

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**NOVAS ESTRATÉGIAS DE COMBATE A ESPÉCIES PATOGÊNICAS DE
Fusarium spp.**

BRUNA GERARDON BATISTA

PORTO ALEGRE, 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

NOVAS ESTRATÉGIAS DE COMBATE A ESPÉCIES PATOGÊNICAS DE
***Fusarium* spp.**

Tese apresentada por **BRUNA GERARDON**
BATISTA para obtenção do TÍTULO DE
DOUTOR(A) em Ciências Farmacêuticas.

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

Porto Alegre, 2020

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30 de setembro de 2020, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Daiane Flores Dalla Lana
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Profa. Dra. Juliana Caierão
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Lucélia Santi
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

BATISTA, BRUNA GERARDON
NOVAS ESTRATÉGIAS DE COMBATE A ESPÉCIES PATOGÊNICAS
DE *Fusarium spp.* / BRUNA GERARDON BATISTA. -- 2020.
155 f.
Orientador: Alexandre Meneghello Fuentesfria.

Coorientador: Gustavo Pozza Silveira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. *Fusarium spp.*. 2. Combinações terapêuticas. 3. Antifúngicos. 4. Compostos organosselênios. 5. Fusariose. I. Fuentesfria, Alexandre Meneghello, orient. II. Silveira, Gustavo Pozza, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Aplicada, sob orientação do Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); no Centro de Biotecnologia da UFRGS, em parceria com a Prof^a Dra. Marilene Henning Vainstein; no Instituto de Química da UFRGS, em parceria com o Prof. Dr. Gustavo Pozza Silveira; no Laboratório de Bioquímica e Toxicologia do Instituto Federal de Santa Catarina, em colaboração com o Prof. Dr. Mário Lettieri Teixeira; e no Laboratório de Pesquisa em Toxicologia Celular, da Universidade Federal do Pampa, em parceria com os Profs. Dr. Luís Flávio Oliveira e Dr. Michel Mansur Machado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar presente em minha vida me fazendo crer que nada que acontece é por acaso e que os propósitos Dele nem sempre são compreendidos de imediato, me fazendo ter fé e esperança.

Agradeço ao meu orientador e amigo Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, por acreditar em mim e por me incentivar em todos os momentos. Poder fazer parte da tua história com certeza é uma honra para mim.

Agradeço aos meus pais, maravilhosos, meus fãs número 1, pelo amor incondicional e apoio emocional, que, mesmo longe, sempre estão presentes.

Agradeço as minhas irmãs que me motivam a seguir em frente por ser um espelho para elas.

Agradeço aos meus avós pela confiança e amor.

Agradeço aos meus amigos que me admiram e me apoiam.

Agradeço as minha colegas do Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada. Que pessoas inteligentes!!!!...dedicadas e receptivas. Agradeço a cada uma que tive a oportunidade de aprender, conviver e colaborar. O companheirismo é uma peça fundamental para a evolução como coletivo. Sucesso para todas nós!

Agradeço ao meu co-orientador Dr. Gustavo Pozza Silveira pela confiança e por acreditar em mim.

Agradeço a todos os colaboradores que de uma maneira ou outra se fizeram parte essencial para o andamento desse projeto.

“Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas.

Pessoas transformam o mundo.”

(Paulo Freire)

RESUMO

Fusarium spp. são fungos que vem emergindo como patógeno humano oportunista. A multirresistência de isolados de *Fusarium* spp. correlacionam-se com mal desfechos clínicos, e as poucas opções de terapêuticas dificultam um tratamento eficaz. **Objetivos:** tendo em vista essa problemática, buscou-se avaliar o potencial antifúngico de moléculas sintéticas de selenocianatos alílicos frente a cepas de *Fusarium* spp. multirresistentes, estudar seu mecanismo de ação e potencial tóxico, assim como buscar uma nova estratégias para tratamento de fusariose utilizando moléculas de síntese inédita. **Materiais e métodos:** foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) de moléculas de selenocianatos alílicos por microdiluição; ensaio de sorbitol e ergosterol foi realizado para a determinação do mecanismo de ação; HET-CAM foi utilizado para verificação de possível potencial alergênico; viabilidade celular, ensaio do micronúcleo e ensaio cometa determinaram a toxicidade dessas moléculas; *checkerboard* determinou possíveis efeitos sinérgicos entre a molécula e antifúngicos comerciais comumente utilizados. **Resultados:** as moléculas de selenocianatos alílicos apresentaram baixos valores de CIM e possuem ação na membrana celular do fungo. Dentre as sete moléculas testadas apenas duas apresentaram potencial alergênico e a toxicidade é dose-dependente. Foi possível observar efeito sinérgico na associação de selenocianato alílico com antifúngico comercial. **Conclusão:** selenocianatos alílicos podem ser promissores como uma nova classe de antifúngicos devido a baixa concentração necessária de substância que possui capacidade para inibir o crescimento de *Fusarium* spp., a baixa toxicidade e alergenicidade reforça essa afirmação. O sinergismo com antifúngicos comerciais torna mais amplo o uso de tais moléculas.

PALAVRAS-CHAVE: *Fusarium* spp., combinações terapêuticas, antifúngicos, compostos organoselênios, fusariose.

ABSTRACT

Fusarium spp. are fungi that have been emerging as an opportunistic human pathogen. The multiresistance of *Fusarium* spp. are correlate with poor clinical outcomes, and the few therapeutic options make effective treatment difficult.

Objectives: in view of this problem, we search to assess the antifungal potential of synthetic molecules of allylic selenocianates against strains of multiresistant *Fusarium* spp., study its mechanism of action and toxic potential, as well as seek a new strategy for the treatment of fusariosis using molecules of unprecedented synthesis. **Materials and methods:** the minimum inhibitory concentration (MIC) of allylic selenocyanate molecules was determined by microdilution; sorbitol and ergosterol assay was performed to determine the mechanism of action; HET-CAM was used to check for possible allergenic potential; cell viability, micronucleus assay and comet assay determined the toxicity of these molecules; checkerboard determined possible synergistic effects between the molecule and commonly used commercial antifungals.

Results: the allylic selenocyanate molecules showed low MIC values and have action on the fungal cell membrane. Among the seven molecules tested, only two showed allergenic potential and toxicity is dose-dependent. It was possible to observe a synergistic effect in the association of allyl selenocyanate with commercial antifungal.

Conclusion: allylic selenocyanates can be promising as a new class of antifungals due to the low necessary concentration of substance that has the capacity to inhibit the growth of *Fusarium* spp., the low toxicity and allergenicity reinforces this statement. Synergism with commercial antifungals makes the use of such molecules wider.

KEY WORDS: *Fusarium* spp., therapeutic combinations, antifungals, organoselenium compounds, fusariosis.

Sumário

INTRODUÇÃO	15
OBJETIVO GERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
CAPÍTULO I – REVISÃO TEÓRICA	19
1. <i>FUSARIUM</i> SPP.	19
2. FATORES DE VIRULÊNCIA.....	22
3. RESISTÊNCIA	22
4. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	23
5. DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL	25
6. TRATAMENTO	26
6.1. ANTIFÚNGICOS CONVENCIONAIS	26
6.2. OUTRAS OPÇÕES NA TERAPIA COMBINADA	27
6.3. PROSPECTIVA DE NOVAS OPÇÕES DE TRATAMENTO	28
6.4. COMPOSTOS ORGANOSELÊNIOS.....	28
CAPÍTULO II – ALLYLIC SELENOCYANATES AS NEW AGENTS TO COMBAT <i>FUSARIUM</i> SPECIES INVOLVED WITH HUMAN INFECTIONS	31
CAPÍTULO III – HUMAN FUSARIOSIS: AN EMERGING INFECTION THAT IS DIFFICULT TO TREAT	65
CAPÍTULO IV – <i>IN VITRO</i> SYNERGISM OF ORGANOSELENIUM AND ECHINOCANDIN AGAINST <i>FUSARIUM</i> SPP.	85
DISCUSSÃO GERAL	97
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	99
COLABORAÇÕES	101
ANEXOS	103
ANEXO I – PATENTE “SELENOCIANATO ALÍLICO, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USOS DO MESMO E COMPOSIÇÃO DE ENXAGUATÓRIO BUCAL”	104
REFERÊNCIAS	139

INTRODUÇÃO

Fusarium spp. são fungos filamentosos com ampla distribuição ambiental, sendo encontrados no ar, água, solo, plantas e substratos orgânicos. As regiões tropicais e subtropicais são consideradas as que apresentam condições climáticas propícias para o desenvolvimento da espécie (MAHMOUDI *et al.*, 2018). Além de ser considerado uma ameaça agrônômica, nas últimas três décadas o fungo vem emergindo como patógeno humano oportunista, ganhando destaque na área médica (TUPAKI-SREEPURNA & KINDO, 2018).

As infecções em humanos apresentam gravidade relacionada com a forma da doença, que pode ser superficial, invasiva ou disseminada (MCCARTHY *et al.*, 2018) sendo as infecções superficiais relacionadas com uma alta morbidade e as disseminadas com extrema mortalidade (TUPAKI-SREEPURNA & KINDO, 2018). Algumas manifestações clínicas são infecção de pele, ceratite, endoftalmite, onicomiose, peritonite, osteomielite, artrite, otite, sinusite e abscesso cerebral (MCCARTHY *et al.*, 2018).

A fusariose é conhecida como a terceira causa mais comum de infecções por fungos filamentosos, logo atrás da aspergilose e zigomicose (TUPAKI-SREEPURNA & KINDO, 2018). Indivíduos acometidos por infecções causadas por *Fusarium* spp. e que apresentam fatores de risco como neutropenia prolongada grave tendem a evoluir para a forma disseminada da doença resultando em fungemia em aproximadamente 70% dos casos (KADRI *et al.*, 2015).

O diagnóstico correto e definitivo de fusariose é difícil e demorado (KADRI *et al.*, 2015; MCCARTHY *et al.*, 2018) e conseqüentemente não favorece o tratamento, visto que o início precoce de uma terapia antifúngica adequada demonstra ter um impacto direto na melhora ou cura do paciente (HALDRICH & AYADI, 2018). A alta resistência de isolados de *Fusarium* spp. correlacionam-se com mal desfechos clínicos, sendo que muitas vezes a presença de susceptibilidade *in vitro* não corresponde ao combate no desenvolvimento do fungo *in vivo* (HADRI *et al.*, 2015). As poucas opções de antifúngicos com ação frente a espécies de *Fusarium* dificultam o manejo clínico e o uso de monoterapia com azóis e polienos muitas vezes não se mostra eficaz (HALDRICH & AYADI, 2018). O uso de combinações terapêuticas sejam elas antifúngicas ou não podem apresentar efeitos sinérgicos benéficos *in vitro*, podendo ser um método alternativo no combate a fusariose (MAHMOUDI *et al.*, 2018).

Classes de antifúngicos comerciais assim como novas substâncias ainda em fase inicial de experimentação *in vitro* revelam baixos valores de concentração inibitória mínima (CIM) para *Fusarium* spp., porém, vale ressaltar que *in vivo*, nem sempre o desfecho clínico é como o esperado (SRADHANJALI *et al.*, 2018). A terapia combinada utilizando antifúngicos com diferentes mecanismos de ação vêm sendo realizada e as interações sinérgicas entre eles apresentam grandes chances de superar a toxicidade e os efeitos colaterais se comparados com às altas doses de medicamentos utilizados na monoterapia (WEI *et al.*, 2018).

É a eficácia e segurança de combinações já testadas *in vitro* que encorajam novos estudos envolvendo possíveis interações sinérgicas não apenas com antifúngicos comerciais, mas também utilizando novas moléculas sintéticas. O uso de antifúngicos que não são comumente utilizados também podem ser uma alternativa na busca de novas estratégias para o tratamento de fusariose. Com base nessa informação se pensou no uso da caspofungina para propor um modelo de terapia combinada. Da classe das equinocandinas, esse antifúngico atua inibindo a enzima β (1,3) -d-glucano-sintase, necessária para a síntese da parede celular (DANIELESCU *et al.*, 2017). Outras substâncias incluem moléculas de selenocianatos alílicos cujo mecanismo de ação é relacionado a biossíntese do ergosterol, envolvidos na membrana do fungo.

Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial antifúngico de moléculas sintéticas de selenocianatos alílicos frente a cepas de *Fusarium* spp. multirresistentes estudando seu mecanismo de ação e toxicidade. A partir dessa investigação, se propoz descrever uma nova estratégias para tratamento de fusariose.

OBJETIVO GERAL

Verificar a atividade antifúngica de selenocianatos alílicos inéditos e sua ação combinada com diferentes fármacos frente à cepas de *Fusarium* spp. multirresistentes, bem como, investigar o mecanismo de ação e toxicidade dessa classe de moléculas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de selenocianatos alílicos, moléculas orgânicas de síntese inédita frente a cepas *Fusarium* spp., investigar o mecanismo de ação e o potencial de toxicidade e alergenicidade das moléculas, a fim de buscar uma nova classe de antifúngicos;
2. Propor uma nova estratégia de tratamento para ceratite com o uso das moléculas orgânicas sintetizadas aliadas à um antifúngico comercial, a fim de demonstrar o potencial *in vitro* da molécula de selenocianato alílico no combate à infecções;

CAPÍTULO I – REVISÃO TEÓRICA

1. *Fusarium* spp.

