

Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

BRUNA GRAZIELE MARQUES DA SILVA

**EFEITO DOS COMPOSTOS ORGANOCALCOGÊNEOS disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> E *p*-cloro disseleneto de difenila (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub> sobre *Candida albicans* E *Candida krusei*: INIBIÇÃO da FORMAÇÃO de BIOFILME, CRESCIMENTO e ADESÃO em CÉLULAS ENDOCERVICAIS HUMANAS (HeLa)**

São José dos Campos, SP

2022

BRUNA GRAZIELE MARQUES DA SILVA

**EFEITO DOS COMPOSTOS ORGANOCALCOGÊNEOS disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> E *p*-cloro disseleneto de difenila (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub> sobre *Candida albicans* E *Candida krusei*: INIBIÇÃO da FORMAÇÃO de BIOFILME, CRESCIMENTO e ADESÃO em CÉLULAS ENDOCERVICAIS HUMANAS (HeLa)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Maricilia Silva Costa  
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto-Silva

São José dos Campos, SP

2022

## TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

### Ficha catalográfica

Silva, Bruna Grazielle Marques da  
Efeito dos compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> E p-cloro disseleneto de difenila (pCl-PhSe)<sub>2</sub> sobre Candida albicans e Candida krusei : inibição da formação de biofilme, crescimento e adesão em células endocervicais humanas (HeLa) / Bruna Grazielle Marques da Silva; orientadora, Maricilia Silva Costa; co-orientador Carlos Alberto Silva. - São José dos Campos, SP, 2022.

1 CD-ROM, 63 p.

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

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. Candida krusei. 3. Candida albicans. 4. Biofilme. I. Costa, Maricilia Silva, orient. II. Silva, Carlos Alberto, co-orient. III. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. IV. Título.

Eu, Bruna Grazielle Marques da Silva, autor(a) da obra acima referenciada:

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

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

São José dos Campos, 26 de Maio de 2022.



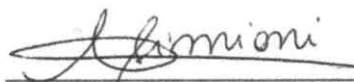
Autor(a) da Obra

**BRUNA GRAZIELE MARQUES DA SILVA**

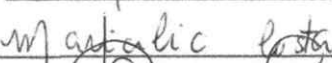
**“EFEITO DOS COMPOSTOS ORGANOCALCOGÊNEOS *disseleneto de difenila* (PhSe)<sub>2</sub> E *p.cloro disseleneto de difenila* (pCl-PhSe)<sub>2</sub> sobre *Candida albicans* E *Candida Krusei*: INIBIÇÃO da FORMAÇÃO de BIOFILME, CRESCIMENTO e ADESÃO em CÉLULAS ENDOCERVICAIS HUMANAS (HeLa).”**

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

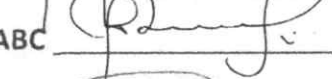
PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> ANDREZA RIBEIRO SIMIONI



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



PROF. DR. CARLOS ALBERTO-SILVA / UFABC



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



PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> HANA PAULA MASUDA /UFABC



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

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 05 de abril 2022.

**“Compreendi que o Amor encerra  
todas as vocações”.**

**Santa Teresinha do Menino Jesus e  
da Sagrada Face**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as graças desde o início da minha vida acadêmica, me proporcionando muitas realizações e bênçãos. À Nossa Senhora e à Santa Teresinha que intercedem por mim, durante todo meu doutorado e proveem todas as minhas conquistas.

À minha família que me devota muito amor, dedicação e compreensão. Principalmente aos meus pais, Ana Maria e Geraldo Antonio, que são o princípio de minha educação e minha irmã Vanessa, por todos os conselhos, por me auxiliar inúmeras vezes e me acolher. Agradeço também ao meu afilhado Lorenzo e minha sobrinha Helena, por serem meu incentivo diário em cada sorriso, abraço, beijinho e olhar cheio de amor.

Agradeço de forma póstuma, ao meu avô Cantílio, por ser minha inspiração de garra, foco, determinação, paciência, fé e sabedoria. Por me ensinar até hoje que uma pedra no caminho, não é nada, se não perdemos a fé. Ele me ensinará por toda a vida.

Ao meu esposo, Rodrigo, por todo companheirismo, paciência, apoio, carinho, amor, incentivo, ajuda, cuidado e devoção. Sou eternamente grata por tê-lo em minha vida e por apoiar meus sonhos.

Agradeço a Prof<sup>a</sup> Dra. Maricilia Silva Costa, pela confiança, ensinamentos e paciência que me concede, ajudando sempre a me superar e buscar soluções e respostas em cada passo do meu projeto. Além de me aconselhar em diversos momentos, por todos os “puxões de orelha” e me ensinar muito além da pesquisa científica.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Carlos Alberto-Silva pelo apoio durante toda a trajetória do meu projeto, me disponibilizando toda atenção, cuidado e ensinamentos.

Agradeço aos amigos que fiz durante esse período, Me. Juliene, Me. Ana Paula, Dra. Isabela, Me. Victor e Dr. Moisés, por estarem sempre ao meu lado, me ajudando e incentivando durante as atividades, e principalmente, por me aguentarem em todas as minhas fases. Sou grata pela amizade que se originou do convívio do laboratório. E agradeço, principalmente, a Me Juliene que nos últimos quatro anos se tornou uma irmã de vida.

E aos meus amigos que me acompanham por longos anos e sempre me incentivam, apoiam e estão comigo. E aos meus parentes, por todo carinho.

Agradeço também a mim, que desde 2014 me desafiei na pesquisa científica. Com todos os erros, tropeços e empecilhos que tive, fui persistindo e dando além dos meus 100 %. Por vezes passei noites sem dormir, por vezes pensava em desistir, tive crises de pânico e ansiedade, mas continuei resistente ao meu objetivo e sonho. O meu objetivo sempre foi meu sonho; trabalhar com pesquisa e um dia obter um título. Os erros e acertos me amadureceram e me fizeram chegar até aqui.

Sou grata a Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, pelo ensino proporcionado a mim.

Ao Laboratório de Bioquímica Aplicada à Engenharia Biomédica, pela oportunidade de iniciar a minha carreira científica e disponibilização dos recursos para realizar o meu projeto.

Agradeço ao professor Dr. João Batista Teixeira da Rocha da Universidade Federal de Santa Maria por disponibilizar os compostos organocalcogêneos para a pesquisa deste trabalho.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes). Obrigada por acreditar e investir em mim.

## Lista de Figuras

Figura 1: Ilustração de desenvolvimento do biofilme	20
Figura 2: Estrutura molecular do composto disseleneto de difenila (PhSe) <sub>2</sub>	23
Figura 3: Estrutura molecular do composto <i>p</i> -cloro disseleneto de difenila - ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub>	23
Figura 4: Efeito de (PhSe) <sub>2</sub> ou ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub> sobre a cinética de crescimento de <i>C. albicans</i>	30
Figura 5: Efeito de diferentes concentrações de (PhSe) <sub>2</sub> ou ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub> sobre a formação de biofilme por <i>C. albicans</i>	32
Figura 6: Viabilidade do biofilme produzido em 6, 24 e 48 h após o tratamento com (PhSe) <sub>2</sub>	33
Figura 7: Viabilidade do biofilme produzido em 6, 24 e 48 h após o tratamento com ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub>	34
Figura 8: Aspectos morfológicos do biofilme produzido por <i>C. albicans</i> em 6 e 24 horas após o tratamento com (PhSe) <sub>2</sub> ou ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub>	35
Figura 9: Adesão de <i>C. albicans</i> em células HeLa na presença de (PhSe) <sub>2</sub> ou ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub>	36
Figura 10: Efeito de (PhSe) <sub>2</sub> (A) ou ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub> (B) sobre o crescimento de <i>C. krusei</i>	43
Figura 11: Efeito de (PhSe) <sub>2</sub> ou ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub> sobre a cinética de crescimento de <i>C. krusei</i>	44
Figura 12: Formação do biofilme produzido por <i>C. krusei</i> em 24 horas após o tratamento com (PhSe) <sub>2</sub> ou ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub>	45
Figura 13: Aspectos morfológicos do biofilme produzido por <i>C. krusei</i> 24 horas após o tratamento com (PhSe) <sub>2</sub> ou ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub>	46
Figura 14: Adesão de <i>C. krusei</i> em placa de poliestireno após o tratamento com (PhSe) <sub>2</sub> ou ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub>	47
Figura 15: Viabilidade das células HeLa após o tratamento com os compostos (PhSe) <sub>2</sub> e ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub>	48
Figura 16: Adesão de <i>C. krusei</i> em células HeLa na presença de (PhSe) <sub>2</sub> ou ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub>	49

## Lista de Abreviações

ATCC: de American Type Culture Collection (Tradução - Coleção de Cultura Tipo Americana)

CO: compostos organocalcogêneos

(PhSe)<sub>2</sub>: disseleneto de difenila

(*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub>: *p*-cloro disseleneto de difenila

NAC: não-*albicans*

## RESUMO

O gênero *Candida* é considerado um fungo oportunista por causar infecções em pacientes imunossuprimidos. Sendo capaz de causar infecções superficiais até invasivas, podendo ser fatais. Dentre as espécies do gênero *Candida*, *Candida albicans* possui maior prevalência dos casos de candidoses e *Candida krusei* tem destaque por ser intrinsecamente resistente aos fármacos de escolha para o tratamento de fungemias. O potencial de virulência e patogenicidade desses fungos podem estar associados à sua capacidade de produzir biofilmes em superfícies abióticas e bióticas. O estudo de novas terapias é necessário uma vez que os fármacos de escolha têm se tornado menos eficazes em tratamentos dessas fungemias e sua patogenicidade. Os dois compostos orgânicos sintéticos, compostos organocalcogêneos, disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> e *p*-cloro disseleneto de difenila (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub>, foram utilizados neste estudo para avaliar o comportamento nas condições de crescimento, cinética de crescimento, viabilidade de biofilmes e em adesão em células endocervicais humanas (HeLa) nas duas espécies de *Candida*, *C. albicans* e *C. krusei*. Os dois compostos inibiram o crescimento e a adesão em células HeLa de *C. albicans* e *C. krusei*, principalmente na maior concentração utilizada dos compostos (20 μmol·L<sup>-1</sup>) e esse efeito foi maior com o (PhSe)<sub>2</sub>. A diminuição da viabilidade de biofilmes em diferentes estágios e a sua formação ocorreu em ambas as *Candidas* e com os dois compostos de forma dose-dependente. Em todas as condições analisadas neste estudo o composto (PhSe)<sub>2</sub> foi significativamente mais eficaz que o (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub> para inibir o desenvolvimento das duas espécies de *Candida*. Em suma os compostos (PhSe)<sub>2</sub> e (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub>, especialmente (PhSe)<sub>2</sub>, demonstraram ser potenciais drogas antifúngicas e eficazes contra *C. albicans* e *C. krusei*.

**Palavras-Chaves:** *candida krusei*; *candida albicans*; biofilme; células endocervicais hela; compostos organocalcogêneos.

## ABSTRACT

The *Candida* genus is considered an opportunistic fungus for causing infections in immunosuppressed patients. Being able to cause superficial to invasive infections, which can be fatal. Among the species of the genus *Candida*, *Candida albicans* has a higher prevalence of cases of candidiasis and *Candida krusei* stands out for being intrinsically resistant to the drugs of choice for the treatment of fungemia. The virulence and pathogenicity potential of these fungi may be associated with their ability to produce biofilms on abiotic and biotic surfaces. The study of new therapies is necessary since the drugs of choice have become less effective in treating these fungemia and their pathogenicity. The two synthetic organic compounds, organochalcogen compounds, diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub> and *p*-chloro diphenyl diselenide (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub>, were used in this study to evaluate the behavior under growth conditions, growth kinetics, biofilm viability and adhesion in human endocervical cells (HeLa) in the two *Candida* species, *C. albicans* and *C. krusei*. Both compounds inhibited growth and adhesion in HeLa cells of *C. albicans* and *C. krusei*, mainly at the highest concentration of compounds used (20 μmol·L<sup>-1</sup>) and this effect was greater with (PhSe)<sub>2</sub>. The decrease in the viability of biofilms at different stages and their formation occurred in both *Candidas* and with the two compounds in a dose-dependent manner. Under all conditions analyzed in this study the compound (PhSe)<sub>2</sub> was significantly more effective than (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub> to inhibit the development of both *Candida* species. In summary, the compounds (PhSe)<sub>2</sub> and (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub>, especially (PhSe)<sub>2</sub>, proved to be potential antifungal drugs and effective against *C. albicans* and *C. krusei*.

**Keywords:** *candida albicans*; *candida krusei*; biofilm; hela endocervical cells; organochalcogen compounds.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>17</b>
2.1 Fungos e Gênero <i>Candida</i>	17
2.2 <i>Candida albicans</i>	17
2.3 <i>Candida krusei</i>	18
2.4 Biofilme microbiano	19
2.5 Resistência e antifúngicos convencionais	21
2.6 Compostos organocalcogêneos (PhSe) <sub>2</sub> e (pCl-PhSe) <sub>2</sub>	22
2.7 Células endocervicais humanas (HeLa)	23
<b>3. OBJETIVO</b>	<b>25</b>
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos específicos	25
 <b>Artigo 1 - “(PhSe)<sub>2</sub> and (pCl-PhSe)<sub>2</sub> organochalcogen compounds inhibit <i>Candida albicans</i> adhesion to human endocervical (HeLa) cells and show anti-biofilm activities”</b>	
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>26</b>
4.1 Condições de crescimento de <i>C. albicans</i>	26
4.2 Efeito dos compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila (PhSe) <sub>2</sub> e <i>p</i> -cloro disseleneto de difenila (pCl-PhSe) <sub>2</sub> sobre a cinética de crescimento de <i>C. albicans</i>	26

4.3 Efeito dos compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila (PhSe) <sub>2</sub> e <i>p</i> -cloro disseleneto de difenila ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub> sobre a formação de biofilme de <i>C. albicans</i>	27
4.4 Efeito dos compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila (PhSe) <sub>2</sub> e <i>p</i> -cloro disseleneto de difenila ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub> sobre a formação de biofilme de <i>C. albicans</i> em diferentes estágios do desenvolvimento	27
4.5 Condições de cultura de células HeLa	28
4.6 Adesão de <i>C. albicans</i> em células HeLa após o tratamento com os compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila (PhSe) <sub>2</sub> e <i>p</i> -cloro disseleneto de difenila ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub>	28
4.7 Análise estatística	29
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>30</b>
5.1 Efeito dos compostos organocalcogêneos (PhSe) <sub>2</sub> e ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub> sobre a cinética de crescimento de <i>C. albicans</i>	30
5.2 Efeito dos compostos organocalcogêneos (PhSe) <sub>2</sub> e ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub> sobre a formação de biofilme de <i>C. albicans</i> após 24 horas de tratamento	31
5.3 Efeito dos compostos organocalcogêneos (PhSe) <sub>2</sub> e ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub> sobre biofilmes de <i>C. albicans</i> em diferentes estágios do desenvolvimento	32
5.4 Análise morfológica de biofilme de <i>C. albicans</i> após o tratamento com compostos organocalcogêneos (PhSe) <sub>2</sub> e ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub>	34
5.5 Adesão de <i>C. albicans</i> em células HeLa após o tratamento com os compostos organocalcogêneos (PhSe) <sub>2</sub> e ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub>	36

**Artigo 2 - "Diphenyl diselenide suppresses key virulence factors of *Candida krusei*, a neglected fungal pathogen"**

<b>6. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>37</b>
6.1 Condições de crescimento de <i>C. krusei</i>	37
6.2 Ensaio dos compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila (PhSe) <sub>2</sub> e <i>p</i> -cloro disseleneto de difenila ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub> sobre o crescimento de <i>C. krusei</i>	37
6.3 Ensaio dos compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila (PhSe) <sub>2</sub> e <i>p</i> -cloro disseleneto de difenila ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub> sobre a cinética de crescimento <i>C. krusei</i>	38
6.4 Ensaio dos compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila (PhSe) <sub>2</sub> e <i>p</i> -cloro disseleneto de difenila ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub> sobre a formação de biofilme de <i>C. krusei</i>	38
6.5 Ensaio dos compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila (PhSe) <sub>2</sub> e <i>p</i> -cloro disseleneto de difenila ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub> sobre a adesão de <i>C. krusei</i> em superfície de poliestireno	39
6.6 Condições de cultura de células HeLa	40
6.7 Efeito dos compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila (PhSe) <sub>2</sub> e <i>p</i> -cloro disseleneto de difenila ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub> sobre a viabilidade celular das células HeLa	40
6.8 Adesão de <i>C. krusei</i> em células HeLa após o tratamento com os compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila (PhSe) <sub>2</sub> e <i>p</i> -cloro disseleneto de difenila ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub>	41
6.9 Análise estatística	41
<b>7. RESULTADOS</b>	<b>42</b>
7.1 Efeito dos compostos organocalcogêneos (PhSe) <sub>2</sub> e ( <i>p</i> Cl-PhSe) <sub>2</sub> sobre o crescimento de <i>C. krusei</i>	42

7.2 Efeito dos compostos organocalcogêneos (PhSe) <sub>2</sub> e (pCl-PhSe) <sub>2</sub> sobre a cinética de crescimento de <i>C. krusei</i>	43
7.3 Efeito dos compostos organocalcogêneos (PhSe) <sub>2</sub> e (pCl-PhSe) <sub>2</sub> sobre a formação de biofilme de <i>C. krusei</i> após 24 horas de tratamento	44
7.4 Análise morfológica de biofilme de <i>C. krusei</i> após o tratamento com os compostos organocalcogêneos (PhSe) <sub>2</sub> e (pCl-PhSe) <sub>2</sub>	45
7.5 Efeito dos compostos organocalcogêneos (PhSe) <sub>2</sub> e (pCl-PhSe) <sub>2</sub> sobre a adesão de <i>C. krusei</i> em superfície de poliestireno	46
7.6 Viabilidade celular das células HeLa após o tratamento com os compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila (PhSe) <sub>2</sub> e <i>p</i> -cloro disseleneto de difenila (pCl-PhSe) <sub>2</sub>	47
7.7 Adesão de <i>C. krusei</i> em células HeLa após o tratamento com os compostos (PhSe) <sub>2</sub> e (pCl-PhSe) <sub>2</sub>	48
<b>8. DISCUSSÃO</b>	<b>50</b>
<b>9. CONCLUSÃO</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO A – Artigo 1</b>	<b>63</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As leveduras são fungos unicelulares e possuem reprodução assexuada por gemulação ou brotamento. Outra característica desses fungos é a formação de hifas e de pseudo hifas (BARBEDO *et al.*, 2010; NIKOU *et al.*, 2019). Algumas leveduras possuem forma de vida de comensalismo, como o gênero *Candida*. As infecções causadas pelo gênero *Candida* podem causar infecções superficiais e sistêmicas em pacientes imunocomprometidos, sendo capazes de provocar a morte do indivíduo (BARBEDO *et al.*, 2010; NIKOU *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2020; CULLEN *et al.*, 2012).

