



UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Gabriela de Souza Calvi

**Efeito dos compostos de organoselênio (PhSe)₂, (MeOPhSe)₂, (p-Cl-PhSe)₂ em biofilmes
dupla-espécie de *Candida albicans* e *Candida krusei***

Effect of organoselenium compounds (PhSe)₂, (MeOPhSe)₂, (p-Cl-PhSe)₂ on dual-species
biofilms of *Candida albicans* and *Candida krusei*

São José dos Campos
2024

Gabriela de Souza Calvi

**Efeito dos compostos de organoselênio (PhSe)₂, (MeOPhSe)₂, (p-Cl-PhSe)₂ em biofilmes
dupla-espécie de *Candida albicans* e *Candida krusei***

Dissertação apresentada ao Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Prof. Dra. Maricília Silva Costa

São José dos Campos
2024

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Calvi, Gabriela de Souza
Efeito dos compostos de organoselênio (PhSe)₂, (MeOPhSe)₂,
(p-Cl-PhSe)₂ em biofilmes dupla-espécie de *Candida albicans* e
Candida krusei / Gabriela de Souza Calvi; orientadora, Profa.
Dra. Maricilia Silva Costa. - São José dos Campos, SP, 2024.
1 CD-ROM, 68 p.

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

Inclui referências

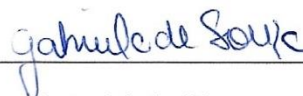
1. Engenharia Biomédica. 2. *Candida albicans*. 3. Biofilme. I.
Costa, Profa. Dra. Maricilia Silva, orient. II. Universidade do
Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Biomédica. III. Título.

Eu, Gabriela de Souza Calvi, 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, 19 de Setembro de 2024.



Autor(a) da Obra

Data da defesa: 31 / 07 / 2024

GABRIELA DE SOUZA CALVI

**"EFEITO DOS COMPOSTOS DE ORGANOSELÊNIO($PhSe$)₂, ($MeOPhSe$)₂, ($p-Cl-PhSe$)₂ em biofilmes
dupla-espécie de *Candida albicans* e *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:

| | |
|------------------------|------------------------------|
| Renata de A. Canevari | <i>Renata de A. Canevari</i> |
| Maricília S. Costa | <i>Maricília S. Costa</i> |
| Carlos Alberto – Silva | <i>Carlos A. Silva</i> |

Prof.^a Dr.^a Juliana Ferreira Strixino

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 31 de julho de 2024.

DEDICATÓRIA

Esta dissertação dedico ao meu marido Uriel Cairê Balan Calvi, pois o seu apoio foi essencial para a construção deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu marido por todo o apoio que me deu, não só durante, como até antes de iniciar minha jornada acadêmica. Aos meus pais, pois sem sua criação e valores, eu não estaria aqui. Agradeço a minha orientadora, por todo o discernimento e direção que me proporcionou neste trabalho. Sou grata também aos meus colegas de laboratório pelo auxílio e aprendizado durante a pesquisa. Por fim, agradeço a CAPES pelo apoio financeiro que me foi confiado.

*“O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice. Colhe, pois, a
sabedoria. Armazena suavidade para o amanhã.”*

- Leonardo da Vinci

RESUMO

O gênero *Candida* é o mais comumente isolado em culturas de pacientes acometidos com infecções causadas por fungos. A espécie *Candida albicans* é, entre o gênero, a mais comum, e a espécie *Candida krusei*, é considerada emergente. Ambas as espécies já demonstram resistência aos fármacos convencionais, como o fluconazol e as equinocandinas. Além disso, ambas são plenamente capazes de formar biofilmes. Biofilmes são estruturas complexas capazes de abrigar mais de uma espécie de microrganismo, alcançando características ainda mais resistentes. Os compostos de organoselênio, principalmente o disseleneto de difenila e derivados, são estruturas químicas simples que apresentam atividade antifúngica, tornando-os promissores para a inibição de biofilmes dupla-espécie. O objetivo da pesquisa foi analisar o efeito dos compostos (PhSe)₂, (MeOPhSe)₂, (p-Cl-PhSe)₂ nas fases de adesão de ambas as espécies em conjunto, e no biofilme misto, nas fases de formação e biofilme maduro. Para a formação dos biofilmes, foram utilizados dois meios, o RPMI-1640 e o Sabouraud dextrose. Para avaliar a viabilidade dos biofilmes, foi mensurada a atividade metabólica, e a diferenciação das espécies por *CHROMagar Candida*® foi realizada. Os resultados demonstram que os compostos possuem capacidade de inibir os biofilmes dupla-espécie, especialmente nas fases de adesão e formação. O composto (MeOPhSe)₂ demonstrou capacidade de inibir a formação dos biofilmes dupla-espécie, obtendo resultados de até 95%, sendo mais significativo que (PhSe)₂ e (p-Cl-PhSe)₂ que inibiram a formação em 56% e 27% respectivamente. Sendo assim, conclui-se que os compostos de organoselênio são terapias promissoras para o combate destes biofilmes.

Palavras-chave: *Candida spp.*; biofilme; compostos de organoselênio; resistência fúngica; terapia antifúngica.

ABSTRACT

Candida is the most common genus isolated in patient cultures affected with fungal infections. The *Candida albicans* species is, among the genus, the most common; and the *Candida krusei* is considered emergent. Both species have already demonstrated resistance to conventional drugs. Furthermore, both species are capable of forming biofilms. Biofilms are *complex structures capable of harboring more than one microorganism species, reaching* characteristics even more resistant. The organoselenium compounds, mainly diphenyl diselenide and derivatives, are chemical structures that demonstrate antifungal activity, making them auspicious alternatives to inhibit dual-species biofilms. The research purpose was to analyse the effect of (PhSe)₂, (MeOPhSe)₂ and (p-Cl-PhSe)₂ in biofilm adhesion and formation; and in mature biofilm. To create biofilms, two media were used: RPMI-1640 and Sabouraud Dextrose-broth. To analyse the biofilm viability, the metabolic activity was measured, and to differentiate the species, CHROMagar was used. The results show that these compounds are able to inhibit the dual-species biofilms, particularly in the adhesion and formation phases. The compound (MeOPhSe)₂ demonstrated the ability to inhibit the formation of dual-species biofilms, obtaining results of up to 95%, being more significant than (PhSe)₂ and (p-Cl-PhSe)₂, which inhibited the formation by 56% and 27% respectively. Therefore, it is concluded that organoselenium compounds are promising therapies for combating these biofilms.

Key words: *Candida spp.*; biofilm, organoselenium compounds; fungal resistance; antifungal therapy.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Estrutura do biofilme de <i>Candida albicans</i> formado em meio RPMI-1640..... | 24 |
| Figura 2 – Estrutura do biofilme de <i>Candida krusei</i> formado em meio RPMI-1640 | 25 |
| Figura 3 – Ilustração das fases de formação de um biofilme de <i>Candida spp.</i> | 26 |
| Figura 4 – Ciclo da dispersão de um biofilme maduro de <i>Candida spp.</i> | 26 |
| Figura 5 – Estrutura química do $(\text{PhSe})_2$ | 29 |
| Figura 6 – Estrutura química do $(\text{MeOPhSe})_2$ | 30 |
| Figura 7 – Estrutura química do $(\text{pCl-PhSe})_2$ | 30 |
| Figura 8 – Esquema da diluição seriada para plaqueamento no CHROMagar <i>Candida</i> ® | 33 |
| Figura 9 - Efeito do composto $(\text{MeOPhSe})_2$ em meio RPMI-1640 e SD na adesão de biofilme dupla-espécie de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida krusei</i> cultivados em em meio RPMI- 1640 e SD. | 36 |
| Figura 10 – Efeito do composto $(\text{PhSe})_2$ em meio RPMI-1640 e SD na adesão de biofilme dupla- espécie de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida krusei</i> | 37 |
| Figura 11 - Efeito do composto $(\text{p-Cl-PhSe})_2$ em meio RPMI-1640 na adesão biofilme dupla- espécie de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida krusei</i> | 38 |
| Figura 12 –Biofilmes dupla-espécie de <i>Candida spp.</i> cultivados em meio RPMI-1640 e aderidos na presença de $30\mu\text{M}$ de compostos de organoselênio. | 39 |
| Figura 13 – Efeito dos compostos de organoselênio na formação de biofilme dupla-espécie de <i>Candida spp.</i> em meio RPMI-1640 e SD..... | 40 |
| Figura 14 – Imagens de biofilmes dupla-espécie de <i>Candida spp.</i> formados com a presença dos compostos de organoselênio ($30\mu\text{M}$) em meio RPMI-1640. | 41 |
| Figura 15 – Imagens de biofilmes dupla-espécie de <i>Candida spp.</i> cultivados na presença de $30\mu\text{M}$ de $(\text{MeOPhSe})_2$ em meio SD..... | 42 |
| Figura 16 – Efeito dos compostos de organoselênio em biofilmes maduros dupla-espécie de <i>Candida spp.</i> cultivados em meio RPMI-1640 e SD | 43 |
| Figura 17 – Comparação entre os biofilmes dupla-espécie de <i>Candida spp.</i> tratados no período de formação e na fase de biofilme maduro, em meio RPMI-1640. | 44 |
| Figura 18 – Placa contendo CHROMagar <i>Candida</i> ® semeada com inóculo utilizado para o experimento em iguais proporções de <i>Candida albicans</i> / <i>Candida krusei</i> | 45 |
| Figura 19 – Placas contendo CHROMagar <i>Candida</i> ® semeadas com biofilme dupla-espécie de <i>Candida albicans</i> e <i>Candida krusei</i> em meio RPMI-1640 e SD. | 46 |

| | |
|--|----|
| Figura 20 – Contagem de UFCs provenientes da raspagem de biofilmes dupla-espécie de <i>Candida</i> spp. na presença de (MeOPhSe) ₂ e (PhSe) ₂ semeados em CHROMagar <i>Candida</i> ® | 47 |
| Figura 21 – Contagem de UFCs provenientes da raspagem de biofilmes maduros dupla-espécie de <i>Candida</i> spp. tratados com (MeOPhSe) ₂ e (PhSe) ₂ semeados em CHROMagar <i>Candida</i> ® | 48 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Grupos de fungos definidos, pela OMS, por escala de prioridade (crítica, alta e média), para descoberta de novas estratégias e terapias clínicas..... | 18 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Céls/mL – Células viáveis por mL

COs – Compostos de organoselênio

DNA - deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

ESKAPE - *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.*

MRSA - methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina).

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS - phosphate buffered saline (tampão fosfato-salino)

SD – Sabouraud Dextrose

Spp. – Species (Espécies)

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

VRE - Vancomycin-Resistant *Enterococcus spp* (*Enterococcus spp* resistente a vancomicina).

WHO – World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

μL – microlitro

$\mu\text{g/mL}$ – micrograma por mL

μM – micromolar

% – porcentagem

DO – densidade óptica

mL – mililitro

h – horas

$^{\circ}\text{C}$ – graus celsius

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 17 |
| 2.1 | Infecções hospitalares e resistência antimicrobiana..... | 17 |
| 2.2 | <i>Candida spp.</i> | 19 |
| 2.2.1 | <i>Candida albicans</i> | 20 |
| 2.2.2 | <i>Candida krusei</i> | 21 |
| 2.3 | Biofilmes..... | 23 |
| 2.3.1 | Biofilmes polimicrobianos | 27 |
| 2.4 | Compostos de organoselênio..... | 28 |
| 3 | OBJETIVOS | 31 |
| 3.1 | Objetivos específicos | 31 |
| 4. | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 32 |
| 4.1 | Cultura de <i>Candida spp.</i> e condições de crescimento..... | 32 |
| 4.2 | Ensaio de atividade metabólica – XTT | 32 |
| 4.3 | Ensaio CHROMagar <i>Candida</i> ® | 32 |
| 5.4 | Preparo dos Compostos de Organoselênio | 33 |
| 5.5 | Preparação dos biofilmes | 34 |
| 5.6 | Efeito dos COs sobre a adesão de <i>Candida spp.</i> | 34 |
| 5.6 | Efeito dos COs sobre a formação de biofilme de <i>Candida spp.</i> | 34 |
| 5.7 | Efeito dos COs sobre o biofilme maduro de <i>Candida spp.</i> | 35 |
| 5.8 | Análise estatística..... | 35 |
| 6 | RESULTADOS | 36 |
| 6.1 | Efeito dos compostos de organoselênio na adesão de biofilmes de <i>Candida spp.</i> | 36 |
| 6.2 | Efeito dos compostos de organoselênio na formação de biofilmes de <i>Candida spp.</i> | 39 |
| 6.3 | Efeito dos compostos de organoselênio em biofilmes maduros de <i>Candida spp.</i> | 42 |
| 6.8 | Resultados do Ensaio <i>CHROMagar Candida</i> ® | 45 |
| 7 | DISCUSSÃO | 49 |
| 8 | CONCLUSÕES | 55 |
| | REFERÊNCIAS..... | 57 |

1 INTRODUÇÃO

As infecções nosocomiais são de extrema importância para a saúde pública mundial, devido ao alto índice de morbimortalidade envolvido. Diversos microrganismos são associados a essa complicação, causando altos impactos para a saúde da população, incluindo longa permanência em instituições de saúde, sobrecarga do sistema, e ainda estão envolvidos com a resistência aos agentes antimicrobianos. (Drohan, *et al.*, 2019; Kollef, *et al.*, 2021).

Os fungos do gênero *Candida spp.* são leveduras presentes na microbiota humana, principalmente no trato gastrointestinal. No entanto, em situações de comprometimento da imunidade do hospedeiro, as espécies podem se tornar hostis para a saúde humana. Essa característica torna essas espécies de grande relevância clínica, especialmente quando se tratam de pacientes imunocomprometidos internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e em infecções de corrente sanguínea (Rodriguez-Cerdeira *et al.*, 2018; Suleyman, Alangaden, 2021).

A espécie *Candida albicans* é a mais comumente envolvida em infecções sistêmicas causadas por fungos, sendo a sua capacidade de formar biofilmes um dos mais importantes fatores associados ao alto nível de virulência apresentado. Acredita-se que essa capacidade intrínseca seja possível devido a sua habilidade de realizar a transição de sua forma leveduriforme para a filamentosa. A maneira como as células da espécie *Candida albicans* se comportam em seus biofilmes as tornam mais aderentes ao tecido do hospedeiro, permitindo maior capacidade de multiplicação e formação de novos biofilmes (Wall *et al.*, 2019; Pereira *et al.*, 2021).

As infecções por espécies de *Candida spp. não-albicans*, contudo, aumentaram expressivamente nos últimos anos, incluindo a infecção pela espécie *Candida krusei*. Apesar de menos frequente em culturas isoladas em indivíduos com candidemia, a espécie é associada a uma alta taxa de mortalidade devido sua resistência natural ao fluconazol, antifúngico de primeira escolha para tratamento de candidíases. Entretanto, um estudo realizado em um hospital terciário no norte da Índia, a espécie *Candida krusei* foi responsável por 44% dos casos de candidemias em pacientes neonatais internados em UTI com idade média de 13 di-as, justificando sua relevância clínica (Kaur *et al.*, 2020; Jamiu *et al.*, 2020).

As estruturas chamadas de biofilmes são formadas por microrganismos quando estes ficam agrupados e aderidos a uma superfície que pode ser biótica ou abiótica. Apresentam-se como um arranjo de moléculas que compõem uma matriz extracelular de polímeros que consistem em ácidos nucleicos, lipídios e proteínas. Os biofilmes são importantes clinicamente porque apresentam um fator de proteção aos agentes etiológicos envolvidos, oferecendo maior

resistência a células da imunidade do hospedeiro e aos agentes antimicrobianos utilizados e, ainda, um alto risco de causar uma infecção na corrente sanguínea (Karygianni *et al.*, 2020).

Dentro do tratamento proposto, os principais agentes antifúngicos disponíveis são os da classe dos azólicos, sendo o fluconazol o primeiro medicamento escolhido no tratamento de *Candida albicans*. O mecanismo de ação do fluconazol se baseia no impedimento do crescimento das leveduras e não em sua morte, tornando-o mais propício a resistência fúngica (Lu *et al.*, 2021). Por essa razão, há um grande número de infecções complicadas provocadas por *Candida spp.* também resistentes aos antifúngicos convencionais, que ocasionam alta incidência de infecções de corrente sanguínea em Unidades de Terapia Intensiva, necessitando de outros medicamentos mais eficazes, como a Anfotericina B, droga de escolha em infecções invasivas por fungos do gênero *Candida spp.* No entanto, a Anfotericina B é uma droga potencialmente nefrotóxica, que pode agravar o quadro de um paciente já em estado crítico (Zaragoza; Maseda; Pemán, 2021; LU *et al.*, 2021).

Portanto, muito se tem estudado sobre as formas de impedir e combater infecções, pensando na resistência microbiana aos variados antibióticos e antifúngicos disponíveis. Os Compostos de Organoselênio (COs), ou Compostos Organocalcogêneos, demonstraram-se capazes de inibir alguns microrganismos, apresentando atividades antifúngicas, antibacterianas e antivirais *in vitro* (da Silva, *et al.*, 2021; Larsson; Flatch, *et al.*, 2022; Munhoz *et al.* 2023; Wildner *et al.*, 2023).

Os COs são estruturas sintéticas e orgânicas que possuem características responsáveis por ações anti-inflamatórias. Em microrganismos, os COs podem causar danos na estrutura do DNA, proporcionando a função antimicrobiana desses compostos (Rosseti *et al.*, 2014; Siqueira, 2022).

Em um estudo de Munhoz *et al.* (2023), o composto (PhSe)₂, conhecido como disseleneto de difenila, nas concentrações de 5 a 10mg/kg obteve resultados significativos na inibição de *Sporothrix brasilienses*, fungo responsável pela esporotricose em felinos. Em estudos anteriores já se constatou efeitos antimicrobianos dos compostos (PhSe)₂, (MeOPhSe)₂, (p-Cl-PhSe)₂ no tubo germinativo, crescimento e biofilmes nas cepas *C. albicans* e *C. krusei* separadamente, além da adesão em células *HeLa* obtendo resultados promissores (Rosseti *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2021; Siqueira, *et al.*, 2022).

Sendo assim, considera-se importante a descoberta de novas terapias antifúngicas para modelos de biofilmes dupla-espécie de *Candida albicans* e *Candida krusei*, levando em conta a atual problemática da resistência microbiana e a importância dos biofilmes nesse contexto.

Os COs podem ser uma alternativa, considerando a sua ação antifúngica em ambas as espécies separadamente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INFECÇÕES HOSPITALARES E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Infecções nosocomiais estão associadas a altas taxas de morbimortalidade em todo o mundo. Geralmente, essas infecções estão presentes em pacientes graves, onde há a necessidade de intervenções mais invasivas, como implantação de cateteres venosos, principalmente centrais, ventilação mecânica e cateteres urinários (Li et al., 2017; Liu; Dickter, 2020).

Em unidades destinadas a serviços de saúde, há uma grande circulação de agentes patológicos, incluindo bactérias, vírus, fungos e parasitas. Diferentes tipos desses agentes podem ser encontrados nas superfícies dessas unidades, podendo persistir por meses (Kramer *et al.*, 2006; Xia *et al.*, 2016).

