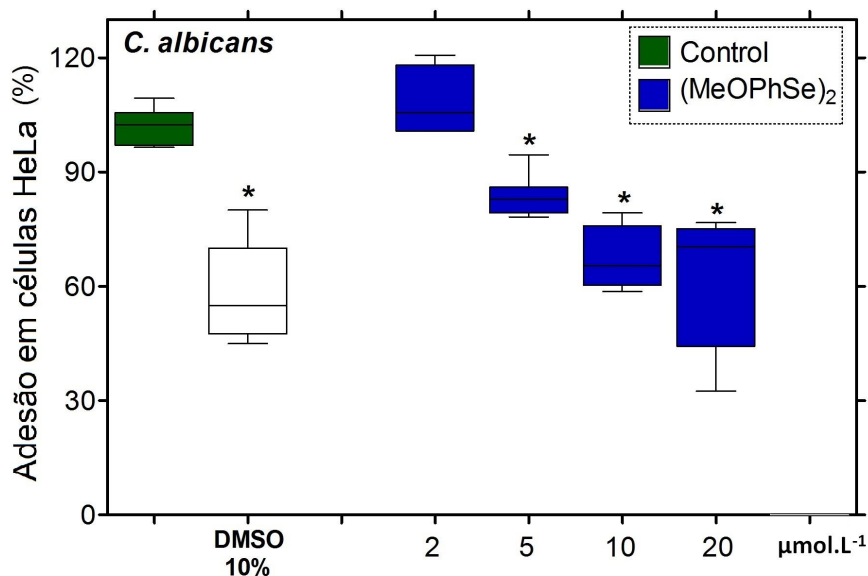
Figura 12 - Efeito do composto (MeOPhSe)<sub>2</sub> em diferentes concentrações (2, 5, 10 e 20 μmol.L<sup>-1</sup>) na adesão de *C. krusei* sobre células HeLa.



**Legenda:** \* $p < 0,05$  relativo ao controle indicando diferença significativa

Fonte: Autor.

Figura 13 - Efeito do composto (MeOPhSe)<sub>2</sub> em diferentes concentrações (2, 5, 10 e 20 μmol.L<sup>-1</sup>) na adesão de *C. albicans* sobre células HeLa.



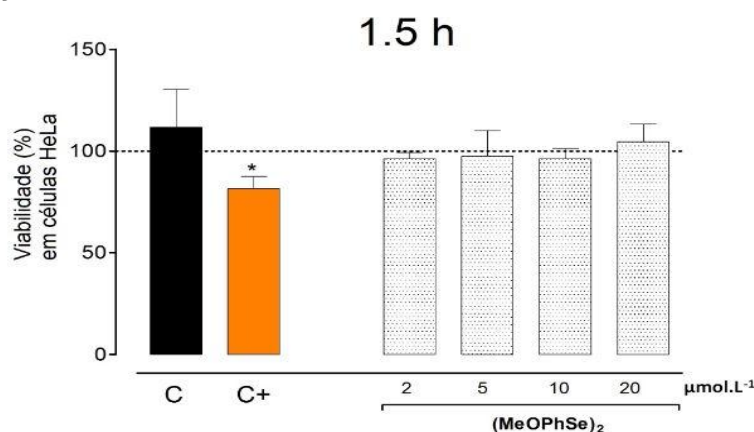
**Legenda:** \* $p < 0,05$  relativo ao controle indicando diferença significativa

Fonte: Autor

Com o objetivo de verificar se o composto (MeOPhSe)<sub>2</sub> possui efeito citotóxico em célula animal, foram realizados testes com dois tipos distintos de

células, células HeLa (Figuras 14, 15, 16 e 17) e células Vero (Figuras 18, 19, 20 e 21) nos períodos de 1,5, 6, 24 e 48 horas. Dentro das concentrações testadas, não houve citotoxicidade significativa apresentada ( $p > 0,05$ ) em ambas as células quando comparadas ao grupo controle até o período de 24 horas. Nas concentrações de 2, 5 e 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $(\text{MeOPhSe})_2$ , não houve efeitos tóxicos significativos às células até o período de 48 horas nos dois tipos de célula, já na concentração de 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  a viabilidade das células HeLa sofreu uma redução de  $35,65 \pm 17,08\%$  das células viáveis, enquanto que a viabilidade das células Vero sofreu uma redução de  $24,34 \pm 12,47\%$  das células viáveis. Por outro lado, o controle positivo (C+) (2,5% DMSO) reduziu as células viáveis de HeLa e Vero em todos os tempos testados ( $p < 0,05$ ), demonstrando uma grande toxicidade.

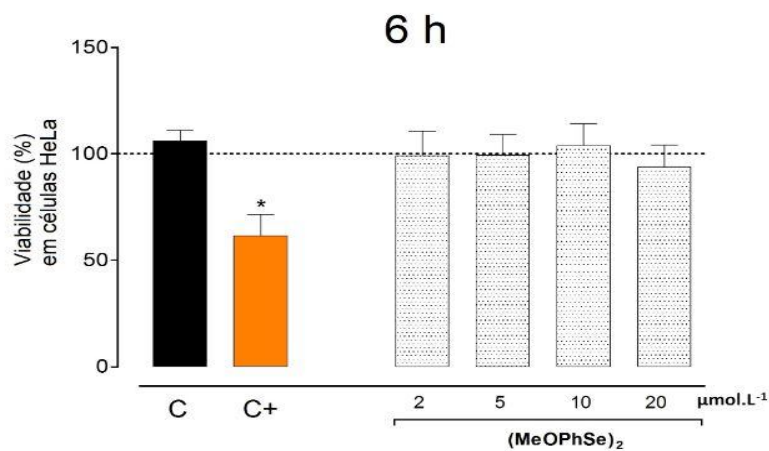
Figura 14 - Toxicidade do composto  $(\text{MeOPhSe})_2$  sobre células HeLa em diferentes concentrações (2, 5, 10 e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) no período de 1,5 horas.



**Legenda:** \* $p < 0,05$  em relação ao controle, estatisticamente significativo; C: células não tratadas, grupo controle; C+: células tratadas com 2,5% DMSO, controle positivo

Fonte: Autor.