O fungo do gênero *Candida* está presente em 80% das infecções hospitalares (COLOMBO *et al.*, 2003). Dentre as espécies de *Candida*, a *Candida albicans* está presente em 50% do total dos casos de candidíase (BARBEDO *et al.*, 2010; COLOMBO *et al.*, 2003), sendo relatada como a espécie mais prevalente produzindo infecções nosocomiais em hospitais dos Estados Unidos da América (WISPLINGHOFF *et al.*, 2014). *C. albicans* é um fungo dimórfico capaz de promover a transição de levedura para formas filamentosas, uma etapa essencial para a formação de biofilmes. O biofilme é uma fase crucial para a colonização e virulência (SARDI *et al.*, 2011 e 2014; PEREIRA *et al.*, 2020).

Todavia, na última década houve um aumento do número de candidíases ocasionadas por espécies de *Candida* não *albicans*, tais como *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Dentre as espécies de *Candida* não *albicans* (NAC), *Candida krusei* tem destaque por possuir resistência intrínseca aos fármacos comumente usados para o tratamento de infecções fúngicas, tais como os fármacos da classe dos azólicos, devido à diminuição da susceptibilidade da enzima lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilase, que atua bloqueando a conversão do lanosterol em ergosterol e alterando a permeabilidade da membrana do fungo (DESAI *et al.*, 2015; WISPLINGHOFF *et al.*, 2014; OROZCO *et al.*, 1998; SEYOUM *et al.*, 2020).

Segundo Colombo e colaboradores (2003), os pacientes neutropênicos tratados com Fluconazol (fármaco de classe dos azólicos) possuem incidência maior de candidíase ocasionada por *C. krusei*, uma vez que a resistência intrínseca deste fungo ao fármaco de escolha impede a ação do azólico para o

tratamento da fungemia (GÓMEZ-GAVIRIA *et al.*, 2020). A resistência do fungo *Candida krusei* pode estar associada à sua habilidade de formar biofilmes (JAMIU *et al.*, 2020), como também ocorre com *C. albicans*.

Os biofilmes são compostos por células de microrganismos que se desenvolvem em superfícies bióticas e abióticas. Para que ocorra a formação do biofilme se faz necessário quatro etapas. As quatro etapas compreendem em adesão celular numa superfície; sucedendo da formação de colônias; assim a matriz extracelular de polímeros é excretada e ocorre a maturação do biofilme sobre a superfície em que está estabelecido. E por fim, ocorre a dispersão dos microrganismos para a formação de novos biofilmes. A formação do biofilme dificulta a difusão de fármacos, como os azólicos, sendo considerado um fator de patogenicidade (DESAI *et al.*, 2015; HARDING *et al.*, 2009; TSUI *et al.*, 2016; NOBILE *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2020).

Com o aumento dessas fungemias, a habilidade de formar biofilmes e a crescente resistência às drogas de escolha para tratamentos antifúngicos, torna necessário o desenvolvimento de novos tratamentos para candidoses ocasionadas por *C. albicans* e *C. krusei*.

Os compostos organocalcogêneos são importantes reagentes utilizados em sínteses orgânicas (BRAGA *et al.*, 1997; PAULMIER *et al.*, 1986). São formados por elementos localizados no grupo 16 da tabela periódica, como oxigênio (O), enxofre (S), selênio (Se), telúrio (Te) e polônio (Po). Tem sido observado que estes compostos podem apresentar ação neuroprotetora, antitumoral, antimicrobiana, e podem funcionar como indutor de citocinas e imunomoduladores do sistema nervoso central (MACHADO *et al.*, 2009; NOGUEIRA *et al.*, 2004). O selênio é um componente estrutural presente em diversas enzimas que possuem propriedades antioxidantes. Por este motivo o interesse no desenvolvimento de compostos sintéticos contendo selênio tem aumentado, uma vez que antioxidantes têm capacidade de proteger células contra os efeitos dos radicais livres (STEFANELLO *et al.*, 2020).

Dentre os diversos compostos organocalcogêneos, o disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> apresenta propriedades neuroprotetoras (GHISLENI *et al.*, 2004) e demonstra efeito mutagênico fraco capaz de promover quebras no DNA de leveduras e bactérias (ROSA *et al.*, 2007). Foi observada atividade antimicrobiana do (PhSe)<sub>2</sub> sobre o crescimento de *C. albicans* (BILLACK *et al.*,

2009; NOGUEIRA *et al.*, 2004; ROSSETI *et al.*, 2015; DA SILVA *et al.*, 2021). Os compostos organocalcogêneos  $(\text{PhSe})_2$  e  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  não possuem mecanismo de ação descrito em literatura.

Dado a urgência para novas terapias antifúngicas contra candidíases, os compostos organocalcogêneos se mostram promissores como terapia alternativa para este fim. Este estudo teve como objetivo comparar em diferentes condições os efeitos de dois compostos organocalcogêneos,  $(\text{PhSe})_2$  e  $(p\text{Cl-PhSe})_2$ , bem como sua capacidade de agir nos fatores de virulência de *C. albicans* e *C. krusei* relacionados à adesão em células endocervicais humanas (HeLa), formação e viabilidade de biofilmes, crescimento e morfologia.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Fungos e Gênero *Candida*

Os fungos unicelulares não apresentam diferenciação morfológica entre as partes vegetativas e reprodutivas. Também, demonstram formato de suas células ovóides, alongadas e arredondadas. Tais tipos de células que possuem essas características são denominadas leveduras (BARBEDO *et al.*, 2010; NIKOU *et al.*, 2019).

As leveduras que possuem grande incidência e prevalência em infecções fúngicas invasivas e também muco cutâneas, dentre as leveduras temos o gênero *Candida*. Os fungos desse gênero possuem reprodução assexuada, vivem em comensalismo na microbiota normal e se manifestam em condições de imunossupressão do indivíduo. Outra característica é a formação de hifas e pseudohifas (BARBEDO *et al.*, 2010; NIKOU *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2020; CULLEN *et al.*, 2012).

Os indivíduos que são acometidos por afecções devido ao gênero *Candida*, são pacientes imunossuprimidos e/ou acometidos por enfermidades concomitantes, como diabetes, neoplasias, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e o uso excessivo de medicamentos, como antibióticos (COLOMBO *et al.*, 2003; NIKOU *et al.*, 2019; SARDI *et al.*, 2014; SEYOUM *et al.*, 2020).

Desde o início da década de 80 a prevalência de infecções fúngicas invasivas e muco cutâneas têm aumentado significativamente. O gênero *Candida* possui alta prevalência em infecções hospitalares por causar infecções superficiais e/ou sistêmicas e que podem provocar o óbito do indivíduo (SPELLBERG *et al.*, 2006; SEYOUM *et al.*, 2020).

### 2.2 *Candida albicans*

Entre as espécies de *Candida*, *Candida albicans* está presente em 50% do total dos casos de infecções (CARDOSO *et al.*, 2013). Sendo considerada a mais prevalente em conjuntura clínica. Em ambiente hospitalar é considerado o

terceiro patógeno mais prevalente e com alta taxa de mortalidade de até 70 % (MATHÉ *et al.*, 2013; DÍAZ-GARCIA *et al.*, 2019; NIKOU *et al.*, 2019).

*Candida albicans* é a espécie mais prevalente dentre as espécies do mesmo gênero e a literatura relata a crescente resistência desse fungo aos antifúngicos de uso convencional, como os azóis (WISPLINGHOFF *et al.*, 2014; WARRILOW *et al.*, 2019). Por ser um fungo dimórfico, possui capacidade de transitar da forma leveduriforme para a forma filamentosa, sendo esta classificada como uma fase essencial para a virulência e a colonização do fungo em formação de biofilme (SARDI *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2020). Os biofilmes de *Candida albicans* têm apresentado resistência aos fármacos de escolha mais conhecidos, Fluconazol e Anfotericina B (PEREIRA *et al.*, 2020; BILLACK *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2020, DESAI *et al.*, 2015).

Os estudos de novos tratamentos são de extrema relevância para intervenção da fungemia causada pela espécie.

### **2.3 *Candida krusei***

Na última década houve um aumento do número de infecções ocasionadas por espécies de *Candida* não *albicans*, tais como *C. auris*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Dentre as espécies de *Candida* não *albicans*, *Candida krusei* tem destaque por apresentar resistência intrínseca aos fármacos comumente usados para o tratamento de infecções fúngicas, tais como os fármacos da classe dos azóis, devido à diminuição da susceptibilidade da enzima 14 $\alpha$ -demetilase presente na estrutura do fungo (VILLAMIL *et al.*, 2020; WARRILOW *et al.*, 2019).

A infecção ocasionada por *C. krusei* está relacionada principalmente aos pacientes portadores de patologias hematológicas malignas e em casos de transplantados de medula óssea (GÓMEZ-GAVIRIA *et al.*, 2020; KAUR *et al.*, 2020). *Candida krusei* possui morfologia alongada, com formação de colônias diferenciadas que não tem propriedades especificadas, e ainda, detém ultraestrutura na formação de sua parede celular. Essa ultraestrutura se deve a sua composição celular complexa que estaria relacionada a resistência aos fármacos convencionais de tratamento das infecções ocasionadas pela espécie (SAMARANAYAKE *et al.*, 1994; JAMIU *et al.*, 2020).

Segundo Colombo e colaboradores (2003), os pacientes neutropênicos tratados com fármacos da classe dos azóis, apresentam maior incidência de candidíase ocasionada por *C. krusei*. Uma vez que a resistência intrínseca deste fungo ao fármaco de escolha impede a ação do azólico para o tratamento da fungemia (RICARDO *et al.*, 2020). A importância de novos estudos para terapias alternativas no tratamento dessa fungemia, possui extrema relevância.

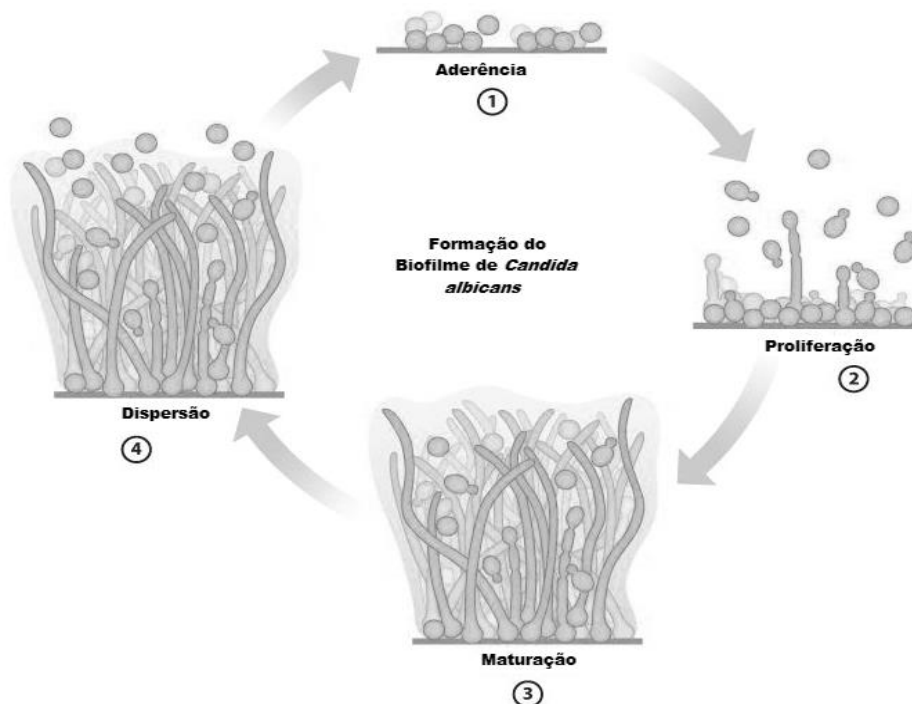
#### **2.4 Biofilme microbiano**

A formação do biofilme ocorre por adesão das células do microrganismo em superfícies ativas ou inativas em que a matriz extracelular de polímeros confere este efeito. No desenvolvimento do biofilme, além das células aderidas à superfície, há também as células planctônicas que estão presentes em forma de vida livre no biofilme (HARDING *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2020; RAMAGE *et al.*, 2005 e 2009). Devido à formação resistente que o biofilme possui, a difusão e penetração de fármacos pela estrutura formada do biofilme se tornam dificultadas, assim as terapias convencionais utilizadas como tratamento antifúngico se tornam ineficazes (DESAI *et al.*, 2015; BARBEDO *et al.*, 2010).

Somando essa realidade e a resistência aos tratamentos antifúngicos originados a partir do uso intensivo de substâncias derivadas dos azóis, tais como o fluconazol, fármaco comum para o tratamento de infecções fúngicas (RICARDO *et al.*, 2020) os estudos de novas terapias são fundamentais para a inibição do biofilme e diminuindo a viabilidade ou reduzindo a quantidade de células na forma filamentosa (sendo considerado um sinal de virulência do fungo) (RICARDO *et al.*, 2020; PEREIRA *et al.*, 2020).

A formação de biofilme é descrita em quatro etapas, que estão apresentadas a seguir na figura 1:

**Figura 1:** Ilustração de desenvolvimento do biofilme.



**Legenda:** Etapas de desenvolvimento de biofilme, sendo: 1- Adesão de células a um substrato biótico ou abiótico; 2- Proliferação de células, produzindo acumulação de células; 3- Maturação com formação de matriz extracelular; 4- Dispersão de células para novos focos.

**Fonte:** Adaptado de Nobile e Johnson, 2015.

A adesão de células em superfícies (abióticas e bióticas) para a formação de biofilme ocorre num período de 0 a 11 h, formando a camada de blastosporos. Em seguida temos a fase de proliferação em que as camadas de células formadas, pseudohifas e hifas são formadas nessa fase, sucedendo das próximas 12 a 30 h. A fase de maturação é quando o biofilme se torna mais resistente em relação às outras fases, isso acontece devido a excreção de matriz extracelular agrupadas no meio (biofilme de formação de 38 a 72 h). Já a dispersão, considerada a última etapa, compreende a disseminação das células para infectar novos alvos (TSUI *et al.*, 2016; NOBILE *et al.*, 2015). O biofilme num período de 0 a 11 h é considerado como um biofilme jovem, sendo mais sensível aos fármacos; de 12 a 23 h um período intermediário e a partir de 24 horas é considerado como biofilme maduro, quando sua resistência é maior aos tratamentos de escolha.

Devido a essa complexa formação do biofilme, a disseminação de antifúngicos no meio se torna dificultada. Os estudos bibliográficos sobre o aumento do uso indiscriminado de medicamentos relatam um agravante da resistência do biofilme. Algumas hipóteses são levadas em consideração em

relação a resistência de biofilmes, sendo às bombas de efluxo presentes na membrana celular que podem dificultar a penetração dos fármacos e a formação de matriz extracelular que confere proteção do biofilme contra os antifúngicos (VAN DIJCK *et al.*, 2013).

A formação de biofilmes vem agregando resistência aos antifúngicos, tornando importante novos estudos sobre terapias alternativas contra fungemias.

## 2.5 Resistência e antifúngicos convencionais

As diversas formas de apresentação das candidíases e sua significância clínica têm despertado o interesse de pesquisas em relação aos mecanismos de patogenicidade, fatores de virulência e a busca por novos tratamentos (WISPLINGHOFF *et al.*, 2014).

Os antifúngicos podem pertencer a muitas classes farmacológicas e ter como alvo várias vias metabólicas em espécies de *Candida*, alterando características fungistáticas ou fungicidas (BHATTACHARYA *et al.*, 2020).

As terapias antifúngicas convencionais empregadas no tratamento de fungemia necessitam de novos estudos para compreender a diminuição da eficácia destes, visto que os fungos estão se tornando resistentes (WISPLINGHOFF *et al.*, 2014; WARRILOW *et al.*, 2019). Tem sido observado um aumento na frequência das infecções resistentes à terapia antifúngica padrão, devido ao uso intensivo e repetitivo de antifúngicos (WARRILOW *et al.*, 2019; BILLACK *et al.*, 2009).

Os fármacos de escolha para o tratamento de fungemias são divididos em cinco classes, sendo os polienos (nistatina, anfotericina B), equinocandinas (casposfungina, por exemplo), os azóis como os fluconazol e voriconazol, os alilaminas (naftilina) e por último os análogos de pirimidina, como o fármaco flucitosina. Cada fármaco possui um mecanismo de ação em fungos. No caso dos polienos, são responsáveis por se ligarem ao ergosterol (molécula de colesterol presente nas membranas dos fungos) fazendo com que ocorra perda de componentes citosólicos. As equinocandinas atuam sobre a enzima  $\beta$ -sintase 1,3-glucano que é bloqueada inibindo a síntese da parede dos fungos. Os azóis inibem a enzima lanosterol 14 $\alpha$ -desmetilase, que é uma enzima presente na síntese do ergosterol, rompendo a membrana celular. Os fármacos de alilaminas

também atuam na biossíntese de ergosterol e os análogos de pirimidina interferem na síntese de DNA e RNA (SARDI *et al.*, 2014; WARRILOW *et al.*, 2019; VILLASMIL *et al.*, 2020).

