

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE DERIVADOS DE SELENOCIANATOS ALÍLICOS  
SOBRE ESPÉCIES PATOGÊNICAS DE *CANDIDA***

LUANA CANDICE GENZ BAZANA

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Pozza Silveira

Porto Alegre

Agosto, 2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE DERIVADOS DE SELENOCIANATOS ALÍLICOS  
SOBRE ESPÉCIES PATOGÊNICAS DE *CANDIDA***

Luana Candice Genz Bazana  
Bacharela em Biomedicina

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestra em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia do Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria  
Coorientador: Gustavo Pozza Silveira

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil  
Agosto, 2018

### CIP - Catalogação na Publicação

Bazana, Luana Candice Genz  
Potencial antifúngico de derivados de  
Selenocianatos Alílicos sobre espécies patogênicas de  
Candida / Luana Candice Genz Bazana. -- 2018.  
84 f.  
Orientador: Alexandre Meneghello Fuentefria.

Coorientador: Gustavo Pozza Silveira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Agentes Antifúngicos. 2. Selenocianatos. 3.  
Candidas. 4. Infecções fúngicas. I. Fuentefria,  
Alexandre Meneghello, orient. II. Silveira, Gustavo  
Pozza, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

*“A cada dia que vivo mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca, e que, esquivando-se do sofrimento, perdemos também a felicidade. A dor é inevitável. O sofrimento é opcional.”*

Carlos Drummond de Andrade

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas que são a minha base, meus pais Leila e Luis, e minha irmã Lara. Obrigada pelo apoio, essa conquista também é de vocês.

## AGRADECIMENTOS

O caminho rumo à conclusão deste trabalho foi longo e ao mesmo tempo breve, contando com inúmeras mãos que de alguma forma contribuíram para que esta caminhada fosse mais leve e valiosa. Hoje quero agradecer a cada uma destas mãos. Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentesfria que me recebeu de braços abertos e confiou a mim esta oportunidade, agradeço também por todo conhecimento que partilhaste. Tu és um exemplo do líder, professor e grande amigo. Agradeço também ao Prof. Dr. Gustavo Pozza Silveira pela oportunidade, pelo suporte material e humano.

Também agradeço aos componentes da banca Saulo Fernandes de Andrade, Adelina Mezzari e Bruna Pippi por todas as contribuições feitas e pelo tempo demandado.

Agradeço a todos os colegas do laboratório de micologia aplicada, Paula, Bruna Batista, Priscila, Taís, Daiane, Bárbara, que sempre se colocaram a disposição em todas as horas, que compartilharam risos, cafés, diálogos, conhecimento, amizade e carinho. Vocês foram a minha segunda família. Em especial quero agradecer aos colegas Magda e Anderson por todas as sugestões e auxílio durante a construção deste trabalho, que foram de suma importância. Vanessa, Gabriella e Bruna Pippi quero agradecer por terem sido além de colegas, minhas parceiras e companheiras, por compartilharem comigo muitos momentos fora do laboratório, tenham sido estes de alegria ou tristeza. Enfim, agradeço a todos vocês, com quem pude contar em diversas fases da minha vida, todos vocês são muito especiais.

Agradeço também a todos os demais colegas e professores da pós-graduação, aos funcionários da UFRGS, aos professores de instituições parceiras que de alguma forma contribuíram na realização deste projeto e a CAPES pela concessão da bolsa.

Aos amigos de longa data que sempre estiveram vibrando com as minhas vitórias, torcendo pelo meu sucesso e estendendo as suas mãos quando caí. O apoio de vocês foi crucial nesta jornada.

A toda minha família que sempre me incentivou na busca pelos meus sonhos, que mesmo longe sempre esteve presente. Aos meus pais, Luis e Leila, por sempre me apoiarem nos momentos mais difíceis, por terem me ensinado desde muito cedo a ser independente e correr atrás do meu futuro, pela honestidade e educação, pelo amor e carinho. Agradeço a minha irmã pelas inúmeras chamadas de vídeo, pelas melodias tocadas na flauta e por sempre me esperar com o coração cheio de saudade. Agradeço aos meus avós, por se fazerem presentes e acompanharem os meus passos, pelas ligações e pelas comidinhas quando retornei para casa. Enfim, vocês todos são as pessoas mais importantes da minha vida, amo muito todos vocês!

# POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE DERIVADOS DE SELENOCIANATOS ALÍLICOS SOBRE ESPÉCIES PATOGÊNICAS DE *CANDIDA*<sup>1</sup>

Autor: Luana Candice Genz Bazana  
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentesfria  
Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Pozza Silveira

## RESUMO

Espécies de *Candida* são típicos agentes de infecções oportunistas de baixa a alta complexidade. No ambiente hospitalar, por exemplo, estão geralmente relacionadas a infecções sistêmicas em pacientes imunocomprometidos com altas taxas de mortalidade. Complexando esse cenário, o uso indiscriminado de antifúngicos acarretou nos últimos anos em altos índices de resistência, o que atualmente dificulta o êxito das estratégias terapêuticas. Em vista deste panorama, estudos empenhados no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos são um dos principais alvos da indústria farmacêutica na atualidade. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar uma série de 12 compostos derivados de selenocianatos alílicos (SA) sobre quatro espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*). Para tanto, foram determinadas as concentrações inibitória e fungicida mínima (CIM/CFM), os possíveis mecanismos de ação envolvidos e a cinética da ação destes SA. Paralelamente, foi também investigado o perfil de toxicidade das moléculas selecionadas. As moléculas de SA mostraram-se ativas sobre todas as cepas de *Candida* testadas. A CIM sobre as cepas alcançou atividade na ordem de nanogramas por mililitro e a CFM foi equivalente a CIM em 50% das cepas fúngicas avaliadas. Não foi constatada ação sobre a parede celular ou membrana citoplasmática fúngica, o que pode indicar uma classe de antifúngico com um diferente mecanismo de ação dos convencionais antifúngicos disponíveis na clínica médica. O perfil de toxicidade mostra que grande parte dos SA testados não exercem efeitos genotóxicos e citotóxicos sobre leucócitos humanos, além de ausência de alergenicidade. A cinética de ação demonstrou que SA 9 possui um efeito fungistático sobre as células fúngicas. Com base nos resultados encontrados neste estudo, podemos concluir que os SA são potenciais hits para o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos no combate das mais prevalentes espécies de *Candida*, sendo o composto 9 a entidade com melhor atividade inibitória em baixas concentrações, segurança toxicológica e bom perfil de biodisponibilidade.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (84 p.) agosto, 2018.

# ANTIFUNGAL POTENTIAL OF ALILIC SELENOCYANATE DERIVATIVES ON PATHOGENIC *CANDIDA* SPECIES<sup>1</sup>

Author: Luana Candice Genz Bazana  
Supervisor: Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria  
Co-supervisor: Prof. Dr. Gustavo Pozza Silveira

## ABSTRACT

*Candida* species are typical agents of opportunistic infections from low to high complexity. In the hospital environment, for example, they are usually related to systemic infections in immunocompromised patients with high mortality rates. Complexing this scenario, the indiscriminate use of antifungals has in recent years resulted in high levels of resistance, which currently hinders the success of therapeutic strategies. In view of this panorama, studies dedicated to the development of new antifungal agents are one of the main targets of the pharmaceutical industry today. In this sense, the main objective of this work was to evaluate a series of 12 compounds derived from allylic selenocyanates (AS) on four *Candida* species (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* and *C. krusei*). Therefore, the minimum inhibitory and fungicidal concentrations (MIC / MFC), the possible mechanisms of action involved and the kinetics of the action of these SA were determined. In parallel, the toxicity profile of the selected molecules was also investigated. AS molecules were active to all tested *Candida* strains. The MIC of the strains reached activity in the order of nanograms per milliliter and the CFM was equivalent to MIC in 50% of the evaluated fungal strains. No action was observed on the cell wall or fungal cytoplasmic membrane, which may indicate a class of antifungal with a different mechanism of action of the conventional antifungal available in the medical clinic. The toxicity profile show that a large part of the AS tested does not exert genotoxic and cytotoxic effects on human leukocytes, besides absence of allergenicity. The kinetics of action demonstrated that AS 9 has a fungistatic effect on fungal cells. Based on the results found in this study, we can conclude that AS are potential hits for the development of new antifungal agents in the fight against the most prevalent species of *Candida*, with compound 9 being the entity with the best inhibitory activity in low concentrations, toxicological safety and good bioavailability profile.

<sup>1</sup>Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (84 p.) august, 2018.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	18
	2.2 Objetivo Geral.....	18
	2.3 Objetivos Específicos.....	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
	3.1 <i>Candida</i> sp. e a epidemiologia de candidíase.....	19
	3.2 Candidíases e Candidemias.....	22
	3.3 Classificação dos agentes antifúngicos.....	24
	3.3.2 Azóis.....	25
	3.3.3 Equinocandinas.....	27
	3.4 Mecanismos de resistência de espécies de <i>Candida</i> aos antifúngicos..	29
	3.5 Desenvolvimento de novas moléculas com potencial antifúngico.....	30
	3.6 Derivados de selênio.....	32
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
	4.2 Cepas selecionadas para o estudo.....	35
	4.3 Compostos orgânicos investigados.....	35
	4.4 Preparo do inóculo fúngico para o teste de susceptibilidade.....	37
	4.5 Preparo das soluções de antifúngicos e dos derivados de selenocianatoa alílicos.....	38
	4.6 Teste de susceptibilidade fúngica.....	38
	4.7 Avaliação do ergosterol exógeno.....	39
	4.8 Avaliação do efeito protetivo do sorbitol.....	40
	4.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	40
	4.10 Teste de redução da resazurina.....	41
	4.11 Ensaio para avaliação de irritação em membrana cório-alantoide (HET- CAM).....	42

4.12	Ensaio de citotoxicidade em leucócitos humanos.....	42
4.12.1	Viabilidade celular.....	42
4.12.2	Avaliação de dano ao DNA (ensaio cometa).....	43
4.12.3	Teste de divisão nuclear citotóxica (frequência de micronúcleos).....	44
4.13	Determinação das curvas do tempo morte.....	44
4.14	Análise estatística.....	44
5	RESULTADOS.....	45
5.1	Susceptibilidade de <i>Candida</i> spp. frente aos selenocianatos.....	45
5.2	Avaliação da Concentração Fungicida Mínima.....	48
5.6	Teste de redução da resazurina.....	57
5.7	Ensaio de citotoxicidade em leucócitos humanos.....	57
5.7.1	Viabilidade celular.....	57
5.7.2	Frequência de micronúcleos.....	59
5.8	Teste de alergenicidade HET-CAM.....	59
6	DISCUSSÃO.....	62
7	CONCLUSÕES.....	70
8	PERSPECTIVAS.....	71
9	REFERÊNCIAS.....	72

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Classes de agentes antifúngicos recomendados para o tratamento de infecções ocasionadas por fungos leveduriformes e filamentosos.....	24
<b>TABELA 2:</b> Desenvolvimento de novas moléculas antifúngicas com potencial ação sobre fungos leveduriformes e filamentosos.....	32
<b>TABELA 3:</b> Cepas utilizadas para o desenvolvimento dos ensaios.....	35
<b>TABELA 4:</b> Derivados dos selenocianatos alílicos obtidos através da reação presente na figura 1 e suas características físico-química.....	36
<b>TABELA 5:</b> Perfil de susceptibilidade de quatro espécies de <i>Candida</i> frente a 12 compostos de selenocianatos alílicos e fármaco controle de acordo com a média, desvio padrão e intervalo.....	48
<b>TABELA 6:</b> Concentração fungicida mínima das quatro espécies de <i>Candida</i> frente aos 12 selenocianatos alílicos.....	49
<b>TABELA 7:</b> Avaliação do efeito protetivo de 0,8 M de sorbitol sobre espécies de <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. krusei</i> expostas a selenocianatos durante 48 horas e 7 dias.....	52
<b>TABELA 8:</b> Avaliação da capacidade de ligação dos compostos sobre o ergosterol exógeno ou presente na membrana celular fúngica de espécies de <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. krusei</i> .....	54

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esquema da reação entre brometo alílico e selenocianato de potássio, resultando em selenocianato alílico..	36
<b>Figura 2:</b> Média e desvio padrão das concentrações inibitórias mínimas de <i>Candida</i> spp. ( <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. krusei</i> ) frente aos 12 compostos de selenocianatos alílicos e fluconazol.	46
<b>Figura 3:</b> Fotomicrografias referentes à MEV de cepas de <i>C. albicans</i> e <i>C. glabrata</i> em concentrações sub-inibitória de SeCN-9.	56
<b>Figura 4:</b> Avaliação da viabilidade celular em leucócitos humanos tratados com selenocianatos alílicos.	57
<b>Figura 5:</b> Estudo do dano ao DNA ocasionado em leucócitos humanos após exposição aos selenocianatos alílicos.	58
<b>Figura 6:</b> Análise da frequência de micronúcleos encontrados em leucócitos humanos após exposição à selenocianatos alílicos.	59
<b>Figura 7:</b> Relação dose-resposta para selenocianatos alílicos 9 ao 12.	60
<b>Figura 8:</b> Curvas referentes ao tempo de morte de <i>Candida albicans</i> exposta a diferentes concentrações do SeCN-9.	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABC - *ATP-binding cassette*
- ABCL - Anfotericina B Complexo Lipídico
- AgNO<sub>3</sub> - Nitrato de Prata
- AmB - Anfotericina B desoxicolato
- AND - Anidulafungina
- ANOVA - *Analysis of variance*
- ATCC - *American Type Culture Collection*
- CDC - Candidíase disseminada crônica
- CFM - Concentração fúngica mínima
- CIM - Concentração inibitória mínima
- CLogP - Coeficiente de partição
- CLSI - *Clinical & Laboratory Standards Institute*
- CNA - *Candida não-albicans*
- CV - Candidíase vulvovaginal
- DMF - Dimetilformamida
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- EARI - Efeitos adversos relacionados à infusão
- EUA - Estados Unidos da América
- ERO - Espécies reativas de oxigênio
- FDA - *Food and Drug Administration*
- HET-CAM - *Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane*
- IFC - Instituto Federal Catarinense
- MEV - Microscopia eletrônica de varredura
- MMV - *Medicines for Malaria Venture*
- MOPS - Ácido 3-morfolinopropanosulfônico
- MSF - *Major facilitator superfamily*
- NaOH - Hidróxido de Sódio
- PBS - Tampão fosfato salino
- REA - Relação estrutura-atividade
- RNA - ácido ribonucleico

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*  
SDA - Ágar sabouraud dextrose  
SDD - Sensível Dose-Dependente.  
SeCN - Selenocianato  
SeNP - Nanopartículas de selênio  
TOXCEL - Grupo de Pesquisa em Toxicologia Celular  
UFC - Unidade formadora de colônia  
UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
UNIPAMPA - Universidade Federal do Pampa  
UTI - Unidades de terapia intensiva  
5-FC - 5-Fluorocitosina  
5-FU - 5-Fluoracil

## 1 INTRODUÇÃO

*Candida* sp. é um microrganismo comensal encontrado na microbiota de humanos e animais. Considerado um patógeno oportunista, é o principal gênero associado a infecções de difícil tratamento em imunocomprometidos, além de ocasionar candidíases em indivíduos saudáveis. As espécies *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* representam, atualmente, mais de 90% da incidência de infecção por este gênero e são os principais alvos da maioria dos antifúngicos. Embora *C. albicans* represente a espécie mais isolada em candidíases, nas últimas décadas tem-se observado uma mudança epidemiológica que revela um aumento no número de infecções ocasionadas por espécies não-*albicans* (Spampinato & Leonardi, 2013; Ng et al., 2015; Moazeni et al., 2018). Essa mudança está relacionada principalmente ao aumento do número de indivíduos imunocomprometidos, bem como o uso de imunossupressores, quimioterápicos, antimicrobianos, acesso venoso central, procedimentos cirúrgicos invasivos, nutrição parenteral, uso profilático e indiscriminado de antifúngicos (Dadar et al., 2018).

Esses fatores favorecem a adaptação e evolução de isolados resistentes e menos suscetíveis aos tratamentos disponíveis na clínica médica o que acaba por ocasionar a falha terapêutica (Wiederhold, 2017). Este cenário revela um importante problema de saúde pública especialmente nos casos de infecções invasivas, uma vez que são relatadas altas taxas de morbidade e mortalidade (cerca de 50%), representando um grande desafio para o êxito das estratégias terapêuticas, além de dispendiosos custos e prolongamento do tempo de internação (Lockhart, 2014; Jahagirdar et al., 2018).

Atualmente, diversos antifúngicos estão disponíveis para o tratamento destas infecções, porém os mais utilizados e recomendados apresentam importantes reações adversas, como é o caso da anfotericina B e sua ação nefrotóxica (Kyriakidis et al., 2017; Laniado-Laborín & Cabrales-Vargas, 2009; Stanzani et al., 2017; Yamazaki et al., 2018). Por outro lado, antifúngicos tais como o fluconazol, possibilitam o desenvolvimento de resistência adaptativa devido a sua ação fungistática (Huang & Kao, 2012), e as equinocandinas estão disponíveis apenas para administração intravenosa (Kofla & Ruhnke, 2011). Diante destes fatos, há notável

necessidade em pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos com diferentes estruturas químicas e mecanismos de ação para um tratamento seguro e eficaz destas doenças.

Neste contexto, compostos derivados de selenocianatos têm emergido com seu potencial antimicrobiano, relatando ação frente a fungos filamentosos (Batista et al., 2017), bactérias (Burghout et al., 2011; Huang et al., 2018; Sá et al., 2014), micobactérias (Silveira et al., 2012), leishmania (Iman et al., 2016; Baquedano et al., 2016; Plano et al., 2011), trypanossoma (Chao et al., 2017), além de estudos avaliando seu potencial antioxidante (Chakraborty et al., 2016) e antitumoral (Tew & Galli, 2017; Abed et al., 2015; Saha et al., 2011; Facompre et al., 2010; Naithani, 2008).

Mediante estes estudos questionou-se a atividade de compostos derivados de selenocianatos alílicos sobre espécies patogênicas de leveduras do gênero *Candida*, bem como os seus possíveis mecanismos de ação, efeitos citotóxicos e alergênicos. Este estudo teve a finalidade de descobrir um novo e promissor agente antifúngico visando o avanço de recursos terapêuticos disponíveis atualmente para o tratamento de candidíases.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Caracterizar o potencial anti-*Candida* de compostos sintéticos pertencentes à classe dos selenocianatos alílicos.

### 2.2 Objetivos Específicos

a) Estudar a susceptibilidade de 36 cepas, entre sensíveis e resistentes ao fluconazol, pertencentes às espécies de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* frente a 12 compostos derivados de selenocianato alílico.

b) Determinar a relação estrutura-atividade (REA) das moléculas frente às cepas estudadas, possibilitando o melhor entendimento das modificações estruturais e seu desempenho em relação ao potencial fungitóxico.

c) Avaliar o tempo de ação do composto que desempenhar o melhor potencial antifúngico, bem como a sua cinética sobre as células fúngicas.

d) Investigar os possíveis mecanismos de ação das moléculas mais efetivas, observando sua interação em relação à membrana e parede celular fúngica.

e) Avaliar o perfil de toxicidade e alergenicidade das 12 moléculas, com o intuito de conhecer a segurança do seu uso clínico.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 *Candida* sp. e a epidemiologia de candidíase

*Candida* sp. é um microrganismo eucarioto ubíquo, amplamente distribuído no ambiente e constituído por cerca de 150 espécies (Silva et al., 2012), das quais aproximadamente 40 estão ligadas a humanos (Criseo et al., 2015). Nesses, é um saprofítico comum, encontrado principalmente na cavidade oral, região genital, trato gastrointestinal e pele (Dantas et al., 2016; Sun & Dudeja, 2018).

No entanto, ainda que saprofítico, em alguns momentos pode comportar-se como oportunista induzido por alterações do sistema imune do hospedeiro (Papon et al., 2013; Spampinato & Leonardi 2013), já que em um processo infeccioso, as células fúngicas secretam enzimas hidrolíticas (lipases, proteases, fosfolipases) utilizadas para invadir células hospedeiras e adesinas que permitem a sua adesão em superfícies bióticas ou abióticas, tais como implantes médicos e cateteres formando biofilme (Richardson et al., 2018). Assim, são capazes de manipular a resposta imune do hospedeiro para sua evasão (Chaffin, 2008; Gow & Yadav, 2017; Braunsdorf & LeibundGut-Landmann, 2018).

Mundialmente, *Candida* spp. pode ocasionar diferentes tipos de infecções, tais como: candidíase cutânea, orofaríngea, esofágica, candidíase do trato respiratório, urinário, do sistema nervoso central, vulvovaginal, abdominal, ocular, cardíaca, endovascular, candidíase disseminada e candidemia. Entre as recorrentes, destacam-se as apresentações mucocutânea e invasiva (Sobel, 2015). E, dentre os principais fatores envolvidos, estão a antibioticoterapia prolongada, dispositivos de acesso central vascular, procedimentos cirúrgicos, queimaduras extensivas, neutropenia, nutrição parenteral, cateter urinário, malignidade hematológicas, quimioterapia, prematuridade, entre outros (Abu-Elteen & Hamad, 2012; Mora-Montes & Lopes-Bezerra, 2017).

No caso das candidemias, apenas 5 espécies (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*) são responsáveis por 92% delas (Mora-Montes & Lopes-Bezerra, 2017). Em um âmbito mundial, as infecções por *Candida* sp. mostram diferentes padrões de incidência em diferentes regiões, pois variam de acordo com as condições climáticas, sociais e econômicas de cada país (Vallabhaneni et al., 2016). Como é o caso, por exemplo, do Paquistão, onde foram relatados 21

casos para cada 100.000 habitantes, destacando-se como o país de maior prevalência desse acometimento. O Brasil foi o segundo a exibir casos de candidemia (14,9 casos em 100.000), seguido pela Rússia (8,29 casos em 100.000). Por outro lado, os menores índices foram relatados pela Jamaica que exibiu cinco casos em cada 100.000, seguido pela Áustria (2,1 em 100.000) e Portugal (2,2 casos em 100.000) (Bongomin et al., 2017).