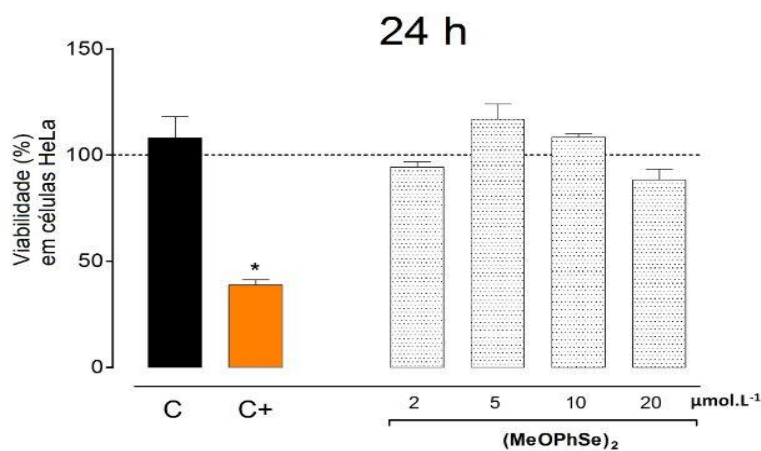
Figura 15 - Toxicidade do composto  $(\text{MeOPhSe})_2$  sobre células HeLa em diferentes concentrações (2, 5, 10 e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) no período de 6 horas



**Legenda:** \*  $p < 0,05$  em relação ao controle, estatisticamente significativo; C: células não tratadas, grupo controle; C+: células tratadas com 2,5% DMSO, controle positivo

Fonte: Autor.

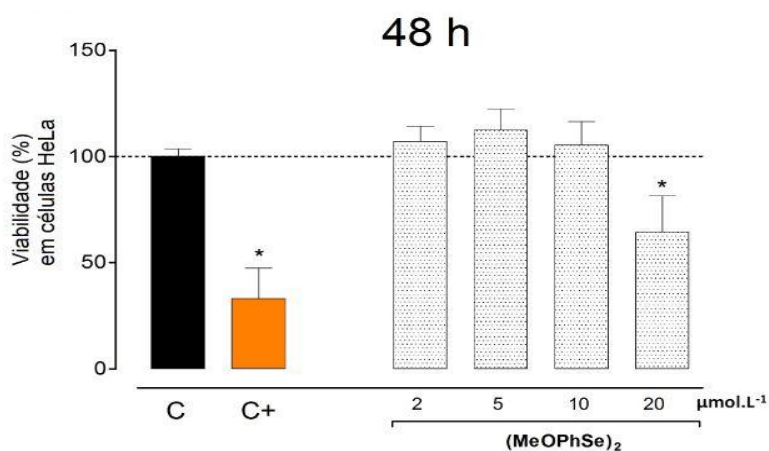
Figura 16 - Toxicidade do composto  $(\text{MeOPhSe})_2$  sobre células HeLa em diferentes concentrações (2, 5, 10 e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) no período de 24 horas;



**Legenda:** \*  $p < 0,05$  em relação ao controle, estatisticamente significativo; C: células não tratadas, grupo controle; C+: células tratadas com 2,5% DMSO, controle positivo

Fonte: Autor.

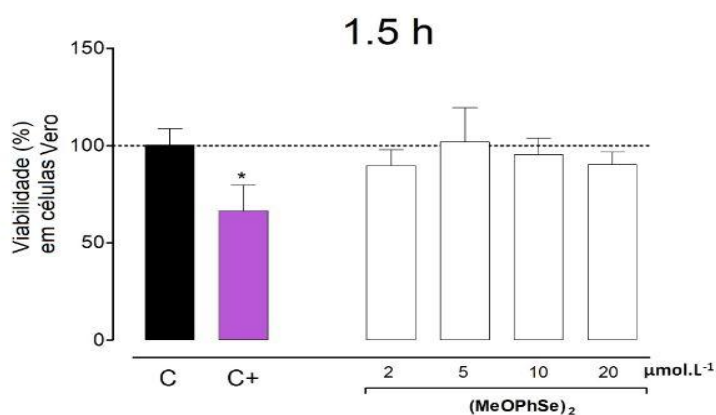
Figura 17 - Toxicidade do composto  $(\text{MeOPhSe})_2$  sobre células HeLa em diferentes concentrações (2, 5, 10 e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) no período de 48 horas;



**Legenda:** \*  $p$  0,05 em relação ao controle, estatisticamente significativo; C: células não tratadas, grupo controle; C+: células tratadas com 2,5% DMSO, controle positivo

Fonte: Autor.

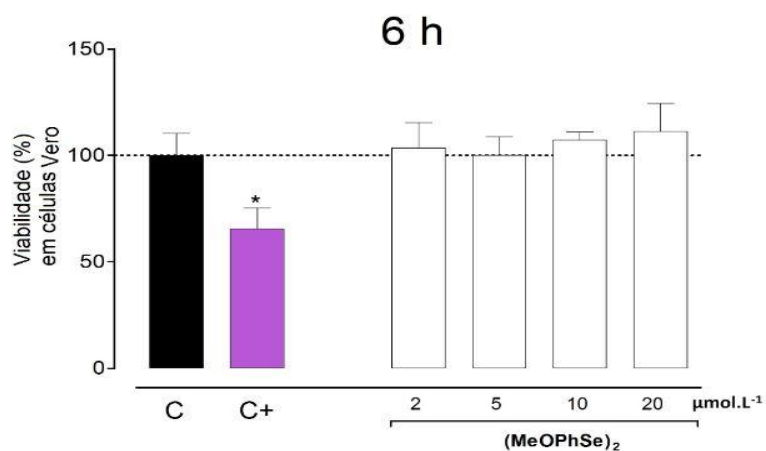
Figura 18 - Toxicidade do composto  $(\text{MeOPhSe})_2$  sobre células Vero em diferentes concentrações (2, 5, 10 e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) no período de 1.5 horas.



**Legenda:** \*  $p$  0,05 em relação ao controle, estatisticamente significativo; C: células não tratadas, grupo controle; C+: células tratadas com 2,5% DMSO, controle positivo

Fonte: Autor.