A microbiota humana que circula em ambientes hospitalares geralmente é composta por microrganismos resistentes, que já foram expostos a múltiplos antimicrobianos. Além disso, fatores como a ventilação, composição de superfícies e antissepsia, podem influenciar a população de microrganismos presentes em um ambiente destinado a cuidados de saúde (Lax; Gilbert, 2015).

Os altos custos envolvidos no tratamento, o adiamento das internações e o alto grau de sofrimento envolvido, são fatores relacionados a infecções nosocomiais e que preocupam a comunidade médica (Saint; Veenstra; Lipsky, 2000).

A sepse é a consequência mais grave da infecção nosocomial, e ela pode ser definida como uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica que ocorre na presença de uma infecção. Caracteriza-se por um quadro de alterações fisiopatológicas relacionadas a resposta imune, desencadeando alterações generalizadas nas funções vitais. Análises mais profundas sobre a fisiopatologia da sepse indicam que a síndrome inclui danos celulares e alterações no padrão de coagulação (Mayer *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 2019).

Pode-se citar, como um problema relacionado a infecções nosocomiais, a resistência antimicrobiana. A resistência adquirida pelos microrganismos vem sendo estudada com mais afinco desde a década de 1990, iniciando com dois patógenos principais: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e *Enterococcus* resistentes a vancomicina (VRE). Depois disso, foram isolados novos agentes que demonstravam certo tipo de resistência incluindo outras espécies de *Staphylococcus*, assim como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella Pneumoniae* e *Escherichia coli* (Neely; Holder, 1998.; Snary *et al.*, 2004).

Para tentar controlar a disseminação dos patógenos resistentes no Brasil, a venda doméstica de antibióticos das mais variadas classes foi restringida desde 2011. Porém, no ambiente hospitalar a prescrição e administração de antibióticos pode não seguir critérios tão rígidos, criando uma situação propícia ao surgimento de microrganismos multirresistentes (Tognim; Cardoso, 2016).

A resistência aos antimicrobianos é uma preocupação da Organização Mundial da Saúde (OMS), pois se caracteriza como um problema global. Em relação aos agentes bacterianos, um grupo denominado *ESKAPE* foi criado para englobar os principais agentes multirresistentes que necessitam de novos antibióticos, são agentes desse grupo: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter* (De Oliveira *et al.*, 2020).

Além de bactérias, os fungos também são alvos de estratégias e ações da OMS. Em uma lista de fungos patogênicos prioritários (Tabela 1), são esclarecidas as espécies principais relacionadas às doenças fúngicas invasivas em humanos, justificando ações importantes e instigando a descoberta de novos métodos antifúngicos. A questão se tornou mais visível durante a pandemia de Sars-Cov-2, em 2020, após surgirem diagnósticos de coinfeções por fungos em pacientes diagnosticados com COVID-19 (Parums, 2022; Fisher; Denning, 2023).

Tabela 1 – Grupos de fungos definidos, pela OMS, por escala de prioridade (crítica, alta e média), para descoberta de novas estratégias e terapias clínicas.

| Crítica | Alta | Média |
|--------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | <i>Candida glabrata</i> | <i>Scedosporium spp.</i> |
| <i>Aspergillus fumigatus</i> | Eumycetoma | <i>Lamentospora prolificans</i> |
| <i>Candida auris</i> | <i>Fusarium spp.</i> | <i>Coccidioides spp.</i> |
| <i>Candida albicans</i> | <i>Candida parapsilosis</i> | <i>Candida krusei</i> |
| | <i>Histoplasma spp.</i> | <i>Cryptococcus gatti</i> |
| | Mucorales | <i>Talaromyces marneffeii</i> |
| | <i>Candida tropicalis</i> | <i>Pneumocystis jirovecii</i> |
| | | <i>Paracoccidioides spp.</i> |

Fonte: OMS (2022).

2.2 CANDIDA SPP.

Os fungos do gênero *Candida spp.* são leveduras comensais, presentes na microbiota humana saudável em abundância, principalmente no trato gastrointestinal. Quando há a alteração da microbiota, por algum procedimento invasivo ou redução da imunidade do hospedeiro, os fungos do gênero *Candida* passam de comensais para microrganismos oportunistas. Por esse motivo, o gênero é o mais importante grupo de fungos para a clínica (Polke *et al.*, 2015; Kreulen *et al.*, 2023).

Além da mucosa intestinal, a colonização da cavidade oral pelo gênero *Candida* é também conhecida. A candidíase oral é uma infecção comum, causada pelo crescimento exacerbado dos fungos na boca. Em pacientes em tratamento com radioterapia, em razão de câncer de cabeça e pescoço, a presença de culturas orais positivas de *Candida* podem significar maior predisposição para mucosite oral severa, condição que afeta a qualidade de vida do paciente oncológico, prejudicando a alimentação e fala, de maneira dolorosa e incômoda (Williams; Lewis, 2000; Rupe *et al.*, 2022).

Candida albicans é a espécie mais comum e maior responsável por candidíases e candidemias, sua relevância clínica é tão alta que as outras espécies são englobadas em um único grupo denominado *não-albicans*. Entre esse grupo, se encontram as espécies *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida dubliensis* e *Candida auris*. Em um estudo no Reino Unido, em dois centros de cuidado em saúde, apenas *Candida albicans* foi responsável por 45% dos casos de candidemias, sendo o restante distribuídas as outras espécies. No Brasil, estudos epidemiológicos demonstram que em infecções da corrente sanguínea causadas por *Candida spp.*, *Candida albicans* é responsável por 35-60% dos casos (Melo *et al.*, 2019; Canela *et al.*, 2020; Mba; Nweze, 2020; Raja, 2021).

A facilidade para invadir os tecidos dos hospedeiros se deve a alguns mecanismos. As espécies de *Candida* são capazes de se adaptar a diversas situações físicas e químicas presentes no organismo humano, como mudanças de temperatura e pH transitórias, escassez de nutrientes e carbono. As adaptações são parcialmente resultado da composição de sua parede celular, a qual estão presentes manoproteínas, glucanas e quitina. Essa facilidade em se adaptar a condições adversas e a secreção de proteases e fosfolipases, permitem sua aderência e invasão tecidual, explicando a alta virulência (Pappas *et al.*, 2018; Mba; Nweze, 2020).

Os antifúngicos são as drogas de escolha para combater infecções por *Candida spp.*, sendo os mais usados os da classe dos azólicos (fluconazol, itraconazol, ravuconazol, posaconazol e voriconazol), as equinocandinas (caspofungin, anidulafungin e micafungin) e a

Anfotericina B. Porém, as cepas de *Candida spp.* podem apresentar resistência a todos esses antifúngicos, em maior ou menor grau (Salci *et al.*, 2018; Pristov; Ghannoum, 2019).

Os azólicos agem bloqueando a síntese de ergosterol nas células fúngicas, atrapalhando a ação da lanosterol-14a-demethylase. Já as equinocandinas, inibem a síntese da principal proteína que compõe a parede celular, a (1,3)- β -D-glucan. No caso da Anfotericina B, ela também possui ação no ergosterol, mas não inibitória. A droga se liga ao esterol causando poros, e conseqüentemente maior permeabilidade na membrana celular, ocasionando a perda de íons (Maubon *et al.*, 2014).

Um estudo de Cook *et al.* (2023) utilizando uma base de dados contendo informações sobre pacientes neonatais em países do continente africano e asiático, concluiu que em 35% dos casos de candidemias, a cepa *Candida albicans* foi isolada; e 73% de todos os casos foram tratados com Anfotericina B. Entretanto, sabe-se que a Anfotericina B pode causar efeitos adversos graves, como disfunções renais. Em pacientes graves e hospitalizados, utilizando múltiplas drogas, e lidando com descompensações generalizadas, a administração de Anfotericina B pode, em algumas vezes, significar o agravamento do caso (Suberviola, 2021).

2.2.1 *Candida albicans*

A levedura *Candida albicans*, quando em seu estado comensal, pode até ser considerada benéfica para o organismo humano. Sua presença é indispensável para criar uma imunidade treinada e induzir o reconhecimento de linfócitos T, impedindo a infecção invasiva (Kumamoto; Gresnigt; Hube, 2020).

A espécie compete com grupos bacterianos também comensais, sendo algumas dessas bactérias responsáveis por manter o equilíbrio de *Candida albicans* na mucosa intestinal. Por essa razão, o uso de antibióticos de amplo espectro de forma prolongada pode causar disbiose intestinal, provocando um caso de candidíase (Gutierrez *et al.*, 2020; D'enfert *et al.*, 2021).

Um estudo de Guinan & Thangamani (2018) relacionou o aumento das concentrações de ácido taurocólico no intestino do hospedeiro com o aumento do crescimento de *Candida albicans*. Os autores afirmam que, o aumento da concentração deste ácido em seres humanos se deve a redução da população bacteriana no microbioma intestinal.

A espécie *Candida albicans* pode transitar da mucosa intestinal e colonizar o trato genital feminino com frequência, causando episódios de candidíase vaginal. A candidíase vulvovaginal é a principal causa de infecções no trato sexual feminino depois da vaginose bacteriana (Ester; Lopez, 2013). A candidíase do trato sexual feminino pode se tornar um

incômodo para as pacientes que a vivenciam, causando prurido, irritação, dispareunia e aumento das secreções vaginais. Em algumas situações, a infecção pode se tornar recorrente, pois a espécie *Candida albicans* possui facilidade em aderir as células epiteliais da vagina. O antifúngico fluconazol, administrado por via oral, é o tratamento mais prescrito pelos médicos para essa condição, seguidos por azólicos de uso tópico (Sobel, 2016).

Biofilmes da espécie *Candida albicans* foram encontrados em Dispositivos Intrauterinos (DIU), por Zahran *et al.* (2015), demonstrando que, quando não corretamente tratadas, as candidíases vaginais podem migrar do trato sexual inferior e causar infecção intrauterina. A espécie não possui dificuldade em aderir a superfície do DIU, representando risco para mulheres que usam o dispositivo e apresentem candidíase.

A espécie *Candida albicans* possui uma característica que pode determinar sua resistência e virulência, esses fungos possuem a capacidade de transitar entre três morfologias: leveduras, pseudohifas e hifas. Inclusive, a espécie é a única que consegue adquirir a forma de hifas verdadeiras. As estruturas chamadas de hifas surgem durante condições determinadas, são alongadas, promovendo um sistema filamentososo complexo e possuem grande capacidade invasiva (Shepherd; Poulter; Sullivan, 1985; Witchley *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2020).

Além de seu polimorfismo, *Candida albicans* possui outros mecanismos para garantir sua virulência e resistência aos antifúngicos convencionais, principalmente da classe dos azólicos e das equinocandinas. Cepas resistentes ao antifúngico fluconazol apresentaram superexpressão dos genes *Candida drug resistente* (CDR1 e CDR2) que codificam um maior número de proteínas transmembrana (bombas de efluxo), permitindo que a cepa evite altas concentrações das drogas em seu meio intracelular (Chen *et al.*, 2010; Pristov; Ghannoum, 2019).

Um significativo fator de risco para infecções graves por *Candida albicans* é o uso de dispositivos invasivos, muito comuns em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) em pacientes hospitalizados. Para Thomas-Rüddel *et al.* (2022), pacientes críticos com comorbidades crônicas, intervenções invasivas e tratamento antibiótico de amplo espectro possuem maior risco de adquirir candidemias (McCarty; White; Pappas, 2021).

2.2.2 *Candida krusei*

Candida krusei é uma levedura dimórfica capaz de transitar entre a sua forma planctônica e de pseudohifas. Sua morfologia quando planctônica se apresenta em formato

cilíndrico, como um grão de arroz. A espécie também se apresenta em outra forma, em ascósporos, podendo ser identificada como *Pichia kudriavzevii* (Jamiu *et al.*, 2021).

Diferente de sua forma anamórfica assexuada (*Candida krusei*), *Pichia kudriavzevii* é utilizada na indústria alimentícia, envolvida na produção de vinhos, bebidas, chocolates e queijo, por exemplo. Ainda, no setor de biotecnologia, também é usada para produzir bioetanol e outros compostos químicos relevantes para a atividade humana (Chu *et al.*, 2023).

Candida krusei, quando cultivada em ágar, se apresenta como uma colônia de coloração branca de aspecto cremoso, muito parecida com outras espécies de *Candida spp.* Para sua diferenciação de outras espécies, pode ser usado o ágar cromogênico *CHROMagar Candida*®, onde *Candida krusei* adquire coloração branca-rosada (Jamiu *et al.*, 2021).

Assim como as outras espécies de *Candida spp.*, *Candida krusei* também pode viver como um microrganismo comensal na microbiota de mamíferos, se tornando oportunista quando ocorre algum desequilíbrio. A patogênese da espécie depende de muitos mecanismos que incluem a sua capacidade invasiva, iniciando pela aderência e finalizando em diferentes níveis de invasão, causando infecção da corrente sanguínea ou de outros tecidos moles (Yadav *et al.*, 2012).

Para invadir o tecido do hospedeiro e causar candidíases invasivas, *Candida krusei* usa-se de alguns mecanismos. Um deles é a secreção de enzimas hidrolíticas para facilitar a aquisição de nutrientes e destruir a imunidade inata, garantindo sua infecção (Gómez-Gaviria; Mora-Montes, 2020).

Diferentemente das outras espécies do gênero *Candida*, a preocupação emergente com *Candida krusei* se deve principalmente à sua resistência natural ao antifúngico fluconazol, além de sua habilidade de adquirir resistência a outros azólicos e a anfotericina B. (Khalifa *et al.*, 2022).

Segundo Antinori *et al.* (2016), foram listados como condições clínicas de maior risco para adquirir uma candidemia por *Candida krusei*: profilaxia com azólicos, condições malignas hematológicas e terapia com corticosteroides.

Apesar de menos comum, há relatos de surtos de *Candida krusei* em todo o planeta, especialmente em UTI, acometendo pacientes adultos e pediátricos. A menor prevalência dessa espécie não reduz a sua importância para a clínica (Navarro-Arias *et al.*, 2019; Kaur *et al.*, 2020). Em um estudo retrospectivo de Al-Musawi *et al.* (2021), por um período de sete anos, observou-se que *Candida krusei* foi a espécie isolada do gênero com maior taxa de mortalidade em pacientes adultos acometidos com candidemia. Em um hospital de cuidados terciários

brasileiro, os autores da Costa *et al.* (2014) concluíram que, entre as espécies do gênero *Candida* isoladas, todas as cepas de *Candida krusei* representaram alta resistência ao fluconazol.

2.3 BIOFILMES

Os microrganismos vivem em comunidades, e essas comunidades quando aderem em superfícies bióticas ou abióticas são chamadas de biofilmes. Essas estruturas se comportam de maneiras diferentes, dependendo de quais espécies estão envolvidas, podendo ser simples coberturas ou estruturas complexas (Douglas, 2003; Schuster; Markx, 2014.)

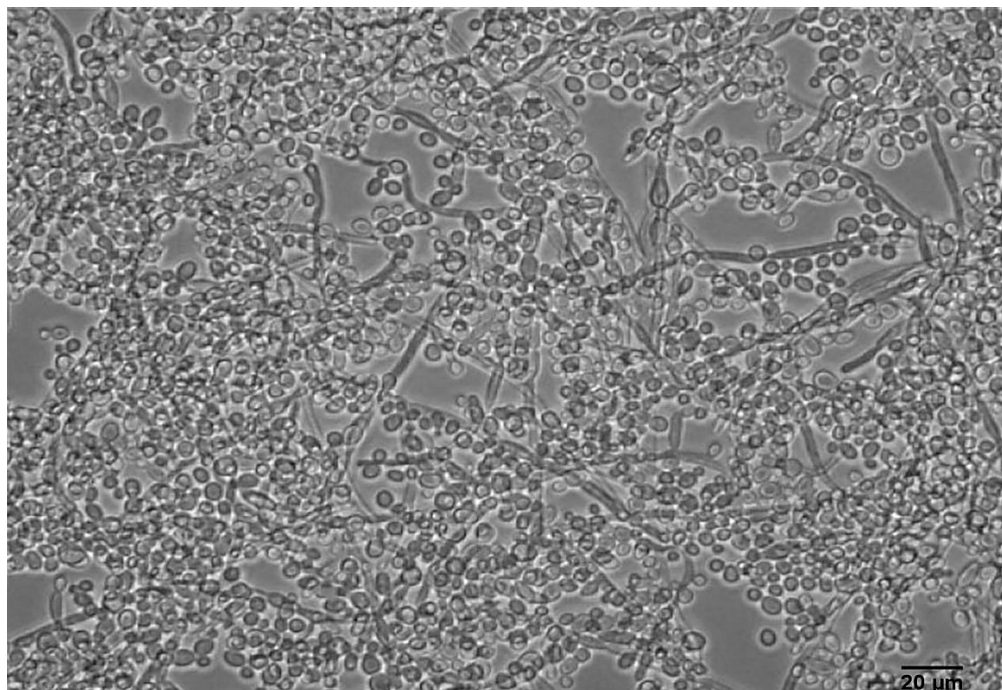
Biofilmes são compostos pelos próprios microrganismos que o originaram, embebidos em uma substância polimérica extracelular. Essa substância, secretada pelos próprios microrganismos, forma a base da matriz desse microambiente. A morfologia de um biofilme pode variar conforme a espécie, ou se há a presença de uma ou mais espécies envolvidas em sua constituição. Acredita-se que muitas infecções persistentes e fatais podem estar diretamente relacionadas a capacidade de um patógeno formar um biofilme (Tolker-Nielsen, 2015; Del Pozo, 2018).

Os microambientes chamados de biofilmes permitem que as células envolvidas sejam diferentes daquelas em sua forma livre. Há uma diferença no crescimento dessas células e em sua expressão gênica, pois há também condições que determinam essas diferenças: alta osmolaridade, alta densidade celular e baixa oferta de nutrientes. Além disso, sua estrutura impede que as células microbianas sejam atacadas, seja pela imunidade ou variações físicas e químicas do hospedeiro quanto pela presença de antimicrobianos (Sharma; Misba; Khan, 2019).

Para fungos, a estrutura de um biofilme pode significar a sobrevivência em relação a ação de antifúngicos convencionais. Para a eliminação de algumas espécies de fungos quando encontrados em biofilmes, espera-se que a dose de um fármaco convencional seja até 1000 vezes maior que aquela capaz de inibir suas formas planctônicas (Reichhardt; Stevens; Cegelski, 2016).

Em um biofilme formado pela espécie *Candida albicans* (Figura 1), há a presença de hifas e pseudohifas, embebidas em uma matriz constituída por carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. A junção das estruturas alongadas com essa matriz polimérica torna o biofilme altamente aderente e complexo, se tornando um arcabouço que permite a proteção e proliferação de mais formas planctônicas capazes de migrar e infectar outros sítios (Mukherjee *et al.*, 2005; Wall *et al.*, 2019).

Figura 1 – Estrutura do biofilme de *Candida albicans* formado em meio RPMI-1640.