As razões para estas diferenças são multifatoriais e podem ser atribuídas à diferença de população de pacientes, recursos disponíveis para cuidados médicos e treinamentos, além de dificuldade na implementação de programas de controle de infecção hospitalar e diferentes metodologias de vigilância (Vallabhaneni et al., 2016). Em relação à candidíase invasiva, uma estimativa global recente relata que ocorrem cerca de 700.000 casos por ano, sendo *Candida albicans* o principal agente etiológico associado a candidíase invasiva no mundo, porém está sendo observado um aumento de casos envolvendo espécies não-*albicans* (*C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. inconspícua*, *C. bracarensis*, *C. famata*, e recentemente *C. auris*) (Martins et al., 2014; Mora-Montes & Lopes-Bezerra, 2017). Estas são mais propensas a apresentarem resistência aos antifúngicos, principalmente fluconazol, o qual possui importante papel no tratamento e profilaxia dessas infecções em vários continentes (Bongomin et al., 2017).

Nucci et al. (2010) abordam a incidência de infecções invasivas em centros de tratamento do hemisfério norte: EUA – 0,28 a 0,96 em 1000 admissões hospitalares, Canadá - 0,45, Europa – 0,20 a 0,38, França – 0,17, Noruega – 0,17, Hungria – 0,20 a 0,40, Suíça – 0,27, Itália – 0,38 e Espanha – 0,76 a 0,81. No Brasil, Doi et al. (2016) realizaram um estudo multicêntrico de vigilância em 16 hospitais entre os meses de junho de 2007 a março de 2010 e relataram que *Candida* sp. foi o sétimo microrganismo mais prevalente, sendo que 65,4% dos isolados eram espécies não-*albicans*.

Guinea (2014) relata que alguns países do norte europeu e Estados Unidos apresentam um grande número de infecções causadas por *C. glabrata* e baixo índice de *C. parapsilosis*. Em contraste, hospitais brasileiros relatam poucos casos de infecções atribuídas à *C. glabrata* e alto índice de infecções ocasionadas por *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (Doi et al., 2016). As diferenças na distribuição das espécies de *Candida* nas diferentes partes do mundo podem estar ligadas a

imunossupressão, enfermidades, prematuridade, exposição a antibióticos de amplo espectro, idade avançada, uso profilático de antifúngicos e presença de cateter intravenoso (Mora-Montes & Lopes-Bezerra, 2017).

*C. albicans* é indubitavelmente a espécie mais abundante presente na microbiota dos seres humanos e um dos fatores de virulência mais importantes ligados a essa espécie é a transição de levedura para hifa (Calderone & Cancy, 2012; Noble et al., 2017). Esse dimorfismo se torna crucial para a invasão e infecção do tecido, sendo já relatado que cepas mutantes incapazes de desenvolverem filamentos tornaram-se avirulentas (Lo et al., 1997). Além de leveduras, pseudo-hifas e hifas, *C. albicans* é capaz de produzir clamidósporos em condições de estresse e abstenção de nutrientes (Calderone & Cancy, 2012).

Por outro lado, *C. glabrata* assume a posição de segunda causa mais comum de candidemia, sendo relatada como a espécie mais prevalente isolada em infecções da mucosa oral e vaginal, nos Estados Unidos da América e outros países europeus (Kurtzman et al., 2010; Sampaio & Pais, 2014). O tratamento de infecções ocasionadas por essa espécie é complexo devido a sua característica intrínseca aos azóis, além de possuir alta capacidade de adaptação quando exposta a antifúngicos fungistáticos. Apresenta-se principalmente sob a forma leveduriforme, embora haja relato de dimorfismo quando privadas de fonte de nitrogênio (Csank & Haynes 2000; Kaur et al., 2005) portanto, sua patogenicidade parece ser independente de sua morfologia celular (Roy & Thompson, 2015). É considerada uma das espécies mais resistentes, podendo sobreviver em superfícies inanimadas por cerca de 5 meses, além de colonizar tecidos e superfícies abióticas formando biofilme (Rodrigues et al., 2014).

*Candida tropicalis* é considerada o terceiro patógeno mais isolado em hemoculturas e uroculturas, é frequentemente encontrada em pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTI), especialmente em pacientes que necessitam de cateterismo prolongado devido à quimioterapia ou antibioticoterapia de amplo espectro. Além disso, *C. tropicalis* pode exibir maior capacidade de disseminação em indivíduos neutropênicos em comparação às demais espécies de *Candida* spp. (Silva et al., 2012).

*C. krusei* embora não seja a espécie mais comumente isolada, é um importante patógeno, pois é intrinsecamente resistente ao fluconazol, sendo que seu

mecanismo de resistência permanece não completamente elucidado (Whaley et al., 2017). Já a *C. parapsilosis* é separada em três espécies distintas: *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* e *C. orthopsilosis* (Neji et al., 2017). Nas últimas décadas sua incidência aumentou drasticamente e atualmente é considerada a segunda espécie de *Candida* mais isolada em hemoculturas, devido a sua capacidade de crescimento em soluções de hiperalimentação, além de alta afinidade de crescimento em dispositivos intravasculares e próteses (Silva et al., 2012).

### **3.2 Candidíases e Candidemias**

Em crianças, a candidíase cutânea primária manifesta-se por erupções cutâneas difusas, de prurido generalizado, podendo acometer o tronco, tórax, região anal, axilas, mãos e pés. Essas erupções começam como vesículas individuais que se rompem causando fissuras, espalhando-se pelo tecido. Lesões satélites são frequentemente encontradas. Os locais onde os tecidos estejam próximos e forneçam um ambiente quente e úmido são propícios para o desenvolvimento de tais infecções (Sobel, 2015). Nos casos de candidíase mucocutânea crônica, os indivíduos apresentam manifestações clínicas na infância ou durante as duas primeiras décadas de vida. Essas infecções crônicas e recorrentes acometem a pele, cabelos, unhas e mucosas, possuem um curso prolongado, podendo resultar em formas desfiguradas chamadas de granuloma (Green & Dolen, 2017). Esses pacientes raramente apresentam a forma disseminada da infecção. Essa condição é associada com frequência a endocrinopatias (doença de Addison, hipotireoidismo, hipoparatiroidismo e diabetes) e indivíduos imunocomprometidos (Khosravi et al., 2018).

As infecções mucocutâneas ocasionadas pelo gênero *Candida* que acometem as unhas resultam na paroníquia, a qual é caracterizada por lesões dolorosas e eritematosas ao redor/sob as unhas e leitos ungueais. Está frequentemente associada à constante imersão das mãos em água e é muito frequente em diabéticos (Schlosserg, 2015).

A candidíase vulvovaginal (CV) é considerada a infecção mucocutânea mais frequente. É caracterizada pela infecção superficial das paredes vaginais desencadeando leucorréia, prurido e dor, principalmente ao urinar (Chew & Than,

2016). Estima-se que ao longo da vida, uma a cada duas mulheres apresentarão um episódio (Blostein et al., 2017). Nesse tipo de infecção, *Candida albicans* é o principal agente etiológico, no entanto, o número de episódios ocasionados por CNA têm aumentado significativamente nos últimos anos, relevando uma maior incidência de *C. glabrata* (Gonçalves et al., 2016). Em homens, a glândula ou sulco coronal também podem ser acometidos por *C. albicans* resultando na balanite que pode espalhar-se pelas áreas inguinais (Kaushik et al., 2015; Rajiah et al., 2012).

A candidíase oral é uma das infecções mais populares da cavidade bucal, provoca sensação de queimação, ardência, boca seca, mau gosto e perda do paladar (Zhou et al., 2018). Em geral, atinge grande parte de pacientes idosos usuários de próteses dentárias, imunodeprimidos, diabéticos e neutropênicos (Meira et al., 2017). Pode alcançar a faringe e em casos mais graves e estender-se até o esôfago (Kaushik et al., 2015). A manifestação geralmente acontece de forma assintomática, caracterizada por placas brancas na língua, embora possa ocorrer ardência ou dor ao ingerir comidas temperadas e ácidas (Meira et al., 2017).

Por outro lado, a candidíase esofágica é considerada causa mais comum de esofagite infecciosa. Manifesta-se por disfagia ou odinofagia, dor retroesternal acompanhada ou não de candidíase oral, está correlacionada a imunossuprimidos, diabéticos, idade avançada e antibioticoterapia de amplo espectro (Alsomali et al., 2017). Nos casos de candidemia, as manifestações clínicas são a presença de febre e a não resposta aos antifúngicos em pacientes de risco. A febre tem início insidioso, e pode estar acompanhada ou não de calafrio, mialgia, hipotensão e taquicardia, até hipotermia e outros sintomas de sepse (Colombo et al., 2013).

Candidemias também podem manifestar as formas invasiva e metastática sistêmica. Quando diagnosticada, o exame físico geral dificilmente revela sinais clínicos de disseminação. O uso de cateter venoso central é a principal fonte desse tipo de infecção e a taxa de mortalidade relatada é de 40-60% variando de acordo com as condições epidemiológicas (Sobel, 2015). A candidíase disseminada crônica (CDC), em geral acomete pacientes com neutropenia grave e persistente (devido a transplante de células estaminais e leucemia aguda, por exemplo) (Schlosserg, 2015).

Outras formas de candidíase invasiva também são relatadas como: endocardite, infecção do sistema nervoso central, candidíase gastrointestinal, candidíase ocular, infecção dos ossos e tecidos moles, candidíase do trato respiratório

e infecções geniturinárias ocasionadas por *Candida* (O’Leary et al., 2018).

### 3.3 Classificação dos agentes antifúngicos

Atualmente as principais classes de agentes antifúngicos disponíveis no mercado consistem em polienos, azóis e equinocandinas (Tabela 1).

**TABELA 1:** Classes de agentes antifúngicos recomendados para o tratamento de infecções ocasionadas por fungos leveduriformes.

Classe	Antifúngico	Mecanismo de ação
Azóis	Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol e Posaconazol	Bloqueadores da $\alpha$ -14-demetilase
Polienos	Anfotericina B (AmB), Anfotericina B Lipossomal (AmB-L), Anfotericina B Complexo Lipídico (ABCL), Natamicina e Nistatina	Ligação ao ergosterol, formação de poros e lise celular
Equinocandinas	Caspofungina, Anidulafungina e Micafungina	Inibidores da síntese de 1, 3 – $\beta$ – Glucano
Análogos da Pirimidina	5-Fluorocitosina (5-FC) e 5-Fluoracil (5-FU)	Inibidores da síntese de DNA

Fonte: Adaptada de Schlosserg (2015).

#### 3.3.1 Poliênos

Os poliênos foram os primeiros fármacos antifúngicos de uso clínico, são fungicidas e de amplo espectro atuando sobre fungos filamentosos, dimórficos e leveduriformes (Nett & Andes, 2016). E, dentre eles estão a nistatina, natamicina e Anfotericina B desoxicolato (AmB). Estes por sua vez, são fármacos de origem natural obtidos através dos actinomicetos: *Streptomyces noursei*, *S. natalensis* e *S. nodosum*, respectivamente.

A AmB possui estrutura anfifílica e atua ligando-se à bicamada lipídica da membrana celular. Seu mecanismo de ação é caracterizado pela interação de oito das

suas moléculas com 8 moléculas de ergosterol formando um canal. Quando dois destes canais se unem, resultam em um poro que atravessa a membrana. Esses poros rompem e desestruturam a célula, ocasionando o extravasamento do conteúdo e morte celular (Bellmann & Smuszkiewicz, 2017). Também podem atuar ligando-se ao ergosterol onde formam uma estrutura extramembranosa espongiforme culminando na morte celular (Campoy & Adrio, 2017).

AmB possui outras duas formulações de base lipídica, AmB – Lipossomal (AmB-L) e AmB Complexo Lipídico (ABCL) com a finalidade de melhorar sua entrada na célula fúngica e diminuir os efeitos tóxicos que muitas vezes limitam o seu uso (Stone et al., 2016; Adler-Moore et al., 2016). Os efeitos adversos relacionados à infusão (EARI) amplamente observados são calafrio, hipo ou hipertensão, náuseas, vômitos, hipocalemia, febre, hipóxia, rigidez e em alguns casos fibrilação ventricular, além da deterioração da função renal observada em cerca de 80% dos pacientes tratados com AmB (Bellmann & Smuszkiewicz, 2017; Laniado-Laborín & Cabrales-Vargas, 2009).

Nistatina é comumente utilizada para o tratamento de candidíase cutânea, vaginal e esofágica, e a natamicina é empregada em casos de ceratite fúngica. Ambas são utilizadas para tratamento tópico devido a sua baixa absorção no intestino e alta toxicidade (Prasad, 2017; Malayeri et al., 2018).

### **3.3.2 Azóis**

Os azóis são antifúngicos constituídos por moléculas orgânicas amplamente utilizadas na clínica médica para fins de prevenção e tratamento, inibem um amplo espectro de espécies fúngicas, mas apresentam algumas limitações para fungos filamentosos e espécies intrinsecamente resistentes (Scorzoni et al., 2017). Atuam na inibição da enzima lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilase, codificada pelo gene *ERG11*, responsável por converter o lanosterol em ergosterol presente na membrana celular, impedindo o crescimento e replicação celular (Nett & Andes, 2016; François et al., 2006).

Os azóis podem ser classificados em dois grupos, imidazóis e triazóis. Os imidazóis (clotrimazol, miconazol, cetoconazol) foram a primeira linha de antifúngicos azólicos que surgiram, porém, sua alta toxicidade, efeitos colaterais e interações medicamentosas no uso sistêmico levaram a substituição pelos triazóis, e passaram

a ser usados em formulações tópicas (Prasad, 2017). A primeira geração de triazóis foi composta por itraconazol e fluconazol, ambos com ampla atividade e segurança. Entretanto, ambos apresentam ação limitada sobre espécies emergentes como *Scedosporium*, *Fusarium* e *Mucorales*. A segunda geração de triazóis é representada pelo voriconazol (2002) e posaconazol (2006). Estes exibem amplo espectro de ação, incluindo *Fusarium*, *Zygomycetos* e *Cryptococcus*, e ação fungicida. Voriconazol tornou-se tratamento de primeira linha para aspergilose invasiva (Nett & Andes, 2016; Peyton et al., 2015).

Fluconazol é o antifúngico de preferência entre os triazóis devido a sua excelente biodisponibilidade, tolerância e segurança. Ambas as formulações são disponíveis, oral (sua absorção não é prejudicada pelo suco gástrico) e intravenosa. Este fármaco possui excelente penetração no líquido cefalorraquidiano (Bafeltowska & Buszman, 2005). É principalmente indicado para o tratamento de candidíase esofágica, do trato urogenital, vulvovaginal e candidemia. Também é indicado como tratamento profilático em pacientes que passaram por transplante de medula óssea (Carmona & Limper, 2017; Richardson et al., 1990).

Itraconazol surge com amplo espectro em relação ao fluconazol, porém, não é ativo contra espécies de *Fusarium* ou zigomicetos. É disponível em solução oral e cápsulas, sua formulação para administração intravenosa foi retirada em 2007 devido à toxicidade cardíaca. Não consegue atingir o líquido cefalorraquidiano e sua biodisponibilidade é baixa. Atualmente, permanece sendo utilizado no tratamento de pacientes acometidos por infecções de fungos dimórficos, incluindo coccidiomicose, blastomicose e histoplasmose (Lestner & Hope, 2013; Hurlé et al., 2006). A segunda geração de triazóis é marcada pelo melhor desempenho farmacocinético e menores interações medicamentosas (Peyton et al., 2015).

O voriconazol possui formulação oral e intravenosa, sendo a forma oral de alta biodisponibilidade e são capazes de penetrar no líquido (Palmisani et al., 2017). Seu espectro de ação é mais amplo em relação à primeira geração, abrangendo espécies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Scedosporium* e *Aspergillus*, porém não é ativo para zigomicetos, contrário ao posaconazol que possui atividade (Chang et al., 2017).

Posaconazol inicialmente era apenas disponível na forma de solução oral, porém já conta com a forma de comprimidos, sendo estes de liberação lenta, melhor

absorção, e presença prolongada no plasma. Este fármaco tem sido aplicado como profilaxia em pacientes de alto risco por neutropenia prolongada, leucemia mieloide aguda, pós-transplante, e também em casos infecções fúngicas por fungos filamentosos (Clark et al., 2015). Atualmente posaconazol injetável está em fase clínica 3 no tratamento de aspergilose invasiva, e sua conclusão está prevista para 2018 (Bustamante et al., 2017; Farowski et al., 2007).

Recentemente o uso do isavuconazol foi aprovado nos Estados Unidos e União Européia para o tratamento intravenoso e oral de mucormicose e aspergilose invasiva (Jenks et al., 2018; Donnelley et al., 2016). Devido ao caráter fungistático da grande maioria dos triazóis, observa-se o crescente desenvolvimento de resistência extrínseca e cruzada dos fungos a estas drogas, como exemplo *C. glabrata*, *C. krusei* e *Aspergillus fumigattus* para fluconazol (Campoy & Adrio, 2017).

### 3.3.3 Equinocandinas

As equinocandinas por sua vez são uma classe lipopeptídeos sintéticos que possuem alvo seletivo para a parede celular fúngica, não agindo sobre as células humanas, o que os tornam seguros e com poucos efeitos colaterais em comparação aos demais antifúngicos como a Anfotericina B (Patil & Majumdar, 2017). Estes compostos atuam como inibidores não competitivos do complexo enzimático  $\beta$ -(1,3)-D-Glicano sintase que se ligam à subunidade Fsk1 bloqueando a produção de  $\beta$ -1,3-Glicano, um dos principais componentes da parede celular fúngica. Dessa forma ocorre a ruptura das estruturas da parede celular em crescimento, fragilizando a célula devido à instabilidade osmótica, resultando na morte celular (Sanguinetti et al., 2015).

Possuem ação fungicida contra espécies de *Candida* e *Saccharomyces*, contudo, desempenha ação fungistática em espécies de *Aspergillus*. Essa diferença no modo de atuação do fármaco é atribuída às variações morfológicas e fenotípicas dos fungos relativo ao conteúdo de glicano presente na célula. Não são ativas para os gêneros *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Trichosporon*, *Rhodotorula* e *Scedosporium* (Perlin et al., 2017).

Micafungina, caspofungina e anidulafungina, possuem basicamente as mesmas características em relação ao mecanismo de ação, farmacocinética e efeitos adversos. Caspofungina é derivada da pneumocandina B, que é produzida por *Glarea lozoyensis*, por outro lado, micafungina é um composto semi-sintético da

equinocandina B produzida por *Aspergillus nidulans* e a anidulafungina é obtida através da modificação química do produto da fermentação de *Coleophoma empetri* (Campoy & Adrio, 2017). O uso desta classe é indicado principalmente para infecções como candidíase esofágica, candidemia e candidíase invasiva, além de ser aprovada como tratamento empírico em casos de neutropenia febril e falha terapêutica em aspergilose invasiva ou pacientes intolerantes aos demais antifúngicos (Wilke, 2011). São metabolizadas pelo fígado, portanto recomenda-se diminuir a dose em pacientes com insuficiência hepática crônica. Pode interagir com ciclosporina, rifampicina, tacrolimo, dexametasona e carbamazepina. Anidulafungina foi aprovada pela FDA para tratamento de candidíase disseminada, esofágica e candidemia. Efeitos adversos ao processo de infusão são raros, não sendo observadas interações medicamentosas significativas até então investigadas (Carmona & Limper, 2017).

As equinocandinas possuem um perfil de absorção no trato gastrointestinal extremamente baixo, portanto encontram-se disponíveis apenas para administração via parenteral (Perea, 2016). Também possuem distribuição limitada para o sistema nervoso central, sendo assim inadequado o uso em casos de meningites e endoftalmites (Aguilar-Zapata et al., 2015). Entre as reações adversas relatadas estão os distúrbios gastrointestinais, a elevação das aminotransferases, a cefaleia e as reações infusionais leves, ocorrendo em menos de 1% dos pacientes (Patil & Majumdar, 2017).

### **3.3.4 Análogos da pirimidina**

Em relação aos análogos da pirimidina, a flucitosina apresenta mecanismo de ação único e distinto dos demais antifúngicos, com atividade fungistática seletiva interferindo no metabolismo da pirimidina, síntese de RNA/DNA e proteínas. As moléculas de flucitosina permeiam a célula fúngica através da via citosina permease que é convertida pela citosina deaminase em 5-fluorouracil. Posteriormente é transformada em 5-fluorouridina monofosfato, fosforilada e incorporada ao RNA ocasionando a inibição da síntese de proteínas (Sidhartha, 2015). A molécula 5-fluorouracil também pode sofrer conversão à monofosfato de 5-fluorodeoxiuridina inibindo a enzima timidilato sintase, impedindo assim a síntese de DNA e divisão celular (Campoy & Adrio, 2017). Possui atividade contra espécies de *Candida*, *Cryptococcus* e *Saccharomyces*, entretanto é ineficaz para espécies de *Aspergillus* e

*Zigomicetos*, pois muitos fungos filamentosos não possuem as enzimas necessárias para a sua internalização e conversão (Davey et al., 2015). O desenvolvimento de resistência é comum nessa classe, o que leva ao uso da terapia combinada com outros antifúngicos, como por exemplo a anfotericina B e fluconazol (Chandrasedhar, 2011; Perfect, 2017).

A monoterapia com flucitosina pode ser uma opção a ser aplicada em casos de cistite ocasionada por *Candida*, em decorrência das altas concentrações urinárias e tempo de tratamento relativamente curto (Nett & Andes, 2016). Seus efeitos colaterais são geralmente brandos, os mais comuns compreendem erupção cutânea, diarreia, elevação das enzimas hepáticas e supressão da medula óssea (apenas em períodos prolongados de administração) (Carmona & Limper, 2017; Vandeputte et al., 2012).