Os fármacos mais comuns para o tratamento dessas fungemias, são o fluconazol e anfotericina B, possuem efeitos colaterais graves, como nefrotoxicidade. Levando a dificuldade da administração desses fármacos em infecções fúngicas, uma vez que sujeitam o indivíduo a infecções e doenças secundárias (VILLASMIL *et al.*, 2020). Levantando a questão de novas terapias para o tratamento de candidíases.

## 2.6 Compostos organocalcogêneos (PhSe)<sub>2</sub> e (pCl-PhSe)<sub>2</sub>

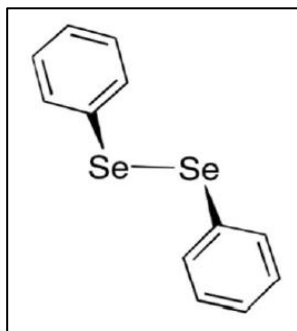
Os compostos organocalcogêneos são importantes intermediários e reagentes utilizados nas sínteses orgânicas (BRAGA *et al.*, 1997). São formados por elementos localizados no grupo 16 da tabela periódica, como: oxigênio (O), enxofre (S), selênio (Se), telúrio (Te) e polônio (Po). Tem sido observado que estes compostos podem apresentar ação neuroprotetora, antitumoral, antimicrobiana, e podem funcionar como indutor de citocinas e imunomoduladores do sistema nervoso central (MACHADO *et al.*, 2009; GIURG *et al.*, 2017). O selênio é um componente estrutural de diversas enzimas com propriedades antioxidantes (MACHADO *et al.*, 2009; NOGUEIRA *et al.*, 2004; STEFANELLO *et al.*, 2020), por este motivo o interesse no desenvolvimento de compostos sintéticos contendo selênio tem aumentado (STEFANELLO *et al.*, 2020).

Dentre os diversos compostos organocalcogêneos, o disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> (figura 2) apresenta propriedades antioxidantes e neuroprotetoras (MELO *et al.*, 2020; GHISLENI *et al.*, 2004). O (PhSe)<sub>2</sub> demonstra efeito mutagênico fraco capaz de promover quebras no DNA (ROSA *et al.*, 2007). Foi observada atividade antimicrobiana do (PhSe)<sub>2</sub> sobre o crescimento de *C. albicans* (BILLACK *et al.*, 2009; NOGUEIRA *et al.*, 2004).

O composto (pCl-PhSe)<sub>2</sub> (figura 3) possui um par de átomos de cloro, sendo cada um deles ligado ao grupo orgânico fenil. O composto (pCl-PhSe)<sub>2</sub> possui baixa eficiência em inibir o crescimento de *C. albicans*, entretanto é capaz de causar redução na formação do tubo germinativo (ROSSETI *et al.*, 2011).

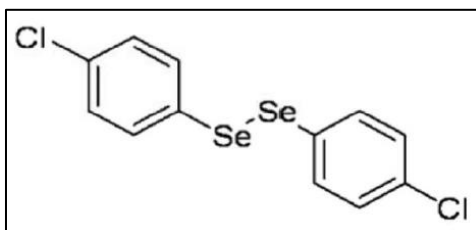
A utilização de diversos compostos organocalcogêneos está baseada no fato de que os compostos utilizados são estruturalmente relacionados ao  $(\text{PhSe})_2$  e que as alterações na molécula podem causar alterações na sua estrutura química, e conseqüentemente, em suas atividades biológicas sobre as células (ROSSETI *et al.*, 2011; KADE *et al.*, 2008; DE AMORIM *et al.*, 2018).

**Figura 2:** Estrutura molecular do composto disseleneto de difenila  $(\text{PhSe})_2$ .



**Fonte:** O autor.

**Figura 3:** Estrutura molecular do composto *p*-cloro disseleneto de difenila  $(p\text{Cl-PhSe})_2$ .



**Fonte:** O autor.

## 2.7 Células endocervicais humanas (HeLa)

Na década de 50 as células endocervicais humanas (HeLa) tiveram início do uso em pesquisas, devido a sua facilidade de manuseio e resistência em âmbito científico.

Curiosamente, as células HeLa são as primeiras de linhagem humana que sobreviveram *in vitro*, as primeiras amostras foram coletadas do colo de útero de uma mulher chamada Henrietta Lacks, sendo células cancerosas, devido a isso as células ganharam o nome de HeLa em homenagem a Henrietta. As células HeLa são consideradas de linhagem contínua, ou seja, possuem divisões infinitas não passando pelo processo de apoptose após um período de

multiplicação. A HeLa, mesmo sendo uma célula cancerígena, possui características próximas às células sem anormalidades, apresentando como células apropriadas para pesquisa e além de não ocorrer morte celular como em células normais (LAN *et al.*, 2017; TANG *et al.*, 2019).

O uso de células HeLa no presente estudo, possui importância devido a sua origem endocervical, mucosa onde é frequente infecções causadas pelo gênero *Candida*, o que contribui para um estudo verídico dos efeitos dos compostos e das condições realizadas neste trabalho.

Dado que compostos organocalcogêneos mostram-se promissores como terapia alternativa e a urgência para novas terapias antifúngicas contra infecções associadas ao gênero *Candida*. Este estudo teve como objetivo comparar a atividade antifúngica de dois compostos organocalcogêneos,  $(\text{PhSe})_2$  e  $(p\text{Cl-PhSe})_2$ , bem como sua capacidade de agir sobre os fatores de virulência de *C. albicans* e *C. krusei* relacionados à adesão em células endocervicais humanas (HeLa), viabilidade de biofilme, crescimento e morfologia.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos dos compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> e *p*-cloro disseleneto de difenila (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub> sobre *Candida albicans* e *Candida krusei*.

#### 3.2 Objetivos específicos

a). Avaliar os efeitos dos compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> e *p*-cloro disseleneto de difenila (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub>, sobre o crescimento, cinética de crescimento e viabilidade de biofilmes de *Candida albicans* e *Candida krusei*, em diferentes densidades de células e concentrações diferentes dos compostos;

b). Avaliar os efeitos dos compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> e *p*-cloro disseleneto de difenila (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub> sobre a adesão de *Candida krusei* em superfície de poliestireno com concentrações diferentes dos compostos;

c). Analisar os efeitos dos compostos sobre a morfologia do biofilme de *Candida albicans* e *Candida krusei*;

d). Avaliar a adesão de *Candida albicans* e *Candida krusei* em células endocervicais HeLa na presença dos compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> e *p*-cloro disseleneto de difenila (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub>.

**Artigo 1 - “(PhSe)<sub>2</sub> and (pCl-PhSe)<sub>2</sub> organochalcogen compounds inhibit *Candida albicans* adhesion to human endocervical (HeLa) cells and show anti-biofilm activities”**

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Condições de crescimento de *C. albicans***

Culturas de *C. albicans* (ATCC 10231) foram plaqueadas em ágar Sabouraud dextrose (Merck, Darmstadt, Hesse, Germany) e incubadas em ar atmosférico (37 °C). Após 48 horas de incubação, uma amostra das colônias foi removida da superfície da placa de ágar e ressuspensa em solução fisiológica estéril (0,85% NaCl). Após foram determinadas diferentes densidades celulares ( $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células viáveis.mL<sup>-1</sup>), utilizando a câmara de Neubauer na presença do corante vital azul de metileno (0,5 mg.mL<sup>-1</sup>).

### **4.2 Efeito dos compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> e *p*-cloro disseleneto de difenila (pCl-PhSe)<sub>2</sub> sobre a cinética de crescimento de *C. albicans***

Os ensaios foram realizados em tubos de ensaio com volume final de 2 mL para *C. albicans* em caldo Sabouraud dextrose (Merck, Darmstadt, Hesse, Germany). A concentração de células utilizada foi de  $10^5$  células viáveis.mL<sup>-1</sup> e as concentrações utilizadas de (PhSe)<sub>2</sub> e (pCl-PhSe)<sub>2</sub> foram de 2 e 10 µmol.L<sup>-1</sup>. Nas condições de controle as suspensões de *C. albicans* foram incubadas com DMSO 1 %, sendo este o solvente presente em todas as concentrações dos compostos. Foi utilizado DMSO 1 % devido à baixa toxicidade que apresenta nas células do fungo. Foi determinada a absorbância após o término do experimento. A primeira leitura realizada foi considerada como tempo zero. A absorbância foi novamente determinada após 2, 4 e 6 horas de incubação do crescimento. A partir de 6 horas de incubação o crescimento foi analisado de 1 em 1 hora até completar o período de 24 horas de crescimento de *C. albicans*. Para análise foram feitas alíquotas de 100 µL (duplicata) em placas de microtitulação de 96 poços e determinada a absorbância em 570 nm (OD<sub>570</sub>), utilizando o leitor de

microplacas Synergy HT multi-Detecção Microplate Reader (Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

#### **4.3 Efeito dos compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> e *p*-cloro disseleneto de difenila (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub> sobre a formação de biofilme de *C. albicans***

As suspensões de *C. albicans* ( $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células viáveis.mL<sup>-1</sup>) foram semeadas em placas de microtitulação de 96 poços na presença de (PhSe)<sub>2</sub> e (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub> em concentrações de 1, 2, 5 10 e 20 µmol.L<sup>-1</sup> e em meio RPMI-1640 (Sigma. St Louis, MO, USA), resultando num volume final de 200 µL. As placas foram incubadas em estufa microbiológica (37 °C) por 24 horas para formação do biofilme. Após os tratamentos, as células foram lavadas três vezes com PBS estéril a fim de retirar as células não aderidas. Posteriormente foram feitas alíquotas de 200 µL de PBS (final) e acrescidos de 20 µL de 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) Molecular Probes) e de menadione 0,4mM (Sigma, MO, EUA), numa proporção de 9:1 para verificar o metabolismo do biofilme. As células foram incubadas por aproximadamente 2 horas em estufa microbiológica em ar atmosférico (37 °C). Após esse período de incubação, a absorbância do produto formado foi determinada em 490 nm (OD<sub>490</sub>) utilizando o leitor de microplacas Synergy HT Multi-Detection. Os experimentos foram realizados em duplicata (n=8) e no grupo controle houve a ausência dos compostos organocalcogêneos.

#### **4.4 Efeito dos compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> e *p*-cloro disseleneto de difenila (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub> sobre a formação de biofilme de *C. albicans* em diferentes estágios do desenvolvimento**

Diferentes densidades celulares ( $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células viáveis.mL<sup>-1</sup>) de *C. albicans* foram alíquotadas em placas de 96 poços contendo RPMI-1640 (Sigma. St Louis, MO, USA), resultando num volume final de 200 µL. As placas foram incubadas por períodos diferentes de 6, 24 e 48 horas em estufa microbiológica à 37 °C. Posteriormente as células foram lavadas com a solução de PBS estéril por três vezes. Após a lavagem, as placas foram incubadas com

a presença dos compostos  $(\text{PhSe})_2$  e  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  nas concentrações de 2, 5, 10 e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e RPMI-1640 (Sigma, St Louis, MO, USA) num volume final de 200  $\mu\text{L}$  por 24 horas em estufa à 37 °C. Após esse período as placas foram lavadas 3 vezes com PBS estéril e acrescidos 200  $\mu\text{L}$  de PBS em cada poço. Foram feitas alíquotas em cada poço de 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) (Molecular Probes) e de menadione 0,4 mM (Sigma, MO, EUA), numa proporção de 9:1. As placas foram mantidas em estufa microbiológica em ar atmosférico (37 °C) por 2 horas aproximadamente. Em seguida, a absorbância foi determinada em 490 nm ( $\text{OD}_{490}$ ) utilizando o leitor de microplacas Synergy HT Multi-Detection. Os experimentos foram realizados em duplicata ( $n=5$ ) e no grupo controle houve a ausência dos compostos organocalcogêneos e a presença de DMSO 1 % (solvente presente nas concentrações dos compostos).

O biofilme formado foi observado por microscopia óptica, utilizando um microscópio de sistema invertido para observar possíveis alterações morfológicas após o tratamento com os compostos.

#### **4.5 Condições de cultura de células HeLa**

Células humanas endocervicais HeLa (ATCC CCL-2) foram cultivadas em meio DMEM (Sigma-Aldrich) que foi suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (Gibco, Waltham, USA), Penicilina à 1 % de 10.000 U mL, Streptomina numa concentração de 10  $\text{mg.mL}^{-1}$  e Anfotericina B à 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Sigma- Aldrich) que foram condicionadas à 37 °C em 5 % de  $\text{CO}_2$  e 95 %  $\text{O}_2$  (Water Jacketed  $\text{CO}_2$  Incubator, Thermo Scientific). Numa concordância de 80 % as células foram submetidas a uma solução de tripsina-EDTA, sendo 0,05 % de tripsina e 0,02 % de EDTA.

#### **4.6 Adesão de *C. albicans* em células HeLa após o tratamento com os compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila $(\text{PhSe})_2$ e *p*-cloro disseleneto de difenila $(p\text{Cl-PhSe})_2$**

As células HeLa foram semeadas em placas de 96 poços (Nest Biotechnology, Rahway, USA) numa densidade celular de  $1 \times 10^5$  por 24 h à 37

°C em 5 % de CO<sub>2</sub> e 95 % O<sub>2</sub> (Water Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator, Thermo Scientific) para as células crescerem até a densidade de  $2 \times 10^5$ , numa confluência de 90 %. As células foram lavadas duas vezes com PBS para retirar as células não aderidas e o meio de cultura. Assim, 20 µL de meio DMEM com Soro Fetal Bovino contendo uma suspensão de *C. albicans* (MOI 50:1) e em concentrações 2, 5, 10 e 20 µmol.L<sup>-1</sup> de (PhSe)<sub>2</sub> e (pCl-PhSe)<sub>2</sub> foram incubadas por 2 h à 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub> (5 %). Logo após, as células foram lavadas duas vezes com PBS. As células HeLa foram lisadas com água destilada estéril (200 µL) por 40 min à 37°C. Uma alíquota (20 µL) foi pipetada em placas de 24 poços contendo caldo Sabouraud dextrose (Merck, Darmstadt, Hesse, Germany) em que foram incubadas por 24 h à 37°C. Foi determinada a absorbância em 570 nm (OD<sub>570</sub>) com o leitor SpectraMax (Molecular Devices, CA, USA). Os experimentos foram realizados em triplicata (n=4) e no grupo controle houve a ausência dos compostos organocalcogêneos.

#### **4.7 Análise estatística**

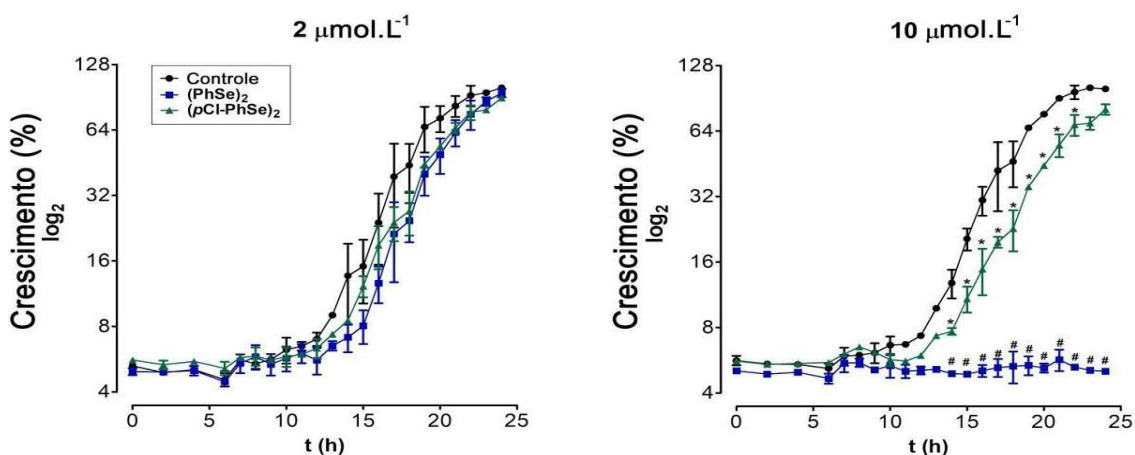
Os valores foram expressos como médias ± desvio padrão. As diferenças estatísticas foram avaliadas por análise de variância (ANOVA) e post hoc de comparação com o teste de Tukey-Kramer. Os valores de P <0,05 foram considerados significativos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Efeito dos compostos organocalcogêneos (PhSe)<sub>2</sub> e (pCl-PhSe)<sub>2</sub> sobre a cinética de crescimento de *C. albicans*

Foi avaliado o efeito dos compostos (PhSe)<sub>2</sub> e (pCl-PhSe)<sub>2</sub> sobre a cinética de crescimento de *C. albicans* em suspensão celular de 10<sup>5</sup> células viáveis.mL<sup>-1</sup> (Figura 4). Foi observada uma redução do crescimento celular de *C. albicans* na concentração de 10 μmol.L<sup>-1</sup> de (PhSe)<sub>2</sub>, diferentemente da mesma concentração do composto (pCl-PhSe)<sub>2</sub>, em que obteve um resultado parecido ao controle. Já na concentração de 2 μmol.L<sup>-1</sup> ambos os compostos tiveram crescimento semelhante ao controle após 24 h. Demonstrando que o composto (PhSe)<sub>2</sub> na concentração de 10 μmol.L<sup>-1</sup> teve potencial de inibição da cinética de crescimento de *C. albicans* desde as primeiras horas até 24 h de incubação. Já na concentração de 2 μmol.L<sup>-1</sup> os compostos (PhSe)<sub>2</sub> e (pCl-PhSe)<sub>2</sub>, e também, na concentração de 10 μmol.L<sup>-1</sup> de (pCl-PhSe)<sub>2</sub>, tiveram comportamento confluyente em relação ao controle, em que tiveram crescimento exponencial durante 24 h de incubação.