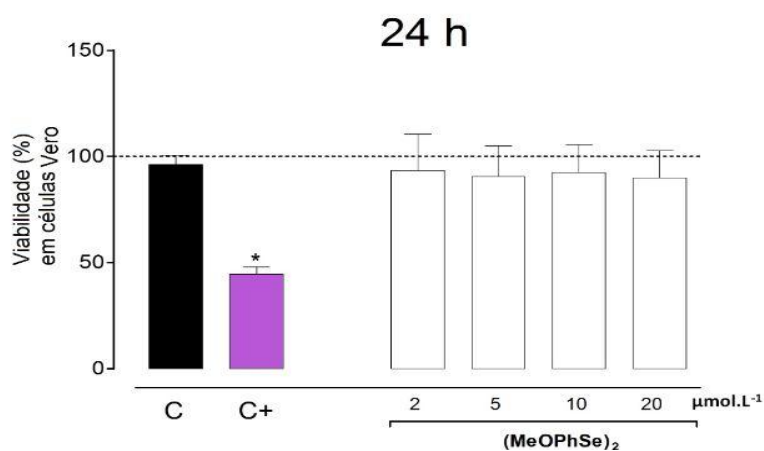
Figura 19 - Toxicidade do composto  $(\text{MeOPhSe})_2$  sobre células Vero em diferentes concentrações (2, 5, 10 e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) no período de 6 horas.



**Legenda:** \* $p$  0,05 em relação ao controle, estatisticamente significativo; C: células não tratadas, grupo controle; C+: células tratadas com 2,5% DMSO, controle positivo

Fonte: Autor.

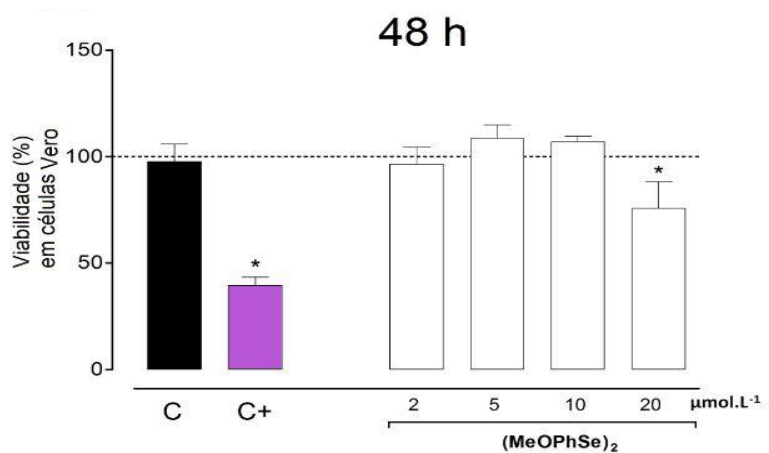
Figura 20 - Toxicidade do composto  $(\text{MeOPhSe})_2$  sobre células Vero em diferentes concentrações (2, 5, 10 e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) no período de 24 horas.



**Legenda:** \* $p$  0,05 em relação ao controle, estatisticamente significativo; C: células não tratadas, grupo controle; C+: células tratadas com 2,5% DMSO, controle positivo

Fonte: Autor.

Figura 21 - Toxicidade do composto  $(\text{MeOPhSe})_2$  sobre células Vero em diferentes concentrações (2, 5, 10 e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) no período de 48 horas.



**Legenda:** \* $p$  0,05 em relação ao controle, estatisticamente significativo; C: células não tratadas, grupo controle; C+: células tratadas com 2,5% DMSO, controle positivo

Fonte: Autor.

## 6 DISCUSSÃO

Cerca de 30% das infecções fúngicas hospitalares são advindas de espécies de *Candida não-albicans* e com o passar dos anos essa ocorrência vem crescendo, visto que mesmo sendo responsáveis por grande parte das infecções fúngicas, as espécies *não-albicans* costumam sofrer negligência muitas vezes pelo prognóstico/diagnóstico executado de maneira incorreta, sendo notável o aumento no número de relatos de *C. krusei* nos últimos anos (FALAGAS, 2010; OLIVEIRA, 2014; CASTRO, 2016). Por conta do pequeno número de antifúngicos eficientes e o uso profilático de maneira muitas vezes equivocada, as infecções causadas por fungos do gênero *Candida* vêm aumentando cada vez mais (RICHARDSON, 2005; SPAMPINATO *et al.*, 2013). Por conta de sua resistência intrínseca a uma ampla gama de antifúngicos, principalmente da classe dos azóis e baixa sensibilidade a anfotericina-B, a *C. krusei* embora tenha uma baixa incidência, se torna um grande desafio aos profissionais da saúde (COLOMBO e GUIMARÃES, 2003; PFALLER *et al.*, 2014).

No presente estudo foi possível observar que, como visto na figura 2, o processo de crescimento da *C. krusei* sofreu uma inibição de aproximadamente 80 e 90 % a partir da concentração de 5 e 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $(\text{MeOPhSe})_2$ , respectivamente. Diferente da *C. albicans*, que sofreu inibição em concentrações menores, e que na concentração de 5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  do composto, ocorreu inibição superior a 90%, podendo chegar até mais de 95 % nas concentrações de 10 e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $(\text{MeOPhSe})_2$  respectivamente (AMORIM *et al.*, 2018). Já nos testes para avaliar a formação do biofilme de *C. krusei* (figura 3), houve uma significativa redução na capacidade de formação do biofilme. Aproximadamente 76 % na concentração de 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  do composto  $(\text{MeOPhSe})_2$  e de 47,5 % com 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $(\text{MeOPhSe})_2$ , valores inferiores aos obtidos com *C. albicans*. De acordo com Amorim e seus colaboradores (2018), concentrações de 10 e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $(\text{MeOPhSe})_2$  obtiveram capacidade de inibição superior a 70 e 80% respectivamente com a densidade  $10^7$  células viáveis/mL, a mesma densidade utilizada em nosso trabalho; como notado em outros testes realizados, a *C. krusei* apresentou maior resistência ao composto quando comparado com *C. albicans*. É possível observar também nas figuras 5 e 6

(10 e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $(\text{MeOPhSe})_2$  respectivamente) uma drástica redução na quantidade e no tamanho dos filamentos que formam o biofilme. As infecções fúngicas causadas por espécies do gênero *Candida* possuem como um dos principais fatores de virulência a formação de biofilmes (MOHANDAS e BALLAL, 2011). Uma diminuição no número de células e filamentos reduz consideravelmente a virulência e aumenta a fragilidade da *Candida* (RAMAGE *et al.*, 2009). Segundo Samaranayake (2008), existem quatro etapas para a formação de um biofilme: a adesão a uma superfície, a formação de colônias, a secreção de matriz extracelular e a maturação da estrutura tridimensional, e a quarta etapa que é a disseminação de células do biofilme. O que se observa na figura 4 (grupo controle) é que há a presença de colônias e filamentos possivelmente se sobrepondo e formando o biofilme; enquanto que na figura 5 existe uma redução desses filamentos e número de células. Já na figura 6 a presença de filamentos, colônias e matriz extracelular não foram observadas, notando somente a presença de *C. krusei* em sua forma leveduriforme.