### **3.4 Mecanismos de resistência de espécies de *Candida* aos antifúngicos**

Os microrganismos de forma geral possuem uma grande capacidade de desenvolver resistência aos antimicrobianos como forma de evolução e perpetuação da espécie, em decorrência, o número de falhas terapêuticas é crescente tornando as opções de tratamento restritas (Campoy & Adrio, 2017). Em relação aos fungos, este cenário é ainda mais agravante, uma vez que há poucas classes majoritariamente empregadas na clínica médica (Hadrich & Ayadi, 2018).

Os principais mecanismos de resistência relatados são de atuação a nível molecular. Para conter o efeito fungicida e/ou fungistático destes fármacos, os microrganismos expressam três principais mecanismos de resistência. O primeiro é baseado no decréscimo da concentração efetiva do fármaco, seguido por alteração do seu alvo, e modificações do metabolismo para evadir os efeitos tóxicos exercidos pelos fármacos (Spampinato & Leonardi, 2013).

Um dos mecanismos utilizados pelas células para diminuir a concentração intracelular do fármaco é aumentar o seu efluxo. As principais classes de bombas de efluxo são representadas pelos transportadores de cassete de ligação a ATP (transportadores do tipo ABC) e transportadores pertencentes à superfamília dos facilitadores maioritários (MFS). Os principais transportadores do tipo ABC são *CDR1*

e *CDR2*, majoritariamente envolvidos na resistência aos azóis por *C. albicans* e *CgCDR1*, *CgCDR2*, *CgSNQ2* para *C. glabrata* (Perlin et al., 2017; Pfaller, 2012). Outros genes também são relatados, como *ABC1* e *2* em *C. krusei* e *CDR1* em *C. tropicalis*. Os transportadores MSF são principalmente regulados por *MDR1* e *FLU1* em *C. albicans*. Além disso, mutações pontuais nestes reguladores, definidas como mutações de ganho de função (MGF), conferem altos níveis de resistência aos azóis. Mutações no gene de transcrição *Upc2p* de MGF aumentam a resistência ao fluconazol em *C. albicans* (Perlin, 2015). Outra maneira de diminuir a efetividade da droga ocorre por meio de mutações no gene *ERG11*, *ERG1*, *ERG3*, *ERG7*, *ERG9* e *ERG25*, envolvidos na biossíntese do ergosterol, acarretando na resistência aos azóis (Campoy & Adrio, 2017).

Nas equinocandinas a resistência é sistematicamente associada a mutações nos genes *FSK1* ou *FSK2*. Essas mutações são localizadas em duas diferentes regiões *hot spot* desses genes, nomeadas HS1 e HS2, sendo assim encontradas em *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. albicans*. Essas mutações alteram a cinética da síntese de glicano resultando em concentrações inibitórias altas do fármaco (Sekyere & Asante, 2018). Enquanto que nos análogos de pirimidina, 5-fluorocitosina (5-FU), o mecanismo de resistência está relacionado a mutações pontuais nos genes *FCY2* que propicia alteração nas enzimas envolvidas na absorção do antifúngico, *FCY1* e *FUR1* que estão relacionados à alteração nas enzimas envolvidas no metabolismo do fármaco, ocasionando resistência de espécies de *Candida* à 5-Flucitosina (Arendrup & Patterson 2017).

O mecanismo de resistência envolvido em anfotericina B, embora raro, está ligado ao decréscimo das concentrações de ergosterol presente na membrana celular, ocasionado por mutações em genes responsáveis pela biossíntese do ergosterol, sendo estes *ERG1*, *ERG2*, *ERG3*, *ERG4*, *ERG6* e *ERG11*, encontrados, principalmente em *C. albicans* e *C. glabrata* (Morio et al., 2017).

### **3.5 Desenvolvimento de novas moléculas com potencial antifúngico**

Devido ao aumento no número de falhas terapia em decorrência de microrganismos resistentes, tornou-se essencial a busca por novas estratégias

terapêuticas. Recentemente surge uma promissora estratégia para auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos, o rastreio químico. O projeto “Pathogen Box”, liderado pela Medicines for Malaria Venture (MMV – Suíça), visa identificar novos medicamentos com atividade para doenças como tuberculose, malária, toxoplasmose, dengue, entre outras. Dentre aproximadamente quatro milhões de compostos, 400 substâncias químicas sintéticas foram selecionadas de acordo com a baixa toxicidade às células de mamíferos e atividade antimicrobiana contra patógenos humanos (McCarthy & Walsh, 2017). Pathogen Box também foi utilizada para o rastreio de novos agentes antifúngicos por Mayer e Kronstad em 2017, no qual cinco compostos (tolfenpyrad, difenoconazol, bitertanol e MMV688271) foram encontrados com atividade para *C. albicans* e *C. neoformans*.

Atualmente várias moléculas promissoras encontram-se em diferentes fases clínicas (Tabela 2). VT-1161 e VT-1129 foram designadas para a ação seletiva sobre a inibição de CYP51 da célula fúngica, sendo fracamente ligadas à CYP51 humana. VT-1161 apresenta atividade contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *Cryptococcus neoformans* e *Trichophyton mentagrophytes*. VT-1129 possui alto potencial de ação sobre *Cryptococcus* spp. (Schell et al., 2017).

SCY-078 abrange várias espécies de *Candida* spp., incluindo *C. auris* e cepas resistentes aos triazóis e equinocandinas. Também abrange *Aspergillus* spp., quando combinado a triazóis. É o primeiro inibidor da síntese de (1,3)- $\beta$ -D-glucano oralmente biodisponível (Schell et al., 2017). CD101 foi avaliada frente a 713 isolados fúngicos, estes pertencentes a *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* e *Cryptococcus neoformans*. Todos os isolados foram sensíveis a este composto, apresentando variações de acordo com mutações em hot spot FSK de algumas espécies. Essa nova equinocandina apresenta estabilidade química no plasma, em soluções aquosas e temperaturas elevadas, além de meia-vida elevada (Pfaller et al., 2017).

APX001 é um inibidor da proteína fúngica Gwt1, responsável pela catálise em etapas iniciais da biossíntese da âncora de glicofosfatidilinositol (GPI), crucial para a ancoragem de proteínas manosiladas da parede e membrana celular fúngica. Apresentou atividade contra *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Scedosporium*, bem como para espécies de *Candida* resistentes aos azóis e equinocandinas (Zhao et al., 2018).

Pertencente à classe das orotomides, F901318 é um composto com modo de ação único, inibindo a dihidroorotato desidrogenase (enzima crucial para a síntese de pirimidinas), desempenha significativa atividade contra *Aspergillus*, *Scedosporium*, *Acremonium*, *Paecilomyces*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Blastomyces*, porém não apresenta atividade contra leveduras e *Mucorales* (Wiederhold, 2018).

**TABELA 2:** Desenvolvimento de novas moléculas antifúngicas com potencial ação sobre fungos leveduriformes e filamentosos.

<b>Novos antifúngicos</b>	<b>Classe</b>	<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Fase clínica</b>	<b>Ref.</b>
VT-1161	Tetrazol	Ligação e inibição do citocromo P45051(CYP51)	IIb	Schell et al., 2017
VT-1129	Tetrazol	Ligação e inibição do citocromo P45051(CYP51)	I	Schell et al., 2017
SCY-078	Triterpeno	Inibidor da síntese de glucana	I	Schell et al., 2017
CD101	Equinocandina	Inibidor da síntese de glucana	III	Pfaller et al., 2017
APX001		Inibidor da glicosilfosfatidilinositol	I	Hager et al., 2018
F901318	Orotomide	Inibidor da síntese de pirimidinas	I	Oliver et al., 2016

### **3.6 Derivados de selênio**

O selênio bem como seus derivados também tem sido alvo de estudos. Durante um longo período da história a principal atividade biológica atribuída ao selênio era de toxicidade, correlacionado a alguns eventos históricos de envenenamento por selênio (Santi & Bagnoli, 2017). Atualmente, distúrbios tanto em animais como em humanos, podem ser atribuídos a essa molécula devido a sua

bioacumulação. No entanto, em baixas concentrações é um micronutriente indispensável, presente em cerca de 30 selenoproteínas de papel crucial para o equilíbrio redox dos seres vivos (Wrobel et al., 2016). Tendo em vista os seus potenciais efeitos biológicos, o selênio passa a ser alvo de pesquisas (Santi & Bagnoli, 2017).

As nanopartículas de selênio (SeNP) ganham cada vez mais espaço no campo da medicina devido às suas propriedades antimicrobianas e anticancerígenas, apresentando-se de forma biocompatível e atóxicas em relação ao selenito e selenato. SeNP sintetizadas por meio de uma fonte biológica apresentam ampla atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas e fungos. O seu efeito frente aos microrganismos é dependente de concentração e tamanho (Wadhvani et al., 2016).

Sobre *C. albicans* e *Aspergillus fumigatus* os SeNP apresentam potencial antifúngico demonstrando concentrações inibitórias de 70 µg/ml e 100 µg/mL, respectivamente (Shakibaie et al. 2015), além de exibirem atividade contra *Malasesia sympodialis* e *Malasesia furfur*, com CIM de 10 µg/mL e 50 µg/mL (Shahverdi et al., 2010). Contrária a atividade antifúngica até então encontrada, Kazempour et al. (2013) demonstraram que a pré-exposição de *A. niger* a SeNP é capaz de diminuir a fase lag, promovendo o seu crescimento. Esse fato pode ser atribuído à capacidade de *A. niger* em utilizar o selênio presente nas nanopartículas como um oligoelemento.

Adicionalmente, a capacidade de romper biofilmes bacterianos foi estudada por Zonaro et al. (2015), que constataram resultados positivos dessas nanopartículas como antimicrobianos além de sua efetividade na erradicação de biofilmes. Guisbiers et al. (2017), traz em sua publicação a inibição de até 50% do biofilme formado por *C. albicans* e atribui essa ação de acordo com o tamanho de partículas, uma vez que as menores SeNP apresentaram os melhores resultados.

Os selenocianatos e seus derivados são formados a partir da união de um calcogênio (oxigênio, enxofre, selênio, telúrio, polônio) a um substituinte hidrocarboneto, e em seu outro lado um agrupamento carbonitrila e são obtidos respectivamente: cianatos, tiocianatos, selenocianatos e telurocianatos. Os selenocianatos, em questão, são facilmente obtidos através de reações com selenocianato de potássio como material de partida. Entre derivados sintéticos de selênio, os organoselenocianatos são uma importante classe estudada devido as suas propriedades quimiopreventivas, antioxidantes e anticarcinogênicas (Guillemin, 2011),

sendo os compostos difenilmetilselenocianato e 1,4-FenilenoBis(Metileno)Selenocianato mais estudados para estes fins (Guttenplan et al., 2007; Facompre et al., 2010; Fiala et al., 2005; Prokopczyk et al., 1997; Shimada, 2017; Das & Bhattacharya, 2005; Das et al., 2007; Chakraborty et al., 2015).

Compostos organossulfurados são amplamente encontrados na natureza e estão presentes no alho (alicina), em cogumelos (ergotioneína) e vegetais crucíferos (tiocianatos e isotiocianatos). Estes compostos despertaram atenção devido suas propriedades, como exemplo, ebselen que está em fase clínica 2, utilizado na redução da perda auditiva induzida por ruídos (Nasim et al., 2018; Kil et al., 2017).

Derivados de selenocianatos têm emergido devido ao seu potencial antimicrobiano já encontrado em estudos anteriores (Batista et al., 2017; Burghout et al., 2011; Huang et al., 2018; Sá et al., 2014; Silveira et al., 2012; Iman et al., 2016; Baquedano et al., 2016; Plano et al., 2011; Chao et al., 2017). Porém, o grupo de moléculas utilizadas neste estudo foi testado apenas para espécies de *Fusarium*, mostrando a necessidade de investigar a sua ação também sobre fungos leveduriformes.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Locais da realização da pesquisa

Os ensaios microbiológicos desenvolvidos foram realizados no Laboratório de Micologia Aplicada, localizado na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os experimentos referentes à toxicidade celular foram executados pelo Grupo de Pesquisa em Toxicologia Celular (TOXCEL) da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) campus Uruguaiana. Os testes referentes ao potencial de irritação dos compostos foram elaborados pelo Instituto Federal Catarinense (IFC) campus Concórdia.

### 4.2 Cepas selecionadas para o estudo

Foram utilizadas 36 cepas distribuídas entre *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (Tabela 3), sendo estas explanadas na tabela 3. Dentre estas cepas, ATCC 40039, RL12m, DEN10 e CA02, são resistentes ou sensíveis dose-dependente (SDD) ao Fluconazol. Todas as cepas encontram-se depositados na micoteca do Laboratório de Micologia Aplicada da UFRGS e foram identificados fenotipicamente através do sistema Vitek Yeast Biochemical Card (BioMerieux Vitek).

**TABELA 3:** Cepas utilizadas para o desenvolvimento dos ensaios

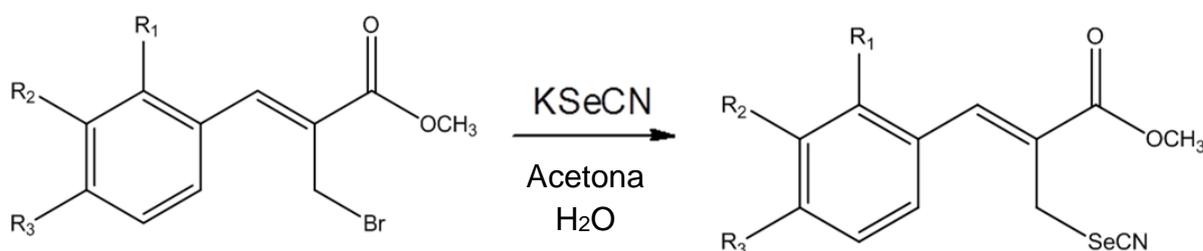
<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. Tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>
ATCC 18804	ATCC 40039*	ATCC 750	ATCC 6258
CA02*	RL29	72 A	CK01
DEB05	RL27	94P	CK02
DEB06	RL12m*	RL17	CK03
DEN13	RL34	57 A	CVB42
DEN10*	DEN30	RL14	CVB44
CA01	DEN20	RL08	RL52
RL12	CG08	RL16	DEN43
DEN06	DEN01	RL56	RL102

\*Cepas dose-dependente ou resistentes ao fluconazol

### 4.3 Compostos orgânicos investigados

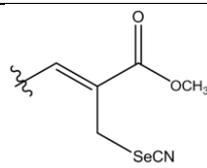
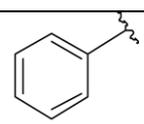
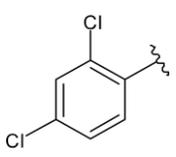
Uma série de 12 compostos da classe de selenocianatos alílicos foram selecionados para avaliar sua atividade antifúngica *in vitro*. Estes compostos foram

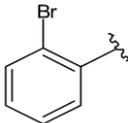
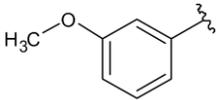
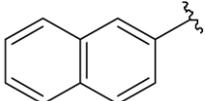
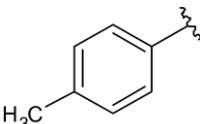
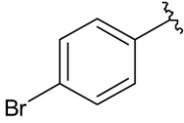
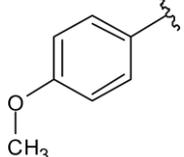
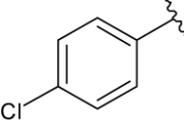
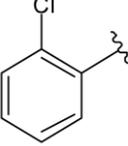
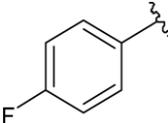
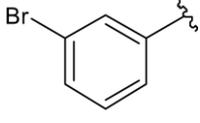
sintetizados e gentilmente cedidos pelo Laboratório de Síntese Orgânica do Instituto de Química, sob coordenação e orientação do Prof. Dr. Gustavo Pozza Silveira. O processo para a síntese é baseado na reação entre brometos alílicos e selenocianatos de potássio (figura 1). A síntese foi realizada a partir de brometo alílico solubilizado em acetona aquosa e posteriormente resfriado a 5 °C, então o selenocianato de potássio foi acrescentado, sendo esta mistura agitada durante 15 minutos nesta mesma temperatura. Para finalizar, a reação foi diluída com acetato de etila e a fase orgânica resultante foi lavada com água, seca e evaporada. O resíduo foi purificado através de cromatografia em coluna de sílica gel. As moléculas resultantes deste processo receberam modificações em sua estrutura, que estão apresentadas na tabela 4.



**Figura 1:** Esquema da reação entre brometo alílico e selenocianato de potássio, resultando em selenocianato alílico. Fonte: ChemSketch 2016.2 (Advanced Chemistry Development Inc., ACD/Labs).

**TABELA 4:** Derivados dos selenocianatos alílicos obtidos através da reação presente na figura 1 e suas características físico-química

Molécula s		Peso molecula r (g/mol <sup>-1</sup> )	CLog P	Aceptores de hidrogênio	Doadores de hidrogênio	Área de superfície e polar (Å)
SeCN-1		280.143	2,33	3	0	50.09
SeCN-2		349.033	3,75	3	0	50.09

SeCN-3		359.039	3,19	3	0	50.09
SeCN-4		310.169	2,25	4	0	59.32
SeCN-5		330.203	3,50	3	0	50.09
SeCN-6		294.170	2,25	3	0	50.09
SeCN-7		359.039	3,19	3	0	50.09
SeCN-8		310.169	2,25	4	0	59.32
SeCN-9		314.588	3,04	3	0	50.09
SeCN-10		314.588	3,04	3	0	50.09
SeCN-11		298.133	2,47	3	0	50.09
SeCN-12		359.039	3,19	3	0	50.09

Fonte: ChemSketch 2016.2 (Advanced Chemistry Development Inc., ACD/Labs)

#### 4.4 Preparo do inóculo fúngico para o teste de susceptibilidade

De acordo com o protocolo M27-A3 da *Clinical & Laboratory Standards*

*Institute* (CLSI) de 2008, as leveduras selecionadas foram cultivadas em Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) (Kasvi; Paraná, Brasil) e incubadas a 35°C durante 24 horas. Após o período de incubação, cinco colônias foram retiradas e homogeneizadas em salina estéril 0,85%. Esta suspensão foi ajustada em espectrofotômetro GT 7220 Global Trade Technology (São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 530 nm, até atingir a densidade celular padrão de 0,5 da escala MacFarland. Após este ajuste, a suspensão foi novamente diluída em salina (1:50) e em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 (Sigma Aldrich®; St. Louis, EUA) (1:20), resultando em um inóculo leveduriforme de concentração final entre 1 a 5 x 10<sup>3</sup> UFC/mL.

#### **4.5 Preparo das soluções de antifúngicos e dos derivados de selenocianato alílicos**

Todas as soluções estoque utilizadas neste estudo (antifúngicos e compostos) foram preparadas e devidamente armazenadas na concentração de 5 mg/mL. Os selenocianatos alílicos, anfotericina B (Cristália®; São Paulo, Brasil) e anidulafungina (Pfizer®; Nova Iorque, EUA) foram dissolvidos em Dimetilsulfóxido (DMSO) (Dinâmica®; São Paulo, Brasil). Fluconazol (Sigma Aldrich®; St. Louis, EUA) foi dissolvido em água deionizada estéril. As soluções de trabalho foram preparadas a partir da solução estoque no momento da realização do ensaio, diluídas em meio RPMI 1640 tamponado com ácido 3-morfolinopropanosulfônico (MOPS) (Neon; São Paulo, Brasil) e pH ajustado a 7,0 de acordo com as concentrações requeridas para cada ensaio. As soluções de trabalho foram cuidadosamente calculadas para que a concentração de DMSO não fosse tóxica às células fúngicas ( $\leq 2\%$ ).

#### **4.6 Teste de susceptibilidade fúngica**

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada de acordo com o método de microdiluição em caldo, considerando as diretrizes contidas na norma CLSI, conforme os documentos M27-A3 (2008) e M27-S4 (2012). Para este ensaio foram utilizadas microplacas de poliestireno contendo 96 poços com fundo em forma de "U". Primeiramente pipetou-se 100 µL de meio RPMI 1640, aos poços da microplaca, procedendo posteriormente com a diluição seriada dos compostos estudados. Os selenocianatos alílicos foram testados na concentração de 50 µg/mL à

0,097 µg/mL e fluconazol de 64 µg/mL à 0,125 µg/mL, de modo que a cada microdiluição a concentração destes caia pela metade. Após finalizada a microdiluição, adicionou-se 100 µL do inóculo, de modo que cada poço da microplaca tenha um volume final de 200 µL. A 11ª coluna da microplaca foi utilizada como controle de viabilidade de crescimento, pipetando apenas meio de cultura e inóculo (células sem tratamento); e a 12ª coluna, representando o controle de esterilidade, contendo apenas meio RPMI sem adição de inóculo. Finalizando todos os procedimentos anteriormente citados, as microplacas foram incubadas à 35°C durante 48 horas. Após este período realizou-se a leitura através da observação visual, sendo considerada a CIM de acordo com a menor concentração dos compostos capaz de inibir o crescimento fúngico 100% e para Fluconazol 50% da inibição visual do crescimento. O teste foi realizado em triplicata e os resultados expressos em µg/mL. Fluconazol foi utilizado como controle, possuindo seus breakpoints conhecidos e preestabelecidos pela CLSI M27 S4.

A concentração fúngica mínima (CFM) também foi realizada em triplicata a partir do subcultivo de alíquotas de 20 µL em ágar SDA provenientes das microplacas de poliestireno utilizadas no teste de susceptibilidade, correspondentes à CIM, 2xCIM e 4xCIM. A CFM foi considerada a menor concentração onde não houve crescimento de colônias fúngicas após 48 horas de incubação à 35°C. (Haghdoust et al., 2015; Staniszewska et al., 2017). As moléculas 7 e 8 apresentaram CIM's acima de 50 µg/mL e não foram utilizadas para este teste.