O gênero *Fusarium* pertencem ao Filo *Ascomycota* e sua estrutura é constituída por hifas hialinas segmentadas em septos espaçados de forma mais ou menos regular, sendo caracterizado como um fungo filamentoso. Por mais que alguns ascomicetos apresentem um breve estágio de estrutura feminina ou masculina, *Fusarium* spp. é um representante sem estágio sexual conhecido (SADALVA *et al.*, 2009). A sua reprodução é assexuada, ocorre por meio de formação de conídios no ápice das hifas. Esses conídios tem a capacidade de sobreviverem por semanas na natureza. Seu habitat natural é o solo e são patógenos frequentes e bem conhecidos de plantas e cereais (FRAC *et al.*, 2016; SHI *et al.*, 2016; MORETTI *et al.*, 2018), tendo a maioria das suas espécies como saprófitas de vida livre e a patogenicidade nas plantas está relacionada com a produção de micotoxinas (ROMANO *et al.*, 2010). Com relação a sua morfologia macroscópica, podem se assemelhar a um denso tapete (as hifas) (Figura 1.) que microscopicamente apresentam conidiósporos fusiformes característicos do gênero (Figura 2.) (TORTORA *et al.*, 2017).

Geneticamente o gênero *Fusarium* spp. compreende pelo menos 20 complexos



Figura 1. Morfologia macroscópica de uma cepa de *Fusarium* spp.



Figura 2. Observação microscópica de conidiósporos fusiformes.

divididos entre nove linhagens (VAN DIEPENINGEN *et al.*, 2014; ALANIO *et al.*, 2017) representando mais de 70 espécies que já foram relatadas como patógenos à córnea humana, por exemplo (KREDICS *et al.*, 2015). Os complexos mais frequentes

relacionados com infecções humanas são o complexo *Fusarium solani* (60% dos casos), *F. oxysporum* (10%), *F. fujikuroi* (10%), *F. dimerum* (5%) (ALANIO *et al.*, 2017) e seguidos pelos complexos *F. incarnatum-equiseti*, *F. chlamydosporum* e complexo *F. sporotrichioides* (VAN DIEPENINGEN *et al.*, 2014). Dentre os complexos acima citados, os mais frequentemente identificados são as espécies do complexo *F. solani* e *F. oxysporum* (ROMANO *et al.*, 2010; DEBOURGOGNE *et al.*, 2016).

Para causar uma infecção em humanos, o oportunismo do *Fusarium* spp. têm relação com alguns fatores de risco do indivíduo, como trauma, imunossupressão, tratamento prévio com esteróides e o uso de lentes de contatos (PROENÇA-PINA *et al.*, 2010). As formas de infecção podem variar em superficiais, invasivas locais e disseminadas (VAN DIEPENINGEN *et al.*, 2015).

As infecções fúngicas invasivas correspondem a um problema mundialmente emergente, sendo associado ao crescente número de pacientes imunodeprimidos, com anomalias hematológicas e transplantados (DEBOURGOGNE *et al.*, 2016). Sendo assim, conhecer a epidemiologia do agente infeccioso facilita o entendimento a respeito da evolução do fungo, distribuição geográfica e disseminação tanto das doenças quanto dos isolados (ALANIO *et al.*, 2017). No Brasil, no ano de 2007 foi observado um aumento na incidência de fusariose invasiva, sendo relatados cinco casos na forma disseminada da doença e dois casos de infecções invasivas localizadas num período de apenas sete meses (NUCCI *et al.*, 2013). Já entre os anos de 2000 e 2010 foram relatados um total de vinte e um casos de fusariose invasiva em pacientes com anomalias hematológicas (neutropenia, leucemia mielóide aguda e transplantados de células hematopoiéticas) (NUCCI *et al.*, 2013).

Por mais que as infecções fúngicas sejam prevalentes em países com clima tropical e subtropical (PROENÇA-PINA *et al.*, 2010), a identificação de complexos específicos do gênero têm relação com incidência em determinadas regiões enquanto outras têm uma distribuição mundial (VAN DIEPENINGEN *et al.*, 2015). Como já abordado, a incidência de infecções ocasionadas por espécies de *Fusarium* está relacionada com regiões geográficas, por isso, na Espanha, apenas 1,2% das infecções têm como agente etiológico espécies de *Fusarium*, sendo isolados de tecidos, secreções respiratórios e fluídos estéreis. Em contrapartida, no Brasil, o *Fusarium* spp. é considerado o segundo agente etiológico mais frequente em

infecções fúngicas invasivas (LASS-FLÖRL & CUENCA-ESTRELLA, 2017; MORETTI *et al.*, 2018).

O uso de lentes de contato foi um fator importante para o relato de mais de 300 casos de ceratite causadas por *Fusarium* spp., gerando surtos mundialmente distribuídos entre 2005 e 2007, porém, as áreas endêmicas geralmente estão localizadas em regiões de clima tropical e subtropical (AL-HATMI *et al.*, 2016). Um estudo realizado em São Paulo com casos de ceratite fúngica ocorridos no período entre 2000 e 2004 relatou que *Fusarium* spp. correspondia ao fungo mais comumente isolado do tecido infectado dos pacientes representando um total de 66,7% sendo que o total de ceratite causada por fungos foi de 66 casos para as 478 suspeitas (13,81%) (IBRAHIM *et al.*, 2009). Em outro estudo realizado entre 2001 e 2004 também em São Paulo relatou um total de 32 casos de ceratite fúngica, sendo que *Fusarium* spp. foi o agente etiológico mais comum representando 16,92% dos casos (FURLANETTO *et al.*, 2018). Já em outro período, variando entre 2003 e 2006, foram observados 11 casos de ceratite fúngica causada por espécies de *Fusarium*, correspondendo a um total de 65% de todos os casos envolvendo fungos (IBRAHIM *et al.*, 2011). Da Rosa e colaboradores identificaram 10 casos de ceratite fúngica causada por *Fusarium* spp. entre 2008 e 2017 no sul do país. O estudo revelou que aproximadamente 70% dos casos estavam relacionados à população rural, inferindo uma contaminação através do contato com plantas carregando o fungo (DA ROSA *et al.*, 2018).

Uma revisão bibliográfica envolvendo todos os relatos de infecções causadas por espécies de *Fusarium* foi feita por AL-HATMI e colaboradores (2016). Nesse estudo foram encontrados 388 casos de fusariose no período de 1958 até 2015, sendo que foram realizadas buscas em relatos de casos publicados na literatura e os principais países com esses relatos estavam em regiões tropicais e subtropicais como Brasil, México, China, Índia e Colômbia. As principais formas de infecção relatadas foram a superficial e subcutânea (174 casos; 44,8%), dessas, infecções de pele representavam 62 casos (16%), infecções na região ocular, 66 casos (17%) e nas unhas 25 casos (6,4%). Episódios de fusariose invasiva também foram encontrados, representando 9 casos (2,27%) e as infecções disseminadas corresponderam a 109 casos (28%).

2. Fatores de virulência

A patogenicidade e virulência do gênero *Fusarium* spp. ainda não é bem estabelecida. Alguns fatores de virulência vêm sendo reportados, como a produção de biofilme, proteinases e enzimas hidrolíticas (SAV *et al.*, 2016; ÇUHADAR *et al.*, 2018). Ainda não há estudos que comprovem uma correlação entre o perfil de suscetibilidade do fungo com a sua virulência, em contrapartida, já foi possível afirmar que isolados patogênicos de *Fusarium* spp. oriundos de infecção ocular apresentaram os fatores de virulência acima citados (SAV *et al.*, 2016).

Fusarium solani é a espécie mais virulenta (NUCCI & ANAISSIE, 2007) e após análise de isolados patogênicos oriundos de plantas e outros de animais, relatou-se que há fatores de virulência específicos para plantas e outros comum entre ambos isolados. Por mais que diferenças com relação aos mecanismos de virulência expressos sejam encontrados em isolados com relação a sua origem, o sistema de sinalização que controla essa patogenicidade é conservada em ambos (GUARRO, 2013).

As micotoxinas produzidas pelo fungo são metabólitos secundários que podem ser prejudiciais também aos seres humanos, visto que elas já são conhecidas como prejudiciais as plantas. A ingestão de micotoxinas pelo homem pode ocasionar intoxicação alimentar, prejudicar o sistema imunológico e causar toxicidade dérmica, desempenhando um papel importante em infecções de pele e tecidos moles. Curiosamente, a produção dessas toxinas não é confirmada em espécies de *Fusarium* que causam infecções invasivas (ARIF & PERFECT, 2017).

3. Resistência

A resistência primária ou intrínseca é encontrada naturalmente entre algumas espécies de *Fusarium* e a resistência secundária se desenvolve entre cepas previamente suscetíveis após a exposição ao antifúngico (DABAS *et al.*, 2016; AL-HATMI *et al.*, 2016; TAJ-ALDEEN, 2017; HALDRICH & AYADI, 2018). Por isso, a aplicação de fungicidas no campo para tentar barrar o desenvolvimento de espécies de *Fusarium* como patógenos contribui diretamente para o desenvolvimento de resistência. No geral, fungicidas que apresentam o seu mecanismo de ação relacionado com a inibição da biossíntese de esteroides são os mais utilizados, como

os azóis, que parecem ser os mais eficientes no combate de fusariose em plantas. Sendo assim, o crescente uso dessa classe de antifúngicos na Europa e Ásia já relatou menos eficácia contra espécies de *Fusarium* (FRAC *et al.*, 2016). A opção por uso de fungicidas azóis no campo, principalmente propiconazol, bromuconazol, epoxiconazol, difenoconazol e tebuconazol, se dá pelo baixo custo dessa classe de antifúngicos, amplo espectro e estabilidade consideravelmente longa do fármaco. Em contrapartida, algumas espécies de *Fusarium* são resistentes aos azóis (DABAS *et al.*, 2016). Para uso clínico, são utilizados derivados da classe como imidazóis ou triazóis (AL-HATMI *et al.*, 2016).

Os isolados clínicos mais relevantes de *Fusarium* são resistentes a vários antifúngicos usados atualmente, representando um enorme desafio para o tratamento de infecções em humanos (TAJ-ALDEEN, 2017). Além de possuir mecanismo de bomba de efluxo, há evidências que a resistência do *Fusarium* tenha origem genética com uma mutação do gene FKS1 alterando o perfil de suscetibilidade frente às equinocandinas e alterações na expressão do gene CYP51 relacionados com a suscetibilidade frente aos azóis (AL-HATMI *et al.*, 2016).

Fusarium spp. apresentam um perfil de suscetibilidade *in vitro* variável frente à antifúngicos como anfotericina B e triazóis (itraconazol, voriconazol e posaconazol). Isolados de *F. solani* tendem a ser um pouco mais suscetível à anfotericina B, mas menos suscetível ao voriconazol do que outras espécies, como *F. oxysporum* (MCCARTHY *et al.*, 2018).

Por fim, nem mesmo uma susceptibilidade *in vitro* aparente, com baixas CIM poderão ser correlacionados com sucesso terapêutico. A eficiência clínica de antifúngicos comparados aos resultados *in vitro* são de até 53% para anfotericina B, entre 47-60% para voriconazol e 48% para posaconazol tornando ainda mais difícil o tratamento de fusariose (KADRI *et al.*, 2015).

4. Manifestações clínicas

Quando espécies de *Fusarium* estão causando doença, estas são denominadas fusariose. As formas clínicas de fusariose podem variar de localizada à invasiva, incluindo lesões de pele, ceratite, infecção de corrente sanguínea, osteomielite, abscesso cerebral e sinusite (ROMANO *et al.*, 2010). Essas

manifestações clínicas estão relacionada com o estado imune do hospedeiro (DABAS *et al.*, 2016; DEBOURGOGNE *et al.*, 2016). Ceratite e onicomicose são as doenças mais comuns acometendo indivíduos imunocompetentes e a contaminação pode ocorrer por trauma ou mesmo pelo uso de lentes de contato. Já em indivíduos imunocomprometidos, especialmente aqueles que apresentam anomalias hematológicas, a fusariose pode ocorrer de forma disseminada no organismo (NUCCI & ANASSIE, 2007; VAN DIEPENINGEN *et al.*, 2015; DEBOURGOGNE *et al.*, 2016; MURAOSA *et al.*, 2017; MORETTI *et al.*, 2018; MCCARTHY *et al.*, 2018). A taxa de mortalidade em pacientes acometidos por infecção fúngica invasiva, principalmente aqueles que apresentam fatores de risco como anomalias hematológicas pode chegar a até 75% (LASS-FLÖRL & CUENCA-ESTRELLA, 2017; MURAOSA *et al.*, 2017).

Fusarium solani é a espécie mais frequente relacionada com fusariose, estando presente em 50% do total de casos, seguido por *F. oxysporum* (20%), *F. verticillioideis* e *F. moniliforme* (10%) (MURAOSA *et al.*, 2017; MORETTI *et al.*, 2018).

