



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**LUÍS FELIPE BEZERRA LINO**

**EFEITO DO EBSELEN SOBRE *Candida* spp.: AVALIAÇÃO *in vitro* DA  
SENSIBILIDADE DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES, COM  
PROPOSTA *in silico* DO MECANISMO DE AÇÃO.**

**FORTALEZA-CE**

**2025**

LUÍS FELIPE BEZERRA LINO

**EFEITO DO EBSELEN SOBRE *Candida* spp.: AVALIAÇÃO *in vitro* DA  
SENSIBILIDADE DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES, COM  
PROPOSTA *in silico* DO MECANISMO DE AÇÃO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gláucia Morgana de Melo Guedes.

Coorientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Giovanna Riello Barbosa Correia

**FORTALEZA-CE**

**2025**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- L73e Lino, Luis Felipe Bezerra.  
Efeito do ebselen sobre Candida spp: : Avaliação in vitro da sensibilidade de células planctônicas e biofilmes, com proposta in silico do mecanismo de ação / Luis Felipe Bezerra Lino. – 2025.  
73 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2025.  
Orientação: Profa. Dra. Gláucia Morgana de Melo Guedes.  
Coorientação: Profa. Dra. Giovanna Riello Barbosa Correia.
1. Candida spp.. 2. Resistência Antifúngica. 3. Reposicionamento de fármaco. 4. Ebselen. I. Título.  
CDD 616.9
-

LUÍS FELIPE BEZERRA LINO

**EFEITO DO EBSELEN SOBRE *Candida* spp.: AVALIAÇÃO *in vitro* DA  
SENSIBILIDADE DE CÉLULAS PLANCTÔNICAS E BIOFILMES, COM  
PROPOSTA *in silico* DO MECANISMO DE AÇÃO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gláucia Morgana de Melo Guedes (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Jacqueline Cosmo Andrade Pinheiro  
Universidade Federal do Cariri – (UFCA)

---

Prof. Dr. Saulo Relison Tintino  
Universidade Regional Do Cariri (URCA)

Feliz é todo aquele que não anda conforme os conselhos dos perversos; que não entra no caminho dos malvados, nem junto aos zombadores vai sentar-se; mas encontra seu prazer na lei de Deus e a medita, dia e noite, sem cessar.

- Sl 1,1-2.3.4.6 (R. Sl 39,5a)

## AGRADECIMENTO

A Deus, só o Senhor sabe o quanto este último ano foi difícil e tudo o que enfrentei. Pai, agradeço por todas as bênçãos que recebi e continuo recebendo. Peço que continue abençoando a mim e a todos que estiveram ao meu lado nesta caminhada.

À minha mãe, Benedita Maria, e ao meu pai, Luís Carlos, minha eterna gratidão. Obrigado por todo o apoio, carinho e amor incondicional. Quero que saibam o quanto sinto falta da presença de vocês e como foi difícil deixar nossa casa. A distância tornou tudo mais solitário, mas sigo firme com a esperança de retribuir tudo o que fizeram por mim e trazer orgulho a vocês. Apesar da saudade, saibam que seu filho está bem e sempre buscará ser o filho que vocês merecem.

Aos meus irmãos, Eduardo e Gean, às suas esposas e às minhas irmãs, Érica e Vitória, sou imensamente grato e feliz por ter vocês em minha vida. Sinto-me abençoado por saber que posso contar com vocês em todos os momentos. Espero, um dia, retribuir esse apoio e ser um pilar para nossa família, assim como vocês são para mim.

Ao Sr. Sebastião e à Dra. Nildes, por todo o apoio incondicional à minha educação e à dos meus irmãos. Pelos ensinamentos transmitidos com sabedoria, pelos conselhos dados com carinho e firmeza, e por nunca medirem esforços para apoiar não apenas a mim, mas a toda a nossa família. Sua generosidade, presença constante e exemplo de vida foram fundamentais na nossa formação pessoal e acadêmica. Esta conquista também é fruto do amor, da dedicação e da confiança que sempre depositaram em nós. Meu mais sincero agradecimento.

À Elisa, minha melhor amiga, namorada, futura noiva e esposa. Amor, obrigado por tudo. Você é tudo o que pedi a Deus. Você me salvou. Meu mundo era cinza, e você trouxe cor a ele. Sua presença ilumina tudo ao redor – não existe escuridão quando você está por perto. Você é bondade, pureza e a luz do meu jardim, meu girassol. Sou grato por cada conversa, pelo seu ombro amigo, por me ouvir e até por brigar comigo quando foi preciso. Hoje, sou feliz em qualquer situação, porque tenho você ao meu lado. Você merece o mundo, mas eu sempre vou querer lhe dar todas as estrelas. Este trabalho só foi possível graças a você, ao seu apoio incondicional e à sua dedicação. Te amo mais que tudo.

À dona Ana, sr. Ezady, Letícia e Pedro, a família da Elisa, obrigado por todo o suporte. Em todos os momentos em que me senti sozinho, em que precisei de uma base familiar, de um lugar para confiar e de um espaço seguro, encontrei tudo isso em vocês. Serei eternamente grato por todo o carinho e acolhimento. Espero, um dia, poder retribuir tudo o que fizeram por mim e, desde já, peço desculpas por qualquer coisa. Também sou grato aos pets mais lindos do mundo, Lupita e Mogli, vocês são muito especiais.

Aos meus amigos Thales, Victor, Breno, Guilherme, Ravi, Levi, Rodrigo, Ricardo, Pereira, Matheus, Alexandre e Mavi, apesar da distância, sempre gosto de lembrar dos bons momentos que tivemos juntos e de como era viciante estar com vocês. Sou grato por tudo, pessoal.

Aos meus queridos amigos Louise, Gillian, Olivia, Pedro e Bruno, vocês são muito especiais, pois apareceram em um momento conturbado, no qual eu me sentia muito sozinho. Obrigado por todo o carinho pessoal, e espero poder conhecê-los o quanto antes.

Aos meus amigos que apareceram nos 45 minutos do segundo tempo do meu mestrado — Pedro Coelho, Sara e Anderson —, obrigado pelas conversas que, apesar de curtas, são sempre interessantes, respeitadas e divertidas. De formas diferentes, vocês foram, sim, importantes nessa minha caminhada.

Também quero agradecer ao pessoal do laboratório da professora Rossana — Renata, Benaya, Pedro e Ilaina. Obrigado por sempre aceitarem minhas negociações por materiais e confiarem que, algum dia, eu iria desenvolvê-los para vocês. Além disso, sempre me sinto muito bem quando faço uma visita ao laboratório de vocês. Só tenho boas lembranças desse incrível laboratório.

Aos profissionais, professores e amigos em quem me inspiro — Bruno Jaegger e Mário Sidney —, obrigado por terem sido minha base, pelos conselhos e por todas as oportunidades e espaços que me foram dados para treinar durante a graduação. Sou grato por isso e espero ser, hoje, um profissional que faça jus aos ensinamentos de vocês.

Aos meus coautores e colegas do laboratório GraMM, sou imensamente grato pelo suporte e apoio. Sem dúvida, este trabalho não teria sido possível sem a colaboração de cada um de vocês. Ao Vinícius e Marcos, vivemos e compartilhamos inúmeras experiências. Apesar de seguirmos caminhos diferentes, preservarei para sempre nossa amizade. Estarei distante, mas sempre feliz e torcendo pelo crescimento de vocês. Vocês possuem um grande potencial, pois, assim como eu, trabalham com paixão e dedicação. Quero que saibam que estarei à disposição sempre que precisarem.

À minha orientadora, Profa. Dra. Glaucia Morgana de Melo Guedes, e às professoras Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia e Dra. Giovanna Riello Barbosa Correia, agradeço imensamente pela oportunidade de trabalhar com o que mais amo: a pesquisa. Sou profundamente grato por tudo. Com toda certeza, vocês são e serão minha inspiração como pesquisadores. Espero poder fazer jus ao título de mestre, levando orgulho a vocês e ao laboratório de onde recebo tanto aprendizado.

Ao Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI), ao Prof. Dr. Aldo, José Amadeu, Jeferson e à Samilly e à Tete, agradeço profundamente por me acolherem. Para mim, será um prazer e uma

honra trabalhar com vocês. Desde já, sou imensamente grato e ansioso para o início das atividades, e prometo total comprometimento, zelo e dedicação, bem como a manutenção do nível de responsabilidade exigido para atuar neste ambiente.

Agradeço, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica (PPGMM) pelo suporte institucional e científico durante esta jornada, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo fomento e apoio financeiro por meio da bolsa de estudos, que viabilizou a dedicação plena à pesquisa e à formação acadêmica.

Que Deus abençoe todos os envolvidos neste trabalho. Amém.



## RESUMO

As infecções causadas por *Candida* spp. apresentam uma ampla variedade de manifestações clínicas, desde infecções superficiais e mucosas até infecções amplamente disseminadas. Um número limitado de classes antifúngicos está disponível para tratar pacientes com infecções graves e, nos últimos anos, o relato de resistência tem sido crescente. Diante disso, torna-se necessária a busca por novos compostos com potencial antifúngico e o Ebselen, um composto organosselênio com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, tem emergido como um potencial agente antimicrobiano, demonstrando atividade *in vitro* contra diferentes cepas fúngicas. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* a ação do Ebselen sobre o crescimento planctônico e biofilme de espécies do gênero *Candida*, além de investigar *in silico* possíveis mecanismos de ação. Foram utilizados 15 isolados clínicos de *Candida* spp.: *C. albicans* (n = 5), *C. parapsilosis* (n = 5) e *C. tropicalis* (n = 5). Inicialmente, testes de sensibilidade foram realizados para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antifúngicos clássicos Fluconazol (FLC), Itraconazol (ITZ), Anfotericina B (ANB) e Micafungina (MCF), conforme as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI - M27 S4). Posteriormente, foi avaliada a interação da associação do Ebselen em concentrações subinibitórias (CIM/2, CIM/4 e CIM/8) com os antifúngicos clássicos sobre o crescimento planctônico e biofilme de *Candida* spp. A avaliação da ação sobre o biofilme foi realizada por quantificação de biomassa com cristal violeta e atividade metabólica com MTT. Além disso, foi conduzida uma análise de *docking* molecular para determinar o possível alvo molecular do Ebselen. Os valores de CIM obtidos das *Candida* spp. para o Ebselen variaram de 8 - 0,5 µg/mL (MG = 3,7); para o FLC de 128 - 0,5 µg/mL (MG = 35,86); para o ITZ de 32 - 0,063 µg/mL (MG = 8,7), para a ANB, de 0,5 - 0,062 µg/mL (MG = 0,133) e para a MCF de 0,5 - 0,125 µg/mL (MG = 0,3). Foi observada interação sinérgica quando os antifúngicos foram combinados com concentrações subinibitórias (CIM/8) de Ebselen, resultando na redução das CIM médias de FLC (MG = 1,21), ITZ (MG = 1,21), ANB (MG = 0,015) e MCF (MG = 0,015). Em relação ao efeito sobre o biofilme, a melhor interação foi observada na associação com a ANB. Isoladamente, em concentrações de 2 a 0,25 µg/mL, a ANB reduziu em média 43% da biomassa e 54% da atividade metabólica, entretanto, quando associada ao Ebselen (CIM/8), a redução foi de 62% e 84%, respectivamente. A combinação com Ebselen também potencializou a ação da MCF em baixas concentrações (1 a 0,25 µg/mL), reduzindo biomassa e atividade metabólica. A associação do Ebselen com FLC e ITZ não interferiu significativamente na biomassa e na atividade metabólica do biofilme de *Candida* spp. Em relação ao *docking* molecular, a análise revelou uma alta afinidade do Ebselen com a Timidilato quinase, sugerindo que seu mecanismo de ação envolve a interferência na síntese de DNA. Em suma, o Ebselen demonstrou sinergia com antifúngicos clássicos contra *Candida* spp. na forma planctônica e, em biofilmes, potencializou especialmente a ação da ANB. Esses achados reforçam o potencial do Ebselen como um adjuvante terapêutico no manejo da resistência antifúngica.

**PALAVRAS-CHAVES:** *Candida* spp., Resistência Antifúngica, Reposicionamento de fármaco, Ebselen.

## ABSTRACT

Infections caused by *Candida* spp. exhibit a wide range of clinical manifestations, from superficial and mucosal infections to widely disseminated infections. A limited number of antifungal classes are available to treat patients with severe infections, and in recent years, reports of resistance have been increasing. Given this scenario, the search for new compounds with antifungal potential is necessary, and Ebselen, an organoselenium compound with antioxidant and anti-inflammatory properties, has emerged as a potential antimicrobial agent, demonstrating *in vitro* activity against different fungal strains. Thus, this study aimed to evaluate *in vitro* the action of Ebselen on the planktonic growth and biofilm formation of *Candida* species, as well as to investigate *in silico* possible mechanisms of action. A total of 15 clinical isolates of *Candida* spp. were used: *C. albicans* (n = 5), *C. parapsilosis* (n = 5), and *C. tropicalis* (n = 5). Initially, susceptibility tests were performed to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of classical antifungals—Fluconazole (FLC), Itraconazole (ITZ), amphotericin B (AMB), and micafungin (MCF)—following the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI - M27 S4). Subsequently, the interaction of Ebselen at subinhibitory concentrations (MIC/2, MIC/4, and MIC/8) with classical antifungals was assessed on planktonic growth and biofilm formation of *Candida* spp. The effect on biofilms was evaluated by biomass quantification using crystal violet and metabolic activity assessment using MTT. Additionally, molecular docking analysis was conducted to determine the possible molecular target of Ebselen. The MIC values for Ebselen ranged from 8 to 0.5 µg/mL (GM = 3.7); for FLC from 128 to 0.5 µg/mL (GM = 35.86); for ITZ from 32 to 0.063 µg/mL (GM = 8.7); for AMB from 0.5 to 0.062 µg/mL (GM = 0.133); and for MCF from 0.125 to 0.5 µg/mL (GM = 0.3). Synergistic interaction was observed when antifungals were combined with subinhibitory concentrations (MIC/8) of Ebselen, resulting in a reduction in the mean MIC values of FLC (GM = 1.21), ITZ (GM = 1.21), AMB (GM = 0.015), and MCF (GM = 0.015). Regarding biofilm effects, the best interaction was observed in combination with AMB. Alone, at concentrations of 2 to 0.25 µg/mL, AMB reduced biomass by an average of 43% and metabolic activity by 54%. However, when combined with Ebselen (MIC/8), the reduction increased to 62% and 84%, respectively. The combination with Ebselen also enhanced the action of MCF at low concentrations (1 to 0.25 µg/mL), reducing biomass and metabolic activity. The association of Ebselen with FLC and ITZ did not significantly affect biofilm biomass and metabolic activity in *Candida* spp. Regarding molecular docking, the analysis revealed a high affinity of Ebselen for thymidylate kinase, suggesting that its mechanism of action involves interference with DNA synthesis. In summary, Ebselen demonstrated synergy with classical antifungals against *Candida* spp. in planktonic form and, in biofilms, particularly enhanced the action of AMB. These findings reinforce the potential of Ebselen as a therapeutic adjuvant in managing antifungal resistance.

**Keywords:** *Candida* spp., Antifungal Resistance, Drug Repurposing, Ebselen.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Sítios de infecções do gênero <i>Candida</i> no corpo humano e manifestações clínicas da infecção .....	20
Figura 2 - Quatro etapas da formação de biofilme de <i>Candida</i> .....	31
Figura 3 - Grupo de prioridade da OMS.....	33
Figura 4 Molécula do Ebselen (2-Phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one).....	35
Figure 5 - Gráfico da distribuição de CIM's dos antifúngicos clássicos isolados e em combinação com Ebselen contra <i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> e <i>Candida tropicalis</i> .....	52
Figura 6 - Efeito do Ebselen (Eb) com Anfotericina B (ANB) e Micafulina (MICA), isolados e em combinação, sobre a biomassa e atividade metabólica dos biofilmes maduros de <i>Candida albicans</i> ( $n = 3$ ), <i>Candida parapsilosis</i> ( $n = 3$ ) e <i>Candida tropicalis</i> ( $n = 3$ ) .....	55
Figura 7 - Interação Molecular do Ebselen com a Timidilato quinase.....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração inibitória mínima (CIM) de Ebselen, Fluconazol (FLC), Itraconazol (ITZ), Anfotericina B (ANB) e Micafungina (MCF), isolado e em associação contra <i>Candida albicans</i> (n = 5), <i>Candida parapsilosis</i> (n = 5) e <i>Candida tropicalis</i> (n = 5) .....	50
Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) de Ebselen (EB), Fluconazol (FLC), Itraconazol (ITZ), Anfotericina B (ANB) e Micafungina (MCF) : isolado e em associação contra <i>Candida albicans</i> (n = 5), <i>Candida parapsilosis</i> (n = 5) e <i>Candida tropicalis</i> (n = 5).....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

° C	Celsius
%	Porcentagem
5FU	5-fluorouracil
a.C	Antes de Cristo
(v/v)	(volume/volume)
ANB	Anfotericina B
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CVV	Candidíase Vulvovaginal
CI	Candidíases Invasivas
Cl <sup>-</sup>	Cloreto
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Óptica
Doc	Valor de Corte da Densidade Óptica
OMS	Organização Mundial da Saúde
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CIFA	Concentração Inibitória Fracional do Agente A
CIFB	Concentração Inibitória Fracional do Agente B
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
FICI	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
FLC	Fluconazol
g/mol	Gramas por mol.
GrAMM	Grupo Aplicado em Microbiologia Médica
GSH	Glutathione
GPx	Glutathione Peroxidases

H <sup>+</sup>	Hidrogênio
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IRAS	Infecção Relacionada à Assistência à Saúde
ITZ	Itraconazol
K <sup>+</sup>	Potássio
MCF	Micafungina
MG	Média Geométrica
MOPS	Ácido 3-Morfolipopropanosulfônico
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
Na <sup>+</sup>	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PDA	Ágar Batata Dextrose
pH	Potencial Hidrogeniônico
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPMI	Instituto Memorial Roswell Park
SP	São Paulo
SSD	Sensíveis Dose-Dependentes
SSP	Espécies
TSB	Tryptona de Soja
UFC	Universidade Federal do Ceará
UTI	Unidades de Terapias Intensivas
µg/mL	Microgramas por mililitro
µL	Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Aspectos históricos de <i>Candida</i> spp.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2</b>	<b>Infecções por <i>Candida</i> spp.....</b>	<b>20</b>
2.2.1	Epidemiologia do Gênero <i>Candida</i> spp.....	23
2.2.2	<i>Candida albicans</i> .....	24
2.2.3	Outras espécies de <i>Candida</i> spp.....	24
<b>2.3</b>	<b>Tratamento das infecções por <i>Candida</i> spp.....</b>	<b>26</b>
<b>2.4</b>	<b>Resistencia fúngica.....</b>	<b>28</b>
2.4.1	Mecanismos de resistência aos antifúngicos clássico.....	28
2.4.2	Biofilmes do gênero <i>Candida</i> .....	30
<b>2.5</b>	<b>Reposicionamento de fármaco e a busca de drogas com potenciais antifúngicos.....</b>	<b>33</b>
<b>2.6</b>	<b>Composto Ebselen.....</b>	<b>35</b>
2.6.1	Atividade Antifúngica.....	36
2.6.2	Testes Clínicos e Fases Clínicas do Ebselen.....	37
<b>2.7</b>	<b>Modelo <i>in silico</i> como ferramenta de análise de alvos moleculares para a atividade antifúngica.....</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES .....</b>	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>42</b>
4.1	Objetivo Geral.....	42
4.1	Objetivos específicos.....	42
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
5.1	Local de estudo.....	43
5.2	Microrganismos.....	43
5.3	Drogas.....	43
5.4	Avaliação da sensibilidade de <i>Candida</i> spp. aos antifúngicos clássicos e ao Ebselen .....	44
5.5	Avaliação da interação do Ebselen <i>in vitro</i> com os antifúngicos clássicos sobre <i>Candida</i> spp. na forma planctônica.....	44

5.6	Avaliação atividade do Ebselen isolado e em combinação com os antifúngicos clássicos no biofilme de <i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> e <i>Candida tropicalis</i> .....	45
5.7	Investigação in silico dos mecanismos de ação do Ebselen por <i>docking molecular</i> .....	46
5.8	Análise estatística.....	47
6	RESULTADOS.....	48
6.1	Atividade antifúngica do Ebselen isolado e em combinação com antifúngicos clássicos em células planctônicas de <i>Candida spp.</i> .....	48
6.2	Sensibilidade do Ebselen isolado e em combinação com antifúngicos Fluconazol, Itraconazol, Micafungina e Anfotericina B contra isolados clínicos sensíveis e resistentes de <i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> e <i>Candida tropicalis</i> .....	53
6.3	Investigação in silico dos mecanismos de ação do Ebselen por docking molecular.....	54
7	DISCUSSÃO.....	56
8	CONCLUSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS .....	63



## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* é composto por leveduras que fazem parte da microbiota de humanos e animais saudáveis (MALINOVSKÁ *et al.* 2023; KREULEN *et al.*, 2023). No entanto, sob determinadas condições, esses microrganismos podem atuar como patógenos oportunistas, causando infecções conhecidas como candidíase. As espécies de *Candida* podem causar infecções como candidíase oral, esofagite, infecções cutâneas superficiais, onicomicose e vaginite, que podem ocorrer tanto em indivíduos saudáveis quanto imunocomprometidos (MCCARTY *et al.*, 2021). Entretanto, uma das principais preocupações relacionadas a essas infecções são as candidíases sistêmicas, especialmente a candidemia, que corresponde a infecções na corrente sanguínea, sobretudo em pacientes hospitalizados e em estado crítico, com taxa de mortalidade em entorno de 50% (ARAUJO, *et al.* 2024; SALMANTON, *et al.* 2024; LOPES; LIONAKIS, 2022). Além disso, infecções associadas à formação de biofilme podem elevar a taxa de mortalidade para até 66% (ALIYU, 2022; VITÁLIS, *et al.* 2020).