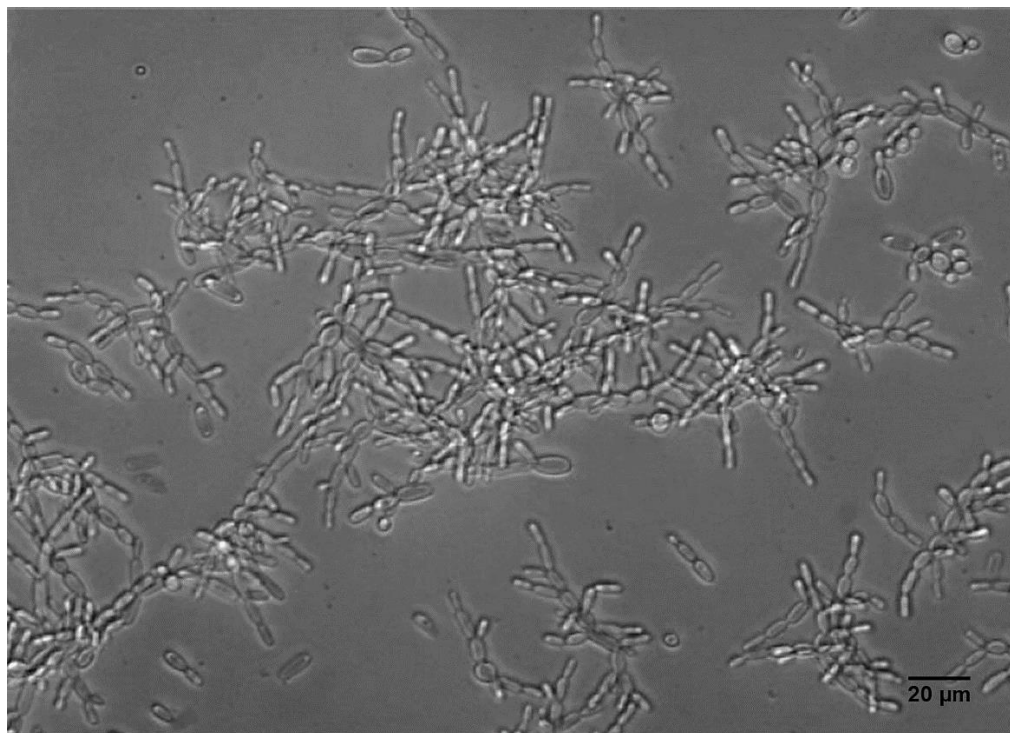


Fonte: Autoria própria (2024).

Legenda: Imagem obtida através de microscopia óptica de biofilme de *Candida albicans* cultivado em meio RPMI-1640 por 24 horas. A escala da fotografia está em 20µm.

Apesar de ser menos capaz de formar biofilmes tão estruturados como *Candida albicans*, *Candida krusei* também possui esse fator de virulência presente em sua biologia (Figura 2) (Sachivkina; Podoprighora; Bokov, 2021). Em um estudo de Fritsch *et al.* (2022) foram formados biofilmes de *Candida albicans* e *Candida krusei* em cinco tipos de lentes de contato oftalmológicas, e em todas elas, ambas as espécies foram capazes de produzir atividade metabólica e produção de biomassa significativas, principalmente em lentes mais macias de hidrogel.

Figura 2 – Estrutura do biofilme de *Candida krusei* formado em meio RPMI-1640

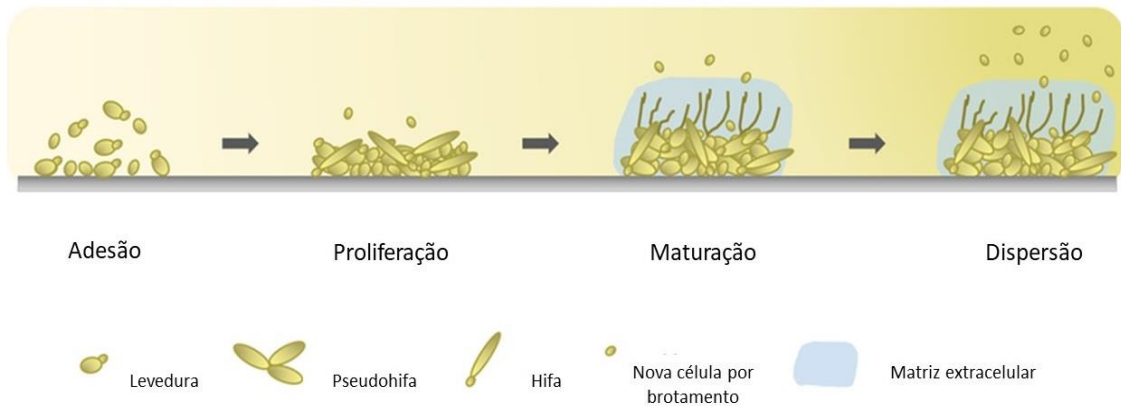


Fonte: Autoria própria (2024)

Legenda: Imagem obtida através de microscopia óptica de biofilme de *Candida krusei* cultivado em meio RPMI-1640 por 24 horas. A escala da fotografia está em 20μm.

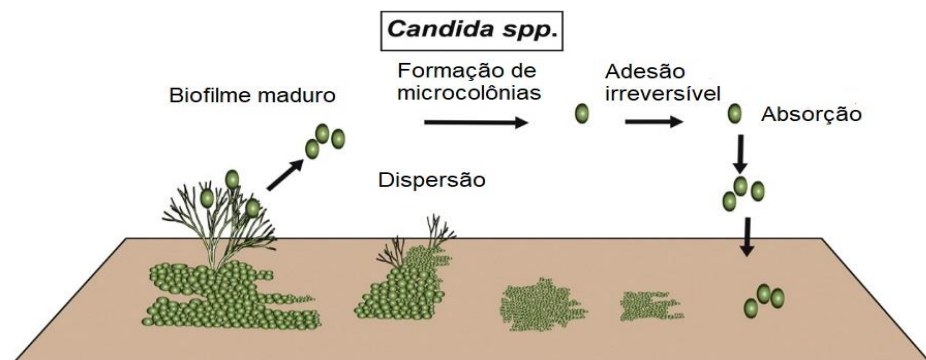
A formação de um biofilme de *Candida spp.* pode ser resumida em quatro fases: Aderência, proliferação, maturação e dispersão. Na fase de aderência, as células em sua forma livre, se prendem em uma superfície, depois começam a se multiplicar e transitar para a forma de hifas, no que se chama fase de proliferação. Depois de formar uma estrutura mais complexa e filamentosa, passa a fase de maturação, quando a substância polimérica é secretada e permite maior estabilidade e fixação do biofilme (Figura 3). Por fim, durante a dispersão (Figura 4), novas células provenientes desse biofilme são liberadas para iniciar o processo novamente (Gulati; Nobile, 2016; Wall *et al.*, 2019).

Figura 3 – Ilustração das fases de formação de um biofilme de *Candida spp.*



Fonte: Adaptado de Branco, Miranda e Rodrigues (2023)

Figura 4 – Ciclo da dispersão de um biofilme maduro de *Candida spp.*



Fonte: Adaptado de Rodríguez-Cerdeira *et al.* (2018).

No contexto clínico, biofilmes podem ser encontrados aderidos em diferentes estruturas com variadas composições. Dispositivos médicos como cânula endotraqueal, fios de sutura, próteses ortopédicas e cardíacas, lentes de contato e cateteres podem ser superfícies propícias. No entanto, em tecidos orgânicos também é comum a existência de biofilmes, geralmente causados por microrganismos que já colonizam essas superfícies e que podem se transformar em patógenos oportunistas (Donlan; Costerton, 2002; Desrousseaux *et al.*, 2013).

Os cateteres venosos centrais são importantes dispositivos terapêuticos para a infusão de medicamentos em doses contínuas, grandes volumes de solução ou para a realização de

hemodiálise. Estes dispositivos são conectados diretamente a circulação central do paciente, e estão sujeitos a colonização por microrganismos capazes de formar biofilmes. Encontrar biofilmes em cateteres venosos não é incomum, e a infecção da corrente sanguínea pode ser uma consequência dessa situação (Niemann *et al.*, 2022).

Quando se trata de superfícies orgânicas ou bióticas, a cavidade oral se torna um exemplo. Dentro da cavidade oral, os microrganismos podem colonizar diferentes regiões anatômicas, como a mucosa presente na gengiva ou os dentes (esmalte e dentina), causando respectivamente, periodontite e placa bacteriana. Essas condições podem evoluir para doenças orais mais sérias, que podem ter como consequência a perda dos dentes (Sterzenbach *et al.*, 2020).

2.3.1 Biofilmes polimicrobianos

Em condições complexas como as existentes no corpo humano, onde há a interação entre diferentes espécies de microrganismos, há muitas oportunidades que proporcionam a formação de um biofilme multi-espécie. A interação de microrganismos dentro de um biofilme com mais de uma espécie, seja de bactérias ou fungos, pode aumentar a resistência dos agentes patogênicos, aumentando a tolerância dos mesmos aos antibióticos e a imunidade inata do hospedeiro (Gabriliska; Rumbaugh, 2015).

Um biofilme polimicrobiano pode tornar a infecção recorrente, recalcitrante e crônica. Pois, com a variedade de microrganismos presentes, há a tendência de resistência a múltiplos antimicrobianos, sejam eles antifúngicos ou antibióticos. Além disso, matriz polimérica que envolve um biofilme misto é mais complexa quando comparada a que existe em uma infecção com apenas um microrganismo (Kulshrestha; Gupta, 2023).

A indução de um biofilme misto existe porque os microrganismos buscam formas de sobreviver aos estressores ambientais. Algumas vezes, os microrganismos coexistem de forma comensal ou em mutualismo, ou seja, algumas reações metabólicas de um microrganismo favorecem a existência de outro, propiciando sua viabilidade e crescimento. Essas reações podem fornecer nutrientes ou condições físicas e químicas específicas que contribuem para relação interespecies (Kulshrestha; Gupta, 2022).

Candida albicans já foi encontrada em biofilmes múltiplos com diferentes espécies de bactérias, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Pseudomonas aeruginosa*. A interação entre *Candida albicans* e bactérias ou outros fungos são frequentemente reportadas

em infecções orais, urinárias e respiratórias, e até mesmo em feridas infectadas (Lohse *et al.*, 2018; Kulshrestha; Gupta, 2022)

Quando há condições para que um biofilme de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* seja formado em conjunto, acredita-se que as hifas do fungo funcionem como um fator de virulência para bactéria, a tornando mais resistente a terapias antibióticas (Eichelberger; Cassat, 2021).

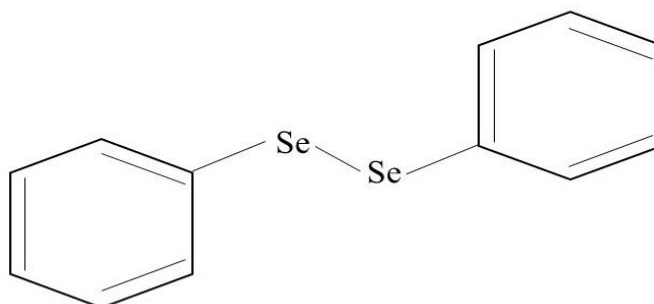
Interações entre a espécie *Candida albicans* e espécies *não-albicans* são encontradas dentro de biofilmes (Ponde *et al.* 2021). Alves *et al.* (2014) observou que *Candida albicans* promoveu a invasão do epitélio vaginal por *Candida glabrata*. Coco, *et al.* (2008) também constatou que a relação entre essas duas espécies de *Candida* propiciou a patogênese de estomatite protética na cavidade oral.

Em um estudo de Franco-Duarte *et al.* (2022) notou-se que entre as espécies *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*, há uma relação de sinergismo. Essa ecologia presente em biofilmes dupla-espécie entre o gênero *Candida spp.* pode aumentar a virulência da infecção, provavelmente porque ambas as espécies possuem diferentes níveis de resistência aos fármacos disponíveis.

Entre a filamentosa *Candida albicans* e as outras espécies do gênero que não apresentam filamentos (*Candida dubliniensis* e *Candida tropicalis*), há o favorecimento metabólico e de crescimento dessas duas últimas espécies, pois as suas células apresentam a capacidade de aderir as estruturas filamentosas de *Candida albicans*. A persistência das espécies não filamentosas de *Candida* é favorecida pela interação em um biofilme misto (Pathirana *et al.*, 2019).

2.4 COMPOSTOS DE ORGANOSELÊNIO

Os compostos de organoselênio, são parte do grupo de compostos organocalcogêneos: estruturas químicas compostas de selênio, telúrio, enxofre e/ou oxigênio ligadas ao carbono. O $(\text{PhSe})_2$ ou disseleneto de difenila (Figura 5), é um composto de organoselênio simples e estável, muito usado em sínteses de outros compostos derivados do selênio. Ultimamente, os estudos indicam que esse composto pode ter propriedades terapêuticas (Rosa *et al.*, 2007).

Figura 5 – Estrutura química do (PhSe)₂

Fonte: Autoria própria (2024)

Testes realizados *in vivo* encontraram no composto (PhSe)₂ uma possível alternativa para o controle de hiperglicemia e hipercolesterolemia, além de efeito neuro, hematológico e hepatoprotetor. Esses efeitos estão relacionados a capacidade de modular o estresse oxidativo nos indivíduos testados (Barbosa *et al.*, 2006; De Bem *et al.*, 2009; Acker *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2014).

Ainda, em ensaios *in vivo*, o (PhSe)₂ demonstrou baixa toxicidade em exposições subcrônicas em ratos em altas dosagens, não demonstrando efeito tóxico em doses consideradas farmacológicas. (Meotti *et al.*, 2008)

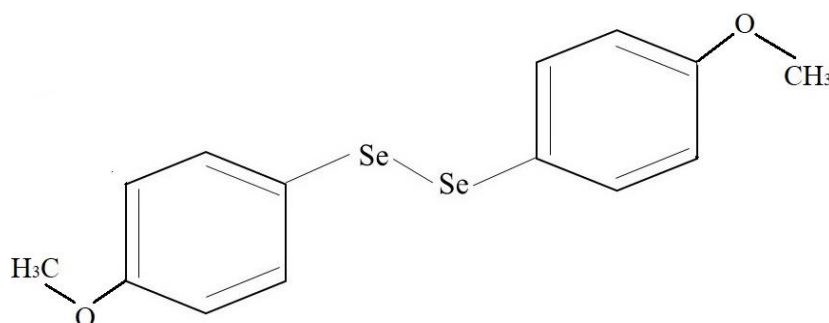
Além disso, doses terapêuticas de (PhSe)₂ indicam que há promissora atividade bactericida, antifúngica e até antiviral. Nos ensaios realizados com o composto, houveram resultados positivos contra espécies de *Sporothrix* e *Cryptococcus* associados ou não a um antifúngico convencional (Poester *et al.*, 2019, 2021b; Rossato *et al.*, 2019).

Um ensaio realizado por Amaral *et al.* (2021), (PhSe)₂ foi capaz de potencializar o efeito da droga cidofovir *in vitro* e em uma ovelha em um tratamento contra o *Alphaherpesvírus* bovino ou BoHV-2. No tratamento *in vivo* tópico, foi administrado o (PhSe)₂ e depois o composto combinado ao antiviral. Na mesma linha antiviral, o composto também demonstrou potencial para inibir a replicação de Sars-Cov-2 em doses não tóxicas para linhagens humanas (Wildner *et al.*, 2023).

Especialmente em cepas de *Candida albicans* e *Candida krusei* separadamente, compostos de organoselênio incluindo (PhSe)₂, (MeOPhSe)₂ (Figura 6) e (pCl-PhSe)₂ (Figura 7) já foram testados em suas formas planctônicas e em diferentes fases do biofilme, e obtiveram

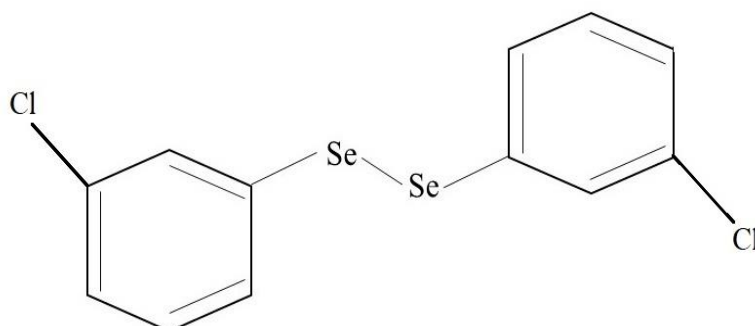
inibições significativas em ambas os estágios de desenvolvimento celular (Rosseti *et al.*, 2011; Rosseti; Rocha; Costa, 2015; Da Silva *et al.*, 2021; De Siqueira *et al.*, 2022).

Figura 6 – Estrutura química do (MeOPhSe)₂



Fonte: Autoria própria (2024)

Figura 7 – Estrutura química do (PChSe)₂



Fonte: Autoria própria (2024)

No estudo de Rosseti, Rocha e Costa (2015), o composto (PhSe)₂ induziu o aumento de produção de espécies reativas de oxigênio e permeabilidade das membranas pela espécie *Candida albicans*. Espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas que contêm oxigênio com alta reatividade. As EROs são consideradas antimicrobianas, pois reagem ao grupo thiol de proteínas, enzimas, DNA e membranas celulares, causando danos irreversíveis aos microrganismos afetados. Além da atividade antimicrobiana em células planctônicas, sua capacidade também inclui a inibição de biofilmes (Dryden *et al.*, 2017; Dryden, 2018; Lam *et al.*, 2020).

3 OBJETIVOS

Avaliar a eficiência do uso dos compostos (PhSe)₂, (MeOPhSe)₂, (p-Cl-PhSe)₂ contra os biofilmes mistos de *Candida albicans* e *Candida krusei*.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito dos compostos separadamente na formação e na manutenção do biofilme maduro misto de *Candida albicans* e *Candida krusei*;
- Verificar se os compostos alteram a adesão de *Candida albicans* e *Candida krusei*;
- Avaliar o efeito dos compostos sobre a atividade metabólica dos biofilmes;
- Analisar condições de manutenção e meio de cultivo sobre a viabilidade e formação do biofilme;
- Identificar as espécies que mais são afetadas pelos compostos em um biofilme dupla-espécie.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CULTURA DE *CANDIDA SPP.* E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

As espécies de *Candida albicans* (Manassas, VA, USA; ATCC #1023) e *Candida krusei* (Manassas, VA, USA; ATCC #6258) utilizadas foram compradas na American Type Culture Collection e semeadas em placas contendo Ágar Sabouraud (Merck, Darmstadt, Hesse, Alemanha). As culturas cresceram em estufa, a uma temperatura de 37 °C, em ar atmosférico por 48h. Depois disso, foram suspensas em solução fisiológica à 0,9% e ajustadas para as concentrações de 10^7 (cél/ml), usando uma câmara de Neubauer na presença de corante vital azul de metileno (Sigma, St. Louis, MO, USA). As duas espécies foram misturadas na proporção 1:1 para a realização dos experimentos.

