

## POTENCIAL ANTIFÚNGICO E ANTIBIOFILME DE METALOFÁRMACOS SOBRE ISOLADOS DE *Candida albicans*.

Pedro H. Tavares<sup>1\*</sup>, Fabiana G. da Silva<sup>2</sup>, Kelly Mari P. de Oliveira<sup>3</sup>

1. Discente do curso de Biotecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)

2. Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFGD.

3. Docente/ Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. FCBA/ UFGD/Orientadora

### Resumo

A incidência de espécies de *Candida* multirresistentes e a terapêutica limitada para o tratamento de células planctônicas e em biofilme têm impulsionado a busca por novas moléculas com potencial antifúngico. Neste sentido, a utilização de íons metálicos coordenados a ligantes surge como uma alternativa. Portanto, este trabalho objetivou avaliar o potencial antifúngico de dois novos complexos de cobre(II) com ligantes 2-tiouracilas. Foram sintetizados dois complexos, complexo 1 Cu(bipy)Cl<sub>2</sub>(tiouracila) e complexo 2 Cu(bipy)Cl<sub>2</sub>(6-metiltiouracila). A concentração inibitória mínima e a concentração fungicida mínima do complexo 1 variou de 31,25 µg/mL<sup>-1</sup> a 1000 µg/mL<sup>-1</sup>. O complexo 1 apresentou percentual de inibição de 11,2% contra o biofilme pré-formado de *C. krusei* e *C. tropicalis*. Uma vez que o complexo 1 apresentou atividade antifúngica frente a todos os isolados testados, sugere-se que o mesmo pode ser utilizado para o desenvolvimentos de novas drogas para a terapia anti-*Candida*.

**Palavras-chave:** Cobre (II); Biofilme; 2-tiouracila.

**Trabalho selecionado para a JNIC:** UFGD

### Introdução

As infecções fúngicas têm aumentando significativamente nos últimos anos, contribuindo para as elevadas taxas de morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados (Doi et al., 2016; Garbee et al., 2017). *Candida albicans* é o patógeno fúngico mais prevalente em humanos, sendo a causa mais comum de candidemia e candidíase invasiva (Chandra e Mukherjee, 2015). Estudos epidemiológicos revelam que as espécies *Candida* não-*C. albicans* também tem emergido nas últimas décadas como uma preocupante ameaça a população (Doi et al., 2016; Pappas et al., 2016). Estudos têm mostrado que a maioria das infecções causadas por espécies de *Candida* estão associadas a formação de biofilme em dispositivos médicos e na mucosa do hospedeiro (Chandra et al., 2012; Sardi et al., 2013) contribuindo para o aumento da resistência a terapia antifúngica tradicional (Araújo et al., 2017).

A terapêutica das infecções causadas pelas espécies de *Candida* é realizada com antifúngicos da classe dos polienos, azóis e equinocandinas (Colombo et al., 2013). No entanto, à incidência de espécies multirresistentes, principalmente aos azóis e equinocandinas tem aumentado o número destas infecções (Stana et al., 2016). A toxicidade dos polienos e demais efeitos adversos dos antifúngicos convencionais (Sardi et al., 2013; Whaley et al., 2017) também são fatores que limitam a terapia antifúngica.

Na busca por novas moléculas com atividade antifúngica, é crescente a utilização de íons metálicos, coordenados a ligantes carreadores (Ferreira et al., 2013). A investigação sobre o comportamento químico de tiopirimidinas como tiouracilas é de grande interesse devido aos vários papéis desempenhados em sistemas biológicos. (Kuzovlev et al., 2015). Tiouracilas são ligantes N, O, S doadores, o que torna essas moléculas interessantes para metalacção devido as suas várias possibilidades de coordenação a centros metálicos. O cobre é um elemento traço essencial para as funções vitais dos seres vivos, sendo que suas propriedades biológicas estimulam o desenvolvimento de compostos de coordenação biologicamente ativos (Chaudhary e mishra., 2017).