Os principais fatores que contribuem para a candidíase incluem mudanças no microbioma local e na integridade imunológica dos indivíduos, bem como o uso de cateteres de longa permanência que criam uma via direta para a colonização e formação de biofilme nas superfícies (KREULEN *et al.*, 2023). Nesse contexto, durante a pandemia de COVID-19, foi observado que pacientes imunocomprometidos com coinfeções por *Candida* spp. apresentaram taxa de mortalidade de 53%, valor significativamente superior aos 31% observados em pacientes sem infecções fúngicas associadas (AHMED *et al.* 2022).

A epidemiologia das candidíases tem mostrado taxas de incidência crescentes em todo o mundo, com *Candida albicans* sendo responsável por aproximadamente 37,2% a 64,25% dos casos e mais de 80% de todas as formas de candidíase humana (MALINOVSKÁ *et al.*, 2023). Enquanto outras espécies de *Candida* como *Candida auris*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata* estão se tornando cada vez mais significativas, principalmente devido à resistência aos antifúngicos (CHEN *et al.*, 2024; LASS-FLÖRL; STEIXNER, 2023; BILAL *et al.*, 2023). Nessa perspectiva, a Organização Mundial da Saúde (OMS) elaborou um relatório para abordar a necessidade urgente de pesquisa no combate a patógenos fúngicos. *Candida albicans* é apontada no grupo de prioridade crítica, enquanto *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* estão no grupo de alta prioridade (WHO, 2023).

A resistência antifúngica emergente entre as espécies de *Candida* é um problema crescente (MAKLED *et al.*, 2024; ABDEL-HAMID *et al.*, 2023) e estudos demonstram uma redução crescente na sensibilidade de *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* à

antifúngicos amplamente utilizadas como aos azólicos (Fluconazol e Itraconazol), equinocandinas (Micafungina) e polienos (Anfotericina B), especialmente em infecções recorrentes ou em pacientes imunocomprometidos (AL-JANABI, 2024; WHO, 2023)

Diante da crescente problemática, tem-se intensificado a busca por novos compostos com atividade antifúngica (MAŚLANKA; MUCHA, 2023). Nessa perspectiva, o Ebselen, um composto organosselênio que apresenta propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antibacterianas e tem emergido como um potente agente antifúngico demonstrando atividade *in vitro* contra cepas de *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. e *Aspergillus* spp., *Trichosporon* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Pythium* spp. e *Sporothrix* spp. (SILVA; RIO-TINTO, 2024; YU *et al.*, 2024; SANTI; SCIMMI; SANCINETO, 2021).

Entretanto, ainda são escassos os estudos desse composto sobre a sensibilidade contra *Candida* spp., na forma planctônica e em biofilme, e em combinação com os antifúngicos clássicos. Com isso, o objetivo geral deste estudo é avaliar efeito, *in vitro*, do Ebselen isolado e combinado aos antifúngicos clássicos contra às cepas clínicas do gênero *Candida* spp. na forma planctônica e no biofilme, e avaliar *in silico* possíveis mecanismos de ação.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos históricos de *Candida* spp.

Os primeiros relatos de infecções atribuídos ao gênero *Candida* spp. foram há cerca de 2400 anos, no século V a.C., quando Hipócrates, conhecido como “pai da medicina”, descreveu máculas embranquecidas na cavidade oral de recém-nascidos e indivíduos em condições debilitantes de saúde, que sugeriam uma relação com a imunossupressão. Além disso, outros gregos da antiguidade que atuavam na medicina, como Galeno, também documentaram manifestações semelhantes em seus escritos, sugerindo o reconhecimento precoce da doença (KARAMANOU *et al.*, 2012).

No século XIX, o médico Lanbenbeck identificou o patógeno, hoje estabelecido como *Candida* spp., e o associou ao desenvolvimento de lesões orais, identificando o microrganismo na boca de crianças (SANTOS, 1978). Ainda no século XIX, Charles Robin nomeou este mesmo microrganismo como *Oidium albicans* e Zenker detalhou o primeiro caso de infecção no sistema nervoso central por disseminação hematogênica (CALDERONE; CLANCY, 2012; SANTOS, 1978). Ainda do século XIX, o micologista britânico Zopf renomeou o fungo para *Monilia albicans*. Posteriormente, no século XX, Berkhout o transferiu para o gênero *Candida*, tornando assim a espécie *Candida albicans*, como é conhecida atualmente (CALDERONE; CLANCY, 2012; SANTOS, 1978).

Apesar das descrições clínicas históricas, o gênero *Candida* foi totalmente descrito no século XX. Essas leveduras são classificadas no filo da Ascomycota, classe das Saccharomycetes, na ordem das Saccharomycetales e por fim na família Saccharomycetaceae (CALDERONE; CLANCY, 2012; BRANDT, 2002). Com o avançar dos estudos micológicos, *Candida albicans* foi estabelecida com a espécie mais prevalente em infecções fúngicas humanas, enquanto outros membros, como *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*, foram identificados como patógenos emergentes de importância clínica (SCHUSTER *et al.*, 2005; ODDS, 1988).

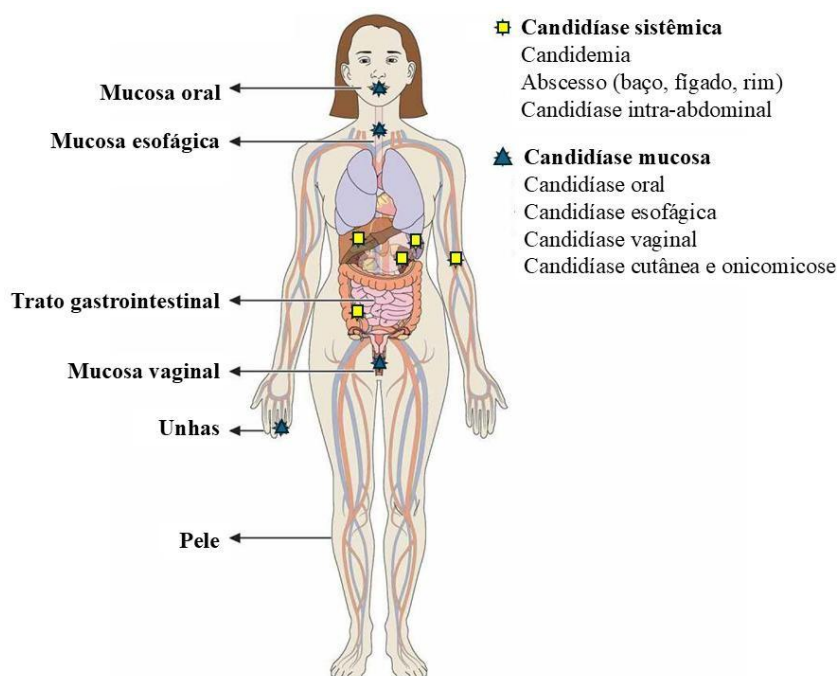
Os fungos são uma classe diversa de microrganismos, predominantemente saprófitos, que desempenham papéis essenciais na decomposição da matéria orgânica e no ciclo energético dos ecossistemas. Com isso, o gênero *Candida* é composto por mais de 150 espécies, várias das quais fazem parte da microbiota de indivíduos saudáveis, estando localizadas no trato gastrointestinal, na cavidade oral, no trato respiratório, no trato urogenital (especialmente na

genitália feminina) e na pele. Embora essas leveduras sejam em sua maioria comensais, elas podem se tornar patogênicas e ocasionar infecções, chamadas Candidíase (MALINOVSKÁ *et al.*, 2023; KREULEN *et al.*, 2023).

## 2.2 Infecções por *Candida* spp.

As infecções fúngicas podem ser subdivididas em quatro categorias principais, de acordo com o local da infecção: superficial, cutânea, subcutânea e profunda (Figura 1). (LOPES; LIONAKIS, 2022)

Figura 1 - Sítios de infecções do gênero *Candida* no corpo humano e manifestações clínicas da infecção.



Fonte: LOPES & LIONAKIS (2022) adaptado.

As infecções causadas por *Candida* spp. são mais frequentes em locais como mucosa e pele (mucocutâneas) (LOPES; LIONAKIS, 2022), e o surgimento dessas infecções, assim como candidíases em outros sítios anatômicos, está associado a diversos fatores predisponentes, como infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), uso de fármacos corticoides, imunossupressores e antibióticos de amplo espectro, leucemia, desnutrição, queda da imunidade decorrente da idade avançada, entre outros (RAO; MCCLELLAND, 2024). Mais especificamente em relação à candidíase oral, fatores locais como o uso de dentaduras, inaladores com corticoides e xerostomia contribuem para a proliferação do fungo e transição de microrganismo comensal para patogênico (MILSOP; FASEL, 2016). Associado a isso, a má higiene oral e o tabagismo são comportamentos que contribuem para as doenças orais

(JORGESSEN, 2024). A patogênese do gênero *Candida* pode depender, além dos fatores predisponentes relacionados ao hospedeiro, a fatores também relacionados às características da levedura (JORGESSEN, 2024).

A candidíase oral pode se apresentar sob duas formas clínicas: branca ou eritematosa. A candidíase oral branca é caracterizada por lesões brancas, que incluem a candidíase pseudomembranosa e a candidíase hiperplásica. A forma eritematosa é caracterizada por lesões de cor vermelha, e inclui condições como a candidíase atrófica aguda, a candidíase atrófica crônica, a glossite rombóide mediana, a glossite, a queilite angular e o eritema gengival linear. (MILSOP; FASEL, 2016).

A candidíase esofágica, que é um tipo de esofagite infecciosa, tem como principal agente causador a espécie de *Candida albicans*, que pode fazer parte da microbiota comensal, colonizando o esôfago em cerca de 20% dos indivíduos. No entanto, processos que prejudicam o sistema imunológico e que causam interferência na composição da microbiota normal dessa região, bem como aqueles que causam lesões locais no córtex superior do esôfago, podem levar à proliferação e colonização de *Candida albicans* e ao desenvolvimento das lesões. Essas lesões correspondem a placas brancas ou exsudatos aderentes à mucosa e que não podem ser lavados com irrigação com água, visualizados diretamente por meio da endoscopia (MOHAMED *et al.*, 2019). Devido as lesões, a disfagia é um sintoma clássico de candidíase esofágica, podendo também ser relatados: dor abdominal, pirose, náusea, vômitos, perda de peso, entre outros sintomas (MOHAMED *et al.*, 2019; ALSOMALI *et al.*, 2017).

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção multifatorial do trato reprodutivo inferior feminino, resultante do desequilíbrio do ecossistema vaginal, no qual *Candida* spp. pode proliferar excessivamente devido a fatores como uso de antibióticos, terapia de reposição hormonal, gravidez, diabetes mellitus e predisposição genética (SUN *et al.*, 2023). Estima-se que 75% das mulheres apresentem CVV pelo menos uma vez na vida, enquanto a forma recorrente, caracterizada por quatro ou mais episódios anuais, afeta até 8% das mulheres globalmente (CRUZ *et al.*, 2020). A maioria dos casos é causada por *Candida albicans*, mas espécies não-*albicans*, como *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, estão associadas a infecções recorrentes e maior resistência antifúngica (COOKE *et al.*, 2022). O tratamento convencional baseia-se em azóis tópicos ou orais; no entanto, o uso prolongado de Fluconazol e Clotrimazol favorece a resistência antifúngica, especialmente em infecções causadas por outras espécies de *Candida*, frequentemente associadas à formação de biofilmes, que dificultam a penetração dos

antifúngicos e aumentam a tolerância ao estresse químico. A incidência de CVV resistente ao tratamento pode chegar a 45%, principalmente em infecções causadas por *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. lusitaniae* (SATORA *et al.*, 2023).

As infecções profundas causadas pelo gênero *Candida*, como candidemia, endocardite, peritonite e abscessos hepáticos ou esplênicos, são graves e frequentemente envolvem órgãos internos, incluindo o sistema nervoso central, como nas candidemias e meningites fúngicas, sendo comumente associadas a fatores predisponentes como imunossupressão, uso de cateteres venosos centrais, nutrição parenteral total e internação em Unidades de Terapia Intensiva (UTI). (RAO; MCCLELLAND, 2024; LOPES; LIONAKIS, 2022).

Os casos mais graves de candidíase são denominados como Candidíases Invasivas (CI), sendo geralmente uma Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (IRAS), reconhecida como uma das principais causas de morbidade e mortalidade relacionadas com a infecção. Em mais de 95% das doenças invasivas causadas por *Candida* spp., seis agentes patogênicos são mais comuns: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e em algumas regiões *Candida auris* (MCCARTY *et al.*, 2021).

As CI abrangem uma variedade de desordens que podem afetar vários órgãos, sendo infecções profundas ou disseminadas. A mais grave é a candidemia que é caracterizada por infecções da corrente sanguínea causadas por *Candida* spp. Os danos aos tecidos estão relacionados à agressão mediada pelo patógeno e/ou à ação do sistema imune do hospedeiro, podendo levar à falência de órgãos e a candidemia pode levar à sepse e choque séptico (LASS-FLÖRL *et al.*, 2024). O desenvolvimento da infecção invasiva ocorre a partir de um aumento da carga fúngica, devido a fatores relacionados ao hospedeiro e à exposição ambiental, além de uma alteração da superfície da pele ou das membranas mucosas. Essas alterações são frequentemente associadas à presença de material protético, como cateteres intravasculares e cateteres urinários de demora (MCCARTY *et al.*, 2021).

A candidemia, uma infecção hematogênica representando mais de 50% dos casos em estudos epidemiológicos e ensaios clínicos sobre antifúngicos. Diante do alto risco de morbimortalidade e do prognóstico desfavorável, um resultado positivo de hemocultura para *Candida* spp. deve ser investigado minuciosamente (LASS-FLÖRL *et al.*, 2024; MCCARTY *et al.*, 2021).

Além disso, a candidíase neonatal tem se tornado um problema sério na atualidade, pois pode ser fatal em recém-nascidos, especialmente devido ao alto risco de comprometimento do sistema nervoso central. Vale ressaltar que a meningite está frequentemente associada à candidemia em neonatos. Uma das grandes diferenças dessa patologia em neonatos é que seus sintomas, de maneira geral, são muito mais inespecíficos (LASS-FLÖRL *et al.*, 2024).

### 2.2.1 Epidemiologia do Gênero *Candida* spp

As infecções por espécies do gênero *Candida* representam uma preocupação significativa na saúde pública em todo o mundo, especialmente quando envolve o ambiente hospitalar. Com isso, estudos recentes apontam que as cepas de *Candida albicans* continua sendo a espécie mais frequentemente isolada em casos de candidemia mundialmente. Além disso, pesquisas mais abrangentes revelaram que os isolados de *C. albicans* foi responsável por 57,7% dos episódios de candidemia, seguida por *C. glabrata* 15,4% *C. tropicalis* com 12% a 18% e *C. parapsilosis* com 9% a 15% (MAREKOVIC *et al.*, 2021). Com variações, que mudam conforme a região geográfica e a população estudada (MALINOVSKÁ *et al.*, 2020; YAZDANI *et al.*, 2022)

A diversidade na distribuição das espécies de *Candida* é influenciada por diversos fatores, como práticas hospitalares, uso de dispositivos médicos, profilaxia antifúngicos e resistência aos mesmos. Além do mais, estudos observaram que em países da América Latina os isolados de *C. albicans* manteve sua posição dominante, mas espécies como *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* estão se tornando mais prevalentes, especialmente em ambiente hospitalares e entre pacientes imunocomprometidos (SANTOS *et al.*, 2023). Este mesmo padrão se repete no continente Asiático, onde a resistência aos antifúngicos também tem influenciado a prevalência dessas espécies (LIU *et al.*, 2022).

Durante a pandemia de COVID-19, houve um aumento significativo nas infecções fúngicas, especialmente por *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*, em algumas regiões, como Ásia e América Latina. Nessas áreas, essas espécies foram responsáveis por surtos em ambientes hospitalares, com ênfase em infecções associadas a dispositivos médicos e unidades de terapia intensiva. (PIENTHONG *et al.*, 2023).

No Brasil, a epidemiologia das infecções por *Candida* spp. reflete a diversidade climática e hospitalar do país, com isso, a situação da candidemia tem seguido a tendência global, com as cepas de *C. albicans* representando a espécie predominante na maioria dos casos, mas a prevalência das espécies *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* tem se destacado como

importantes agentes de candidemia, especialmente em unidades de terapias intensivas (UTI) e entre pacientes com doenças crônicas e imunocomprometidos. Pesquisadores observaram em estudos de campo brasileiro que os isolados de *C. albicans* esteve presente em 50% dos casos, enquanto a espécie de *C. tropicalis* representou 12% a 21% dos casos de candidemia, enquanto *C. parapsilosis* foi responsável por 10% a 20% (CORREIA *et al.*, 2020; MOREIRA *et al.*, 2021).

### 2.2.2 *Candida albicans*

*C. albicans* permanece como a principal espécie associada a infecções fúngicas sistêmicas e superficiais. Sua prevalência é impulsionada por sua capacidade de colonizar diferentes nichos anatômicos e de formar biofilmes resistentes a antifúngicos. Estima-se que *C. albicans* esteja envolvida em mais da metade dos casos de candidemia em países desenvolvidos (KOTEY *et al.*, 2021; MOREIRA *et al.*, 2021). Além do mais, a resistência crescente aos antifúngicos azólicos tem sido uma preocupação, pois dificulta o tratamento de infecções mais graves (SANTOS *et al.*, 2021; PEREIRA *et al.*, 2022).

Esse fungo faz parte da microbiota humana saudável e coloniza de forma comensal o trato gastrointestinal (TGI), o sistema reprodutivo feminino, cavidade oral e a pele. Em indivíduos imunocompetentes, *C. albicans* não causa prejuízos significativo (GAO *et al.*, 2024; (MCDONOUGH *et al.*, 2021). No entanto, em situações adversas, como o uso indiscriminado antimicrobianos, terapias imunossupressoras ou condições que enfraquecem o sistema imunológico, o equilíbrio dessa microbiota pode ser rompido, permitindo o crescimento excessivo de *C. albicans*. Esse crescimento desordenado está associado ao desenvolvimento de uma variedade de patologias, incluindo candidíase oral, vulvovaginal e infecção sistêmicas graves, que podem ser fatais em pacientes imunocomprometidos (WHIBLEY; GAFFEN, 2015).

### 2.2.3 Outras espécies de *Candida* spp.

*Candida tropicalis* é particularmente prevalente em regiões tropicais e subtropicais, com destaque para países da América Latina e Ásia. Essa espécie é frequentemente associada a infecções em pacientes imunossuprimidos e em UTI. Estudos recentes revelaram que *C. tropicalis* apresenta uma alta capacidade de formar biofilmes e desenvolver resistência aos antifúngicos, o que contribui para sua relevância clínica (CORREIA *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2021). Com isso, um estudo realizado na Índia, indicou que essa espécie foi responsável por



14% dos casos de candidemia na país, superando outras espécies, como *C. parapsilosis*, em vários centros médicos (RAJ *et al.*, 2022). Além disso, quando ocorre disseminação hematogênica, a infecção por *C. tropicalis* pode ser fatal, devido a gravidade da patologia e a elevada taxa de mortalidade em quadros invasivos (ZHANG *et al.*, 2024).

Uma das características mais notáveis da cepa de *C. tropicalis* é sua capacidade de formar biofilmes complexos e altamente resistentes, similar a espécie de *C. albicans*. Entretanto, apesar da proximidade filogenética entre essas espécies, *C. tropicalis* apresenta particularidades importantes, como a capacidade de tolerar concentrações de até 15% de NaCl, além de metabolizar e responder de maneira singular a N-acetilglucosamina, um fator que influencia diretamente na sua adaptação e virulência em diferentes condições ambientais (ZHANG *et al.*, 2024; ZUZA; ROCHA; CHAVES, 2017).

*Candida parapsilosis* destaca-se pela sua presença em infecções relacionadas a dispositivos médicos, como cateteres venosos centrais, principalmente em neonatos e pacientes imunossuprimidos. Essa espécie é prevalente em ambientes hospitalares, onde sua transmissão pode ocorrer por contato direto entre pacientes e profissionais de saúde (LIMA *et al.*, 2022; MATTA *et al.*, 2017).