Embora os mecanismos responsáveis pela resistência dos biofilmes não sejam totalmente elucidados, uma hipótese bastante aceita é a de que os diversos filamentos e todo o conteúdo extracelular formam uma espécie de barreira que impede a penetração e a ação das drogas por uma barreira de difusão (NETT *et al.*, 2011). Sabe-se também que dentre as espécies de *Candida*, a *C. krusei* está entre as que formam biofilmes mais espessos, com diversas camadas de filamentos e matriz extracelular (PANNANUSORN; FERNANDEZ; RÖMLING, 2013). Entretanto, segundo Ramage *et al.*, (2009) uma vez que essa barreira seja impedida de se formar ou seja destruída, a ação da droga se torna mais eficaz por lidar somente com o organismo em sua forma leveduriforme.

Com a finalidade de verificar o efeito do composto  $(\text{MeOPhSe})_2$  sobre *C. krusei* em sua curva de cinética de crescimento, após os teste, notou-se na figura 8 que a partir da concentração de 2  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  do  $(\text{MeOPhSe})_2$  o período de LAG (latência) foi prolongando conforme se aumentou a concentração, levando cada vez mais tempo para entrar na fase exponencial e dar continuidade na curva de cinética de crescimento. Na concentração de 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $(\text{MeOPhSe})_2$  a curva de cinética vai da fase exponencial diretamente para a fase de declínio, sem passar por um período estacionário, necessário para adesão e conseqüentemente colonização. A

curva de cinética de crescimento observada na *C. krusei* é muito distinta quando comparada com a *C. albicans*, que a partir da concentração de  $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$  do composto  $(\text{MeOPhSe})_2$ , já sofre um prolongamento no período de latência, cerca de 5 horas a mais para iniciar a fase exponencial. A partir da concentração de  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $(\text{MeOPhSe})_2$ , a *C. albicans* sofre uma inibição completa, não sendo possível notar alterações em sua curva de cinética de crescimento, permanecendo durante o período de 40 horas sem entrar na fase exponencial. Foi observado que há uma grande diferença entre a curva de ambas espécies (*C. albicans* e *C. krusei*), visto que há uma resistência intrínseca a certos compostos antifúngicos, por parte da *C. krusei*, isso pode ser um dos fatores que fazem com que a sensibilidade das espécies ao composto seja algo tão particular. Um outro fator importante para o aumento de virulência de espécies de *Candida* é a adesão (SAMARANAYAKE, 1994; NETT *et al.*, 2011). É possível observar na figura 12 que o  $(\text{MeOPhSe})_2$  alterou as propriedades de adesão de *C. krusei* em células HeLa nas concentrações de 10 e  $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$  do composto de forma significativa. Por outro lado, nas concentrações de 2 e  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $(\text{MeOPhSe})_2$  não foi possível encontrar diferenças relevantes em comparação ao grupo controle. Já na figura 13 podemos notar novamente que a *C. albicans* é mais sensível a concentrações mais baixas do composto, possuindo uma inibição de adesão bem maior. Nota-se que já na concentração de  $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  do composto sobre *C. albicans* houve uma inibição próxima da inibição observada em *C. krusei* sob efeito da concentração de  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $(\text{MeOPhSe})_2$ .

De acordo com os efeitos observados do  $(\text{MeOPhSe})_2$  em *C. krusei*, foi necessário estudar o efeito citotóxico desse composto em outros tipos de células, células animais, como observado nas figuras 14 a 21. A toxicidade do composto  $(\text{MeOPhSe})_2$  foi testada em células HeLa (epitélio cervical) e células Vero (fibroblasto renal de macaco) em 1.5, 6, 24 e 48 horas. Durante o período de 24 horas, nenhuma das concentrações estudadas apresentou algum tipo de alteração significativa com relação a citotoxicidade. Entretanto, a concentração de  $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$  do composto, acaba por apresentar um efeito citotóxico em ambos os tipos de célula; reduzindo HeLa para aproximadamente 64 % de células viáveis, e Vero para cerca de 75 % de células viáveis. No passo em que na concentração de  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  não foi observada citotoxicidade, significativa, nos dois tipos de célula.

A partir dos dados obtidos nesse trabalho, pode-se observar que embora a concentração de  $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$  apresente resultados mais expressivos com relação a alterações na curva de cinética de crescimento, inibição de crescimento celular, formação de biofilme e alterações na capacidade de adesão, essa mesma concentração também se mostrou citotóxica no período de 24 a 48 horas. Entretanto a concentração de  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  do  $(\text{MeOPhSe})_2$ , apresentou resultados de inibição próximos dos obtidos com a concentração de  $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$  do composto, porém sem citotoxicidade observada em célula animal durante os ensaios.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos a partir desse estudo demonstraram que o composto (MeOPhSe)<sub>2</sub> foi capaz de inibir o crescimento celular com diferentes concentrações e em diversas densidades celulares, a formação de biofilme com diferentes concentrações do composto, a adesão em células HeLa e não demonstrou efeitos citotóxicos em células HeLa e Vero até a concentração de 10 µmol.L<sup>-1</sup>, concentração que apresentou resultados similares aos da concentração de 20 µmol.L<sup>-1</sup> de (MeOPhSe)<sub>2</sub>.

Quando comparado com *C. albicans* os efeitos do (MeOPhSe)<sub>2</sub> em *C. krusei* são mais atenuados. Nota-se essa diferença quando comparadas as formações de biofilme, o crescimento celular, a curva cinética de crescimento e a adesão em células HeLa. Embora a *C. krusei* possua naturalmente resistência a diversos compostos e apresente uma diferença de resultados quando comparada a *C. albicans*, claramente o composto (MeOPhSe)<sub>2</sub> expressou capacidade inibitória.