#### **4.7 Avaliação do ergosterol exógeno**

A partir deste teste avaliou-se qualitativamente a interação dos compostos selecionados (SeCN-2, 5, 9, 19, 11 e 12) com o ergosterol presente na membrana celular fúngica. Este ensaio foi realizado de acordo com o método de microdiluição, na presença e ausência de ergosterol exógeno (Sigma Aldrich®; St. Louis, EUA) adicionado ao meio RPMI nas seguintes concentrações: 150 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL e 25 µg/mL. Para que o ergosterol pudesse ser dissolvido em meio RPMI utilizou-se o solvente Dimetilformamida (DMF) (Dinâmica®; São Paulo, Brasil) na concentração de 1%, de modo que não interfira na viabilidade celular fúngica. Anfotericina B foi escolhida como controle positivo de validação do teste, pois sua ação ocorre em nível de membrana celular. A 11ª coluna da microplaca foi utilizada

para controle de crescimento e a 12<sup>a</sup> como controle de esterilidade do meio. As placas foram incubadas a 35°C durante 48 horas para a posterior realização da leitura (Miron et al., 2014).

#### **4.8 Avaliação do efeito protetivo do sorbitol**

Este ensaio foi baseado na adição de sorbitol ao meio de cultura, que age como protetor osmótico sobre a parede celular fúngica. Através do método, avaliou-se a ação das moléculas selecionadas (SeCN-2, 5, 9, 10, 11 e 12) na presença e ausência de sorbitol. Foi adicionada a exata quantidade necessária de D-sorbitol (Dinâmica®; São Paulo, Brasil) ao meio RPMI para atingir uma concentração final correspondente a 0.8 mol/L em cada poço das microplacas. Estas foram incubadas a 35°C, sendo realizada a leitura após 2 e 7 dias (Freires et al., 2014). Anidulafungina (AND) foi o fármaco selecionado para controle deste ensaio, uma vez que é conhecido por sua atividade sobre a parede celular fúngica (Peixoto et al., 2017).

#### **4.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Foi selecionado o composto SeCN-9, devido ao seu potencial antifúngico, para a realização da MEV. As cepas selecionadas foram pertencentes às espécies de *C. glabrata* e *C. albicans*, CGDEN20 e ATCC 18804, respectivamente. O preparo das amostras foi realizado previamente, com o tratamento das cepas em exposição aos compostos durante 48 horas, procedendo com a técnica de macrodiluição (CLSI, 2008). Em uma placa estéril de poliestireno de 24 poços, realizou-se a macrodiluição do composto SeCN-9. Finalizando a macrodiluição, adicionou-se o inóculo resultando em um volume final de 2 ml em cada poço. As placas com os tratamentos foram incubadas à 35°C. Após as 48 horas de incubação/tratamento, 2 ml da concentração sub-inibitória (MIC/2) correspondente a ao tratamento foi transferida para um eppendorf. Amostras sem tratamento foram utilizadas como controle. Os eppendorfs contendo as amostras foram centrifugados durante 3 min à 5000 rpm, sendo o sobrenadante descartado e o pellet lavado com tampão fosfato salino (PBS). O processo de lavagem foi realizado 3 vezes. Logo após o procedimento de lavagem, adicionou-se a solução de fixação Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7,2) permanecendo submersas durante 1 hora em temperatura ambiente. Posteriormente foram realizadas

3 lavagens com tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7,2, contendo 0,02 M de sacarose. Após este procedimento, 800 µL de cada amostra foram transferidos para lâminas revestidas com poli-L-lisina, que permaneceram uma hora em repouso para a aderência das células. Estas lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 95 e 100%) e dissecação final em aparelho de ponto crítico (EM CPD 300, Leica). Após a secagem das lâminas, estas foram revestidas por uma camada (12-20 nm) de ouro pulverizado e então analisado em microscópio de varredura eletrônica (Carl Zeiss EVO® MA10, Oberkochen, Alemanha). A aplicação da MEV para amostras biológicas proporciona detalhes estruturais finos e imagens tridimensionais, sendo adequada para análise de modificações superficiais promovidas pelos compostos que apresentarem atividade sobre as leveduras em estudo, confirmando a ocorrência de possível ação em nível de parede celular (Staniszewska et al., 2013).

#### **4.10 Teste de redução da resazurina**

A resazurina é amplamente conhecida como corante vital, por sua capacidade em aceitar elétrons provenientes de radicais livres, bem como reagir com moléculas de oxigênio de forma que espécies reativas de oxigênio sejam geradas. Esta reação reduz a resazurina em resorufina que é facilmente visualizada devido a sua coloração rosa fluorescente. Além disso, a resazurina atua com aceptor de elétrons presentes na cadeia transportadora de elétrons presente na membrana mitocondrial, dessa forma, células viáveis são rapidamente distinguidas por sua capacidade metabólica (Erikstein et al., 2010). Com base nestas informações, utilizamos a resazurina como indicador de reação de redução sobre os SeCN com o intuito de conhecer a sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio.

Os compostos foram microdiluídos utilizando meio RPMI, em microplacas de poliestireno de 96 poço, nas concentrações de 50 µg/mL até 0,02 µg/mL. Ácido ascórbico foi utilizada como controle positivo de oxidação nas concentrações de 5.000 µg/mL até 2,44 µg/mL. Posteriormente, foram adicionados 20 µL de resazurina a 0,01% em todos os poços. A reação foi observada durante 30 minutos para a leitura visual baseada na mudança da coloração. A menor concentração capaz de ocasionar mudança de cor foi considerada como a concentração antioxidante mínima. Este teste foi baseado na metodologia apresentada por Dhankhar et al. (2012), com

modificações.

#### **4.11 Ensaio para avaliação de irritação em membrana cório-alantoide (HET-CAM)**

Este ensaio avaliou o perfil de alergenicidade das moléculas, observado através de reações de irritação dos vasos sanguíneos presentes na membrana cório-alantoide de ovos de galinha fertilizados, como alternativa aos testes em tecido conjuntivo de coelhos. Foram utilizados 3 ovos brancos fertilizados Lohmann para cada amostra, mantidos sob condições de fertilização em uma temperatura de 38°C a 39°C e umidade ajustada em torno de 55 e 60% por um período de 10 dias. No décimo dia, a casca dos ovos foi removida cuidadosamente na região da câmara de ar por equipamento rotativo (Dermel, WI). Posteriormente adicionou-se 300 µL de cada selenocianato (SeCN-9, 10, 11 e 12) em cada ovo. O comportamento dos compostos sobre a membrana foi observado em 30 segundos, 2 e 5 minutos. Para controle negativo utilizou-se solução salina 0,9% e controle positivo 0,1 mol/L de NaOH. Fluconazol foi utilizado como fármaco controle. Este ensaio foi realizado em triplicata (Bergamo, et al., 2016; McKenzie, et al., 2015; ICCVMA, 2010). A quantificação de dano foi medida por escala de hemorragia, lise e coagulação através equação para obtenção de um escore de irritação. Os resultados entre 0 e 4,9 foram classificados como não irritantes. O score de irritação (SI) foi calculado de acordo com a equação abaixo:

$$SI = \left( \left( \frac{(301 - \text{Tempo de hemorragia})}{300} \right) \times 5 \right) + \left( \left( \frac{(301 - \text{Tempo de lise})}{300} \right) \times 7 \right) + \left( \left( \frac{(301 - \text{Tempo de coagulação})}{300} \right) \times 9 \right)$$

#### **4.12 Ensaio de citotoxicidade em leucócitos humanos**

##### **4.12.1 Viabilidade celular**

Este ensaio possibilita a avaliação da viabilidade celular de leucócitos humanos através da observação da perda da integridade da membrana quando submetidos às moléculas selecionadas. Foi realizada a coleta de sangue venoso, cujo

doador fosse maior de 18 anos e não usuário de medicação. Desta coleta foram obtidos os leucócitos, a partir de centrifugação, sendo imediatamente transferidos para meio de cultura contendo 9 ml de meio RPMI 1640, acrescido com 10% de soro fetal bovino e 1% de estreptomicina. Os frascos foram incubados à 37°C durante 72 horas. Tampão PBS 7,4 foi utilizado com controle negativo, e bleomicina como controle positivo na concentração de 3 µg/mL. Após este preparo prévio, foram adicionados 100 µL de azul de Tripam e 100 µL dos compostos (SeCN-9, 10, 11 e 12) na concentração de 12,5 µg/mL. Decorridos 3 minutos as amostras foram visualizadas em microscópio ótico com aumento de 100x. Um total de 300 células foram contabilizadas, dentre vivas e mortas que são diferenciadas de acordo com a presença de coloração azul no citoplasma das células inviáveis (Güez et al., 2017; Machado et al., 2017). Os demais compostos (SeCN-1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) foram anteriormente avaliados por Batista et al. (2017).

#### **4.12.2 Avaliação de dano ao DNA (ensaio cometa)**

Após o procedimento de preparo das culturas de leucócitos humanos anteriormente citados, esta foi exposta aos compostos em teste (SeCN-9, 10, 11 e 12) e homogeneizada com agarose em baixo ponto de fusão 0,75%. Posteriormente essa mistura é adicionada a lâminas previamente revestidas com agarose 1,5%. Essas lâminas foram então imersas em solução de lise (solução detergente com altas concentrações de sais promovendo a desintegração celular) para proceder com a corrida eletroforética (20 minutos, 300 mA e 25 V) em tampão de NaOH 300 mM e pH 13. Ao final da corrida as lâminas foram neutralizadas e secadas em temperatura ambiente *overnight*. Estas lâminas foram então reidratadas, fixadas, secas novamente e coradas com solução de coloração à base de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) à 1%. São analisados 100 nucleoides por lâmina, em triplicata. A classificação dos nucleoides é baseada de acordo com o comprimento da cauda revelada pela eletroforese. Essa classificação é dada de acordo com pontuações, sendo 0 (sem migração) a 400 (migração máxima), assim demonstrando o índice de dano ao DNA (Singh et al., 1998; Tice et al., 2000). Os demais compostos (SeCN-1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) foram anteriormente avaliados por Batista et al. (2017).

#### **4.12.3 Teste de divisão nuclear citotóxica (frequência de micronúcleos)**

Este teste foi realizado segundo a técnica descrita por Schmid (1975). As lâminas preparadas no item 4.12.1, foram analisadas em microscópio com ampliação de 1.000 vezes, sendo 300 células contabilizadas para cada lâmina e classificadas de acordo com a quantidade de células mononucleadas com presença de micronúcleos, células binucleadas, células binucleadas com micronúcleos, células em processo necrótico e células em processo apoptótico entre intervalos de 72 horas após a incubação (Fenech, 2000). Os demais compostos (SeCN-1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) foram anteriormente avaliados por Batista et al. (2017).

#### **4.13 Determinação das curvas do tempo morte**

Este teste tem como finalidade a determinação do tempo de morte, do ciclo vital destes microrganismos. Para este ensaio utilizou-se uma cepa de *Candida albicans* (ATCC18804) e o composto SeCN-9 que apresentou maior potencial fungitóxico em menores concentrações de acordo com os resultados obtidos pelo teste de susceptibilidade juntamente com os dados de toxicidade. Para a realização deste ensaio, o inóculo utilizado foi preparado na concentração de aproximadamente  $1 \times 10^6$  UFC/mL, em meio RPMI 1640. O composto foi preparado nas concentrações correspondentes à CIM/2, CIM, 2xCIM e 4xCIM. Apenas meio RPMI e inóculo foram utilizados para controle de crescimento. O experimento foi incubado à 35°C. Alíquotas com 10 µL foram coletadas em diferentes intervalos de tempo (0, 4, 8, 12, 24 e 48 horas), prosseguindo com a sua diluição seriada para visualização e contagem das colônias ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ), sendo plaqueadas em SDA. As placas foram incubadas durante 24 horas a 35°C para posterior contagem do número de colônias (Toledo et al., 2016). O efeito fungicida foi considerado quando houve diminuição de  $\geq 99,9\%$  no  $\log_{10}$  do número de UFC/mL em comparação com o inóculo inicial sem tratamento.

#### **4.14 Análise estatística**

Os dados provenientes do teste de susceptibilidade fúngica foram expressos através da média e desvio padrão. As comparações entre os dados foram realizadas utilizando análise de variância de uma via (ANOVA One-Way). Além da

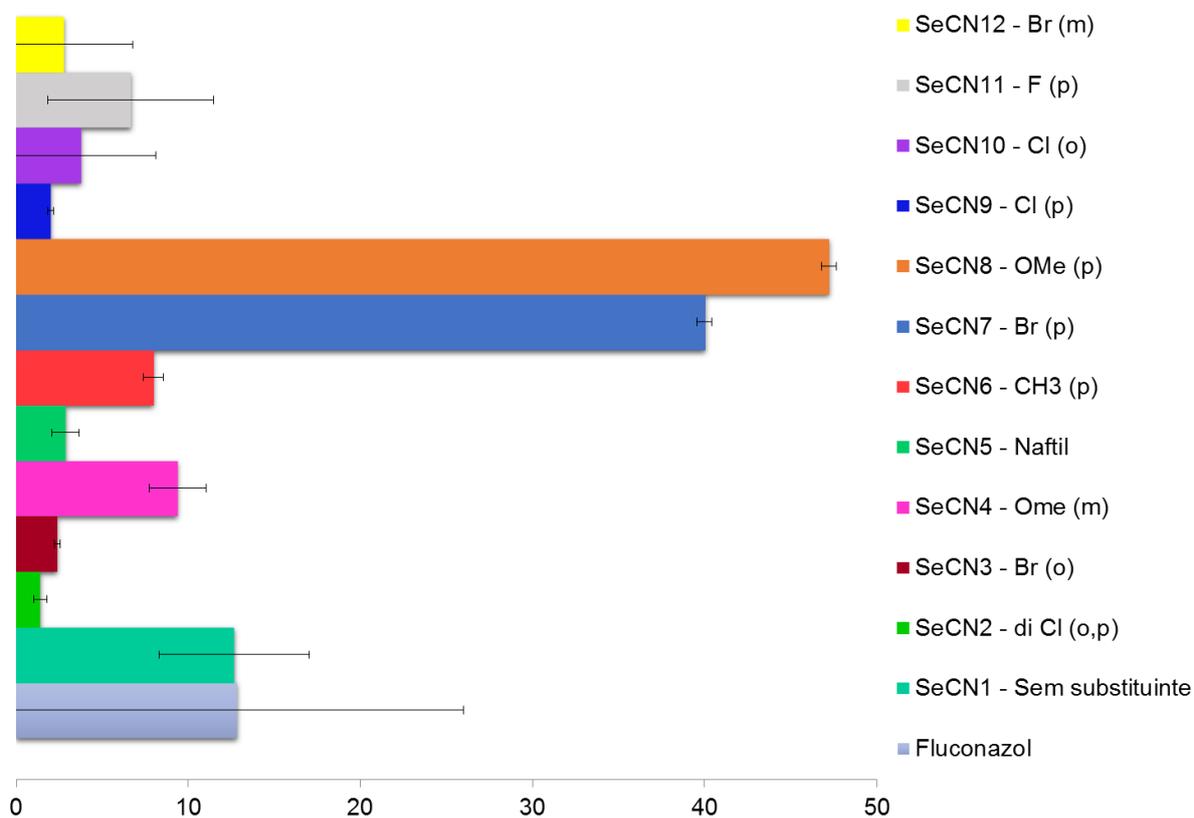
análise de variância, os resultados das CIM's foram complementados com o teste de Tukey possibilitando múltiplas comparações. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Susceptibilidade de *Candida* spp. frente aos selenocianatos

Na presente pesquisa, foram avaliados o perfil de susceptibilidade de 36 cepas de *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*) frente aos 12 compostos derivados de selenocianatos alílicos. Foi observado que a maioria dos compostos exibiram uma ótima atividade antifúngica contra as cepas de *Candida* spp., no qual destacaram-se principalmente os compostos SeCN-2, 3, 5, 9 e 12 cujas CIM's variaram entre 0,78 µg/mL a 6,25 µg/mL. Já os compostos SeCN-7 e 8 foram menos ativos, como demonstrado na Figura 2 e Tabela 5.

Média e desvio padrão de CIM's ( $\mu\text{g/mL}$ ) para espécies *Candida*



**Figura 2:** Média e desvio padrão das concentrações inibitórias mínimas de *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*) frente aos 12 compostos de selenocianatos alílicos e fluconazol.

**TABELA 5:** Perfil de susceptibilidade de quatro espécies de *Candida* frente a 12 compostos de selenocianatos alílicos e fluconazol de acordo com a média, desvio padrão e intervalo das concentrações inibitórias mínimas, expressos em µg/mL.

	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. krusei</i>	
	Média (+ - DP)	Intervalo	Média (+ - DP)	Intervalo	Média (+ - DP)	Intervalo	Média (+ - DP)	Intervalo
<b>SeCN-1</b>	15,97 (7,07)	6,25 – 25	13,88 (6,83)	6,25 – 25	6,25 (0)	6,25 – 6,25	14,58 (8,27)	6,25 – 25
<b>SeCN-2</b>	1,56 (0,96)	0,78 – 3,12	0,86 (0,26)	0,78 – 1,56	1,56 (0,68)	0,78 – 1,56	1,64 (1,77)	0,78 – 6,25
<b>SeCN-3</b>	2,25 (1,58)	1,56 – 6,25	2,43 (0,82)	1,56 – 3,12	2,60 (0,78)	1,56 – 3,12	2,25 (0,82)	1,56 – 3,12
<b>SeCN-4</b>	11,11 (6,07)	6,25 – 25	10,41 (3,12)	6,25 – 12,5	7,63 (2,76)	6,25 – 12,5	8,33 (4,13)	3,12 – 12,5
<b>SeCN-5</b>	2,34 (1,66)	0,78 – 6,25	2,25 (1,58)	1,56 – 3,12	2,95 (0,52)	1,56 – 3,12	3,99 (3,50)	1,56 – 12,5
<b>SeCN-6</b>	7,98 (6,46)	3,12 – 25	7,98 (3,53)	3,12 – 12,5	8,68 (3,76)	3,12 – 12,5	7,29 (4,13)	3,12 – 12,5
<b>SeCN-7</b>	19,44 (12,67)	12,5 – 50	40,45 (19,14)	12,5 – 50	50 (0)	50 - ≥50	50 (0)	50 - ≥50
<b>SeCN-8</b>	≥50 (0)	50 - ≥50	≥50 (0)	50 - ≥50	50 (0)	50 - ≥50	38,88 (17,05)	12,5 - 50
<b>SeCN-9</b>	1,90 (1,66)	0,78 – 6,25	2,16 (0,94)	0,78 – 3,12	1,90 (0,69)	1,56 – 3,12	2,08 (1,03)	0,78 – 3,12
<b>SeCN-10</b>	4,16 (3,12)	3,12 – 12,5	3,64 (1,56)	1,56 – 6,25	3,99 (1,77)	1,56 – 6,25	3,29 (1,82)	1,56 – 6,25
<b>SeCN-11</b>	6,59 (2,44)	3,12 – 12,5	8,33 (3,12)	6,25 – 12,5	6,59 (2,44)	3,12 – 12,5	5,16 (4,65)	0,39 – 12,5
<b>SeCN-12</b>	2,77 (1,52)	1,56 – 6,25	2,25 (0,82)	1,56 – 3,12	3,81 (1,93)	1,56 – 6,25	2,25 (0,82)	1,56 – 3,12
<b>Fluconazol</b>	3,11 (2,93)	1 – 8	17,90 (19,39)	1 – 64	1,28 (0,56)	0,5 – 2	29,11 (28,99)	0,5 – 64

Todos os compostos foram submetidos individualmente à análise de variância (ANOVA one way) para avaliar a resposta de variação na susceptibilidade entre as espécies. Os resultados apontam que apenas SeCN-1 demonstrou variação na susceptibilidade entre as 4 espécies ( $F_{cal} = 4,16 \geq F_{crítico} = 2,90$ ,  $P = <0,05$ ) e para os demais SeCN, não foram observadas variações significativas. Os compostos com melhores resultados foram selecionados de acordo com a CIM e seu intervalo de confiança, sendo estes SeCN-2, SeCN-3, SeCN-5, SeCN-9, SeCN-10 e SeCN-12.

As cepas DEN10, RL12m, ATCC40039, bem como as cepas da espécie de *Candida krusei* foram utilizadas devido a sua resistência ao Fluconazol, antifúngico pertencente a classe azóis, mais utilizada atualmente na terapia. Estas cepas revelaram susceptibilidade aos selenocianatos testados, exceto para as moléculas SeCN-7 e 8 que demonstraram-se pouco efetivos.

## **5.2 Avaliação da Concentração Fungicida Mínima**

Ao avaliar a concentração fungicida mínima das 36 cepas frente aos 10 selenocianatos ( $n = 360$ ) (exceto 7 e 8, que apresentaram CIM's acima de  $50 \mu\text{g/mL}$ ), foi observado que a CFM permaneceu equivalente à CIM para a maioria dos isolados e compostos (93,6%). Apenas 5% apresentaram a CFM em  $\text{CIM} \times 2$  e 1,3% em  $\text{CIM} \times 4$ . Desta maneira, pode-se inferir que este comportamento (tabela 6) não seguiu um padrão relacionado a cepas ou moléculas, portanto são considerados eventos aleatórios.

**TABELA 6:** Concentração fungicida mínima em µg/mL das quatro espécies de *Candida* frente aos 12 selenocianatos alílicos.