A endoftalmite geralmente ocorre após complicação de ceratite avançada ou cirurgia ocular em indivíduos imunocompetentes. Já em imunocomprometidos essa manifestação clínica é mais comum como resultado da disseminação hematogênica (NUCCI & ANASSIE, 2007; PROENÇA-PINA *et al.*, 2010). A presença do fungo infectando a pele geralmente se manifesta com a presença de lesões avermelhadas ou acinzentadas com formação de úlcera. A ulceração e formação de escara nas lesões são atribuídas a trombose em vasos dérmicos, extravasamento de eritrócitos e necrose dérmica focal induzida por hifas fúngicas (ROMANO *et al.*, 2010). A sinusite causada por *Fusarium* spp. ocorre principalmente em pacientes imunocomprometidos ou que apresentam fatores de risco como neoplasias hematológicas, transplantados e ainda os que foram submetidos a longos tratamentos com imunossupressores (DAVOUDI *et al.*, 2015). Essa manifestação clínica é caracterizada como uma infiltração fúngica na cavidade nasal e seios paranasais, sendo uma porta de entrada para infecções locais invasivas que podem atingir o cérebro (VINH *et al.*, 2017).

Quando a forma da doença está disseminada no organismo, comumente estão presente múltiplas lesões eritematosas papulosas ou nodulares e dolorosas, frequentemente com necrose central no paciente infectado. Essas lesões também podem estar em diferentes estágios de evolução e muitas vezes são a única fonte de diagnóstico na maioria dos casos (NUCCI & ANASSIE, 2007). A doença disseminada

é a forma clínica desafiadora de fusariose em pacientes imunocomprometidos e representa aproximadamente 70% de todos os casos de fusariose nesses indivíduos (JENSEN *Et al.*, 2004; TAJ-ALDEEN, 2017). Outros fatores de risco para o disseminação é leucemia aguda e neutropenia prolongada e profunda (DEBOURGOGNE *et al.*, 2016).

Em casos de osteomielite, artrite séptica, pneumonia, abscesso vertebral e cerebral são resultado da inoculação do fungo como porta de entrada, sendo que essa inoculação pode ser traumática ou apenas por inalação (TUPAKI-SREEPURNA & KINDO, 2018).

5. Diagnóstico clínico e laboratorial

Para o início do diagnóstico laboratorial, a histologia do tecido afetado pode ser feita (DABAS *et al.*, 2016). Nesse caso, hifas com filamentos hialinos e septados dicotomizados em ângulos agudos e retos serão observadas. Além disso, pode estar presente uma esporulação, o achado de hifas e estruturas semelhantes a leveduras juntas é altamente sugestivo de fusariose. Algumas espécies de *Fusarium* podem formar clamidósporos nas hifas no tecido, porém, as características morfológicas observadas diretamente no exame histopatológico são inespecíficas, necessitando de técnicas adicionais de identificação (VAN DIEPENINGEN *et al.*, 2014).

Na imuno-histoquímica são utilizados anticorpos específicos contra antígenos celulares para identificação fúngica, porém, essa técnica não é comumente utilizada na rotina da maioria dos laboratório clínicos (MCCARTHY *et al.*, 2018). Técnicas que utilizam a estrutura do DNA como base costumam ser mais específicas no diagnóstico, porém, muitas técnicas não são comercialmente disponibilizadas (VAN DIEPENINGEN *et al.*, 2014). A reação de cadeia polimerase (PCR) baseada nas regiões do DNA do fungo possibilita uma identificação em gênero e espécie do fungo (MCCARTHY *et al.*, 2018).

Na maioria dos laboratórios de análises clínicas, a identificação de isolados fúngicos tem sido baseada em características morfológicas de culturas e microscópicas de sua estrutura. O problema desse tipo de identificação é que não possibilita a diferenciação de espécies, visto que muitas delas se parecem semelhantes em meio de cultura (VAN DIEPENINGEN *et al.*, 2014). A característica

mais típica do gênero *Fusarium* são seu macroconídios em forma de “fuso” ou “canao”. Porém, os macroconídios nem sempre estão presentes, dificultando a confirmação microscópica. A forma dos conidióforos (estruturas nas quais os conídios são formados) podem diferir entre as espécies. Algumas espécies são homotáticas e produzem corpos frutíferos com ascósporos, enquanto espécies heterotáticas precisam de um parceiro adequado para produzir tais estruturas. Para uma identificação morfológica mais especializada se faz necessário o cultivo do fungo em meios de cultura padronizados e a formação de características distintivas pode exigir de 6 a 8 semanas, tornando a identificação precisa clinicamente redundante. Além disso, o reconhecimento morfológico de espécies de *Fusarium* em um ambiente hospitalar é muitas vezes impossível pela degeneração da morfologia da colônia. (VAN DIEPENINGEN *et al.*, 2014)

6. Tratamento

6.1. Antifúngicos convencionais

Fusarium spp. apresentam um perfil de suscetibilidade com altos níveis de resistência (VAN DIEPENINGEN *et al.*, 2015; MORETTI *et al.*, 2018). Uma vez que não existem protocolos clínicos oficiais para o tratamento da fusariose, a eficácia das diferentes terapias baseia-se nos resultados de alguns casos clínicos ou estudos retrospectivos, sendo assim, a estratégia de tratamento ideal permanece incerta (GUARRO, 2013; AL-HATMI *et al.*, 2016). Resultados *in vitro* indicam grande variação de suscetibilidade para anfotericina B e azóis, resultando em relatos divergentes com relação ao sucesso ou insucesso terapêutico após a utilização clínica dessas classes (DABAS *et al.*, 2016; MCCARTHY *et al.*, 2018).

As opções terapêuticas de primeira escolha utilizados na maioria das infecções causadas por *Fusarium* spp. são a anfotericina B, natamicina e azóis como o voriconazol (TUPAKI-SREEPURNA & KINDO, 2018).

O tratamento de ceratite geralmente é realizado com o uso de natamicina, apresentando bons resultados (VAN DIEPENINGEN *et al.*, 2015; TUPAKI-SREEPURNA & KINDO, 2018). Outra opção também utilizada é a anfotericina B (DABAS *et al.*, 2016; AL-HATMI *et al.*, 2016). Para o tratamento dessa infecção, a forma tópica de aplicação dos fármacos é considerada melhor opção. Por mais que a penetração da natamicina na córnea é considerada uma problemática, a sua

biodisponibilidade tente a compensar a falha na penetração ocular (KREDICS *et al.*, 2015).

Já para o tratamento da forma disseminada da infecção por *Fusarium* spp., a anfotericina B e o voriconazol são as duas opções de escolha na prática clínica (LAMOTH & KONTOYIANNIS, 2019). Uma análise de Nucci e colaboradores (2014) com 233 casos de pacientes acometidos pela fusariose invasiva mostrou uma média similar de sobrevivência de 90 dias com tratamento com voriconazol e anfotericina B. Lamoth e colaboradores (2016) relataram uma falha terapêutica em 87,5% dos pacientes analisados, interessantemente observaram que a maioria dos pacientes receberam como primeira escolha o voriconazol. E é devido as poucas evidências científicas que possam estabelecer um tratamento monoterápico para a fusariose invasiva que a terapia combinada passa a demonstrar benefício (LAMOTH & KONTOYIANNIS, 2019). Interações indiferentes e até antagonistas *in vitro* com anfotericina B combinada ao voriconazol frente à *Fusarium* spp. são relatadas, porém, alguns isolados mostram um comportamento diferente e essa combinação passa a ser sinérgica. A eficácia clínica dessa combinação e também de outras, como por exemplo, anfotericina B e caspofungina ou voriconazol e terbinafina podem ser observadas em poucos casos (CÓRDOBA *et al.*, 2008; SPADER *et al.*, 2011).

6.2. Outras opções na terapia combinada

Algumas interações *in vitro* entre anfotericina B e voriconazol com outros fármacos não antifúngicos como rifampicina, ibuprofeno e ciprofloxacina, por exemplo, já foram relatados (LAMOTH & KONTOYIANNIS, 2019). Modelos de experimentos envolvendo animais e também *in vitro* relataram uma atividade frente a *Fusarium* spp. com o uso de pentamidina (LIONAKIS *et al.*, 2003; LIONAKIS *et al.*, 2006).

Outo exemplo é o uso da miltefosina, um análogo de fosfolípídeo de membrana comumente utilizado contra leishmaniose e que exibiu atividade antifúngica demonstrando interações sinérgicas quando combinada com posaconazol ou voriconazol contra *Fusarium* spp. (BISWAS *et al.*, 203).

6.3. Prospectiva de novas opções de tratamento

Por muitos anos o tratamento de infecções fúngicas invasivas eram tratadas apenas com anfotericina B, sendo que o desenvolvimento de outras classes de antifúngicos como os triazóis e equinocandinas, por exemplo, surgiu a fim de ampliar as opções terapêuticas (LAMOTH & KONTOYIANNIS, 2019). Porém, o *Fusarium* spp. é um patógeno que ainda necessita de maior atenção na busca pelo desenvolvimento de novas opções para combatê-lo.

Alguns estudos vem sendo feitos a fim de suprir essa demanda de um fármaco eficaz no combate a proliferação do fungo nos seres humanos. Um inibidor da síntese de proteínas ancoradas ao Glicosilfosfatidilinositol da parede celular fúngica apresentou atividade *in vitro* para *Fusarium* spp. e outros fungos filamentosos relevantes como *Aspergillus* spp. e *Scedosporium* spp. (CASTANHEIRA *et al.*, 2012; RIVERO-MENENDEZ *et al.*, 2019).

Outro possível agente antifúngico, inibidor da biossíntese de pirimidina apresentou uma atividade variável contra *Fusarium* spp., sendo apenas fungistático (JORGENSEN *et al.*, 2018; WIEDERHOLD *et al.*, 2017). Atualmente podemos encontrar agentes antifúngicos em fase pré-clínica (MCCARTHY *et al.*, 2018), um exemplo é um novo composto com atividade na parede fúngica inibindo uma etapa inicial de ancoragem de proteínas à parede celular com atividade *in vitro* contra *Fusarium* spp. (PFALLER *et al.*, 2011; WATANABE *et al.*, 2012; WIEDERHOLD *et al.*, 2015). Análises genéticas e bioquímicas indicam que a hemofungina também pode ser uma candidata como opção de tratamento pois ela atua inibindo a ferrocelatase, que é a última enzima na via biossintética do heme e tem capacidade de inibir o crescimento *in vitro* de espécies patogênicas de *Fusarium* (MCCARTHY *et al.*, 2017).

Fosmanogepix é um pró-fármaco que tem como alvo a enzima fúngica altamente conservada Gwt1, sendo um candidato a antifúngico de amplo espectro que demonstrou atividade *in vitro* frente a *Fusarium* spp. (ALKHAZRAJI *et al.*, 2020).

6.4. Compostos organosselênios

Compostos organosselênios são moléculas clinicamente seguras que possuem potencial antifúngico, porém, sua ação *in vivo* ainda é incerta (THANGAMANI *et al.*, 2017), podendo ter essa atividade biológica atraentes aplicações na clínica médica

(GULARTE *et al.*, 2010). Além disso, propriedades anti-ateroscleróticas, anti-inflamatórias, antioxidantes, citoprotetoras, anti-mutagênicas e anti-lipoperoxidativas já descritas (THANGAMANI *et al.*, 2017).

Novas classes de organosselênios já foram relatados com atividade *in vitro* frente a *Leishmania* spp. (AL-TAMIMIA *et al.*, 2019). Fernández-Rubio e colaboradores (2019) descreveram atividade de derivado de isosseleniocianato frente a *Leishmania* spp., sendo os resultados até 10 vezes melhor se comparados com a anfotericina B, droga de referência no tratamento, caracterizando esse organosselênio como promissor no desenvolvimento de um novo fármaco para o tratamento da leishmaniose. Atividade *in vitro* frente a *Sporothrix brasiliensis* também foi descrita com o uso de outra classe de organosselênios. Poester e colaboradores (2019) não apenas descreveram atividade dessa molécula isolada frente ao patógeno como também relataram efeito sinérgico e aditivo quando utilizada em combinação com itraconazol, fármaco de escolha para o tratamento da sporotricose.

Atividade antifúngica foi descrita frente a *Candida* spp. and *Cryptococcus* spp. em concentração inibitória mínima na faixa entre 0,5 to 2 µg/mL de organosselênio, erradicando o inóculo fúngico em um tempo de 2 horas. O possível mecanismo de ação pode estar envolvido com a diminuição dos níveis glutathiona intracelular que levaria ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, perturbando a homeostase nas células fúngicas (THANGAMANI *et al.*, 2017). Frente a *Fusarium* spp., Venturini e colaboradores (2016) descreveram atividade *in vitro* de organosselênios isolados e também em combinação com antifúngicos comumente utilizados no tratamento de fusariose como anfotericina B e voriconazol. Com base nesses resultados, que também demonstraram atividade quando combinando a molécula de organosselênio a caspofungina, o presente trabalho procurou investigar essa combinação com outra classe de organosselênio e caspogungina como sendo uma nova alternativa no combate a infecções causadas por *Fusarium* spp.

**CAPÍTULO II – ALLYLIC SELENOCYANATES AS NEW AGENTS TO COMBAT
FUSARIUM SPECIES INVOLVED WITH HUMAN INFECTIONS**

Artigo publicado na Revista ChemistrySelect em 19/12/2017.