Os isolados de *Candida parapsilosis* foi descoberta em 1928, passou por diversas reclassificações filogenéticas ao longo das décadas. Inicialmente, foi isolada em países da América central e recebeu a denominação de *Monilia parapsilosis*. Posteriormente, foi renomeada como *Candida parapsilosis*. No século XXI, essa espécie foi incluída em um complexo grupo que também engloba *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis* (BRANCO; MIRANDA; RODRIGUES, 2023).

Esse patógeno é encontrado em uma ampla variedade de ambientes, vivendo de forma comensal em superfícies e mucosas humanas, o que favorece sua disseminação, especialmente por meio de profissionais de saúde e pacientes hospitalizados. Com isso, a espécie de *C. parapsilosis* se torna um agente relevante nas infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). Dessa forma, indivíduos imunocomprometidos, como paciente oncológicos, portadores de HIV e transplantados, estão entre os mais suscetíveis a infecção por esses microrganismos. A virulência da *C. parapsilosis* está intimamente ligada a sua capacidade de aderir tanto a superfícies de dispositivos médicos como cateteres venosos centrais e pacientes que recebem

nutrição por cateter parenteral total, com isso aumenta o risco de infecção e facilita a formação de biofilmes (KAN *et al.*, 2024; TANG *et al.*, 2024).

### 2.3 Tratamento das infecções por *Candida* spp

No Brasil, o tratamento de infecções por *Candida* spp. é realizado principalmente com antifúngicos das classes dos Azóis, Equinocandinas, Polienos e Análogos de Pirimidina. Dentre esses, os mais utilizados na prática clínica são o Fluconazol (azólicos), a Anfotericina B (polieno), as Micafungina e Caspofungina (equinocandinas) e a flucitosina (análogo de pirimidina), sendo a escolha do fármaco baseada no perfil de resistência da espécie, no sítio e na gravidade da infecção (ANVISA, 2021).

Os derivados Azólicos, ou Azóis, são os antifúngicos mais utilizados no tratamento de infecções fúngicas. Esses fármacos atuam inibindo a síntese do ergosterol, que é o principal componente da membrana celular fúngica e desempenha um papel crucial em diversas funções celulares, como a manutenção da integridade da membrana e o funcionamento adequado das enzimas associadas a ela (CAMPOY; ADRIO, 2017).

Os azóis são a classe de antifúngicos com o maior número de medicamentos disponíveis para uso clínico, o que está diretamente relacionado à sua eficácia e segurança biológica. Entre os principais representantes dessa classe, destacam-se o Fluconazol e o Itraconazol. Esses fármacos atuam inibindo a atividade da enzima 14 $\alpha$ -desmetilase, impedindo a biossíntese do ergosterol, um lipídio essencial para a formação das membranas celulares fúngicas (BRANCO *et al.*, 2023). Os azóis são moléculas orgânicas cíclicas que podem ser classificadas em dois grupos: Imidazóis e triazóis. Os Imidazóis (como Clotrimazol, Miconazol e Cetoconazol) foram os primeiros azóis desenvolvidos, mas devido à sua alta toxicidade, efeitos colaterais graves e interações medicamentosas, deram lugar aos Triazóis. Os Triazóis de primeira geração (como Itraconazol, Fluconazol e Voriconazol) apresentam um espectro de atividade antifúngica mais amplo, um melhor perfil de segurança e são eficazes contra *Candida* spp., sendo utilizados no tratamento de diversos tipos de candidíase (CRUZ *et al.*, 2020; CAMPOY; ADRIO, 2017).

Os Polienos são disruptores da membrana da célula fúngica e fungicidas, tendo como alvo o ergosterol na membrana plasmática, formando poros e causando um extravasamento rápido de íons monovalentes (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, H<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>), culminando na morte celular. Os medicamentos Poliênicos incluem Anfotericina B e Nistatina, mas apenas a Anfotericina B é usada para tratamento sistêmico, sendo a Nistatina usada de forma tópica para quadros de

candidíase cutâneo mucosa (BATTACHARYA *et al.*, 2020). A terapia tópica usando suspensão de Nistatina ainda é o pilar para o tratamento da candidíase oral, devido a sua maior eficácia, baixo custo e menos efeitos colaterais (RAI *et al.*, 2022).

Anfotericina B convencional, complexada com desoxicolato de sódio, é limitada pela intolerância individual e pela nefrotoxicidade frequentemente observada. Em decorrência disso, as formulações lipídicas são menos tóxicas e mais bem toleradas pelos pacientes (BARANTSEVICH, 2022). As outras formulações incluem: complexo de sulfato de colesterol, complexo lipídico e formulação lipossomal, as quais possuem custo mais elevado. Este medicamento é escolhido principalmente quando os isolados de *Candida* spp. é resistente a outras classes de medicamentos ou para candidíases invasivas (BATTACHARYA *et al.*, 2020). A maioria das espécies de *Candida* são suscetíveis aos polienos sistêmicos, sendo a resistência frequentemente detectada em *C. lusitaniae* (BARANTSEVICH, 2022).

As Equinocandinas são metabólitos secundários de fungos que contêm um núcleo composto de um hexapeptídeo cíclico e resíduos lipídicos responsáveis por sua atividade antifúngica. Fármacos derivados sintéticos das equinocandinas, como a anidulafungina, Caspofungina e Micafungina, são recomendados como tratamento de primeira linha em pacientes que sofrem de infecção invasiva por *Candida* spp., especialmente em pacientes hemodinamicamente instáveis após tratamento prévio com triazóis. O alvo molecular das equinocandinas é a enzima 1,3- $\beta$ -glucano sintase, responsável pela síntese do  $\beta$ -(1,3-D)-glucano, um polissacarídeo essencial da parede celular fúngica. Esse componente, junto com a quitina, é fundamental para a estrutura, rigidez e integridade da parede celular, conferindo resistência osmótica e suporte mecânico aos fungos. A inibição da 1,3- $\beta$ -glucano sintase leva à fragilização da parede celular, resultando na lise e morte celular, especialmente em espécies do gênero *Candida* e *Aspergillus*. (MROCZYŃSKA; BRILLOWSKA-DĄBROWSKA, 2020).

A Flucitosina é um análogo fluorado sintético da citosina e não tem atividade antifúngica imediata. A célula fúngica internaliza a molécula por meio de um processo dependente de energia através da ação da enzima citosina permeases. Então a enzima citosina desaminase converte a flucitosina em sua forma ativa, a 5-fluorouracil (5FU). Seus metabólitos inibem a síntese de DNA e a síntese de proteínas na célula fúngica. Esse medicamento pode ser empregado para o tratamento de endocardite, endoftalmite, meningite e infecções sintomáticas do trato urinário causadas por espécies de *Candida* resistentes a azóis. Nesses casos, geralmente

a flucitosina é administrada em associação com Anfotericina B ou outros antifúngicos com a intenção de evitar o surgimento de resistência antifúngica (SIGERA; DENNING, 2023).

Vários fatores podem contribuir para a falha no tratamento antifúngico. O primeiro envolve as possíveis diferenças na absorção e biodisponibilidade dos medicamentos entre os diferentes tecidos. As características farmacocinéticas dos fármacos e seus efeitos colaterais também influenciam o desfecho do tratamento. Outro fator importante é que medicamentos fungistáticos, como os azóis, dependem do suporte do sistema imunológico do hospedeiro para o sucesso no tratamento de infecções invasivas por *Candida*. Muitas vezes, no entanto, o paciente apresenta imunossupressão, o que dificulta a eficácia do tratamento (HOUST *et al.*, 2020). Além disso, como mencionado anteriormente, *Candida* spp. podem formar biofilmes na superfície de equipamentos médicos, como cateteres, os quais são resistentes à penetração de alguns antifúngicos e modificam a expressão dos alvos dos medicamentos. Por fim, um fator importante que pode levar à falha terapêutica é a resistência de *Candida* spp. aos antifúngicos (HOUST *et al.*, 2020).

## **2.4 Resistência fúngica**

### **2.4.1 Mecanismos de resistência aos antifúngicos clássicos**

A resistência aos antifúngicos tem crescido, tornando-se um desafio no tratamento de infecções fúngicas. Frequentemente, a Anfotericina B é a última opção eficaz, mas sua utilização é limitada devido à alta toxicidade, especialmente em relação aos rins. Essa situação destaca a necessidade urgente de novas terapias antifúngicas e estratégias de manejo (ALABDALALL, 2023).

Acredita-se que a crescente emergência de resistência aos azóis esteja associada ao uso excessivo de Fluconazol na profilaxia de pacientes considerados em risco de infecções causadas por *Candida* spp., o que expõe essas leveduras a uma pressão seletiva. Além disso, o uso de fungicidas agrícolas (agroquímicos) estruturalmente semelhantes aos Azóis clínicos adiciona uma camada extra de pressão para a seleção de cepas de *Candida* mais tolerantes. Embora a resistência às Equinocandinas e à Anfotericina B seja baixa, algumas cepas resistentes de *C. glabrata*, *C. auris* e *C. krusei* já foram identificadas (CASTELO-BRANCO, D. *et al.* 2022; SALAZAR *et al.*, 2020).

Quanto aos mecanismos de resistência de *C. albicans* aos azóis, diversos fatores têm sido citados, incluindo: a superexpressão da esterol desmetilase, alvo do azol (ERG11), por regulação positiva, o que pode neutralizar a inibição do alvo; a ocorrência de mutações no gene ERG11, que podem reduzir a afinidade dos azóis pela esterol desmetilase; a aneuploidia, que pode aumentar a expressão dos genes de efluxo e do ERG11, além de promover maior diversidade genética nos isolados de *C. albicans* em resposta à exposição ao medicamento; e a redução das concentrações intracelulares do antifúngico azólicos por meio da regulação positiva da expressão de genes de bombas de efluxo, entre outros (NISHIMOTO *et al.*, 2019). Devido a essa superexpressão das bombas de efluxo, a resistência cruzada entre os azóis é frequentemente observada em *C. albicans* (PRISTOV; GHANNOUM, 2019; BRANCO *et al.*, 2023). Para *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, os mecanismos de resistência aos azóis são semelhantes aos das outras espécies de *Candida*, com isolados mostrando alta resistência, mais especificamente, ao Fluconazol (PRISTOV; GHANNOUM, 2019).

A maioria das espécies de *Candida* são sensíveis a Anfotericina B, sendo rara a resistência, que só é geralmente associada a cepas de *C. auris*. Quando a resistência é observada, os mecanismos que podem estar envolvidos incluem: modulação da composição de esterol através da depleção ou substituição de ergosterol desencadeada por mutações em genes envolvidos na via de biossíntese do ergosterol (*ERG1* para *ERG4*, *ERG6* e *ERG11*); defesa aumentada contra danos oxidativos para quebrar as espécies reativas de oxigênio (ROS) que são produzidas sob exposição a Anfotericina B, seja por meio da atividade da catalase e/ou pelas chaperonas moleculares da família da proteína de choque térmico (HSP), nomeadamente, Hsp90 e Hsp7 (BRANCO *et al.*, 2023).

Quanto a resistência as Equinocandinas em *Candida* spp. estão relacionadas a mutações pontuais em duas regiões altamente conservadas, HS1 e HS2 do gene *FKS1* que codifica a 1,3- $\beta$ -glucano sintase (responsável pela síntese de  $\beta$ -(1,3-D)-glucano da parede celular fúngica), inibindo a ligação não competitiva do fármaco (WALKER, 2022). Essas mutações também estão relacionadas a resistência cruzada entre Equinocandinas. Além disso, para *C. parapsilosis* ocorre um polimorfismo natural no gene *FKS1*, levando a redução da sensibilidade a equinocandina *in vitro* e, embora pacientes com infecções sistêmicas respondam bem aos tratamentos com equinocandina, mesmo com altos valores de CIM, a exposição repetida a equinocandinas é um fator de risco para *C. parapsilosis* desenvolver resistência (PRISTOV; GHANNOUM, 2019).

Diante das opções terapêuticas limitadas e da ocorrência de resistência aos antifúngicos existentes, há a necessidade de identificação de novas alternativas terapêuticas para as infecções causadas por *Candida* spp. que possam ser utilizadas de forma isolada ou em associação aos antifúngicos já utilizados tradicionalmente.

#### **2.4.2 Biofilmes do gênero *Candida***

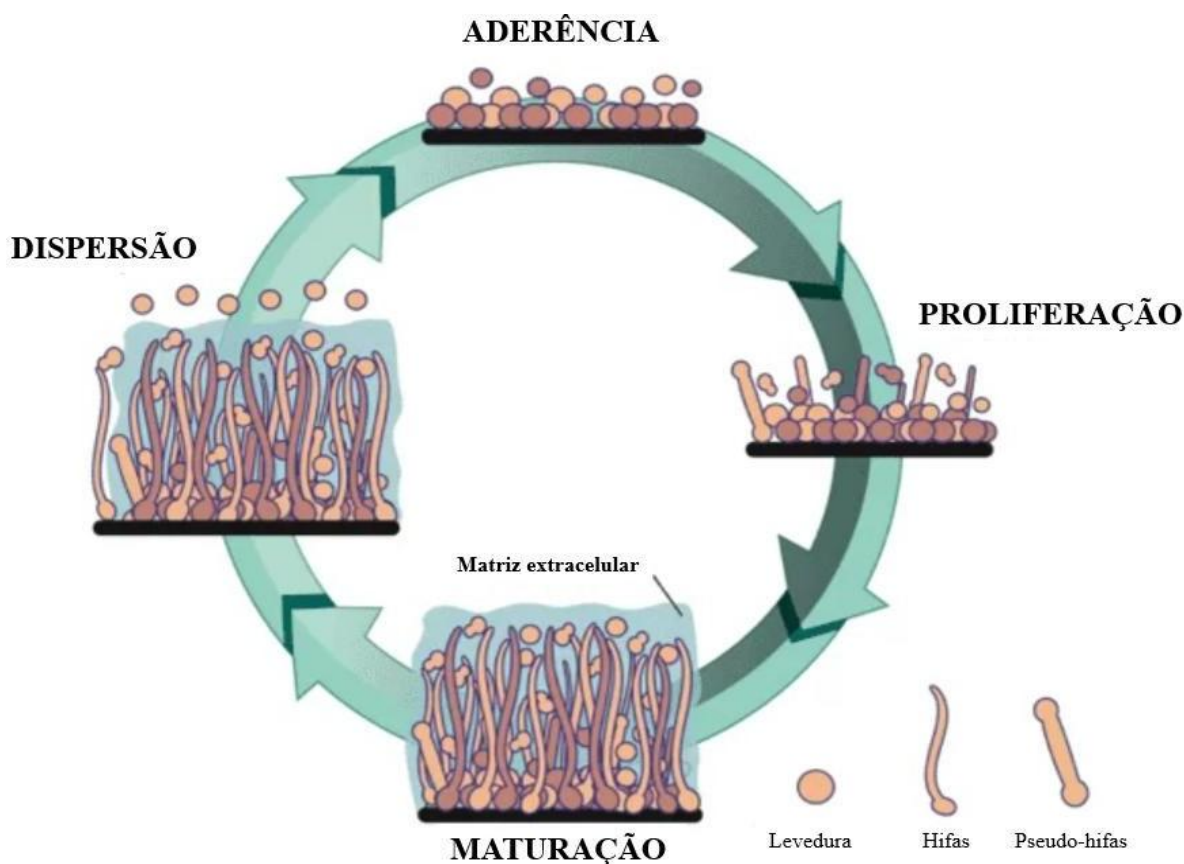
Os biofilmes são definidos como comunidades microbianas complexas, espacialmente orientadas e estruturadas, fixadas em uma superfície e envoltas por uma matriz extracelular (MEC). Espécies de *Candida* são conhecidas por construir biofilmes altamente estruturados e dinâmicos compreendendo várias formas morfológicas do fungo (leveduras, pseudo-hifas e hifas) (BARROS *et al.*, 2020).

Essas superfícies, as quais os biofilmes se aderem, podem ser superfícies bióticas, tais como os tecidos do hospedeiro, ou superfícies abióticas, tais como implantes médicos, superfícies em hospitais, tubulações, dentre outras (Pereira *et al.*, 2020; Rather *et al.*, 2021). Por adentrar os tecidos do hospedeiro, os biofilmes são responsáveis por doenças infecciosas e algumas das infecções teciduais associadas incluem periodontite, osteomielite, infecção pulmonar na fibrose cística, endocardite, placa dentária, amigdalite crônica, laringite crônica, feridas crônicas e infecções do trato biliar e urinário (RATHER *et al.*, 2021).

O processo de formação do biofilme ocorre em algumas etapas que incluem: adesão, proliferação, maturação e dispersão (Figura 2). Inicia com a fixação de microrganismos na forma planctônica às superfícies, que é subdividida em fixação reversível e irreversível, seguida pela divisão microbiana para formar microcolônias. As microcolônias passam por maturação caracterizada por composição, forma e arquitetura específicas. Um biofilme maduro é uma mistura heterogênea de células planctônicas, células aderidas (sésseis), células persistentes, células mortas, canais de água e diferentes tipos de moléculas de sinalização e estabilização, como lipídios, polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular. Dessa forma, o aumento da biomassa de um biofilme vai acontecendo a partir do processo de divisão celular, pela redistribuição de células entre as microcolônias e pela adesão de novas células planctônicas à essa estrutura (GULATI; NOBILE, 2016). Em seguida, ocorre a dispersão de células do biofilme para repetir o ciclo de formação do biofilme em outros locais (RATHER *et al.*, 2021). As células dessas comunidades microbianas podem se dispersar na corrente sanguínea e se

disseminar para outros órgãos, válvulas cardíacas, articulações, baço, rins e fígado (NETT; ANDES, 2020).

Figura 2 - Quatro etapas da formação de biofilme de *Candida* spp.



Fonte: QUEIROZ (2021) adaptado

Diferentes fatores estão relacionados ao processo de formação de biofilme em todas as espécies de *Candida* e há uma rede reguladora que difere entre *C. albicans* e *Candida* não-*albicans*. Essas diferenças levam a implicações na persistência de infecções, e na tolerância antifúngica. Ainda, a presença de exopolissacarídeos na matriz extracelular (MEC) desses biofilmes, que funciona como uma barreira à difusão de drogas, potencializa a capacidade do biofilme de se proteger da ação de fármacos antifúngicos (BARROS *et al.*, 2020). Confere também proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro (ATRIWAL *et al.*, 2021).

A MEC é formada a partir da produção de vesículas extracelulares que são distintas daquelas fabricadas durante o crescimento planctônico dessas leveduras. Essas estruturas possuem entre 30 e 200 nm de tamanho e consistem em bicamadas lipídicas que envolvem proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e carboidratos. Na medida em que os biofilmes de *C.*

*albicans* amadurecem, as células liberam vesículas no espaço extracelular e a carga que as acompanha é incorporada à matriz (NETT; ANDES, 2020).

Em relação a sua estrutura, biofilmes maduros de *C. albicans* exibem uma característica mais heterogênea, composta por blastoconídios e hifas cercados por uma MEC de material polissacarídeo. A MEC fornece um arcabouço para a adesão entre células em diferentes superfícies, e uma barreira entre as células no biofilme e o ambiente vizinho. Dentro da estrutura há canais de água circundando as microcolônias (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018).

Os biofilmes de *C. tropicalis* correspondem a uma rede de leveduras, pseudohifas e hifas, com intensa brotação de hifas, enquanto *C. parapsilosis* exibe um biofilme formado por aglomerados de células de levedura aderidas à superfície, com MEC mínima. Essas diferenças destacam a complexidade dos processos subjacentes à formação do biofilme e a dificuldade de encontrar uma maneira única de erradicar todos os biofilmes do gênero *Candida* (CAVALHEIRO; TEIXEIRA, 2018).

Além de fatores relacionados à composição do biofilme, os mecanismos de resistência adquiridos, comumente encontrados na forma planctônica de *Candida* spp., podem ser compartilhados entre os estados planctônico e de biofilme, a exemplo da expressão de bombas de efluxo. Essas bombas de efluxo são reguladas positivamente durante o estágio de adesão da formação do biofilme e permanecem reguladas positivamente conforme o biofilme amadurece, independente da exposição ou não a um fármaco antifúngico (KAUR; NOBILE, 2024).

A resistência dos biofilmes de *C. albicans* aos antifúngicos clássicos é um fenômeno complexo e multifatorial, explicado por três pilares principais. O primeiro é a matriz extracelular protetora, que envolve o biofilme e atua como uma barreira física e química, dificultando a penetração eficaz dos medicamentos. Em segundo lugar, a superexpressão de bombas de efluxo contribui para a expulsão ativa de antifúngicos, reduzindo, assim, suas concentrações intracelulares. Por último, a presença de células persistentes metabolicamente inativas garante a sobrevivência do biofilme em condições adversas, incluindo a exposição prolongada a medicamentos antifúngicos (GULATI; NOBILE, 2016).