Como observado nos ensaios, há um potencial antifúngico com resultados significativos sobre *C. krusei*, embora careça de estudos, o composto p,p'-Methoxi-disseleneto de difenila se estabelece como um composto eficiente e promissor para futuros tratamentos de fungemias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, Jalal *et al.* *Candida krusei* fungemia: an escalating serious infection in immunocompromised patients. **Archives of internal medicine**, v. 160, n. 17, p. 2659-2664, 2000.
- ALVES, Sydney H. *et al.* Development of secondary resistance to fluconazole in *Cryptococcus neoformans* isolated from a patient with AIDS. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, n. 6, p. 359-362, 1997.
- AMORIM, L. *et al.* The Organochalcogen Compound (MeOPhSe)<sub>2</sub> Inhibits Both Formation and the Viability of the Biofilm Produced by *Candida albicans*, at Different Stages of Development. **Current pharmaceutical design**, 24 (33), 3964–3971, 2018.
- ANGUS, Derek C.; PIRES PEREIRA, Carlos A.; SILVA, Eliezer. Epidemiology of severe sepsis around the world. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)**, v. 6, n. 2, p. 207-212, 2006.
- ARENDRUP, Maiken C. Epidemiology of invasive candidiasis. **Current opinion in critical care**, v. 16, n. 5, p. 445-452, 2010.
- ARRUA, Juliana MM *et al.* Prevalence of *Candida tropicalis* and *Candida krusei* in onychomycosis in João Pessoa, Paraíba, Brazil from 1999 to 2010. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 3, p. 1819-1822, 2015.
- BARBEDO, Leonardo S.; SGARBI, Diana BG. Candidíase. **J Bras Doenças Sex Transm**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.
- BASSETTI, Matteo *et al.* A multicenter study of septic shock due to candidemia: outcomes and predictors of mortality. **Intensive care medicine**, v. 40, n. 6, p. 839-845, 2014.
- BECK-SAGUÉ C, JARVIS WR and National Nosocomial Infections Surveillance System. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. **Journal of Infectious Diseases** 167: 1247-1251, 1993.

- BEN-AMI, R. et al. Distribution of fluconazole-resistant *Candida* bloodstream isolates among hospitals and inpatient services in Israel. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 8, p. 752-756, 2013.
- BENITEZ, Lydia L.; CARVER, Peggy L. Adverse effects associated with long-term administration of azole antifungal agents. **Drugs**, v. 79, n. 8, p. 833-853, 2019.
- BERMAN, Judith; SUDBERY, Peter E. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. **Nature reviews. Genetics**, v. 3, n. 12, p. 918, 2002.
- BLACKWELL, Meredith. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species?. **American journal of botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.
- BODEY GP. *et al.*. Fungal infections in cancer patients: an international autopsy survey. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 1992;11:99–109.
- BROOKS, G. F.; CARROLL, Karen C.; BUTEL, Janet; MORSE, Stephen. **Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology** 26 E. McGraw Hill Professional, 2013.
- BROWN, Gordon D. *et al.* Hidden killers: human fungal infections. **Science translational medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13-165rv13, 2012.
- BRUTTS, Arielle; KRYSAN, Damian J. Antifungal drug discovery: something old and something new. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 9, p. e1002870, 2012.
- CALDERONE, Richard A.; CLANCY, Cornelius J. (Ed.). *Candida* and candidiasis. **American Society for Microbiology Press**, 2011.
- Campoy, Sonia, & José L Adrio. Antifungals. **Biochemical pharmacology** vol. 133: 86-96, 2017.
- CARRILLO MUÑOZ, A.-J. *et al.* Resistencia in vitro al fluconazol e itraconazol en aislamientos clínicos de *Candida sp.* y *Cryptococcus neoformans*. **Rev. Iberoam. Micol.**, Barcelona, v. 14, n. 2, p. 50-54, June 1997.

CARVALHO, Renan Henrique de *et al.* Sepsis, sepsis grave e choque séptico: aspectos clínicos, epidemiológicos e prognósticos em pacientes de Unidade de Terapia Intensiva de um Hospital Universitário. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 5, p. 591-3, 2010.

CASTELLANI A. Observations on the fungi found in tropical bronchomycosis. **Lancet** 1912; 1: 13-15.

CASTRO, Tito Lívio *et al.* Mecanismos de resistência da *Candida Sp.* Wwa antifúngicos. **Infarma**, v. 18, n. 9, p. 10, 2006.

CASTRO, Luísa Lima *et al.* Prevalence of fungemia in a tertiary hospital: Analysis of the last decade. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo , v. 62, n. 4, p. 315- 319, 2016.

CHANDRA, Jyotsna *et al.* Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5385-5394, 2001.

CLEVELAND, Angela Ahlquist *et al.* Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008–2013: results from population-based surveillance. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0120452, 2015.

COLOMBO, Arnaldo Lopes; GUIMARÃES, Thaís. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida spp.* **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2003.

COLOMBO, Arnaldo Lopes *et al.* Brazilian guidelines for the management of candidiasis—a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia e Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283-312, 2013.

COLOMBO, Arnaldo L. *et al.* Prognostic factors and historical trends in the epidemiology of candidemia in critically ill patients: an analysis of five multicenter studies sequentially conducted over a 9-year period. **Intensive care medicine**, v. 40, n. 10, p. 1489-1498, 2014.

COWEN, Leah E. *et al.* Mechanisms of antifungal drug resistance. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 7, p. a019752, 2015.

CROCCO, Elisete I. *et al.* Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica in vitro: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais Identification of *Candida* species and antifungal susceptibility in vitro: a study on 100 patients with. **An Bras Dermatol**, v. 79, n. 6, p. 689-697, 2004.

DAGI, Hatice Turk *et al.* Identification and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from bloodstream infections in Konya, Turkey. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 15, n. 1, p. 36, 2016.

DENNING, David W.; HOPE, William W. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. **Trends in microbiology**, v. 18, n. 5, p. 195-204, 2010.

DIEKEMA D.J. *et al.* Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. **Journal of Clinical Microbiology** 40: 1298-1302, 2002.

DOERING T.L. *et al.* Essentials of Glycobiology. 3rd ed. Cold Spring Harbor (NY): **Cold Spring Harbor Laboratory Press**; 2015–2017. Chapter 23.

DOI, André Mario *et al.* Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian national surveillance program. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0146909, 2016.

DONLAN, Rodney M. Biofilms and device-associated infections. **Emerging infectious diseases**, v. 7, n. 2, p. 277, 2001.

DONLAN, Rodney M.; COSTERTON, J. William. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DOUGLASS, Alexander P. *et al.* Population genomics shows no distinction between pathogenic *Candida krusei* and environmental *Pichia kudriavzevii*: One species, four names. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 7, p. e1007138, 2018.

ELLIS, David. Amphotericin B: spectrum and resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 7-10, 2002.