Fator de impacto 1.811

DOI <https://doi.org/10.1002/slct.201702338>

Allylic Selenocyanates as New Agents to Combat *Fusarium* Species Involved with Human Infections

**Bruna G. Batista,^[a,h] Daiane F. Dalla Lana,^[a,h] Prof. Dr. Gustavo P. Silveira,^[b]
Prof. Dr. Marcus M. Sá,^[c] Dr. Misael Ferreira,^[c] Theo V. C. Russo,^[c] Prof. Dr.
Rômulo F. S. Canto,^[d] Flavio A. R. Barbosa,^[c] Prof. Dr. Antônio L. Braga,^[c] Taís
F. A. Kaminski,^[a,e,h] Prof. Dr. Luís F. S. de Oliveira,^[e] Prof. Dr. Michel M.
Machado,^[e] William Lopes,^[f] Prof. Dra. Marilene H. Vainstein,^[f] Prof. Dr. Mário L.
Teixeira,^[g] Prof. Dr. Saulo F. Andrade,^[h] Prof. Dr. Alexandre M. Fuentefria,^{[a,h]*}**

^[a]Laboratório de Micologia Aplicada, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^[b]Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^[c]Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

^[d]Departamento de Farmacociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

^[e]Grupo de Pesquisa em Toxicologia Celular, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, Brazil.

^[f]Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^[g]Laboratório de Pesquisa em Toxicologia e Farmacologia, Instituto Federal de Santa Catarina, Concordia, SC, Brazil.

^[h]Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Abbreviated running headline: Selenocyanates as new antifungal agents

Correspondence author:

Prof. Alexandre M. Fuentefria, PhD,

Laboratório de Micologia Aplicada, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: alexandre.fuentefria@ufrgs.br

Abstract

Fusarium is an emerging opportunistic fungal pathogen that causes local or systemic infections. The successful use of a therapeutic drug or combination antifungal therapies against *Fusarium* spp. are compromised because reports of multidrug resistance are currently frequent. Thus, the development of new antifungal capable of combating multidrug-resistant *Fusarium* strains becomes necessary. This study presents the synthesis of seven new allylic selenocyanates and their screening against *Fusarium* spp. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of these compounds ranged from 4 to 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$, with the mechanism of action being related to fungal cell membrane disruption. Specific structural changes, such as widespread thinning along the hyphae, were observed by scanning electron microscopy. The effect of selenocyanates on cell viability and genotoxicity are concentration dependent, however they did not cause mutagenicity in human cells. Five selenocyanates were identified as nonirritant by the *ex-vivo* HET-CAM (Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane) method. Allylic selenocyanates represents a promising alternative in the treatment and prevention of fusariosis.

Introduction

Fusarium is an ubiquitous fungus that is commonly found in water and soil.^[1] They are known to be opportunistic microorganisms which may cause local or systemic infections and present the most diverse antifungal resistance panel of drugs that include voriconazole, posaconazole, and amphotericin B. Clinical manifestation depends on the immune status of the host being neutropenia the major risk factor for acquiring infections.^[2-4] Fusariosis represents the second most prevalent cause of systemic filamentous fungal infection after aspergillosis.^[5] Keratitis and onychomycosis are local infections that are also related to this fungus, sometimes associated with previous trauma and possible dissemination related to the above-mentioned patient's immune status. Therefore, for optimal treatment, surgical debridement of the infected tissue is performed.^[1,5-7]

Many clinical isolates demonstrate *in vitro* and *in vivo* resistance to various antifungals. Hence, consequent diseases are difficult to treat. The main species reported causing infections in humans are *Fusarium solani* complex, *F. oxysporum* complex, *F. verticillioidis*, and *F. moniliforme*. Other species have a lower incidence of

infections.^[8] Invasive fusariosis usually attacks immunocompromised patients while immunocompetent individuals usually are affected by local infections.^[1,2,6] With regard to pathogenicity, *F. solani* represents the most virulent genus of the species.^[1] In Brazil, invasive *Fusarium* infections are identified in 40–60% of blood cultures being the fungus identified in 60-80% of the patients presenting cutaneous lesions.^[6,9,10] The mortality of disseminated *Fusarium* infections to immunocompromised patients ranges from 50 to 70% being related to the therapy.^[4,6,9,11,12]

Therapeutic success depends on factors such as the ability of a topical antifungal agent to penetrate tissues. In some cases, oral antifungals are required to achieve this goal.^[13] However, until now, animal studies are inconclusive to determine the best treatment choice for fusariosis.^[1]

Amphotericin B, an antifungal medication used to treat serious fungal infections, presents strong activity against *Fusarium* species. Similarly, azoles, such as fluconazole and itraconazole, do not demonstrate considerable *in vitro* activity against these species, although voriconazole showed efficacy against some *Fusarium* isolates.^[1]

Combination therapies for fusariosis are scarce.^[1-3] Some studies suggest that combinations such as amphotericin B and voriconazole, or azoles and terbinafine, may lead to better clinical responses. In fact, the combination of terbinafine and voriconazole was synergistic in 70% of the cases. On the other hand, fusariosis infections treated with voriconazole combinations did not demonstrate any benefit over patients treated just with voriconazole. Similarly, the combination of amphotericin B and azoles did not lead to any detected synergism or antagonism.^[1] Therefore, the development of new antifungal drugs capable of combating multidrug resistant strains of *Fusarium* sp. having lower side effects to patients is imperative.

Organoselenium compounds exhibit several pharmacological properties, including antimicrobial activity against bacteria and fungi.^[14,15] For instance, imidazo-[1,2-a]pyridine based organoselenium compounds have shown unique antifungal properties, including the synergistic effect with antibiotics to enhance their antimicrobial activity.^[16-18] Ebselen and its analogues have been reported as antifungal compounds and its activity have been related, at least in part, to the inhibition of H⁺-ATPase.^[19,20] Some reports relate the antifungal activity of diselenides to the pro-oxidant activity of these compounds as well as the increase in ROS production and fungal membrane

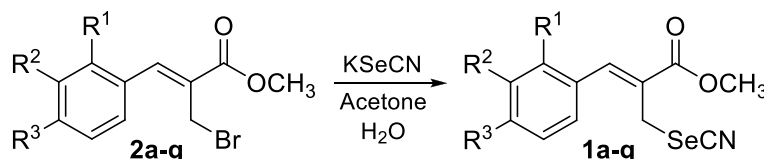
permeability.^[21,22] Ebselen and diselenides have demonstrated activity against *Fusarium* sp. when administered alone or in combination with other antifungal drugs showing good synergistic effects.^[23,24] It was shown that a piperidine isoselenocyanate derivative is the most active among its isosters against selected fungi, including *Fusarium culmorum*.^[25] Furthermore, related thiocyanates exhibit a variety of biological properties,^[26,27] including antibacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*^[28] and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).^[29] These facts motivate the investigation of allylic organoselenium compounds as antifungal agents.

Herein, we will present our results on MIC, mechanism of action, and toxicity of the allylic selenocyanates **1a-g** as a new and promising antifungal class to combat *Fusarium* species involved with human infections.

Results and Discussion

The synthesis of the target allylic selenocyanates **1a-g** was efficiently achieved by combining the nucleophilic potassium selenocyanide (KSeCN) with the electrophilic allylic bromide **2a-g** (Scheme 1), a versatile precursor readily prepared through the treatment of Morita-Baylis-Hillman adducts^[30] with LiBr in acidic medium.^[31] The novel allylic selenocyanates **1a-g** were obtained in high yield and elevated purity, and were fully characterized by spectroscopic methods. Compounds **1a-g** present *clogP* in between 2.4–3.9, molecular weight 290–359 g mol⁻¹, number of hydrogen donors and acceptors lower than 3, total polar superficies 50–59 Å² (Table 1).

Table 1. Synthesis of allylic selenocyanates **1a-g** and calculated ADME properties.



#	R ¹	R ²	R ³	Yield (%)	CLogP [*]	tPSA [*]	MW
a	H	H	H	93	2.4	50	280
b	Cl	H	Cl	89	3.9	50	349
c	Br	H	H	78	3.3	50	359
d	H	CH ₃ O	H	70	2.4	59	310
e	H	CH=CHCH=CH	H	90	3.6	50	330
f	H	H	CH ₃	83	2.9	50	294
g	H	H	H	82	3.3	59	359

* Calculated by chemdraw.

The susceptibility profile of 16 *Fusarium* strains related to keratitis and onychomycosis infections was initially determined against five approved antifungals: amphotericin B, voriconazole, itraconazole, fluconazole, and terbinafine (Table 2). Clearly, all strains presented resistance against itraconazole, fluconazole, and terbinafine. Thus, amphotericin B and voriconazole are indicated for treatment of infections caused by these fungi. However, HCF17 and HCF22 are already resistant to concentrations of at least 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of amphotericin B and of at least 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of voriconazole, respectively. Thus, it is mandatory to find new chemicals able to combat infections caused by these fungi strains.

Further screening of this panel of *Fusarium* spp. against the allylic selenocyanates **1a-g** revealed that these compounds have an *in vitro* broad-spectrum profile against multidrug-resistant *Fusarium* spp. strains (Table 3). Compounds **1a**, **1b**, and **1e** present MICs $\leq 8 \mu\text{g mL}^{-1}$ to most of the *Fusarium* spp. screened in the panel. Despite amphotericin B being at least one-fold serial dilution more active against *F. solani* (F9, F20, and HCF27, Table 2) than the allylic selenocyanates **1b** and **1e** (Table 3), this first-choice drug for *Fusarium* infections is, at least, two-fold less active against *F. keratoplasticum* (HCF17) and *F. oxysporum* (HCF22) compared to **1b** and **1e**. Noteworthy, the naphthyl-substituted selenocyanate **1e** presents MIC of 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ against HCF17 and HCF22, which is at least three-fold serial dilutions more active than all the five approved antifungals included in this screening.

Table 2. Taxonomy, infection caused, and minimum inhibitory concentrations (MIC values) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) for antifungals commonly used in clinical practice against *Fusarium* spp. strains.

Strain	Infection	Amph	Vori	Itra	Fluc	Terb
<i>Gibberella fujikuroi</i> (F2)	Keratitis	4	1	>128	>128	>64
<i>Fusarium solani</i> (F9)	Keratitis	2	16	>128	>128	>64
<i>Fusarium solani</i> (F20)	Keratitis	2	8	>128	>128	>64
<i>Fusarium oxysporum</i> (F24)	Keratitis	1	4	>128	>128	>64
<i>Fusarium petrophilum</i> (HCF13)	Onychomycosis	1	16	>128	>128	>64
<i>Fusarium keratoplasticum</i> (HCF17)	Onychomycosis	>16	>32	>128	>128	>64
<i>Fusarium falciforme</i> (HCF19)	Onychomycosis	8	0.5	>128	>128	>64
<i>Fusarium keratoplasticum</i> (HCF20)	Onychomycosis	1	16	>128	>128	>64
<i>Fusarium oxysporum</i> (HCF22)	Onychomycosis	>16	>32	>128	>128	>64
<i>Fusarium petrophilum</i> (HCF24)	Onychomycosis	2	2	1	>128	>64
<i>Fusarium keratoplasticum</i> (HCF25)	Onychomycosis	2	1	>16	>128	>64
<i>Fusarium keratoplasticum</i> (HCF26)	Onychomycosis	4	8	>128	>128	>64
<i>Fusarium solani</i> (HCF27)	Onychomycosis	4	>32	>64	>128	>64
<i>Fusarium falciforme</i> (HCF32)	Onychomycosis	4	16	>64	>128	>64
<i>Fusarium solani</i> (HCF41)	Onychomycosis	4	16	>64	>128	>64
<i>Fusarium oxysporum</i> (HCF46)	Onychomycosis	2	4	>128	64	16

Amph = Amphotericin B; Vori = Voriconazole; Itra = Itraconazole; Fluc = Fluconazole; Terb = Terbinafine.

Table 3. Anti-*Fusarium* activity (MIC values in $\mu\text{g mL}^{-1}$) of allylic selenocyanates **1a-g**.