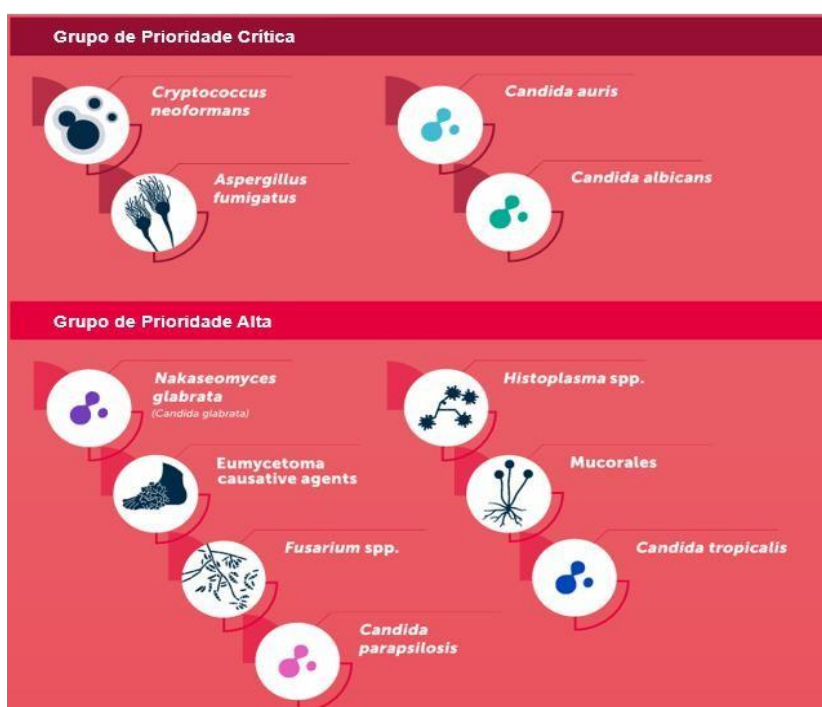
Dessa forma, biofilmes maduros de *Candida* são altamente tolerantes à ação de antifúngicos como o Fluconazol, Anfotericina B e Caspofungina e requerem concentrações mais elevadas desses fármacos, quando comparados com as células planctônicas (PONDE *et al.*, 2021).



## 2.5 Reposicionamento de fármaco e a busca de drogas com potenciais antimicrobianos

O aumento das infecções fúngicas invasivas e sua elevada morbimortalidade representam um desafio crescente para a saúde pública. A resistência antimicrobiana emergente agrava ainda mais essa situação, sendo considerada uma ameaça global crescente. Esse fenômeno tem sido amplamente associado ao uso excessivo e inadequado de antimicrobianos, bem como à escassez de novos fármacos antifúngicos disponíveis para atender às demandas clínicas. A falta de inovação em medicamentos antifúngicos, aliada ao uso intensivo de compostos azólicos tanto na prática clínica quanto na agricultura, contribui para o aumento da resistência entre fungos patogênicos (CASTELO-BRANCO *et al.*, 2022; BENELLI *et al.*, 2021). Diante desse cenário, estratégias como o reposicionamento de fármacos surgem como alternativas promissoras para enfrentar esses desafios.

Figura 3 – Grupo de prioridade da OMS



Fonte: WHO (2023) adaptado

A OMS classificou os fungos em três grupos prioritários: críticos e alto com base na gravidade das infecções que causam e na resistência antifúngica associada (figura 3). O grupo crítico inclui *Candida auris*, *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*, espécies responsáveis por infecção graves, caracterizadas por altas taxas de resistência aos tratamentos disponíveis e elevada mortalidade, especialmente em indivíduos imunocomprometidos. O grupo alto compreende espécies como *Nakaseomyces glabrata*, *C.*

*tropicalis* e *C. parapsilosis*, além de fungos como *Histoplasma* spp. e representantes da ordem *Mucorales*. Essas espécies também apresentam um risco significativo, embora com níveis menores de resistência antifúngica em comparação ao grupo crítico (WHO, 2023).

O desenvolvimento de novos antifúngicos é um desafio científico complexo devido a diversos fatores. A necessidade de especificidade dos fármacos, para que atuem exclusivamente em células fúngicas eucarióticas sem causar toxicidade às células hospedeiras, constitui uma das principais barreiras nesse processo. Essa limitação reduz o número de alvos moleculares disponíveis, dificultando a identificação de compostos eficazes (BENELLI *et al.*, 2021; WALL *et al.*, 2018). Além disso, a restrita diversidade de classes antifúngicas disponíveis atualmente, somada ao surgimento de cepas multirresistentes de gêneros como *Aspergillus* spp. e *Candida* spp., agravam o problema das infecções fúngicas resistentes (BENELLI *et al.*, 2021). WALL *et al.* (2018) também mencionam que *C. auris* é tipicamente intrinsecamente resistente ao Fluconazol e pode também apresentar resistência a equinocandinas e até mesmo à Anfotericina B. Isso torna a busca por novas opções de tratamento urgente, especialmente considerando a crescente incidência de infecções associadas a esses fungos, principalmente as do gênero *Candida*.

Essa resistência, combinada à limitada eficácia dos tratamentos existentes, resulta em altas taxas de mortalidade associadas a infecções fúngicas invasivas. No contexto da resistência antifúngica, torna-se imprescindível o investimento em estratégias inovadoras para o tratamento de micoses, sendo o reposicionamento de fármacos uma das alternativas mais promissoras (LOCKHART *et al.*, 2017; CHOWDHARY; SHARMA; MEIS, 2017).

O reposicionamento de medicamentos é uma abordagem que aproveita compostos já aprovados ou em desenvolvimento para outras indicações terapêuticas, buscando novas aplicações para doenças distintas das inicialmente previstas (BENELLI *et al.*, 2021; WALL *et al.*, 2018). Essa estratégia reduz substancialmente os custos, o tempo e os riscos associados ao desenvolvimento de novas drogas, oferecendo uma solução rápida para necessidades clínicas urgentes, como o combate às infecções fúngicas multirresistentes (WALL *et al.*, 2018).

Nesse contexto, as bibliotecas químicas de reaproveitamento de fármacos têm desempenhado um papel crucial. Essas bibliotecas reúnem coleções de compostos químicos, predominantemente já aprovados para uso humano ou em fases avançadas de testes clínicos, que são avaliados para identificar novos usos terapêuticos. Um exemplo notável é a biblioteca

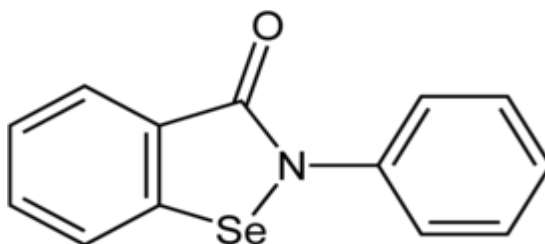
Prestwick, composta por cerca de 1.200 moléculas de baixo peso molecular (80 a 1.670 g/mol), todas aprovadas pela FDA. Essas moléculas abrangem uma ampla gama de mecanismos de ação, sendo usadas no tratamento de doenças infecciosas, neurodegenerativas, psiquiátricas, cardiovasculares e oncológicas. A caracterização detalhada das propriedades químicas, estruturais e funcionais dessas moléculas facilita a interpretação dos resultados de triagens antifúngicas e acelera o desenvolvimento de novas aplicações terapêuticas (WALL *et al.*, 2018).

Entre os compostos presentes na biblioteca Prestwick, o Ebselen (2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-ona) destaca-se por suas múltiplas propriedades biológicas. Trata-se de um composto organosselênio com atividade antiaterosclerótica, anti-inflamatória, citoprotetora, antimutações, antioxidante e antilipoperoxidativa (THANGAMANI *et al.*, 2017). Adicionalmente, estudos recentes apontam o Ebselen como um potente agente antibacteriano, ampliando ainda mais seu espectro terapêutico e sua relevância como um candidato promissor no reposicionamento de fármacos (SILVA; RIO-TINTO, 2024).

## 2.6 Composto Ebselen

O Ebselen (ácido 2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3-(2H)-ona) é um composto orgânico sintético de selênio que se destaca por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, citoprotetoras e antimicrobianas (Figura 3). Esse composto tem sido amplamente estudado devido ao seu potencial terapêutico em diversas áreas da medicina, incluindo doenças cardiovasculares, artrite, aterosclerose, câncer e infecções por patógenos multirresistentes (THANGAMANI *et al.*, 2017; BENELLI *et al.*, 2021). Apesar de sua não aprovação pela FDA, o Ebselen é considerado clinicamente seguro e tem sido investigado em ensaios clínicos para diversas indicações terapêuticas (WALL *et al.*, 2018; ALVES DE LIMA E SILVA; RIO-TINTO, 2024).

Figura 4 – Molécula do Ebselen (2-Phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-one)



Fonte: Sigma-Aldrich Merck (2024).

O Ebselen, devido à sua alta eletrofilicidade, interage com tíois livres, como a glutathiona (GSH), formando sulfeto de selenenilo de Ebselen. Esse intermediário desempenha um duplo papel: catalisa a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e pode ser reduzido pela própria GSH, funcionando como eliminador de ROS, protegendo as células de mamíferos dos danos causados por radicais livres (THANGAMANI *et al.*, 2017; BENELLI *et al.*, 2021). Esse mecanismo antioxidante tem sido associado ao efeito citoprotetor em diversas condições clínicas (ALVES DE LIMA E SILVA; RIO-TINTO, 2024).

### 2.6.1 Atividade Antifúngica

Recentemente, o Ebselen tem sido investigado por sua atividade antifúngica, especialmente contra fungos patogênicos, como algumas espécies de *Candida*, *Cryptococcus* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. e *Sporothrix* spp.. Estudos demonstram que o Ebselen possui atividade fungicida de amplo espectro, com concentrações inibitórias mínimas (CIM) variando entre 0,5 e 2 µg/mL (BENELLI *et al.*, 2021; THANGAMANI *et al.*, 2017). Em modelos experimentais com *Caenorhabditis elegans*, o Ebselen mostrou-se superior a antifúngicos convencionais, como Fluconazol, flucitosina e Anfotericina B, na redução da carga fúngica (BENELLI *et al.*, 2021). Em outros estudos, o Ebselen também demonstrou atividade contra cepas multirresistentes de *Candida auris*, uma das mais desafiadoras para o tratamento antifúngico (WALL *et al.*, 2018). Embora tenha sido relatado como possuidor de potente atividade antifúngica, seu mecanismo de ação e sua eficácia *in vivo* ainda permanecem desconhecidos (BENELLI *et al.*, 2021; WALL *et al.*, 2018).

O Ebselen tem demonstrado sinergia quando utilizado em combinação com outros antifúngicos, o que pode representar uma estratégia eficaz no combate a patógenos resistentes. Estudos têm mostrado que, quando combinado com antifúngicos convencionais, como Fluconazol, Anfotericina B e Itraconazol, a interação entre Ebselen e antifúngicos pode ser atribuída à sua capacidade de modificar a homeostase redox das células fúngicas, facilitando a ação de outros agentes antimicrobianos. Por exemplo, Venturini *et al.* (2016) observaram que o Ebselen, em combinação com antifúngicos tradicionais, apresentou um efeito antifúngico aumentado contra *Fusarium* spp., sugerindo um potencial para o uso combinado em tratamentos clínicos. Além disso, estudos de Benelli *et al.* (2021) e Wall *et al.* (2018) indicaram que a associação do Ebselen com outras drogas antifúngicas pode superar a resistência fúngica, promovendo uma ação mais ampla e eficaz contra infecções fúngicas difíceis de tratar. Essa

combinação de terapias pode ajudar a reduzir a carga fúngica de forma mais rápida e minimizar os efeitos colaterais associados ao uso de antifúngicos em altas doses.

### 2.6.2 Testes Clínicos e Fases Clínicas do Ebselen

O Ebselen, embora ainda não tenha sido aprovado pela FDA como tratamento antifúngico, tem se destacado como um promissor candidato para o tratamento de infecções causadas por patógenos multirresistentes, especialmente devido às suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Amplamente investigado em estudos clínicos e pré-clínicos, o Ebselen tem mostrado potencial não apenas contra fungos, mas também contra bactérias resistentes a múltiplos fármacos, o que faz dele uma opção relevante no contexto da resistência antimicrobiana. A pesquisa sobre Ebselen está em diferentes estágios, incluindo ensaios clínicos, testes de eficácia *in vitro* e *in vivo*, e continua a gerar expectativas quanto ao seu impacto na medicina, principalmente em infecções difíceis de tratar (ALVES DE LIMA E SILVA; RIO-TINTO, 2024).

Nos ensaios clínicos, o Ebselen tem sido testado em uma variedade de patologias associadas a infecções por patógenos multirresistentes, com foco em sua segurança, eficácia e possíveis vantagens em comparação com tratamentos convencionais. Sua principal característica que o diferencia de outras drogas é a sua capacidade de atuar como um antioxidante eficiente, mimetizando a ação das glutathionas peroxidases (GPx), uma classe de enzimas responsáveis pela proteção celular contra o dano induzido pelos radicais livres (ROS) (ALVES DE LIMA E SILVA; RIO-TINTO, 2024).

Com isso, o Ebselen demonstra capacidade de atuar em diversos alvos biológicos, incluindo processos inflamatórios, apoptose, diferenciação celular, e distúrbios neurodegenerativos, ampliando seu espectro de ação além das infecções, o que o coloca como um composto múltiplos alvos de grande interesse terapêutico (ALVES DE LIMA E SILVA; RIO-TINTO, 2024). Isso sugere que o Ebselen poderia não apenas combater os microrganismos, mas também aliviar os efeitos adversos das terapias convencionais e ajudar no tratamento de doenças associadas à inflamação e ao estresse oxidativo, como doenças neurodegenerativas e distúrbios do sistema imune (BENELLI *et al.*, 2021).

Entretanto, o uso do Ebselen ainda enfrenta desafios significativos, especialmente no que diz respeito à compreensão completa de seu mecanismo de ação, que permanece parcialmente obscuro. Embora se saiba que o Ebselen pode atuar como antioxidante e

potencializar os efeitos de outros antimicrobianos, como os antifúngicos, sua interação com outros medicamentos e sua toxicidade ainda precisam ser mais bem avaliadas. Estudos em modelos animais e humanos têm mostrado que o Ebselen é bem tolerado, com efeitos colaterais mínimos quando administrado em doses terapêuticas. Nos ensaios clínicos, foi observada boa absorção oral do composto, e os estudos demonstraram que ele tem uma distribuição eficaz no plasma e nos tecidos. Embora a excreção seja baixa, o composto não libera selênio inorgânico no organismo, o que minimiza o risco de toxicidade em comparação com outros compostos contendo selênio (ALVES DE LIMA E SILVA; RIO-TINTO, 2024).

Um estudo clínico de fase I, conduzido com 32 voluntários saudáveis, demonstrou que o Ebselen tem boa tolerabilidade, mesmo em doses elevadas, de até 1.600 mg, sem apresentar efeitos adversos significativos em comparação com o placebo. A análise das concentrações plasmáticas de selênio revelou uma correlação com os níveis de Ebselen no plasma, sendo que apenas 11% da dose de Ebselen foi excretada na urina. Esses resultados positivos da fase I abriram caminho para a realização de um ensaio clínico de fase II, randomizado, duplo-cego e controlado por placebo, com o objetivo de avaliar a segurança e a eficácia do Ebselen na prevenção da perda auditiva induzida por ruído em jovens adultos (ALVES DE LIMA E SILVA; RIO-TINTO, 2024; BENELLI *et al.*, 2021).

Neste estudo de fase II, os participantes foram aleatoriamente designados para receber Ebselen nas doses de 200 mg, 400 mg ou 600 mg, ou placebo, administrados duas vezes ao dia. O tratamento com Ebselen foi bem tolerado em todas as doses, sem diferenças significativas nos exames hematológicos, bioquímicos ou radiológicos entre os grupos que receberam o tratamento e o grupo placebo. A dose de 800 mg por dia (dividida em duas doses de 400 mg) foi considerada segura e eficaz para prevenir a perda auditiva induzida por ruído, com bons resultados observados nos participantes que receberam essa dosagem. (ALVES DE LIMA E SILVA; RIO-TINTO, 2024).

Além disso, a pesquisa de Alves de Lima e Silva e Rio-Tinto (2024) também evidenciou que o Ebselen, quando administrado em pacientes com acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico agudo, mostrou potencial neuroprotetor, sem diferenças significativas em relação ao placebo. Sugerindo a utilização do Ebselen como um candidato viável para condições em que a proteção celular é essencial, como no caso de danos causados por isquemia.

## 2.7 Modelo *in silico* como ferramenta de análise de alvos moleculares para a atividade antifúngica.

O *docking* molecular é uma ferramenta computacional fundamental na química medicinal e biotecnologia estrutural, utilizada para prever a interação entre moléculas bioativas e macromoléculas-alvo. Esse método estima a afinidade de ligação de um ligante ao sítio ativo de proteínas, facilitando a identificação de compostos promissores e a elucidação de seus mecanismos de ação. O processo envolve a geração de várias conformações do ligante, ranqueadas com base na estabilidade das interações químicas, como ligações de hidrogênio, forças de Van Der Waals e interações eletrostáticas. Na pesquisa antifúngica, o *docking* molecular tem se mostrado essencial, pois permite a triagem virtual de moléculas, acelerando a identificação de novas terapias. A modelagem computacional também permite analisar a interação de fármacos reposicionados com alvos fúngicos, fornecendo uma base para otimização de compostos candidatos (SETHI *et al.*, 2020).

O uso do *docking* molecular tem se mostrado uma ferramenta valiosa na pesquisa de novos antifúngicos, permitindo a análise das interações entre compostos e alvos *in silico*. Esse método facilita a identificação de novos inibidores e a otimização de terapias combinadas. Além disso, o *docking* molecular pode revelar interações entre alvo e ligante *in silico*, sugerindo a atividade desses agentes e indicando possíveis mecanismos de ação (BENELLI *et al.*, 2021; SETHI *et al.*, 2020).

Nesse contexto, o uso do *docking* torna-se particularmente relevante para o estudo do ebselen, um composto que apresenta forte atividade antimicrobiana contra fungos, que pode interagir com enzimas e estruturas essenciais para o microrganismo como a 14 $\alpha$ -desmetilase fúngica (CYP51), Eixo- $\beta$ -(1,3)-glucanase e Timidilato quinase (TMPK). Esses efeitos culminam no aumento de ROS e na interrupção da homeostase redox. No entanto, seu mecanismo de ação antifúngica ainda permanece obscuro (SILVA; RIO-TINTO, 2024), reforçando a importância de abordagens *in silico* para a elucidação de suas possíveis interações moleculares com alvos fúngicos.

A CYP51 é uma enzima chave na biossíntese do ergosterol, essencial para a homeostase da membrana plasmática de *Candida* spp.. Ela remove um grupo metil do lanosterol, permitindo sua conversão em ergosterol, que garante fluidez e estabilidade à membrana. Inibidores da CYP51, como os azóis (Fluconazol, Itraconazol e Voriconazol), se ligam ao grupo heme da

enzima, bloqueando sua função e resultando no acúmulo de intermediários tóxicos. Isso altera a fluidez da membrana, comprometendo o transporte de nutrientes, a integridade celular e a adaptação ao estresse osmótico. Além disso, mutações na CYP51 estão associadas à resistência aos azóis, tornando-a um alvo importante para o desenvolvimento de novos antifúngicos (ZHANG *et al.*, 2019).

A degradação enzimática do  $\beta$ -(1,3)-glucano, um componente chave da parede celular fúngica, é realizada pela exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase. A integridade dessa parede é crucial para a sobrevivência de *Candida spp.*, conferindo resistência osmótica e estabilidade celular. Antifúngicos como Caspofungina, Micafungina e anidulafungina inibem a síntese de  $\beta$ -(1,3)-glucano, enfraquecendo a parede celular. Inibidores dessa enzima podem prejudicar a remodelação da parede celular, tornando o fungo mais vulnerável a danos estruturais e a antifúngicos (BANERJEE *et al.*, 2024; SAMALOVA *et al.*, 2017)

A Timidilato quinase (TMPK) é essencial para a biossíntese de nucleotídeos, convertendo o Timidilato monofosfato (dTMP) em Timidilato difosfato (dTDP), crucial para a síntese de DNA. Seu funcionamento adequado é vital para a replicação celular e a viabilidade fúngica. Inibidores da TMPK podem bloquear a síntese de DNA, interrompendo o ciclo celular e resultando em morte fúngica. Devido ao seu papel central no metabolismo do DNA e à ausência de análogos em células humanas, a TMPK é um alvo promissor para antifúngicos, com menor risco de toxicidade. Antifúngicos como a flucitosina, que inibem a síntese de ácidos nucleicos, também impactam essa via (SINHA; RULE, 2017).