	CEPAS	SeCN-1	SeCN-2	SeCN-3	SeCN-4	SeCN-5	SeCN-6	SeCN-9	SeCN-10	SeCN-11	SeCN-12
<i>C. albicans</i>	ATCC18804	12,5	3,125*	3,125	12,5	3,125	6,25	1,562	3,125	6,25	3,125
	DEN13	6,25	1,562	1,562	6,25	3,125*	6,25	0,781	3,125	3,125	1,562
	DEN06	12,5	0,781	1,562	12,5	1,562	6,25	1,562	12,5**	6,25	3,125
	CA02	12,5	0,781	1,562	12,5	1,562	6,25	1,562	3,125	6,25	3,125
	DEB06	25	0,781	1,562	6,25	1,562	6,25	0,781	3,125	6,25	1,562
	DEB05	12,5	3,125	1,562	6,25	3,125	3,125	1,562	3,125	6,25	1,562
	RL12	25	0,781	1,562	6,25	1,562	6,25	1,562	3,125	6,25	1,562
	CA01	25	3,125	25**	25	6,25	25	6,25	12,5	12,5	6,25
	DEN10	12,5	1,562	1,562	12,5	0,782	6,25	1,562	3,125	6,25	3,125
<i>C. glabrata</i>	ATCC40039	12,5	0,781	1,562	12,5	1,562	12,5	1,562	3,125	6,25	3,125
	RL12m	25	0,781	3,125	12,5	1,562	6,25	1,562*	6,25	12,5	1,562
	CG08	25	1,562*	6,25*	12,5	3,125	25*	1,562	6,25	12,5	3,125
	DEN20	12,5	0,781	1,562	6,25	1,562	6,25	1,562	3,125	6,25	1,562
	RL29	12,5	0,781	3,125	12,5	1,562	6,25	3,125	3,125	6,25	1,562
	DEN30	6,25	0,781	6,25*	6,25	6,25	12,5	3,125	6,25*	6,25	3,125
	DEN01	12,5	1,562	3,125	12,5	1,562	6,25	3,125	3,125	12,5	1,562
	RL34	6,25	0,781	1,562	12,5	1,562	6,25	3,125	1,562	6,25	1,562
	RL37	12,5	0,781	1,562	6,25	1,562	3,125	1,562	3,125	6,25	3,125

Continuação da tabela 6:

<i>C. tropicalis</i>	<b>ATCC 750</b>	6,25	0,781	1,562	6,25	3,125	3,125	1,562	3,125	6,25	6,25
	<b>CT57A</b>	6,25	1,562	3,125	12,5	3,125	12,5	1,562	3,125	6,25	12,5*
	<b>RL16</b>	6,25	1,562	6,25*	12,5*	6,25*	6,25	1,562	3,125	6,25	3,125
	<b>94P</b>	6,25	1,562	1,562	6,25	6,25	6,25	1,562	6,25	6,25	3,125
	<b>RL17</b>	6,25	3,125	3,125	12,5	12,5	12,5	3,125	6,25	12,5	6,25
	<b>RL08</b>	6,25	0,781	1,562	6,25	6,25	25**	1,562	1,562	3,125	1,562*
	<b>RL14</b>	6,25	1,562	3,125	6,25	6,25	12,5	1,562	6,25	6,25	6,25*
	<b>RL56</b>	6,25	1,562	3,125	6,25	6,25	6,25	3,125	3,125	6,25	1,562
	<b>RL10</b>	6,25	1,562	3,125	6,25	6,25	12,5	1,562	3,125	6,25	3,125
<i>C. krusei</i>	<b>ATCC 6258</b>	6,25	0,781	1,562	12,5	3,125	12,5**	1,562	3,125	6,25	3,125
	<b>DEN43</b>	25	0,781	3,125	3,125	1,562	6,25	0,782	1,562	3,125	1,562
	<b>RL52</b>	25	0,781	1,562	3,125	12,5	12,5	1,562	6,25	12,5*	3,125
	<b>RL102</b>	25	0,781	3,125	15,5	1,562	12,5	0,781	3,125	6,25*	1,562
	<b>CK01</b>	12,5	3,125*	1,562	12,5*	1,562	6,25	3,125	3,125	12,5	1,562
	<b>CK02</b>	12,5	1,562	3,125	6,25	3,125	3,125	3,125	3,125	1,562	3,125
	<b>CK03</b>	12,5	0,781	3,125	12,5	6,25	6,25	3,125	6,25	0,390	3,125
	<b>CVB42</b>	6,25	1,562	1,562	6,25**	3,125	3,125	3,125	1,562	0,782	1,562
	<b>CVB44</b>	6,25	6,25	1,562	6,25	3,125	3,125	1,562	1,562	3,125	1,562

\*Cepas que apresentaram ação fungicida em 2xCIM. \*\* Cepas que apresentaram ação fungicida em 4xCIM.

### **5.3 Avaliação do efeito protetivo do sorbitol**

Pode-se observar que após a adição de 0,8 M de sorbitol ao meio RPMI com AND houve um aumento da CIM em relação à cultura sem este protetor. Este comportamento demonstra que as células fúngicas foram protegidas da ação da AND. Os SeCN testados não apresentaram ação sobre a parede celular fúngica, uma vez que mantiveram a sua CIM na presença de sorbitol (Tabela 7).

**TABELA 7:** Avaliação do efeito protetivo de 0,8 M de sorbitol sobre espécies de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* expostas a selenocianatos durante 48 horas e 7 dias.

		Concentração inibitória mínima – 2º e 7º DIA (µg/mL)			
Isolados		CT	CA	CK	CG
SeCN-2	Ausência	1,562/ 1,562	0,781/ 0,781	0,781/ 1,562	1,562/1,562
	Presença	1,562/ 1,562	0,781/ 0,781	1,562/ 1,562	1,562/1,562
SeCN-5	Ausência	0,781/ 0,781	0,781/ 0,781	1,562/ 1,562	1,562/0,781
	Presença	0,781/ 0,781	0,781/ 0,781	0,781/ 0,781	1,562/1,562
SeCN-9	Ausência	1,562/ 1,562	0,390/ 0,390	3,125/ 3,125	0,781/0,781
	Presença	1,562/ 1,562	0,390/ 0,390	1,562/ 1,562	0,781/0,781
SeCN-10	Ausência	1,562/ 3,125	3,125/ 3,125	6,25/ 6,25	0,781/1,562
	Presença	1,562/ 1,562	3,125/ 3,125	3,125/ 3,125	0,781/3,125
SeCN-11	Ausência	6,25/ 6,25	6,25/ 6,25	6,25/ 6,25	6,25/6,25
	Presença	3,125/ 3,125	6,25/ 6,25	3,125 /6,25	6,25/6,25
SeCN-12	Ausência	1,562/ 1,562	0,781/ 0,781	3,125/ 3,125	1,562/1,562
	Presença	1,562/ 1,562	0,781/ 0,781	1,562/ 1,562	1,562/1,562
AND	Ausência	0,0625/ 0,0625	0,00781/ 0,00781	0,0156/0,0156	0,0156/0,0156
	Presença	≥1/ ≥1	0,0156/ 0,125	≥1/≥1	0,0156/0,125

AND: Anidulafungina. CT: *C. tropicalis*, CA: *C. albicans*, CK: *C. krusei* e CG: *C. glabrata*.

#### **5.4 Avaliação do ergosterol exógeno**

Nesse ensaio foi avaliada a capacidade dos SeCN-2, 5, 9, 10, 11 e 12 em estabelecer ligações diretas com o ergosterol exógeno, através da adição de diferentes concentrações (25, 50, 100 e 150 µg/mL) do ergosterol exógeno no meio de cultura RPMI junto com o inóculo fúngico e os respectivos compostos. A AmB foi o antifúngico utilizado como controle para validação do teste. Como esperado, AmB revelou um aumento da CIM de acordo com as concentrações crescentes de ergosterol exógeno, deixando de ligar-se ao ergosterol presente na membrana celular fúngica para se ligar ao ergosterol exógeno presente na microplaca. Foi observado que os compostos testados não apresentaram capacidade de complexação ao ergosterol exógeno, uma vez que a ação dessas moléculas sobre a célula fúngica não foi prejudicada, mantendo a sua CIM (Tabela 8).

**TABELA 8:** Avaliação da capacidade de ligação dos compostos sobre o ergosterol exógeno ou presente na membrana celular fúngica de espécies de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*.

<b>Concentração inibitória mínima – 48 horas (µg/mL)</b>																
<b>Concentração de ergosterol</b>	<b>SeCN-10</b>				<b>SeCN-11</b>				<b>SeCN-12</b>				<b>ANFOTERICINA</b>			
	<b>C.A.</b>	<b>C.G.</b>	<b>C.T.</b>	<b>C.K.</b>	<b>C.A.</b>	<b>C.G.</b>	<b>C.T.</b>	<b>C.K.</b>	<b>C.A.</b>	<b>C.G.</b>	<b>C.T.</b>	<b>C.K.</b>	<b>C.A.</b>	<b>C.G.</b>	<b>C.T.</b>	<b>C.K.</b>
<b>S/ ergosterol</b>	3,125	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	0,781	3,125	3,125	6,25	0,0625	0,5	0,25	0,5
<b>25 µg/ml</b>	3,125	6,25	12,5	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	1,562	3,125	3,125	6,25	0,25	1	1	1
<b>50 µg/ml</b>	3,125	6,25	12,5	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	3,125	3,125	3,125	6,25	2	4	2	2
<b>100 µg/ml</b>	3,125	6,25	12,5	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	3,125	3,125	3,125	6,25	4	≥16	4	8
<b>150 µg/ml</b>	3,125	6,25	12,5	6,25	6,25	6,25	6,25	12,5	3,125	6,25	3,125	6,25	≥16	≥16	≥16	≥16

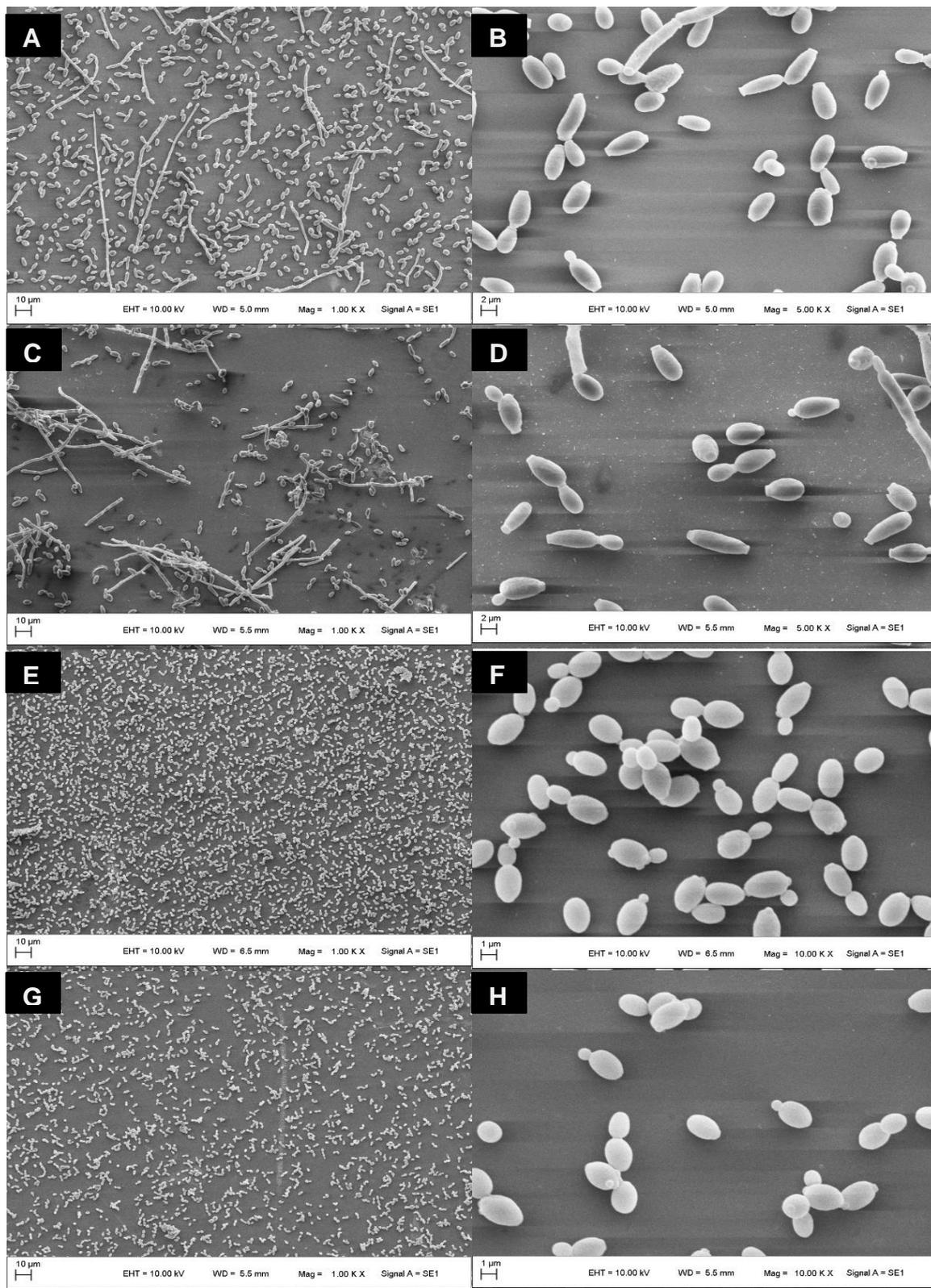
Continuação da tabela 8:

<b>ERGOSTEROL EXÓGENO – 48 horas (µg/mL)</b>												
<b>Concentração de ergosterol</b>	<b>SeCN-2</b>				<b>SeCN-5</b>				<b>SeCN-9</b>			
	<b>C.A.</b>	<b>C.G.</b>	<b>C.T.</b>	<b>C.K.</b>	<b>C.A.</b>	<b>C.G.</b>	<b>C.T.</b>	<b>C.K.</b>	<b>C.A.</b>	<b>C.G.</b>	<b>C.T.</b>	<b>C.K.</b>
<b>S/ ergosterol</b>	1,562	0,781	1,562	0,390	1,562	1,562	6,25	3,125	1,562	3,125	3,125	1,562
<b>25 µg/ml</b>	1,562	0,781	1,562	0,390	1,562	1,562	6,25	3,125	3,125	3,125	3,125	1,562
<b>50 µg/ml</b>	1,562	1,562	1,562	0,390	3,125	1,562	6,25	3,125	3,125	3,125	3,125	1,562
<b>100 µg/ml</b>	1,562	1,562	0,781	0,390	1,562	1,562	6,25	3,125	3,125	3,125	3,125	1,562
<b>150 µg/ml</b>	1,562	1,562	1,562	0,390	1,562	1,562	6,25	3,125	3,125	3,125	1,562	1,562

C.A.: *Candida albicans*, C.G.: *Candida glabrata*, C.T.: *Candida tropicalis* e C.K.: *Candida krusei*.

## **5.5 Microscopia eletrônica de varredura**

De acordo com os resultados obtidos pelo teste de susceptibilidade, o composto SeCN-9 foi escolhido para a avaliação micromorfológica frente as cepas ATCC 18804 (*C. albicans*) e DEN20 (*C. glabrata*). Pode-se observar que SeCN-9 quando testado sobre a ATCC 18804, demonstrou expressiva redução das células leveduriformes, bem como observou-se aglomerados de pseudo-hifas. Quando avaliado o efeito da molécula sobre a DEN20, observou-se uma redução significativa no número de células quando comparado ao controle de crescimento (Figura 3). Para ambas cepas utilizadas neste ensaio, não foram identificadas modificações ou danos estruturais visíveis na superfície das células fúngicas. Estes dados corroboram com os resultados obtidos no ensaio de proteção da parede celular (sorbitol).



**Figura 3:** Fotomicrografias referentes à MEV de cepas de *C. albicans* ATCC 18804 e *C. glabrata* DEN 20 em concentrações sub-inibitória de SeCN-9. A e B: controle de sem tratamento de *C. albicans*. C e D: concentração sub-inibitória de 0,781 µg/mL. E e F: controle sem tratamento de *C. glabrata*. G e H: concentração sub-inibitórias 0,781 µg/mL.

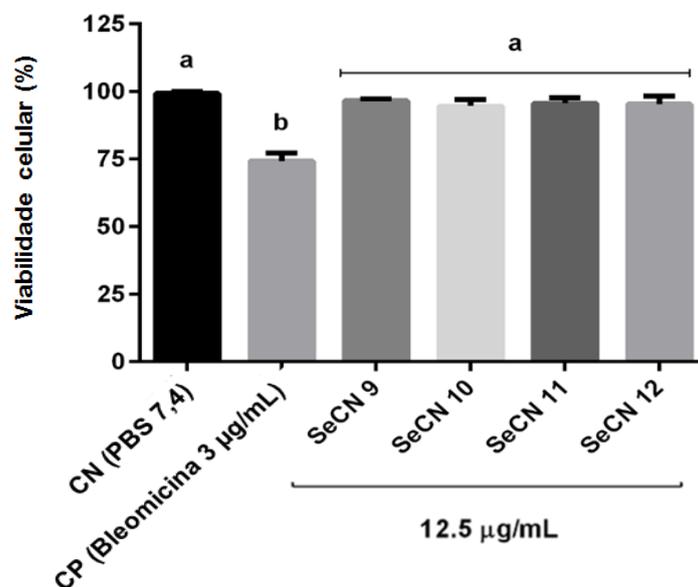
## 5.6 Teste de redução da resazurina

Este ensaio nos possibilitou visualizar a interação das 12 moléculas de selenocianatos em relação à resazurina e seu potencial de oxidação. Após 30 minutos de reação, não foram observadas reações de oxidação-redução, uma vez que não observamos a conversão da resazurina a resorufina (mudança da cor azul para rosa fluorescente). O contrário pode ser visto no controle positivo, uma vez que o ácido ascórbico reagiu com a resazurina resultando em um processo de oxidação e conversão de resazurina em resorufina, assim, validando o teste.

## 5.7 Ensaio de citotoxicidade em leucócitos humanos

### 5.7.1 Viabilidade celular

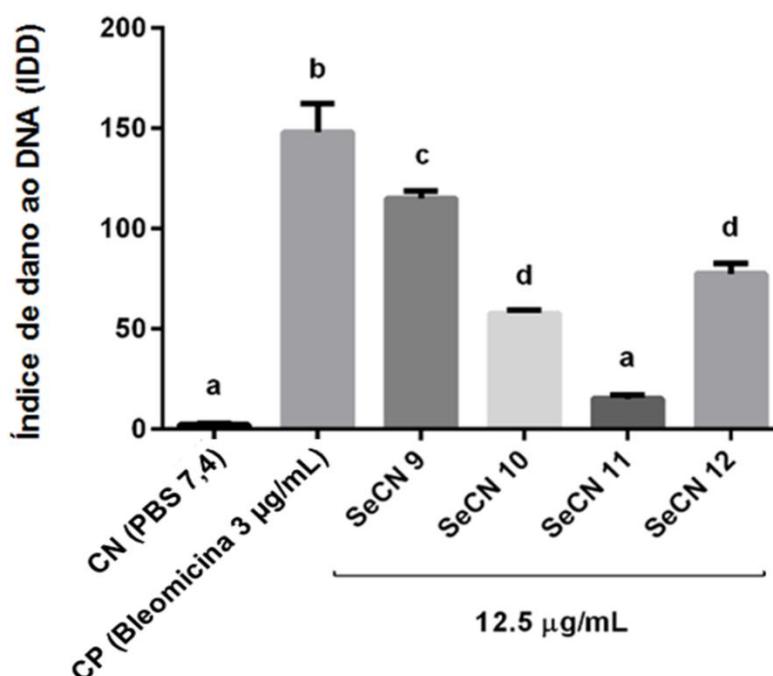
Os resultados para os compostos SeCN-9, 10, 11 e 12 (figura 4) testados na concentração de 12,5 µg/mL mostram que todos os compostos ocasionaram danos mínimos às células (96,6%, 94,6%, 95,6% e 95,4%), não apresentando diferença estatística quando comparados ao controle negativo (99,3% de viabilidade), e significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle positivo (74,3%).



**Figura 4:** Avaliação da viabilidade celular em leucócitos humanos tratados com selenocianatos alílicos na concentração de 12,5 µg/mL e fármaco controle na concentração de 3 µg/mL. Letras diferentes indicam diferença estatística. CN: controle negativo. CP: controle positivo.

### 5.7.1 Ensaio cometa – dano ao DNA celular

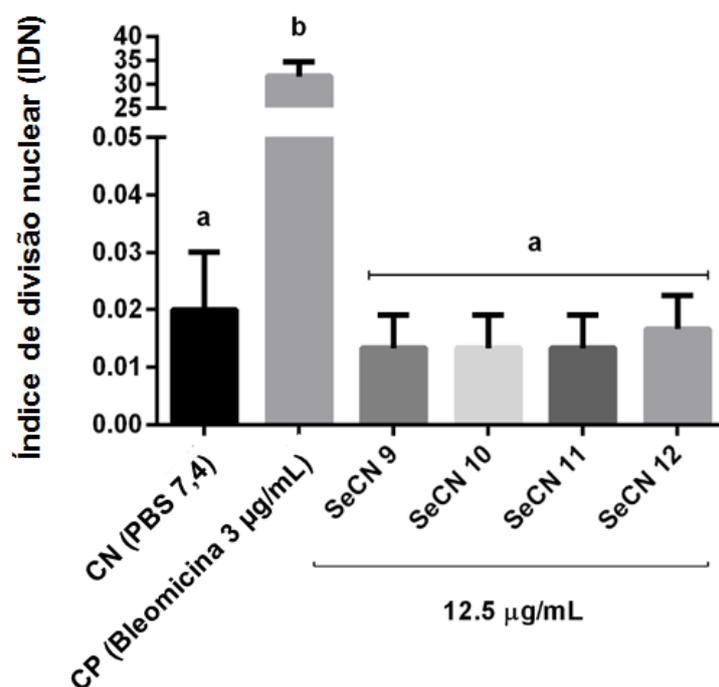
Os compostos SeCN-9 ao 12 também foram testados para a genotoxicidade. O comportamento do SeCN-9 apresentou o índice de dano mais próximo ao controle positivo (115,0 e 148,0 respectivamente), seguido por SeCN-12 (77,6) e 10 (57,6). O SeCN-11 expressou leve dano ao DNA (15,3). Todos os compostos evidenciaram diferença estatística significativa em relação ao controle positivo ( $p < 0,05$ ), visto que apenas SeCN-11 não exibiu diferença estatística em relação ao controle negativo. Foi utilizada a concentração de 12,5  $\mu\text{g/ml}$  para todos os selenocianatos avaliados conforme demonstrado na figura abaixo.



