

SELENO-CUMARINAS COMO UMA NOVA CLASSE DE MOLÉCULAS ANTIFÚNGICAS

Melissa Mendes Velaski¹; Brenda Carrera²; Ariel Domingues³; Guilherme Cunha⁴;
Catherine Dos Santos⁵; Rômulo Canto⁶; Vera Lucia Eifler Lima⁷; Dra. Priscilla
Maciel Quatrin⁸ (orientadora)

RESUMO: *Candida* spp. são fungos leveduriformes relacionados a infecções que, muitas vezes, apresentam difícil tratamento devido à resistência aos agentes antifúngicos convencionais e pela formação de biofilmes. Nas últimas décadas, os fungos estão desenvolvendo considerável resistência aos fármacos sintéticos tradicionais, sendo necessária a síntese de novos compostos que sejam eficazes. Sendo assim, este estudo tem como objetivo avaliar 8 compostos da classe das seleno-cumarinas contra *Candida* spp., através do método de microdiluição em caldo padronizado pelo CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute). Os resultados preliminares revelaram uma ação promissora de 3 derivados da seleno-cumarinas contra *Candida tropicalis*. Mais estudos são necessários para verificar o potencial destes compostos contra outras espécies de *Candida*.

PALAVRAS-CHAVE: *Candida*, seleno-cumarinas, antifúngicos

INTRODUÇÃO:

Estimativas indicam que mais de 300 milhões de pessoas são afetadas por infecções fúngicas graves, resultando na morte anual de mais de um milhão de pessoas no mundo, principalmente pelo número crescente de pacientes imunocomprometidos. Os agentes antifúngicos convencionais utilizados para o tratamento de infecções invasivas são limitados, incluindo três classes principais de fármacos: Polienos (anfotericina B), Azóis (fluconazol, isavuconazol, itraconazol, posaconazol e voriconazol) e Equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micofungina) (XIE et al. 2014). Recentes avanços utilizando triazóis e equinocandinas de amplo espectro proporcionam alternativas mais eficazes e menos tóxicas quando comparado aos



polienos, mesmo assim, há uma necessidade crescente de desenvolvimento de novas opções terapêuticas (PETRIKKOS e SKIADA, 2007).

Nas últimas duas décadas, observou-se o aumento da incidência de infecções causadas por *Candida* spp., juntamente ao surgimento de falhas clínicas, que estão associadas à resistência adquirida. A maioria das infecções são atribuídas à *C. albicans*, porém, é evidente a emergência de infecções por *Candida* não-*albicans* (RICHTER et al. 2005). A patogenicidade destas infecções envolve a expressão de diferentes fatores de virulência, como a formação de tubo germinativo, presença de adesinas, mudanças fenotípicas, formação de biofilme e produção de enzimas hidrolíticas (SARDI et al. 2013). Altas taxas de mortalidade estão relacionadas com essas infecções, variando entre 20% e 60%, dependendo dos fatores de risco de cada paciente (CALDERONE & CLANCY, 2012).

Cumarinas são compostos sintéticos ou naturais procedentes de plantas, seus derivados possuem diversas propriedades farmacológicas relatadas, como ação anti-inflamatória, anticoagulante, antibacteriana, antiviral, antifúngica, antimalárica, além de ação contra o câncer e Alzheimer (FENG et al. 2020). Em relação aos compostos derivados de selênio, estudos têm demonstrado que estas entidades químicas apresentam propriedades biológicas interessantes, como inibição da proliferação de células cancerígenas, ativação de proteína quinase, inativação de radicais livres, além de apresentarem propriedades antimicrobianas e antioxidantes (GERZSON et al. 2012; AL-RUBAIE et al. 2014). Não há dados na literatura demonstrando a atividade antimicrobiana de seleno-cumarinas, apenas um estudo que avalia a ação antiproliferativa dessa classe de moléculas (LAGUNES et al. 2019), destacando a relevância científica da proposta do projeto.

A busca por alternativas aos antifúngicos atualmente disponíveis frente as infecções fúngicas é de fundamental importância, não somente em função do restrito arsenal terapêutico, mas também em função dos relatos de resistência e toxicidade dos antifúngicos utilizados de forma clínica. Nesse sentido, a síntese de uma nova classe de moléculas como as seleno-cumarinas, pode ser uma estratégia na terapia antifúngica.