### 3 HIPÓTESES

1. O Ebselen apresenta atividade antifúngica *in vitro* contra isolados clínicos sensíveis e resistentes de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*.
2. O Ebselen potencializa a ação dos antifúngicos clássicos (Fluconazol, Itraconazol, Anfotericina B e Micafungina) contra isolados clínicos sensíveis e resistentes de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* na forma planctônica.
3. O Ebselen apresenta atividade antifúngica *in vitro* contra biofilmes de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*.
4. O Ebselen potencializa a ação dos antifúngicos clássicos (Fluconazol, Itraconazol, Anfotericina B e Micafungina) contra biofilmes de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*.
5. O *docking molecular* permitirá elucidar o mecanismo de ação do ebselen por meio da identificação de suas interações com proteínas alvos associadas à parede celular, membrana e DNA.

## 4 OBJETIVO

### 4.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos, *in vitro*, do Ebselen isolado e combinado aos antifúngicos Fluconazol, Itraconazol, Anfotericina B e Micafungina frente às cepas clínicas do gênero *Candida spp.* (*C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*) em crescimento planctônico e no biofilme, e avaliar *in silico* os mecanismos de ação.

### 4.2 Objetivos específicos

1. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Ebselen e dos antifúngicos Fluconazol, Itraconazol, Micafungina e Anfotericina B contra isolados clínicos sensíveis e resistentes de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* em crescimento planctônico.
2. Avaliar a interação do Ebselen com os antifúngicos Fluconazol, Itraconazol, Anfotericina B e Micafungina em isolados clínicos sensíveis e resistentes de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* na forma planctônica.
3. Avaliar a ação do Ebselen na sensibilidade a antifúngicos no biofilme de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*.
4. Avaliar, *in silico*, as interações moleculares do Ebselen com alvos relacionados a parede, membrana e DNA

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Local de estudo

O estudo foi realizado no laboratório de bacteriologia do Grupo Aplicado em Microbiologia Médica (GrAMM), vinculado ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica (PPGMM), localizado no Centro de Biomedicina da Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE.

### 5.2 Microrganismos

Neste estudo, foram utilizados 15 isolados clínicos do gênero *Candida*: *C. albicans* (n = 5), *C. parapsilosis* (n = 5), *C. tropicalis* (n = 5). Para cada espécie citada, foi incluída uma cepa padrão, respectivamente, ATCC 14053, ATCC 22019 e ATCC 750 (Tabela 1). Todos os isolados fazem parte da coleção de microrganismos do laboratório de bacteriologia GrAMM da Universidade Federal do Ceará (UFC) e estavam estocadas em -20 °C em meio caldo Triptona de Soja (TSB) adicionado 20% de glicerol. Para a utilização durante os experimentos, essas cepas foram semeadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) para restabelecerem seu metabolismo. Em seguida, foram cultivados em meio ágar batata dextrose (PDA) (Himedia, Índia) e incubados a 35° C durante 24 horas antes dos experimentos.

### 5.3 Drogas

O antifúngico Fluconazol (FLC; Pfizer Pharmaceuticals, EUA) foi preparado na concentração de 6.400 µg/mL, o Itraconazol (ITZ; Pfizer Pharmaceuticals, EUA), Micafungina (MCF; Sigma Chemical Corporation, EUA) e Anfotericina B (ANB; Sigma Chemical Corporation, EUA) nas concentrações de 1.600 µg/mL, conforme protocolo M27-S4 padronizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017). Os antifúngicos foram estocados a -20 °C e diluídos no momento de uso em meio RPMI 1640 com L- glutamina e sem bicarbonato de sódio (Sigma Chemical Corporation, EUA). O composto Ebselen [2-fenil-1,2-benzisosselenazol-3(2H)-ona] (Sigma Chemical Corporation, EUA) foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 3000 µg/mL e estocado a -20 °C. Para os testes, as diluições subsequentes foram realizadas em meio RPMI.

#### 5.4 Avaliação da sensibilidade de *Candida* spp. aos antifúngicos clássicos e ao Ebselen

Os testes de sensibilidade ao Fluconazol, Itraconazol, Anfotericina B, Micafungina e Ebselen foram realizados através do método de microdiluição em caldo, seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) M100-S30 (2020). O inóculo fúngico foi preparado a partir da suspensão de uma colônia em solução salina estéril (0,9%), ajustada à turbidez 0,5 na escala de McFarland, seguido de uma diluição de 1:50 e 1:20 em meio RPMI (concentração final de 0,5 a  $2,5 \times 10^3$  células/mL). Aliquotas de 100  $\mu$ L do inóculo foram adicionadas em placas de cultura de 96 poços já contendo 100  $\mu$ L de RPMI-1640 suplementado com os fármacos, distribuídos em diluições seriadas. Os fármacos foram testados em concentrações com intervalos que variaram de 0,25 a 64  $\mu$ g/mL para FLC e 0,03125 a 16  $\mu$ g/mL para ANB, ITZ e MCF. A concentração Ebselen foi testada em concentrações que variam de 0,125 a 32  $\mu$ g/mL. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas.

Para Anfotericina B, a concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de fármaco capaz de inibir 100% do crescimento fúngico, enquanto para Fluconazol, Itraconazol e Micafungina, a CIM foi definida como a menor concentração de fármaco capaz de inibir 50% do crescimento fúngico, quando comparado ao controle de crescimento de acordo como os parâmetros do CLSI M100-S30 (2020). Todos os experimentos foram realizados em duplicata. A partir dos pontos de corte baseados nas CIM's para *Candida* spp., os isolados serão classificados em sensíveis (S), sensíveis dose-dependentes (SSD), intermediário (I) e resistentes (R). A CIM do Ebselen foi definida como a menor concentração de fármaco capaz de inibir 100% do crescimento fúngico. As cepas *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019 foram usadas como controle de qualidade para cada teste de acordo com CLSI M100-S30 (2020).

#### 5.5 Avaliação da interação do Ebselen *in vitro* com os antifúngicos clássicos sobre *Candida* spp. na forma planctônica

A avaliação das interações entre o Ebselen e os antifúngicos Fluconazol, Itraconazol, Micafungina e Anfotericina B sobre células planctônicas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* foi realizada empregando-se o método de microdiluição em caldo. Para cada antifúngico, FLC, ITZ, ANB e MCF foi utilizada uma placa de 96 poços contendo diluições seriadas nas concentrações de 0,25-64  $\mu$ g/mL para FLC e 0,015 a 16

$\mu\text{g} / \text{mL}$  para ANB, ITZ e MCF. Em cada placa, foram preparadas combinações do antifúngico com o composto Ebselen em diferentes concentrações subinibitórias (CIM/2, CIM/4 e CIM/8). As placas foram incubadas a  $35^\circ \text{C}$  por 24 h e as CIM's dos fármacos combinados foram determinadas pelo menor concentração de fármacos capazes de inibir 100% do crescimento fúngico.

A interpretação dos resultados foi feita por meio do cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI), que se baseia na soma dos valores da Concentração Inibitória Fracionada (CIF) de cada composto usado em associação e isolado, em que  $\text{FICI} = \text{CIFA} + \text{CIFB}$ , como mostra o cálculo do Índice da Concentração Inibitória Fracionária abaixo:

$$\text{CIFA} = \text{CIM do composto em combinação} / \text{CIM do composto isolado}$$

$$\text{CIFB} = \text{CIM do antimicrobiano em combinação} / \text{CIM do antimicrobiano isolado}$$

A interpretação dos resultados obtidos a partir dos cálculos do índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI) foram interpretados seguindo as metodologias propostas por Fratini *et al.*, (2017). O Autor sugeriu um sistema de classificação, que propõe efeito sinérgico quando  $\text{FICI} < 1$ , aditivo quando  $\text{FICI} = 1$ ; indiferente quando o resultado for  $> 1$  e  $\leq 2$ ; e antagônico quando  $\text{FICI} > 2$ .

## 5.6 Avaliação atividade do Ebselen isolado e em combinação com os antifúngicos clássicos no biofilme de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*.

Inicialmente, foi avaliado o padrão de formação de biofilme das cepas. Para tanto, o inóculo foi previamente preparado em meio RPMI 1640 e ajustado para a concentração de  $1 \times 10^6$  células / mL; em seguida, alíquotas contendo 200  $\mu\text{L}$  do inóculo foram transferidas para placas de poliestireno com 96 poços e incubado a  $35^\circ\text{C}$  por 48 horas. (Brilhante *et al.*, 2016). Após 48 horas de crescimento, o sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados uma vez com PBS X1. As células aderidas restantes foram fixadas com 200  $\mu\text{L}$  de metanol 99% por poço e, após 15 minutos, as placas foram esvaziadas e deixadas para secar. Em seguida, as placas foram coradas por 10 min com 200  $\mu\text{L}$  de cristal violeta a 0,3%. O cristal foi removido e os poços foram lavados com 200  $\mu\text{L}$  de água destilada estéril. Após secagem, o corante ligado às células aderentes foi resolubilizados com 200  $\mu\text{L}$  de ácido acético glacial a 33% (v/v) por poço. A densidade óptica (DO) de cada poço foi medida em espectrofotômetro de placa de 96 poços na

absorbância de 490nm. Valores de DO obtidos a partir de poços contendo meio de cultura, sem inóculo das *Candida*, foram utilizados como controle negativo para o crescimento de biofilme.

Com base nos valores de DO do controle negativo, o valor de corte (DOc) para o teste, para classificar as cepas como produtoras de biofilme, foi definido como três desvios-padrão acima da média de DO observada para o controle negativo. No final, as cepas foram classificadas como não produtoras de biofilme ( $DO \leq DOc$ ), fracas produtoras de biofilme ( $DOc < DO \leq 2 \times DOc$ ), moderadas produtoras de biofilme ( $2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$ ) ou fortes produtoras de biofilme ( $4 \times DOc < DO$ ) (STEPANOVIĆ *et al.*, 2007). Todos os testes foram realizados em duplicata.

Após definir e selecionar as *Candida* moderada e forte produtoras de biofilme, foi avaliado o efeito do Ebselen em combinação com as drogas clássicas sobre os biofilmes maduros das mesmas (N=9). Após a formação do biofilme, foi feita a lavagem com o PBS X1 e em seguida foi adicionada os antifúngicos combinados com o Ebselen. As drogas foram combinadas nas seguintes concentrações: o Ebselen em CIM/2, CIM/4 e CIM/8 com o Fluconazol (FCL) e Itraconazol (ITZ) nas concentrações de 25 a 128 µg / mL, Anfotericina (ANB) e Micafigina (MICA) nas concentrações de 0,061 a 32 µg / mL. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h. Após o período, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados duas vezes com PBS X1.

Após a incubação, a atividade metabólica foi avaliada utilizando brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), com a leitura também realizada no espectrofotômetro a 490 nm, conforme descrito por Brilhante *et al.* (2016) e Rocha *et al.* (2019), onde a menor concentração capaz de inibir completamente a atividade metabólica do biofilme foi definida como a Concentrações Eliminatórias Mínimas em Biofilme (CEMBs). Em seguida, a biomassa do biofilme foi quantificada por coloração com cristal violeta, com a absorbância medida no espectrofotômetro a 490 nm. Cada cepa foi avaliada em duplicata em dois momentos distintos. Poços sem inóculo microbiano foram incluídos como controle de esterilidade (SIDRIM *et al.*, 2020).

### **5.7 Investigação in silico dos mecanismos de ação do Ebselen por *docking molecular* análise in silico**

As estruturas tridimensionais (3D) do alvo correspondente à timidilato quinase

foram obtidas no Protein Data Bank (PDB), sob os códigos 5V5Z, 2PB1 e 5UIV, respectivamente. Já as estruturas 3D do ligante TMP (trifosfato de timidina) foram obtidas no banco de dados PubChem. O TMP, um metabólito essencial no metabolismo dos nucleotídeos, atua como substrato da timidilato quinase, uma enzima fundamental na síntese de DNA.

Para avaliar a competição pelo sítio de ligação dos ligantes, foi utilizado o Ebselen, cuja estrutura bidimensional (2D) foi desenhada no software ChemSketch. A partir dessa estrutura, seguida da conversão para a forma tridimensional (3D) com geometria otimizada no programa Avogadro 1.99.0.

Os parâmetros utilizados no *docking* molecular para ensaios de *docking* molecular foram realizados AutoDock Vina (Trott & Olson, 2009; Eberhardt *et al.*, 2021). As caixas de docking foram definidas de maneira a cobrir toda a estrutura das enzimas, com os seguintes parâmetros - centro\_x: -51.890800, centro\_y: -21.354800, centro\_z: 23.761200, tamanho\_x: 40, tamanho\_y: 40, tamanho\_z: 40 para 14 $\alpha$ -desmetilase, centro\_x: 37.447500, centro\_y: 24.953750, centro\_z: 54.398375, tamanho\_x: 40, tamanho\_y: 40, tamanho\_z: 40 para Exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase e centro\_x: 23.785500, centro\_y: 13.442833, centro\_z: 2.787583, tamanho\_x: 40, tamanho\_y: 40, tamanho\_z: 40 para Timidilato quinase. As imagens 3D que mostram as poses de ligação foram feitas com o software Pymol. A representação 2D das interações polares e não polares foi obtida com o software Discovery Studio (BIOVIA).

## 5.8 Análise estatística

Para avaliar o efeito do Ebselen na sensibilidade antimicrobiana das cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* em formas planctônicas e de biofilme; as CIMs, CEMBs e os valores obtidos das leituras de absorbância para as drogas isoladas e em combinação foram comparados usando Mann-Whitney para os dados que apresentaram distribuição assimétrica e Teste t não pareado para dados simétricos. Para todas as análises, valores de P inferiores a 5% foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism 10.4.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Atividade antifúngica do Ebselen isolado e em combinação com antifúngicos clássicos em células planctônicas de *Candida* spp.

Ebselen apresentou CIMs variando de 0,5 e 8 µg/mL, sendo a média geométrica contra *Candida tropicalis* (MG = 4,59) ( $p < 0,05$ ) superior as médias encontradas contra *Candida albicans* (MG = 3,48) ( $p < 0,05$ ) e *Candida parapsilosis* (MG = 2,30) ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1). Em relação aos antifúngicos clássicos, as CIMs de Fluconazol variaram de 0,5 a >64 µg/mL em *Candida albicans* (MG = 6,06); 0,5 a 4 µg/mL em *Candida parapsilosis* (MG = 2,30) e 1 a >64 µg/mL em *Candida tropicalis* (MG = 12,13). Para o Itraconazol, observaram-se CIMs de 0,062 a >16 µg/mL em *Candida albicans* (MG = 1,0); 0,062 a 0,5 µg/mL *Candida parapsilosis* (MG = 0,12) e 0,062 a >16 µg/mL *Candida tropicalis* (MG = 2,0). Quanto a Anfotericina B, as CIMs variaram de 0,062 a 0,5 µg/mL em *Candida albicans* (MG = 0,12); 0,062 a 0,25 em *Candida parapsilosis* (MG = 0,09) e de 0,062 a 0,25 µg/mL em *Candida tropicalis* (MG = 0,09). Por fim, a Micafungina, as CIMs foram de 0,125 µg/mL para todas as cepas de *Candida albicans* (MG = 0,125); 0,125 a 2 em *Candida parapsilosis* (MG = 0,38) e de 0,125 a 0,25 µg/mL em *Candida tropicalis* (MG = 0,16) (Tabela 1).

Na associação do Ebselen com os antifúngicos contra as cepas de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* na forma planctônica, observou-se redução dos valores de CIM de todas as drogas ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2). Para Fluconazol, houve redução das médias geométricas das CIM (MG = 5,53) para 0,36; 0,69 e 0,31 quando combinado com concentrações subinibitórias do Ebselen (CIM/2, CIM/4 e CIM/8, respectivamente). Com Itraconazol, a CIM da droga isolada (MG = 0,63) também reduziu para 0,03; 0,05 e 0,03 em todas as combinações com Ebselen (CIM/2, CIM/4 e CIM/8, respectivamente). Para Anfotericina B, a CIM da droga isolada (MG = 0,10) foi reduzida em 5x vezes em todas as combinações com Ebselen (MG = 0,02). Já para Micafungina, houve uma redução da CIM da droga (MG = 0,210) isolada em até 10x quando combinada com Ebselen (CIM/2, CIM/4 e CIM/8) (Tabela 2).

Para avaliar de forma mais detalhada os resultados da sinergia entre o Ebselen e os antifúngicos Fluconazol, Itraconazol, Anfotericina B e Micafungina, foram elaborados gráficos que mostram a distribuição das CIMs dos antifúngicos clássicos, tanto isolados



quanto em combinação com o Ebselen em concentrações subinibitórias (CIM/2, CIM/4 e CIM/8) (Figura 4)

Tabela 1 - Perfil das cepas e concentração inibitória mínima (CIM) de Ebselen, Fluconazol (FLC), Itraconazol (ITZ), Anfotericina B (ANB) e Micafungina (MCF) contra *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*.

Cepas	Origem	Padrão de formação de biofilme	CIM dos antifúngicos				
			Ebselen (µg/mL)	FLC (µg/mL)	ITZ (µg/mL)	ANB (µg/mL)	MCF (µg/mL)
<i>Candida albicans</i> 01 (CA01)	Urina	Moderada	4	>64 (R)	>16 (R)	0,062 (S)	0,125 (S)
<i>Candida albicans</i> 02 (CA02)	Urina	Forte	4	>64 (R)	>16 (R)	0,125 (S)	0,125 (S)
<i>Candida albicans</i> 03 (CA03)	Urina	Forte	4	1 (S)	0,062 (S)	0,062 (S)	0,125(S)
<i>Candida albicans</i> 04 (CA04)	Lavado Broncoalveolar	Moderada	4	1 (S)	0,25 (I)	0,5 (S)	0,125 (S)
<i>Candida albicans</i> 05 (CA05)	ATCC 14053	Moderada	2	0,5 (S)	0,062 (S)	0,125 (S)	0,125 (S)
<b>Média Geométrica</b>			<b>3,48</b>	<b>6,06</b>	<b>1,0</b>	<b>0,12</b>	<b>0,13</b>
<i>Candida parapsilosis</i> 01 (CP01)	Linfonodo	Moderada	2	4 (SDD)	0,125 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)
<i>Candida parapsilosis</i> 02 (CP02)	Unha	Forte	4	4 (SDD)	0,062 (S)	0,062 (S)	2 (S)
<i>Candida parapsilosis</i> 03 (CP03)	Hemocultura	Moderada	4	4 (SDD)	0,062 (S)	0,062 (S)	0,5 (S)
<i>Candida parapsilosis</i> 04 (CP04)	Urina	Moderada	0,5	2 (S)	0,5 (I)	0,125 (S)	0,125 (S)
<i>Candida parapsilosis</i> 05 (CP05)	ATCC 22019	Moderada	4	0,5 (S)	0,125 (S)	0,062 (S)	0,125 (S)
<b>Média Geométrica</b>			<b>2,30</b>	<b>2,30</b>	<b>0,12</b>	<b>0,18</b>	<b>0,50</b>
<i>Candida tropicalis</i> 01 (CT01)	Oral	Forte	4	>64 (R)	>16(R)	0,062 (S)	0,125 (S)
<i>Candida tropicalis</i> 02 (CT02)	Urina	Moderada	4	>64 (R)	>16 (R)	0,062 (S)	0,25 (S)
<i>Candida tropicalis</i> 03 (CT03)	Lavado Broncoalveolar	Forte	4	4 (SDD)	1 (R)	0,25 (S)	0,25 (S)
<i>Candida tropicalis</i> 04 (CT04)	Secreção de ouvido	Moderada	8	4 (SDD)	0,5 (I)	0,125 (S)	0,125 (S)
<i>Candida tropicalis</i> 05 (CT05)	ATCC 750	Forte	4	1 (S)	0,062 (S)	0,062 (S)	0,125 (S)
<b>Média Geométrica</b>			<b>4,59</b>	<b>12,13</b>	<b>2,00</b>	<b>0,09</b>	<b>0,16</b>

**Legenda:** S – Sensível, SDD – Sensível dose Dependente, I - Susceptibilidade Intermediária, R – Resistente; critérios do CLSI M60 (2020)

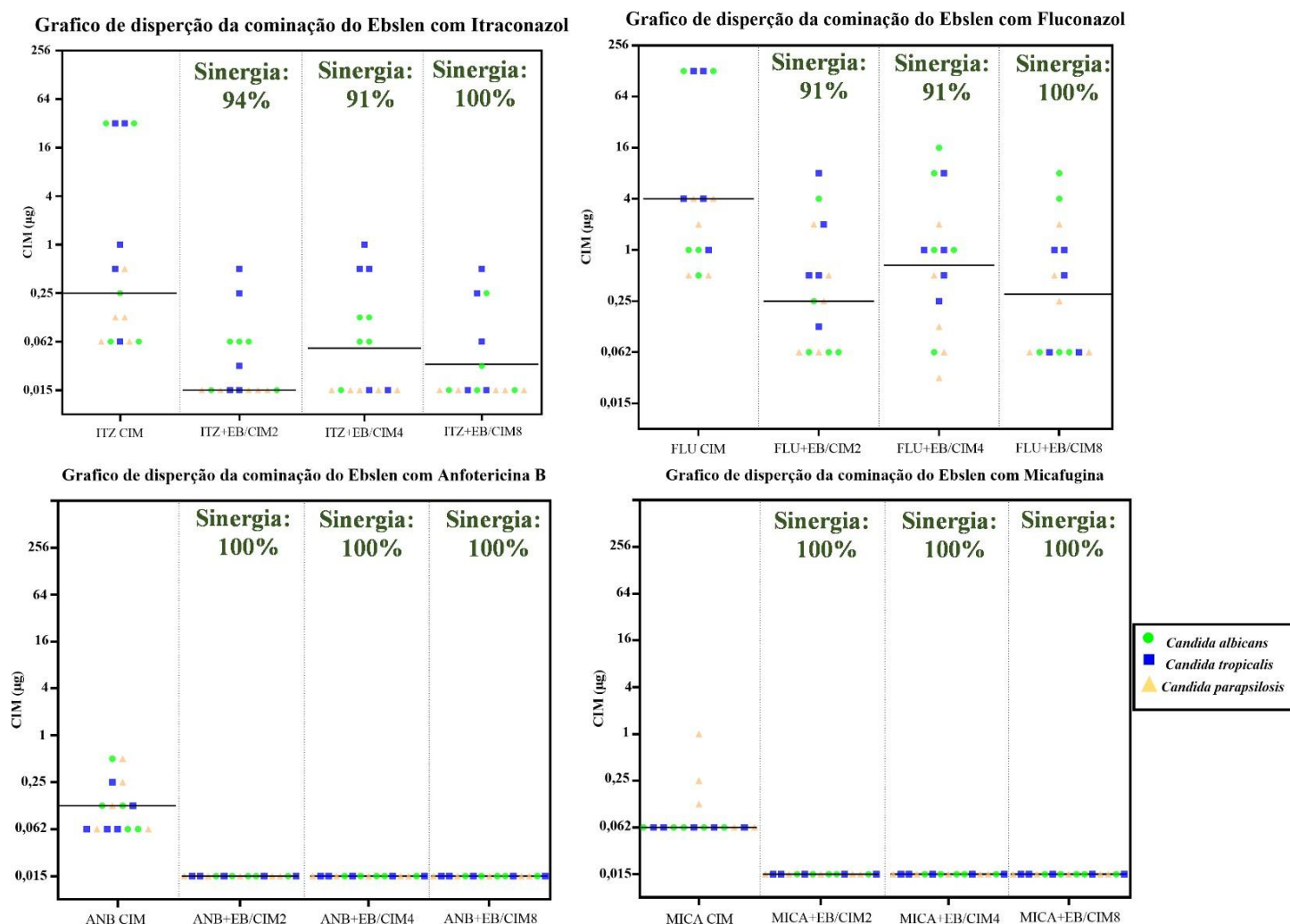
Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) de Ebselen (EB), Fluconazol (FLC), Itraconazol (ITZ), Anfotericina B (ANB) e Micafungina (MCF): isolado e em associação contra *Candida albicans* (n = 5), *Candida parapsilosis* (n = 5) e *Candida tropicalis* (n = 5).