Nesta perspectiva, dois novos complexos de cobre(II) com ligantes 2-tiouracilas foram sintetizados e caracterizados, a fim de avaliar o potencial antifúngico desses compostos.

### Metodologia

Os complexos baseados em ligantes com núcleos pirazolínicos e metais de transição forão sintetizados pelo Grupo de Pesquisa em Síntese e Caracterização Molecular coordenado pelo Prof. Dr. Gleison Antonio Casagrande da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos complexos foram avaliadas de acordo com as diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008). Foram testados 21 isolados clínicos de espécies de *Candida*, sendo dez *C. albicans*, seis *C. glabrata*, três *C. parapsilosis* e um isolado de *C. krusei* e *C. tropicalis*. O fluconazol (*Sigma-Aldrich*) foi utilizado como droga de referência. A CIM foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, onde as microplacas contendo as

diluições seriadas do complexo, 1,9 µg/mL a 1000 µg/mL, foram inoculadas com alíquotas de cada espécie na concentração de  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL. As placas foram incubadas a 35°C por 48 h. A CIM foi considerada como a menor concentração do complexo na qual os microrganismos não apresentaram crescimento visível após incubação.

Após a interpretação dos resultados da CIM, foi avaliado o número de células viáveis pela determinação do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) a partir de diluições seriadas e plaqueamento em Ágar Sabouraud (*Sigma-Aldrich*). Decorrido o tempo de 24 horas o número de colônias foram contadas. A CFM foi considerada a concentração que não apresentou contagem de UFCs.

Para avaliação do do efeito do complexo 1 no biofilme pré-formado também foi avaliado em microplacas de poliestireno com 96 poços de fundo chato. Neste ensaio, 100 µL das concentrações do complexo diluídas em RPMI 1640 foram inoculadas, simultaneamente, a 100 µL da suspensão do inóculo padronizada a  $1 \times 10^7$  células/mL. As placas foram incubadas sob agitação (120 rpm/minuto) por 48 h a 35 °C. Os poços foram lavados três vezes com PBS para remover as células fracamente aderidas e a atividade do complexo sobre o biofilme pré-formado foi mensurada pela quantificação do número de UFCs e os resultados foram expressos em Log/UFC.

Os resultados dos ensaios de biofilme foram analisados pelo software Graph Pad Prism 7.0 utilizando o teste ANOVA two-way e pós-teste Bonferroni.

## Resultados e Discussão

A atividade antifúngica do complexo 1 Cu(bipy)Cl<sub>2</sub>(tiouracila) e complexo 2 Cu(bipy)Cl<sub>2</sub>(6-metiluracila) e ligantes livres 2-tiouracila e 6-metiluracila em células planctônicas foi avaliada em isolados de espécies de *Candida*. A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) variaram de 31,25 µg/mL<sup>-1</sup> a 1000 µg/mL<sup>-1</sup>. O isolado de *C. krusei* foi o mais sensível com uma CIM de 31,25 µg/mL<sup>-1</sup>. O complexo 2 e os ligantes livres não apresentaram atividade antifúngica nas concentrações avaliadas, portanto, seus resultados foram desconsiderados. Assim, o complexo 1 foi selecionado para realização dos testes de avaliação do potencial antibiofilme.

Os dados de viabilidade celular demonstraram que o complexo 1 apresentou atividade fungicida além fungistática para todos os isolados testados, sendo que os azóis, como fluconazol possuem apenas atividade fungistática. Esses dados sugerem que a atividade fungicida do complexo também influenciou na capacidade do mesmo em destruir o biofilme pré-formado.

A partir dos resultados de atividade antifúngica com as células planctônicas foi selecionado um isolado de cada espécie, *C. albicans* CA1, *C. glabrata* CG1, *C. krusei* CK1, *C. parapsilosis* CP1 e *C. tropicalis* CT1, para os testes de formação de biofilme. Foi necessária uma concentração de 8 vezes a CIM para inibição das células em biofilme. Nos ensaios de tratamento do biofilme pré-formado, o complexo 1 apresentou um percentual de inibição de 11,2 % para *C. krusei* (250 µg/mL) e para *C. tropicalis* (500 µg/mL).