Strain	1a	1b	1c	1d	1e	1f	1g
<i>Gibberella fujikuroi</i> (F2)	32	32	64	32	32	32	16
<i>Fusarium solani</i> (F9)	16	16	64	16	4	32	32
<i>Fusarium solani</i> (F20)	16	16	32	8	4	16	16
<i>Fusarium oxysporum</i> (F24)	8	8	32	32	4	8	32
<i>Fusarium petrophilum</i> (HCF13)	8	4	64	32	4	8	8
<i>Fusarium keratoplasticum</i> (HCF17)	8	8	32	4	4	8	16
<i>Fusarium falciforme</i> (HCF19)	32	8	32	32	8	32	32
<i>Fusarium keratoplasticum</i> (HCF20)	32	16	64	32	8	32	64
<i>Fusarium oxysporum</i> (HCF22)	8	4	64	8	4	16	16
<i>Fusarium petrophilum</i> (HCF24)	8	8	64	32	8	16	64
<i>Fusarium keratoplasticum</i> (HCF25)	16	8	32	16	16	16	64
<i>Fusarium keratoplasticum</i> (HCF26)	16	16	64	32	8	16	64
<i>Fusarium solani</i> (HCF27)	16	8	25	25	8	25	16
<i>Fusarium falciforme</i> (HCF32)	8	4	64	64	4	16	16
<i>Fusarium solani</i> (HCF41)	8	4	64	32	4	8	64
<i>Fusarium oxysporum</i> (HCF46)	8	4	25	25	4	8	16

A tentative structure-activity relationship was emerged from this study. Comparing the activity of selenocyanate **1e** with **1a** (naphthyl versus phenyl substituent) it was noted that the introduction of a second aromatic ring enhanced the activity, with compound **1e** being up to 4-fold more active than **1a** in a few cases. Thus, it appears that the presence of bulky and/or hydrophobic groups in this region could be favorable to the antimicrobial profile. It holds true for compounds **1b** (2,4-di-Cl) and **1f** (4-CH₃), which roughly retained the activity profile observed for **1e**. However, in general, the introduction of other substituents in the phenyl ring was deleterious to the

activity. Thus, substituted selenocyanates **1c** (2-Br), **1d** (3-CH₃O), and **1g** (4-Br) were less potent than the unsubstituted **1a**.

The results in Table 2 designate the naphthyl-substituted selenocyanate **1e** as the most active compound. However, the dichloro-substituted **1b** presented similar activities to most species of *Fusarium* (4 µg mL⁻¹), with the exception of *F. keratoplasticum* which was generally one-fold serial dilution less susceptible to **1b** than to **1e**. The methoxy-substituted selenocyanate **1d** exhibited moderate activities in the series, with MICs of 4 to 16 µg mL⁻¹ in some cases. Finally, the 2-bromophenyl derivative **1c** was the less active of the library of compounds, presenting MICs in the range of 25 to 64 µg mL⁻¹ (Table 3).

Due to the higher resistance of four *Fusarium* strains against the approved antifungals (Table 2) compared to the allylic selenocyanates **1a-g** at low concentrations (Table 3), they were selected to perform the sorbitol and ergosterol assays to uncover the mechanism of action (Tables 4 and 5).

The role of sorbitol is to provide osmotic protection to the fungal cell wall.^[32] Thus, it is expected that an antifungal candidate acting on the fungal cell wall be inhibited by competitive binding to sorbitol present into the medium, with consequent increase in the MIC values. However, no relevant modifications on the MIC of selenocyanates **1a-g** were observed after adding sorbitol into the culture medium (Table 4). These results indicated that selenocyanates **1a-g** do not act on the fungal cell wall.

Table 4. MIC values (µg mL⁻¹) for allylic selenocyanates **1a-g** with addition of sorbitol into the culture medium.

Strain	1a	1b	1c	1d	1e	1f	1g
<i>Fusarium solani</i> (F9)	8	8	64	8	8	16	128
<i>Fusarium solani</i> (F20)	8	8	32	4	8	8	64
<i>Fusarium keratoplasticum</i> (HCF17)	8	16	16	4	8	32	64
<i>Fusarium oxysporum</i> (HCF22)	16	16	32	8	16	32	64

Ergosterol is an essential chemical found on the fungal membrane. Drugs, such as amphotericin B, have affinity to sterols. Pores on the membrane are consequently created allowing small molecules and ions, such as potassium and hydronium, to leave the cell disrupting the fungal membrane. Thus, it is possible to determine if a new antifungal candidate could act on the fungal cell membrane supplying ergosterol to the culture medium.^[33] Mammals count on cholesterol, instead of ergosterol, as essential structure of cells. Thus, targeting on ergosterol is very attractive for developing

selective antifungal agents. It is observed from Table 5 that MICs of allylic selenocyanates **1a-f** increased (lower activities) at least three orders of dilution against the whole panel of fungus. Thus, allylic selenocyanates presented herein disclosed a mechanism of action related to ergosterol biosynthesis and present excellent MICs against multidrug-resistant *Fusarium* sp., leading us to believe in the potential of these compounds to reach advanced clinical studies and become antifungal agents to fight infections.

Table 5. MIC values ($\mu\text{g mL}^{-1}$) for allylic selenocyanates **1a-g** after addition of ergosterol into the medium.

Strain	1a	1b	1c	1d	1e	1f	1g
<i>Fusarium solani</i> (F9)	>256	128	128	>256	256	256	256
<i>Fusarium solani</i> (F20)	256	256	256	>256	256	126	256
<i>Fusarium keratoplasticum</i> (HCF17)	256	256	256	256	256	256	256
<i>Fusarium oxysporum</i> (HCF22)	>256	256	>256	>256	128	256	>256

Analysis of scanning electron microscopy (SEM) images evidenced specific structural changes for *F. keratoplasticum* in the presence of **1a**, **1b**, **1c**, **1e**, and **1g** at $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ for 48 h. For untreated control, well-preserved hyphae are noticed (Figure 1.1). After *in vitro* treatment with selenocyanates **1a**, **1b**, **1c**, **1e**, and **1g**, structural alteration represented by widespread thinning along the hyphae of the fungus was noticed, an effect that is mainly evidenced with the use of **1b** (Figure 1.2). On the other hand, compounds **1d** and **1f** do not impair the morphology of *F. keratoplasticum* since no evident cellular damage or morphological modifications of tubular structures was noted when compared to the control. Same morphological damage in fungi cells was recently observed in related studies using SEM, after treating the strains with a variety of organic compounds or nanoparticles.^[34-36]

Since selenocyanates **1d** and **1f** did not change the morphology of the fungal at the concentration and period chosen for the experiment, these results suggested that concentration and treatment time play important roles in the inhibition of the pathogen as reported. Morphological alterations and damage in hyphae observed in this study could be intensified by increasing the concentration of the molecules, a fact recently documented.^[37]

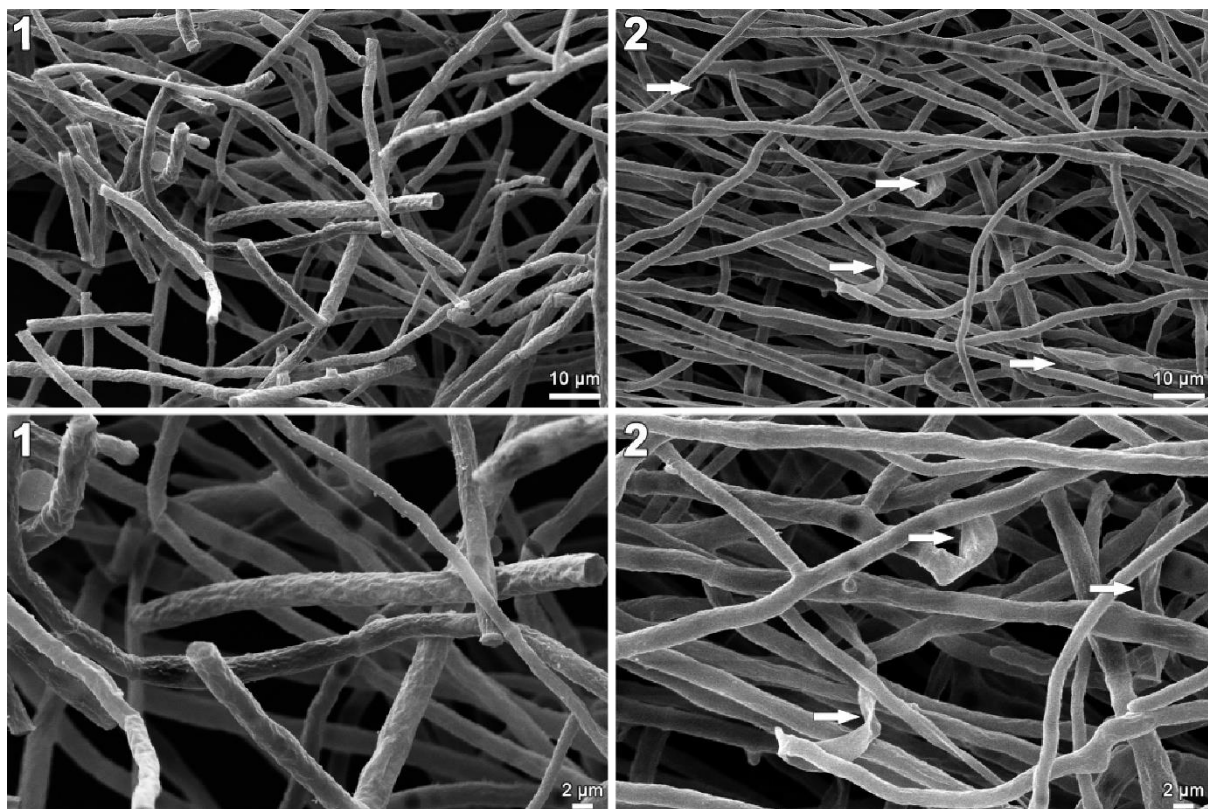


Figure 1. SEM images of *F. keratoplasticum*. 1) control; 2) widespread thinning along the hyphae of the fungus in the presence of selenocyanate **1b**.

For the cell viability assay, no statistical differences were observed for selenocyanate **1a** at $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ compared to the negative control (Figure 2). Meanwhile, $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ of **1a** decreased cell viability to approximately 90%. At $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, this compound exhibit cell viability statistically equal to the positive control. Compound **1b** presented 90% of cell viability at $4 \mu\text{g mL}^{-1}$, 85% at $8 \mu\text{g mL}^{-1}$, and viability damage compared to the positive control at $16 \mu\text{g mL}^{-1}$. For **1c**, cell viability was statistically compared to the negative control at $4 \mu\text{g mL}^{-1}$, approximately 90% at $8 \mu\text{g mL}^{-1}$, and similar to the positive control at $16 \mu\text{g mL}^{-1}$. The allylic derivative **1d** ($4 \mu\text{g mL}^{-1}$) is statistically comparable to the negative control. However, at concentrations of $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $16 \mu\text{g mL}^{-1}$, the cell viability is approximately 90%. Concentrations up to $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ of **1e** do not cause damage to cells. Meanwhile, $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ of this compound damaged approximately 90% of the cells. Selenocyanates **1f** and **1g** did not impair the cell at the concentrations tested. Overall, the effects of these compounds on cell viability, i.e., the ability to perform certain functions such as metabolism, growth and reproduction, suggest that loss of integrity of the leukocyte membrane is concentration dependent (Figure 2).

The micronucleous test did not show statistical difference between the allylic selenocyanates **1a-g** and the negative control at all concentrations tested, result that favors the novel compounds (not presented).

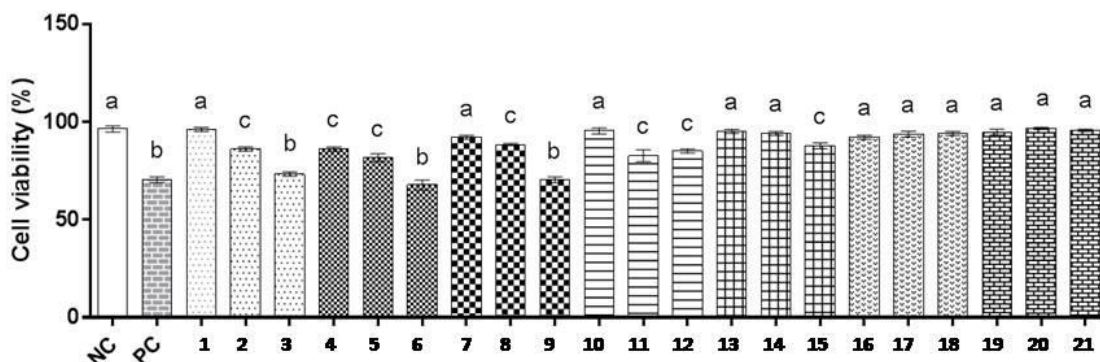


Figure 2. Cell viability. NC: negative control; PC: positive control; 1: **1a** at 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 2: **1a** at 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 3: **1a** at 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 4: **1b** at 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 5: **1b** at 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 6: **1b** at 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 7: **1c** at 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 8: **1c** at 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 9: **1c** at 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 10: **1d** at 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 11: **1d** at 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 12: **1d** at 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 13: **1e** at 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 14: **1e** at 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 15: **1e** at 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 16: **1f** at 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 17: **1f** at 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 18: **1f** at 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 19: **1g** at 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 20: **1g** at 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 21: **1g** at 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$. a,b,c: represent statistical differences.

The comet assay relates the genotoxicity potential of substances to affect the cell integrity and its genetic material. The selenocyanate **1a** did not induce DNA damage at concentrations 8–16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ presenting statistical significance at the level of the negative control. However, at 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, the solution exhibited DNA deterioration of approximately 40%. 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of **1b** do not impair the cells but at higher concentrations (8 and 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$), a damage of 45% was observed. Meanwhile, **1c** does not produce DNA deterioration at any concentration tested. The allylic derivative **1d** did not originate DNA disturbance at 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$, but at 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ the damage was approximately of 20% and 30%, respectively. Conversely, solutions of **1e** at 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ through 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ resulted in DNA harm around 40%. Although 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of **1e** induced DNA damage of 45%, increasing the concentration of this compound (8 and 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$) was not capable of producing higher levels of DNA damage. Selenocyanate **1f** showed damages of 50% to 60% at the concentrations tested (4–16 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Finally, **1g** exhibited the same statistical difference observed for the negative control at the lower concentrations tested, while at 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ the DNA damage was approximately 20% (Figure 3).