Cepas	EB	CIM															
		FLC				ITZ				ANB				MCF			
		Isolado	+CIM/2 EB	+ CIM /4 EB	+ CIM /8 EB	Isolado	+ CIM /2 EB	+ CIM /4 EB	+ CIM /8 EB	Isolado	+ CIM /2 EB	+ CIM /4 EB	+ CIM /8 EB	Isolado	+ CIM /2 EB	+ CIM /4 EB	+ CIM /8 EB
<i>Candida albicans</i>																	
CA01	4	>64 (R)	4	8	8	>16 (R)	0,062	0,125	0,25	0,062 (S)	<0,031	<0,031	<0,031	0,125 (S)	<0,031	<0,031	<0,031
CA02	4	>64 (R)	0,25	16	4	>16 (R)	0,062	0,125	0,031	0,125 (S)	<0,031	<0,031	<0,031	0,125 (S)	<0,031	<0,031	<0,031
CA03	4	1 (S)	<0,125	1	<0,125	0,062 (S)	<0,031	0,062	<0,031	0,062 (S)	<0,031	<0,031	<0,031	0,125(S)	<0,031	<0,031	<0,031
CA04	4	1 (S)	<0,125	1	<0,125	0,25 (I)	0,062	0,062	<0,031	0,5 (S)	<0,031	<0,031	<0,031	0,125 (S)	<0,031	<0,031	<0,031
CA05	2	0,5 (S)	<0,125	<0,125	<0,125	0,062 (S)	<0,031	<0,031	<0,031	0,125 (S)	<0,031	<0,031	<0,031	0,125 (S)	<0,031	<0,031	<0,031
Média Geométrica	3,48	6,06	0,19*	1,51*	0,38*	1,0	0,04*	0,06*	0,03*	0,12	0,02*	0,02*	0,02*	0,13	0,02*	0,02*	0,02*
<i>Candida parapsilosis</i>																	
CP01	2	4 (SDD)	2	2	2	0,125 (S)	<0,031	<0,031	<0,031	0,25 (S)	<0,031	<0,031	<0,031	0,5 (S)	<0,031	<0,031	<0,031
CP02	4	4 (SDD)	1	1	1	0,062 (S)	<0,031	<0,031	<0,031	0,062 (S)	<0,031	<0,031	<0,031	2 (S)	<0,031	<0,031	<0,031
CP03	4	4 (SDD)	0,25	0,125	0,25	0,062 (S)	<0,031	<0,031	<0,031	0,062 (S)	<0,031	<0,031	<0,031	0,5 (S)	<0,031	<0,031	<0,031
CP04	0,5	2 (S)	<0,125	0,031	<0,125	0,5 (I)	<0,031	<0,031	<0,031	0,125 (S)	<0,031	<0,031	<0,031	0,125 (S)	<0,031	<0,031	<0,031
CP05	4	0,5 (S)	<0,125	<0,125	<0,125	0,125 (S)	<0,031	<0,031	<0,031	0,062 (S)	<0,031	<0,031	<0,031	0,125 (S)	<0,031	<0,031	<0,031
Média Geométrica	2,30	2,30	0,29*	0,22*	0,29*	0,12	0,02*	0,02*	0,02*	0,18	0,02*	0,02*	0,02*	0,50	0,02*	0,02*	0,02*
<i>Candida tropicalis</i>																	
CT01	4	>64 (R)	8	8	1	>16(R)	0,031	0,5	0,5	0,062 (S)	<0,031	<0,031	<0,031	0,125 (S)	<0,031	<0,031	<0,031
CT02	4	>64 (R)	2	1	0,5	>16 (R)	0,5	0,5	0,25	0,062 (S)	<0,031	<0,031	<0,031	0,25 (S)	<0,031	<0,031	<0,031
CT03	4	4 (SDD)	0,5	0,5	<0,125	1 (R)	0,25	1	<0,031	0,25 (S)	<0,031	<0,031	<0,031	0,25 (S)	<0,031	<0,031	<0,031
CT04	8	4 (SDD)	0,5	1	1	0,5 (I)	<0,031	<0,031	0,062	0,125 (S)	<0,031	<0,031	<0,031	0,125 (S)	<0,031	<0,031	<0,031
CT05	4	1 (S)	0,125	0,25	<0,125	0,062 (S)	<0,031	<0,031	<0,031	0,062 (S)	<0,031	<0,031	<0,031	0,125 (S)	<0,031	<0,031	<0,031
Média Geométrica	4,59	12,13	0,87*	1,00*	0,29*	2,00	0,06*	0,14*	0,07*	0,09	0,02*	0,02*	0,02*	0,16	0,02*	0,02*	0,02*

**Legenda:** S – Sensível, SDD – Sensível dose Dependente, I – Susceptibilidade Intermediária, R – Resistente; critérios do CLSI M60 (2020). (\*) indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05), quando comparadas o antifúngico sozinho com o antifúngico em combinação com Ebselen nas concentrações subinibitórias. A interpretação dos resultados quanto a sinergia foi feita por meio do cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI), proposto por FRATINI *et al.*, (2017) que propõe efeito: Sinérgico quando FICI<1 (verde), aditivo quando FICI =1 (azul), indiferente quando o resultado for >1 e ≤ 2 (amarelo) e antagônico quando FICI>2 (Vermelho)

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 4 - Gráfico da distribuição de CIM's dos antifúngicos clássicos isolados e em combinação com Ebselen contra *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*.



**Legenda:** Gráfico representando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Itraconazol (ITZ), Fluconazol (FLU), Anfotericina B (ANB) e Micafungina (MICA), isolados e em combinação com Ebselen nas concentrações subinibitórias CIM/2, CIM/4 e CIM/8. Os pontos representam os valores individuais de CIM para cada concentração subinibitórias do Ebselen (EB) em combinação com os antifúngicos, comparados ao antifúngico isolado. A linha horizontal indica a mediana dos valores em cada grupo.

Quando avaliada a interação do Ebselen com os antifúngicos clássicos por meio do cálculo do FICI, observou-se sinergia do Fluconazol com todas as concentrações subinibitórias do Ebselen (CIM/2, CIM/4 e CIM/8) para cepas em que os valores de FICI (FLC + CIM/2 de Ebselen) variaram de 0,515 a 0,750, FICI (FLC + CIM/4) de 0,265 a 0,750 e FICI (FLC + CIM/8 Ebselen) de 0,128 a 0,625. Em uma cepa de *C. parapsilosis* foi-se observado efeito aditivo (FLC + CIM/2 de Ebselen) e apenas em duas cepas de *C. albicans* (FLC + CIM/4 de Ebselen) e 1 de *C. tropicalis* (FLC + CIM/4 de Ebselen) foi observado efeito indiferente. Com o Itraconazol, também foi observado sinergia com

todas as concentrações subinibitórias do Ebselen (CIM/2, CIM/4 e CIM/8) para cepas em que os valores de FICI (FLC + CIM/2 de Ebselen) variaram de 0,5 a 0,750, FICI (FLC + CIM/4) de 0,265 a 0,530 e FICI (FLC + CIM/8 de Ebselen) de 0,13 a 0,37. Em uma cepa de *C. tropicalis* foi observado efeito aditivo (FLC + CIM/2 de Ebselen) e uma cepa de *C. tropicalis* e *C. albicans* a associação foi indiferente (FLC + CIM/4 de Ebselen) (Tabela 2).

Quanto a Anfotericina e Micafungina, foi observado sinergia em todas as combinações com o Ebselen (CIM/2, CIM/4 e CIM/8). Para Anfotericina B os valores de FICI (ANB + CIM/2) foram 0,53 a 0,74; FICI (ANB + CIM/4) de 0,28 a 0,49 e FICI (ANB + CIM/8) de 0,15 a 0,354; já para Micafungina o FICI (MICA + CIM/2) variou de 0,5 a 0,74; FICI (MICA + CIM/4) de 0,256 a 0,49 e FICI (MICA + CIM/8) de 0,14 a 0,369 (Tabela 2).

## **6.2 Sensibilidade do Ebselen isolado e em combinação com antifúngicos Fluconazol, Itraconazol, Micafungina e Anfotericina B contra biofilmes isolados de clínicos sensíveis e resistentes de *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis***

Todas as 15 cepas avaliadas neste estudo foram capazes de formar biofilmes, sendo 4 classificadas como forte formadoras de biofilme (2 de *Candida albicans*, 1 de *Candida parapsilosis* e 1 de *Candida tropicalis*), 6 como formadoras moderadas (1 de *C. albicans*, 2 de *C. parapsilosis* e 3 de *C. tropicalis*) e 5 como formadoras fracas (2 de *C. albicans*, 2 de *C. parapsilosis* e 1 de *C. tropicalis*) (Tabela 1). Para análise foram selecionadas 3 cepas de cada espécie de *Candida*, com as melhores formas classificação de formação de biofilme.

Quando esses biofilmes formam expostos aos antifúngicos clássicos isolados e em combinação com Ebselen em concentrações subinibitórias (CIM/2; CIM/4 e CIM/8) observou-se que o Fluconazol e Itraconazol não interferiram na atividade metabólica e biomassa do biofilme de *Candida* spp.

Entretanto, a Anfotericina B, isolada e combinada ao Ebselen, reduziu a atividade metabólica do biofilme até concentração de 0,25 µg/mL quando comparada ao controle de crescimento ( $p < 0,05$ ). Vale destacar que na concentração de 2 a 0,25 µg/mL a inibição da associação foi melhor do que a da Anfotericina B isolada ( $p < 0,05$ ). Ademais, quando associada ao Ebselen foi capaz de inibir a atividade metabólica até a concentração de

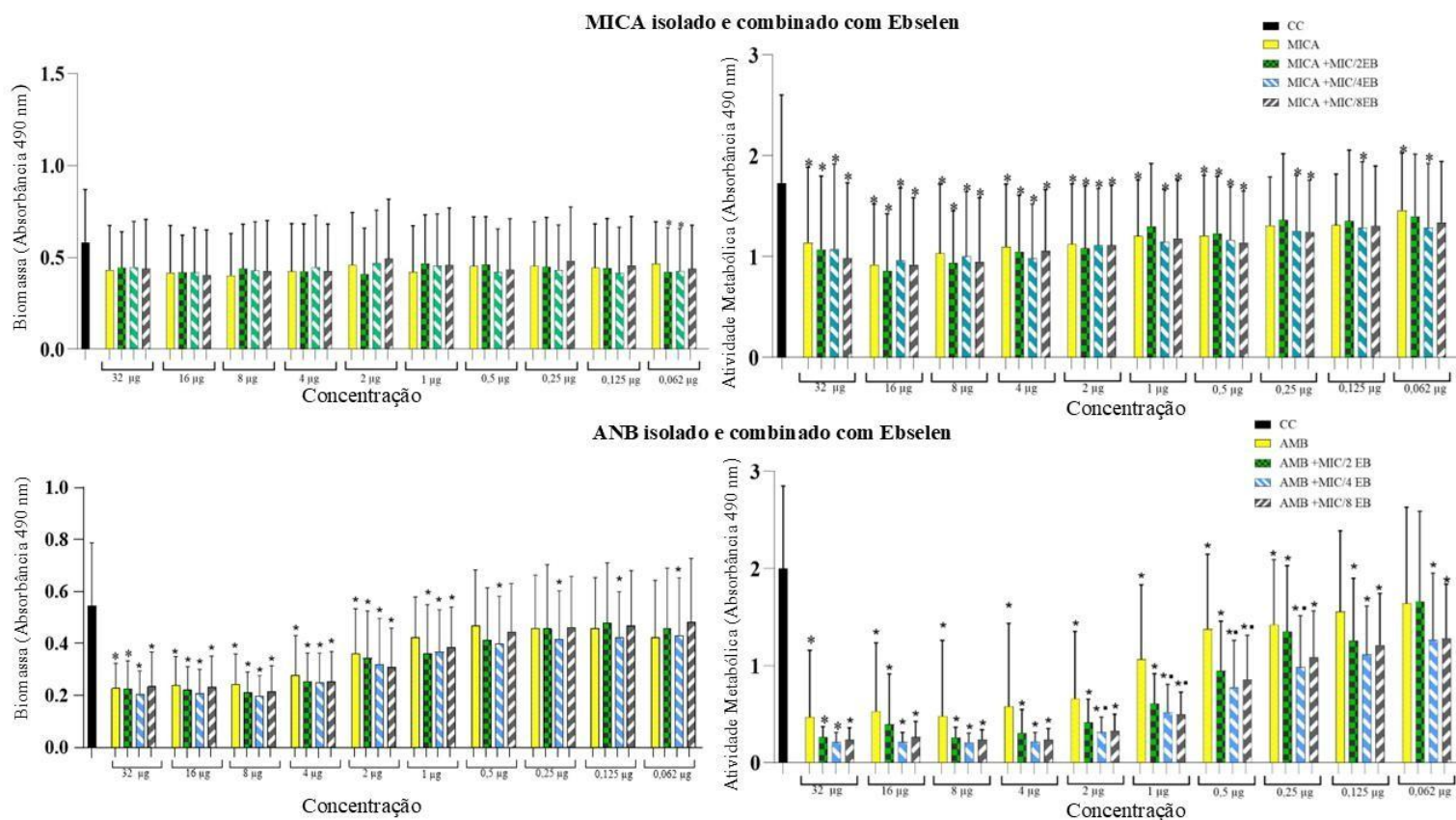
0,062  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,05$ ). Além disso, nas concentrações entre 2  $\mu\text{g/mL}$  e 0,25  $\mu\text{g/mL}$ , a combinação de Anfotericina B com Ebselen demonstrou uma redução significativa em comparação à Anfotericina B isolada ( $p < 0,05$ ). Para biomassa, a Anfotericina B isolada e associada teve atividade até a concentração 2  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,05$ ); todavia, nas concentrações de 1 a 0,25  $\mu\text{g/mL}$  em combinação com Ebselen, a Anfotericina B também reduziu a biomassa em 33%, 27% e 24%, respectivamente. ( $p < 0,05$ ) (Figura 5).

A micafungina, tanto isolada quanto em combinação com Ebselen, reduziu a atividade metabólica do biofilme até a concentração de 0,125  $\mu\text{g/mL}$ . Entretanto, na concentração de 0,062  $\mu\text{g/mL}$ , essa redução foi significativa apenas quando a Micafungina foi associada ao Ebselen ( $p < 0,05$ ). Além disso, não foram observadas diferenças significativas entre a Micafungina isolada e sua combinação com Ebselen nas concentrações subinibitórias. Em nenhuma das concentrações testadas houve redução na biomassa do biofilme (Figura 5).

### 6.3 Investigação *in silico* dos mecanismos de ação do Ebselen por *docking molecular*

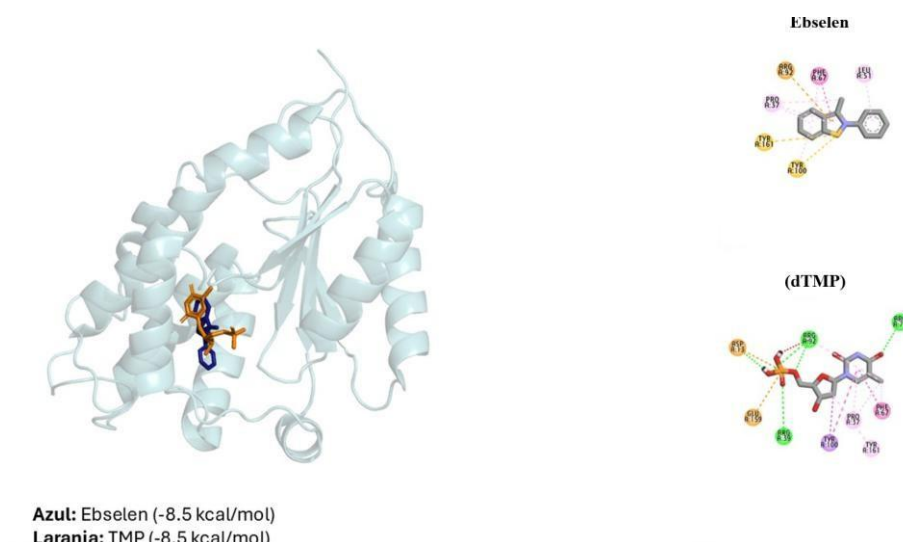
O Ebselen se ligou às enzimas 14 $\alpha$ -desmetilase (CYP51), Exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase e Timidilato quinase (Figura 6) com as energias de interação de -7.8kcal/mol, -8.1 kcal/mol e -8.5 kcal/mol, respectivamente. Em 14 $\alpha$ -desmetilase e Exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase, a ligação não ocorreu no sítio ativo da enzima (Mackenzie *et al.*, 1997; Flowers *et al.*, 2015), além de não ter sido evidenciada nenhuma alteração conformacional na enzima após a interação. Contudo, para a interação com a Timidilato quinase, foi observado que o Ebselen se ligou ao mesmo sítio e com a mesma energia de ligação (-8.5 kcal/mol) da thymidine 5'-monophosphate (dTMP), nucleotídeo que é convertido por essa enzima em thymidine 5'-diphosphate (dTDP) na presença de ATP e  $\text{Mg}^{2+}$  (SINHA; RULE, 2017). O Ebselen interagiu com PRO37, LEU51, PHE67, ARG92, TYR100 e TYR161, enquanto o dTMP se ligou a ASP13, PRO37, ARG39, PHE67, ARG71, ARG92, TYR100, GLU159 e TYR161. A presença do Ebselen no mesmo sítio de ligação e com energia de interação semelhante ao substrato natural da enzima pode indicar que ele atue competindo por esse sítio e prejudicando o funcionamento normal dessa enzima.

Figura 5 - Efeito do Ebselen (Eb) com Anfotericina B (ANB) e Micafugina (MICA), isolados e em combinação, sobre a biomassa e atividade metabólica dos biofilmes maduros de *Candida albicans* ( $n = 3$ ), *Candida parapsilosis* ( $n = 3$ ) e *Candida tropicalis* ( $n = 3$ ).