**Figura 4:** Efeito de (PhSe)<sub>2</sub> ou (pCl-PhSe)<sub>2</sub> sobre a cinética de crescimento de *C. albicans*.



**Legenda:** O crescimento celular foi determinado por uma curva de tempo em suspensões de *C. albicans* (10<sup>5</sup> células viáveis.mL<sup>-1</sup>) no grupo de controle (células incubadas na ausência de composto organocalcogêneo) e na presença de (PhSe)<sub>2</sub> ou (pCl-PhSe)<sub>2</sub> – 2 e 10 μmol.L<sup>-1</sup>. Absorbância (OD<sub>570</sub>) mostrada como médias ± DP obtidas de três experimentos independentes em duplicata e analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey-Kramer para comparações múltiplas. *p*<0,05 em relação ao controle (\*) e (pCl-PhSe)<sub>2</sub> (#).

**Fonte:** o autor.

## 5.2 Efeito dos compostos organocalcogêneos (PhSe)<sub>2</sub> e (pCl-PhSe)<sub>2</sub> sobre a formação de biofilme de *C. albicans* após 24 horas de tratamento

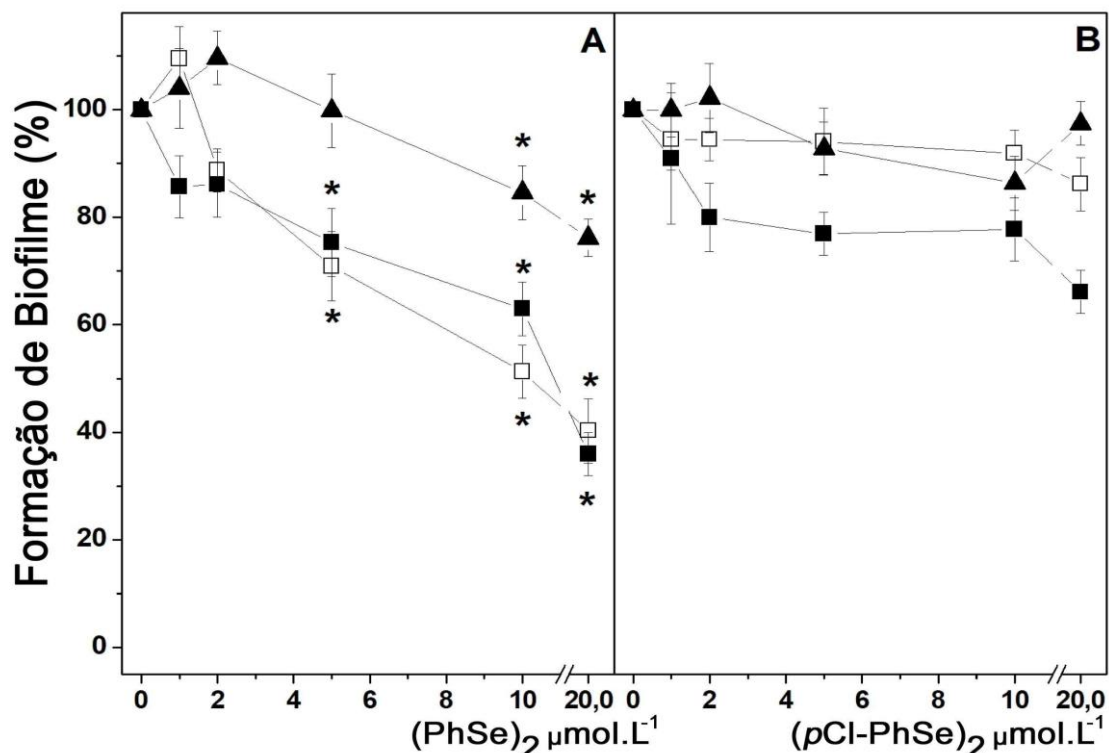
Avaliamos as três densidades celulares de  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células viáveis.mL<sup>-1</sup>, após o tratamento com os compostos (PhSe)<sub>2</sub> e (pCl-PhSe)<sub>2</sub> e na formação de biofilme de 24 h de *C. albicans*.

Assim como observamos nos resultados o composto (PhSe)<sub>2</sub> possui inibição dose dependente. Foi possível observar esse efeito em todas as densidades celulares que foram utilizadas nos experimentos, porém nas concentrações de 5, 10 e 20 µmol.L<sup>-1</sup> o efeito dose dependente nessas condições foi mais visível. Na densidade celular de  $10^5$  células viáveis.mL<sup>-1</sup> foi obtido inibição de ~30, 49 e 60 %, respectivamente.

Na densidade de  $10^6$  células viáveis.mL<sup>-1</sup> ocorreu uma inibição ~25, 37 e 65 % nas concentrações de 5, 10 e 20 µmol.L<sup>-1</sup>. Na densidade celular de  $10^7$  células viáveis.mL<sup>-1</sup> foi possível observar que em concentrações de 5, 10 e 20 µmol.L<sup>-1</sup> de (PhSe)<sub>2</sub> houve uma inibição da formação de biofilme de ~2, 15 e 23 %, respectivamente.

O composto (pCl-PhSe)<sub>2</sub>, em todas as densidades celulares de  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células viáveis.mL<sup>-1</sup> utilizadas, foi possível verificar uma inibição de não mais que ~20 % na concentração de 10 µmol.L<sup>-1</sup> do composto, e não apresentando inibição significativa em concentrações menores do composto.

**Figura 5:** Efeito de diferentes concentrações de  $(\text{PhSe})_2$  (A) ou  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  (B) sobre a formação de biofilme por *C. albicans*.



**Legenda:** A formação de biofilme foi determinada usando suspensões em densidades celulares de  $10^5$ (□),  $10^6$ (■) e  $10^7$ (▲) células viáveis.mL<sup>-1</sup>. Os valores foram expressos como porcentagem (OD<sub>490</sub>) na presença de compostos e ausência de compostos (grupo de controle). Os valores são expressos como médias ± DP (n=8) e analisados por ANOVA de um fator seguido pelo Teste *post hoc* de Tukey – Kramer para comparações múltiplas. \**p*<0,05 em relação ao controle.  
**Fonte:** o autor.

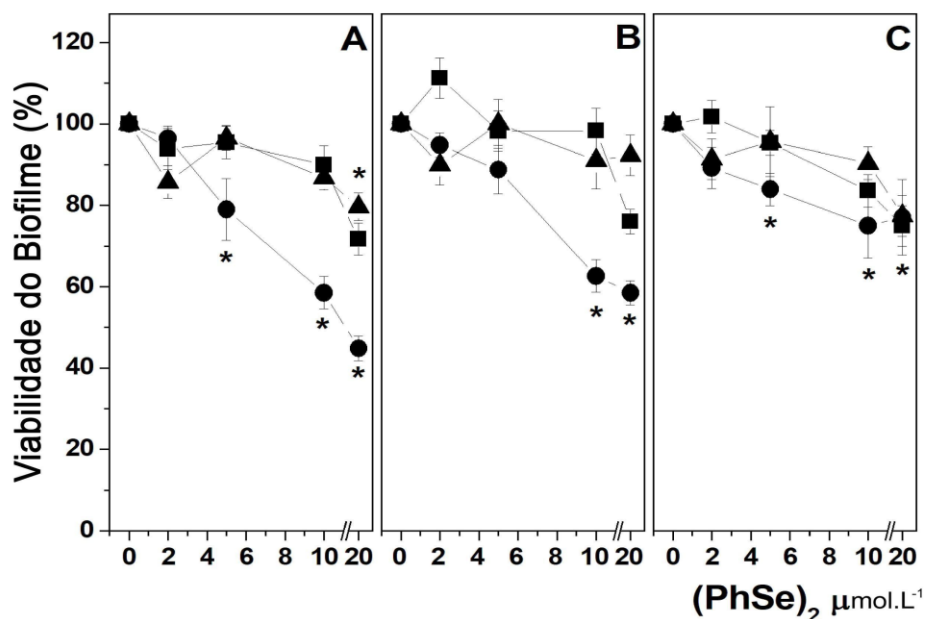
### 5.3 Efeito dos compostos organocalcogêneos $(\text{PhSe})_2$ e $(p\text{Cl-PhSe})_2$ sobre biofilmes de *C. albicans* em diferentes estágios do desenvolvimento

Analisamos os efeitos dos compostos  $(\text{PhSe})_2$  e  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  em diferentes estágios do biofilme de *Candida albicans*. Foi observada a formação de biofilme nos períodos de 6, 24 e 48 horas, utilizando  $(\text{PhSe})_2$  e  $(p\text{Cl-PhSe})_2$ .

Na figura 5 podemos observar três condições diferentes de biofilme (6, 24 e 48 h), além de três densidades celulares diferentes ( $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células viáveis.mL<sup>-1</sup>). Na densidade celular  $10^5$  células viáveis.mL<sup>-1</sup>, no período de 6 horas, na concentração de 20 µmol.L<sup>-1</sup>  $(\text{PhSe})_2$ , a formação de biofilme foi diminuída em ~56 %, já nas demais densidades celulares utilizadas de  $10^6$  e  $10^7$  células viáveis.mL<sup>-1</sup>, de aproximadamente 42 e 23 %, respectivamente. Na formação de biofilme de 24 e 48 h nas densidades celulares  $10^6$  e  $10^7$  células

viáveis.mL<sup>-1</sup>, em todas as concentrações obtivemos um resultado semelhante, visto que na maior concentração (20 μmol.L<sup>-1</sup> (PhSe)<sub>2</sub>) a inibição da formação de biofilme foi de 25 % em relação ao controle.

**Figura 6:** Viabilidade do biofilme produzido em 6, 24 e 48 h após o tratamento com (PhSe)<sub>2</sub>.



**Legenda:** A composição do meio de ensaio e as condições experimentais foram conforme descritos na seção de métodos, usando suspensões na densidade celular de 10<sup>5</sup>(A), 10<sup>6</sup>(B) e 10<sup>7</sup>(C) células viáveis.mL<sup>-1</sup>. Sendo 6 (●), 24 (■) e 48 h (▲). Os valores (médias ± DP obtidas em oito experimentos independentes) representam a porcentagem (OD<sub>490</sub>) na presença de compostos e ausência de compostos (grupo de controle). Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey-Kramer para comparações múltiplas. \**p*<0,05 em relação ao controle.

**Fonte:** o autor.

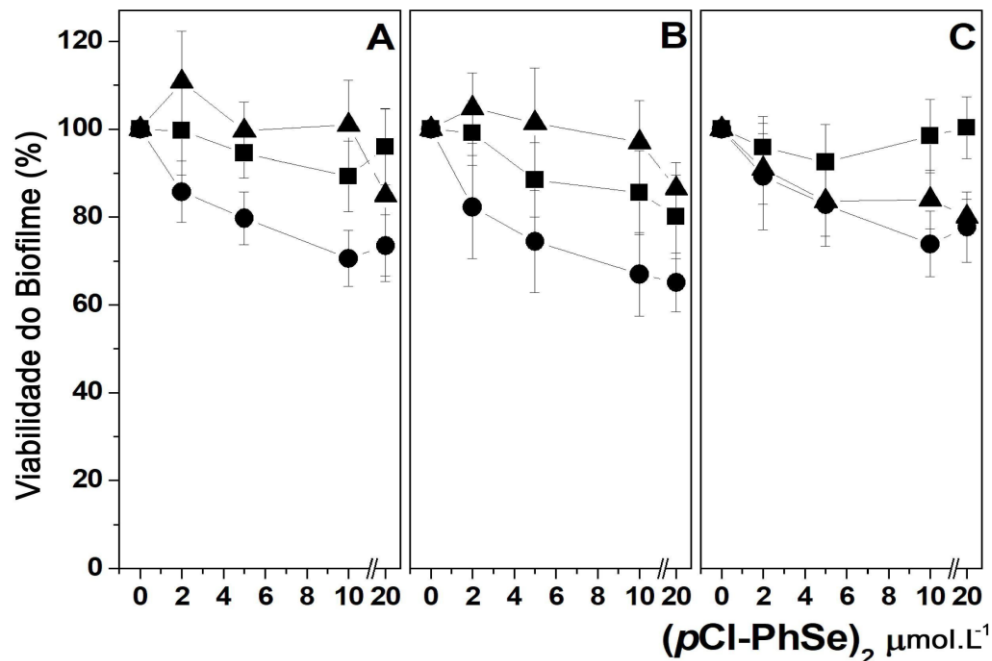
As três densidades celulares utilizadas (10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> e 10<sup>7</sup> células viáveis.mL<sup>-1</sup>) e nas três condições diferentes de biofilme (6, 24 e 48 h) observamos a viabilidade do biofilme nessas condições (Figura 7).

Nas densidades celulares utilizadas de 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> células viáveis.mL<sup>-1</sup>, foi possível observar que houve resultados semelhantes entre os períodos de incubação. Sendo na densidade de 10<sup>6</sup> células viáveis.mL<sup>-1</sup>, houve uma redução da formação de biofilme no período de 6 horas (~27 %) maior em relação densidade celular de 10<sup>5</sup> células viáveis.mL<sup>-1</sup> na concentração de 20 μmol.L<sup>-1</sup>.

Na densidade celular de 10<sup>7</sup> células viáveis.mL<sup>-1</sup>, o composto (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub> apresentou diferença em relação às demais densidades celulares utilizadas e

não demonstrando inibição significativa.

**Figura 7:** Viabilidade do biofilme produzido em 6, 24 e 48 h após o tratamento com  $(p\text{Cl-PhSe})_2$ .



**Legenda:** Os experimentos foram descritos na seção de métodos, usando suspensões com densidade celular de  $10^5$ (A),  $10^6$ (B) e  $10^7$ (C) células viáveis.mL<sup>-1</sup>. Sendo 6 (●), 24 (■) e 48 h (▲). Os valores (médias ± DP obtidas em oito experimentos independentes) representam a porcentagem (OD<sub>490</sub>) na presença de compostos e ausência de compostos (grupo de controle). Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey-Kramer para comparações múltiplas. \* $p < 0,05$  em relação ao controle.

**Fonte:** o autor.

#### 5.4 Análise morfológica de biofilme de *C. albicans* após o tratamento com compostos organocalcogêneos $(\text{PhSe})_2$ e $(p\text{Cl-PhSe})_2$

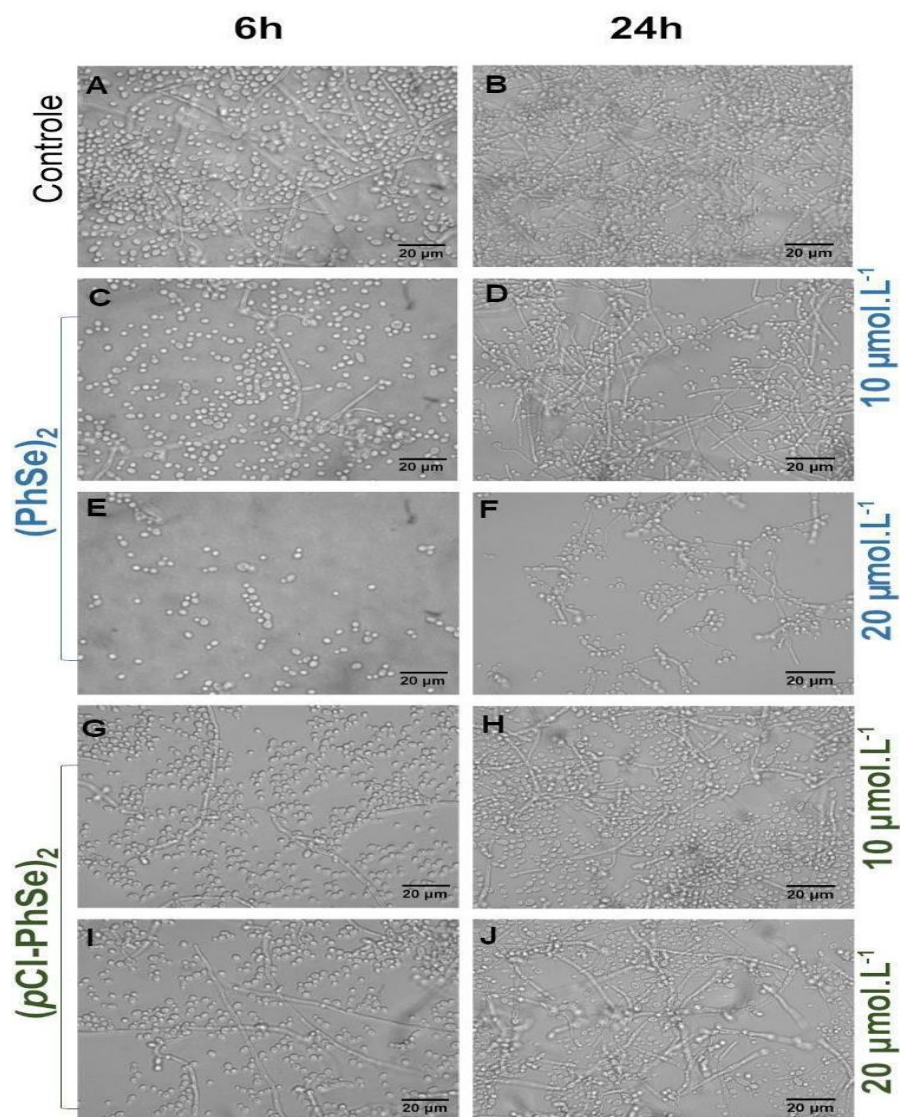
Foi realizada a análise morfológica de *Candida albicans* após o tratamento com compostos  $(\text{PhSe})_2$  e  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  em biofilme formado nos tempos de 6 e 24h (Fig. 8).

Na condição de controle tem a presença de DMSO 1 %, sendo o solvente presente em todas as concentrações dos compostos. Pode-se verificar que houve formação de filamentos alongados e grande quantidade de células. Os biofilmes tratados com  $(\text{PhSe})_2$  nos tempos 6 e 24 horas e nas concentrações de 10 e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  tiveram uma diminuição de células de forma dose dependente. Aconteceu redução de filamentos em ambas as concentrações em

relação ao controle.

Já nas condições em que o biofilme foi tratado com  $(pCl-PhSe)_2$  nos tempos de 6 e 24 horas, entre as concentrações de 10 e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , ocorreu uma diminuição sutil, sendo possível perceber essa diferença se comparado ao controle do biofilme.

**Figura 8:** Aspectos morfológicos do biofilme produzido por *C. albicans* em 6 e 24 horas após o tratamento com  $(PhSe)_2$  ou  $(pCl-PhSe)_2$ .