ENGMAN, Lars *et al.* Diaryl chalcogenides as selective inhibitors of thioredoxin reductase and potential antitumor agents. **Anticancer research**, v. 17, n. 6D, p. 4599-4605, 1997.

ERNST, Joachim F.; SCHMIDT, Axel (Ed.). Dimorphism in human pathogenic and apathogenic yeasts. **Karger Medical and Scientific Publishers**, 2000.

FALAGAS, Matthew E.; ROUSSOS, Nikos; VARDAKAS, Konstantinos Z. Relative frequency of albicans and the various *non-albicans Candida spp* among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 11, p. e954-e966, 2010.

FISCHER, Alexandra *et al.* Effect of selenium and vitamin E deficiency on differential gene expression in rat liver. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 285, n. 2, p. 470-475, 2001.

FISHER, Matthew C. *et al.* Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. **Nature**, v. 484, n. 7393, 2012.

FITZPATRICK, David A. *et al.* A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. **BMC evolutionary biology**, v. 6, n. 1, p. 99, 2006.

FLOHE, Leopold; GÜNZLER, W. A.; SCHOCK, H. H. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. **FEBS letters**, v. 32, n. 1, p. 132-134, 1973.

FLOHE, L. Role of selenium in hydroperoxide metabolism. **Proceedings of the Symposium on Selenium-Tellurium Environment**. 1976. p. 138-157.

Food and nutritional board. National Research Council. Recommended Dietary Allowance. 10th ed, Washington, **DC: National Academy Press**, 1989.

GÓMEZ-GAVIRIA, Manuela; MORA-MONTES, Héctor M. Current Aspects in the Biology, Pathogeny, and Treatment of *Candida krusei*, a Neglected Fungal Pathogen. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 1673, 2020.

GRADEL, Kim Oren *et al.* The Danish Collaborative Bacteraemia Network (DACOBAN) database. **Clinical epidemiology**, v. 6, p. 301, 2014.

GROLL, Andreas H.; DE LUCCA, Anthony J.; WALSH, Thomas J. Emerging targets for the development of novel antifungal therapeutics. **Trends in microbiology**, v. 6, n. 3, p. 117-124, 1998.

HALLEN-ADAMS HE, SUHR MJ. Fungi in the healthy human gastrointestinal tract. **Virulence**. Apr 3;8(3):352-358, 2017.

HARPF V. *et al.* *Candida* and Complement: New Aspects in an Old Battle. **Front Immunol**. Jul 14;11:1471, 2020.

HAWSER, STEPHEN P.; DOUGLAS, L. JULIA. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. **Infection and immunity**, v. 62, n. 3, p. 915-921, 1994.

HAZEN, Kevin C. New and emerging yeast pathogens. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 4, p. 462-478, 1995.

HII, Moi *et al.* Changing epidemiology of candidemia in a medical center in middle Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 48, n. 3, p. 306-315, 2015.

IBRAHIM, Mohamad Nasir Mohamad *et al.* A concise review of the natural existance, synthesis, properties, and applications of syringaldehyde. **BioResources**, v. 7, n. 3, p. 4377-4399, 2012.

IWEN P.C., Kelly DM, Reed EC, Hinrichs SH. Invasive infection due to *Candida krusei* in immunocompromised patients not treated with fluconazole. **Clinical Infectious Diseases** 20:342-347, 1995.

JESSE RC, Rocha BTJ, Nogueira CW, Savegnago L. Further analysis of the antinociceptive action caused by p-methoxyl-diphenyl diselenide in mice. **Pharmacology, Biochemistry and behavior**, 2009, 91: 573-580.

JOSHI, K. R.; WHEELER, E. E.; GAVIN, J. B. The ultrastructure of *Candida krusei*. **Mycopathologia**, v. 56, n. 1, p. 5-8, 1975

JUNG, Hwa Jin; SEO, Young R. Current issues of selenium in cancer chemoprevention. **Biofactors**, v. 36, n. 2, p. 153-158, 2010.

KADE IJ, Paixão MW, Rodrigues OE *et al.* Comparative studies on dicholesteroyl diselenide and diphenyl diselenide as antioxidant agents and their effect on the activities of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase and delta-aminolevulinic acid dehydratase in the rat brain. **Neurochem Res**; 33(1): 167-178., 2008.

KANAFANI, Zeina A.; PERFECT, John R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 1, p. 120-128, 2008.

KAUR, Ravinder *et al.* Emergence of non-albicans *Candida* species and antifungal resistance in intensive care unit patients. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 5, p. 455-460, 2016.

KLOTZ, Lars-Oliver *et al.* Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 5, p. 1448S-1451S, 2003.

KÖHLER J.R. *et al.* Fungi that Infect Humans. **Microbiol Spectr.** 5 (3), 2017.

KUMAMOTO CA, GRESNIGT MS, HUBE B. The gut, the bad and the harmless: *Candida albicans* as a commensal and opportunistic pathogen in the intestine. **Curr Opin Microbiol.** Aug; 56:7-15, 2020.

KULLBERG, B. J. *et al.* Voriconazole versus a regimen of amphotericin B followed by fluconazole for candidaemia in non-neutropenic patients: a randomised non-inferiority trial. **The Lancet**, v. 366, n. 9495, p. 1435-1442, 2005.

KURTZMAN, Cletus; FELL, Jack W.; BOEKHOUT, Teun (Ed.). The yeasts: a taxonomic study. **Elsevier**, 2011.

LACAZ, C.S. *et al.* Drogas antifúngicas. Terapêutica das micoses. Provas de sensibilidade in vitro. Dosagem sangüínea. **Tratado de micologia médica**. São Paulo: Sarvier, 9 ed. p. 998-1067, 2002.

LANGENBECK B. Auffingung von Pilzen aus der Schleimhaut der Speiserohre einer Typhus-Leiche. **Neue Not Geb Natur-uHeilk (Froriep)**. 12: 145-147, 1839.

LATOUCHE, G. Nicolas *et al.* Comparison of use of phenotypic and genotypic characteristics for identification of species of the anamorph genus *Candida* and related teleomorph yeast species. **Journal of clinical microbiology**, v. 35, n. 12, p. 3171-3180, 1997.

LEVY, Stuart B.; O'BRIEN, Thomas F.; ALLIANCE FOR THE PRUDENT USE OF ANTIBIOTICS. Global antimicrobial resistance alerts and implications. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. Supplement\_4, p. S219-S220, 2005.