Alguns estudos tem revelado que para a redução do biofilme são necessárias concentrações de antimicrobianos de 2 a 1000 vezes maiores que CIM para células planctônicas (Chandra e Mukherjee, 2015; Martins et al., 2016; Sardi et al., 2017). Neste estudo foi utilizada a concentração de 8 vezes a CIM dos isolados testados e já foi possível observar uma redução nos ensaios realizados para o tratamento do biofilme pré-formado.

Os resultados de atividade antifúngica sugerem que a coordenação do ligante 2-tiouracil ao centro de cobre (complexo 1) potencializou a atividade, uma vez que o ligante livre não apresentou ação contra os isolados avaliados. Mohamed et al. (2011; 2013) e Masoud et al. (2012) também relataram em seus estudos a atividade antifúngica dos complexos de cobre com ligante de 2-tiouracil. Esta atividade pode ser resultante da melhora da lipossolubilidade do complexo e da toxicidade do cobre aos microrganismos, a qual acarreta danos a membrana levando a morte celular (Gaetke et al., 2014; García-Santamarina e Thiele, 2015). Também foi possível verificar que a alteração do ligante influenciou na atividade antifúngica. O complexo 2 não apresentou efeito sobre os isolados testados, uma vez que, a diferença estrutural entre os dois compostos está na presença do substituinte metila na posição 6 do anel tiopirimidinico, acredita-se que o substituinte interfira na lipossolubilidade e consequentemente na atividade antifúngica do complexo 2.

## Conclusões

Neste estudo foi avaliada a síntese a atividade antifúngica de dois novos complexos baseados em ligantes de tiouracil coordenados ao centro metálico de cobre. O complexo 1, Cu(bibi)Cl<sub>2</sub>(tiouracila), foi fungicida para todos os isolados testados apresentando atividade antifúngica frente as células planctônicas e em biofilme. *Candida krusei* foi a espécie mais sensível ao complexo. Com base nos dados obtidos sugere-se que mais testes sejam feitos, porém, evidenciou-se que o complexo 1 pode ser utilizado no desenvolvimento de novas drogas para a terapêutica anti-*Candida*.

## Referências bibliográficas

ARAÚJO, DANIELA, HENRIQUES M., SILVA, SÓNIA. **Portrait of Candida Species Biofilm Regulatory Network Genes**. Trends in Microbiology, 25, 2017.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; CAMARGO, L. F. A.; RICHTMANN, R.; QUEIROZ-TELLES, F.; SALLES, M. J. C.; Cunha, C. A.; Yasuda, M. A. S. **Brazilian guidelines for the management of candidiasis – a joint**