**Legenda:** Biofilmes produzidos por *C. albicans* ( $10^6$  células viáveis. $\text{mL}^{-1}$ ) na ausência de compostos [Controle (A e B)] e tratado com  $(PhSe)_2$  [10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (C e D) e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (E e F)] ou  $(pCl-PhSe)_2$  [10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (G e H) e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (I e J)]. Barra de escala = 20  $\mu\text{m}$ .

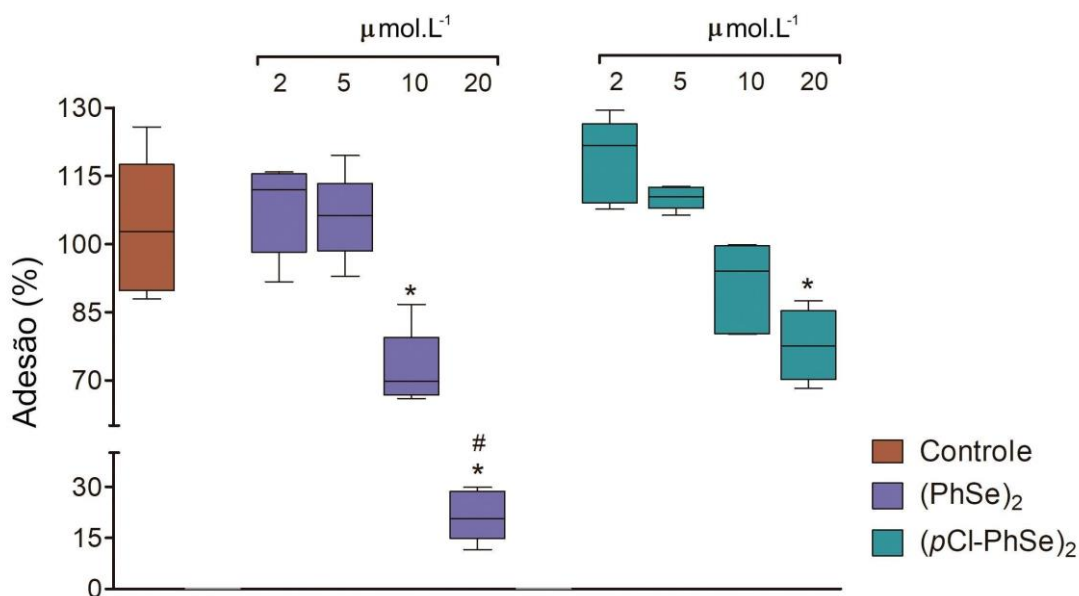
**Fonte:** o autor.

### 5.5 Adesão de *C. albicans* em células HeLa após o tratamento com os compostos organocalcogêneos (PhSe)<sub>2</sub> e (pCl-PhSe)<sub>2</sub>

Ambos os compostos organocalcogêneos estudados inibiram a adesão de *C. albicans* a células HeLa, dependente das concentrações de compostos presentes no meio, como observado na figura 9.

A quantidade de *C. albicans* aderida às células HeLa foram significativamente diminuídas após exposição a 10 e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (PhSe)<sub>2</sub> em relação ao controle. Enquanto, não foi significativa a mudança observada após a exposição a 2 e 5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de (PhSe)<sub>2</sub>. Por outro lado, (pCl-PhSe)<sub>2</sub> diminuiu a adesão às células HeLa em 77,7 % na concentração de 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , mas essas alterações não foram demonstradas a 2, 5 e 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Curiosamente, (PhSe)<sub>2</sub> na concentração de 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  foi suficiente para diminuir a adesão de *C. albicans* em células HeLa em mais de 20% (pCl-PhSe)<sub>2</sub>.

**Figura 9:** Adesão de *C. albicans* em células HeLa na presença de (PhSe)<sub>2</sub> ou (pCl-PhSe)<sub>2</sub>.



**Legenda:** Os dados são apresentados como porcentagem de adesão e correspondem às médias  $\pm$  DP de quatro experimentos independentes ( $n = 4$ ). \*indica diferenças significativas ( $p < 0,05$  em relação ao controle) pelo teste ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Tukey-Kramer para comparações múltiplas. C: Grupo de controle.

**Fonte:** o autor.

## **Artigo 2 - “Diphenyl diselenide suppresses key virulence factors of *Candida krusei*, a neglected fungal pathogen”**

### **6 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **6.1 Condições de crescimento de *C. krusei***

Culturas de *C. krusei* (ATCC 6258) foram plaqueadas em ágar Sabouraud dextrose (Merck, Darmstadt, Hesse, Germany) e incubadas em ar atmosférico (37 °C). Após 48 horas de incubação, uma amostra das colônias foi removida da superfície da placa de ágar e ressuspensa em solução fisiológica estéril (0,85% NaCl). Foram determinadas diferentes densidades celulares ( $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células viáveis.mL<sup>-1</sup>), utilizando a câmara de Neubauer na presença do corante vital azul de metileno (0,5 mg.mL<sup>-1</sup>).

#### **6.2 Ensaio dos compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> e *p*-cloro disseleneto de difenila (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub> sobre o crescimento de *C. krusei***

Com a finalidade de determinar o crescimento de *C. krusei* após o tratamento com compostos, foram preparadas suspensões de *C. krusei* ( $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  células viáveis.mL<sup>-1</sup>) e realizadas alíquotas em placas de 24 poços na presença de diferentes concentrações dos compostos (0,5; 1; 2; 5; 10 e 20 µmol.L<sup>-1</sup>) e caldo Sabouraud dextrose (Merck, Darmstadt, Hesse, Germany) em volume final de 0,2 mL. No grupo controle foi utilizado o solvente DMSO na concentração final de 1 %, e também, presente em todas as concentrações dos compostos. O DMSO é um solvente orgânico e na concentração de 1 % não promove nenhuma interferência nas células do fungo. Em seguida, as placas foram incubadas aproximadamente por 18 horas em estufa microbiológica (37 °C). Os experimentos foram realizados em condições assépticas. Após esse período de incubação, o meio foi homogeneizado e a densidade óptica foi determinada a 570 nm (OD<sub>570</sub>) utilizando o equipamento Synergy HT multi-Detecção Microplate Reader (Bio-Tek, Winooski, VT, USA), a fim de determinar o crescimento de *C. krusei*. Os valores apresentados nas figuras representam o

porcentual de crescimento calculado utilizando o grupo controle como 100 % de crescimento.

### **6.3 Ensaio dos compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> e *p*-cloro disseleneto de difenila (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub> sobre a cinética de crescimento *C. krusei***

Os ensaios foram realizados em tubos de ensaio com volume final de 8 ml de caldo Sabouraud dextrose (Merck, Darmstadt, Hesse, Germany). A densidade celular de *C. krusei* utilizada foi de 10<sup>5</sup> células viáveis.mL<sup>-1</sup> e as concentrações utilizadas de (PhSe)<sub>2</sub> e (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub> foram de 2 e 10 µmol.L<sup>-1</sup>. Nas condições de controle as suspensões de *C. krusei* foram incubadas com DMSO 1 %, sendo este o solvente presente em todas as concentrações dos compostos. Foi determinada a absorbância a partir do término do experimento, considerado como tempo zero. E após foi analisada em 2, 4 e 6 horas de incubação do crescimento. A partir de 6 horas de incubação foi analisado a cada 1 hora de modo sucessivo até completar as 40 horas de crescimento de *C. krusei*. Para análise do crescimento foram feitas alíquotas de 100 µL (duplicata) em placas de microtitulação de 96 poços e determinada a absorbância em 570 nm (OD<sub>570</sub>), utilizando o leitor de microplacas Synergy HT multi-Detecção Microplate Reader (Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

### **6.4 Ensaio dos compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> e *p*-cloro disseleneto de difenila (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub> sobre a formação de biofilme de *C. krusei***

Suspensões de *C. krusei* (10<sup>7</sup> células viáveis.mL<sup>-1</sup>) foram alíquotadas em meio RPMI-1640 estéril (Sigma, St Louis, MO, USA) em placas de microtitulação de 96 poços na presença de (PhSe)<sub>2</sub> e (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub> nas concentrações de 2, 5 10 e 20 µmol.L<sup>-1</sup>; em volume final de 200 µL. As placas foram incubadas em estufa microbiológica (37 °C) por 48 horas para formação do biofilme. Após os tratamentos, as células foram lavadas uma vez com PBS estéril (100 µL), a fim de retirar as células não aderidas. Posteriormente foram feitas alíquotas de 100 µL de PBS e acrescidos de 20 µL de 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfohenyl)-

2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) (Molecular Probes) e de menadione 0,4 mM (Sigma, MO, EUA), numa proporção de 4:1, para verificar o metabolismo do biofilme. As células foram incubadas por aproximadamente 2 horas em estufa microbiológica em ar atmosférico (37 °C). Após esse período de incubação, a absorbância do produto formado foi determinada em 490 nm (OD<sub>490</sub>) utilizando o leitor de microplacas Synergy HT Multi-Detection. Os experimentos foram realizados em duplicata (n=6) e no grupo controle houve a ausência dos compostos organocalcogêneos.

O biofilme formado foi observado por microscopia óptica, utilizando um microscópio de sistema invertido Nikon eclipse TS100 para observar possíveis alterações morfológicas após o tratamento com os compostos.

### **6.5 Ensaio dos compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> e *p*-cloro disseleneto de difenila (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub> sobre a adesão de *C. krusei* em superfície de poliestireno**

Suspensões de *Candida krusei* em uma densidade celular de 10<sup>7</sup> células viáveis.mL<sup>-1</sup> foram incubadas em placa de 96 poços com os compostos nas concentrações de 10 e 20 µmol.L<sup>-1</sup> por 90 minutos em um volume final de 200 µL a 37°C. E na condição de controle, as suspensões de *C. krusei* foram incubadas com DMSO 1% (solvente presente nas concentrações dos compostos). Após o período de incubação, as células foram lavadas duas vezes com 100 µL de solução tampão (PBS). O meio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi aliquotado em um volume final de 200 µL sobre o biofilme formado e tratado com os compostos. As placas foram incubadas por 24 horas. O efeito inibitório dos compostos foi determinado após 24 h de incubação. Posteriormente a incubação, o biofilme foi lavado uma vez com 100 µL de PBS. O ensaio foi analisado utilizando o 2,3-bis 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Antes de cada ensaio a solução de XTT (1 mg.mL<sup>-1</sup>) foi misturada com solução de menadione 0,4 mM em uma proporção de volume de 4:1 numa combinação de PBS e XTT com um volume final de 100 µL. Após 2 h à 37 °C o produto formado foi medido em 490 nm (OD<sub>490</sub>) usando o leitor de microplacas de multidetecção

Synergy HT. Os experimentos foram realizados em duplicata (n=4) e no grupo controle houve a ausência dos compostos organocalcogêneos.

## 6.6 Condições de cultura de HeLa

Células humanas endocervicais HeLa (ATCC CCL-2) foram cultivadas em meio DMEM (Sigma-Aldrich) que foi suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (Gibco, Waltham, USA), Penicilina à 1 % de 10.000 U mL, Streptomicina numa concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup> e Anfotericina B à 25 µg.mL<sup>-1</sup> (Sigma- Aldrich) que foram condicionadas à 37 °C em 5 % de CO<sub>2</sub> e 95 % O<sub>2</sub> (Water Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator, Thermo Scientific). Numa concordância de 80 % as células foram submetidas a uma solução de tripsina-EDTA, sendo 0,05 % de tripsina e 0,02 % de EDTA.

## 6.7 Efeito dos compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> e *p*-cloro disseleneto de difenila (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub> sobre a viabilidade celular das células HeLa

Em placas de 96 poços (Nest Biotechnology, Rahway, USA) foram semeadas as células HeLa numa densidade celular de 2x10<sup>5</sup> célulasxpoço<sup>-1</sup> com diferentes concentrações dos compostos (2, 5, 10 e 20 µmol.L<sup>-1</sup>) de (PhSe)<sub>2</sub> e (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub> em um volume final de 0,2 mL. As placas foram incubadas à 37°C por 2 e 6 h. Os ensaios de efeitos citotóxicos de ambos os compostos foram determinados usando um ensaio de cristal violeta (Feoktistova *et al.* 2016). O meio foi aspirado e as células foram lavadas duas vezes delicadamente com água. Em sequência, foi aliquoteado 50 µL de cristal violeta à 0,5 % e incubado por 20 minutos em temperatura ambiente em um agitador de onda e oscilação em uma frequência de 20 oscilações por minuto. A placa foi lavada quatro vezes e seca em temperatura ambiente por 2 h. Após foi adicionado metanol (200 µL) em cada poço e incubada por 20 minutos em temperatura ambiente em agitador de onda por 20 oscilações por minuto. Posteriormente, a absorbância foi determinada em 570 nm usando o equipamento SpectraMax (Molecular Devices, CA, USA). Os experimentos foram realizados em triplicata (n=5).

### **6.8 Adesão de *C. krusei* em células HeLa após o tratamento com os compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> e *p*-cloro disseleneto de difenila (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub>**

As células HeLa foram semeadas em placas de 96 poços (Nest Biotechnology, Rahway, USA) numa densidade celular de  $1 \times 10^5$  por 24 h à 37 °C em 5 % de CO<sub>2</sub> e 95 % O<sub>2</sub> (Water Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator, Thermo Scientific) para as células crescerem até a densidade de  $2 \times 10^5$ , numa confluência de 90 %.

As células foram lavadas duas vezes com PBS para retirar as células não aderidas e o meio de cultura. Assim, 20 µL de meio DMEM com Soro Fetal Bovino contendo uma suspensão de *C. krusei* (MOI 50:1) e em concentrações 2, 5, 10 e 20 µmol.L<sup>-1</sup> de (PhSe)<sub>2</sub> e (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub> foram incubadas por 2 h à 37 °C em estufa de CO<sub>2</sub> (5 %). Logo após, as células foram lavadas duas vezes com PBS. As células HeLa foram lisadas com água destilada estéril (200 µL) por 40 min à 37°C. Uma alíquota (20 µL) do ensaio foi pipetada em placas de 24 poços contendo caldo Sabouraud dextrose (Merck, Darmstadt, Hesse, Germany) em que foram incubadas por 24 h à 37°C.

Foi determinada a absorbância em 570 nm (OD<sub>570</sub>) com o leitor SpectraMax (Molecular Devices, CA, USA). Os experimentos foram realizados em triplicata (n=4).

### **6.9 Análise estatística**

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

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Efeito dos compostos organocalcogêneos (PhSe)<sub>2</sub> e (pCl-PhSe)<sub>2</sub> sobre o crescimento de *C. krusei*

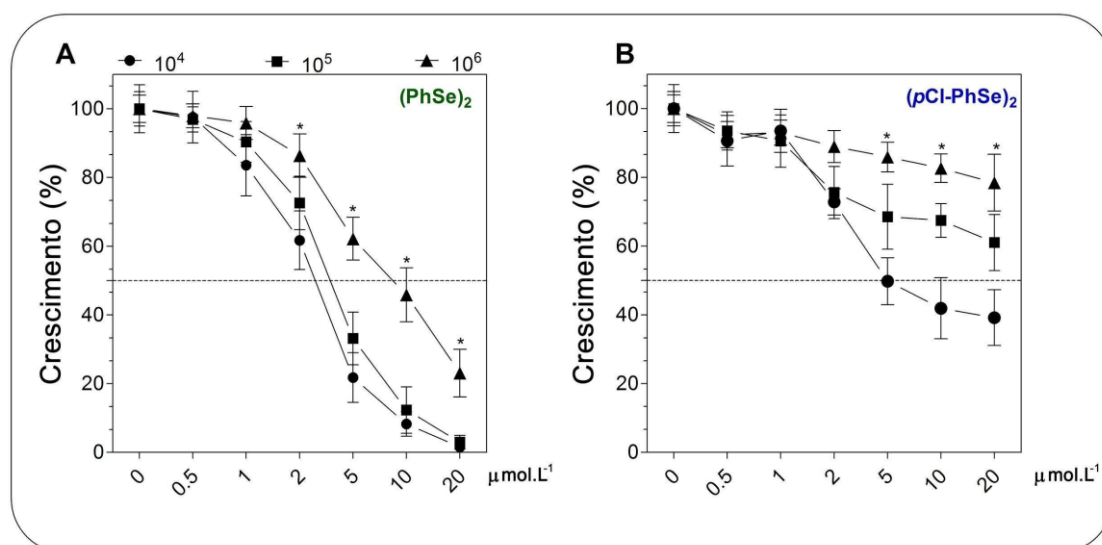
Avaliamos também o crescimento de *C. krusei* em diferentes densidades celulares, sendo 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> células viáveis.mL<sup>-1</sup> (Fig. 10). Os compostos (PhSe)<sub>2</sub> e (pCl-PhSe)<sub>2</sub> apresentaram inibição dose dependente em relação às concentrações e as densidades celulares.

O composto (PhSe)<sub>2</sub> apresenta inibição do crescimento maior nas densidades menores de células e nas maiores concentrações utilizadas. Sendo que nas densidades de células de 10<sup>4</sup> e 10<sup>5</sup> células viáveis.mL<sup>-1</sup> e das concentrações utilizadas do composto, 10 e 20 µmol.L<sup>-1</sup>, obtivemos uma inibição de ~75 e 90 %, respectivamente, de inibição do crescimento em relação ao controle. Já na densidade celular de 10<sup>6</sup>, obtivemos uma inibição de ~95 % na maior concentração do composto (PhSe)<sub>2</sub>, sendo a maior inibição nessa condição. Entretanto, na concentração de 10 µmol.L<sup>-1</sup> de (PhSe)<sub>2</sub> houve uma inibição de ~55 %. (Fig.10 A). Foi possível considerar o potencial inibitório do composto (PhSe)<sub>2</sub>, em crescimento de *Candida krusei*, tendo em vista a intrínseca resistência aos tratamentos de escolha que a espécie apresenta.