LIVERMORE, David M. Minimising antibiotic resistance. **The Lancet infectious diseases**, v. 5, n. 7, p. 450-459, 2005.

LORTHOLARY, Olivier *et al.* Worrysome trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002–2010). **Intensive care medicine**, v. 40, n. 9, p. 1303-1312, 2014.

MACCALLUM, Donna M. Hosting infection: experimental models to assay *Candida* virulence. **International journal of microbiology**, v. 2012, 2011.

MACHADO M. da S. *et al.* 3'3-Ditrifluoromethyldiphenyl diselenide: A new organoselenium compound with interesting antigenotoxic and antimutagenic activities. **Mutation Research**. 673 (2): 133-140, 2009.

MACHADO, C. F. **Efeito do Resveratrol em associação com compostos organocalcogênicos (PhSe)<sub>2</sub>, (MeOPhSe)<sub>2</sub>, (p-Cl-PhSe)<sub>2</sub> em *Candida albicans***. 2013.

19 f. TCC (Graduação)- Curso de Ciências Biológicas, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2013

MAGILL, Shelley S. *et al.* Multistate point-prevalence survey of health care– associated infections. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 13, p. 1198-1208, 2014.

MALUCHE, ME; SANTOS, JI. Candida sp. e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 40, n. 1, p. 65-67, 2008.

MARICHAL, Patrick *et al.* Contribution of mutations in the cytochrome P450 14 $\alpha$ demethylase (Erg11p, Cyp51p) to azole resistance in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 145, n. 10, p. 2701-2713, 1999.

MARIO, Débora Alves Nunes *et al.* The activity of echinocandins, amphotericin B and voriconazole against fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant Brazilian *Candida glabrata* isolates. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 3, p. 433-436, 2012.

MARTIN, Greg S. *et al.* The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 16, p. 1546-1554, 2003.

MARTINEZ, Jose Luis. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental pollution**, v. 157, n. 11, p. 2893-2902, 2009.

MATHEW, Bijoy P.; NATH, Mahendra. Recent approaches to antifungal therapy for invasive mycoses. **ChemMedChem**, v. 4, n. 3, p. 310-323, 2009.

MBA, I. E., & NWEZE, E. I. Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, 39(10), 1797–1819, 2020.

MERZ, W. G., *et al.* "Increased incidence of fungemia caused by *Candida krusei*." **Journal of Clinical Microbiology** 24.4, 581-584, 1986.

MIKULSKA, Małgorzata *et al.* Occurrence, presentation and treatment of candidemia. **Expert review of clinical immunology**, v. 8, n. 8, p. 755-765, 2012.

MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 142-151, 2011.

MOHANDAS, Vinitha; BALLAL, Mamatha. Distribution of *Candida* species in different clinical samples and their virulence: biofilm formation, proteinase and phospholipase production: a study on hospitalized patients in southern India. **Journal of global infectious diseases**, v. 3, n. 1, p. 4, 2011.

MORETTO, M. B. *et al.* Ebselen and diorganylchalcogenides decrease in vitro glutamate uptake by rat brain slices: prevention by DTT and GSH. **Toxicology in vitro**, v. 21, n. 4, p. 639-645, 2007.

MULLERMANN, F. A história do selênio. **Feeding Times**, n. 3, p. 4-19, 1999.

MURRAY, Patrick; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. Microbiología médica. **Elsevier Brasil**, 8ª ed. 2015.

NAGLIK, Julian R.; CHALLACOMBE, Stephen J.; HUBE, Bernhard. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 67, n. 3, p. 400-428, 2003.

NETT, Jeniel E. *et al.* Interface of *Candida albicans* biofilm matrix-associated drug resistance and cell wall integrity regulation. **Eukaryotic cell**, v. 10, n. 12, p. 1660- 1669, 2011.

NUCCI, Marcio *et al.* Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratorybased survey. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e59373, 2013.

O'BRIEN HE, Parrent JL, JACKSON JA, Moncalvo JM, VILGALYS R. 2005. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Appl Environ Microbiol** 71:5544–5550, 2005.

ODDS, Frank C.; BROWN, Alistair JP; GOW, Neil AR. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272-279, 2003.

OLIVEIRA, Vanessa Kummer Perinazzo *et al.* Fungemia caused by *Candida* species in a children's public hospital in the city of São Paulo, Brazil: study in the period 2007-2010. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 4, p. 301- 305, 2014.

OROZCO, Alison S. *et al.* Mechanism of Fluconazole Resistance in *Candida krusei*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 10, p. 2645-2649, 1998

OLSZEWER, E. **Tratado de medicina molecular e bioquímica médica**. São Paulo: Ícone, 2002.

PAPPAS, P. G., *et al.* Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.** 48:503–535, 2009.

PAPON, Nicolas *et al.* Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 9, p. e1003550, 2013.

PANNANUSORN, Srisuda; FERNANDEZ, Victor; RÖMLING, Ute. Prevalence of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species causing bloodstream infection. **Mycoses**, v. 56, n. 3, p. 264-272, 2013.

PETROGNANI, N., Rodrigues, R., Comasseto, J. V. 1976. Organomet. **Chem.** 144-281.

PFALLER, Michael A. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. **Clinical infectious diseases**, v. 22, n. Supplement\_2, p. S89-S94, 1996.

PFALLER, M. A. *et al.* *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal

Surveillance Program, 2001 to 2005. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 2, p. 515-521, 2008.

PFALLER, Michael A. *et al.* *Candida* bloodstream infections: comparison of species distributions and antifungal resistance patterns in community-onset and nosocomial isolates in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2008-2009. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 561-566, 2011.

PFALLER, Michael A.; JONES, Ronald N.; CASTANHEIRA, Mariana. Regional data analysis of *Candida non-albicans* strains collected in United States medical sites over a 6-year period, 2006–2011. **Mycoses**, v. 57, n. 10, p. 602-611, 2014.

PFALLER, Michael A. *et al.* CD101, a long-acting echinocandin, and comparator antifungal agents tested against a global collection of invasive fungal isolates in the SENTRY 2015 Antifungal Surveillance Program. **International journal of antimicrobial agents**, v. 50, n. 3, p. 352-358, 2017.

PIERCE, Christopher G. *et al.* The *Candida albicans* Biofilm Matrix: Composition, Structure and Function. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 14, 2017.