4.2 ENSAIO DE ATIVIDADE METABÓLICA – XTT

O ensaio foi realizado para analisar a atividade metabólica dos biofilmes de *Candida spp.* Após cada tratamento, as células foram lavadas com PBS de acordo com cada fase do biofilme e então será feito o protocolo ensaio de atividade metabólica.

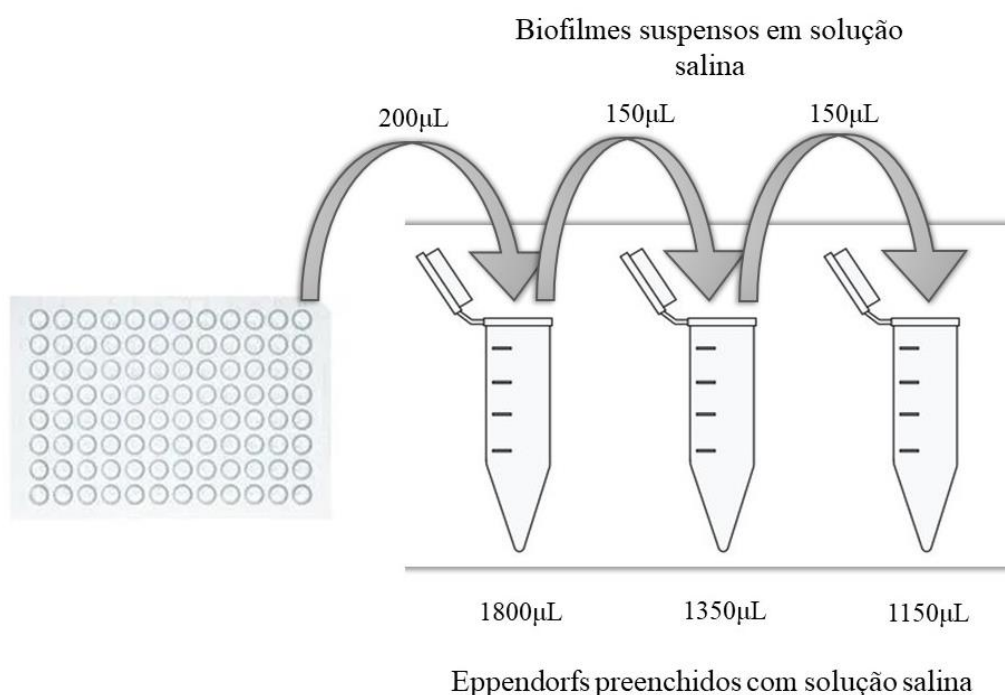
Para o ensaio, foi feita uma solução contendo XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide sodium salt) 1 mg/mL e o catalisador menadione na concentração de 0,4 mM, em uma proporção de 9:1. A mistura foi adicionada a outra solução contendo PBS, em proporção de 5 partes de PBS para 1 parte de XTT/menadione. Então, 100µl dessa solução foi adicionada aos poços, e a placa foi incubada novamente por um período de até duas horas para proporcionar a reação do XTT. Após esse período, o conteúdo foi transferido para outra placa de 96 poços e o produto da formação foi quantificado pela absorbância na densidade óptica de 490nm (DO490) em um espectrofotômetro Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader (Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

4.3 ENSAIO CHROMAGAR CANDIDA ®

O ensaio com *CHROMagar Candida*® foi realizado na fase de formação dos biofilmes e nos biofilmes maduros mistos, para verificar qual espécie foi mais afetada na presença dos compostos de organoselênio estudados.

Após os ensaios, os poços foram lavados duas vezes com solução de PBS estéril. Depois disso, os biofilmes foram novamente suspensos em 200 μ L de solução salina para raspagem. Os biofilmes suspensos foram diluídos 800 vezes em eppendorfs, já preenchidos com solução salina, de forma seriada (Figura 8).

Figura 8 – Esquema da diluição seriada para plaqueamento no CHROMagar Candida®



Fonte: Autorial Própria (2024)

Alíquotas de 25 μ L foram retiradas da última diluição, e semeadas em placas contendo o ágar cromogênico. Após 48h, em estufa à 37°C, prosseguiu-se a contagem e as colônias foram indicadas por coloração: as de coloração verde eram *Candida albicans* e as branco-rosadas *Candida krusei*.

5.4 PREPARO DOS COMPOSTOS DE ORGANOSELÊNIO

O composto disseleneto de difenila (PhSe)₂ foi obtido da Sigma (St. Louis, MO, USA). Já os compostos *p*-Cl de disseleneto de difenila (pCl-PhSe)₂ e disseleneto de *p*-metoxi fenila (MeOPhSe)₂ foram adquiridos de acordo com Paulmier *et al.* (1986). Todos os compostos foram

solubilizados em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) à 100% e diluídos com água ultrapura para chegar na concentração dos ensaios em 1%.

5.5 PREPARAÇÃO DOS BIOFILMES

Todos os ensaios foram preparados em dois meios para a formação do biofilme: o meio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) e o meio Sabouraud dextrose (SD) (Merck, Darmstadt, Hesse, Germany) para obter diferentes biofilmes e observar o comportamento dos compostos em duas constituições diferentes. Os biofilmes formados em meio RPMI-1640 foram lavados com 200µL de PBS, enquanto os formados em meio SD foram lavados com 100µL.

5.6 Efeito dos cos sobre a adesão de *Candida spp.*

Foram adicionados 25µl do inóculo em placas de 96 poços contendo solução salina à 0,9% e os compostos (PhSe)₂, (MeOPhSe)₂ e (p-Cl-PhSe)₂, na concentração de 30µM diluídos em solução de DMSO à 10%. Para o controle, o meio reacional estará em uma concentração de DMSO final a 1%. A placa foi incubada em estufa em ar atmosférico a 37°C por 90 minutos. O meio reacional dos poços foi retirado, e depois disso, os poços foram lavados com 100µl solução de PBS estéril e acrescidos de 200µL de meio RPMI-1640 e SD e a placa foi novamente incubada a 37°C, em estufa, por 24h. Após isso, os meios reacionais foram retirados, e os poços lavados duas vezes segundo o meio utilizado. Após a lavagem, prosseguiu ao ensaio de atividade metabólica.

5.6 EFEITO DOS COS SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *CANDIDA SPP.*

Foram adicionados 25µL de inóculo, a uma placa de 96 poços contendo meio e diferentes concentrações de (PhSe)₂, (MeOPhSe)₂ e (p-Cl-PhSe)₂, num volume final de 200µL. A placa foi incubada à 37°C por 24h. Após esse período, o conteúdo dos poços foi removido e os mesmos foram lavados com PBS duas vezes conforme o meio utilizado. Após a lavagem, prosseguiu o ensaio de atividade metabólica e *CHROMagar Candida*®.

5.7 EFEITO DOS CO_s SOBRE O BIOFILME MADURO DE *CANDIDA SPP.*

Suspensões (25µL) de inóculo foram adicionadas a uma placa de 96 poços contendo separadamente meio RPMI-1640 e meio SD, em um volume final de 200µL, e a placa foi incubada por 24h a 37 °C em estufa microbiológica. Após esse período, em um ambiente estéril, os meios foram removidos e os poços foram lavados duas vezes para remoção das células não-aderidas. O meio reacional contendo meio RPMI-1640 e SD, com os compostos (PhSe)₂, (MeOPhSe)₂ e (p-Cl-PhSe)₂ na concentração de 30µM, foi adicionado e novamente a placa foi incubada a 37°C por mais 24h. O meio de reação foi retirado dos poços e os mesmos foram lavados duas vezes com PBS, e então realizado o ensaio de atividade metabólica e *CHROMagar Candida*®.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados apresentados neste estudo são oriundos de oito experimentos independentes realizados em triplicata. Os valores obtidos pelas leituras de absorvância no espectrofotômetro foram apresentados em figuras que representaram a porcentagem de crescimento/atividade metabólica, que será calculada utilizando sempre o grupo controle de cada tratamento.

Os gráficos foram elaborados utilizando o software ORIGIN 9.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA), bem como a análise estatística. Os valores foram expressos como médias e desvio padrão. As diferenças estatísticas foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) e comparação post-hoc com teste Tukey-Kramer. Valores de p <0,05 foram considerados significativos.

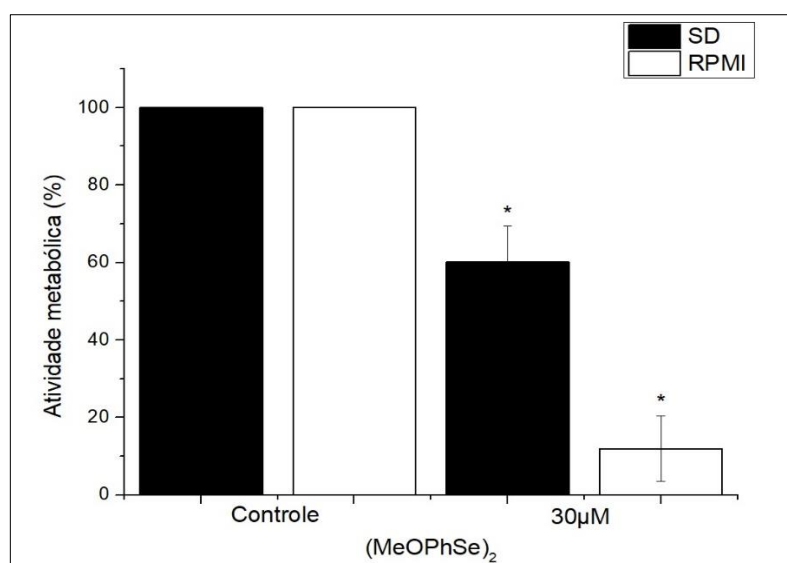
6 RESULTADOS

O efeito dos compostos de organoselênio foi testado nas fases de adesão e formação de biofilme, e no biofilme maduro dupla-espécie de *Candida albicans* e *Candida krusei*, em dois meios de cultivo diferentes: o meio RPMI-1640 e meio SD.

6.1 Efeito dos compostos de organoselênio na adesão de biofilmes de *Candida spp.*

Conforme demonstrado na Figura 9, na presença do composto (MeOPhSe)₂, houve a inibição de ~88% da adesão do biofilme misto em meio RPMI-1640. Apesar de menor, também houve inibição significativa no meio SD, de ~40%.

Figura 9 - Efeito do composto (MeOPhSe)₂ em meio RPMI-1640 e SD na adesão de biofilme dupla-espécie de *Candida albicans* e *Candida krusei* cultivados em em meio RPMI-1640 e SD.

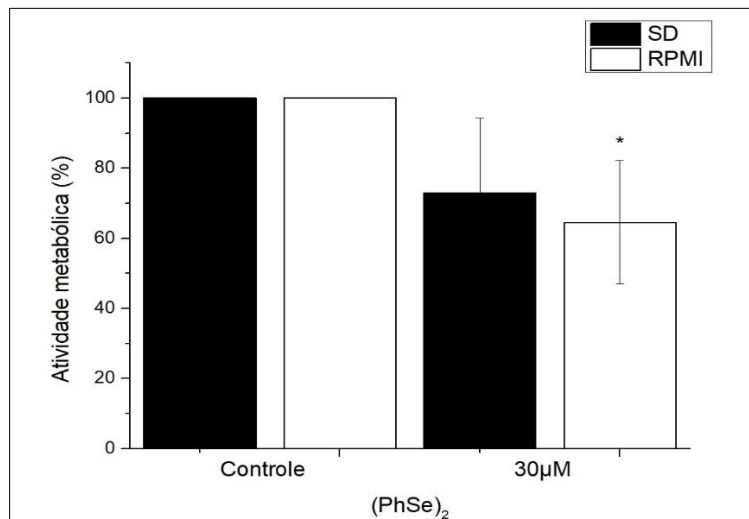


Fonte: Autoria própria (2024).

Legenda: o gráfico mostra o efeito do composto (MeOPhSe)₂ na concentração de 30 μM na adesão de biofilmes dupla-espécie de *Candida albicans* e *Candida krusei* cultivados em meio SD (barra preenchida) e em meio RPMI-1640 (barra não preenchida), representados por valores de média e desvio padrão. Os dados foram tratados com ANOVA e teste post-hoc Tukey kramer. O símbolo (*) representa que o dado é significativo.

Quando pré-incubadas com (PhSe)₂, houve a redução de ~35% de adesão em meio RPMI-1640, já no meio SD, não houve inibição significativa do biofilme dupla-espécie de *Candida spp.* (Figura 10).

Figura 10 – Efeito do composto $(\text{PhSe})_2$ em meio RPMI-1640 e SD na adesão de biofilme dupla-espécie de *Candida albicans* e *Candida krusei*

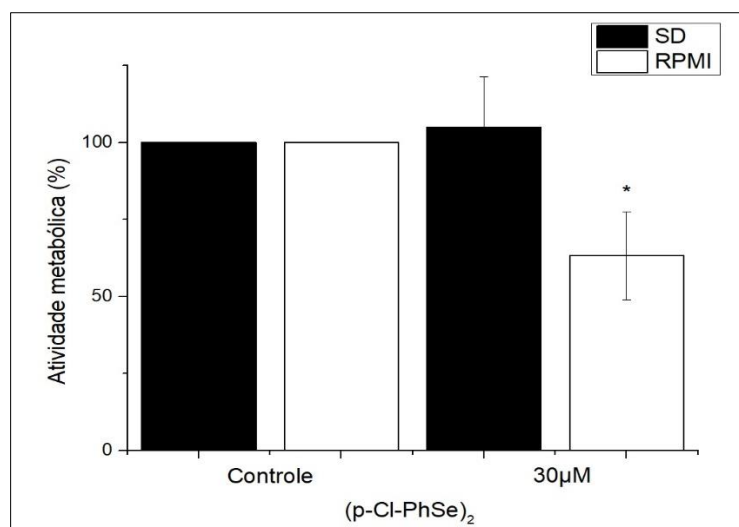


Fonte: Autoria própria (2024).

Legenda: o gráfico mostra o efeito do composto $(\text{PhSe})_2$ na concentração de $30\mu\text{M}$ na adesão de biofilmes dupla-espécie de *Candida albicans* e *Candida krusei* cultivados em meio SD (barra preenchida) e em meio RPMI-1640 (barra não preenchida). Os dados foram tratados com ANOVA e teste post-hoc Tukey kramer. O símbolo (*) representa que o dado é significativo.

A maior inibição do composto $(p\text{-Cl-PhSe})_2$ foi na fase de adesão das células em solução salina, quando na concentração de $30\mu\text{M}$ em meio RPMI-1640, onde foi possível observar a inibição metabólica do biofilme em ~37%. Na adesão em meio SD, o composto $(p\text{-Cl-PhSe})_2$ não obteve nenhum resultado significativo (Figura 11).

Figura 11 - Efeito do composto (p-Cl-PhSe)₂ em meio RPMI-1640 na adesão biofilme dupla-espécie de *Candida albicans* e *Candida krusei*

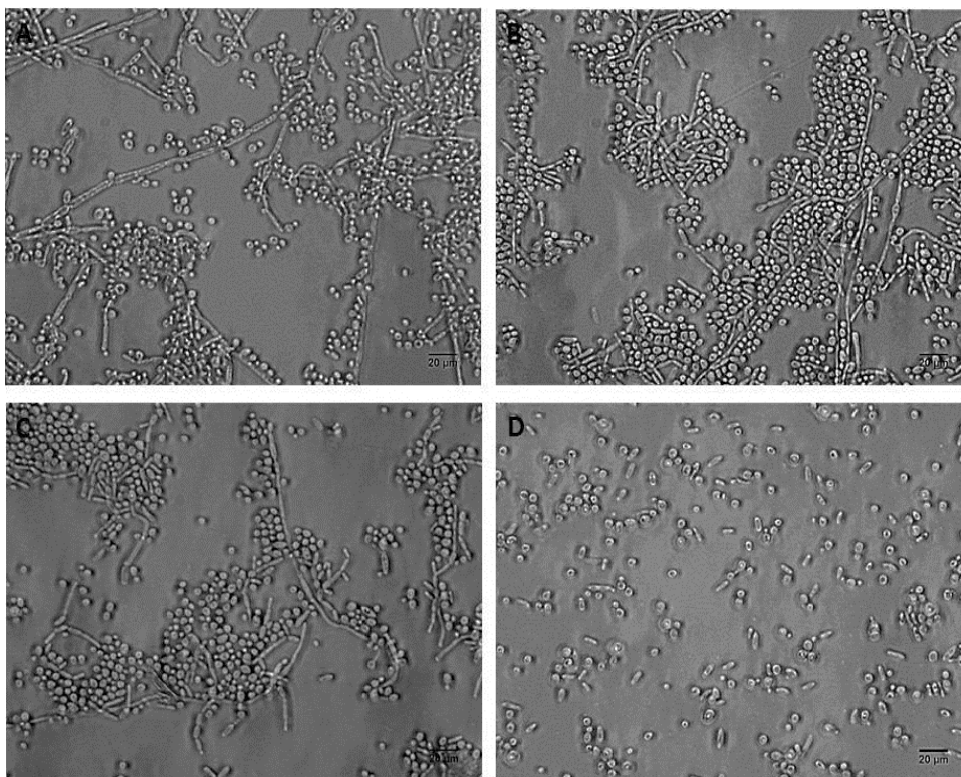


Fonte: Autoria própria (2024).

Legenda: o gráfico mostra o efeito do composto (p-Cl-PhSe)₂ na concentração de 30µM na adesão de biofilmes dupla-espécie de *Candida albicans* e *Candida krusei* cultivados em meio SD (barra preenchida) e em meio RPMI-1640 (barra não preenchida) e representados por valores de média e desvio padrão. Os dados foram tratados com ANOVA e teste post-hoc Tukey kramer. O símbolo (*) representa que o dado é significativo.

Nas imagens obtidas por microscopia óptica, corroborando com os resultados na inibição da atividade metabólica, verifica-se a redução do número de células nos biofilmes aderidos na presença dos compostos na concentração de 30µM em meio RPMI-1640. Em biofilmes aderidos com o composto (MeOPhSe)₂, nota-se redução acentuada do número de células e inibição dos filamentos (Figura 12D). Nos demais biofilmes, não se nota redução significativa de células pelo composto (p-Cl-PhSe)₂ (Figura 12B), entretanto há redução discreta na presença do composto (PhSe)₂ (Figura 12C) em relação ao grupo controle (Figura 12A).

Figura 12 –Biofilmes dupla-espécie de *Candida spp.* cultivados em meio RPMI-1640 e aderidos na presença de 30 μ M de compostos de organoselênio.



Fonte: Autoria própria (2024).

Legenda: A imagem representa a microscopia óptica de biofilmes dupla-espécie de *Candida albicans* e *Candida krusei* aderidos na presença de 30 μ M de (p-Cl-PhSe)₂ (B), (PhSe)₂ (C) e (MeOPhSe)₂ (D) e solução salina por 90 minutos, e posteriormente cultivados em meio RPMI-1640. O grupo controle foi aderido na presença de 1% de DMSO (A). A escala da imagem está em 20 μ m.