O composto (pCl-PhSe)<sub>2</sub> teve inibição inferior ao (PhSe)<sub>2</sub>. Na densidade celular de 10<sup>4</sup> células viáveis.mL<sup>-1</sup> de *C. krusei* e nas maiores concentrações de 10 e 20 µmol.L<sup>-1</sup> utilizadas do composto, observamos uma inibição de ~60 %.

Já nas densidades celulares de 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> células viáveis.mL<sup>-1</sup>, na maior concentração de (pCl-PhSe)<sub>2</sub> (20 µmol.L<sup>-1</sup>) a inibição do crescimento foi menor que 50 %. (Fig.10 B).

**Figura 10:** Efeito de  $(\text{PhSe})_2$  (A) ou  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  (B) sobre o crescimento de *C. krusei*.



**Legenda:** O crescimento celular foi determinado por uma curva de tempo em suspensões de *C. krusei* ( $10^4$  (●),  $10^5$  (■) e  $10^6$  (▲) células viáveis.mL<sup>-1</sup>) no grupo de controle (células incubadas na ausência de composto organocalcogêneo) e na presença de  $(\text{PhSe})_2$  ou  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  – 0,5; 1; 2; 5; 10 e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Absorbância ( $\text{OD}_{570}$ ) mostrada como médias  $\pm$  DP obtidas de três experimentos independentes em duplicata e analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Tukey-Kramer para comparações múltiplas.  $p < 0,05$  em relação ao controle (\*).  
**Fonte:** o autor.

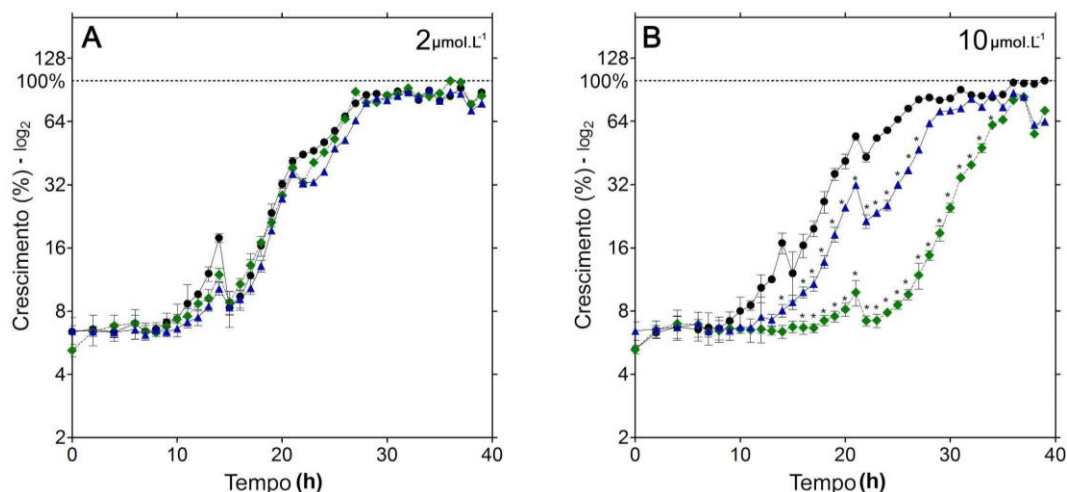
## 7.2 Efeito dos compostos organocalcogêneos $(\text{PhSe})_2$ e $(p\text{Cl-PhSe})_2$ sobre a cinética de crescimento de *C. krusei*

O efeito dos compostos  $(\text{PhSe})_2$  e  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  sobre a cinética de crescimento de *C. krusei* (Fig. 11) foi analisada a partir dos resultados obtidos.

Na suspensão celular de  $10^5$  células viáveis.mL<sup>-1</sup> e na concentração de 2  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de ambos os compostos não houve diferença significativa em relação ao controle. A concentração de 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $(\text{PhSe})_2$ , apresentou inibição em relação ao controle e obteve um crescimento exponencial de 40 horas.

Para o composto  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  foi observado que a inibição do crescimento foi menor em relação ao composto  $(\text{PhSe})_2$ , na mesma concentração no mesmo período de 40 horas.

**Figura 11:** Efeito de  $(\text{PhSe})_2$  ou  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  sobre a cinética de crescimento de *C. krusei*.



**Legenda:** O crescimento celular foi determinado por uma curva de tempo em suspensões de *C. krusei* ( $10^5$  células viáveis.mL $^{-1}$ ) no grupo de controle (células incubadas na ausência de composto organocalcogênio) e na presença de  $(\text{PhSe})_2$  ou  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  – 2 e 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .  $(\text{PhSe})_2$  ( $\blacklozenge$ ) ou  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  ( $\blacktriangle$ ) e controle ( $\bullet$ ) Absorbância ( $\text{OD}_{570}$ ) mostrada como médias  $\pm$  DP obtidas de três experimentos independentes em duplicata e analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey-Kramer para comparações múltiplas.  $p < 0,05$  em relação ao controle (\*).

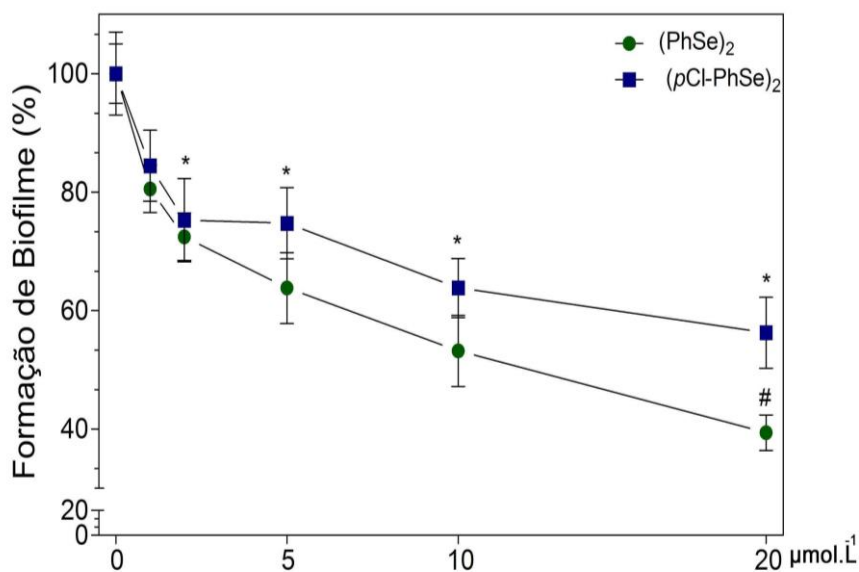
**Fonte:** o autor.

### 7.3 Efeito dos compostos organocalcogêneos $(\text{PhSe})_2$ e $(p\text{Cl-PhSe})_2$ sobre a formação de biofilme de *C. krusei* após 24 horas de tratamento

Avaliamos a formação de biofilme de 24 h na densidade celular utilizada ( $10^7$  células viáveis.mL $^{-1}$ ) após o tratamento com os compostos  $(\text{PhSe})_2$  e  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  nas concentrações de 1, 2, 5, 10 e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

Assim, como apresentamos em outros resultados, o composto  $(\text{PhSe})_2$  possui capacidade inibitória maior em relação ao  $(p\text{Cl-PhSe})_2$ . O composto  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  inibiu a formação de biofilme em suas maiores concentrações (10 e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) aproximadamente de 36 e 44 %. O composto  $(\text{PhSe})_2$  em relação ao controle nas concentrações de 10 e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , visualizamos uma inibição de ~47 e 61 %. Os resultados demonstram que os compostos  $(\text{PhSe})_2$  e  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  no tratamento dessa fungemia, apresentaram um potencial significativo de inibição no desenvolvimento de biofilme de *C. krusei*. Podendo ser uma terapia alternativa no tratamento desse fungo.

**Figura 12:** Formação do biofilme produzido por *C. krusei* em 24 horas após o tratamento com  $(\text{PhSe})_2$  ou  $(p\text{Cl-PhSe})_2$ .



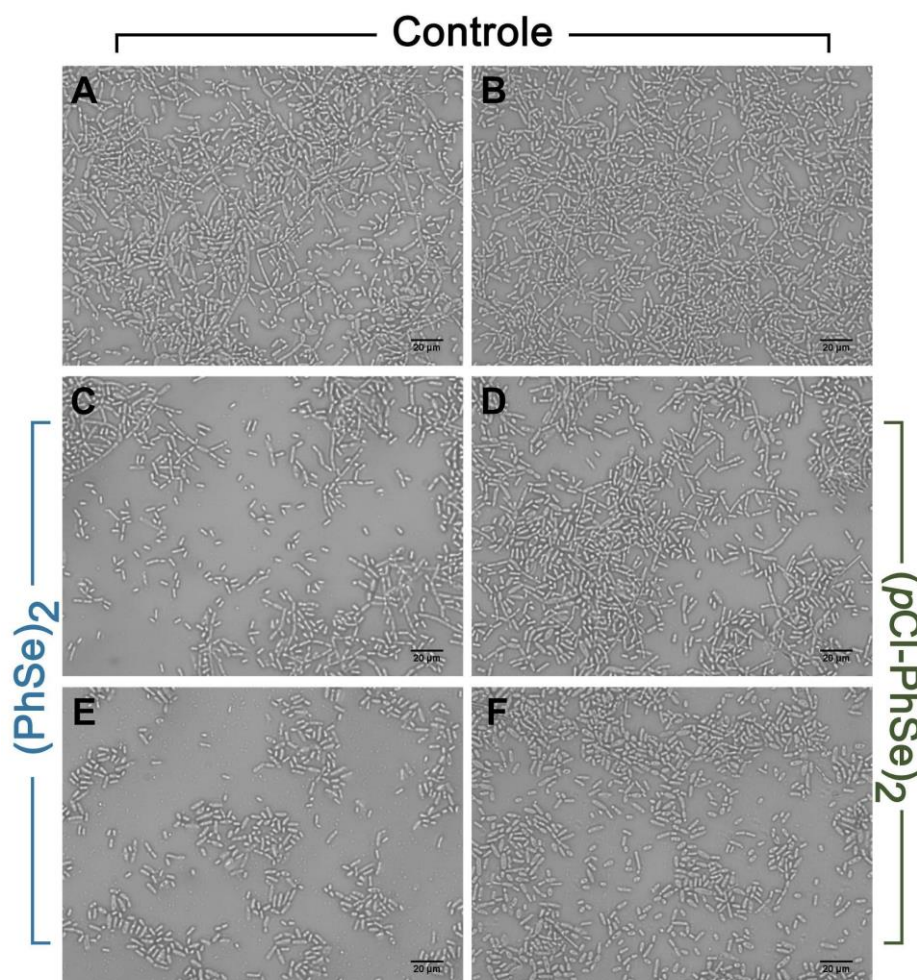
**Legenda:** As condições experimentais foram conforme descritas na seção de métodos, usando suspensões na densidade celular de  $10^7$  células viáveis.mL<sup>-1</sup>. Sendo  $(\text{PhSe})_2$  (●) ou  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  (■). Os valores (médias  $\pm$  DP obtidas de oito experimentos independentes) representam a porcentagem ( $\text{OD}_{490}$ ) na presença de compostos e ausência de compostos (grupo de controle). Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey-Kramer para comparações múltiplas. \* $p < 0,05$  em relação ao controle.  $(\text{PhSe})_2$  (#).

**Fonte:** o autor.

#### 7.4 Análise morfológica de biofilme de *C. krusei* após o tratamento com os compostos organocalcogêneos $(\text{PhSe})_2$ e $(p\text{Cl-PhSe})_2$

As células de *Candida krusei* tratadas com  $(\text{PhSe})_2$  ou  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  em formação de biofilme de 24 h (Figura 13) foram analisadas. Em ambos os compostos utilizados ocorreu a inibição da formação do biofilme em relação ao controle. Foi capaz de observar, também, uma diminuição dos filamentos e número de células. Porém, o composto  $(\text{PhSe})_2$  foi capaz de reduzir mais efetivamente os filamentos, e principalmente, de células em comparação ao composto  $(p\text{Cl-PhSe})_2$ , corroborando com os resultados que obtemos dos experimentos, em que o  $(\text{PhSe})_2$  possui um potencial inibitório maior em relação ao  $(p\text{Cl-PhSe})_2$ .

**Figura 13:** Aspectos morfológicos do biofilme produzido por *C. krusei* 24 horas após o tratamento com  $(\text{PhSe})_2$  ou  $(p\text{Cl-PhSe})_2$ .



**Legenda:** Biofilmes produzidos por *C. krusei* ( $10^7$  células viáveis.mL $^{-1}$ ) na ausência de compostos [Controle (A e B)] e tratado com  $(\text{PhSe})_2$  [10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (C) e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (E)] ou  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  [10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (D) e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (F)]. Barra de escala = 20  $\mu\text{m}$ .

**Fonte:** o autor.

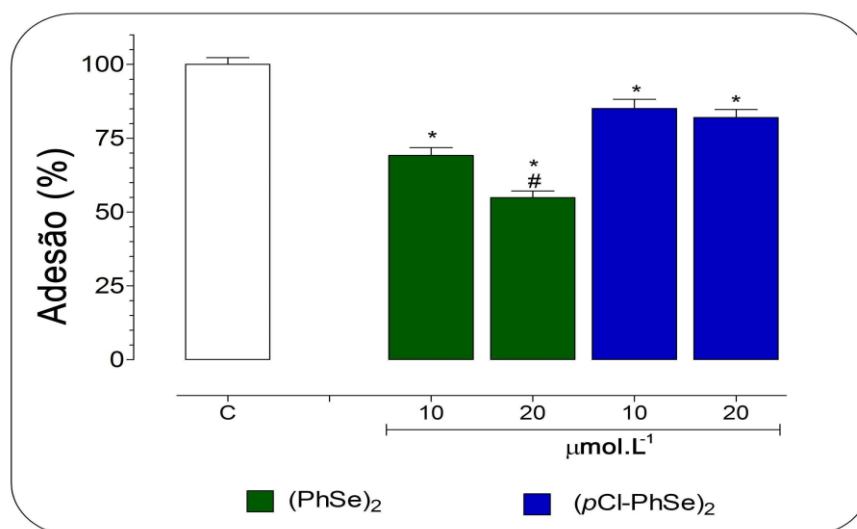
### 7.5 Efeito dos compostos organocalcogêneos $(\text{PhSe})_2$ e $(p\text{Cl-PhSe})_2$ sobre a adesão de *C. krusei* em superfície de poliestireno

Os resultados obtidos da viabilidade do biofilme foram determinados a partir da densidade celular de  $10^7$  células viáveis.mL $^{-1}$  de *Candida krusei*, nas concentrações dos compostos  $(\text{PhSe})_2$  e  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  de 10 e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (Fig. 14).

Em relação ao controle pode-se observar que o composto  $(\text{PhSe})_2$  na menor e na maior concentração utilizada, teve uma inibição do biofilme formado foi de ~25 e 45 %, respectivamente. Já o composto  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  nas

concentrações de 10 e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  teve uma redução do biofilme formado de ~15 e 20 %, respectivamente. Esses resultados corroboram com os resultados que obtivemos no item anterior, que o composto  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  possui um potencial de inibição inferior ao composto  $(\text{PhSe})_2$  no tratamento de biofilmes de *C. krusei*.

**Figura 14:** Adesão de *C. krusei* em placa de poliestireno após o tratamento com  $(\text{PhSe})_2$  ou  $(p\text{Cl-PhSe})_2$ .



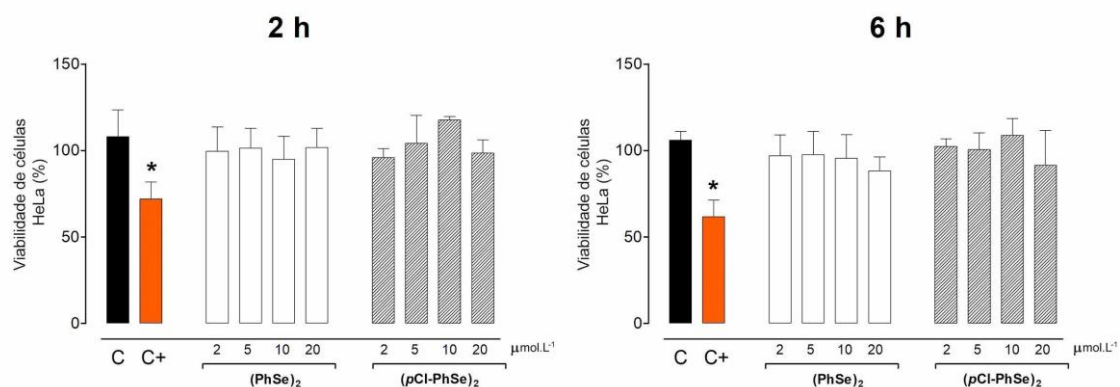
**Legenda:** A composição do meio de ensaio e as condições experimentais foram conforme descrito na seção de métodos, usando suspensões na densidade celular de  $10^7$  células viáveis  $\text{.mL}^{-1}$ . Sendo  $(\text{PhSe})_2$  (■) ou  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  (■). Os valores (médias  $\pm$  DP obtidas em seis experimentos independentes) representam a porcentagem ( $\text{OD}_{490}$ ) na presença de compostos e ausência de compostos (grupo de controle). Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Tukey-Kramer para comparações múltiplas. \* $p < 0,05$  em relação ao controle.  $(\text{PhSe})_2$  (#).

**Fonte:** o autor.

## 7.6 Viabilidade celular das células HeLa após o tratamento com os compostos organocalcogêneos disseleneto de difenila $(\text{PhSe})_2$ e *p*-cloro disseleneto de difenila $(p\text{Cl-PhSe})_2$

Os efeitos citotóxicos de  $(\text{PhSe})_2$  e  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  foram avaliados utilizando as células endocervicais humanas, HeLa. Nenhum dos compostos organocalcogêneos apresentaram qualquer citotoxicidade ( $p > 0,05$ ) em qualquer uma das concentrações testadas após 2 e 6 h em comparação com o grupo não tratado (grupo controle), na figura 15.