PINTON S, Rocha JT, Gai BM, Prigol M, Rosa LV, Nogueira CW. Neuroprotector effect of p,p'-methoxyl-diphenyl diselenide in a model of sporadic dementia of Alzheimer's type in mice: contribution of antioxidant mechanism. **Cell Biochemistry and function**, 29: 245-243, 2011.

POTERA, Carol. Forging a link between biofilms and disease. **Microbiology**, 1999.

PRATES, Renato A. *et al.* The irradiation parameters investigation of photodynamic therapy on yeast cells. In: Mechanisms for Low-Light Therapy III. **International Society for Optics and Photonics**, p. 684606, 2008.

RAMAGE, Gordon *et al.* Our current understanding of fungal biofilms. **Critical reviews in microbiology**, v. 35, n. 4, p. 340-355, 2009.

RAMAGE, Gordon *et al.* Fungal biofilm resistance. **International journal of microbiology**, v. 2012, 2012.

REX, John H. *et al.* Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. 2, p. 235-247, 1997.

REX, John H. *et al.* Practice guidelines for the treatment of candidiasis. **Clinical infectious diseases**, v. 30, n. 4, p. 662-678, 2000.

RICHARDSON MD, Warnock DW. Fungal Infection: Diagnosis and Management, 3rd edn. **Oxford: Blackwell Publishing**, 2003.

RICHARDSON, Malcolm D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. suppl\_1, p. i5-i11, 2005.

ROSSETI IB., *et al.* *Candida albicans* growth and germ tube formation can be inhibited by simple diphenyl diselenides [(PhSe)<sub>2</sub>, (MeOPhSe)<sub>2</sub>, (p-Cl-PhSe)<sub>2</sub>, (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub>] and diphenyl ditelluride. **Rev. Mycoses**; 54 (6): 506-513, 2010.

SALES JÚNIOR, João Andrade L. *et al.* An epidemiological study of sepsis in Intensive Care Units: Sepsis Brazil study. **Revista Brasileira de terapia intensiva**, v. 18, n. 1, p. 9-17, 2006.

SAMARANAYAKE, Yuthika H.; SAMARANAYAKE, L. P. *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. **Journal of medical microbiology**, v. 41, n. 5, p. 295-310, 1994.

SANGLARD, Dominique; ODDS, Frank C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 73-85, 2002.

SANTOS DB, Schiar VP, Paixão MW *et al.* Hemolytic and genotoxic evaluation of organochalcogens in human blood cells *in vitro*. **Toxicology in Vitro**, 23 (6): 1195-1204, 2009.

SANTOS, D *et al.* Genotoxicity of organoselenium compounds in human leukocytes in vitro. **Mutation Research**, n. 676, p. 21-26, 2009.

SCHIAR VP, Dos Santos DB, Lüdtke DS *et al.* Screening of potentially toxic chalcogens in erythrocytes. **Toxicol in Vitro**; 21(1): 139-145, 2007.

SENEVIRATNE, C. J.; JIN, L.; SAMARANAYAKE, L. P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral diseases**, v. 14, n. 7, p. 582-590, 2008.

SHEMER, Revital *et al.* A highly polymorphic degenerate microsatellite for molecular strain typing of *Candida krusei*. **Microbiology**, v. 147, n. 8, p. 2021-2028, 2001.

SIES, Helmut; ARTEEL, Gavin E. Interaction of peroxynitrite with selenoproteins and glutathione peroxidase mimics. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 10, p. 1451-1455, 2000.

SILVA V.; M CRISTINA DÍAZ J.; NALDY FEBRÉ Y. Red De Diagnóstico En Micología Médica. Vigilancia De La Resistencia De Leveduras A Antifúngicos. **Rev. Chil. Infectol. Santiago** v.19 Supl.2, 2002.

SILVA, Eliézer *et al.* Brazilian sepsis epidemiological study (BASES study). **Critical Care**, v. 8, n. 4, p. R251, 2004.

SILVA, Sónia *et al.* *Candida* species biofilm's antifungal resistance. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 8, 2017.

SPAMPINATO, Claudia; LEONARDI, Darío. *Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

SOUZA, Marcelo Duarte; NEUFELD, Paulo Murillo. Infecções fúngicas nosocomiais correlacionadas a *Candida spp.*: incidência e distribuição de espécies na 87 região metropolitana do Rio de Janeiro. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 4, n. 4, p. 97-110, 2016.

STANISZEWSKA, Monika. Virulence Factors in *Candida* species. **Current protein & peptide science** vol. 21,3: 313-323, 2020.

SUDBERY, Peter E. The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization. **Molecular microbiology**, v. 41, n. 1, p. 19-31, 2001.

SUH, Sung-Oui *et al.* Phylogenetics of *Saccharomycetales*, the *ascomycete* yeasts. **Mycologia**, v. 98, n. 6, p. 1006-1017, 2006.

THEIN, Zaw M.; SAMARANAYAKE, Yuthika H.; SAMARANAYAKE, LAKSHMAN P. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and *non-albicans Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. **Archives of oral biology**, v. 52, n. 8, p. 761- 767, 2007.

TORTORA, Gerard J.; CASE, Christine L.; FUNKE, Berdell R. **Microbiologia-12<sup>a</sup>** Edição. Artmed Editora, 2016.

WHO: World Health Organization. The Evolving Threat of Antimicrobial Resistance. **Options for Action**. WHO, Geneva, Switzerland, 2012.

WILLE, Marcos Paulo *et al.* Historical trends in the epidemiology of candidaemia: analysis of an 11-year period in a tertiary care hospital in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, p. 288-292, 2013.

WINGARD, John R. *et al.* Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. **New England Journal of Medicine**, v. 325, n. 18, p. 1274-1277, 1991.

WINGARD John R. Importance of *Candida* species other than *C. albicans* as pathogens in oncology patients. **Clinical Infectious Diseases** 20: 115-125, 1995.

WISPLINGHOFF H, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Current trends in the epidemiology of nosocomial bloodstream infections in patients with haematological

malignancies and solid neoplasms in hospitals in the USA. **Clin Infect Dis**; 36:1103–1110, 2003.

WISPLINGHOFF, Hilmar *et al.* Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. **Clinical infectious diseases**, v. 39, n. 3, p. 309-317, 2004

WISSING, Heimo *et al.* Intensive care unit-related fluconazole use in Spain and Germany: patient characteristics and outcomes of a prospective multicenter longitudinal observational study. **Infection and drug resistance**, v. 6, p. 15, 2013.