6.2 EFEITO DOS COMPOSTOS DE ORGANOSELÊNIO NA FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE *CANDIDA SPP.*

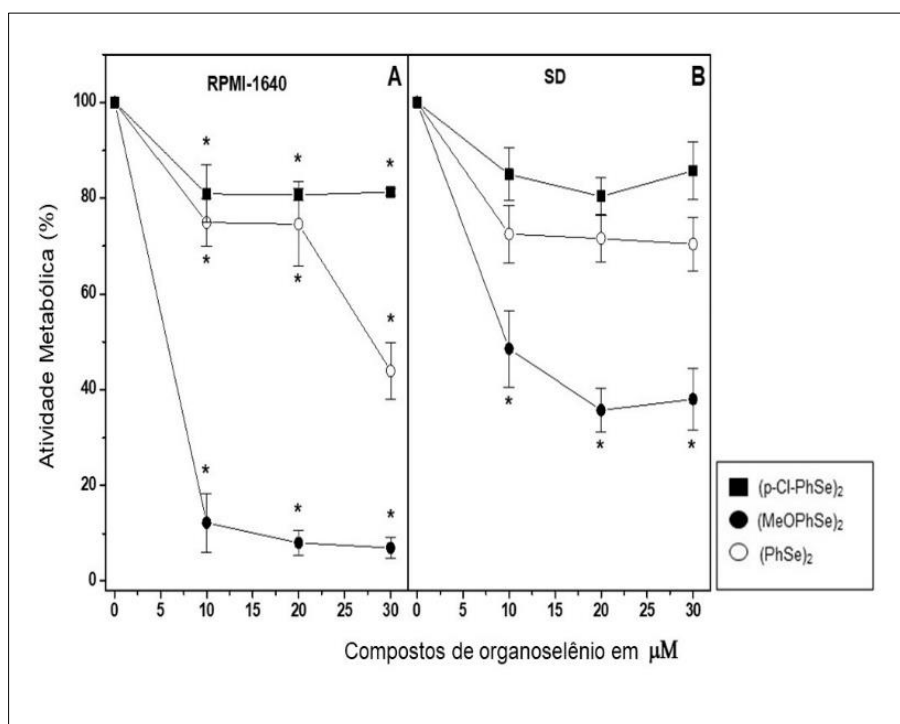
Na presença de diferentes concentrações de (MeOPhSe)₂, em meio RPMI-1640, houve redução significativa em todas as concentrações a partir de 10 μ M, de ~90% chegando à inibição máxima de ~95%. Na formação de biofilme em meio SD, o comportamento do composto (MeOPhSe)₂ foi diferente, obtendo ~49%, ~65% e ~62% nas concentrações de 10, 20 e 30 μ M respectivamente.

O biofilme em formação no meio RPMI-1640 na presença de (PhSe)₂ também demonstrou inibição progressiva na presença de 10, 20 e 30 μ M de ~29%, ~30% e ~56% respectivamente. Já nos biofilmes em formação no meio SD, a inibição não foi progressiva. Em meio SD o (PhSe)₂ não houve diferença significativa entre as concentrações 10, 20 e 30 μ M que foram de ~28%, ~32% e ~33% respectivamente.

Durante a formação utilizando o meio RPMI-1640, a inibição máxima na presença de $(p\text{-Cl-PhSe})_2$ ocorreu em $\sim 27\%$ com $20\mu\text{M}$, no entanto, em concentrações maiores, não houve diferença significativa que justificasse seu uso. No meio SD, houve a inibição de $\sim 17\%$ e $\sim 23\%$ nas concentrações de 10 e $20\mu\text{M}$ respectivamente, também não havendo benefício do composto em maiores concentrações.

Comparando o efeito entre os compostos, nota-se que o composto $(\text{MeOPhSe})_2$ possui maior capacidade de inibição nos dois meios utilizados, seguido pelo $(\text{PhSe})_2$ e por fim ao $(p\text{-Cl-PhSe})_2$. No meio RPMI-1640 (Figura 13A), a inibição da atividade metabólica dos biofilmes é maior para o composto $(\text{MeOPhSe})_2$ em meio RPMI-1640 quando comparada ao meio SD (Figura 13B), assim como a concentração de $30\mu\text{M}$ de $(\text{PhSe})_2$ (Figura 13)

Figura 13 – Efeito dos compostos de organoselênio na formação de biofilme dupla-espécie de *Candida spp.* em meio RPMI-1640 e SD.



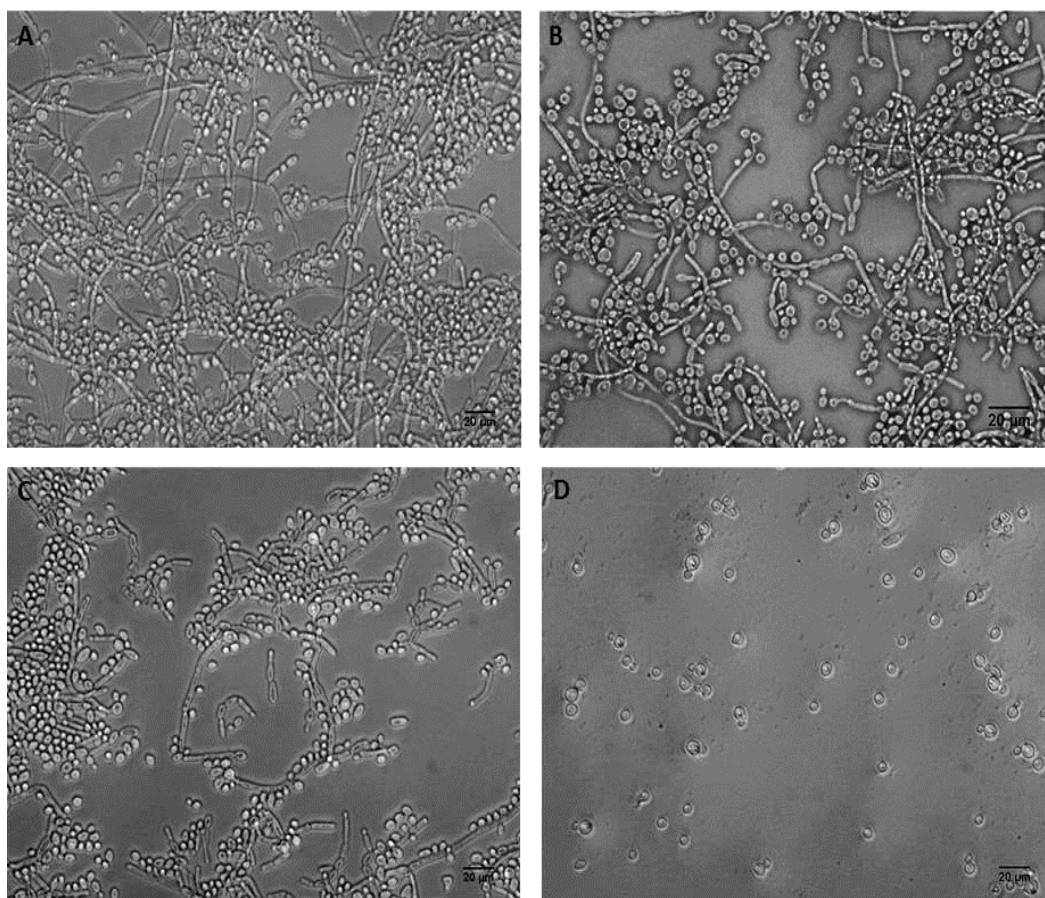
Fonte: Autoria própria (2024).

Legenda: A figura apresenta o gráfico de linhas que representa as taxas de atividade metabólica (média e desvio padrão) dos biofilmes dupla-espécie de *Candida albicans* e *Candida krusei*, formados na presença dos compostos $(p\text{-Cl-PhSe})_2$ (■), $(\text{MeOPhSe})_2$ (●) e $(\text{PhSe})_2$ (○) nas concentrações de 10, 20 e $30\mu\text{M}$, por 24h em estufa à 37°C , e cultivados em meio RPMI-1640 (A) e SD (B). Os dados foram tratados com análise de variância (ANOVA) e teste post-hoc Tukey kramer, e representados por valores de média e desvio padrão. O símbolo (*) representa que o dado é significativo.

Em relação a morfologia dos biofilmes que se formaram na presença dos compostos, assim como no ensaio de adesão, notou-se que, em comparação com grupo controle (Figura

14A) o composto $(\text{MeOPhSe})_2$ em meio RPMI-1640 inibiu totalmente a presença de filamentos e o reduziu drasticamente o número de células, corroborando com o percentual de inibição da atividade metabólica de ~95% na concentração de $30\mu\text{M}$ (Figura 14D). Para $(\text{p-Cl-PhSe})_2$ não houve diferença morfológica significativa (Figura 14B). Entretanto, o composto $(\text{PhSe})_2$ apresentou redução do número de células e redução da extensão dos filamentos (Figura 14C).

Figura 14 – Imagens de biofilmes dupla-espécie de *Candida spp.* formados com a presença dos compostos de organoselênio ($30\mu\text{M}$) em meio RPMI-1640.

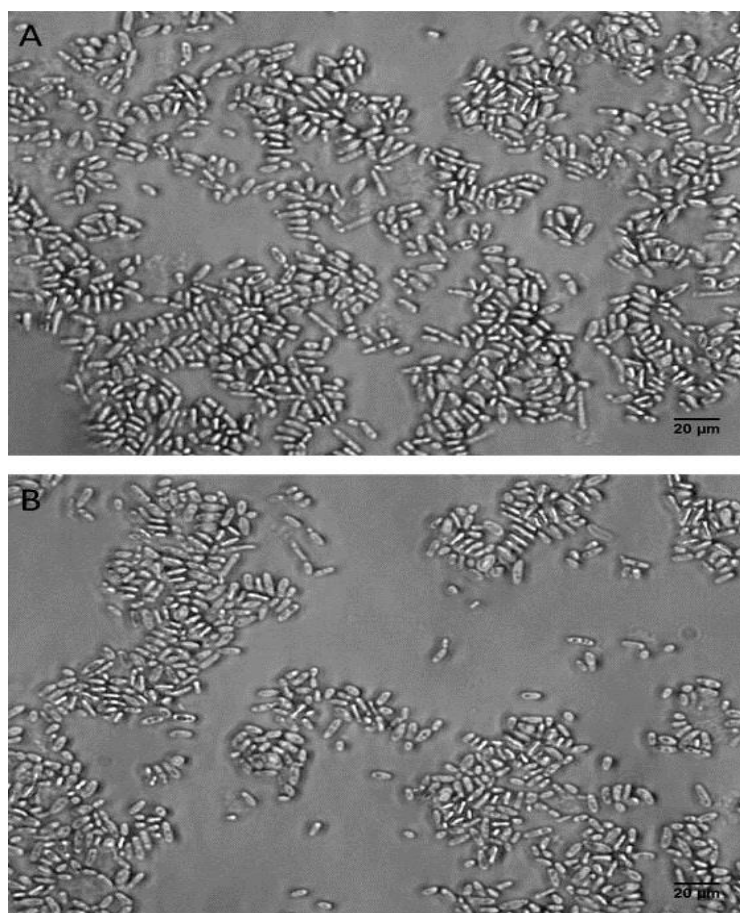


Fonte: Autoria própria (2024).

Legenda: A figura apresenta as fotografias dos biofilmes dupla-espécie de *Candida albicans* e *Candida krusei* formados na presença de $30\mu\text{M}$ dos compostos $(\text{p-Cl-PhSe})_2$ (B), $(\text{PhSe})_2$ (C) e $(\text{MeOPhSe})_2$ (D) e cultivados em meio RPMI-1640 por 24h em estufa à 37°C . O controle apresenta o biofilme formado na presença de 1% de DMSO (A). A escala da microscopia é de $20\mu\text{m}$.

No biofilme cultivado em meio SD, observa-se a presença de maior quantidade de células cilíndricas, compatíveis com *Candida krusei* e menor quantidade de filamentos (Figura 15). Observa-se que há uma ligeira redução do número de células no biofilme tratado com $(\text{MeOPhSe})_2$ (Figura 15B) em relação ao grupo controle (Figura 15A).

Figura 15 – Imagens de biofilmes dupla-espécie de *Candida spp.* cultivados na presença de $30\mu\text{M}$ de $(\text{MeOPhSe})_2$ em meio SD.



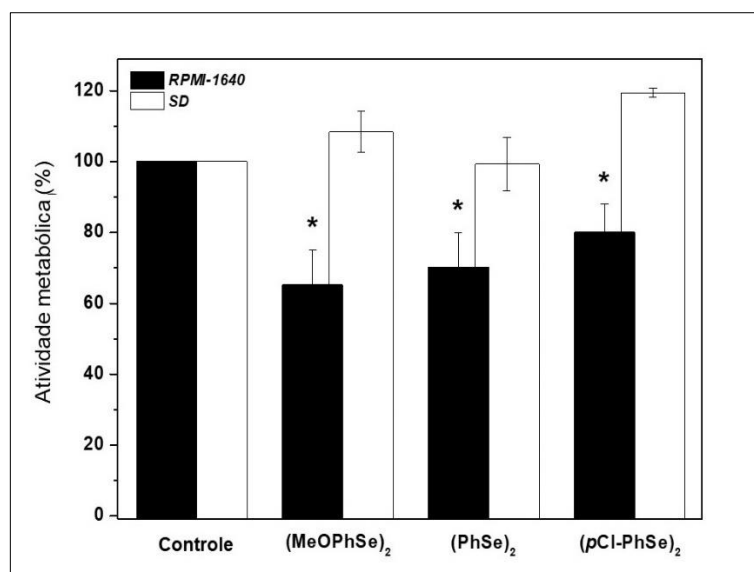
Fonte: Autoria própria (2024).

Legenda: A figura apresenta a imagem de microscopia óptica de biofilmes dupla-espécie de *Candida albicans* e *Candida krusei* formados em meio SD, na presença de $30\mu\text{M}$ de $(\text{MeOPhSe})_2$ (B), por 24h à 37°C . O grupo controle foi formado na presença de 1% de DMSO (A). A escala da fotografia é de $20\mu\text{m}$.

6.3 EFEITO DOS COMPOSTOS DE ORGANOSELÊNIO EM BIOFILMES MADUROS DE *CANDIDA SPP.*

Os biofilmes dupla-espécie cultivados em meio RPMI-1640 e posteriormente tratados com os compostos $(\text{MeOPhSe})_2$, $(\text{PhSe})_2$ e $(\text{p-Cl-PhSe})_2$, na concentração de $30\mu\text{M}$, obtiveram inibição de ~35%, ~30% e ~20% da atividade metabólica dos biofilmes maduros, respectivamente. No entanto, nos biofilmes formados em meio SD, nenhum composto apresentou qualquer efeito (Figura 16).

Figura 16 – Efeito dos compostos de organoselênio em biofilmes maduros dupla-espécie de *Candida* spp. cultivados em meio RPMI-1640 e SD

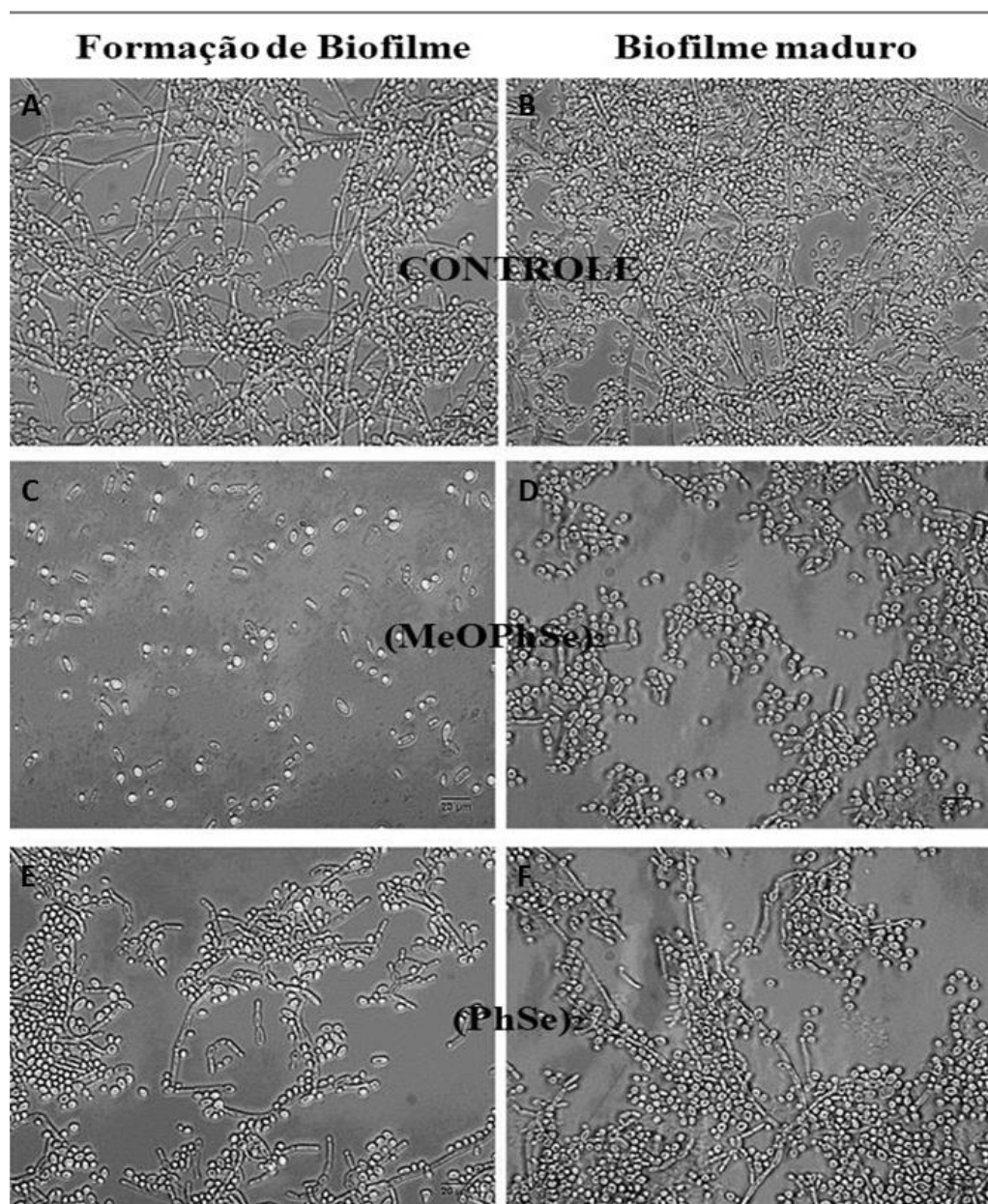


Fonte: Autoria própria (2024)

Legenda: A figura apresenta um gráfico de barras representando o efeito dos compostos (MeOPhSe)₂, (PhSe)₂ e (p-Cl-PhSe)₂, em valores de média e desvio padrão, na concentração de 30µM em biofilmes dupla-espécie maduros de *Candida albicans* e *Candida krusei*, cultivados em meio RPMI-1640 (barra preenchida) e meio SD (barra não preenchida) por 24h em estufa à 37°C. Os dados foram tratados com análise de variância (ANOVA) e teste post-hoc Tukey kramer. O símbolo (*) representa que o dado é significativo.