**Figura 5:** Estudo do dano ao DNA ocasionado em leucócitos humanos após exposição aos selenocianatos alílicos na concentração de 12,5  $\mu\text{g/mL}$  e fármaco controle na concentração de 3  $\mu\text{g/mL}$ . Letras diferentes indicam diferença estatística. CN: controle negativo. CP: controle positivo.

### 5.7.2 Frequência de micronúcleos

Os resultados apresentados pela frequência de micronúcleos demonstram que os compostos não apresentam diferença estatística em relação ao controle negativo.

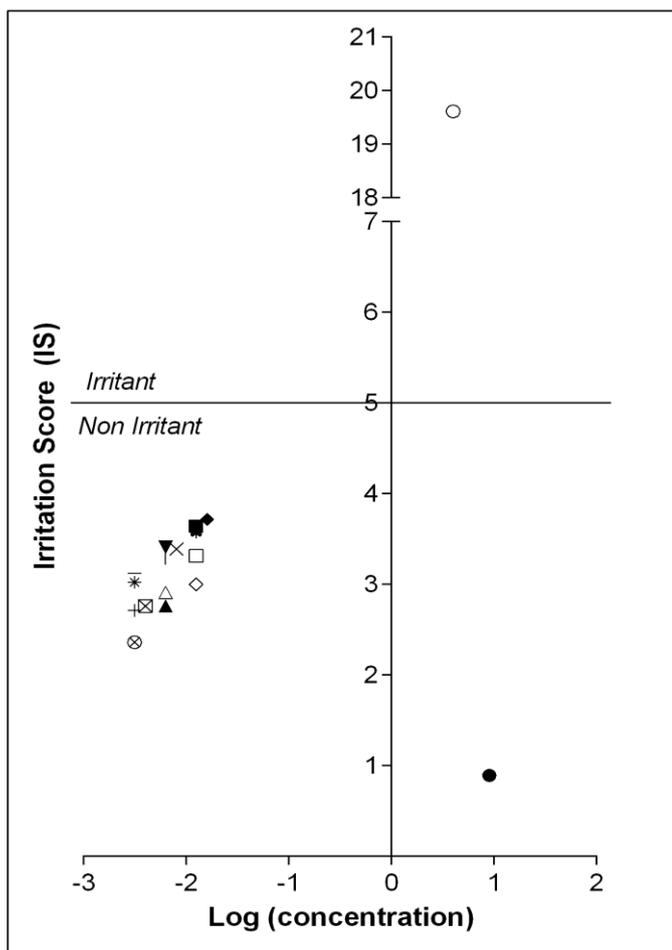


**Figura 6:** Análise da frequência de micronúcleos encontrados em leucócitos humanos após exposição à selenocianatos na concentração de 12,5 µg/mL e fármaco controle na concentração de 3 µg/mL. Letras diferentes indicam diferença estatística. CN: controle negativo. CP: controle positivo.

### 5.8 Teste de alergenicidade HET-CAM

Conforme a figura 7, as moléculas SeCN-9, 10, 11, 12 e fluconazol (fármaco utilizado como controle) foram testados em 3 concentrações diferentes, sendo elas 3,125, 6,25 e 12,5 µg/ml, e 4, 8 e 16 µg/ml para fluconazol. O escore de irritação a seguir corresponde respectivamente às concentrações citadas anteriormente, SeCN-

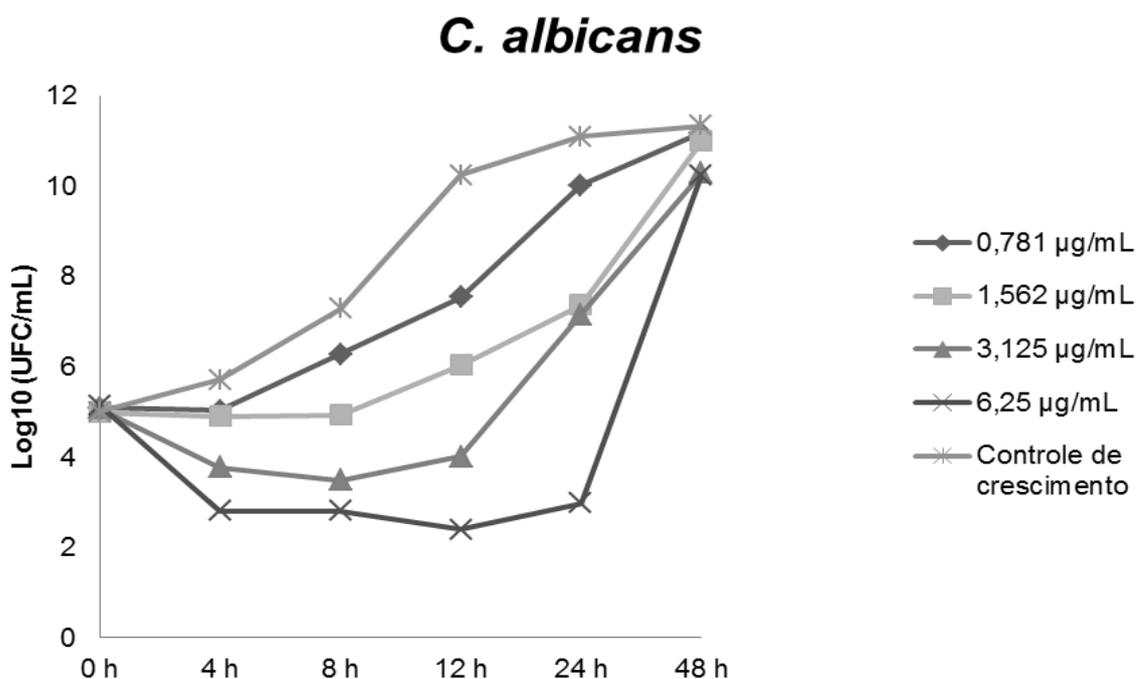
9: 3,02, 3,41 e 3,58, SeCN-10: 2,71, 2,91 e 3,01, SeCN-11: 3,12, 3,28 e 3,64, SeCN-12: 2,36, 2,76 e 3,31, e fluconazol: 2,76, 3,39 e 3,71. Estes resultados mostram que todas as concentrações e compostos testados não demonstraram ação irritante (<4,9) sobre a membrana cório-alantoide.



**Figura 7:** Relação dose-resposta para selenocianatos alílicos 9 ao 12. Controle positivo: NaOH (0.1M) (o) e Controle negativo: 0.9% NaCl (●), Fluconazol (4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (⊠), Fluconazol (8  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (x), Fluconazol (16  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (◆), SeCN-09 (3.125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (\*), SeCN-9 (6.25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (▼), SeCN-9 (12.5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (♣) SeCN-10 (3.125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (+), SeCN-10 (6.25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (Δ), SeCN-10 (12.5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (◇), SeCN 11 (3.125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (-), SeCN-11 (6.25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (l), SeCN-11 (12.5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (■), SeCN-12 (3.125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (⊗), SeCN-12 (6.25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (▲), SeCN-12 (12.5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (□). Cada ponto representa um experimento (n = três ovos). As concentrações foram transformadas logaritmicamente.

### 5.9 Ensaio do tempo de morte (*Time kill assay*)

Este ensaio se refere à cinética de ação do composto SeCN-9 sobre *C. albicans* (ATCC18804) em diferentes concentrações e intervalo de tempo (Figura 8). Pode-se observar que no controle sem tratamento há o crescimento progressivo das leveduras, bem como na concentração sub-inibitória. Nas concentrações referentes à CIM (1,562 µg/mL) e 2xCIM (3,125 µg/mL) foi observado um declínio no número de células até 8 horas. Após esse período o número de células aumentou. Por outro lado, a maior concentração testada, 4xCIM (6,26 µg/mL), apresentou diminuição no número de células até 24 horas. A partir de 24 h, até 48 h, as células retornaram o crescimento, atingindo concentrações celulares próximas ao controle sem tratamento. Dessa forma podemos constatar que esta molécula desempenha papel fungistático independente de concentração e tempo.



**Figura 8:** Curvas referentes ao tempo de morte de *Candida albicans* exposta a diferentes concentrações do SeCN-9 (CIM/2: 0,781 µg/mL, CIM: 1,562 µg/mL, 2xCIM: 3,125 µg/mL e 4xCIM: 6,25 µg/mL).

## 6 DISCUSSÃO

As mudanças epidemiológicas ocorridas no decorrer das últimas décadas revelam um aumento de indivíduos imunocomprometidos tornando mais grave o cenário das infecções fúngicas, uma vez que alguns microrganismos emergentes são menos suscetíveis ou resistentes aos antifúngicos disponíveis atualmente no mercado (Santos et al., 2017; Perfect, 2016). Além disso, o uso profilático e indiscriminado destes fármacos ocasiona a resistência dos microrganismos, sejam por processos adaptativos e/ou evolutivos. O fluconazol, antifúngico mais utilizado na clínica médica devido à baixa toxicidade, é um exemplo clássico desse panorama de adaptação da resistência, pois o seu mecanismo de ação fungistático fez com que o processo de aquisição de resistência tenha tido uma rápida evolução (Berkow & Lockhart, 2017; Vuichard et al., 2014; Mount et al., 2018).

Diante do exposto, o presente estudo buscou demonstrar a capacidade dos selenocianatos alílicos em atuar contra as principais espécies de *Candida* relacionadas a infecções em humanos. *Candida krusei* e *C. glabrata*, por exemplo, são importantes alvos por tipicamente apresentarem um perfil de susceptibilidade diminuído para alguns antifúngicos na clínica médica, principalmente aqueles pertencentes a classe dos azóis. Os isolados CA02, DEN10, ATCC 40039 e RL12m resistentes ou suscetíveis dose-dependente ao fluconazol, exibiram sensibilidade aos selenocianatos, demonstrando de um modo geral que sua efetividade é independente da espécie, um fator primordial quando se prospecta novas classes ou hits de antimicrobianos. O teste de análise de variância (ANOVA) aplicado sobre as CIM's obtidas mostra que há diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre as moléculas, porém, não há diferença estatística significativa entre as espécies para os compostos testados individualmente, provando, de modo geral, que sua efetividade é independente de espécie para o gênero *Candida*. Essa constatação permite significativamente concluir que os selecionatos alílicos podem ser considerados antifúngicos com ação Anti-*Candida*.

Ao analisar as moléculas, pode-se inferir que o melhor desempenho foi exibido pelas moléculas SeCN-2, 3, 5, 9 e 12 (Figura 2). Apenas as moléculas SeCN-7 e 8 demonstraram uma efetividade baixa para todas as cepas em relação aos demais compostos. Este fato pode estar relacionado à natureza do substituinte e sua

posição. A molécula SeCN-1 representa a base para as demais, que possuem agrupamentos metila, metoxila e átomos de halogênio, bem como suas diferentes posições no anel aromático.

Para inferir observações acerca da REA, foi aplicado o teste estatístico de Turkey, no qual foi possível comparar a efetividade entre os selenocianatos e suas CIM's. As moléculas que possuem átomos de cloro (SeCN-2, 9 e 10) apresentaram diferença estatística em relação ao SeCN-1 para todas as espécies, e não apresentam diferença estatística entre si. Portanto a posição e o número de átomos de cloro não influenciaram na atividade destas estruturas. Logo, os compostos 9 e 10 são melhores, considerando a economia atômica em relação ao composto 2.

As moléculas que receberam átomos de bromo na posição *orto* e *meta* (SeCN-3 e 12) foram ativas contra todas as cepas e não apresentam diferença estatística entre si, exceto SeCN-7 que deixou de ser ativo na posição *para* em relação à molécula base (SeCN-1). SeCN-3 não apresentou diferença estatística em relação à molécula SeCN-1, bem como SeCN-12, com exceção de *C. tropicalis* que não apresentou diferença estatística entre a molécula 1 e 12.

SeCN-11 possui um átomo de flúor na posição *para*, quando comparado com SeCN-1 apenas a espécie de *C. albicans* demonstrou diferença estatística. Ao ser comparado ao SeCN-7 e 8, foi observado diferença estatística, dessa forma percebeu-se que um átomo de flúor na posição *para* é mais efetivo do que um átomo de bromo ou uma metoxila nesta posição. Já as moléculas SeCN-4, 6 e 10 não apresentaram diferença estatística em relação ao SeCN-11 para todas as espécies, porém, SeCN-2, 3, 5, 9 e 12 apresentaram diferença estatística apenas para *C. tropicalis*, indicando que esta espécie apresenta um perfil de susceptibilidade diferente entre SeCN-11 e as demais moléculas. No caso do SeCN-5, que possui um grupo naftila em substituição a fenila (SeCN-1) foi mais ativo, mostrando-se estatisticamente diferente da molécula base (SeCN-1), bem como de SeCN-7 e 8. Porém, quando comparado aos compostos 2, 3, 9, 10 e 12 não apresentaram diferença estatística para todas as espécies.

A partir dos radicais metoxila adicionados nas posições *meta* e *para* de SeCN-4 e 8 respectivamente, pode-se afirmar que a introdução deste substituinte culminou na perda de atividade apenas para o composto 8. SeCN-4 não apresentou diferença estatística significativa em relação à sua molécula base para todas as

espécies, dessa forma observou-se que a adição de um agrupamento metoxila na posição *meta* foi diferente em relação à efetividade. Ao contrário do grupamento metoxila (SeCN-8) e o composto contendo metila (SeCN-6) na posição *para*, mostrou-se mais efetivo, mas ainda indiferente quando comparada à sua molécula base e ao SeCN-4. Portanto, um átomo de bromo e grupamento metoxila na posição *para* diminuíram a efetividade dos compostos, enquanto moléculas contendo cloro (dispostas em diferentes posições), bromo nas posições *orto* e *meta*, e um naftaleno foram mais efetivas para todas as cepas avaliadas.

Tiocianatos alílicos foram estudados por Silveira et al. (2012) que também constataram a melhor atividade de compostos (Br, Cl e F) que continham halogênios em seu anel aromático. Chao et al. (2017) avaliaram derivados de tiocianatos (selenocianatos) e também destacaram os melhores resultados para moléculas contendo os halogênios flúor e cloro.

Tavares (2004) afirma que dois compostos que possuam estruturas similares, mas apresentem um átomo ou grupo de natureza ou posições diferentes podem apresentar diferenças significativas na sua atividade biológica. Portanto, modificações estruturais são responsáveis pela geração de um caráter eletrônico e hidrofóbico de estruturas moleculares, logo, estes fatores irão determinar a interação de um fármaco com o sistema biológico e a sua influência sobre a absorção e distribuição através dos tecidos (Tamaian et al., 2015).

Lipinski et al. (2001) desenvolveram a regra dos 5 que auxiliam na predição do perfil de biodisponibilidade para novas entidades químicas. Esta regra traz as seguintes considerações: o coeficiente de partição (CLogP) deve ser  $\leq 5$ , o peso molecular deve ser menor ou igual a 500, os aceptores de ligação de hidrogênio  $\leq 10$  e doadores de ligação de hidrogênio  $\leq 5$ . Analisando as moléculas utilizadas neste estudo, foi constatado que todas as estruturas enquadram-se neste perfil. Logo, em relação ao ClogP encontrado em nossas moléculas, Dean & Lewis (2002) constata que baixos valores de CLogP proporcionam grande solubilidade de moléculas e conseqüentemente melhor atividade, esta afirmação vai de encontro às CIM's e CLogP dos SeCN, uma vez que as moléculas que obtiveram melhor desempenho apresentam valores de CLogP próximos 3, já as moléculas com menor atividade observamos CLogP em torno de 2.

Abrigach et al. (2018) avaliou a atividade antifúngica de compostos

pirazólicos e imidazólicos através de docking molecular, também constatou melhor atividade de moléculas que possuíam os maiores valores de CLogP, sugerindo que o provável efeito inibitório destes compostos sobre *Fusarium oxysporum* deve-se a sua inserção na membrana lipofílica fúngica. Outro importante fator a ser levado em consideração é a área de superfície polar, Veber et al. (2002) investigaram as propriedades moleculares de possíveis compostos candidatos a novos fármacos acerca da biodisponibilidade oral e os dados revelaram moléculas com área de superfície polar inferior à 140 Å e dessa maneira possuem melhor biodisponibilidade, sendo também relatado por Lipinski (2001). Os compostos utilizados nessa pesquisa também enquadram-se neste valor, uma vez que as ASP variam entre 50,09 e 59,32 Å mostrando bom potencial para absorção por via oral.

Testes referentes à adição de sorbitol e ergosterol exógeno ao meio de cultura foram utilizados para identificar os possíveis mecanismos de ação dos SeCN. Sorbitol é considerado um protetor osmótico, adicionado ao meio de cultura para proteger a parede celular fúngica. Seu efeito protetivo não se limita apenas aos inibidores de 1,3-β-glicano, sendo aplicado também a inibidores da síntese de outros polímeros presentes na parede celular fúngica. Portanto este ensaio possibilita uma triagem de amplo espectro, identificando agentes que atuam diretamente sobre a síntese e a montagem da parede celular além de mecanismos que participam da regulação destes processos (Frost et al., 1995). Com base nessa afirmação foi avaliado o efeito protetivo do sorbitol sobre os SeCN estudados, que demonstraram não agir sobre a parede celular, uma vez que os valores das CIM não alteraram na presença de 0,8 M de sorbitol adicionados ao meio de cultura (Tabela 7).

O ergosterol é um dos constituintes da membrana celular fúngica responsável por manter a integridade celular, sendo alvo de agentes antifúngicos, portanto a adição de ergosterol ao meio de cultura possibilita avaliar a capacidade de ligação de moléculas a este esterol exógeno. Dessa forma, o ergosterol exógeno evitaria a ligação destas moléculas sobre o ergosterol presente na membrana celular dos fungos, resultando no aumento da CIM (Neto et al., 2017). Os compostos utilizados nessa pesquisa, não apresentaram ação direta sobre a membrana celular, uma vez que não houve ligação entre as moléculas de SeCN e o ergosterol exógeno, portanto, não houve diferença significativa entre as CIM's na presença e ausência de ergosterol exógeno (Tabela 8). Sendo assim, pode-se inferir que a ação dos SeCN

sobre as células fúngicas pode estar relacionada a mecanismos nucleares, uma vez que ambos testes não revelaram ação dos compostos sobre a membrana citoplasmática e parede celular.

O contrário ocorreu com Batista et al. (2017) que avaliaram os 7 primeiros compostos estudados nessa pesquisa e o grupo encontrou ação sobre a membrana celular de espécies de *Fusarium*. Esse fato também demonstra que a ação dos SeCN pode ser dependente de gênero. Tal peculiaridade pode ser assimilada ao comportamento exibido por *Aspergillus* spp. e *Candida* spp. em relação a itraconazol e voriconazol que atuam como fungicidas e fungistáticos, respectivamente para esses dois gêneros (Manavathu et al., 1998), característica também exibida pelas equinocandinas que desempenham ação fungicida sobre *Candida* spp. e ação fungistática sobre algumas espécies de *Aspergillus* (Morris & Villmann, 2006; Bondaryk et al., 2013). Esse comportamento permanece não esclarecido, porém, supõem-se que alterações na via de síntese do ergosterol para *Aspergillus* seja letal, mas não para *Candida* (Manavathu et al., 1998), sendo assim, uma mesma molécula com potencial antifúngico e alvo, pode agir de diferentes formas em relação a diferentes gêneros e/ou espécies de fungos devido às suas características biológicas.

Os mecanismos de ação de compostos derivados do selênio também foram revisados por El-Bayoumy & Sinha (2004) frente as suas propriedades anti-tumorais (principalmente durante a fase de promoção e progressão das células cancerosas). Os autores observaram que as moléculas apresentaram efeitos sobre inúmeros alvos moleculares e celulares. Estes alvos incluíram selenoenzimas e adutos de proteínas de ligação do selênio, proteína quinase C, fosforilação de proteínas, ligação ao DNA, ativador do fator nuclear kB, Sp1, Sp3 e proteína AP1, gene supressor tumoral p53, entre outros.

Ao analisar a MEV (Figura 3), foi possível observar uma diminuição no número de células leveduriformes, além de aglomerados de hifas. Nenhuma alteração morfológica foi encontrada quando as células foram submetidas ao tratamento com selenocianatos em comparação ao controle sem nenhum composto.

Em nossa pesquisa, também foram avaliados o potencial de oxidação das 12 moléculas e estes dados nos mostraram que os SeCN não possuem potencial de oxidação, o que corrobora com os dados físico-químicos destas estruturas (Tabela 4), uma vez que não possuem doadores de hidrogênio disponíveis em sua estrutura.

Portanto, pode-se também supor que os SeCN alílicos apresentem potencial antioxidante, assim descartando a hipótese de um possível mecanismo de ação através da oxidação e geração de espécies reativas de oxigênio (ERO). Essa característica é encontrada em alguns fármacos que além de seu mecanismo de ação, também geram ERO durante a ação antifúngica, como por exemplo, a anfotericina B e miconazol (Mesa-Arango et al., 2014; Kobayashi et al., 2002).

Os dados referentes ao ensaio de viabilidade celular mostram que os compostos 9 ao 12 não apresentaram efeitos citotóxicos aos leucócitos humanos, porém, os ensaios de citotoxicidade realizados por Batista et al., 2017 na concentração de 16 µg/mL, apenas SeCN-2 e 3 demonstraram um decréscimo da viabilidade celular igual ao controle positivo. Plano et al. (2010) mostra em sua pesquisa que selenocianatos e disselenetos exerceram boa atividade antileishmania com baixos níveis de toxicidade em linhagens de células humanas.

Os resultados obtidos referentes ao dano genotóxico para os selenocianatos alílicos mostram que o composto 9 apresentou um índice de dano ao DNA próximo ao controle positivo, mas com diferença estatística. Batista et al., (2017) relata que o composto 6 na concentração de 16 µg/mL demonstrou o índice de dano mais próximo ao controle positivo em comparação aos demais compostos (SeCN-1, 2, 3, 4, 5 e 7).