In short, allylic selenocyanates **1a,b,d-g** may cause cell integrity damage to variable extent due to modification into the genetic material, which is dependent on the concentration of each compound. Notable, compound **1c** was not genotoxic at all concentrations tested, whereas **1g** presents low toxicity at the higher concentration in the assay. Thus, it is possible to affirm that at $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ compounds **1a-g** presented cellular viability of similar magnitude compared to the negative control, reflecting in a low mutagenic effect on cells and a small percentage of DNA damage (Figure 3).

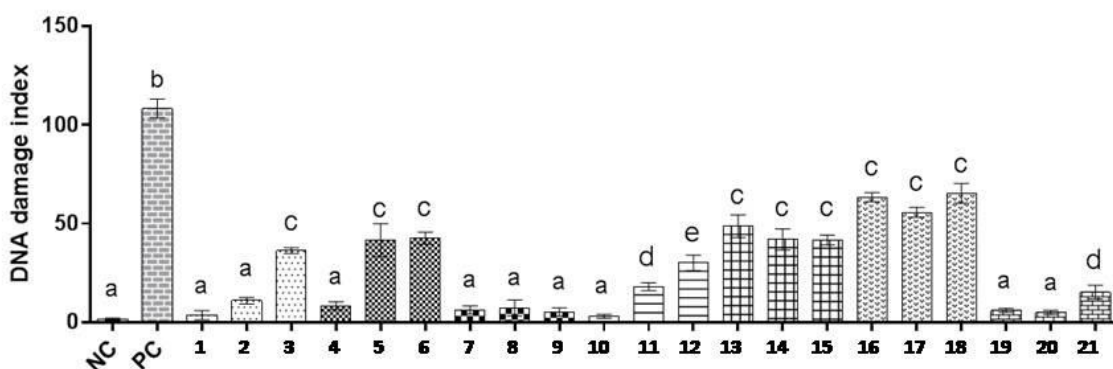


Figure 3. DNA damage index. NC: negative control; PC: positive control; 1: **1a** at $8 \mu\text{g mL}^{-1}$; 2: **1a** at $16 \mu\text{g mL}^{-1}$; 3: **1a** at $25 \mu\text{g mL}^{-1}$; 4: **1b** at $4 \mu\text{g mL}^{-1}$; 5: **1b** at $8 \mu\text{g mL}^{-1}$; 6: **1b** at $16 \mu\text{g mL}^{-1}$; 7: **1c** at $4 \mu\text{g mL}^{-1}$; 8: **1c** at $8 \mu\text{g mL}^{-1}$; 9: **1c** at $16 \mu\text{g mL}^{-1}$; 10: **1d** at $4 \mu\text{g mL}^{-1}$; 11: **1d** at $8 \mu\text{g mL}^{-1}$; 12: **1d** at $16 \mu\text{g mL}^{-1}$; 13: **1e** at $4 \mu\text{g mL}^{-1}$; 14: **1e** at $8 \mu\text{g mL}^{-1}$; 15: **1e** at $16 \mu\text{g mL}^{-1}$; 16: **1f** at $4 \mu\text{g mL}^{-1}$; 17: **1f** at $8 \mu\text{g mL}^{-1}$; 18: **1f** at $16 \mu\text{g mL}^{-1}$; 19: **1g** at $4 \mu\text{g mL}^{-1}$; 20: **1g** at $8 \mu\text{g mL}^{-1}$; 21: **1g** at $16 \mu\text{g mL}^{-1}$. a,b,c,d,e: represent statistical differences.

The HET-CAM is a model to predict the potential irritancy of new compounds. This *ex vivo* method is alternative to the Draize Rabbit Eye test. It mimics vascular changes in the choriocallantonic membrane (CAM) which is an analog of the ocular conjunctiva and responds to injuries caused by processes such as inflammation similarly to what is observed in the conjunctival tissue of rabbit's eyes. Since substances are directly applied over the CAM, the results obtained are generally more sensible than animal models.^[38]

Figure 4 shows the relationship between IS and the logarithms of the concentrations of allylic selenocyanates **1a-g**. The IS found were **1a**: 9.71, **1b**: 7.63, **1c**: 2.73, **1d**: 2.33, **1e**: 3.51, **1f**: 3.11, and **1g**: 2.26. Results attained by the HET-CAM using embryonated eggs demonstrated that selenocyanates **1c-g** are nonirritant of the CAM, having IS ranging from 2.26 to 3.51. Thus, the HET-CAM assay indicates that adducts **1c-g** could be safely applied over the human mucosa. On the other hand,

selenocyanates **1a** and **1b** showed to be irritant presenting IS of 9.71 and 7.63, respectively, according to the methodology.^[38-40] In addition to the broad spectrum and high activities against *Fusarium* spp. (MIC range from 4 to 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$), **1a** and **1b** could be employed as the active principle in formulations to prevent highly risky species of *Fusarium* to form biofilms on materials such as prosthesis or to avoid infections on contact lenses and cornea for corneal transplants.^[41,42]

Considering only the toxicological studies described herein and the potential irritancy, the 4-bromo-substituted selenocyanate **1g** is the most promising hit for future drug development.

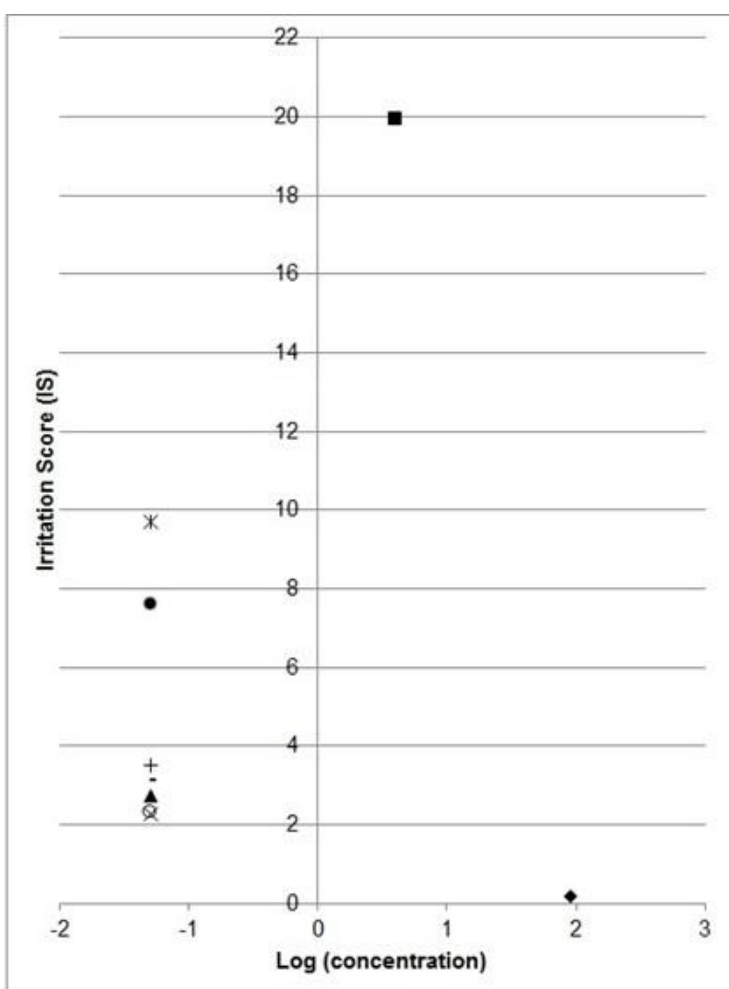


Figure 4. Dose-response relationship for allylic selenocyanates at concentration of 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ **1a** (*), **1b** (●), **1c** (▲), **1d** (○), **1e** (+), **1f** (-), **1g** (x), 0.9% NaCl (negative control, ◆), and 0.1 M NaOH (positive control, ■). Each point represents one experiment (n = three eggs).

Finally, selenocyanates **1a-g** present $\text{clog}P$ values, molecular weight, number of hydrogen donors and acceptors, and total polar superficies that characterize these compounds as perfect for oral bioavailability. The results show that these compounds obey the Lipinski's Rule of Five^[43] and Veber parameters^[44] to have a good PK profile.

In addition, further modifications on these scaffolds could be performed to increase potency keeping their favorable pharmacokinetic properties.

Conclusions

The present work sought to determine the antifungal activity of a novel library of synthetic molecules. Allylic selenocyanates **1a-g** were evaluated for antifungal potential against *Fusarium* species, which are resistant to most antifungals. The results showed the capabilities of these compounds associated to the therapeutic effect related to the low MICs (high potency) and reduced toxicity. Thus, allylic selenocyanates represent promising applicability in both biological and industrial fields. Their predicted pharmacokinetic properties are also a plus for the development of orally available drugs. The unprecedented synthesis of these compounds makes them even more relevant. The naphthyl- and bromophenyl-substituted selenocyanates **1e** and **1g** were identified as the best leads for further *in vivo* studies. Besides the potential use of allylic selenocyanates as new antifungal drugs, due to the high potency observed, this new class would also be applied for the development of disinfectants and pesticides.

Supporting Information Summary

Details of the experimental method can be found in the electronic Supporting Information.

Acknowledgments

This work was supported by Brazilian agencies: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Public Notice Universal MCTI/CNPq No. 14/2013), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS - EDITAL 04/2016 - PRONUPEQ 2016). A. M. Fuentefria, M. H. Vainstein, and M. M. Sá are grateful to CNPq for their research fellowships. Special thanks to CEBIME (Laboratório Central de Biologia Molecular e Estrutural) for providing the mass spectra.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and the writing of the paper.

Keywords: Allylic selenocyanates; Antifungal agents; *Fusarium*; Infection; Multidrug resistance.

References

- [1] S. Arif, J. R. Perfect, *Clin. Chest Med.* **2017**, 2, 1-19.
- [2] M. T. Cutuli, A. Gibello, A. Rodriguez-Bertos, M. M. Blanco, M. Villarroel, A. Giraldo, J. Guarro, *Med. Mycol. Case Rep.* **2015**, 9, 7-11.
- [3] M. G. Graça, I. M. van der Heijden, L. Perdigão, C. Taira, S. F. Costa, A. S. Levin, *J. Microbiol. Methods* **2016**, 123, 39-43.
- [4] P. D. Rosa, D. Heidrich, C. Corrêa, M. L. Scroferneker, G. Vettorato, A. M. Fuentefria, L. Z. Goldani, *Mycoses* **2017**, 28, 1-7.
- [5] H. Salah, A. M. S. Al-Hatmi, B. Theelen, M. Abukamar, S. Hashim, A. D. van Diepeningen, C. Lass-Flörl, T. Boekhout, M. Almaslamani, S. J. Taj-Aldeen, *J. Infect.* **2015**, 71, 658-666.
- [6] A. M. Tortorano, M. Richardson, E. Roilides, A. van Diepeningen, M. Caira, P. Munoz, E. Johnson, J. Meletiadis, Z. D. Pana, M. Lackner, P. Verweij, T. Freiburger, O. A. Cornely, S. Arikan-Akdagli, E. Dannaoui, A. H. Groll, K. Lagrou, A. Chakrabarti, F. Lanternier, L. Pagano, A. Skiada, M. Akova, M. C. Arendrup, T. Boekhout, A. Chowdhary, M. Cuenca-Estrella, J. Guinea, J. Guarro, S. de Hoog, W. Hope, S. Kathuria, O. Lortholary, J. F. Meis, A. J. Ullmann, G. Petrikos, C. Lass-Flörl, *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, 20, 27-46.
- [7] S. J. Taj-Aldeen, H. Salah, A. M. S. Al-Hatmi, M. Hamed, M. Theelen, B. Theelen, A. D. van Diepeningen, T. Boekhout, C. Lass-Flörl, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2016**, 85, 438-443.
- [8] M. Nucci, E. Anaissie, *Clin. Microbiol. Rev.* **2007**, 20, 695-702.
- [9] C. Collado, L. Medina, A. Zorraquino, T. Baeza, C. Ferrer, J. Plazas, F. Colom, *Rev. Iberoam. Micol.* **2013**, 30, 119-121.
- [10] Y. Liu, N. Wang, R. Ye, W. Kao, *Oncol. Lett.* **2014**, 2, 334-336.

