

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA IN VITRO DE NOVOS COMPOSTOS CONTRA *Candida* spp.

Rafaela Martins (PIC/UEM), Érika Seki Kioshima Cotica, Isis Regina Grenier Capoci (Orientador), e-mail: isiscapoci@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de análises clínicas e
Biomedicina, PR

Ciências da Saúde/ Farmácia/ análises toxicológicas (Análises Clínicas)

Palavras-chave: *Candida*, antifúngicos, ensaio *in vitro*.

Resumo

Espécies do gênero *Candida* são os fungos mais frequentemente isolados de infecções hospitalares, representando um grave problema de saúde pública. Devido a poucas opções terapêuticas disponíveis e a resistência de algumas cepas, é necessária a busca por compostos para o desenvolvimento de um novo antifúngico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de 11 compostos, selecionados por métodos *in silico*, contra espécies de *Candida* spp. As metodologias *in vitro* empregadas foram a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM), seguindo os protocolos do CLSI. A maioria dos compostos avaliados apresentaram CIM e CFM de 256 µg/ml, que quando comparados ao antifúngico comercial fluconazol, os valores obtidos frente a ele são menores. Assim, os 11 compostos testados não tiveram atividade satisfatória *in vitro* contra espécies de *Candida* spp., porém, os mesmos serão avaliados quanto a atividade antifúngica contra outros fungos importantes patógenos humanos.

Introdução

As infecções hospitalares por fungos (IHF) estão associadas a maior morbidade, aumento no tempo de internação e, conseqüentemente, altos custos para o tratamento de pacientes graves. Espécies do gênero *Candida* spp. são os fungos mais frequentemente isolados, e estão entre os principais agentes responsáveis por infecções da corrente sanguínea.

O arsenal terapêutico para tratamento dessas infecções é restrito a poucas classes e pode causar efeitos indesejáveis, como toxicidade. Além disso, as espécies de *Candida* spp. variam quanto a suscetibilidade aos antifúngicos comumente utilizados. A resistência intrínseca de algumas espécies a esses medicamentos, e a resistência adquirida durante o tratamento em outras, está se tornando um grande problema no tratamento destas infecções (SANGUINETTI et al, 2015). Diante deste contexto, novas opções terapêuticas precisam ser desenvolvidas.

As metodologias *in silico* tem contribuído com o processo de desenvolvimento de fármacos utilizando como alvo, preferencialmente, enzimas que fazem parte do metabolismo dos patógenos, conferindo assim a propriedade de toxicidade seletiva. Um exemplo de alvo é a a flavoenzima tioredoxina redutase (TRR1) (ARNÉR &

HOLMGREN 2000). Recentemente em nosso grupo de pesquisa, foram obtidos dois novos compostos que interagem com a enzima TRR1 com efetiva atividade contra fungos dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e *Paracoccidioides* (CAPOCI et al, 2019), e dando seguimento as pesquisas, através de reposicionamento de drogas *in silico*, outros 11 compostos foram selecionados. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica *in vitro* dos 11 compostos contra espécies de *Candida* spp.

Materiais e métodos

Microrganismos

Para o desenvolvimento do projeto, foram utilizadas cepas padrão ATCC de *Candida albicans* (ATCC90028), *Candida parapsilosis* (ATCC22019), *Candida krusei* (ATCC6258), *Candida glabrata* (ATCC2001) e *Candida tropicalis* (ATCC750), estocadas à -20 C na Micoteca do Laboratório de Micologia Médica.

Avaliação da atividade antifúngica in vitro

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A avaliação dos 11 compostos foi realizada pela metodologia da microdiluição em caldo com a determinação da CIM (menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento fúngico), seguindo as normas de padronização do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010). Foram avaliadas 10 concentrações de cada composto variando de 0,5 a 256 µg/ml. A concentração do inóculo das espécies de *Candida* spp. foi de $0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Para a avaliação frente ao fluconazol, a metodologia foi a mesma empregada. Em cada placa foram incluídos controles: negativo, positivo e uma levedura de referência.

Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Foram retiradas alíquotas de 3 µL de cada um dos poços da placa da CIM para serem transferidas para placas de Ágar Saboraud (SDA), isento de drogas antifúngicas, e incubadas a 35°C por 24hs, a fim de determinar a CFM, avaliando se a atividade inibitória é também fungicida.

Resultados e Discussão

Apesar da crescente e preocupante ocorrência das IHF, as opções terapêuticas para o tratamento efetivo dessas doenças são limitadas. Na busca de novas estratégias para o desenvolvimento de antifúngicos, na tentativa de otimizar e ultrapassar as barreiras para desenvolvimento tradicional de fármacos (tempo e custos), os avanços nas técnicas computacionais têm habilitado métodos *in silico* para essa finalidade. Este trabalho objetivou a avaliação da suscetibilidade *in vitro* de cepas de *Candida* spp. frente a 11 compostos obtidos por reposicionamento de drogas *in silico*, dando início as técnicas de investigação sobre a ação antifúngica de um novo composto.