Em relação à formação de micronúcleos, os resultados permaneceram iguais ao controle negativo. Os dados obtidos por Batista et al., (2017) também revelam ausência de formação de micronúcleos em leucócitos humanos para todas as moléculas testadas sem diferença estatística significativa do controle negativo. Tunca et al., (2017) investigou o potencial genotóxico de 8-hidroxiquinolina complexada a cádmio e tiocianato, constatando que este composto induziu efeitos clastogênicos e de dano ao DNA em todas as concentrações testadas. Fluconazol também foi objeto de estudo referente a seu potencial genotóxico e apresentou-se como clastogênico e aneugênico em linfócitos humanos (Yüzbaşıoğlu et al., 2007), além de demonstrar uma grande frequência de micronúcleos em amostras de filhotes de rato expostos a terapia durante a gestação (Markovic et al., 2013). Dessa forma podemos esperar que os selenocianatos alílicos sejam seguros para o uso terapêutico, porém, ensaios mais aprofundados acerca de sua toxicidade são necessários.

No que se refere à cinética de ação do SeCN-9 (Figura 10), constatamos que esta é independente de concentração, uma vez que em menores concentrações (CIM e 2xCIM) o efeito fungistático ocorre até 8 h de exposição. Em 24 horas 3,125 µg/mL (concentração correspondente a 4xCIM) foi capaz de reduzir 73,2% no número de células em relação ao controle sem tratamento. Após este período foi visualizado o crescimento exponencial dos microrganismos até 48 horas.

Este evento vai a desacordo com a concentração fungicida mínima encontrada para SeCN-9 sobre ATCC 18804 (Tabela 6). Analisando este evento podemos inferir a possível influência do tamanho do inóculo utilizado para estes ensaios, uma vez que, a CFM é realizada com um inóculo entre 1 a  $5 \times 10^3$  UFC/mL, enquanto o inóculo utilizado para a determinação do tempo de morte foi de  $1 \times 10^6$  UFC/mL. Klepser et al. (1998) estudou a influência do tamanho do inóculo inicial, agitação e a concentração do antifúngico sobre espécies de *Candida* no ensaio do tempo de morte, constatando que o tamanho do inóculo inicial influencia sobre o tempo de morte, uma vez que inóculos menos concentrados ( $10^4$  a  $10^6$ ) demonstram os melhores resultados comparados aos inóculos mais altos ( $10^6$  a  $10^8$ ) devido ao platô das curvas de crescimento que eram apenas 1 log<sub>10</sub> maiores que o inóculo inicial, o que prejudicou a separação das curvas, portanto  $10^4$  e  $10^5$  seriam os tamanhos de inóculo ideais.

Embora todos os compostos tenham apresentado um caráter fungicida na CFM, o tempo de morte é um ensaio crucial para melhor entendimento da cinética de um composto sobre um microrganismo.

Alguns fármacos utilizados na clínica médica desempenham uma farmacocinética fungistática, como por exemplo, fluconazol e itraconazol (Burgess et al., 2000; Szabó et al., 2008). Porém o efeito encontrado em nosso ensaio na maior concentração de SeCN-9 entre 24 e 48 horas não foi relatado pela literatura. Dessa forma, avaliações mais precisas acerca das moléculas de selenocianatos alílicos são necessárias para elucidar seu efeito fungicida presente na CFM e fungistático no tempo de morte, bem como o exato mecanismo de ação sobre as leveduras do gênero *Candida*, lembrando que os argumentos por nós levantados a respeito destas questões são suposições.

Os resultados obtidos através deste trabalho demonstram o potencial dos selecionados alílicos como uma promissora nova classe de antifúngicos, uma vez que

apresentaram atividade em baixas concentrações, inclusive na ordem de nanogramas, bem como baixos efeitos citotóxicos sobre células humanas e características físico-químicas que indicam um ótimo perfil de biodisponibilidade. Embora ainda sejam necessários estudos clínicos controlados com a finalidade de estudar a sua real eficácia, estas moléculas apresentam-se como uma futura alternativa ao atual tratamento de candidíases de baixa e alta complexidade.

## 7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos podemos destacar que:

- As moléculas de selenocianatos alílicos mostraram-se ativas sobre todas as cepas testadas (36) para as 4 espécies de *Candida*, não apresentando diferença estatística entre as espécies, mesmo para as cepas resistentes ao fluconazol, com exceção de SeCN-7 e 8 que foram menos ativas para todas as cepas. Assim, podemos constatar um amplo potencial de ação sobre as leveduras do gênero *Candida*.
- As modificações estruturais destes compostos nos permitiram analisar que a presença de halogênios no anel aromático culminou no melhor desempenho e potencial fungitóxico das moléculas com melhor atividade. A adição de agrupamentos metila e metoxila mostra uma menor efetividade das moléculas, mesmo assim, ainda permanecem ativas contra *Candida* spp.
- De acordo com as curvas de morte de *C. albicans*, podemos inferir que concentrações mais altas do SeCN-9 conseguem manter a ação fungistática das leveduras por um maior período.
- Os mecanismos de ação dos selenocianatos não estão relacionados à membrana ou parede celular fúngica, sugerindo que estes compostos possam surgir como uma nova classe de agentes antifúngicos devido ao seu alvo de ação distinto aos demais antifúngicos presentes no mercado.
- O perfil de toxicidade destas moléculas mostra que a grande parte destes compostos exercem baixos efeitos genotóxicos e citotóxicos sobre leucócitos humanos, demonstrando ser, provavelmente, compostos seguros para o uso na terapia antifúngica além de possuir uma provável ação antioxidante.

## 8 PERSPECTIVAS

- ✓ Ampliar os gêneros estudados, uma vez que várias infecções fúngicas além de candidíases acometem milhares de pessoas anualmente, principalmente imunocomprometidos. Sendo assim *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* spp. e dermatófitos como *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum*, podem ser investigados.
- ✓ Investigar de forma mais profunda os mecanismos de ação destas moléculas visando o uso da microscopia de transmissão eletrônica como auxiliar na visualização de possíveis alterações intracelulares que estes compostos possam estar exercendo. Técnicas moleculares também podem ser úteis para investigar possíveis efeitos sobre o DNA das células fúngicas, impedindo o seu desenvolvimento e enzimas envolvidas na síntese do ergosterol.
- ✓ Avaliar a influência destes compostos sobre os fatores de virulência exercidos pelos fungos, e sua interferência nas diferentes etapas do processo de infecção fúngica.
- ✓ Estudar os demais possíveis efeitos tóxicos destas moléculas (hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, entre outros) e sua rota metabólica, incluindo a forma de excreção e possível acúmulo de metabólitos sobre tecidos, visando avaliações em modelos *ex vivo*, em busca de resultados mais próximos ao organismo humano.
- ✓ Avaliar o possível desenvolvimento de resistência dos microrganismos a estes compostos através da sua exposição por tempo prolongado, e quais os possíveis mecanismos de adaptação desenvolvidos por estes microrganismos.

## 9 REFERÊNCIAS

- Abed NA, Shaaban S, Abdel-latif E. 2015. Synthesis and antitumor activity of some new symmetrical diselenide derivatives. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 6(4):1655-1665.
- Abu-Elteen KH, Hamad MA. 2012. Changing Epidemiology of Classical and Emerging Human Fungal Infections: A Review. *Jordan Journal of Biological Sciences*. 5(4):215-230.
- Abrigach F, Rokni Y, Takfaoui A, Khoutoul M, Doucet H, Asehraou A, Touzani R. 2018. In vitro screening, homology modeling and molecular docking studies of some pyrazole and imidazole derivatives. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 103:653-661.
- ACD/ChemSketch 2016.2, Advanced Chemistry Development 33 Richmond St. West, Suite 605, Toronto, ON MSH 2L3, Canada.
- Aguilar-Zapata D, Petraitiene R, Petraitis V. 2015. Echinocandins: The Expanding Antifungal Armamentarium. *Clinical Infectious Diseases*. 61(6):604-611.
- Alsomali MI, Arnold MA, Frankel WL, Graham RP, Hart PA, Lam-Himlin DM, Naini BV, Voltaggio L, Arnold CA. 2017. Challenges to “Classic” Esophageal Candidiasis: Looks Are Usually Deceiving. *American Journal of Clinical Pathology*. 147(1):33-42.
- Arendrup MC, Patterson TF. 2017. Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *The Journal of Infectious Diseases*. 216(sup.3):S445-S451.
- Azanza PJR. 2016. Echinocandins: Applied pharmacology. *Revista Iberoamericana de Micología*. 33(3):140-144.
- Barnett JA. 2004. A history of research on yeasts 8: taxonomy. *Yeast*. 30;21(14):1141-1493.
- Baquedano Y, Alcolea V, Toro MÁ, Gutiérrez KJ, Nguewa P, Font M, Moreno E, Espuelas S, Jiménez-Ruiz A, Palop JA, Plano D, Sanmartín C. 2016. Novel Heteroaryl Selenocyanates and Diselenides as Potent Antileishmanial Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 60(6):3802–3812.
- Batista BG, Dalla Lana DF, Silveira GP, Sá MM, Ferreira M, Russo TVC, Canto RFS, Barbosa FAR, Braga AL, Kaminski TFA, de Oliveira LFS, Machado MM, Lopes W, Vainstein MH, Teixeira ML, Andrade SF, Fuentefria AM. 2017. Allylic Selenocyanates as New Agents to Combat *Fusarium* Species Involved with Human Infections. *Chemistry Select*. 2(35):11926-11932.
- Bafeltowska JJ, Buszman E. 2005. Pharmacokinetics of fluconazole in the cerebrospinal fluid of children with hydrocephalus. *Chemotherapy*. 51(6):370-376.
- Bellmann R1, Smuszkiewicz P. 2017. Pharmacokinetics of antifungal drugs: practical implications for optimized treatment of patients. *Infection*. 45(6):737-779.
- Bergamo VZ, Donato RK, Nemitz MC, Acasigua GA, Selukar BS, Lopes W, Dalla Lana DF, Teixeira ML. 2016. Assessing an imidazolium salt's performance as antifungal agent on a mouthwash formulation. *Journal of Applied microbiology*. 121(6):1558-1567.
- Berkow EL, Lockhart SR. 2017. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. *Infection and Drug Resistance*. 10:237-245.

- Blostein F, Levin-Sparenberg E, Wagner J, Foxman B. 2017. Recurrent vulvovaginal candidiasis. *Annals of Epidemiology*. 27(9):575-582.
- Bondaryk M, Kurzątkowski W, Staniszevska M. 2013. Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: mode of action and resistance development. *Postepy Dermatologii i Alergologii*. 30(5):293-301.
- Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. 2017. Global and Multi-national Prevalence of Fungal Diseases - Estimate Precision. *Journal of Fungi*. 3(57):1-29.
- Braunsdorf C, LeibundGut-Landmann S. 2018. Modulation of the Fungal-host Interaction by the Intra-Species Diversity of *C. albicans*. *Pathogens*. 7(1): 1.
- Burgess DS, Hastings RW, Summers KK, Hardin TC, Rinaldi MG. 2000. Pharmacodynamics of fluconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Candida albicans*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 36(1):13-8.
- Burghout P, Vullo D, Scozzafava A, Hermans PW, Supuran CT. 2011. Inhibition of the  $\beta$ -carbonic anhydrase from *Streptococcus pneumoniae* by inorganic anions and small molecules: Toward innovative drug design of antiinfectives? *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 19(1):243-8.
- Bustamante B, Martins MA, Bonfiatti LX, Szeszs MW, Jacobs J, Garcia C, Melhem MS. 2017. Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* isolates from bloodstream infections in Lima, Peru. *Journal of Medical Microbiology*. 63(6):855-60.
- Campoy S, Adrio JL. 2017. Antifungals. *Biochemical Pharmacology*. 1(133):86-96.
- Carmona EM, Limper AH. Overview of Treatment Approaches for Fungal Infections. *Clinics in Chest Medicine*. 2017. 38(3):393-402.
- Chaffin WL. 2008. *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 72(3):495-544.
- Chakraborty P, Roy SS, Basu A, Bhattacharya S. 2016. Sensitization of cancer cells to cyclophosphamide therapy by an organoselenium compound through ROS-mediated apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 84:1992-1999.
- Chang YL, Yu SJ, Heitman J, Wellington M, Chen YL. 2017 New facets of antifungal therapy. *Virulence*. 8(2):222-236.
- Chao MN, Storey M, Li C, Rodríguez MG, Di Salvo F, Szajnman SH, Moreno SN, Docampo R, Rodriguez JB. 2017. Selenium-containing analogues of WC-9 are extremely potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* proliferation. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 25(24):6435-6449.
- Chew SY, Than LT. 2016. Vulvovaginal candidosis: contemporary challenges and the future of prophylactic and therapeutic approaches. *Mycoses*. 59(5):262-73.
- CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved Standard – Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Fourth Informational Supplement. CLSI document M27-S4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
- Clark NM, Grim SA, Lynch JP. 2015. Posaconazole: Use in the Prophylaxis and Treatment of Fungal Infections. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 36(5):767-85.

- Colombo AL, Guimarães T, Camargo LFA, Richtmann R, Queiroz-Telles F, Salles MJC, Cunha CA, Yasudag MAS, Moretti ML, Nucci M. 2013. Brazilian guidelines for the management of candidiasis – a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 17(3):283–312.
- Criseo G, Scordino F, Romeo O. Current methods for identifying clinically important cryptic *Candida* species. *Journal of Microbiological Methods*. 111:50-6.
- Csank C, Haynes K. 2000. *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. *FEMS Microbiology Letters*. 189(1):115-20.
- Dadar M, Tiwari R, Karthik K, Chakraborty S, Shahali Y, Dhama K. 2018. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microbial Pathogenesis*. 117:128-138.
- da Silva Dantas A, Lee KK, Raziunaite I, Schaefer K, Wagener J, Yadav B, Gow NA. 2016. Cell biology of *Candida albicans*-host interactions. *Current Opinion in Microbiology*. 34:111-118.
- Das RK, Bhattacharya S. 2005. Anti-tumour promoting activity of diphenylmethyl selenocyanate against two-stage mouse skin carcinogenesis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 6(2):181-8.
- Das RK, Hossain SU, Bhattacharya S. 2007. Protective effect of diphenylmethyl selenocyanate against CCl<sub>4</sub>-induced hepatic injury. *Journal of Applied Toxicology*. 27(6):527-37.
- Dhankhar S, Dhankhar S, Kumar S, Yadav JP. 2012. A Novel and Significant Method for Antioxidant Activity Utilizing Microtitre-plate (Resazurin Reducing Power Assay). *Current Chemical Biology*. 6(1):70-76.
- Doi AM, Pignatari AC, Edmond MB, Marra AR, Camargo LF, Siqueira RA, da Mota VP, Colombo AL. 2016. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian National Surveillance program. *PLoS ONE*. 11(1):e0146909.
- Domínguez-Gil HA, Sánchez NA, García SMJ. 2006. Therapeutic drug monitoring of itraconazole and the relevance of pharmacokinetic interactions. *Clinical Microbiology and Infection*. 12:97–106.
- Donnelley MA, Zhu ES, Thompson GR. 2016. Isavuconazole in the treatment of invasive aspergillosis and mucormycosis infections. *Infection and Drug Resistance*. 9:79-86.
- Douglas LM, Konopka JB. 2016. Plasma membrane organization promotes virulence of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Journal of Microbiology*. 54(3):178-191.
- EI-Bayoumy K, Sinha R. 2004. Mechanisms of mammary cancer chemoprevention by organoselenium compounds. *Mutation Research*. 13:551(1-2):181-197.
- Erikstein BS, Hagland HR, Nikolaisen J, Kulawiec M, Singh KK, Gjertsen BT, Tronstad KJ. 2010. Cellular Stress Induced by Resazurin Leads to Autophagy and Cell Death Via Production of Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Impairment. *Journal of Cellular Biochemistry*. 111(3):574-84.
- Facompre ND, EI-Bayoumy K, Sun YW, Pinto JT, Sinha R. 2010. 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate, but not selenomethionine, inhibits androgen receptor and Akt signaling in human prostate cancer cells. *Cancer Prevention Research*. 3(8):975-984.

- Fardin AM, Aliakbar R, Omid R. 2018. Antifungal agents: Polyene, azole, antimetabolite, other and future agents. *Journal of Basic Research in Medical Sciences*. 5(2): 48-55
- Farowski F, Vehreschild JJ, Cornely OA. 2007. Posaconazole: a next-generation triazole antifungal. *Future Microbiology*. 2(3):231-243.
- Fenech M. 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*. 455(1):81-95.
- Fiala ES, Sohn OS, Wang CX, Seibert E, Tsurutani J, Dennis PA, El-Bayoumy K, Sodum RS, Desai D, Reinhardt J, Aliaga C. 2005. Induction of preneoplastic lung lesions in guinea pigs by cigarette smoke inhalation and their exacerbation by high dietary levels of vitamins C and E. *Carcinogenesis*. 26(3):605-12.
- Fleischmann J, Broeckling CD, Lyons S. 2017. *Candida krusei* form mycelia along agar surfaces towards each other and other *Candida* species. 17(60):1-7.
- Francois I, Cammue B, Borgers M, Ausma J, Dispersyn G, Thevissen K. 2006. Azoles: Mode of Antifungal Action and Resistance Development. Effect of Miconazole on Endogenous Reactive Oxygen Species Production in *Candida albicans*. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*. 5(1):3–13.
- Free SJ. 2013. Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Advances in Genetics*. 81:33-82.
- Freires IA, Murata RM, 2, Furletti VF, Sartoratto A, de Alencar SM, Figueira GM, Rodrigues JAO, Duarte MCT, Rosalen PL. 2014. *Coriandrum sativum* L. (Coriander) Essential Oil: Antifungal Activity and Mode of Action on *Candida* spp., and Molecular Targets Affected in Human Whole-Genome Expression. *PLoS One*. 9(6):e99086.
- Frost DJ, Brandt KD, Cugier D, Goldman R. 1995. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. *The Journal of Antibiotics*. 48(4):306-10.
- Gonçalves B, Ferreira C, Alves CT, Henriques M, Azeredo J, Silva S. 2016. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. *Critical Reviews in Microbiology*. 42(6):905-27.
- Gow NAR, Hube B. 2012. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. *Current Opinion in Microbiology*. 15:406–412.
- Gow NAR, Yadav B. 2017. Microbe Profile: *Candida albicans*: a shape-changing, opportunistic pathogenic fungus of humans. *Microbiology*. 163(8):1145-1147.
- Green L, Dolen WK. 2017. Chronic Candidiasis in Children. *Current Allergy and Asthma Reports*. 17(5):31.
- Guillemin JC. 2011. Organic Selenocyanates: Synthesis, Characterization and Uses in Chemistry and Biology. *Current Organic Chemistry*. 15(11):1670 – 1687.
- Guinea J. 2014. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. *Clinical Microbiology and Infection*. 20(6):5-10.
- Guisbiers G, Lara HH, Mendoza-Cruz R, Naranjo G, Vincent BA, Peralta XG, Nash KL. 2017. Inhibition of *Candida albicans* biofilm by pure selenium nanoparticles synthesized by pulsed laser ablation in liquids. *Nanomedicine*. 13(3):1095-1103.
- Güez CM, Souza RO, Fischer P, Leão MFM, Duarte JA, Boligon AA, Athayde ML, Zuravski L, de Oliveira LFS, Machado MM. 2017. Evaluation of basil extract (*Ocimum basilicum* L.) on oxidative, anti-genotoxic and anti-inflammatory

- effects in human leukocytes cell cultures exposed to challenging agents. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 53(1):e15098.
- Guttenplan J, Chen KM, Khmel'nitsky M, Kosinska W, Hennessy J, Bruggeman R, Desai D, Amin S, Sun YW, Spratt TE, El-Bayoumy K. 2007. Effects of 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate on mutagenesis and p53 protein expression in the tongue of IacI rats treated with 4-nitroquinoline-N-oxide. *Mutation Research*. 634(1-2):146-55.
- Hadrich I, Ayadi A. 2018. Epidemiology of antifungal susceptibility: Review of literature. *Journal de Mycologie Medicale*. 14.S1156-5233(17)30366-9.
- Haghdoust NS, Salehi TZ, Khosravi A, Sharifzadeh A. 2016. Antifungal activity and influence of propolis against germ tube formation as a critical virulence attribute by clinical isolates of *Candida albicans*. *Journal de Mycologie Medicale*. 26(4):298-305.
- Huang M, Kao KC. 2012. Population dynamics and the evolution of antifungal drug resistance in *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Letters*. 333(2):85-93.
- Huang L, Xuan W, Sarna T, Hamblin MR. 2018. Comparison of thiocyanate and selenocyanate for potentiation of antimicrobial photodynamic therapy. *Journal of Biophotonics*. 8:e201800092.
- Iman M, Kaboutaraki HB, Jafari R, Hosseini SA, Moghimi A, Khamesipour A, Harchegani AB, Davood A. 2016. Molecular Dynamics Simulation and Docking Studies of Selenocyanate Derivatives as Anti-Leishmanial Agents. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 19(10):847-854.
- Jahagirdar VL, Davane MS, Aradhya SC, Nagoba BS. 2018. *Candida* species as potential nosocomial pathogens – A review. *Electronic Journal General Medicine*. 15(2):em05.
- Jenks JD, Salzer HJ, Prattes J, Krause R, Buchheidt D, Hoenigl M. 2018. Spotlight on isavuconazole in the treatment of invasive aspergillosis and mucormycosis: design, development, and place in therapy. *Drug Design, Development and Therapy*. 12:1033-1044.
- Kaur R, Domergue R, Zupancic ML, Cormack BP. 2005. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. *Current Opinion in Microbiology*. 8(4):378-84.
- Kaushik N, Pujalte GG, Reese ST. 2015. Superficial Fungal Infections. Primary care. 42(4):501–516.
- Kazempour ZB, Yazdi MH, Rafii F, Shahverdi AR. 2013. Sub-inhibitory concentration of biogenic selenium nanoparticles lacks post antifungal effect for *Aspergillus niger* and *Candida albicans* and stimulates the growth of *Aspergillus niger*. *Iranian Journal of Microbiology*. 5(1):81-5.
- Khosravi AR, Mansouri P, Saffarian Z, Vahedi G, Nikaein D. 2018. Chronic mucocutaneous candidiasis, a case study and literature review. *Journal de Mycologie Médicale*. 28(1):206-210.
- Kil J, Lobarinas E, Spankovich C, Griffiths SK, Antonelli PJ, Lynch ED, Le Prell CG. 2017. Safety and efficacy of ebselen for the prevention of noise-induced hearing loss: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet*. 390(10098):969-979.
- Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA. 1998. Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42(5):1207-12.