- meeting report of three medical societies: **Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 16, 1-43, 2013.
- CHANDRA J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M.A. **Candida biofilms associated with CVC and medical devices**. Mycoses, 55, 46–57, 2012.
- CHANDRA J.; MUKHERJEE, P. K. **Candida Biofilms: Development, Architecture, and Resistance**. Microbiology Spectrum, v. 3, n. 4, 2015.
- CHAUDHARY, N. K.; MISHRA, P. **Metal Complexes of a Novel Schiff Base Based on Penicillin: Characterization, Molecular Modeling, and Antibacterial Activity Study**. Bioinorganic Chemistry and Applications, v. 2017, p. 13, 2017.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). 2008. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, 3rd ed. Approved standard. CLSI M27-A3**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- DOI, A. M.; PIGNATARI, A. C. C.; EDMOND, M. B.; MARRA, A. R.; CAMARGO, L. F. A.; SIQUEIRA, R. A.; MOTA, V. P.; COLOMBO, A. L. **Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program**. Plos one, 11, p. e0146909, 2016.
- FERREIRA, I. P.; LIMA G. M.; PANIAGO, E. B.; TAKAHASHI, J. A.; KRAMBROCK, K.; PINHEIRO, C. B.; WARDELL, J. L.; VISENTIN, L. C. **Synthesis, characterization, structural and biological aspects of copper(II) dithiocarbamate complexes – Part II, [Cu{S2CN(Me)(R1)}2], [Cu{S2CN(Me)(R2)}2] and [Cu{S2CN(R3)(R4)}2] {R1 = ACH2CH(OMe)2, R2 = 2-methyl-1,3-dioxolane, R3 = ACH2(CH2)2N@CHPhOCH2Ph and R4 = ACH2CH2OH}**. Journal of Molecular Structure, 1048, 2013.
- GAETKE, L. M.; CHOW-JOHNSON, H. S.; CHOW, C. K. **Copper: Toxicological relevance and mechanisms**. Archives of Toxicology, v. 88, n. 11, 2014.
- GARBEE, D. D.; PIERCE, S. S.; MANNING J. **Opportunistic Fungal Infections in Critical Care Units**. Critical Care Nursing Clinics of North America, 29, 2017.
- GARCÍA-SANTAMARINA, S.; THIELE, D.J. **Copper at the Fungal Pathogen-Host Axis**. The Journal of Biological Chemistry, 290, 2015.
- KUZOVLEV, A. S.; SAVINKINA, E. V.; CHERNYSHEV, V. V.; GRIGORIEV, M. S.; VOLOV, A. N. **Copper and palladium complexes with substituted pyrimidine-2-thiones and 2 thiouracils: syntheses, spectral characterization, and X-ray crystallographic study**. Journal of Coordination Chemistry, 69, 508–521, 2016.
- MARTINS, N.; FERREIRA, I.C.F.R.; HENRIQUES, M.; SILVA, S. **In vitro anti-Candida activity of Glycyrrhiza glabra L**. Industrial Crops and Products, 83, 81-85, 2016.
- MASOUD, M. S.; SOAYED, A. A.; HUSSEINY, A. F.E. **Coordination modes, spectral, thermal and biological evaluation of hetero-metal copper containing 2-thiouracil complexes**. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 99, 365–372, 2012.
- MOHAMED, M. S.; AWADNAGLAA, S.M.; AHMED, M. **Synthesis and antimicrobial evaluation of some 6-aryl-5-cyano-2-thiouracil derivatives**. Acta Pharmaceutica, 6, 171–185, 2011.
- MOHAMED, M.S.; YOUNS, M.M.; AHMED, N.M. **Synthesis, antimicrobial, antioxidant activities of novel 6-aryl-5-cyanothiouracil derivatives**. European Journal of Medicinal Chemistry, 69, 591-600, 2013.
- PAPPAS, P.G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D. R.; CLANCY, C. J.; MARR, K. A.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REBOLI A. C.; SCHUSTER, M.G.; VAZQUEZ, J. A.; WALSH, T. J., ZAOUTIS T. E.; SOBEL, J. D. **Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America**. Clinical Infectious Diseases, 62, 4, 2016.
- SARDI, J. C. O.; SCORZONI, L.; BERNARDI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES GIANNINI, M. J. S. **Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options**. Journal of Medical Microbiology, 62, 2013.
- SARDI, J.C.O.; FREIRES, I.A.; LAZARINIA, J.G.; INFANTE, J.; ALENCAR, S.M.; ROSALEN, P. L. **Unexplored endemic fruit species from Brazil: Antibiofilm properties, insights into mode of action, and systemic toxicity of four Eugenia spp**. Microbial Pathogenesis, 105, 280-287, 2017.

STANA, A.; ENACHE, A.; VODNAR, D.C.; NASTASĂ, C.; BENEDEC, D.; IONUT, I.; LOGIN, C.; MARC, G.; ONIGA, O.; TIPERCIUC, B. **New Thiazolyl-triazole Schiff Bases: Synthesis and Evaluation of the Anti-*Candida* Potential.** *Molecules*, n 21, 2016.

WHALEY, S.G.; BERKOW, E.L.; RYBAK, J.M; NISHIMOTO, A.T; BARKER, K.S; ROGERS, P.D. **Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-albicans *Candida* Species.** *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:2173. doi:10.3389/fmicb.2016.02173.