Mesmo no meio RPMI-1640, nota-se que houve mudança morfológica mais discreta nos biofilmes maduros quando comparados aos ensaios anteriores, principalmente no ensaio de formação (Figura 17). Os biofilmes maduros demonstram-se mais resistentes ao tratamento quando confrontados com aqueles que receberam seu tratamento em fases mais prematuras.

Figura 17 – Comparação entre os biofilmes dupla-espécie de *Candida* spp. tratados no período de formação e na fase de biofilme maduro, em meio RPMI-1640.



Fonte: Autoria própria (2024).

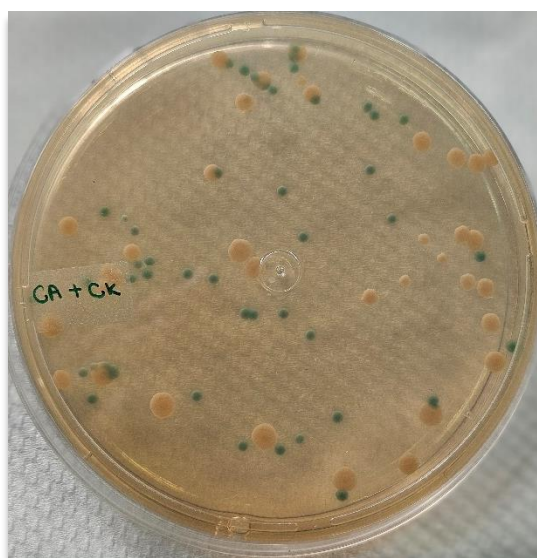
Legenda: A figura apresenta imagens de microscopia óptica obtidas de biofilmes dupla-espécie de *Candida albicans* e *Candida krusei* na presença dos compostos de organoselênio em diferentes fases, na fase de formação (A, C e E) e no biofilme maduro (B, D e F). Ambos os biofilmes foram cultivados em meio RPMI-1640 na ausência (A, B) e na presença de 30 μM de (MeOPhSe)₂ (C, D) e (PhSe)₂ (E, F). A escala das fotografias está em 20 μm.

6.8 RESULTADOS DO ENSAIO CHROMAGAR CANDIDA®

O ágar cromogênico que diferencia as espécies de *Candida* foi usado para determinar a contribuição de cada espécie na atividade metabólica obtida após os tratamentos com os compostos de organoselênio. O ensaio foi feito na fase de formação do biofilme e no biofilme maduro.

O número de UFCs foi determinada por contagem das placas após a raspagem e semeadura. Foi observado uma relação desproporcional de cada espécie dependendo do meio usado para formação do biofilme, levando em consideração que ao início do experimento, a relação era de igualdade (Figura 18).

Figura 18 – Placa contendo CHROMagar Candida® semeada com inóculo utilizado para o experimento em iguais proporções de *Candida albicans*/*Candida krusei*

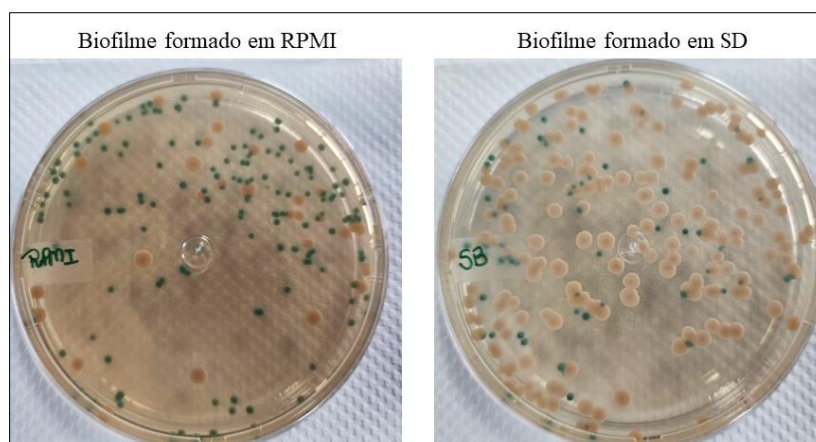


Fonte: Autoria própria (2024).

Legenda: Placa de petri, de dimensões 90x15mm, contendo CHROMAGAR Candida® semeada com inóculo inicial do ensaio (10^7 céls/mL) na proporção de 1:1 para *Candida albicans*/*Candida krusei* diluído 1000x em solução salina. As colônias verdes são de *Candida albicans* e as branco-rosadas de *Candida krusei*.

Nos biofilmes formados em meio RPMI-1640 observa-se maior concentração de *Candida albicans*, e o oposto ocorre no meio SD, onde as colônias são predominantes da espécie *Candida krusei*. Na figura 19, pode-se observar no primeiro quadro (RPMI-1640) a predominância de colônias esverdeadas, representando *Candida albicans*; no segundo quadro (SD), observa-se predominância de colônias branco-rosadas, representando *Candida krusei*.

Figura 19 – Placas contendo CHROMagar Candida semeadas com biofilme dupla-espécie de *Candida albicans* e *Candida krusei* em meio RPMI-1640 e SD.

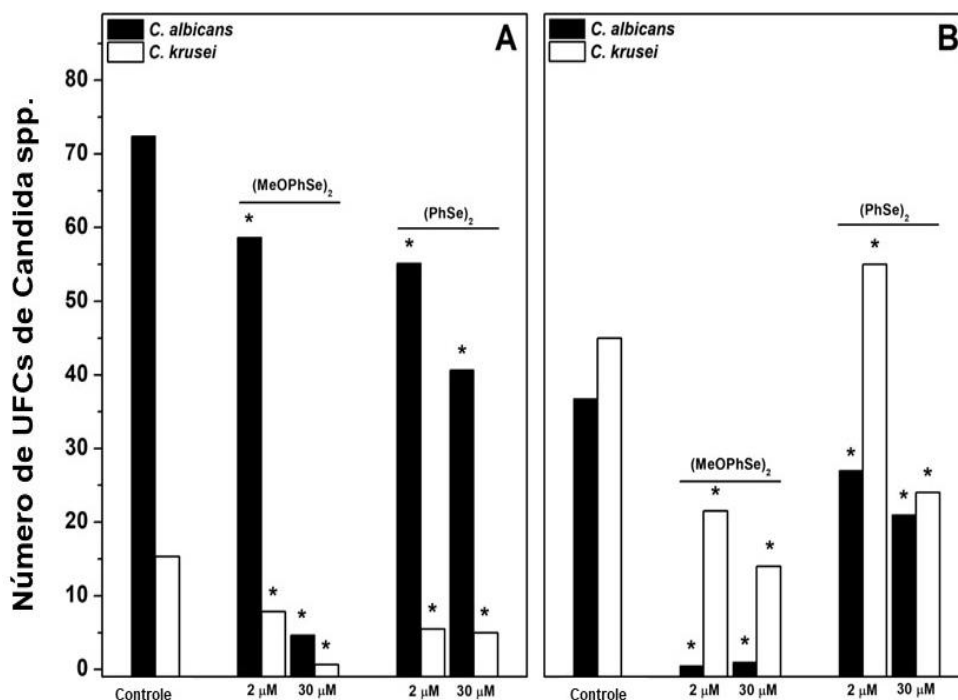


Fonte: Autoria própria (2024).

Legenda: Placas de petri de dimensões 90x15mm contendo *CHROMagar Candida*® e semeadas com biofilmes dupla-espécie de *Candida albicans* e *Candida krusei* em meio RPMI-1640 e meio SD. Os biofilmes foram raspados das placas de 96 poços e suspensos em solução salina, os mesmos foram semeados após diluição de 800x em solução salina. As colônias verdes representam *Candida albicans*, e as branco-rosadas *Candida krusei*.

Na formação de biofilmes usando meio RPMI-1640, o número de UFCs de *Candida albicans* foi de 72, 59 e 5 na ausência e presença de 2 e 30 μ M de (MeOPhSe)₂ respectivamente, esses valores representam a queda de ~88% no número de colônias (Figura 20A). No tratamento com o mesmo composto, mas em meio SD, o número de UFCs de *Candida albicans* foi de 37, 0,5 e 1 nos grupos controle, 2 e 30 μ M, que representam redução de ~97% (Figura 20B). Também foi observando o decaimento das UFCs quando usado o composto (PhSe)₂, mas esse efeito foi menor que a observada na presença de (MeOPhSe)₂, tanto no meio RPMI-1640 (~43%) quanto no meio SD (~42%) (Figura 20).

Figura 20 – Contagem de UFCs provenientes da raspagem de biofilmes dupla-espécie de *Candida spp.* na presença de $(\text{MeOPhSe})_2$ e $(\text{PhSe})_2$ semeados em CHROMagar *Candida*®



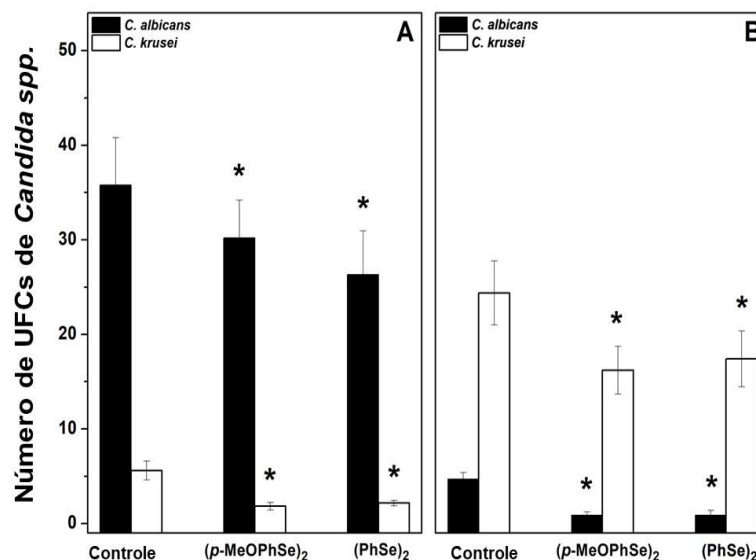
Fonte: Autoria própria (2024)

Legenda: A figura apresenta dois gráficos de barra que representam o número de UFCs de *Candida albicans* e *Candida krusei* provenientes de biofilmes formados com 2 e 30 μM de $(\text{PhSe})_2$ e $(\text{MeOPhSe})_2$. O gráfico A representa os biofilmes cultivados em meio RPMI-1640 e o gráfico B, biofilmes cultivados em meio SD. Os dados são provenientes de 8 testes independentes feitos em triplicatas, e foram tratados com ANOVA e teste post-hoc Tukey kramer e são apresentados por média, com (*) simbolizando a significância (0,05).

O composto $(\text{MeOPhSe})_2$ também foi capaz de reduzir a presença de *Candida krusei* (~47%), no entanto, devido sua pequena contribuição para a biofilme em meio RPMI-1640, o impacto sobre a atividade metabólica foi pequeno. Na formação em meio SD, o $(\text{MeOPhSe})_2$ foi capaz de inibir as UFCs de *Candida krusei* em ~69%. Já o composto $(\text{PhSe})_2$ reduziu ~34% e ~48% as colônias de *Candida krusei* nos meios RPMI-1640 e SD respectivamente. Todos esses resultados mostram que o composto foi capaz de diminuir a atividade metabólica por reduzir o número de células de *Candida albicans* e *Candida krusei* durante a formação de biofilme, usando o meio SD ou RPMI-1640 (Figura 20).

A figura 21 mostra o número de UFCs de *Candida albicans* e *Candida krusei* em biofilmes maduros produzidos usando RPMI-1640 ou SD tratados com 30 μM $(\text{MeOPhSe})_2$ ou $(\text{PhSe})_2$.

Figura 21 – Contagem de UFCs provenientes da raspagem de biofilmes maduros dupla-espécie de *Candida* spp. tratados com $(\text{MeOPhSe})_2$ e $(\text{PhSe})_2$ semeados em CHROMagar *Candida*®



Fonte: Autoria própria (2024).

Legenda: A figura apresenta dois gráficos de barra que representam o número de UFCs de *Candida albicans* e *Candida krusei* provenientes de biofilmes maduros tratados com $30\mu\text{M}$ de $(\text{PhSe})_2$ e $(\text{MeOPhSe})_2$. O gráfico A representa os biofilmes cultivados em meio RPMI-1640 e o gráfico B, biofilmes cultivados em meio SD. Os dados são provenientes de 8 testes independentes feitos em triplicatas, e foram tratados com ANOVA e teste post-hoc Tukey kramer e são apresentados em média e desvio padrão, com (*) simbolizando a significância (0,05).

Semelhante ao mostrado na Figura 20, diferentes proporções de *Candida albicans/Candida krusei* foram obtidas nos ensaios com biofilmes maduros. Foi observada uma relação *Candida albicans/Candida krusei* de 6,3 e 0,2 em biofilmes produzidos usando RPMI-1640 ou SD, respectivamente. Em biofilmes maduros produzidos utilizando RPMI-1640 foi observada redução no número de UFCs de *Candida albicans* de ~16 e ~27% na presença de $30\mu\text{M}$ $(\text{MeOPhSe})_2$ e $(\text{PhSe})_2$, respectivamente. Entretanto, o número de UFC de *Candida krusei* foi reduzido em torno de ~64% na presença de $30\mu\text{M}$ $(\text{MeOPhSe})_2$ ou $(\text{PhSe})_2$ (Figura 21A). Os biofilmes formados usando SD apresentaram diminuição no número de UFCs de *Candida albicans* e *Candida krusei* de ~78 e ~31%, respectivamente por $30\mu\text{M}$ de $(\text{MeOPhSe})_2$ e $(\text{PhSe})_2$ (Figura 21B).

7 DISCUSSÃO

As infecções fúngicas possuem grande impacto para a saúde pública em um contexto global. Os fungos do gênero *Candida spp.* possuem grande relevância clínica, devido sua incidência e morbimortalidade. Quando o hospedeiro é afetado por imunossupressão ou submetido a múltiplos procedimentos invasivos acompanhados de terapia antibiótica contínua, há o oportunismo desse gênero de microrganismos que, quando em situação de equilíbrio, colonizam a microbiota humana sem causar problemas.

Um fator importante de resistência e virulência das espécies do gênero *Candida spp.* são os biofilmes. É importante que se busque novas estratégias de combate a infecções relacionadas a biofilmes, principalmente em modelos onde coabitem mais de uma espécie, já que alguns autores determinaram que pode existir uma relação de sinergismo entre espécies de *Candida spp.*, e que biofilmes polimicrobianos podem ser mais resistentes e induzir infecções crônicas (Coco, *et al.*, 2008; Alves *et al.*, 2014; Pathirana *et al.*, 2019; Franco-Duarte *et al.*, 2022).

O principal método quantitativo empregado neste estudo foi o ensaio de redução de XTT, que produz uma reação que permite quantificar a atividade metabólica produzida pelo biofilme. É importante ressaltar que este método é constantemente empregado para determinar a viabilidade de biofilmes por *Candida spp.*, assim como outras espécies de microrganismos. Kim e Eom (2021) utilizaram o ensaio de XTT para mensurar a atividade metabólica de biofilmes de *Candida auris* tratados com 6-shogaol, um composto derivado do gengibre. Xu *et al.* (2016) empregou o mesmo ensaio para diferenciar as atividades metabólicas de algumas cepas de *Staphylococcus*.

Diferentes drogas são usadas atualmente para tratar infecções produzidas por *Candida spp.*, sendo o fluconazol, o primeiro antifúngico de escolha. Entretanto, a espécie *Candida krusei* é naturalmente resistente a esse fármaco, prejudicando o seu tratamento e profilaxia, prolongando os efeitos de candidíases que envolvem a sua presença (Jamiu *et al.*, 2021). O biofilme dupla-espécie relacionado a espécie *Candida krusei* pode promover alguma resistência inesperada a esse antifúngico, justificando a importância de testes de novas terapias em modelos polimicrobianos envolvendo essa cepa emergente.

Os dados deste estudo indicam que houve um impacto na viabilidade metabólica dos biofilmes tratados com compostos de organoselênio nos biofilmes dupla-espécie de *Candida albicans* e *Candida krusei*, principalmente na fase de formação de biofilme. O composto (MeOPhSe)₂ apresentou o melhor índice de inibição em comparação ao (PhSe)₂ e (p-Cl-PhSe)₂

em todas as fases do biofilme testadas, com valores mais expressivos na fase de adesão e formação.

De Siqueira *et al.* (2022) observaram que nas concentrações acima de 10 μ M, o composto (MeOPhSe)₂ foi capaz de inibir 100% do crescimento de *Candida krusei* nas densidades celulares 10⁵, 10⁶ e 10⁷ céls/mL em meio de cultivo SD. Os mesmos autores determinaram, que a formação do biofilme de *Candida krusei*, cultivado em meio RPMI-1640, foi prejudicada em 75% na presença de 20 μ M de (MeOPhSe)₂. Além disso, os autores testaram a adesão de *Candida krusei* e *Candida albicans*, separadamente, em células HeLa, na presença de (MeOPhSe)₂ em diferentes concentrações. Os resultados foram mais significativos na concentração de 20 μ M, obtendo ~30% de redução da infecção das células.

Em relação aos dados acerca do composto (MeOPhSe)₂ apenas na espécie *Candida albicans*, De Amorim *et al.* (2018) demonstraram que o composto foi capaz de inibir o crescimento de maneira dose dependente, considerando também a densidade celular usada no ensaio. Em todas as densidades celulares, a concentração de 10 μ M foi capaz de inibir 90% do crescimento. Em relação ao biofilme, a concentração de 20 μ M foi capaz de inibir ~80% de sua formação, em um período de 24h. Em biofilmes maduros, a concentração de 20 μ M reduziu a formação de filamentos. Esses resultados demonstram a capacidade do composto de reduzir a viabilidade dos biofilmes de *Candida albicans*.

No presente estudo, concentrações acima de 10 μ M de (MeOPhSe)₂ foram capazes de inibir em até 90% da formação dos biofilmes de *Candida albicans* e *Candida krusei* em meio RPMI-1640, produzidos na densidade celular de 10⁷ céls/mL, corroborando com os dados encontrados anteriormente a respeito deste composto. Apesar de já ter obtido resultados similares e promissores com ambas as espécies separadamente, há a necessidade de promover modelos em conjunto, em diferentes meios de cultivo, para verificar se a correlação entre as ambas pode interferir nos dados encontrados, já que em uma microbiota complexa, os biofilmes polimicrobianos são maioria (Kulshrestha; Gupta, 2023). No entanto, apesar de se tratar de um biofilme misto, a ação do composto foi significativa, principalmente no meio RPMI-1640.

O (PhSe)₂, ou disseleneto de difenila, é um composto de organoselênio que pode possuir efeitos sistêmicos benéficos em mamíferos. O composto e alguns de seus derivados já foram testados em fungos, vírus e parasitas, apresentando resultados promissores *in vitro*, e em alguns ensaios *in vivo* (Barbosa *et al.*, 2006; De Bem *et al.*, 2009; Acker *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2014).