**Figura 15:** Viabilidade das células HeLa após o tratamento com os compostos  $(\text{PhSe})_2$  e  $(p\text{Cl-PhSe})_2$



**Legenda:** Os experimentos utilizando HeLa ( $2 \times 10^5$  células/porco<sup>-1</sup>) foram tratados com  $(\text{PhSe})_2$  ou  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  em concentrações de 2, 5, 10 e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  por 2 e 6 h. Os valores são as porcentagens de células viáveis em relação ao número total de células e corresponde às médias  $\pm$  DP de cinco experimentos independentes ( $n=5$ ) e analisados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post hoc* de Tukey-Kramer para comparações múltiplas. \* $p < 0,05$  em relação ao controle. C: Controle. C+: Controle positivo (DMSO 2,5 %).

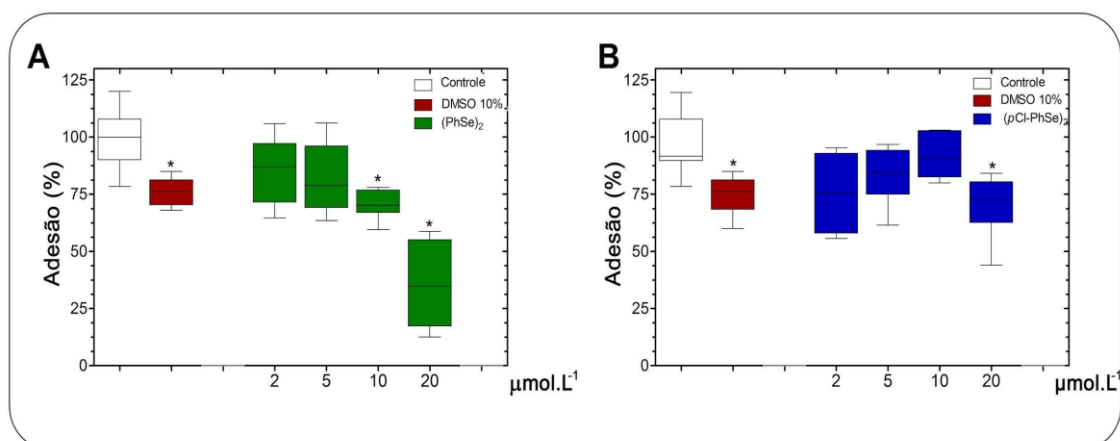
**Fonte:** o autor.

### 7.7 Adesão de *C. krusei* em células HeLa após o tratamento com os compostos $(\text{PhSe})_2$ e $(p\text{Cl-PhSe})_2$

Os efeitos de ambos os compostos organocalcogêneos na adesão de *C. krusei* a células epiteliais cervicais foram testadas no presente estudo (Figura 16). O  $(\text{PhSe})_2$  demonstrou efeitos inibitórios em adesão de *C. krusei* às células epiteliais, sendo mais eficaz que  $(p\text{Cl-PhSe})_2$ , incluindo de uma maneira dependente as concentrações do composto presentes no meio.

A quantidade de células de *C. krusei* que aderiram às células HeLa foram menores que o controle, após a exposição das concentrações de 10 e 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  do composto  $(\text{PhSe})_2$  (70,9 % e 35,9 %, respectivamente) enquanto nenhuma mudança significativa foi analisada após a exposição a 2 e 5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$   $(\text{PhSe})_2$  (Fig. 16A). Por outro lado,  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  inibiu 70,2 % da adesão a 20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , mas nenhuma alteração foi demonstrada em 2, 5 e 10  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (Fig. 16B).

**Figura 16:** Adesão de *C. krusei* em células HeLa na presença de  $(\text{PhSe})_2$  (A) ou  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  (B).



**Legenda:** Os dados são apresentados como porcentagem de adesão e correspondem às médias  $\pm$  DP de quatro experimentos independentes ( $n = 4$ ). \*indica diferenças significativas ( $p < 0,05$  em relação ao controle) pelo teste ANOVA de uma via seguido pelo teste *post hoc* de Tukey-Kramer para comparações múltiplas. C: grupo de controle.

**Fonte:** o autor.

De modo geral, os compostos  $(\text{PhSe})_2$  e  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  em diferentes concentrações utilizadas foram capazes de inibir o crescimento em densidades celulares diferentes de *C. albicans* e *C. krusei*, bem como inibir a cinética de crescimento em um período de 24 horas para *C. albicans* e de 40 horas para *C. krusei*. Esse mesmo efeito de inibição foi possível observar nas condições diferentes de biofilmes que foram estudadas de *C. albicans* e *C. krusei*. As análises morfológicas dos biofilmes, também, demonstram que os compostos foram capazes de diminuir o número de células e filamentos de *C. albicans* e *C. krusei*. Assim, os compostos  $(\text{PhSe})_2$  e  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  demonstraram um potencial significativo de inibição de *C. albicans* e *C. krusei*.

## 8 DISCUSSÃO

As infecções fúngicas possuem importância médica, uma vez que são mais ocasionadas em pacientes imunossuprimidos, em tratamento ou não de outras doenças, como cânceres e síndrome da imunodeficiência humana (AIDS). Nesse cenário temos um índice elevado de infecções ocasionadas pelo gênero *Candida*. Dentre as espécies mais prevalentes dentro do gênero, *Candida albicans* tem maior prevalência (70 %), porém o número de casos de espécie não-*albicans* (NAC) vêm aumentando. *Candida krusei* é espécie NAC que possui notoriedade por ser intrinsecamente resistente às terapias antifúngicas convencionais. Uma vez que as terapias convencionais não se mostram eficazes para o tratamento dessas fungemias e alguns medicamentos apresentam sérios efeitos colaterais, como nefrotoxicidade, se faz necessário o estudo de terapias alternativas.

Neste estudo, analisamos o comportamento de *Candida albicans* e *Candida krusei*, utilizando compostos organocalcogêneos (PhSe)<sub>2</sub> e (pCl-PhSe)<sub>2</sub> como potencial terapia alternativa.

No ensaio de crescimento de *C. krusei* observamos que os compostos (PhSe)<sub>2</sub> e (pCl-PhSe)<sub>2</sub> apresentam inibição dose dependente, ou seja, quanto maior a concentração do composto maior foi a inibição do crescimento. O mesmo foi observado em relação às densidades celulares; na maior densidade utilizada (10<sup>6</sup> células viáveis.mL<sup>-1</sup>) a inibição foi menor (em todas as concentrações dos compostos) comparado a menor densidade celular (10<sup>4</sup> células viáveis.mL<sup>-1</sup>). Estes resultados corroboram com a literatura em que *Candida albicans* teve o mesmo comportamento de dose e densidade celular dependente na presença dos compostos organocalcogêneos. Em que os compostos (PhSe)<sub>2</sub> e (MeOPhSe)<sub>2</sub> foram capazes de inibir o crescimento de *Candida albicans* e nas menores densidades celulares o efeito de inibição foi maior, assim como é possível verificar que quanto maior a concentração utilizada nos estudos, foi maior a inibição do crescimento. Corroborando com os nossos resultados que apresentam dose dependência na inibição do crescimento (DE AMORIM *et al.*, 2018; ROSSETI *et al.*, 2011 e 2015).

Nas concentrações de 5 a 20 µmol.L<sup>-1</sup> houve inibição (no crescimento de *C. krusei*) superior a 50 % no composto (PhSe)<sub>2</sub> nas densidades celulares de 10<sup>4</sup>

e  $10^5$ , porém com composto  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  só foi observado a mesma inibição na densidade celular de  $10^4$ . Rosseti e colaboradores (2011) demonstraram o potencial de inibição do  $(\text{PhSe})_2$  sendo superior ao  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  em crescimento de *Candida albicans*.

Para determinar o efeito de compostos organocalcogêneos em cinética de crescimento de *C. albicans* e *C. krusei*, foi realizada uma curva de crescimento após tratamento com  $(\text{PhSe})_2$  ou  $(p\text{Cl-PhSe})_2$ . Uma curva de crescimento do microrganismo é representada por fases bem definidas (lag, exponencial ou log), estacionária e morte ou declínio (FINKEL *et al.*, 2006). A fase lag é um período de tempo durante o qual a regulação gênica é adaptada para ajustar uma nova condição de crescimento; incluem a ativação de vias de sinalização e modificações transcricionais que levam à regulação positiva da montagem de proteínas (VERMEERSCH *et al.*, 2019).

As propriedades antifúngicas de  $(\text{PhSe})_2$  foram mais eficientes que  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  contra fatores de virulência de *C. albicans* foram descritas anteriormente na formação do tubo germinativo, adesão às superfícies das células epiteliais e formação e viabilidade do biofilme, em diferentes estágios de desenvolvimento (ROSSETI *et al.*, 2011; DA SILVA *et al.*, 2021).

A fase exponencial de *C. albicans* de comportamento linear no período de 14 a 21 h foi demonstrada no controle, apresentando um crescimento regular durante este período. As suspensões de *C. albicans* tratadas com  $(\text{PhSe})_2$  ou  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  a  $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$  não apresentaram nenhuma alteração em sua cinética de crescimento em comparação com o controle. No entanto,  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  a  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  foi capaz de alterar o perfil da curva de tempo de crescimento, particularmente na extensão da fase exponencial. O crescimento das células tratadas com  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  a  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  foi 20% menor que em relação ao grupo controle. Em contraste com  $(p\text{Cl-PhSe})_2$ , as células tratadas com  $(\text{PhSe})_2$  a  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$  inibiram significativamente a cinética de crescimento de *C. albicans* (DA SILVA *et al.*, 2021).

Em nossos experimentos, os efeitos de  $(\text{PhSe})_2$  e  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  também foram observados na cinética de crescimento de *C. krusei*.  $(\text{PhSe})_2$  também alterou o perfil da curva de crescimento de *C. krusei* quando concentrações  $>5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  foram testadas, em comparação com fungos não tratados ou tratados com  $(p\text{Cl-PhSe})_2$ . Parâmetros cinéticos de crescimento entre *C. albicans*, *C.*

*glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* clinicamente relevantes mostraram diferenças na taxa média de crescimento e no tempo necessário para iniciar a fase exponencial de crescimento (fase lag) (BORDALLO-CARDONA *et al.*, 2019). (PhSe)<sub>2</sub> aumentou significativamente a duração da fase lag e atrasou o início da fase exponencial na cinética de crescimento de *C. krusei* em nosso estudo, e esses resultados abrem novas possibilidades para investigar seus efeitos em vias regulatórias em espécies de *Candida* necessárias para diferenciação e multiplicação, podendo ocorrer na fase exponencial do crescimento.

As cinéticas de crescimento de *C. albicans* e *C. krusei* foram semelhantes em ambos os compostos, entretanto na concentração de 10 µmol.L<sup>-1</sup> de (PhSe)<sub>2</sub> não houve fase exponencial de *C. albicans*, se mantendo na fase lag durante todo o período de 24 horas. Diferentemente de *C. krusei* que teve um crescimento exponencial (em mesma condição), não apresentando uma fase lag ampla. As duas espécies de *Candida* que estudamos apresentaram comportamento diferente durante o desenvolvimento do crescimento, isso pode ser associado às diferenças que possuem entre si, uma das é a resistência intrínseca que *C. krusei* apresenta aos tratamentos convencionais, podendo estar relacionado a fase lag do crescimento ser mais extensa, diferentemente de *C. albicans*.

A adesão celular é a fixação de células microbianas a um substrato biológico ou não biológico (RAMAGE *et al.*, 2009) e representa um importante fator de virulência de fungos do gênero *Candida* (TSUI *et al.*, 2016).

Os biofilmes são formados por uma comunidade microbiana de estrutura complexa, tendo um papel importante no processo de infecção em uma superfície (PEREIRA *et al.*, 2020). Sua formação ocorre na mucosa (*in vivo*) (NOBILE *et al.*, 2015), e são difíceis de erradicar uma vez estabelecido, sendo menos susceptíveis a agentes antimicrobianos e defesas imunológicas (TSUI *et al.*, 2016). Diferentes autores têm demonstrado o aumento da resistência de espécies de *Candida* a diversos antifúngicos convencionais (LEBLANC *et al.*, 2020). As principais etapas no desenvolvimento de biofilme fúngico incluem adesão; proliferação, que inclui formação de tubo germinativo e desenvolvimento de hifas; maturação e a produção de uma matriz extracelular; e, finalmente, a dispersão (RAMAGE *et al.*, 2009). O biofilme formado de 0 a 11 h é considerado

como um biofilme jovem, sendo mais sensível a tratamentos; de 12 a 23 h um período intermediário e a partir de 24 h é classificado como biofilme maduro, onde a resistência é maior aos tratamentos de escolha. O processo de adesão de microrganismos em tecidos biológicos, acredita-se ser uma etapa significativa na interação entre o patógeno e hospedeiro, e a experiência de adesão *in vitro* e *in vivo* em diferentes modelos têm sido empregadas em espécies de *Candida* (LAN *et al.*, 2017).

O desenvolvimento do biofilme e adesão celular, ambos desempenham papéis importantes na candidíase vaginal, visto que são os mais ocorrentes. O desenvolvimento de novas terapias fúngicas para direcionar esses mecanismos de virulência é de grande importância como tática para o tratamento de doenças infecciosas (LAN *et al.*, 2017; TANG *et al.*, 2019).

Um método para controlar infecções por *Candida* é o uso de compostos que influenciam na qualidade de adesão e formação de biofilme. Isso pode reduzir o surgimento de cepas resistentes e diminuir as características patogênicas de espécies NAC. Descobriu-se que a atividade antimicrobiana de vários compostos organocalcogêneos é eficaz no aumento da permeabilidade da membrana celular, inibindo proteínas com atividades antioxidantes e induzindo ao estresse oxidativo por meio da superprodução de espécies reativas, eventos estes que podem levar à morte celular (ROSSETI *et al.*, 2011 e 2015; DI LEO *et al.*, 2018; NOGUEIRA *et al.*, 2021; DA SILVA *et al.*, 2021).

A formação e viabilidade do biofilme produzido por *C. albicans* foram diminuídos; biofilmes mais jovens foram mais sensíveis ao (PhSe)<sub>2</sub> que ao (pCl-PhSe)<sub>2</sub>. Esses resultados corroboram os dados da literatura, demonstrando que biofilmes com maior tempo de maturação são mais resistentes a drogas convencionais como anfotericina B e fluconazol (CULLEN E SPRAGUE, 2012; VILA *et al.*, 2013; DESAI E MITCHELL, 2015). Um aumento na resistência a agentes antifúngicos convencionais por biofilmes maduros de *C. albicans* quando comparados com biofilmes de fase inicial também foi relatado na literatura (CULLEN E SPRAGUE, 2012; VILA *et al.*, 2013; DESAI E MITCHELL, 2015). Um dos fatores associados à resistência de biofilmes maduros é a presença e produção em larga escala de b-1,3-glucana na matriz extracelular, dificultando a penetração dos fármacos na estrutura do biofilme (MARTINS *et al.*, 2012).

Este estudo mostrou que baixas concentrações dos compostos organocalcogêneos ( $<10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), especialmente de  $(\text{PhSe})_2$  foram capazes de inibir a viabilidade de biofilmes precoces, especialmente na presença de baixas densidades celulares. Além disso  $(\text{PhSe})_2$  inibiu a transição de levedura para células filamentosas, um processo crucial para a colonização e formação de biofilme por *C. albicans*. Esses resultados indicam a potencial atividade antimicrobiana do  $(\text{PhSe})_2$ , pois a formação de biofilme em dispositivos médicos e tecido do hospedeiro é uma etapa crucial para o aparecimento de infecções fúngicas e está associada à alta morbidade e mortalidade em pacientes no contexto hospitalar (SARDI *et al.*, 2014).

De acordo com os resultados obtidos nos estudos com *C. krusei*, o  $(\text{PhSe})_2$  teve capacidade dose-dependente três vezes mais potente para prevenir a adesão de *C. krusei* às superfícies de poliestireno e células epiteliais cervicais quando comparado ao  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  sugerindo que  $(\text{PhSe})_2$  é mais eficaz que  $(p\text{Cl-PhSe})_2$ . *Candida krusei* é capaz de formar biofilmes em polietileno, policloreto de vinila e vidro (GÓMEZ-GAVIRIA E MORA-MONTES, 2020). Aqui, descrevemos os efeitos de  $(\text{PhSe})_2$  em formação de biofilme por *C. krusei*, que é um pré-requisito para seu estabelecimento em tecidos biológicos e resistência a drogas antifúngicas (RAMAGE *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2020).  $(\text{PhSe})_2$  diminuiu significativamente a formação de biofilme de forma dependente da concentração em *C. krusei*, e exibiu efeitos mais potentes que  $(p\text{Cl-PhSe})_2$ .

As propriedades antifúngicas de  $(\text{PhSe})_2$  também são mais eficientes que  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  e foram descritas que a formação do tubo germinativo de *C. albicans*, adesão às superfícies das células epiteliais e formação e viabilidade do biofilme em diferentes estágios de desenvolvimento (ROSSETI *et al.*, 2011; DE AMORIM *et al.*, 2018; DA SILVA *et al.*, 2021). Em nossos achados, esses efeitos diferenciais de  $(\text{PhSe})_2$  e  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  também foram observados em *C. krusei*.

A necessidade de terapias alternativas surgiu por meio da elucidação dos graves efeitos colaterais de antifúngicos convencionais e devido à resistência que microrganismos vêm adquirindo desses fármacos. Neste trabalho foi analisado o potencial de uma terapia alternativa utilizando os compostos  $(\text{PhSe})_2$  e  $(p\text{Cl-PhSe})_2$ . Ademais, a elucidação dos mecanismos de ação dos compostos organocalcogêneos e do comportamento em células animais é de extrema urgência.

Os ensaios de citotoxicidade avaliam os efeitos de um composto em uma determinada linhagem de células humanas e fornecem informações vitais sobre os atributos biológicos de uma nova molécula, com foco em sua tolerabilidade básica (BACSKAY *et al.*, 2018). E embora os mecanismos químicos subjacentes à toxicidade do selênio não sejam totalmente compreendidos, tem sido relatado que o  $(\text{PhSe})_2$  e seus derivados são reconhecidos como compostos de baixa toxicidade *in vivo*, e que em altas doses podem provocar efeitos tóxicos e estar associados a efeitos oxidativos. (NOGUEIRA E ROCHA, 2011; NOGUEIRA *et al.*, 2021). No presente estudo, os efeitos citotóxicos de  $(\text{PhSe})_2$  e  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  foram avaliados usando a linhagem celular HeLa. Observamos que nenhum dos compostos organocalcogêneos demonstraram qualquer citotoxicidade significativa em qualquer uma das concentrações e tempos testados.