De acordo com os resultados, os compostos R1 e R2 apresentaram valores de 64 e 16 µg/ml para espécies de *C. glabrata* e *C. krusei*, respectivamente; R4 frente a *C. albicans* e *C. glabrata* apresentaram CIM de 16 e 64 µg/ml, porém, a maioria dos isolados tiveram uma CIM de 256 µg/ml ou maior (Tabela 1). A busca

por novos compostos antifúngicos baseados em metodologias *in silico* vem se destacando e na literatura encontramos, por exemplo, compostos promissores com CIM de 32 µg/ml frente a *C. albicans* (CAPOCI et al, 2019) e 32 µg/ml contra *C. krusei* (FARIA et al, 2020).

Entretanto, quando avaliamos a CFM dos 11 compostos, todos eles tiveram suas concentrações em 256 µg/ml (Figura 1 demonstra dois exemplos de CFM de compostos), ou seja, foi visualizado crescimento fúngico em todas as concentrações avaliadas, denotando um caráter fungistático em concentrações elevadas. Essa concentração encontrada não é considerada satisfatória, porque é maior do que as concentrações *in vitro* dos antifúngicos já comercializados para tratamento de infecções por *Candida*.

Comparando nossos resultados com o antifúngico convencional fluconazol (Tabela 1), os isolados foram mais suscetíveis a esse medicamento do que os novos testados, com CIM de 0,25 µg/ml para *C. albicans*, 1 µg/ml para *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*, 8 µg/ml *C. glabrata* e 32 µg/ml para *C. krusei*. Mesmo o fluconazol também apresentando caráter fungistático, suas concentrações *in vitro* para espécies de *Candida* spp. apresentam valores significativos menores do que os resultados que obtivemos, por exemplo para *C. albicans*, CIM variando de 64 – 256 µg/ml e CIM para fluconazol de 0,25 µg/ml.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) de 11 compostos e fluconazol (flc) frente as cepas padrão de *Candida* spp.

Isolado	CIM dos compostos (µg/ml)											
	R1	R2	R3	R4	R5	R7	R8	R9	R10	R11	R12	flc
<i>Candida albicans</i>	256	64	>256	64	128	>256	>256	>256	128	>256	>256	0,25
<i>Candida glabrata</i>	64	16	>256	16	128	>256	>256	>256	256	>256	>256	8
<i>Candida krusei</i>	64	16	>256	64	256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	32
<i>Candida tropicalis</i>	256	64	>256	128	256	>256	>256	>256	256	>256	>256	1
<i>Candida parapsilosis</i>	256	128	>256	64	256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	1

>256: o valor da CIM será maior que 256 µg/ml, porém o teste só foi realizado até essa concentração.

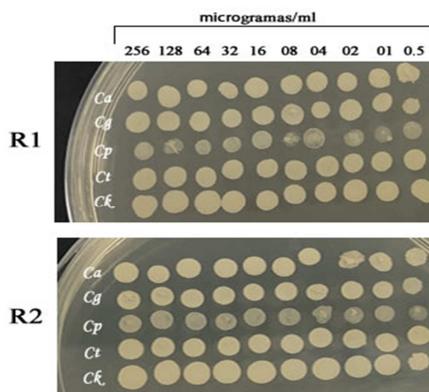


Figura 1. Concentração fungicida mínima (CFM) dos compostos R1 e R2 frente as cepas padrão de *Candida* spp.

Conclusões

De acordo com os resultados apresentados, os 11 compostos testados não tiveram atividade satisfatória *in vitro* contra espécies de *Candida* spp. Porém, serão testados frente a outros importantes patógenos humanos, como *Cryptococcus* spp. e *Paracoccidioides* spp.

Agradecimentos

Agradecemos todo o apoio do Laboratório de Micologia Médica da UEM e as agências de fomento CAPES e CNPq.

Referências

ARNÉR, E. S.; HOLMGREN, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. **European journal of biochemistry**, England, v. 267, n. 20, p. 6102–6109, 2000. DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01701.x.

CAPOCI, I.R.G. et al. Two New 1,3,4-Oxadiazoles With Effective Antifungal Activity Against *Candida albicans*. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 10, n. September, p. 1–11, 2019. a. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02130.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**; Approved Standard–Second Edition, CLSI document M27-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute, PA, USA, 2008.

FARIA, D.R. et al. Promising antifungal activity of new oxadiazole against *Candida krusei*. **PloS one**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. e0227876, 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0227876.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLÖRL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, Germany, v. 58 Suppl 2, p. 2–13, 2015. DOI: 10.1111/myc.12330.