No presente estudo, os biofilmes dupla-espécie de *Candida albicans* e *Candida krusei* foram parcialmente inibidos por (PhSe)₂ com resultados mais expressivos na concentração de 30 μ M no estágio de formação do biofilme, assim como o composto (MeOPhSe)₂, reduzindo

até 56% a viabilidade dos biofilmes. Da Silva *et al.* (2021) demonstraram em seus dados, que os biofilmes formados por *Candida albicans* obtiveram diferentes resultados com (PhSe)₂, que dependeram da densidade celular, da dose e do tempo (em horas) de maturação dos biofilmes. Para condições similares a este estudo, usando a mesma densidade celular e tempo de formação de biofilme (24 horas), a inibição da viabilidade foi de aproximadamente 25%. Para *Candida krusei*, Da Silva *et al.* (2022) apresentaram resultados que indicam, que nas mesmas condições do presente estudo, a viabilidade dos biofilmes foi reduzida em ~61%. Ambos os dados foram obtidos com doses de 20µM de (PhSe)₂ e os biofilmes foram cultivados em meio RPMI-1640. No presente estudo, a mesma dosagem obteve redução de 30% da viabilidade dos biofilmes dupla-espécie cultivado em meio RPMI-1640, apontando que há diferença do comportamento do composto neste modelo.

A ação fungistática e fungicida do composto (PhSe)₂ foi amplamente testada por Loreto *et al.* (2011). Os autores determinaram as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações fungicidas mínimas (CFM) de (PhSe)₂ em 44 cepas de fungos, entre eles espécies de *Candida*, *Fusarium* e *Aspergillus*. Os resultados mostraram atividades antifúngicas promissoras para leveduras e espécies filamentosas. Para *Candida albicans*, os valores de CIM variaram entre 4-32µM e os valores de CFM foram de 8 à 32µM, a variação se deve à variedade de cepas clínicas utilizadas pelos autores (n=15). As dosagens encontradas capazes de inibir a espécie, em diferentes cepas isoladas, corroboram com os resultados encontrados neste estudo e com os anteriores (Rosseti *et al.*, 2011; Da Silva *et al.*, 2021).

A ação antifúngica do composto (PhSe)₂ é melhor estabelecida quando comparado aos compostos (MeOPhSe)₂ e (p-Cl-PhSe)₂, que carecem de mais estudos em outras espécies. O composto (PhSe)₂ possui dados de eficiência nos gêneros *Candida*, *Fusarium*, *Sporothrix*, *Aspergillus* e *Cryptococcus* (Loreto *et al.*, 2011; Poester *et al.*, 2019, 2021a, 2021b; Rossato *et al.*, 2019; Venturini *et al.*, 2016).

Além dos testes com o composto (PhSe)₂ em relação à ação antifúngica, autores testaram o sinergismo desse composto com antifúngicos convencionais. Poester *et al.*, 2019 determinaram que, para a espécie *Sporothrix brasilienses*, houve 73% de efeitos positivos para a combinação de itraconazol e (PhSe)₂. A esporotricose é uma importante zoonose que acomete principalmente felinos, e é de difícil tratamento.

Além disso, Poester *et al.* (2021) testou o composto (PhSe)₂ em diferentes cepas de *Sporothrix schenckii s.str.* e *Sporothrix globosa*. O composto (PhSe)₂ demonstrou a capacidade de inibir as duas cepas em concentrações e 4-8µg/ml. Porém, é importante ressaltar que o composto obteve relações de forte (43%) e fraco (57%) sinergismo com a droga itraconazol.

Além disso, 50% das cepas resistentes ao itraconazol ficaram novamente suscetíveis quando expostas ao (PhSe)₂. Rossato *et al.* (2019) encontrou efeitos semelhantes associando (PhSe)₂ com anfotericina B na inibição de espécies de *Cryptococcus*.

Candida glabrata é uma espécie do gênero, que assim como *Candida krusei*, possui histórico de resistência acentuada aos antifúngicos convencionais (Pristov; Ghannoum, 2019). Denardi *et al.* (2013) apontaram que houve sinergismo quando (PhSe)₂ foi combinado com fluconazol e anfotericina B para o tratamento de *Candida glabrata*. De acordo com os autores, o composto de organoselênio aumentou a suscetibilidade da espécie aos antifúngicos convencionais em questão, sendo assim, precisou-se de doses menores de antifúngicos para inibir seu crescimento.

Todos estes dados conferem uma possibilidade de associação entre o (PhSe)₂, combinados com antifúngicos convencionais, para inibir infecções por *Candida spp.* Pois, apesar de resultar em efeitos menores que (MeOPhSe)₂, a bem estabelecida relação entre antifúngicos convencionais e (PhSe)₂ abre precedentes para uma nova modalidade de terapia antifúngica que pode contribuir para a redução da resistência microbiana, principalmente em modelos envolvendo espécies resistentes como *Candida krusei*.

Apesar de achados por Wildner *et al.* (2023) atestarem que o (PhSe)₂ pode inibir a replicação até de vírus como o Sars-Cov-2 em doses não tóxicas para células HeLa, não são todos os microrganismos que reagem dessa maneira. Sancineto *et al.* (2016) verificou que para as espécies bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* não houve CIM encontrado, mesmo que a concentração máxima testada seja de ~800µM (250µg/mL), ou seja, ~25 vezes maior que a concentração testada neste estudo (30µM).

O composto (p-Cl-PhSe)₂ foi o que menos contribuiu para a inibição dos biofilmes dupla-espécie, obtendo resultados, de 37, 27 e 20% nas fases de adesão, formação e no biofilme maduro, todos eles cultivados em meio RPMI-1640. Resultados ainda menos expressivos foram obtidos para os biofilmes cultivados em meio SD. Da Silva *et al.* (2022) também encontrou um efeito ligeiramente menor (cerca de 15%) para (p-Cl-PhSe)₂ em biofilmes de *Candida krusei* quando comparados ao composto (PhSe)₂, nas mesmas concentrações.

Considerando os resultados obtidos em relação a redução da viabilidade metabólica dos biofilmes maduros (24h) tratados com os três compostos, foi possível observar maior dificuldade em inibir os biofilmes, em comparação as fases de adesão e formação. A diferença é mais expressiva para o composto (MeOPhSe)₂, que obteve 35% de inibição em biofilmes maduros contra 95% de inibição da formação do biofilme utilizando o mesmo meio e a mesma

concentração (30 μ M). Ainda no meio SD, em relação ao biofilme maduro, mesmo o composto (MeOPhSe)₂ não obteve resultados significativos, entretanto, na formação desses biofilmes, utilizando o mesmo meio, o resultado foi de 40% de inibição. Žiemytė *et al.* (2023) verificou que biofilmes de *Candida albicans* e *Candida glabrata*, formados previamente ao tratamento, não foram eliminados por micafungina e caspofungina, isso os levou a considerar que os biofilmes maduros são mais difíceis de erradicar.

Nos estudos anteriores, todos os compostos obtiveram resultados mais significativos em biofilmes de *Candida albicans* e *Candida krusei*, separadamente, na concentração de 20 μ M, e concentrações acima disso não foram testadas (Da Silva *et al.*, 2022, 2021; De Amorim *et al.*, 2018; De Siqueira *et al.*, 2022; Rosseti; Rocha; Costa, 2015). Por esta razão, e pelo fato de se tratar de um biofilme dupla-espécie, este estudo padronizou o teste da concentração de 30 μ M nos ensaios de adesão e no biofilme maduro, e concentrações acima de 10 μ M para o ensaio de formação. O objetivo dessa escolha foi verificar se haveria inibição mais significativa, e a oportunidade de comparar os resultados entre os compostos usados, permitindo que, ao final dos experimentos, fosse possível visualizar o maior potencial do composto (MeOPhSe)₂.

Apesar de obterem resultados em relação a inviabilidade dos biofilmes de *Candida albicans* e *Candida krusei*, o efeito citotóxico dos compostos aparentemente não prejudica células de linhagens animais. De Amorim *et al.* (2018) usaram uma linhagem de fibroblastos (Vero cells), e determinaram que não houve redução da viabilidade celular na presença de (MeOPhSe)₂, enquanto Da Silva *et al.* (2021) verificaram que não houve citotoxicidade na administração dos compostos (PhSe)₂ e (p-Cl-PhSe)₂ em células HeLa. Ambos os autores testaram as mesmas concentrações usadas para inibir *Candida albicans* e *Candida krusei*.

Os tubos germinativos, presentes em espécies de *Candida spp.* são estruturas que permitem a transição da célula em sua forma de levedura para a de hifas. Essa estrutura é caracterizada pelo alongamento da célula mãe (leveduriforme) que ocorre no início da fase de filamentação, e se apresenta como um essencial fator de virulência para essas espécies (Giolo; Terezinha; Svidzinski, 2010). A presença de tubos germinativos em cepas de *Candida albicans* está associada a candidíases vulvovaginais sintomáticas segundo Consolaro *et al.*, (2005).

Rosseti *et al.* (2011) induziu a formação de tubos germinativos de *Candida albicans* em meio SD enriquecido com soro de cabra. Na exposição das células à concentração de 10 μ M de (MeOPhSe)₂ e (PhSe)₂, por um período de cinco horas, 100% dos tubos germinativos foram inibidos. O composto (p-Cl-PhSe)₂ foi capaz de inibir 80% da formação dessas estruturas na mesma concentração. Nos resultados encontrados neste estudo, o composto (MeOPhSe)₂ inibiu o crescimento de estruturas filamentosas no biofilme dupla-espécie cultivado em meio RPMI-

1640. Curiosamente, os outros compostos, apesar de terem também efeito sobre essas estruturas, como apontou Rosseti *et al.* (2011), não obtiveram resultados tão expressivos quanto aos filamentos quando comparados ao composto (MeOPhSe)₂ (Figura 14).

As EROs são consideradas mecanismos de ação antimicrobianos relatados contra espécies de bactérias e fungos. Elas podem estar presentes de forma secundária em antibióticos convencionais como norfloxacin, ampicilina e kanamicina, contra *Escherichia coli*, contribuindo para a morte celular dessa espécie (Kohanski *et al.*, 2007). Em relação aos fungos, as EROs induzem ao estresse oxidativo, causando ruptura de membranas (celular e mitocondrial) e fragmentação, participando de uma cascata de eventos que culminam em apoptose (Gonzalez-Jimenez; Perlin; Shor, 2023). O composto (PhSe)₂ induziu a produção de EROs na espécie *Saccharomyces cerevisiae*, levedura relacionada a produção de pão e cerveja. Os autores determinaram que houve aumento significativo na produção de EROs após 16h de exposição às concentrações acima de 10µM de (PhSe)₂, além de aumento da permeabilidade de membrana e alteração da morfologia celular (redução do tamanho das células) (Galant *et al.*, 2017).

Os autores Rosseti, Rocha e Costa (2015) também encontraram essa relação através da administração de (PhSe)₂ em células de *Candida albicans*. A produção de EROs na presença de 10µM de (PhSe)₂ aumentou 67%, e ainda, a permeabilidade de membrana da espécie *Candida albicans* foi, aproximadamente, três vezes maior na presença desta concentração do composto pelo período de 4h. Analisando esses dados em conjunto, os autores determinaram que a presença de EROs culminaram no aumento da permeabilidade da membrana e, conseqüentemente, promoveram danos celulares. Estes dados podem indicar que os danos causados aos biofilmes dupla-espécie de *Candida albicans* e *Candida krusei*, pelos compostos de organoselênio, podem estar relacionados a indução de EROs e danos na membrana celular de ambas as espécies.

Há na literatura descrições de biofilmes dupla-espécie entre a espécie *Candida albicans* e algumas espécies bacterianas, indicado que a espécie promove resistência a algumas cepas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (Alam *et al.*, 2020; Eshima *et al.*, 2022; Short *et al.*, 2021). Também existem estudos caracterizando biofilmes dupla-espécie de *Candida albicans* com não-*albicans* (Benhabib *et al.*, 2021; Franco-Duarte *et al.*, 2022; Martins *et al.*, 2016). Porém, modelos utilizando as espécies *Candida albicans* e *Candida krusei* são mais escassos na literatura.

Sabe-se que houveram diferenças entre a inibição do biofilme dupla-espécie quando na presença de diferentes meios em todas as suas fases. As relações entre *Candida*

albicans/Candida krusei mostraram-se diferentes, apresentando maior concentração de *Candida albicans* em meio RPMI-1640, assim como de *Candida krusei* em meio SD. Esses resultados também foram encontrados por Passos *et al.* (2023), que trataram os biofilmes com terapia fotodinâmica. O tratamento, usando azul de toluidina, foi capaz de inibir ~40% dos biofilmes formados em meio RPMI-1640, porém para aqueles formados em meio SD, o tratamento não obteve resultado significativo. Os autores atribuíram, para essa diferença de resultados, as proporções de *Candida albicans/Candida krusei*.

O meio RPMI-1640 é mais complexo em termos de substâncias que o meio SD, e maior se assemelha aos fluídos humanos, obtendo sistema tampão de pH, altas concentrações de vitaminas e colinas (Chandra *et al.*, 2001). O meio SD é usado especificamente para crescimento de fungos, apresentando maior concentração de glicose e proteínas, o que carece no meio RPMI-1640 (Porfirio *et al.*, 2017). Porfirio *et al.* (2017) afirma que o biofilme é altamente influenciado pelo meio, e que o meio RPMI-1640 fornece nutrientes necessários para que se forme um biofilme mais resistente e heterogêneo para *Candida spp.* Porém, neste estudo, percebe-se que *Candida krusei* possui maior facilidade de aderir e formar biofilmes em meio SD.

Segundo Weerasekera *et al.* (2016) *Candida albicans* produz um biofilme mais significativo, com alta produção de matriz polimérica e transição leveduriforme em meio RPMI-1640, comparada a outros meios como o SD e YND (Yeast Nitrogen-Based), sendo o último o que obteve menos biomassa. Porém, o meio SD promoveu maior curva de crescimento de células planctônicas. Já para *Candida não-albicans*, Tan *et al.*, (2016) notou que o meio RPMI-1640 não favoreceu a formação de biofilme para *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*, em relação aos meios BHI (Brain Heart Infusion) e YPD (Yeast Peptone dextrose), notando que *Candida krusei* foi a que menos formou biofilme em meio RPMI-1640, mesmo com altas concentrações de inóculo e maior tempo de maturação.

A diferença de relação entre as espécies *Candida albicans* e *Candida krusei* pode levantar a hipótese que, nos biofilmes dupla-espécie formados em contato com os fluídos humanos, a espécie mais prevalente seja de *Candida albicans*, levando em consideração a composição do meio RPMI-1640. Isso sugere que em modelos *in vivo*, a ação dos compostos seja mais significativa, considerando os resultados obtidos neste estudo.

8 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados mostraram que há atividade antifúngica promissora dos compostos de organoselênio para biofilmes dupla-espécie de *Candida albicans* e *Candida krusei*. O efeito do composto (MeOPhSe)₂ foi mais positivo comparado aos outros, obtendo capacidade relevante de inibição, principalmente quando presente na formação dos biofilmes mistos. Além disso, mostrou-se capaz de reduzir as cepas tanto de *Candida albicans* como de *Candida krusei* nos testes utilizando ágar cromogênico de maneira significativa.

O efeito dos três compostos foi mais significativo em fases prematuras do biofilme, obtendo resultados menores, mas ainda presentes, em biofilmes maduros. Porém, sabe-se que biofilmes maduros são naturalmente mais resistentes a qualquer tratamento.

Além disso, foi demonstrado que os meios de cultura usados influenciam na composição do biofilme, em termos de proporção de cada espécie. E que o efeito das drogas derivadas de selênio é afetado pela proporção de *Candida albicans/Candida krusei* obtidas nestes diferentes biofilmes.

Por fim, os resultados mostram que estes compostos de organoselênio são capazes de inibir a adesão e formação de biofilmes dupla-espécie de *Candida albicans* e *Candida krusei*, e também o biofilme formado, porém em menor grau. É possível concluir que, estes compostos dependem da dose e da relação *Candida albicans/Candida krusei* em seus biofilmes, para que haja efeito mais significativo. Entretanto, apesar de seu efeito citotóxico ser baixo em linhagens de células animais *in vitro*, são necessários testes *in vivo* para determinar sua eficácia e toxicidade em sistemas metabólicos, com o objetivo de analisar a sua aplicabilidade e levar esses tratamentos à fase clínica.

REFERÊNCIAS

- ACKER, C. I. *et al.* Diphenyl diselenide attenuates hepatic and hematologic toxicity induced by chlorpyrifos acute exposure in rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 8, p. 3481–3490, 2012.
- AL-MUSAWI, T. S. *et al.* A seven-year surveillance of *Candida* bloodstream infection at a university hospital in KSA. **Journal of Taibah University Medical Sciences**, v. 16, n. 2, p. 184–190, 2021.
- ALAM, F. *et al.* *Candida albicans* enhances meropenem tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in a dual-species biofilm. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 4, p. 925–935, 1 abr. 2020.
- ALVES, C. T. *et al.* *Candida albicans* promotes invasion and colonisation of *Candida glabrata* in a reconstituted human vaginal epithelium. **Journal of Infection**, v. 69, n. 4, p. 396–407, 1 out. 2014.
- AMARAL, B. P. *et al.* Diphenyl diselenide and cidofovir present anti-viral activity against Bovine Alphaherpesvirus 2 in vitro and in a sheep model. **Research in Veterinary Science**, v. 134, p. 78–85, 2021.
- BARBOSA, N. B. V. *et al.* Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: Possible relationship with oxidative stress. **Chemico-Biological Interactions**, v. 163, n. 3, p. 230–238, 2006.
- BENHABIB, O. B. B. *et al.* Interaction in a dual-species biofilm of *Candida albicans* and *Candida glabrata* co-isolated from intravascular catheter. **Microbial Pathogenesis**, v. 152, p. 104613, 2021.
- BRANCO, J.; MIRANDA, I. M.; RODRIGUES, A. G. *Candida parapsilosis* Virulence and Antifungal Resistance Mechanisms: A Comprehensive Review of Key Determinants. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 1, p. 80, 2023.
- CANELA, Heliara Maria Spina *et al.* Genetic diversity assessed using PFGE, MLP and MLST in *Candida* spp. candidemia isolates obtained from a Brazilian hospital. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 503-516, 2021.
- MEOTTI, Flavia Carla *et al.* Toxicological evaluation of subchronic exposure to diphenyl diselenide in rats. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, n. 5, p. 638-644, 2008.
- CHANDRA, J. *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.
- CHEN, Hui *et al.* The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 337-348, 2020.