**Legenda:** (\*) indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), quando comparado o controle de crescimento (CC) do biofilme com as concentrações isoladas de micafugina (MICA) ou Anfotericina B (ANB) e em combinação (EB CIM/2, EB CIM/4 ou EB CIM/8). ( ) indicam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ), quando comparadas as concentrações isoladas de ANB e MICA contra o biofilme com as combinações subinibitórias do ebselen com ANB e MICA.

Figura 6 - Interação Molecular do Ebselen com a Timidilato quinase



**Legenda:** Resultados do docking molecular do Ebselen (azul) em comparação com compostos de referência (laranja) no alvo analisado. Os diagramas 2D destacam as interações químicas específicas de cada composto com os resíduos ativos da proteína. A thymidine 5'-monophosphate (dTMP) é o substrato natural da timidilato quinase e, por isso, foi utilizada como controle de interação com a enzima.

## 7 DISCUSSÃO

Os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) obtidos para o Ebselen variaram de 0,5 a 8 µg/mL contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*. Esses resultados são semelhantes aos observados na literatura para *Candida auris*, cujas CIMs em células planctônicas geralmente variaram de 0,5 a 2 µg/mL (BENELLI *et al.*, 2021; WALL *et al.*, 2018). Além disso, a eficácia do Ebselen foi demonstrada contra uma ampla gama de gêneros fúngicos, incluindo outras *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Trichosporon* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Pythium* spp. e *Sporothrix* spp., com valores de CIM variando entre 0,015 e 64 µg/mL (BENELLI *et al.*, 2021). Em contrapartida, valores de CIM superiores a 64 µg/mL foram relatados para fungos demáceos, como *Alternaria* spp. e *Botrytis* spp., e para dermatófitos, como *Microsporum* spp. (BENELLI *et al.*, 2021). Essas variações podem ser atribuídas a diferenças na composição da parede celular, nos mecanismos metabólicos e em fatores de virulência, como a formação de biofilmes, a produção de enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases e hemolisinas), a expressão de adesinas e a capacidade de transição morfológica entre levedura e hifa. (ROCHA *et al.*, 2021)

Quando combinado com antifúngicos clássicos, como Itraconazol, Fluconazol, Anfotericina B e Micafungina, o Ebselen, em concentrações subinibitórias (CIM/2, CIM/4 e CIM/8), demonstrou potencializar a atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *C.*



*tropicalis* e *C. parapsilosis* na forma planctônica, com interação sinérgica de 96% das combinações testadas. Dentre as 15 cepas avaliadas no presente estudo, 4 eram resistentes ao Fluconazol, 5 ao Itraconazol, enquanto todas foram sensíveis à Anfotericina B e à micafungina. Mesmo entre as cepas resistentes, a combinação com Ebselen reduziu significativamente as CIMs, evidenciando seu potencial adjuvante no combate a resistência antifúngica.

Comparando nossos achados com os resultados de Venturini *et al.* (2016), que relataram atividade *in vitro* do Ebselen isolado e em combinação com Anfotericina B e Voriconazol contra *Fusarium spp.*, observa-se uma consistência no alto índice de sinergia com Anfotericina B (88%) e Voriconazol (80%). No presente estudo, a associação de Ebselen com Anfotericina B e Micafungina demonstrou ser uma das combinações mais eficazes, apresentando sinergia expressiva em todas as concentrações subinibitórias testadas (CIM/2, CIM/4 e CIM/8). Tanto a Anfotericina B quanto a Micafungina exibiram 100% de sinergia em todas as concentrações subinibitórias. Para o Fluconazol, os índices de sinergia foram de 91% em CIM/2 e CIM/4, alcançando 100% em CIM/8. Já para o Itraconazol, a sinergia foi de 94% em CIM/2, 91% em CIM/4 e 100% em CIM/8. Esse resultado destaca a eficácia da combinação, o que corrobora a relevância do Ebselen como adjuvante.

Além disso, Wall *et al.* (2018) relataram sinergia das combinações de Ebselen com Fluconazol, Anfotericina B e Caspofungina contra 10 cepas de *C. auris* e uma cepa de *C. albicans* SC5314. No estudo, somente a combinação de Ebselen com Fluconazol contra a *C. albicans* apresentou um efeito sinérgico. Em contraste, no presente trabalho, a combinação do Ebselen com Fluconazol, Itraconazol, Anfotericina B e Micafungina foi testada em cepas clínicas sensíveis e resistentes de *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, demonstraram efeito sinérgico nas combinações das concentrações CIM/2 e CIM/4 e CIM/8, indicando a eficácia da associação, especialmente em concentrações subinibitórias de CIM/8.

Na análise de biofilme maduro, o Ebselen não apresentou interação combinatória promissora com Fluconazol ou Itraconazol contra os biofilmes, resultado semelhante observado por Wall *et al.* (2018) quando avaliou a combinação do ebselen e Fluconazol contra cepa de *C. auris* e uma cepa de *C. albicans* ATCC. Além disso, também não foi observado resultado de atividade metabólica significativa da combinação do ebselen com os dois azólicos, indicando baixa eficácia combinatória. Embora a Micafungina não tenha reduzido a biomassa, observou-se inibição significativa da atividade metabólica, sugerindo ação parcial sobre biofilmes. A falta de eficácia do Ebselen na redução da biomassa e da atividade metabólica do biofilme, quando

combinado com Fluconazol e Itraconazol, pode estar relacionada às características estruturais e funcionais do biofilme de *Candida* spp.. O Ebselen não possui um mecanismo direto de degradação da matriz extracelular, o que pode limitar sua ação nesses ambiente. Além disso, os azólicos atuam inibindo a síntese de ergosterol, mas sua eficácia depende da entrada da droga na célula fúngica, um processo dificultado pela matriz densa do biofilme, rica em polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular (VIEIRA; NASCIMENTO, 2017; VIEIRA; SANTOS, 2017). Outro fator que pode ter contribuído para a ausência de efeito na combinação do Ebselen com os azólicos é a elevada expressão de bombas de efluxo nos biofilmes, que removem os antifúngicos da célula e reduzem sua eficácia. Esse mecanismo de resistência é particularmente relevante para os azólicos, que são frequentemente expulsos da célula por essas bombas, diminuindo sua concentração intracelular e, consequentemente, sua ação antifúngica (VIEIRA; SANTOS, 2017).

Em contrapartida, a combinação de Ebselen com Anfotericina B demonstrou atividade antifúngica potencializada contra biofilmes maduros de *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, com redução significativa da biomassa e da atividade metabólica em todas as concentrações testadas (32 a 0,062 µg/mL), em comparação ao controle de crescimento. A análise estatística evidenciou que, nas concentrações de 2 µg/mL (CIM/4), 1 µg/mL (CIM/4 e CIM/8), 0,5 µg/mL (CIM/4 e CIM/8) e 0,25 µg/mL (CIM/4), a associação foi significativamente mais eficaz que a Anfotericina B isolada. Os efeitos mais expressivos foram observados nas concentrações de 1 e 0,5 µg/mL, sugerindo uma possível ação sinérgica em concentrações subinibitórias do Ebselen. Esses achados ressaltam a importância das concentrações subinibitórias, evidenciando que o Ebselen potencializa a ação da Anfotericina B em concentrações mais baixas, especialmente contra biofilmes. Diferentemente dos azólicos, a Anfotericina B se liga diretamente ao ergosterol, formando poros na membrana celular e desestabilizando a célula. Essa ação não apenas permite a saída de íons essenciais, mas também facilita a entrada do Ebselen, potencializando o estresse oxidativo nas células fúngicas. Além disso, Anfotericina B induz a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em *Candida*, *Cryptococcus* e *Trichosporon*, o que aumenta o efeito atividade do Ebselen frente as cepas (FERREIRA *et al.*, 2013; MESA-ARANGO *et al.*, 2014).

Esses resultados reforçam a potencialidade do Ebselen em associações terapêuticas para o tratamento de infecções fúngicas, especialmente em cenários de resistência. A sinergia observada não apenas amplia o espectro de atividade dos antifúngicos clássicos, mas também

permite a utilização de doses mais baixas, reduzindo a toxicidade do tratamento e minimizando o risco de desenvolvimento de resistência antimicrobiana. Em linha com os estudos de Venturini *et al.* (2016) e Wall *et al.* (2018), estes achados destacam a importância de explorar combinações de antifúngicos clássicos com o Ebselen, para prevenir e tratar infecções causadas por *Candida* spp..

Por outro lado, ao avaliar a combinação com Micafungina, os efeitos foram menos expressivos, com diferenças estatísticas observadas apenas quando analisada a atividade metabólica. Já as combinações de Ebselen com antifúngicos azólicos, como Fluconazol e Itraconazol, não apresentaram redução significativa na biomassa ou na atividade metabólica dos biofilmes. Isso sugere que o Ebselen exerce um efeito adjuvante mais eficaz quando associado a antifúngicos com mecanismos de ação distintos da inibição da síntese de ergosterol, como a Anfotericina B, que se liga ao ergosterol da membrana e forma poros, e a Micafungina, que inibe a 1,3- $\beta$ -glucanase.

Para complementar os resultados obtidos na avaliação contra biofilmes maduros, os achados desse estudo de Wall *et al.* (2018) corroboram os resultados do presente trabalho, evidenciando que o Fluconazol foi completamente ineficaz na inibição da formação de biofilmes de todas as cepas clínica de *C. auris* e a ATCC de *C. albicans* testadas. Por outro lado, a sinergia entre Ebselen e Anfotericina B contra biofilmes, demonstrada neste estudo, representa uma contribuição inédita e relevante para a área. Com isso, esses achados reforçam o potencial do Ebselen como adjuvante, especialmente em concentrações subinibitórias de Anfotericina B, sugerindo seu uso como uma alternativa promissora para o manejo de biofilmes resistentes.

Embora o mecanismo de ação antifúngica do Ebselen ainda não esteja completamente elucidado, estudos prévios sugerem múltiplos alvos potenciais. Thangamani *et al.* (2017) e Azad *et al.* (2014), ao investigarem *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. e *Saccharomyces cerevisiae*, indicaram que o Ebselen pode reduzir os níveis intracelulares de glutathione (GSH) nas células fúngicas, levando a um aumento significativo na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Essa desregulação da homeostase redox resulta em um estresse oxidativo insustentável, promovendo danos irreversíveis ao DNA e às proteínas celulares, culminando na morte fúngica.

Azad *et al.* (2012), em seu estudo, sugeriram que essas moléculas não atuam diretamente na membrana ou na parede celular dos fungos. Em vez disso, os resultados indicam que seu

mecanismo de ação pode envolver danos ao DNA das células fúngicas. Esse dano foi identificado por meio da técnica de espectroscopia de força, que revelou alterações significativas na estrutura do DNA fúngico, sugerindo uma possível interação direta com os ácidos nucleicos. Essa hipótese reforça que esses compostos podem induzir estresse oxidativo, resultando em danos ao DNA, ou interagir diretamente com proteínas nucleares, promovendo modificações estruturais que comprometem a sobrevivência e a reprodução dos fungos.

Já Quatrin *et al.* (2019), em outro estudo com compostos naturais de selênio, como o 4,3-selenocianato-1H-indol e o 5-bromo-3-selenocianato-1H-indol, avaliou sua atividade contra *Candida albicans* e *Trichophyton rubrum*. Os autores também sugeriram que esses compostos podem causar danos ao DNA, evidenciados por ensaio cometa, conhecido como ensaios de microgel, técnica utilizada para detectar quebras de fita simples ou dupla no DNA e avaliar danos genotóxicos. Esses achados reforçam o potencial desses compostos em induzir alterações no material genético das células fúngicas, o que pode estar associado à sua atividade antifúngica.

Os possíveis mecanismos de ação do Ebselen foram investigados tanto *in silico* por meio do *docking* molecular e correlacionado com os resultados *in vitro*, permitindo discutir sua eficácia em associação com antifúngicos e as diferenças observadas entre a forma planctônica e biofilmes. A avaliação do Ebselen em relação a alvos fúngicos, como a CYP51, a exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase e a timidilato quinase, pode revelar seu potencial de interação com diferentes vias metabólicas essenciais à viabilidade fúngica.

No estudo *in silico*, o Ebselen demonstrou interação com três alvos fúngicos: 14 $\alpha$ -desmetilase (CYP51), exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase e timidilato quinase, com energias de ligação de -7,8 kcal/mol, -8,1 kcal/mol e -8,5 kcal/mol, respectivamente. Na interação com a 14 $\alpha$ -desmetilase, o Ebselen se ligou a um sítio diferente do Fluconazol (-8,1 kcal/mol), com uma energia de ligação maior, sugerindo que seu efeito pode ser distinto do mecanismo de ação do Fluconazol, possivelmente desempenhando um papel secundário. Além disso, a interação do Ebselen com a exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase ocorreu fora do sítio ativo da laminarina (-6,5 kcal/mol), o que indica uma menor capacidade de competir diretamente com esse substrato.

Por outro lado, a timidilato quinase apresentou-se como um alvo promissor. O Ebselen foi capaz de se ligar ao mesmo sítio do substrato dTMP, com energia de interação semelhante (-8,5 kcal/mol). Essa interação sugere que o composto pode atuar como um inibidor competitivo dessa enzima, comprometendo a síntese de DNA fúngico (SINHA; RULE, 2017). Azad *et al.*

(2012) propuseram que o Ebselen também pode alterar proteínas nucleares em leveduras, resultando em danos ao DNA. A técnica de espectroscopia de força é considerada uma das mais avançadas para avaliar a interação de fármacos com o DNA e, quando combinada com a eletroforese em gel, complementa essa análise (QUATRIN *et al.*, 2019). Dessa forma, os resultados obtidos por docking, aliados às evidências presentes na literatura, sugerem que o mecanismo de ação do Ebselen como inibidor da timidilato quinase é promissor.

Embora ainda não aprovado pela FDA, o Ebselen tem demonstrado segurança e potencial terapêutico em ensaios clínicos. Estudos em pacientes com acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico agudo revelaram seu efeito neuroprotetor em doses de 300 mg/dia, com boa tolerância e sem efeitos adversos significativos comparados ao placebo. Ensaios clínicos de fase I confirmaram sua boa tolerabilidade, mesmo em doses elevadas de até 1600 mg, enquanto estudos de fase II demonstraram sua eficácia na prevenção da perda auditiva induzida por ruído em doses de até 800 mg/dia. Com alta absorção oral e excreção urinária limitada (11% da dose administrada), o Ebselen possui um perfil de segurança consistente, reforçando seu potencial como uma alternativa terapêutica promissora para diversas condições médicas (SILVA; RIO-TINTO, 2024; LENARDÃO; SANTI; SANCINETO, 2018).

## 8 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo evidenciam que o Ebselen apresenta atividade antifúngica promissora contra isolados clínicos de *Candida* spp. Além disso, sua associação com Fluconazol, Itraconazol, Anfotericina B e Micafungina resultou em interações sinérgicas na forma planctônica, reduzindo consideravelmente as CIMs e sugerindo seu potencial como adjuvante terapêutico.

No contexto de biofilmes, o Ebselen, quando combinado a antifúngicos azólicos, não exerceu efeito significativo. No entanto, sua associação com Anfotericina B reduziu de maneira expressiva a atividade metabólica dos biofilmes maduros, indicando um efeito potencializador nessa condição.

Os achados *in silico* forneceram suporte fortes direcionamentos para indicar o mecanismo de ação do Ebselen a inibição da Timidilato quinase, em particular, pode estar associada ao comprometimento da síntese de DNA e à consequente atividade antifúngica do composto.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-HAMID, R. M. *et al.* The impact of increasing non-albicans *Candida* trends on diagnostics in immunocompromised patients. **Brazilian journal of microbiology**, v. 54, n. 4, p. 2879–2892, 2023.

AHMED, N. *et al.* COVID-19-associated candidiasis: Possible patho-mechanism, predisposing factors, and prevention strategies. **Current microbiology**, v. 79, n. 5, p. 127, 2022.

ALABDALALL, A. H. Antifungal activity of Myrrh gum resin against pathogenic *Candida* spp. **Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM**, v. 31, n. 3, p. 340–344, 2024.

ALIYU, A. Effects of biofilm formation and plethora of *Candida* species causing ailments: a mini review. **Gadau Journal of Pure and Allied Sciences**, v. 1, n. 2, p. 200–210, 2022.

ALONSO-MONGE, R. *et al.* Morphogenetic transitions in the adaptation of *Candida albicans* to the mammalian gut. **Microbes and infection**, v. 26, n. 3, p. 105253, 2024.

ARAUJO, J. M. *et al.* Epidemiological assessment and risk factors for mortality of bloodstream infections by *Candida* sp. And the impact of the COVID-19 pandemic era. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 4, 2024.

**AutoDock Vina**: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, eficiente optimization, and multithreading. Disponível em <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.21334>.

**AutoDock Vina 1.2.0**: New Docking Methods, Expanded Force Field, and Python Bindings Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jcim.1c00203>.

AZAD, G. K. *et al.* Ebselen induces reactive oxygen species (ROS)-mediated cytotoxicity in *Saccharomyces cerevisiae* with inhibition of glutamate dehydrogenase being a target. **FEBS open bio**, v. 4, n. 1, p. 77–89, 2014.

AZAD, G. K. *et al.* Multifunctional Ebselen drug functions through the activation of DNA damage response and alterations in nuclear proteins. **Biochemical pharmacology**, v. 83, n. 2, p. 296–303, 2012.

BARROS, P. P. *et al.* *Candida* biofilms: An update on developmental mechanisms and therapeutic challenges. **Mycopathologia**, v. 185, n. 3, p. 415–424, 2020.

BAYS, D. J. *et al.* Epidemiology of invasive candidiasis. **Clinical epidemiology**, v. 16, p. 549–566, 2024.

BENCUROVA, E. *et al.* Identification of antifungal targets based on computer modeling. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 4, n. 3, p. 81, 2018.

BILAL, H. *et al.* Six-year retrospective analysis of epidemiology, risk factors, and antifungal susceptibilities of candidiasis from a tertiary care hospital in South China. **Microbiology spectrum**, v. 11, n. 4, p. e0070823, 2023.

BILLACK, B. *et al.* Evaluation of the antifungal and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase inhibitory action of Ebselen and two Ebselen analogs in *S. cerevisiae* cultures. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 25, n. 3, p. 312–317, 2010.

BHATTACHARYA, S.; SAE-TIA, S.; FRIES, B. C. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 6, p. 312, 2020.

BRANCO, J.; MIRANDA, I. M.; RODRIGUES, A. G. Candida parapsilosis virulence and antifungal resistance mechanisms: A comprehensive review of key determinants. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 1, p. 80, 2023.

BRANDT, M. E. Candida and Candidiasis. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 8, p. 876a–8876, 2002.

BRILHANTE, R. S. N.; VENDAS, J. A.; SILVA, M. L. Q.; OLIVEIRA, J. S.; PEREIRA, L. A.; PEREIRA-NETO, W. A.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; CASTELO-BRANCO, D. A. C. M.; ROCHA, M. F. G. Antifungal susceptibility and virulence of *Candida parapsilosis* species complex: an overview of their pathogenic potential. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, p. 903-914, 2018.

BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M. Rhamnolipid enhances *Burkholderia pseudomallei* biofilm susceptibility, disassembly and production of virulence factors. **Future Microbiology**, v. 15, n. 12, p. 1109-1121, 2020.

BUTTS, A.; KRYSAN, D. J. Antifungal drug discovery: something old and something new. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 9, p. e1002870, 2012.

CALDERONE, R.; CLANCY, C. J. **Candida and Candidiasis**. 2. ed. Washington, D.C., DC: American Society for Microbiology, 2011.

CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. **Biochemical pharmacology**, v. 133, p. 86–96, 2017.

CANTÓN, E.; PEMÁN, J.; GOBERNADO, M.; VIUDES, A.; ESPINEL-INGROFF, A. Synergistic Activities of Fluconazole and Voriconazole with Terbinafine against Four Candida Species Determined by Checkerboard, Time-Kill, and Etest Methods Downloaded from. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 49, n. 4, p. 1593–1596, 2005.

CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; BRILHANTE, R. S. N.; PAIVA, M. A. N.; TEIXEIRA, C. E. C.; CAETANO, E. P.; RIBEIRO, J. F.; CORDEIRO, R. A.; SIDRIM, J. J. C.; MONTEIRO, A. J.; ROCHA, M. F. G. Azole-resistant *Candida albicans* from a wild Brazilian porcupine (*Coendou prehensilis*): a sign of an environmental imbalance? **Med Mycol**, v. 51, n. 5, p. 555–560, 2013.

CASTELO-BRANCO, D. *et al.* Collateral consequences of agricultural fungicides on pathogenic yeasts: A One Health perspective to tackle azole resistance. **Mycoses**, v. 65, n. 3, p. 303–311, 2022.

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. Candida biofilms: Threats, challenges, and promising strategies. **Frontiers in medicine**, v. 5, p. 28, 2018.

CHAN, G. *et al.* Evaluation of the antimicrobial activity of Ebselen: role of the yeast plasma



membrane H<sup>+</sup>-ATPase. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 21, n. 5, p. 252–264, 2007.