MÉTODO:

O objeto desta pesquisa é Avaliar a ação antifúngica de 8 compostos derivados das seleno-cumarinas (382, 383, 384, 385, 386, 387, 388 e 395) e 1 composto derivado do selênio (SeCN) contra *C. tropicalis* e *C. albicans*. No total, 6 isolados clínicos foram avaliados até o momento: *C. tropicalis* (MT16, MT21 e MT28) e *C. albicans* (CA02, CA05 e CA09), pertencentes à micoteca do Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada, Faculdade de Farmácia (Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil).

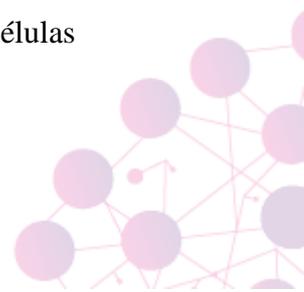
Obtenção das seleno-cumarinas

Os compostos foram sintetizados e caracterizados pelo Laboratório de Química Medicinal de Compostos de Selênio (QMCSel/UFCSPA) e foram cedidas para a realização da pesquisa.

Determinação do espectro de ação antifúngico

O perfil de atividade antifúngica dos compostos foi avaliado frente aos isolados de *Candida* spp. Para obtenção de células viáveis utilizadas no experimento, os fungos leveduriformes foram crescidos em ágar Saboraud com cloranfenicol por 48 h à 35°C.

A atividade antifúngica foi realizada através do método de microdiluição em caldo em RPMI-MOPS (meio RPMI 1640 contendo l-glutamina, sem bicarbonato de sódio – tamponado em pH 7,0 com 0,165 mol/L de MOPS), de acordo com os protocolos padronizados pelo Clinical Laboratory Standard Institute, M27-A3 (CLSI, 2008). Os inóculos foram preparados em solução salina estéril 0,85%, posteriormente ajustados em espectrofotômetro no comprimento de onda de 530 nm. A suspensão final de levedura foi obtida após diluições 1:50 e 1:20, sendo a última realizada em meio RPMI para obtenção do inóculo teste duas vezes mais concentrado (1×10^3 a 5×10^3 UFC/mL). Esta concentração foi diluída 1:1 quando inoculada no poço da placa de 96 poços, resultando em um inóculo final ($0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$). As microplacas foram incubadas a 35 °C por dois dias (48h). Em paralelo foi utilizado o controle de esterilidade (controle negativo) e o controle positivo para viabilidade de células



fúngicas. A CIM foi definida como a menor concentração capaz de inibir 100% o crescimento fúngico quando comparada ao controle positivo, por meio da leitura visual. Além das seleno-cumarinas, também foi avaliada a ação do fluconazol como fármaco padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

A tabela abaixo resume os resultados de concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos e do fluconazol obtidos até o momento:

Tabela 1: Concentração inibitória mínima das selenocumarinas contra *Candida* spp.

Molécula ug/mL	<i>C. albicans</i> CA02	<i>C. albicans</i> CA05	<i>C. albicans</i> CA09
382	>50	>50	>50
383	>50	>50	>50
384	50	>50	>50
385	>50	>50	>50
386	>50	>50	>50
387	>50	>50	>50
388	>50	>50	>50
395	50	50	50
SeCN	>50	50	>50
Fluconazol (inibição 50%)	25	0,19	0,19
Molécula ug/mL	<i>C. tropicalis</i> MT16	<i>C. tropicalis</i> MT28	<i>C. tropicalis</i> MT21
382	>50	50	
383	50	>50	
384	>50	>50	
385	>50	>50	
386	>50	>50	
387	>50	12,5	
388	>50	6,25	
395	50	6,25	
SeCN	50	50	12,5
Fluconazol (inibição 50%)	0,78	0,19	0,78

Após a realização da microdiluição em caldo, observamos que as moléculas não apresentaram um resultado promissor contra a *C. albicans*, pois a CIM foi ≥ 50 ug/mL. Entretanto, em relação a *C. tropicalis* MT28, observamos que a molécula 388 e 395 apresentaram CIM de 6,25 ug/mL, e a molécula 387 demonstrou CIM de 12,5 ug/mL. A molécula SeCN apresentou CIM de 12,5 ug/ml contra o isolado MT21.