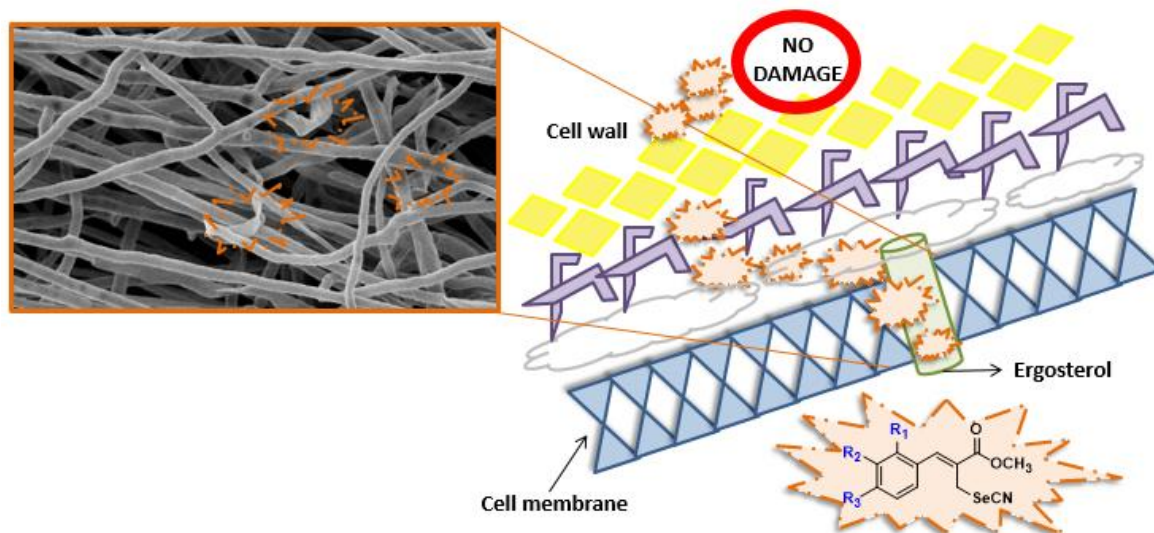
- [11] M. Nucci, K. A. Marr, M. J. G. T. Vehreschild, C. A. de Souza, E. Velasco, P. Cappellano, F. Carlesse, F. Queiroz- Telles, D. C. Sheppard, A. Kindo, S. Cesaro, N. Hamerschlak, C. Solza, W. J. Heinz, M. Schaller, A. Atalla, H. Bertz, C. G. Castro Jr, R. Herbrecht, M. Hoenigl, G. Härter, N. E. U. Hermansen, A. Josting, L. Pagano, M. J. C. Salles, S. B. Mossad, D. Ogunc, A. C. Pasqualotto, V. Araujo, P. F. Troke, O. Lortholary, O. A. Comely, E. Anaissie, *Clin. Microbiol. Infect.* **2014**, *20*, 580-585.
- [12] D. L. Horn, A. G. Freifeld, M. G. Schuster, N. E. Azie, B. Franks, C. A. Kauffmann, *Mycoses* **2014**, *57*, 652-658.
- [13] C. F. Neoh, M. Daniell, S. C. A. Chen, K. Stewart, D. C. M. Kong, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2014**, *44*, 96-104.
- [14] G. Muges, W. W. du Mont, H. Sies, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2125-2179.
- [15] C. W. Nogueira, G. Zeni, J. B. T. Rocha, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 6255-6285.
- [16] S. Kumar, N. Sharma, I. K. Maurya, A. Verma, S. Kumar, K. K. Bashin, R. K. Sharma, *New J. Chem.* **2017**, *41*, 2919-2926.
- [17] S. Kumar, N. Sharma, I. K. Maurya, A. K. K. Bashin, N. Wangoo, P. Brandão, V. Félix, K. K. Bashin, R. K. Sharma, *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *123*, 916-924.
- [18] N. Sharma, S. Kumar, I. K. Maurya, K. K. Bashin, A. Verma, N. Wangoo, A. K. K. Bashin, S. K. Mehta, S. Kumar, R. K. Sharma, *RSC Adv.* **2016**, *6*, 114224-114234.
- [19] H. Wójtowicz, K. Kloc, I. Maliszewska, J. Mlochowski, M. Pietka, E. Piasecki, *Farmaco* **2004**, *59*, 863-868.
- [20] B. Billack, M. Pietka-Ottlik, M. Santoro, S. Nicholson, J. Mlochowski, C. Lau-Cam, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2010**, *25*, 312-317.
- [21] A. P. Pesarico, G. Sartori, C. F. A. dos Santos, J. S. S. Neto, V. Bortolotto, R. C. V. Santos, C. W. Nogueira, M. Prigol, *Microbiol. Res.* **2013**, *168*, 563-568.
- [22] I. B. Rosseti, J. B. T. Rocha, M. S. Costa, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2015**, *29*, 289-295.
- [23] E. S. Loreto, D. A. N. Mario, J. M. Santurio, S. H. Alves, C. W. Nogueira, G. Zeni, *Mycoses* **2011**, *54*, 572-576.
- [24] T. P. Venturini, F. Chassot, E. S. Loreto, J. T. Keller, M. I. Azevedo, G. Zeni, J. M. Santurio, S. H. Alves, *Med. Mycol.* **2016**, *54*, 550-555.
- [25] J. Zakrzewski, M. Krawczyk, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 514-516.

- [26] R. J. Capon, C. Skene, E. H. T. Liu, E. Lacey, J. H. Gill, K. Heiland, T. Friedel, *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1277-1282.
- [27] M. P. Fortes, P. B. N. da Silva, T. G. da Silva, T. S. Kaufman, G. C. G. Militão, C. C. Silveira, *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *118*, 21-26.
- [28] G. P. Silveira, M. Ferreira, L. Fernandes, G. C. Moraski, S. Cho, C. Hwang, S. G. Franzblau, M. M. Sá, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 6486-6489.
- [29] M. M. Sá, M. Ferreira, E. S. Lima, I. Santos, P. P. Orlandi, L. Fernandes, *Braz. J. Microbiol.* **2014**, *45*, 807-812.
- [30] D. Basavaiah, B. S. Reddy, S. S. Badsara, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 5447-5674.
- [31] M. Ferreira, L. Fernandes, M. M. Sá, *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 564-568.
- [32] R. García, J. Botet, J. M. Rodríguez-Peña, C. Bermejo, J. C. Ribas, J. L. Revuelta, C. Nombela, J. Arroyo, *BMC Genomics* **2015**, *16*, 683.
- [33] B. Pippi, A. J. D. Lana, R. C. Moraes, C. M. Güez, M. Machado, L. F. S. Oliveira, G. Lino von Poser, A. M. Fuentefria, *J. Appl. Microbiol.* **2015**, *118*, 839-850.
- [34] L. C. Cordova-Albores, E. S. Zapotitla, M. Y. Ríos, L. L. Barrera-Necha, M. Hernández-López, S. Bautista-Banos, *J. Microsc. Ultrastruct.* **2016**, *4*, 28-35.
- [35] S. H. S. Dananjaya, R. M. C. Udayangani, S. Y. Shin, M. Edussuriya, C. Nikapitiya, J. Lee, M. de Zoysa, *Microbiol. Res.* **2017**, *201*, 21-29.
- [36] A. Kheiri, S. A. M. Jorf, A. Malhipour, H. Saremi, M. Nikkhah, *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *102*, 526-538.
- [37] F. Xing, H. Hua, J. N. Selvaraj, Y. Zhao, L. Zhou, X. Liu, Y. Liu, *Food Control* **2014**, *46*, 343-350.
- [38] Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVMA). The Hen's Egg Test–Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method. Research Triangle Park: National Toxicology Program **2010**.
- [39] M. C. Bubalo, K. Radošević, V. G. Srček, R. N. Das, P. Popelier, K. Roy, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2015**, *112*, 22-28.
- [40] V. Tsarpali, A. Belavgeni, S. Dailianis, *Aquat. Toxicol.* **2015**, *164*, 72-80.
- [41] L. Peiqian, P. Xiaoming, S. Huifang, Z. Jingxin, H. Ning, L. Birun, *FEMS Microbiol. Lett.* **2014**, *350*, 138-145.
- [42] M. Al-Maqtoofi, C. R. Thornton, *Environ. Microbiol.* **2016**, *18*, 3620-3634.
- [43] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3-26.

[44] D. F. Veber, S. R. Johnson, H. Y. Cheng, B. R. Smith, K. W. Ward, K. D. Kopple, *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 2615-2623.

[48] W. Schmid, *Mutat. Res.* **1975**, *31*, 09-15.

Table of Contents



This study provides a library of seven allylic selenocyanates with minimum inhibitory concentrations (MICs) up to $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ against multidrug resistant *Fusarium* spp., an opportunistic fungal that causes serious human infections. The mechanism of action of selenocyanates is related to fungal cell membrane disruption, through complexation with ergosterol. The toxicity was concentration dependent, but the compounds tested were neither human leukocyte mutagenic nor irritant to the chorioallantoic membrane. Then, selenocyanates represents a promising alternative in the treatment of fusariosis.

SUPPORTING INFORMATION FOR

Allylic Selenocyanates as New Agents to Combat *Fusarium* Species Involved with Human Infections

**Bruna G. Batista,^[a,h] Daiane F. Dalla Lana,^[a,h] Gustavo P. Silveira,^[b]
Marcus M. Sá,^[c] Misael Ferreira,^[c] Theo V. C. Russo,^[c] Rômulo F. S. Canto,^[d]
Flavio A. R. Barbosa,^[c] Antônio L. Braga,^[c] Taís F. A. Kaminski,^[a,e,h] Luís F. S.
de Oliveira,^[e] Michel M. Machado,^[e] William Lopes,^[f] Marilene H. Vainstein,^[f]
Mário L. Teixeira,^[g] Saulo F. Andrade,^[h] Alexandre M. Fuentefria^[a,h]***

^[a]Laboratório de Micologia Aplicada, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^[b]Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^[c]Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

^[d]Departamento de Farmacociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

^[e]Grupo de Pesquisa em Toxicologia Celular, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, Brazil.

^[f]Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

^[g]Laboratório de Pesquisa em Toxicologia e Farmacologia, Instituto Federal de Santa Catarina, Concordia, SC, Brazil.

^[h]Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Experimental

Microbial strains: Sixteen strains of *Fusarium* spp. (Table 2) deposited into Mycology Collection of the Laboratory of Applied Mycology at Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) were used in this study to determinate MIC values. Four strains were selected to continue the determination of the mechanism of action. Strains of *Fusarium* spp. were previously identified^[1] analyzing the DNA sequence and comparing Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) for these sequences in the GenBank database of *Fusarium* Multilocus Sequence typing (MLST).

Synthesis of allylic selenocyanates 1: Commercial grade reagents and solvents were used without further purification except as indicated below. All reactions were magnetically stirred and monitored by analytical thin-layer chromatography using silica gel 60 F-254 plates. Visualization was accomplished by UV light (256 nm), iodine or acidic vaniln solution. Flash chromatography was performed by using silica gel 60 (230–400 mesh) and the appropriate eluent system. ¹H NMR spectra were recorded at 200 MHz and ¹³C {¹H} NMR spectra (fully decoupled) were recorded at 50 MHz with the CDCl₃ residual solvent and TMS peaks as internal standards. The line positions of multiplets are given in ppm (δ) and the coupling constants (J) are given as absolute values in Hertz. Splitting patterns are designated as s (singlet), d (doublet), m (multiplet). Infrared spectra were acquired with a FT-IR spectrometer (KBr). APPI-micrOTOF-Q II measurements were performed with a micrOTOF Q-II (Bruker Daltonics) mass spectrometer equipped with an automatic syringe pump (KD Scientific) for sample injection. The mass spectrometer was operated in the positive ion mode. The sample was injected using a constant flow (3 IL/min). The solvent was a chloroform/methanol mixture. The APPI-micrOTOF-Q II instrument was calibrated in the mass range of 50–3000 m/z using an internal calibration standard (low concentration tuning mix solution) supplied by Agilent Technologies. Data were processed employing Bruker Compass Data Analysis software (version 4.0). The melting points were determined using a microscopy coverslip on a Micro Chemical MQA PF digital apparatus and are uncorrected.

General procedure for the synthesis of allylic selenocyanates 1a-g: Allylic bromide **2** (0.25 mmol) was added into a round-bottom-flask equipped with magnetic stir bar and solved with 3 mL of acetone. The reaction medium was cooled on an ice bath to 5 °C. Then, KSeCN (0.30 mmol) was poured into the flask followed by 1 mL of water. After stirring the reaction mixture at 5 °C for 15 min, it was extracted with ethyl acetate (5 mL) and the organic phase was washed with water (5 mL) and brine (5 mL), dried over MgSO₄, filtered and concentrated under reduced pressure. The crude residue was purified by silica gel chromatography with ethyl acetate/hexanes to give the corresponding allylic selenocyanate (**1a-g**).

Methyl (Z)-3-phenyl-2-(selenocyanomethyl)acrylate (1a): IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3057, 3027, 2951, 2845, 2148, 1713, 1626, 1436, 1273, 1203, 773, 702. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 3.86 (s, 3H), 4.17 (s, 2H), 7.40-7.45 (m, 5H), 7.88 (s, 1H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 25.6, 52.5, 102.4, 127.0, 128.9, 129.2, 129.6, 133.7, 143.0, 166.9. HRMS (APPI) m/z calcd. for C₁₂H₁₅N₂O₂Se [M+NH₄] 299.0294, found 299.0291.

Methyl (Z)-3-(2,4-dichlorophenyl)-2-(selenocyanomethyl)acrylate (1b): IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3088, 2951, 2845, 2150, 1715, 1630, 1583, 1436, 1287, 763. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 3.90 (s, 3H), 3.98 (s, 2H), 7.38-7.40 (m, 2H), 7.50 (s, 1H), 7.86 (s, 1H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 25.4, 53.0, 102.4, 127.7, 130.0, 130.1, 130.8, 131.1, 135.0, 136.2, 138.8, 166.4. HRMS (APPI) m/z calcd. for C₁₂H₁₃Cl₂N₂O₂Se [M+NH₄] 366.9509, found 366.9505.