- CHU, Yunfei *et al.* Advances in the application of the non-conventional yeast *Pichia kudriavzevii* in food and biotechnology industries. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 2, p. 170, 2023.
- COCO, B. J. *et al.* Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. **Oral microbiology and immunology**, v. 23, n. 5, p. 377-383, 2008.
- COOK, A. *et al.* Neonatal invasive candidiasis in low- and middle-income countries: Data from the NeoOBS study. **Medical Mycology**, v. 61, n. 3, 2023.
- DA COSTA, V. G. *et al.* Nosocomial Bloodstream *Candida* Infections in a Tertiary-Care Hospital in South Brazil: A 4-Year Survey. **Mycopathologia**, v. 178, n. 3–4, p. 243–250, 1 out. 2014.
- DA SILVA, B. M. *et al.* (PhSe)₂ and (pCl-PhSe)₂ organochalcogen compounds inhibit *Candida albicans* adhesion to human endocervical (HeLa) cells and show anti-biofilm activities. **Biofouling**, v. 37, n. 2, p. 235–245, 2021.
- DE AMORIM, L. M. M. *et al.* The Organochalcogen Compound (MeOPhSe)₂ Inhibits Both Formation and the Viability of the Biofilm Produced by *Candida albicans*, at Different Stages of Development. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 33, p. 3964–3971, 29 nov. 2018.
- DE BEM, A. F. *et al.* Diphenyl diselenide decreases serum levels of total cholesterol and tissue oxidative stress in cholesterol-fed rabbits. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 105, n. 1, p. 17–23, 2009.
- DENARDI, L. B. *et al.* Antifungal Activities of Diphenyl Diselenide alone and in Combination with Fluconazole or Amphotericin B against *Candida glabrata*. **Mycopathologia**, v. 176, n. 1–2, p. 165–169, ago. 2013.
- DE OLIVEIRA, D. M. P. *et al.* Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n.3, p.10-1128, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1128/cmr.00181-19>
- DEL POZO, Jose Luis. Biofilm-related disease. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 16, n. 1, p. 51-65, 2018.
- DESROUSSEAUX, C. *et al.* Modification of the surfaces of medical devices to prevent microbial adhesion and biofilm formation. **Journal of hospital Infection**, v. 85, n. 2, p. 87-93, 2013.
- DIAS, G. R. M. *et al.* Diphenyl diselenide supplemented diet reduces depressive-like behavior in hypothyroid female rats. **Physiology and Behavior**, v. 124, p. 116–122, 2014.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 23, n. 6, p. 352-352, 2002.
- DOUGLAS, L. J. *Candida* biofilms and their role in infection. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 1, 2003.

DROHAN, S. E., *et al.* Incentivizing hospital infection control. **PNAS**, v. 116 n. 13 p. 6221-6225, 2019.

DRYDEN, M. Reactive oxygen species: a novel antimicrobial. **International journal of antimicrobial agents**, v. 51, n. 3, p. 299-303, 2018.

DRYDEN, M. S. *et al.* Reactive oxygen: A novel antimicrobial mechanism for targeting biofilm-associated infection. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 8, p. 186-191, 2017.

EICHELBERGER, K. R.; CASSAT, J. E. Metabolic Adaptations During *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* Co-Infection. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 797550, 2021.

ESHIMA, S. *et al.* *Candida albicans* Promotes the Antimicrobial Tolerance of *Escherichia coli* in a Cross-Kingdom Dual-Species Biofilm. **Microorganisms**, v. 10, n. 11, 1 nov. 2022.

ESTER, J.; LOPEZ, M. **Candidiasis (vulvovaginal)**. Clinical Evidence, 2013.

FISHER, M. C.; DENNING, D. W. The WHO fungal priority pathogens list as a game-changer. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 211-212, 2023.

FRANCO-DUARTE, R. *et al.* Metabolic profile of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* interactions within dual-species biofilms. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 98, n. 4, 1 abr. 2022.

FRITSCH, L. N. *et al.* Comparative analysis of biofilm formation by *Candida albicans* and *Candida krusei* in different types of contact lenses. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 85, n. 3, p. 235–239, 2022.

GABRILSKA, R. A.; RUMBAUGH, K. P. Biofilm models of polymicrobial infection. **Future microbiology**, v. 10, n. 12, p. 1997-2015, 2015.

GIOLO, M. P.; TEREZINHA, ;; SVIDZINSKI, I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, p. 225-234, 2010.

GÓMEZ-GAVIRIA, M.; MORA-MONTES, H. M. Current aspects in the biology, pathogeny, and treatment of candida krusei, a neglected fungal pathogen. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 1673–1689, 2020.

GONZALEZ-JIMENEZ, I.; PERLIN, D. S.; SHOR, E. Reactive oxidant species induced by antifungal drugs: identity, origins, functions, and connection to stress-induced cell death. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 1276406, 2023.

GUINAN, J.; THANGAMANI, S. Antibiotic-induced alterations in taurocholic acid levels promote gastrointestinal colonization of *Candida albicans* **FEMS microbiology letters**, v. 365, n. 18, p. fny196, 2018.

GULATI, M.; NOBILE, C. J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes and infection**, v. 18, n. 5, p. 310-321, 2016.

GUTIERREZ, D. *et al.* Antibiotic-induced gut metabolome and microbiome alterations increase the susceptibility to *Candida albicans* colonization in the gastrointestinal tract. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 96, n. 1, 2020.

HOSIDA, T. Y. *et al.* Interactions between *Candida albicans* and *Candida glabrata* in biofilms: Influence of the strain type, culture medium and glucose supplementation. **Mycoses**, v. 61, n. 4, p. 270–278, 2018.

JAMIU, A. T. *et al.* Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. **Medical mycology**, v. 59, n. 1, p. 14-30, 2021.

JUNG, I. Y. *et al.* A multicenter retrospective analysis of the antifungal susceptibility patterns of *Candida* species and the predictive factors of mortality in South Korean patients with candidemia. **Medicine (United States)**, v. 99, n. 11, 2020.

KAUR, H. *et al.* Prolonged Outbreak of *Candida krusei* Candidemia in Paediatric Ward of Tertiary Care Hospital. **Mycopathologia**, v. 185, n. 2, p. 257–268, 2020.

KARYGIANNI, L. *et al.* Biofilm Matrixome: Extraellular Components in Structures Microbial Communities. **Trends in microbiology**, v. 28, n. 8, p. 668-681, 2020.

KHALIFA, H. O. *et al.* **Prevalence of Antifungal Resistance, Genetic Basis of Acquired Azole and Echinocandin Resistance, and Genotyping of *Candida krusei* Recovered from an International Collection.** MECHANISMS OF RESISTANCE. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2022.

KIM, H. R.; EOM, Y. B. Antifungal and anti-biofilm effects of 6-shogaol against *Candida auris*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 130, n. 4, p. 1142–1153, 1 abr. 2021.

KOHANSKI, M. A. *et al.* A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. **Cell**, v. 130, n. 5, p. 797–810, 7 set. 2007.

KOLLEF, M H, *et al.* Timing of antibiotic therapy in the ICU. **Critical Care**, v. 25, p. 1-10, 2021.

KREULEN, I. A. M. *et al.* *Candida* spp. in Human Intestinal Health and Disease: More than a Gut Feeling. **Mycopathologia**, v. 188, n. 6, p. 845-862, 2023.

KULSHRESTHA, A.; GUPTA, P. Polymicrobial interaction in biofilm: mechanistic insights. **Pathogens and Disease**, v. 80, n. 1, 2022.

KULSHRESTHA, A.; GUPTA, P. Combating polymicrobial biofilm: recent approaches. **Folia Microbiologica**, v. 68, n. 4, p. 495-505, 2023.

KUMAMOTO, C. A.; GRESNIGT, M. S.; HUBE, B. The gut, the bad and the harmless: *Candida albicans* as a commensal and opportunistic pathogen in the intestine. **Current opinion in microbiology**, v. 56, p. 7-15, 2020.

- LAM, P. L. *et al.* The role of reactive oxygen species in the biological activity of antimicrobial agents: An updated mini review **Chemico-Biological Interactions**, v. 320, p. 109023, 2020.
- LARSSON, D.; FLATCH, C. Antibiotic resistance in the environment **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 257-269, 2022.
- LAX, S.; GILBERT, J. A. Hospital-associated microbiota and implications for nosocomial infections. **Trends in molecular medicine**, v. 21, n. 7, p. 427-432, 2015.
- LI, Y. *et al.* Impact of nosocomial infections surveillance on nosocomial infection rates: A systematic review. **International journal of surgery**, v. 42, p. 164-169, 2017.
- LOHSE, M. B. *et al.* Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 19-31, 2018.
- LU, H. *et al.* *Candida albicans* targets that potentially synergize with fluconazole. **Critical reviews in microbiology**, v. 47, n. 3, p. 323-337, 2021.
- MARTINS, C. H. G. *et al.* *Candida/Candida* biofilms. First description of dual-species *Candida albicans/C. rugosa* biofilm. **Fungal Biology**, v. 120, n. 4, p. 530–537, 2016.
- MAUBON, D. *et al.* Resistance of *Candida spp.* to antifungal drugs in the ICU: Where are we now? **Intensive care medicine**, v. 40, p. 1241-1255, 2014.
- MAYER, Jiri *et al.* Sepsis and septic shock: I. Definitions and pathophysiology. **Supportive Care in Cancer**, v. 3, p. 106-110, 1995.
- MBA, I. E.; NWEZE, E. I. Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 39, n. 10, p. 1797-1819, 2020.
- MCCARTY, T. P.; WHITE, C. M.; PAPPAS, P. G. Candidemia and Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics**, v. 35, n. 2, p. 389-413, 2021.
- MUKHERJEE, P. K. *et al.* *Candida* biofilm: A well-designed protected environment. **Medical mycology**, v. 43, n. 3, p. 191-208, 2005.
- MUNHOZ, L. S. *et al.* Effectiveness of diphenyl diselenide against experimental sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. **Medical Mycology**, v. 61, n. 4, p. myad035, 2023.
- NAVARRO-ARIAS, M. J. *et al.* Differential recognition of *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, and *Candida auris* by human innate immune cells. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 783–794, 2019.
- NEELY, A. N.; HOLDER, I. A. Antimicrobial resistance. **Burns**, v. 25, p. 17-24, 1999.

NIEMANN, B. *et al.* Biofilm Formation on Central Venous Catheters: A Pilot Study. **Journal of Surgical Research**, v. 280, p. 123–128, 1 dez. 2022.

PAPPAS, P. G. *et al.* Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1–20, 2018.

PARUMS, D. V. Editorial: The World Health Organization (WHO) Fungal Priority Pathogens List in Response to Emerging Fungal Pathogens During the COVID-19 Pandemic. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 28, p. e939088-1, 2022.

PATHIRANA, R. U. *et al.* Filamentous *non-albicans Candida* species adhere to *Candida albicans* and benefit from dual biofilm growth. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1188, 2019.

PAULMIER, C. **Selenium Reagents and Intermediates in Organic Synthesis**. Oxford: Pergamon, 1986.

PASSOS, J. C. S. *et al.* The inhibitory effect of photodynamic therapy on dual-species biofilms of *Candida albicans* and *Candida krusei* can be determined by *Candida albicans/Candida krusei* ratio. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 44, p. 103787, 2023.

POESTER, V. R. *et al.* Antifungal activity of diphenyl diselenide alone and in combination with itraconazole against *Sporothrix brasiliensis*. **Medical Mycology**, v. 57, n. 3, p. 328–331, 2019.

POESTER, V. R. *et al.* Diphenyl diselenide alone and in combination with itraconazole against *Sporothrix schenckii* s.str. and *Sporothrix globosa*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 3, p. 1271-1274, 2021.

POLKE, M.; HUBE, B.; JACOBSEN, I. D. *Candida* survival strategies. **Advances in Applied Microbiology**, v. 91, p. 139–235, 2015.

PONDE, N. O. *et al.* *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. **Critical reviews in microbiology**, v. 47, n. 1, p. 91-111, 2021.

PORFÍRIO, B. *et al.* Cell Surface Hydrophobicity And Biofilm Formation Of *Candida* Yeast Species In Different Culture Media. **Bioscience Journal**, v. 33, n. 3, p. 739-746, 2017.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 792-798, 2019.

RAJA, N. S. Epidemiology, risk factors, treatment and outcome of *Candida* bloodstream infections because of *Candida albicans* and *Candida non-albicans* in two district general hospitals in the United Kingdom. **International Journal of Clinical Practice**, v. 75, n. 1, 2021.

REICHHARDT, C.; STEVENS, D. A.; CEGELSKI, L. Fungal biofilm composition and opportunities in drug discovery. **Future medicinal chemistry**, v. 8, n. 12, p. 1455-1468, 2016.

RODRIGUES, C. F. *et al.* *Candida glabrata*'s recurrent infections: biofilm formation during Amphotericin B treatment. **Letters in Applied Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 77–81, 1 ago. 2016.

RODRÍGUEZ-CERDEIRA, C. *et al.* Biofilms and vulvovaginal candidiasis **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 174, p. 110-125, 2019.

ROSA, R. M. *et al.* Pharmacology and toxicology of diphenyl diselenide in several biological models. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 1287-1304, 2007.

ROSSATO, L. *et al.* In vitro combination between antifungals and diphenyl diselenide against *Cryptococcus* species. **Mycoses**, v. 62, n. 6, p. 508–512, 2019.

ROSSETI, I. B. *et al.* *Candida albicans* growth and germ tube formation can be inhibited by simple diphenyl diselenides [(PhSe)₂, (MeOPhSe)₂, (p-Cl-PhSe)₂, (F₃CPhSe)₂] and diphenyl ditelluride. **Mycoses**, v. 54, n. 6, p. 506–513, 2011.

ROSSETI, I. B.; ROCHA, J. B. T.; COSTA, M. S. Diphenyl diselenide (PhSe)₂ inhibits biofilm formation by *Candida albicans*, increasing both ROS production and membrane permeability. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 29, p. 289–295, 2015.

RUPE, C. *et al.* Oral *Candida* spp. Colonisation Is a Risk Factor for Severe Oral Mucositis in Patients Undergoing Radiotherapy for Head & Neck Cancer: Results from a Multidisciplinary Mono-Institutional Prospective Observational Study. **Cancers**, v. 14, n. 19, p. 4746, 2022.

SACHIVKINA, N.; PODOPRIGORA, I.; BOKOV, D. Morphological characteristics of *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, and *Candida glabrata* biofilms, and response to farnesol. **Veterinary world**, v. 14, n. 6, p. 1608, 2021.

SAINT, S.; VEENSTRA, D. L.; LIPSKY, B. A. The Clinical and Economic Consequences of Nosocomial Central Venous Catheter-Related Infection: Are Antimicrobial Catheters Useful? **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 21, n. 6, p. 375–380, 2000.

SALCI, T. P. *et al.* **Targeting *Candida* spp. to develop antifungal agents.** Drug Discovery Today/Elsevier Ltd, 2018.

SANCINETO, L. *et al.* Diphenyl diselenide derivatives inhibit microbial biofilm formation involved in wound infection. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, 21 set. 2016.

SCHUSTER, J. J.; MARKX, G. H. Biofilm architecture. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 146, p. 77–96, 2014.

SHARMA, D.; MISBA, L.; KHAN, A. U. Antibiotics versus biofilm: An emerging battleground in microbial communities. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 8, p. 1-10, 2019.

SHORT, B. *et al.* Investigating the Transcriptome of *Candida albicans* in a Dual-Species *Staphylococcus aureus* Biofilm Model. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 2021.

DE SIQUEIRA, V. M. *et al.* (MeOPhSe)₂, a synthetic organic selenium compound, inhibits virulence factors of *Candida krusei*: Adherence to cervical epithelial cells and biofilm formation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 73, p. 127019, 2022.

SHEPHERD, M. C.; POULTER, R. T. M.; SULLIVAN, P. A. *Candida albicans: biology, genetics, and pathogenicity*. **Annual Review of Microbiology**, v. 39, p. 579-614, 1985.

SNARY, E. L. *et al.* Antimicrobial resistance: A microbial risk assessment perspective. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 906-917, 2004.

SOBEL, J. D. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 214, n. 1, p. 15-21, 2016.

STERZENBACH, T. *et al.* Bioadhesion in the oral cavity and approaches for biofilm management by surface modifications. **Clinical oral investigations**, v. 24, p. 4237-4260, 2020.

SUBERVIOLA, Borja. Seguridad clínica de la anfotericina B liposomal. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 38, n. 2, p. 56-60, 2021.

SULEYMAN, G.; ALANGADEN, G. Nosocomial Fungal Infections: Epidemiology, Infection Control and Prevention, **Infectious Disease Clinics**, v. 30, n. 4, p. 1023-1052, 2016.

TAN, Y. *et al.* Influence of culture conditions for clinically isolated *non-albicans Candida* biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 130, p. 123-128, 2016.

TAN, C. H. *et al.* All together now: experimental multispecies biofilm model systems. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 42-53, 2017.

THOMAS-RÜDDEL, D. O. *et al.* Risk Factors for Invasive Candida Infection in Critically Ill Patients: A Systematic Review and Meta-analysis. **Chest**, v. 161, n. 2, p. 345-355, 2022.

TOGNIM, M. C. B.; CARDOSO, C. L. Nosocomial outbreaks in Brazil: can they be controlled? **Journal of Hospital Infection**, v. 94, n. 4, p. 320-321, 2016.

TOLKER-NIELSEN, T. Biofilm Development. In: MUKHERJEE, P. K. (org.). *et al.* **Microbial biofilms**. Washington, DC: ASM Press, 2015.
<https://doi.org/10.1128/9781555817466>

VENTURINI, T. P. *et al.* Antifungal activities of diphenyl diselenide and ebselen alone and in combination with antifungal agents against *Fusarium spp.* **Medical Mycology**, v. 54, n. 5, p. 550-555, 2016.

VIEIRA DE MELO, A. P. *et al.* Virulence factors of *Candida spp.* obtained from blood cultures of patients with candidemia attended at tertiary hospitals in Northeast Brazil. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 29, n. 2, p. 132-139, 2019.

WALL, G. *et al.* *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. **Current opinion in microbiology**, v. 52, p. 1-6, 2019.

WEERASEKERA, M. M. *et al.* Culture media profoundly affect *Candida albicans* and *Candida tropicalis* growth, adhesion and biofilm development. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 11, p. 697–702, 1 nov. 2016.

WILDNER, G. *et al.* Ebselen and Diphenyl Diselenide Inhibit SARS-CoV-2 Replication at Non-Toxic Concentrations to Human Cell Lines. **Vaccines**, v. 11, n. 7, 2023.

WILLIAMS, D. W.; LEWIS, M. Isolation and identification of candida from the oral cavity. **Oral diseases**, v. 6, n. 1, p. 3–11, 2000. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2000.tb00314.x>.

WITCHLEY, J. N. *et al.* *Candida albicans* Morphogenesis Programs Control the Balance between Gut Commensalism and Invasive Infection. **Cell Host and Microbe**, v. 25, n. 3, p. 432- 443.e6, 2019.

XIA, J.; GAO, J.; TANG, W. Nosocomial infection and its molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Bioscience trends**, v. 10, n. 1, p. 14-21, 2016.

XU, Z. *et al.* Crystal Violet and XTT Assays on *Staphylococcus aureus* Biofilm Quantification. **Current Microbiology**, v. 73, n. 4, p. 474–482, 2016.

YADAV, J. S. S. *et al.* *Candida krusei*: Biotechnological potentials and concerns about its safety. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 937-952, 2012.

ZARAGOZA, R.; MASEDA, E.; PEMÁN, J. Individualized antifungal therapy in critically ill patients with invasive fungal infection. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 38, n. 2, p. 68-74, 2021.

ŽIEMYTĖ, M. *et al.* Real-time monitoring of biofilm growth identifies andrographolide as a potent antifungal compound eradicating *Candida* biofilms. **Biofilm**, v. 5, p. 100134, 2023.