O fluconazol é um antifúngico utilizado contra candidíase mucocutânea, por esse motivo, ele foi utilizado como fármaco padrão para fins de comparação nos ensaios, demonstrando baixa CIM para a maioria dos isolados clínicos (0,19 -25 ug/mL). As moléculas 387, 388 e 395 serão avaliadas contra o isolado MT21 de *C. tropicalis*.

Entre as espécies de *Candida*, a *C. albicans* é o principal agente causador de infecções sistêmicas e em mucosas. Entretanto, nota-se o aumento de casos de infecções causadas por *Candida não-albicans*, responsáveis por altas taxas de mortalidade, dependendo da condição imunológica de cada paciente. As classes de antifúngicos atualmente disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas são limitadas, nesse sentido, há um interesse crescente pela busca por novas opções terapêuticas, sendo esse o objetivo desse projeto de pesquisa.

CONCLUSÕES:

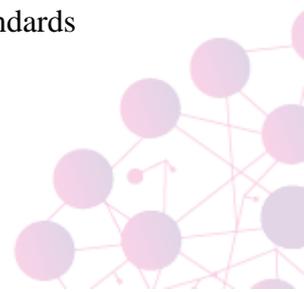
Os resultados preliminares deste trabalho permitem concluir que 3 compostos derivados da classe das seleno-cumarinas (387, 388 e 395) demonstram resultados promissores, pois apresentaram uma baixa CIM contra *C. tropicalis*. Como perspectiva, pretende-se avaliar a atividade destes compostos contra três isolados clínicos de *C. glabrata*, levedura que integra a microbiota dos seres humanos, mas que é responsável por causar infecções fúngicas oportunistas, além de avaliar os compostos promissores contra *C. tropicalis* MT21.

REFERÊNCIAS:

AL-RUBAIE, A. Z.; AL-JADAAN, S. A .S.; MUSLIM, S. K.; SAEED, E. A.; ALI, E. T.; AL- HASANI, A. K. J.; AL-SALMAN, H. N. K.; AL-FADAL, S. A. M. Synthesis, characterization and antibacterial activity of some new ferrocenyl selenazoles and 3,5- diferrocenyl-1,2,4-selenadiazole, **Journal of Organometallic Chemistry**. v..774, p.43-47, 2014.

CALDERONE RA, CLANCY CJ. 2012. *Candida* and Candidiasis. **ASM Press**, USA.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition. CLSI Document M27-A3. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2008.



FENG D, ZHANG A, YANG Y, YANG P. Coumarin-containing hybrids and their antibacterial activities. **Arch Pharm (Weinheim)**. v.353, p.e1900380, 2020.

GERZSON, M. F. B.; VICTORIA, F. N.; RADATZ, C. S.; GOMES, M. G.; BOEIRA, S. P.; JACOB, R. G.; ALVES, D.; JESSE, C. R.; SAVEGNAGO, L. In vitro antioxidante activity and in vivo antidepressant-like effect of a (phenylselanyl)acetophenone in mice **Pharmacology Biochemistry & Behavior**. v.102, p.21-29, 2012.

LAGUNES I, BEGINES P, SILVA A, GALÁN AR, PUERTA A, FERNANDES MX, MAYA I, FERNÁNDEZ-BOLAÑOS JG, LÓPEZ Ó, PADRÓN JM. Selenocoumarins as new multitarget antiproliferative agents: Synthesis, biological evaluation and in silico calculations. **Eur J Med Chem**. v.179, p.493-501, 2019.

PETRIKKOS, G.; SKIADA, A. Recent advances in antifungal chemotherapy. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 2, p.108–117, 2007.

RICHTER, S. S.; GALASK, R. P.; MESSER, S.A.; HOLLIS, R. J.; DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A. Antifungal susceptibilities of *Candida* species causing vulvovaginitis and epidemiology of recurrent cases, **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.2155–2162, 2005.

SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; GIANNINI, M. J. S. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options, **Journal of Medical Microbiology**, v.62, p.10–24, 2013.

XIE, J. L.; POLVI, E. J.; SHEKHAR-GUTURJA, T.; COWEN, L. E. Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. **Future Microbiology**. v.4, p.523–542, 2014.

FOMENTO

O trabalho contou com recursos internos do Centro Universitário Ritter dos Reis (UniRitter) e externos, oriundos da parceria com a Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