No ensaio de adesão de células HeLa, *Candida albicans* e *krusei*, verificamos que na maior concentração ( $20 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) de ambos os compostos, obteve o mesmo comportamento de diminuir a adesão celular. Este estudo descreve pela primeira vez que  $(\text{PhSe})_2$  exibe uma atividade antifúngica potente contra a adesão de *C. albicans* e *C. krusei* às células do epitélio vaginal (células HeLa), contra o aumento da formação de biofilme e viabilidade em comparação com  $(p\text{Cl-PhSe})_2$ .

## 9 CONCLUSÃO

O estudo de novas terapias antifúngicas com compostos organocalcogêneos  $(\text{PhSe})_2$  e  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  é de extrema relevância, uma vez que infecções fúngicas têm sido descritas mais frequentemente, assim como os casos de resistência aos fármacos convencionais. No presente estudo, os efeitos citotóxicos de  $(\text{PhSe})_2$  e  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  foram avaliados utilizando diferentes protocolos.

Os compostos organocalcogêneos  $(\text{PhSe})_2$  e  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  não demonstraram qualquer citotoxicidade em nenhuma das concentrações e tempos testados. Os compostos organocalcogêneos  $(\text{PhSe})_2$  e  $(p\text{Cl-PhSe})_2$  foram capazes de diminuir a adesão de *C. albicans* e *C. krusei* em células HeLa e a viabilidade de biofilmes produzidos pelas espécies.

Curiosamente, os efeitos inibitórios de  $(\text{PhSe})_2$  foram mais eficientes que  $(p\text{Cl-PhSe})_2$ . Portanto, compostos organocalcogêneos, especialmente  $(\text{PhSe})_2$ , podem ser consideradas como drogas antifúngicas promissoras contra *Candida albicans* e *Candida krusei*.

## REFERÊNCIAS

AMORIM, L. M. M. *et al.* The organochalcogen compound (MeOPhSe)<sub>2</sub> inhibits both formation and the viability of the biofilm produced by *Candida albicans*, at different stages of development. **Curr pharm des.**, v. 24, p. 3964–3971, 2018. Doi:10.2174/1381612825666181120155433

BACSKAY, I. *et al.* Role of cytotoxicity experiments in pharmaceutical development. *In*: ÇELİK, T. A. **Cytotoxicity**. London: IntechOpen, 2018. Doi:10.5772/intechopen.72539

BARBEDO, Leonardo S.; SGARBI, Diana BG. Candidiasis. **Dst - j bras doenças sex transm**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

BILLACK, B.; SANTORO, M.; LAU-CAM; C. Growth inhibitory action of ebselen on fluconazole resistant *Candida albicans*: role of the plasma membrane h<sup>+</sup>-atpase. **Microb drug resist.**, v. 15, n. 2, p. 77-83, 2009.

BORDALLO-CARDONA, MÁ *et al.* Growth kinetics in *Candida* spp.: Differences between species and potential impact on antifungal susceptibility testing as described by the EUCAST. **Medical Mycology**, v. 57, n. 5, p. 601–608, 2019. doi.org/10.1093/mmy/myy097

BRAGA, A. L. *et al.* Stereoconservative formation and reativity of  $\alpha$ -chalcogen-functionalized vinylithium compounds from bromo-vinyllic chalcogens. **Synlett**, v.5, p. 595, 1997.

CHEN, H. *et al.* The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 337-348, 2020. doi: 10.1080 / 21505594.2020.1748930

COLOMBO, A. L. *et al.* Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**. v. 36, n. 5, p.599-607, 2003.

CULLEN, P. I.; SPRAGUE, G. F. The regulation of filamentous growth in yeast. **Genetics.**, v. 190, p. 23–49, 2012. Doi:10.1534/genet-ics.111.127456

DESAI, J. V.; MITCHELL, A. P. *Candida albicans* biofilm development and its genetic control. **Microbiol spectr.**, v.3, n. 3, 2015. Doi:10.1128/microbiolspec.mb-0005-2014

DI LEO, I. *et al.* Synthetic Approaches to Organoselenium Derivatives with Antimicrobial and Anti-Biofilm Activity. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 589–601, 2018. doi.org/10.2174/1570193X16666181227111038

DÍAZ-GARCÍA, J. *et al.* Susceptibility of uncommon *Candida* species to systemic antifungals by the EUCAST methodology. **Medical Mycology**, v. 58, n. 6, p. 848-851, 2019 doi:10.1093/mmy/myz121

FEOKTISTOVA, M.; GESERICK, P.; LEVERKUS, M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. **Cold spring harb protoc.**, n. 4, p. 343–346, 2016. Doi:10.1101/pdb. Prot087379

FINKEL, S. E. Long-term survival during stationary phase: Evolution and the GASP phenotype. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 113– 120, 2006. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1340>

GHISLENI, G. *et al.* Diphenyl diselenide exerts an anxiolytic-like effect in wistar rats: roles of gabaa and 5ht receptors. **Prog neuropsychopharmacol biol psychiatry**, v. 32, n. 6, p. 1508-1515, 2004.

GIURG, M. *et al.* Reaction of bis[(2- chlorocarbonyl)phenyl] diselenide with phenols, amino-phenols, and other amines towards diphenyl diselenides with antimicrobial and antiviral properties. **Molecules.**, v. 22, n. 6 2017. Doi:10.3390/molecules22060974

GÓMEZ-GAVIRIA, M.; MORA-MONTES, H. M. Current Aspects in the Biology, Pathogeny, and Treatment of *Candida krusei*, a Neglected Fungal Pathogen. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 1673– 1689, 2020. doi:10.2147/idr.s247944

HARDING, Michael W. *et al.* Can filamentous fungi form biofilms? **Trends in microbiology**, v. 17, n. 11, p.475-480, 2009.

JAMIU, A. T. *et al.* Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. **Medical Mycology.**, v. 59, n. 1, p. 14-30, 2020 doi:10.1093/mmy/myaa031

KADE, I. J. *et al.* Comparative studies on dicholesteroyl diselenide and diphenyl diselenide as antioxidant agents and their effect on the activities of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> atpase and delta-aminolevulinic acid dehydratase in the rat brain. **Neurochem res.**, v. 33, n. 1, p. 167-178, 2008.

KAUR, H. *et al.* Prolonged Outbreak of *Candida krusei* Candidemia in Pediatric Ward of Tertiary Care Hospital. **Mycopathologia.**, v. 185, n. 2, p. 257-268, 2020 doi:10.1007/s11046-020-00427-y

KUBICA, T. F. *et al.* *In vitro* activity of diphenyl diselenide and ebselen alone and in combination with antifungal agents against *Trichosporon asahii*. **Mycoses.**, v. 62, n. 5, p. 428–433, 2019. Doi:10.1111/myc. 12906

LAN ,Y. B. *et al.* Time course of global gene expression alterations in *Candida albicans* during infection of HeLa cells. **Bosn J Basic Med sci.**, v. 17, n. 2, p. 120–131, 2017. Doi:10.17305/bjbms.2017.1667

- LEBLANC, E. V. *et al.* Structure-guided approaches to targeting stress responses in human fungal pathogens. **J Biol Chem.**, v. 295, n. 42, p. 14458-14472, 2020. doi: 10.1074/jbc.REV120.013731.
- MACHADO, M. S. *et al.* 3'3 ditrifluoromethyldiphenyl diselenide: a new organoselenium compound with interesting antigenotoxic and antimutagenic activities. **Mutation research**, v.673, n. 2, p.133-140, 2009.
- MALCHIKOVA, Anna; KLYASOVA, Galina. *In vitro* activity of anidulafungin, caspofungin, fluconazole and amphotericin B against biofilms and planktonic forms of *Candida* species isolated from blood culture in patients with hematological malignancies. **Journal of Medical Mycology**, v. 31, n. 3, 2021. Doi./10.1016/j.mycmed.2021.101162.
- MARTINS, M. *et al.* Addition of dnase improves the in vitro activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. **Mycoses.**, v. 55, p. 80–85, 2012. Doi:10.1111/j.1439-0507.2011.02047.x
- MATHÉ, I.; VAN DIJCK, P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. **Curr genet.**, v. 59, p. 251–264, 2013. Doi:10.1007/s00294-013- 0400-3
- MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence.**, v. 4, p. 119-128, 2013. doi: 10.4161/viru.22913
- MELO, A. M. *et al.* Diphenyl diselenide and its interaction with antifungals against *Aspergillus* spp. **Med mycol.**, v. 59, n. 6, p. 528-536, 2020 Myaa072. Doi:10. 1093/mmy/myaa072
- NASCIMENTO, V. *et al.* Synthesis and biological evaluation of new nitrogen-containing diselenides. **Eur j med chem.**, v. 87, p. 131–139, 2014. Doi:10. 1016/j.ejmech.2014.09.022
- NIKOU, Kichik *et al.* *Candida albicans* Interactions with Mucosal Surfaces during Health and Disease. **Pathogens**, v. 8, n. 2, 2019. doi:10.3390/pathogens8020053
- NOBILE, C.J.; JOHNSON, A. D. *Candida albicans* biofilms and human disease. **Annu rev microbiol.**, v. 69, p. 71–92, 2015. Doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104330
- NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; ROCHA, JBT. (2004). Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chem rev.**, v. 104, p. 6255-6285, 2004.
- NOGUEIRA, C.; ROCHA, J. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. **Archives of toxicology**, v. 85, n. 11, p. 1313–1359, 2011. doi.org/10.1007/S00204-011-0720-3

NOGUEIRA, C. W.; BARBOSA, N.; ROCHA, J. B.T. Toxicology and pharmacology of synthetic organoselenium compounds: an update. **Archives of Toxicology**, v. 95, n. 4, p. 1179–1226, 2021. doi.org/10.1007/s00204-021-03003-5

OROZCO, A. S.; HIGGINBOTHAM, I. M.; HITCHCOCK, C. A. Mechanism of Fluconazole Resistance in *Candida krusei*. **Antimicrob agents chemother.**, v. 42, p. 2645–2649, 1998.

PAULMIER, C. **Selenium reagents and intermediates in organic synthesis**. New York: Pergamon press, 1986, p.463.

PEREIRA, R. *et al.* Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. **J appl microbiol.**, v. 131, n. 1, p. 11-22, 2020. Doi:10.1111/jam.14949

POESTER, V. R. *et al.* Antifungal activity of diphenyl diselenide alone and in combination with itraconazole against *Sporothrix brasiliensis*. **Med mycol.**, v. 57, p. 328–331, 2019. Doi:10.1093/mmy/myy044

RAMAGE, G. *et al.* *Candida* biofilms: an update. **Eukaryot cell.**, v. 4, p. 633–638, 2005. Doi:10.1128/ec.4.4.633-638.2005

RAMAGE, G. *et al.* Our current understanding of fungal biofilms. **Crit rev microbiol.**, v. 35, p. 340–355, 2009. Doi:10.3109/10408410903241436

RICARDO, E. *et al.* Mechanisms of acquired in vivo and in vitro resistance to voriconazole by *Candida krusei* following exposure to suboptimal drug concentration. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 4, 2020 doi:10.1128/aac.01651-19

ROSA, R. M. *et al.* Pharmacology and toxicology of diphenyl diselenide in several biological models. **Braz j med biol res.**, v. 40, n. 10, p. 1287-1304, 2007.

ROSSATO, I. *et al.* *In vitro* combination between antifungals and diphenyl diselenide against *Cryptococcus* species. **Mycoses.**, v. 62, p. 508–512, 2019. Doi: 10.1111/myc.12905

ROSSETI, I. B. *et al.* Biofilm formation by *Candida albicans* is inhibited by 4,4-dichloro diphenyl diselenide (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub>. **Curr drug discov technol.**, v. 11, p. 234–238, 2014. Doi:10.2174/1570163811666140924121758.

ROSSETI, I. B. *et al.* Diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub> inhibits biofilm formation by *Candida albicans*, increasing both ros production and membrane permeability. **J trace elemmed biol.**, v. 29, p. 289–295, 2015. Doi:10.1016/j.Jtemb.2014.08.001

ROSSETI, I. B. *et al.* *Candida albicans* growth and germ tube formation can be inhibited by simple diphenyl diselenide [(PhSe)<sub>2</sub>, (MeOPhSe)<sub>2</sub>, (*p*Cl-PhSe)<sub>2</sub>,

- (F<sub>3</sub>CPhSe)<sub>2</sub>] and diphenyl ditelluride. **Mycoses**, v. 54, p. 506–513, 2011. Doi:10.1111/j. 1439-0507.2010.01888.x
- SANCINETO, I. *et al.* Diphenyl diselenide derivatives inhibit microbial biofilm formation involved in wound infection. **BMC microbiol.**, v. 16, 2016. Doi:10.1186/s12866-016-0837-x.
- SARDI, J. D. C. O, ALMEIDA, A. M. F.; GIANNINI, M. J. S. New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites – a brief review. **Arch oral biol.**, v. 56, p. 951–959. Doi:10.1016/j.archoralbio.2011.03.007.
- SARDI, J. D. C. O. *et al.* Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Rev iberom micol.**, v. 31, p. 22–29, 2014. Doi:10.1016/j.riam.2013.09.014
- SAMARANAYAKE, Yuthika H.; SAMARANAYAKE, I. P. (1994). *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. **J. Mod. Microbiol.**, v. 41, n. 5, p. 295-310, 1994.
- SEGAL, E.; SANDOVSKY-LOSICA, H. Adhesion and interaction of *Candida albicans* with mammalian tissues *in vitro* and *in vivo*. **Methods Enzymol.**, v. 253, p. 439-452, 1995. Doi:10.1016/s0076-6879(95)53038-x
- SEYOUUM, E.; BITEW, A.; MIHRET, A. Distribution of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species isolated in different clinical samples and their *in vitro* antifungal susceptibility profile in Ethiopia. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, 2020. doi: 10.1186 / s12879-020-4883-5
- SILVA, Bruna Marques *et al.* (PhSe)<sub>2</sub> and (pCl-PhSe)<sub>2</sub> organochalcogen compounds inhibit *Candida albicans* adhesion to human endocervical (HeLa) cells and show anti-biofilm activities. **Biofouling**, v. 37, n. 2, p. 235-245, 2021.
- SPELLBERG, B. J.; FILLER, S.G.; EDWARDS, J.E. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. **Clin infect dis.**, v. 42, , 2006.
- STEFANELLO, S.T. *et al.* The insertion of functional groups in organic selenium compounds promote changes in mitochondrial parameters and raise the antibacterial activity. **Bioorg chem.**, 98, 2020. Doi:10.1016/j.bioorg.2020.103727
- TANG, L. Investigating heterogeneity in HeLa cells. **Nature Methods**, v.16, n. 4, p. 281–281, 2019. doi:10.1038/s41592-019-0375-1
- TSUI, C.; KONG, E. F.; JABRA-RIZK, M. A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **Pathog dis.**, v. 74, n. 4, 2016 74:ftw018. Doi:10. 1093/femspd/ftw018
- VERMEERSCH, L. *et al.* On the duration of the microbial lag phase. **Current Genetics**, v. 65, n. 3, p. 721–727, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-00938-2>

VILA, T. V. M. *et al.* Effect of alkylphospholipids on *Candida albicans* biofilm formation and maturation. **J antimicrob chemother.**, v. 68, p. 113–125, 2013. Doi: 10.1093/jac/dks353

VILLASMIL, M. L. *et al.* An Erg11 lanosterol 14- $\alpha$ -demethylase-Arv1 complex is required for *Candida albicans* virulence. **Plos One**, v.15, n. 7, 2020. doi: 10.1371 / journal.pone.0235746

WARRILOW, A. G. *et al.* The Evolution of Azole Resistance in *Candida albicans* Sterol 14 $\alpha$ -Demethylase (CYP51) through Incremental Amino Acid Substitutions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.**, v. 63, n. 5, 2019 doi:10.1128/aac.02586-18

WISPLINGHOFF, H. *et al.* Nosocomial bloodstream infections due to *Candida* spp. In the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. **Int j antimicrob Agents.**, v. 43, p. 78–81, 2014. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.09.005

WERGLARZ-TOMCZAK, E. *et al.* Identification of methionine aminopeptidase 2 as a molecular target of the organoselenium drug ebselen and its derivatives/analogues: synthesis, inhibitory activity and molecular modeling study. **Bioorg Med Chem Lett.**, v. 26, p. 5254-5259, 2016. Doi:10.1016/j.bmcl.2016.09.050.

## ANEXO A – Artigo 1



**Biofouling**  
The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gbf20>



## (PhSe)<sub>2</sub> and (pCl-PhSe)<sub>2</sub> organochalcogen compounds inhibit *Candida albicans* adhesion to human endocervical (HeLa) cells and show anti-biofilm activities

Bruna Marques da Silva, Marília Toledo Braga, Juliene Cristina da Silva Passos, Moisés Lopes Carvalho, Isabela Bueno Rosseti, Laís Mayara Machado de Amorim, João Batista Teixeira da Rocha, Carlos Alberto-Silva & Maricilia Silva Costa

To cite this article: Bruna Marques da Silva, Marília Toledo Braga, Juliene Cristina da Silva Passos, Moisés Lopes Carvalho, Isabela Bueno Rosseti, Laís Mayara Machado de Amorim, João Batista Teixeira da Rocha, Carlos Alberto-Silva & Maricilia Silva Costa (2021) (PhSe)<sub>2</sub> and (pCl-PhSe)<sub>2</sub> organochalcogen compounds inhibit *Candida albicans* adhesion to human endocervical (HeLa) cells and show anti-biofilm activities, *Biofouling*, 37:2, 235-245, DOI: [10.1080/08927014.2021.1897110](https://doi.org/10.1080/08927014.2021.1897110)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/08927014.2021.1897110>



Published online: 15 Mar 2021.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 9



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at  
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=gbf20>

[doi.org/10.1080/08927014.2021.1897110](https://doi.org/10.1080/08927014.2021.1897110)