CHEN, L.; XIE, Z.; JIAN, J. Epidemiology and risk factors of candidemia a 8-year retrospective study from a teaching hospital in China. **Infection and drug resistance**, v. 17, p. 3415–3423, 2024.

CHEN, Y. *et al.* Biofilm formation by *Candida tropicalis*: Clinical significance and therapeutic options. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 59, n. 8, p. 2023–2030, 2021.

CHOW, E. W. L.; PANG, L. M.; WANG, Y. From Jekyll to Hyde: The Yeast-Hyphal Transition of *Candida albicans*. **Pathogens**, v. 10, n. 7, p. 859, 2021.

CLANCY, C. J.; NGUYEN, M. H. Emergence of *Candida auris*: An International Call to Arms. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 64, n. 2, p. 141–143, 2017.

**Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; approved standard, 30th ed. CLSI document M100-S30. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2020.

**Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard. CLSI Document M27-A4. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.

**Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 2st ed. CLSI supplement M60. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.

COOKE, G. *et al.* Treatment for recurrent vulvovaginal candidiasis (thrush). **Cochrane database of systematic reviews**, v. 1, n. 1, p. CD009151, 2022.

CORREIA, E. F.; *et al.* Epidemiology and antifungal resistance patterns of *Candida* bloodstream isolates in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1345–1355, 2020.

CRUZ, G. S. *et al.* Candidíase vulvovaginal na Atenção Primária à Saúde: Diagnóstico e tratamento. **Revista Enfermagem Atual In Derme**, v. 94, n. 32, 2020.

FALCES-ROMERO, I. *et al.* Isolation of *Aspergillus* spp. in respiratory samples of patients with COVID-19 in a Spanish Tertiary Care Hospital. **Mycoses**, v. 63, n. 11, p. 1144–1148, 2020.

FERREIRA, G. F. *et al.* The role of oxidative and nitrosative bursts caused by azoles and amphotericin B against the fungal pathogen *Cryptococcus gattii*. **The journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 68, n. 8, p. 1801–1811, 2013.

FILATOVA, O. A. Independent acoustic variation of the higher- and lower-frequency components of biphonic calls can facilitate call recognition and social affiliation in killer whales. **PloS one**, v. 15, n. 7, p. e0236749, 2020.

FLOWERS, S. A. *et al.* Contribution of clinically derived mutations in *ERG11* to azole

resistance in *Candida albicans*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 450–460, 2015.

FRATINI, F.; MANCINI, S.; TURCHI, B.; FRISCIA, E.; PISTELLI, L.; GIUSTI, G.; CERRI, D. A novel interpretation of the Fractional Inhibitory Concentration Index: The case *Origanum vulgare* L. and *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst essential oils against *Staphylococcus aureus* strains. **Microbiological Research**, v. 195, 2017.

GAJENDRA KUMAR, A.; RAGHUVIR S, T. Ebselen, a promising antioxidant drug: mechanisms of action and targets of biological pathways. **Molecular biology reports**, v. 41, n. 8, p. 4865–4879, 2014.

GAO, Y. *et al.* The progress and future of the treatment of *Candida albicans* infections based on nanotechnology. **Journal of nanobiotechnology**, v. 22, n. 1, 2024.

GARLAND, M. *et al.* The clinical drug Ebselen attenuates inflammation and promotes microbiome recovery in mice after antibiotic treatment for CDI. **Cell reports. Medicine**, v. 1, n. 1, p. 100005, 2020.

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

HAINER, B. L. Dermatophyte infections. **American family physician**, v. 67, n. 1, p. 101–108, 2003.

HEREK, T. C. Formação De Biofilme in vitro Por Isolados Sanguíneos De *Candida Parapsilosis* Stricto Ssensu E *Candida Tropicalis*. 2024.

HOUŠŤ, J.; SPÍŽEK, J.; HAVLÍČEK, V. Antifungal drugs. **Metabolites**, v. 10, n. 3, p. 106, 2020.

JOAQUIM, A. R. *et al.* New 8-hydroxyquinoline derivatives highlight the potential of this class for treatment of fungal infections. **New journal of chemistry**, v. 45, n. 38, p. 18158–18170, 2021.

JORGENSEN, M. R. Pathophysiological microenvironments in oral candidiasis. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 132, n. 12, p. 956–973, 2024.

KARAMANOU, M. From Hippocrates to Galen: Earliest descriptions of fungal infections. **Journal of Medical Mycology**, v. 22, n. 4, p. 217–223, 2012.

KOTEY, F. C. *et al.* *Candida* bloodstream infections: Changes in epidemiology and increase in drug resistance. **Infectious diseases**, v. 14, p. 11786337211026927, 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.

KAUR, J.; NOBILE, C. J. Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. **Current opinion in microbiology**, v. 71, n. 102237, p. 102237, 2023.

LASS-FLÖRL, C.; STEIXNER, S. Corrigendum to “The changing epidemiology of fungal infections” [Mol. Aspect. Med. 94 (2023) 101215]. **Molecular aspects of medicine**, v. 95, p. 101240, 2024.

LENARDÃO, E. J.; SANTI, C.; SANCINETO, L. Bioactive organoselenium compounds and therapeutic perspectives. Em: **New Frontiers in Organoselenium Compounds**. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, p. 99–143, 2018.

LEONG, C. *et al.* Effect of zinc pyrithione shampoo treatment on skin commensal *Malassezia*. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 59, n. 2, p. 210–213, 2021.

LIMA E SILVA, A.; RIO-TINTO, A. Ebselen: A promising repurposing drug to treat infections caused by multidrug-resistant microorganisms. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2024, p. 9109041, 2024.

LIMA, R. *et al.* The emerging threat antifungal-resistant *Candida tropicalis* in humans, animals, and environment. **Frontiers in fungal biology**, v. 3, 2022.

LIU, Z. *et al.* Epidemiology of *Candida* infections in Asia: Prevalence and antifungal resistance patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 59, n. 7, p. 654–662, 2022.

LOPES, J. P.; LIONAKIS, M. S. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Virulence**, v. 13, n. 1, p. 89–121, 2022.

LORETO, É. S. *et al.* *In vitro* antifungal evaluation and structure-activity relationship of diphenyl diselenide and synthetic analogues. **Mycoses**, v. 54, p. 572–576, 2011.

LU, J. *et al.* Inhibition of bacterial thioredoxin reductase: an antibiotic mechanism targeting bacteria lacking glutathione. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 27, n. 4, p. 1394–1403, 2013.

LU, Q. *et al.* Ebselen, a multi-target compound: its effects on biological processes and diseases. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 23, n. e12, 2021.

MACKENZIE, L. F. *et al.* Identification of Glu-330 as the catalytic nucleophile of *Candida albicans* exo-beta-(1,3)-glucanase. **The journal of biological chemistry**, v. 272, n. 6, p. 3161–3167, 1997.

MAKLED, A. F. *et al.* Characterization of *Candida* species isolated from clinical specimens: insights into virulence traits, antifungal resistance and molecular profiles. **BMC microbiology**, v. 24, n. 1, p. 388, 2024.

MALINOVSKÁ, Z.; ČONKOVÁ, E.; VÁCZI, P. Biofilm formation in medically important *Candida* species. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 10, 2023.

MAREKOVIĆ, I. *et al.* Epidemiology of candidemia: Three-year results from a Croatian tertiary care hospital. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 7, n. 4, p. 267, 2021.

MARSHALL, A. C. *et al.* Structure, Mechanism, and Inhibition of *Aspergillus fumigatus* Thioredoxin Reductase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 3, 2019.

MAŚLANKA, M.; MUCHA, A. Antibacterial activity of Ebselen. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 2, p. 1610, 2023.

- MATTA, D.; SOUZA, A.; COLOMBO, A. Revisiting species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates from Latin American medical centers. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 3, n. 2, p. 24, 2017.
- MCCARTY, T. P.; WHITE, C. M.; PAPPAS, P. G. Candidemia and invasive candidiasis. **Infectious disease clinics of North America**, v. 35, n. 2, p. 389–413, 2021.
- MCDONOUGH, L. D. *et al.* *Candida albicans* isolates 529L and CHN1 exhibit stable colonization of the Murine gastrointestinal tract. **mBio**, v. 12, n. 6, 2021.
- MESA-ARANGO, A. C. *et al.* The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of Amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 11, p. 6627–6638, 2014.
- MILLSOP, J. W.; FAZEL, N. Oral candidiasis. **Clinics in dermatology**, v. 34, n. 4, p. 487–494, 2016.
- MITCHELL, A. P. Location, location, location: Use of CRISPR-Cas9 for genome editing in human pathogenic fungi. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 3, p. e1006209, 2017.
- MOHAMED, A. A.; LU, X.-L.; MOUNMIN, F. A. Diagnosis and treatment of esophageal candidiasis: Current updates. **Canadian journal of gastroenterology & hepatology**, v. 2019, p. 3585136, 2019.
- MOREIRA, F. *et al.* The rise of non-*albicans* *Candida* species in bloodstream infections in Brazil. **Brazilian Journal of Medical Mycology**, v. 35, n. 1, p. 56-63, 2021.
- MROCZYŃSKA, M.; BRILLOWSKA-DĄBROWSKA, A. Review on current status of echinocandins use. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 5, p. 227, 2020.
- NETT, J. E.; ANDES, D. R. Contributions of the biofilm matrix to *Candida* pathogenesis. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 1, p. 21, 2020.
- NISHIMOTO, A. T.; SHARMA, C.; ROGERS, P. D. Molecular and genetic basis of azole antifungal resistance in the opportunistic pathogenic fungus *Candida albicans*. **The journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 75, n. 2, p. 257–270, 2020.
- NOBLE, S. M.; GIANETTI, B. A.; WITCHLEY, J. N. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. **Nature reviews. Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 96–108, 2017.
- NOGUCHI, N. Ebselen, a useful tool for understanding cellular redox biology and a promising drug candidate for use in human diseases. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 595, p. 109–112, 2016.
- NOSENGO, N. Can you teach old drugs new tricks? **Nature**, v. 534, n. 7607, p. 314–316, 2016.
- ODDS, F. C. *et al.* *Candida* concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. **Journal of medical and veterinary mycology: bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 26, n. 5, p.

277–283, 1988.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1–1, 12 jun. 2003.

PASSOS, X. S. *et al.* Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp. bloodstream isolates from a Brazilian tertiary care hospital. **Mycopathologia**, v. 163, n. 3, p. 145–151, 2007.

PEREIRA, A. *et al.* Antifungal resistance in *Candida albicans*: A global challenge in medical mycology. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 77, n. 3, p. 749–757, 2022.

PEREIRA, R. *et al.* Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. **Journal of applied microbiology**, v. 131, n. 1, p. 11–22, 2021.

PÉREZ-CANTERO, A. *et al.* Analysis of the contribution of *cyp51* genes to azole resistance in *Aspergillus* section *Nigri* with the CRISPR-Cas9 technique. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 65, n. 5, 2021.

PERRINE-WALKER, F. Caspofungin resistance in *Candida albicans*: genetic factors and synergistic compounds for combination therapies. **Brazilian journal of microbiology**, v. 53, n. 3, p. 1101–1113, 2022.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 1, p. 133–163, 2007.

PIENTHONG, T. *et al.* Increase in the incidence of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* bloodstream infections during the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic. **Antimicrobial stewardship & healthcare epidemiology: ASHE**, v. 3, n. 1, p. e2, 2023.

POLIANSKYTE-PRAUSE, Z. *et al.* Ebselen enhances insulin sensitivity and decreases oxidative stress by inhibiting SHIP2 and protects from inflammation in diabetic mice. **International journal of biological sciences**, v. 18, n. 5, p. 1852–1864, 2022.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 25, n. 7, p. 792–798, 2019.

QUATRIN, P. M. *et al.* 3-Selenocyanate-indoles as new agents for the treatment of superficial and mucocutaneous infections. **New journal of chemistry**, v. 43, n. 2, p. 926–933, 2019.

QUEIROZ, K. Potencial de novos sistemas de liberação de drogas no manejo tópico da candidíase recorrente na mucosa vaginal. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**. Ano 06. v. 08, p. 194–211, 2021.

RAJ, S. *et al.* Epidemiology of *Candida* species causing candidemia in India: An insight into antifungal resistance. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 58–67, 2022.

RAO, H. H.; MCCLELLAND, E. E. A new overview of sex bias in fungal infections. **Journal of fungi** (Basel, Switzerland), v. 10, n. 9, p. 607, 2024.

ROCHA, M. F. G.; SALES, J. A.; ROCHA, M. G.; GALDINO, L. M.; AGUIAR, L.; PEREIRA-NETO, W. A.; CORDEIRO, R. A.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; SIDRIM, J. J. C.; BRILHANTE, R. S. N. Antifungal effects of the flavonoids kaempferol and quercetin: a possible alternative for the control of fungal biofilms. **Biofouling**, v. 35, 2019.

ROCHA, W. R. V. DA *et al.* Gênero *Candida* - Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e43910414283, 2021.

RODRIGUES, C. F.; RODRIGUES, M. E.; HENRIQUES, M. C. R. Promising alternative therapeutics for oral candidiasis. **Current medicinal chemistry**, v. 26, n. 14, p. 2515–2528, 2019.

RODRÍGUEZ-CERDEIRA, C. *et al.* Bioinformatics approaches applied to the discovery of antifungal peptides. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 3, p. 566, 2023.

ROY, S.; GOW, N. A. R. The role of the *Candida* biofilm matrix in drug and immune protection. **Cell surface (Amsterdam)**, v. 10, n. 100111, p. 100111, 2023.

SALAZAR, S. B. *et al.* An overview on conventional and non-conventional therapeutic approaches for the treatment of candidiasis and underlying resistance mechanisms in clinical strains. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 1, p. 23, 2020.

SALMANTON-GARCÍA, J. *et al.* Attributable mortality of candidemia – Results from the ECMM *Candida* III multinational European Observational Cohort Study. **The Journal of infection**, v. 89, n. 3, p. 106229, 2024.

SANDS, K. N.; BACK, T. G. Key steps and intermediates in the catalytic mechanism for the reduction of peroxides by the antioxidant Ebselen. **Tetrahedron**, v. 74, n. 38, p. 4959–4967, 2018.

SANTI, C. *et al.* Selenium containing compounds from poison to drug candidates: A review on the GPx-like activity. **Current chemical biology**, v. 7, n. 1, p. 25–36, 2013.

SANTI, C.; SCIMMI, C.; SANCINETO, L. Ebselen and analogues: Pharmacological properties and synthetic strategies for their preparation. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 26, n. 14, p. 4230, 2021.

SANTOLAYA, M. E. *et al.* Active surveillance of candidemia in children from Latin America: A key requirement for improving disease outcome. **The pediatric infectious disease journal**, v. 33, n. 2, p. e40–e44, 2014.

SANTOS, E. *et al.* Epidemiology of *Candida* bloodstream infections in Latin America: an update. **Revista Brasileira de Terapias Antimicrobianas**, v. 17, n. 3, p. 34-40, 2023.

SANTOS, M. M.; ISHIDA, K. We need to talk about *Candida tropicalis*: Virulence factors and survival mechanisms. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 61, n. 8, 2023.

SATORA, M. *et al.* Treatment of vulvovaginal candidiasis-an overview of guidelines and the latest treatment methods. **Journal of clinical medicine**, v. 12, n. 16, 2023.

SCHUSTER, M. G. Infections due to *Candida* species: Epidemiology, pathogenesis, and clinical features. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 1, p. 36–64, 2005.

SEARS, D.; SCHWARTZ, B. S. *Candida auris*: An emerging multidrug-resistant pathogen. **International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 63, p. 95–98, 2017.

SHI, H. *et al.* Ebselen induced C6 glioma cell death in oxygen and glucose deprivation. **Chemical research in toxicology**, v. 19, n. 5, p. 655–660, 2006.

SIDRIM, J. J. C.; OCADAQUE, C. J.; AMANDO, B. R.; GUEDES, G. M. M.; COSTA, C. L.; SILVA, A. L. E. A.; RIO-TINTO, A. Ebselen: A Promising Repurposing Drug to Treat Infections Caused by Multidrug-Resistant Microorganisms. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2024, p. 9109041, 2024.

SIGERA, L. S. M.; DENNING, D. W. Flucytosine and its clinical usage. **Therapeutic advances in infectious disease**, v. 10, p. 20499361231161387, 2023.

SINHA, K.; RULE, G. S. The structure of thymidylate kinase from *Candida albicans* reveals a unique structural element. **Biochemistry**, v. 56, n. 33, p. 4360–4370, 2017.

SILVA, S. *et al.* *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS microbiology reviews**, v. 36, n. 2, p. 288–305, 2012.

SINGH, N. *et al.* Effect of the putative lithium mimetic Ebselen on brain myo-inositol, sleep, and emotional processing in humans. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 7, p. 1768–1778, 2016.

SINHA, K.; RULE, G. S. The structure of *Thymidylate Kinase* from *candida albicans* reveals a unique structural element. **Biochemistry**, v. 56, n. 33, p. 4360–4370, 2017.

SONG, Y.-D. *et al.* *Candida tropicalis* RON1 is required for hyphal formation, biofilm development, and virulence but is dispensable for N-acetylglucosamine catabolism. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 59, n. 4, p. 379–391, 2021.

SORIANO, A. *et al.* Invasive candidiasis: current clinical challenges and unmet needs in adult populations. **The journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 78, n. 7, p. 1569–1585, 2023.

STEPANOVIĆ, S. *et al.* Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 115, n. 8, p. 891–899, 2007.

SULEYMAN, G.; ALANGADEN, G. J. Nosocomial fungal infections: Epidemiology, infection control, and prevention. **Infectious disease clinics of North America**, v. 35, n. 4, p. 1027–1053, 2021.

SUN, Z. *et al.* Vulvovaginal candidiasis and vaginal microflora interaction: Microflora changes and probiotic therapy. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 13, p. 1123026, 2023.

TAMO, S. P. B. Candida infections: Clinical features, diagnosis and treatment. **Infectious Diseases and Clinical Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 91–102, 2020.

TAVANTI, A., DAVIDSON, A. D., GOW, N. A. R., MAIDEN, M. C. J.; Odds, F. C. *Candida parapsilosis* isolates have variable *AFLP* fingerprints and karyotypes. **FEMS Yeast Research**, 5(2), 111–119, 2005.

THANGAMANI, S. *et al.* Ebselen exerts antifungal activity by regulating glutathione (GSH) and reactive oxygen species (ROS) production in fungal cells, **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, vol. 1861, n. 1, 2017.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.

VAN RHIJN, N. *et al.* CYP51 paralogue structure is associated with intrinsic azole resistance in fungi. **mBio**, v. 12, n. 5, p. e0194521, 2021.

VENTURINI, T. P. *et al.* Antifungal activities of diphenyl diselenide and ebselen alone and in combination with antifungal agents against *Fusarium* spp. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 54, n. 5, p. 550–555, 2016.

VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. I. DOS. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos Anfotericina B, Fluconazol e Caspofungina. **RBAC**, v. 49, n. 3, 2017.

VITÁLIS, E. *et al.* *Candida* biofilm production is associated with higher mortality in patients with candidaemia. **Mycoses**, v. 63, n. 4, p. 352–360, 2020.

WAGENER, J.; STRIEGLER, K.; WAGENER, N.  $\alpha$ - and  $\beta$ -1,3-glucan synthesis and remodeling. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 425, p. 53–82, 2020.

WALL, G. *et al.* Screening a repurposing library for inhibitors of multidrug-resistant *Candida auris* identifies Ebselen as a repositionable candidate for antifungal drug development. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 62 (10), 10-1128, 2018.

WHIBLEY, N.; GAFFEN, S. L. Beyond *Candida albicans*: Mechanisms of immunity to non-*albicans* *Candida* species. **Cytokine**, v. 76, n. 1, p. 42–52, 2015.

WHO. **fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action**, 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240060241>>. Acesso em: 16 out. 2024.

XIE, J. *et al.* N-acetylglucosamine induces white-to-opaque switching and mating in *Candida tropicalis*, providing new insights into adaptation and fungal sexual evolution. **Eukaryotic cell**, v. 11, n. 6, p. 773–782, 2012.

YAZDANI, M. *et al.* Prevalence of *Candida* species in bloodstream infections and antifungal resistance patterns. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 66, n. 5, p. 2505-2513, 2022.



YU, B. *et al.* Ebselen improves fungal keratitis through exerting anti-inflammation, anti-oxidative stress, and antifungal effects. **Redox biology**, v. 73, n. 103206, p. 103206, 2024.

ZEMBOWICZ, A. *et al.* Inhibition of endothelial nitric oxide synthase by Ebselen. Prevention by thiols suggests the inactivation by Ebselen of a critical thiol essential for the catalytic activity of nitric oxide synthase. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 267, n. 3, p. 1112–1118, 1993.

ZHANG, C. *et al.* Clinical manifestations and treatment of candidemia caused by different *Candida* species: a retrospective study. **BMC infectious diseases**, v. 24, n. 1, p. 1234, 2024.