- Kobayashi D, Kondo K, Uehara N, Otokozawa S, Tsuji N, Yagihashi A, Watanabe N. 2002. Endogenous Reactive Oxygen Species Is an Important Mediator of Miconazole Antifungal Effect. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46(10):3113-7.
- Kofla G, Ruhnke M. 2011. Pharmacology and metabolism of anidulafungin, caspofungin and micafungin in the treatment of invasive candidosis: review of the literature. *European Journal of Medical Research*. 16(4):159-66.
- Kyriakidis I, Tragiannidis A, Munchen S, Groll AH. 2017. Clinical hepatotoxicity associated with antifungal agents. *Expert Opinion on Drug Safety*. 16(2):149-165.
- Laniado-Laborín R, Cabrales-Vargas MN. 2009. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Revista Iberoamericana de Micología*. 26(4):223-7.
- Lestner J, Hope WW. 2013. Itraconazole: an update on pharmacology and clinical use for treatment of invasive and allergic fungal infections. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 9(7):911-926.
- Li GX, Hu H, Jiang C, Schuster T, Lü J. 2007. Differential involvement of reactive oxygen species in apoptosis induced by two classes of selenium compounds in human prostate cancer cells. *International Journal of Cancer*. 120(9):2034-43.
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 46(1-3):3-26.
- Lo HJ, Köhler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. 1997. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*. 90(5):939-49.
- Lockhart SR. 2014. Current Epidemiology of *Candida* Infection. *Clinical Microbiology Newsletter*. 36(17):131-136.
- Machado MM, de Oliveira LF, Zuravski L, de Souza RO, Fischer P, Duarte JA, Rocha MO, Guez CM, Boligon AA, Athayde ML. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of hydroalcoholic extract of *Euphorbia tirucalli* (Euphorbiaceae) in cell cultures of human leukocytes. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 88(1):17-28.
- Manavathu EK, Cutright JL, Chandrasekar PH. 1998. Organism-Dependent Fungicidal Activities of Azoles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42(11):3018-21.
- Martins N, Ferreira IC, Barros L, Silva S, Henriques M. 2014. Candidiasis: Predisposing Factors, Prevention, Diagnosis and Alternative Treatment. *Mycopathologia*. 177(5-6):223-240.
- Markovic D, Katic J, Stojkovic R, Borovic S, Zarkovic N, Fucic A. 2013. Lipid peroxidation, detoxification capacity, and genome damage in mice after transplacental exposure to pharmaceutical drugs. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 46(12): 1014-1020.
- Mayer FL, Kronstad JW. 2017. Discovery of a Novel Antifungal Agent in the Pathogen Box. *mSphere*. 2(2):e00120-17.
- McCarthy MW, Kontoyiannis DP, Cornely OA, Perfect JR, Walsh TJ. 2017. Novel Agents and Drug Targets to Meet the Challenges of Resistant Fungi. *The Journal of Infectious Disease*. 216(supl.3):S474-S483.
- McKenzie B, Kay G, Matthews KH, Knott RM, Cairns D. 2015. The hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) test to predict the ophthalmic irritation

- potential of a cysteamine-containing gel: Quantification using Photoshop1 and ImageJ. *International Journal of Pharmaceutics*. 490(1–2):1-8.
- McKim Junior JM. 2010. Building a Tiered Approach to *In Vitro* Predictive Toxicity Screening: A Focus on Assays with *In Vivo* Relevance. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 13(2):188–206.
- Meira HC, De Oliveira BM, Pereira IF, Naves MD, Mesquita RA, Santos VR. 2017. Oral candidiasis: A retrospective study of 276 Brazilian patients. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 21(3):351-355.
- Mesa-Arango AC, Trevijano-Contador N, Román E, Sánchez-Fresneda R, Casas C, Herrero E, Argüelles JC, Pla J, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O. 2014. 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*. 58(11):6627-38.
- Miron D, Battisti F, Silva FK, Lana AD, Pippi B, Casanova B, Gnoatto S, Fuentefria AM, Mayorga P, Schapoval EES. 2014. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 24(6):660-667.
- Moazeni M, Asgari S, Nabili M. Nosocomial fungal infections: Epidemiology, diagnosis, treatment and prevention. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 27(160):182-212.
- Morio F, Jensen RH, Le Pape P, Arendrup MC. 2017. Molecular basis of antifungal drug resistance in yeasts. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 50(5):599-606.
- Morris MI, Villmann M. 2006. Echinocandins in the management of invasive fungal infections, part 1. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 63(18):1693-703.
- Mount HO, Revie NM, Todd RT, Anstett K, Collins C, Costanzo M, Boone C, Robbins N, Selmecki A, Cowen LE. 2018. Global analysis of genetic circuitry and adaptive mechanisms enabling resistance to the azole antifungal drugs. *PLoS Genetics*. 14(4):e1007319.
- Naithani R. 2008. Organoselenium compounds in cancer chemoprevention. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 8(7):657-668.
- Nasim MJ, Witek K, Kincses A, Sarfraz M, Zeslowska E, Marc MA, Gajdács M, Spengler G, Nitek W, Latacz G, Karczewska E, Kiec-Kononowicz K, Jacob C, Handzlik J. 2018. Aromatic Selenocyanates as a New Class of Non-Mutagenic Antimicrobial Selenium Compounds with Pronounced Activity against Multidrug Resistant ESKAPE Bacteria. 2018:1-22.
- Neji S, Hadrich I, Trabelsi H, Abbes S, Cheikhrouhou S, Sellami H, Makni F, Ayadi A. 2017. Virulence factors, antifungal susceptibility and molecular mechanisms of azole resistance among *Candida parapsilosis* complex isolates recovered from clinical specimens. *Journal of biomedical science*. 24(67):1-16.
- Neto LNA, de Lima CAM, de Oliveira JF, de Souza ER, Buonafina MDS, Anjos VMN, Brayner FA, Alves LC, Neves RP, Mendonça-Junior FJB. 2017. Synthesis, cytotoxicity and antifungal activity of 5-nitro-thiophene-thiosemicarbazones derivatives. *Chemico-Biological Interactions*. 272:172-181.
- Nett JE. 2016. The Host's Reply to *Candida* Biofilm. *Pathogens*. 5(1):33.

- Nett JE, Andes DR. 2016. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. *Infectious Disease Clinics of North America*. 30(1):51-83.
- Ng KP, Kuan CS, Kaur H, Na SL, Atiya N1, Velayuthan RD. 2015. *Candida* species epidemiology 2000-2013: a laboratory-based report. *Tropical Medicine and International Health*. 20(11):1447-1453.
- Noble SM, Gianetti BA, Witchley JN. 2017. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nature Reviews Microbiology*. 15(2):96-108.
- Nogueira MF, Istel F, Jenull S, Walker LA, Gow NA and Lion T. 2017. Quantitative Analysis of *Candida* Cell Wall Components by Flow Cytometry with Triple-Fluorescence Staining. *Journal of Microbiology and Modern Techniques*. 2(1):1-9.
- Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A, Colombo AL. 2010. Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. *Clinical Infectious Diseases*. 51(5):561-70.
- O'Leary RA, Einav S, Leone M, Madách K, Martin C, Martin-Loeches I. 2018. Management of invasive candidiasis and candidaemia in critically ill adults: expert opinion of the European Society of Anaesthesia Intensive Care Scientific Subcommittee. *Journal of Hospital Infection*. 98(4):382-390.
- Palmisani E, Barco S, Cangemi G, Moroni C, Dufour C1, Castagnola E. 2017. Need of voriconazole high dosages, with documented cerebrospinal fluid penetration, for treatment of cerebral aspergillosis in a 6-month-old leukaemic girl. *Journal of Chemotherapy*. 29(1):42-44.
- Papon N, Courdavault V, Clastre M, Bennett RJ. Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. *PLoS Pathogens*. 9(9):e1003550.
- Patil A, Majumdar S. 2017. *Journal of Ocular Pharmacology Therapeutics*. Echinocandins in Ocular Therapeutics. 33(5):340-352.
- Peixoto LR, Rosalen PL, Ferreira GL, Freires IA, de Carvalho FG, Castellano LR, de Castro RD. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. *Archives of Oral Biology*. 73:179-185.
- Perfect JR. 2016. "Is there an emerging need for new antifungals?". *Expert Opinion on Emerging Drugs*. 21(2):129-131.
- Perlin DS. 2015. Echinocandin Resistance in *Candida*. *Clinical Infectious Disease*. 61(Sup6):S612-7.
- Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. 2017. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet. Infectious Disease*. 17(12):e383-e392.
- Peyton LR, Gallagher S, Hashemzadeh M. 2015. Triazole antifungals: a review. *Drugs Today*. 51(12):705-18.
- Pfaller MA, Messer SA, Rhomberg PR, Castanheira M. 2017. CD101, a long-acting echinocandin, and comparator antifungal agents tested against a global collection of invasive fungal isolates in the SENTRY 2015 Antifungal Surveillance Program. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 50(3):352-358.

- Plano D, Baquedano Y, Ibáñez E, Jiménez I, Palop JA, Spallholz JE, Sanmartín C. 2010. Antioxidant-Prooxidant Properties of a New Organoselenium Compound Library. *Molecules*. 15(10):7292-312.
- Prokopczyk B, Amin S, Desai DH, Kurtzke C, Upadhyaya P, El-Bayoumy K. 1997. Effects of 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate and selenomethionine on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced tumorigenesis in A/J mouse lung. *Carcinogenesis*. 18(9):1855-7.
- Rajiah K, Veettil SK, Kumar S, Mathew EM. 2012. Study on various types of infections related to balanitis in circumcised or uncircumcised male and its causes, symptoms and management. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 6(2):74-83.
- Richardson K, Cooper K, Marriott MS, Tarbit MH, Troke PF, Whittle PJ. 1990. Discovery of fluconazole, a novel antifungal agent. *Reviews of Infectious Diseases*. 12 (3):267-271.
- Richardson JP, Ho J, Naglik JR. 2018. *Candida*-Epithelial Interactions. *Journal of Fungi*. 4(1). pii: E22.
- Rodrigues CF, Silva S, Henriques M. 2014. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease*. 33(5):673-88.
- Roy S, Thompson D. 2015. Evolution of regulatory networks in *Candida glabrata*: learning to live with the human host. *FEMS Yeast Research*. 15(8):1-17.
- Ruiz-Herrera J, Elorza MV, Valentín E, Sentandreu R. 2006. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Research*. 6(1):14-29.
- Sá MM, Ferreira M, Lima ES, dos Santos I, Orlandi PP, Fernandes L. 2014. Antimicrobial activity of allylic thiocyanates derived from the Morita-Baylis-Hillman reaction. *Brazilian Journal of Microbiology*. 45(3):807-12.
- Saha D, Mridha D, Mondal S, Jana M, Kayal S. 2011. Organoselenium as a cancer chemopreventive agent against carcinogenesis. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 4(3):367-368.
- Sampaio P, Pais C. 2014. Epidemiology of Invasive Candidiasis and Challenges for the Mycology Laboratory: Specificities of *Candida glabrata*. *Current Clinical Microbiology Reports*. 1(1–2):1–9.
- Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C. 2015. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*. 58(2):2-13.
- Santi C, Bagnoli L. 2017. Celebrating Two Centuries of Research in Selenium Chemistry: State of the Art and New Prospective. *Molecules*. 22(12):2124.
- Santos ALS, Branquinha MH, Kneipp LF. 2017. Fungal infections: a veritable worldwide problem. *Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*. 1(1):1-2.
- Schell WA, Jones AM, Garvey EP, Hoekstra WJ, Schotzinger RJ, Alexander BD. 2017. Fungal CYP51 Inhibitors VT-1161 and VT-1129 Exhibit Strong In Vitro Activity against *Candida glabrata* and *C. krusei* Isolates Clinically Resistant to Azole and Echinocandin Antifungal Compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 61(3):e01817-16.
- Schmid W. 1975. The micronucleus test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. 31(1):9-15.
- Scorzoni L, de Paula E, Silva AC, Marcos CM, Assato PA, de Melo WC, de Oliveira HC, Costa-Orlandi CB, Mendes-Giannini MJ, Fusco-Almeida AM. 2017.

- Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. *Frontiers in Microbiology*. 8:36.
- Sekyere JO, Asante J. 2018. Emerging mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria and fungi: advances in the era of genomics. *Future Microbiology*. 13:241-262.
- Shahverdi AR, Fakhimi A, Mosavat G, Jafari-Fesharaki P, Rezaie S, Rezayat SM. 2010. Antifungal activity of biogenic selenium nanoparticles. *World Applied Sciences Journal*. 10(8):918-922.
- Shakibaie M, Forootanfar H, Golkari Y, Mohammadi-Khorsand T, Shakibaie MR. 2015. Anti-biofilm activity of biogenic selenium nanoparticles and selenium dioxide against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Proteus mirabilis*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 29(2015):235–241.
- Shimada T. 2017. Inhibition of Carcinogen-Activating Cytochrome P450 Enzymes by Xenobiotic Chemicals in Relation to Antimutagenicity and Anticarcinogenicity. *Toxicological Research*. 33(2):79-96.
- Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 36(2):288-305.
- Silva S, Rodrigues CF, Araújo D, Rodrigues ME, Henriques M. 2017. *Candida* Species Biofilms' Antifungal Resistance. *Journal of Fungi*. 3(1):8.
- Silveira GP, Ferreira M, Fernandes L, Moraski GC, Cho S, Hwang C, Franzblau SG, Sá MM. 2012. Allylic thiocyanates as a new class of antitubercular agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 22(20):6486-9.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1998 A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*. 175(1):184-191.
- Sobel JD, Recurrent vulvovaginal candidiasis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2016. 214(1):15-21
- Spampinato C, Leonardi D. 2013. *Candida* Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. *BioMed Research International*. 2013:204237.
- Stanzani M, Vianelli N, Cavo M, Maritati A, Morotti M, Lewis RE. 2017. Retrospective Cohort Analysis of Liposomal Amphotericin B Nephrotoxicity in Patients with Hematological Malignancies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 61(9). pii: e02651-16.
- Staniszewska M, Bondaryk M, Ochal Z. 2017. Role of Virulence Determinants in *Candida albicans*' Resistance to Novel 2-bromo-2-chloro-2-(4-chlorophenylsulfonyl)-1-phenylethanone. *Journal of Fungi*. 3(32):1-17.
- Staniszewska M, Bondaryk M, Swoboda-Kopec E, Siennicka K, Sygitowicz G, Kurzatkowski W. 2013. *Candida albicans* morphologies revealed by scanning electron microscopy analysis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 44(3):813-21.
- Suh SO, Blackwell M, Kurtzman CP, Lachance MA. 2006. Phylogenetics of Saccharomycetales, the ascomycete yeasts. *Mycologia*. 98(6):1006-17.
- Szabó Z, Sóczó G, Miszti C, Hermann P, Rozgonyi F. 2008. In vitro activity of fluconazole and amphotericin B against *Candida inconspicua* clinical isolates as determined by the time-kill method. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 55(1):53-61

- Tavares LC. 2004. QSAR: A Abordagem de Hansch. *Química Nova*. 27(4):631-639.
- Tamaian R, Moț A, Silaghi-Dumitrescu R, Ionuț I, Stana A, Oniga O, Nastasă C, Benedec D, Tiperciuc B. 2015. Study of the Relationships between the Structure, Lipophilicity and Biological Activity of Some Thiazolyl-carbonyl-thiosemicarbazides and Thiazolyl-azoles. *Molecules*. 20(12):22188-201.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*. 35(3):206-221.
- Tunca H, Berber AA, Çanakçı K, Tuna M, Yildiz SZ, Aksoy H. 2017. Synthesis, characterization, and determination of genotoxic effect of a novel dimeric 8-hydroxyquinoline Cd(II) SCN complex. *Drug and Chemical Toxicology*. 40(3):300-308.
- Toledo LG, Ramos MA, Spósito L, Castilho EM, Pavan FR, Lopes Éde O, Zocolo GJ, Silva FA, Soares TH, Dos Santos AG, Bauab TM, De Almeida MT. 2016. Essential Oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: A Strategy to Combat Fungal Infections Caused by *Candida* Species. *International Journal of Molecular Sciences*. 17(8). pii: E1252.
- Vallabhaneni S, Kallen A, Tsay S, Chow N, Welsh R, Kerins J, Kemble SK, Pacilli M, Black SR, Landon E, Ridgway J, Palmore TN, Zelzany A, Adams EH, Quinn M, Chaturvedi S, Greenko J, Fernandez R, Southwick K, Furuya EY, Calfee DP, Hamula C, Patel G, Barrett P, Lafaro P, Berkow EL, Moulton-Meissner H, Noble-Wang J, Fagan RP, Jackson BR, Lockhart SR, Litvintseva AP, Chiller TM. 2017. Investigation of the First Seven Reported Cases of *Candida auris*, a Globally Emerging Invasive, Multidrug-Resistant Fungus-United States, May 2013-August 2016. *American Journal of Transplantation*. 17(1):296-299.
- Vandeputte P, Ferrari S, Coste AT. 2012. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *International Journal of Microbiology*. 2012:713687.
- Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. 2002. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*. 45(12):2615-23.
- Vuichard D, Weisser M, Orasch C, Frei R, Heim D, Passweg JR, Widmer AF. 2014. Weekly use of fluconazole as prophylaxis in haematological patients at risk for invasive candidiasis. *BMC Infectious Disease*. 14(573):1-9.
- Yamazaki H, Kondo T, Aoki K, Yamashita K, Takaori-Kondo A. 2018. Occurrence and improvement of renal dysfunction and serum potassium abnormality during administration of liposomal amphotericin B in patients with hematological disorders: A retrospective analysis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 90(2):123-131.
- Yüzbaşıoğlu D, Unal F, Yilmaz S, Aksoy H, Celik M. 2008. Genotoxicity testing of fluconazole in vivo and in vitro. *Mutation Research*. 8;649(1-2):155-60.
- Zhao M, Lepak AJ, VanScoy B, Bader JC, Marchillo K, Vanhecker J, Ambrose PG, Andes DR. 2018. In Vivo Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of APX001 against *Candida* spp. in a Neutropenic Disseminated Candidiasis Mouse Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 62(4):e02542-17.
- Zhou Y, Liao M, Zhu C, Hu Y, Tong T, Peng X, Li M, Feng M, Cheng L, Ren B, Zhou X. 2018. *ERG3* and *ERG11* genes are critical for the pathogenesis of

- Candida albicans* during the oral mucosal infection. International Journal of Oral Science. 10(9):1-8.
- Zonaro E, Lampis S, Turner RJ, Qazi SJS, Vallini G. 2015. Biogenic selenium and tellurium nanoparticles synthesized by environmental microbial isolates efficaciously inhibit bacterial planktonic cultures and biofilms. *Frontiers in Microbiology*. 6:584.
- Wadhvani SA, Shedbalkar UU, Singh R, Chopade BA. 2016. Biogenic selenium nanoparticles: current status and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 100(6):2555-66.
- Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. 2017. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* species. *Frontiers in Microbiology*. 7(2173):1-12.
- Wiederhold NP. 2018. The antifungal arsenal: alternative drugs and future targets. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 51(3):333-339.
- Wilke M. 2011. Treatment and prophylaxis of invasive candidiasis with anidulafungin, caspofungin and micafungin and its impact on use and costs: review of the literature. *European Journal of Medical Research*. 16(4):180-6.
- Wrobel JK, Power R, Toborek M. 2016. Biological activity of selenium: Revisited. *IUBMB Life*. 68(2):97-105.

#### **Livros:**

- Calderone RA, Clancy CJ (Eds). 2012. ***Candida* and Candidiasis**, ASM Press/Washington. 14 p.
- Davey P et al (Eds). 2015. **Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford University Press/USA. 77 p.
- Dean PM, Lewis RA (Eds). 2002 **Molecular Diversity in Drug Design**, Kluwer Academic Publishers/USA. 31 p.
- Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (Eds). 2010. **The Yeasts: A Taxonomic Study**, Elsevier/USA. 11 p.
- Mora-Montes HM, Lopes-Bezerra LM (Eds). 2017. **Current Progress in Medical Mycology**. Springer International Publishing/ Switzerland. 92 p.
- Sidhartha DR (Ed). 2015. **Side Effects of Drugs Annual**, Elsevier/UK. 317 p.
- Prasad R (Ed). 2017. ***Candida albicans*: Cellular and Molecular Biology**, Springer International Publishing/ Switzerland. 41 p.
- Schlosserg D (Ed). 2015. **Clinical Infectious Disease**, Cambridge University Press/UK. 1104 p.
- Tew KD, Galli F (Eds). 2017. **Selenium and Selenoproteins in Cancer**, Academic Press Elsevier/EUA, 260 p.

#### **Internet:**

- ICCVMA - Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. **The Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method**. 2010. Research Triangle Park: National Toxicology Program; 2010. Disponível em: < <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/protocols/ivocular-hetcam.pdf>>. Acesso em: 06 jul. 2018.

MMV - Medicines for Malaria Venture. **The Pathogen Box**. 2018. Switzerland, Geneva: MMV; 2018. Disponível em: <<http://www.pathogenbox.org/>> Acesso em: 30 mai. 2018.