Methyl (Z)-3-(2-bromophenyl)-2-(selenocyanomethyl)acrylate (1c): IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3059, 3031, 2923, 2851, 2150, 1677, 1632, 1585, 1438, 1295, 1089, 759. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 3.90 (s, 3H), 3.99 (s, 2H), 7.23-7.32 (m, 1H), 7.39-7.49 (m, 2H), 7.66 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.88 (s, 1H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 25.5, 52.9, 102.6, 124.0, 127.9, 129.2, 130.0, 130.9, 133.2, 134.5, 142.1, 166.7. HRMS (APPI) m/z calcd. for C₁₂H₁₄BrN₂O₂Se [M+NH₄] 376.9395, found 376.9391.

Methyl (Z)-3-(3-methoxyphenyl)-2-(selenocyanomethyl)acrylate (1d): IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3002, 2953, 2837, 2148, 1713, 1626, 1597, 1577, 1436, 1250, 1154, 789. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 3.85 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 4.20 (s, 2H), 6.94-7.02

(m, 3H), 7.34-7.40 (m, 1H), 7.87 (s, 1H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 25.8, 52.8, 55.5, 102.5, 114.4, 115.7, 121.6, 127.3, 130.2, 135.2, 143.3, 160.0, 167.0. HRMS (APPI) *m/z*calcd. For C₁₃H₁₇N₂O₃Se [M+NH₄] 329.0399, found 329.0403.

Methyl (Z)-3-(naphthalen-2-yl)-2-(selenocyanomethyl)acrylate (1e): IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3059, 3002, 2925, 2853, 2142, 1707, 1617, 1589, 1434, 1254, 1152, 814, 755. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 3.88 (s, 3H), 4.25 (s, 2H), 7.46-7.55 (m, 3H), 7.81-8.01 (m, 5H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 26.0, 52.8, 102.8, 126.1, 127.0, 127.2, 127.5, 127.6, 127.8, 128.8, 129.5, 131.3, 133.2, 133.6, 143.2, 167.2. HRMS (APPI) *m/z*calcd. for C₁₆H₁₇N₂O₂Se [M+NH₄] 349.0450, found 349.0450.

Methyl (Z)-3-(4-methylphenyl)-2-(selenocyanomethyl)acrylate (1f): IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3027, 2951, 2856, 2148, 1711, 1626, 1609, 1436, 1273, 1203, 812, 763. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 2.39 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 4.22 (s, 2H), 7.27 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.86 (s, 1H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 21.5, 26.0, 52.7, 102.6, 126.1, 129.5, 129.8, 131.1, 140.3, 143.4, 167.2. HRMS (APPI) *m/z*calcd. for C₁₃H₁₇N₂O₂Se [M+NH₄] 313.04502, found 313.04496.

Methyl (Z)-3-(4-bromophenyl)-2-(selenocyanomethyl)acrylate (1g): IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3064, 3033, 2925, 2853, 2156, 1709, 1626, 1583, 1487, 1434, 1273, 1197, 808. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 3.88 (s, 3H), 4.14 (s, 2H), 7.30 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.60 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.82 (s, 1H). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 25.5, 52.9, 102.3, 124.2, 127.9, 130.8, 132.4, 132.8, 141.9, 166.8. Anal. Calcd for C₁₂H₁₀BrNO₂Se: C, 40.14; H, 2.81; N, 3.90. Found: C, 41.25; H, 2.97; N, 3.79.

Preparation of samples: Compounds **1a-g** were solved in DMSO to prepare 5 mg mL⁻¹ stock solutions. Then, they were subsequently diluted starting from an initial concentration of 50 µg mL⁻¹ into the 96 wells microplate.

Antifungal activity: Antifungal activity was evaluated by the minimum inhibitory concentration (MIC) values. MIC was determined by the broth microdilution method, according to the protocol established for filamentous fungi.^[2] The conidial inocula were prepared from cultures grown on potato dextrose agar (PDA) at 35 °C. Assays were

conducted with RPMI-1640 medium (containing L-glutamine, without sodium bicarbonate, buffered at pH 7.0, Sigma-Aldrich). Initial concentrations of the allylic selenocyanates were 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. MIC was defined as the lowest concentration of the substance capable of inhibiting the visible fungal growth. Controls were used to indicate possible contamination and to confirm the fungal growth, using only the RPMI medium to check for non-contamination as well as fungal isolate without the compound to be tested to check fungal viability. Experiments were carried out in duplicate with microplate incubation at 35 °C for 48-72 h. MICs were determined visually.

Effect on sorbitol: Antimicrobial effect on the integrity of the fungal cell wall was determined by sorbitol protection assay. Sorbitol assay was performed according to the literature.^[3] MICs of the compounds were performed in the presence and absence of sorbitol (0.8 M, Sigma-Aldrich). Sorbitol was solved in the RPMI-1640 culture medium (containing L-glutamine, without sodium bicarbonate, buffered at pH 7.0, Sigma-Aldrich). The microplates were incubated at 35 °C for 48-72 h. MICs were determined visually by the absence or presence of fungal growth. The assay was performed in duplicate.

Effect on ergosterol: In order to determine the ability of allylic selenocyanates to complex with the sterol of fungal membranes, the ergosterol assay was performed according to the literature.^[4] The exogenous (qualitative) ergosterol determination technique was executed with and without the addition of ergosterol (Sigma-Aldrich) in concentrations of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Ergosterol was solved in dimethylformamide (Sigma-Aldrich) and the solution added to RPMI-1640 medium (containing L-glutamine, without sodium bicarbonate, buffered to pH 7.0, Sigma-Aldrich). The microplates were incubated at 35 °C for 48-72 h. MICs were determined visually by the absence or presence of fungal growth. The assay was performed in duplicate.

Scanning electron microscopy (SEM): Only one fungal strain - *Fusarium keratoplasticum* (HCF17) - was selected to perform the scanning electron microscopy (SEM), which presented the highest MIC values against the antifungal agents commonly used for the treatment of infections. Selenocyanates **1a-g** were tested in a subinhibitory concentration of 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$. After 48 h of incubation, wells containing the

coverslips were washed three times with phosphate buffer saline (PBS). After washing, adhered cells received 500 μ L of glutaraldehyde (2.5%, type 1, Sigma Aldrich), diluted with sodium cacodylate (0.1 M, pH 7.2, Sigma Aldrich), and kept for 1 h at room temperature. Then, the wells were washed three times with sodium cacodylate (0.1 M, pH 7.2) containing sucrose (0.2 M) and $MgCl_2$ (2 mM). Adhered cells were dehydrated in a series of freshly prepared solutions of ethanol (30, 50, and 70%, for 5 min $step^{-1}$, then 95% and twice 100%, for 10 min $step^{-1}$). Then, samples were subjected to critical point drying (EM CPD 300, Leica) immediately after dehydration, mounted on metallic stubs, sputter-coated with a 15–20 nm gold-palladium layer, and visualized in a scanning electron microscope (Carl Zeiss EVO® MA10, Oberkochen, Germany) operating at 10 kV.

Toxicity: Cell culture was prepared using 1 mL of venous blood collected by venipuncture of a young adult volunteer having over 18 years of non-use of medication. Lymphocytes (protocol approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal do Pampa, under number 27045614.0.0000.5323) obtained by centrifugation gradient, were immediately transferred to the culture medium containing 9 mL of RPMI 1640 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% streptomycin/penicillin. Cell culture flasks were stored at 37 °C for 72 h. The negative control was prepared using 500 μ L of PBS buffer 7.4 and the positive control with 3 μ g mL^{-1} of bleomycin. The concentrations of the compounds tested were determined through the MIC being 8, 16 and 25 μ g mL^{-1} for **1a** and 4, 8 and 16 μ g mL^{-1} for **1b**, **1c**, **1d**, **1e**, **1f**, and **1g**. Cell viability was based on the loss of leukocyte membrane integrity evaluated by the trypan blue method. Each group was analyzed in triplicate. About 300 cells were analyzed per slide for each group in a Neubauer chamber at 400 \times magnification.^[5] The micronucleus test was performed under a microscope^[2] (an increase of 1000 \times). 1.000 cells were counted and classified as a number of mononuclear cells with the presence of micronucleus. Finally, the technique of the comet assay was carried out in agreement with the guidelines for use of the comet assay.^[6-8] 100 nucleoids per slide (in triplicate for each group) were selected and analyzed. Nucleoids were classified according to the length of the tail for subsequent calculation of the DNA damage index. For classification, nucleoids received scores from 0 (no migration) to 4 (maximum

migration). Statistical analyses were performed by ANOVA oneway and post-hoc Tukey's multicomparison test with statistical differences determined by $p < 0.05$.

Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane (HET-CAM): Fresh and fertile white eggs (Lohmann selected Leghorn, LSL) were kept under optimized incubation conditions (38-39 °C, 55-60% humidity, 10 days). On the 10th day, the eggshell, around the airspace, was removed with a rotary tool (Dremel, WI). Subsequently, 0.3 mL of each allylic selenocyanate (64 µg mL⁻¹, 0.5% DMSO solution) and controls (negative control: 0.9% NaCl; positive control: 0.1 M NaOH) were added to the CAM of the eggs. Then, the eggs were observed continuously for 5 min for the appearance of hemorrhaging, lysis, and coagulation, which was documented. In addition, the severity of each reaction after 1 and 5 min was recorded. From this, the irritation score (IS) was calculated by the equation 1. The assay was performed in triplicate. Hemorrhage, lysis, and coagulation time are expressed in seconds considering the first appearance of blood hemorrhages, vessel lysis, and protein coagulation, respectively. The IS, when based on this formula, presents a maximum value of 21. The following classification criterion is used: 0 to 4.9 nonirritant (or practically no irritation); 5.0 to 21 irritant (moderate to severe or extreme irritation).^[9]

$$IS = \left(\left(\frac{(301 - Hemorrhage\ Time)}{300} \right) x 5 \right) + \left(\left(\frac{(301 - Lysis\ Time)}{300} \right) x 7 \right) + \left(\left(\frac{(301 - Coagulation\ Time)}{300} \right) x 9 \right)$$

Equation 1. Relationship between IS and the logarithms of the concentrations.

NMR spectra's

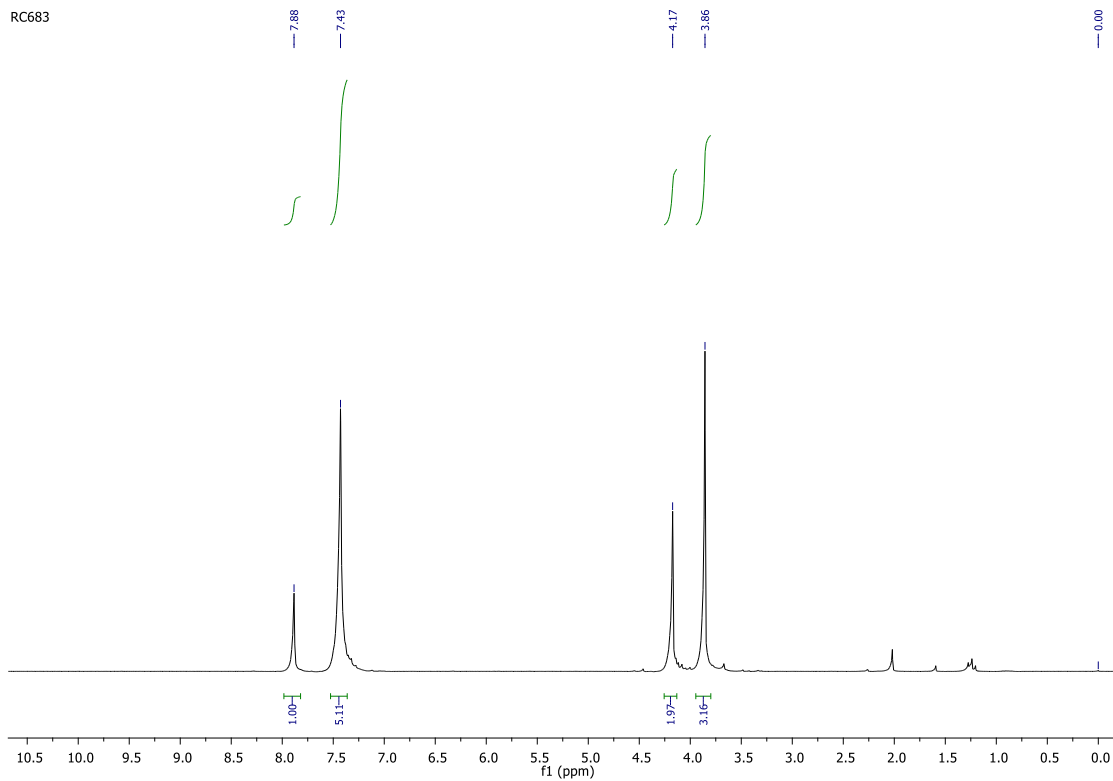


Figure 1. ^1H NMR spectra of compound **1a** (200 MHz, CDCl_3)

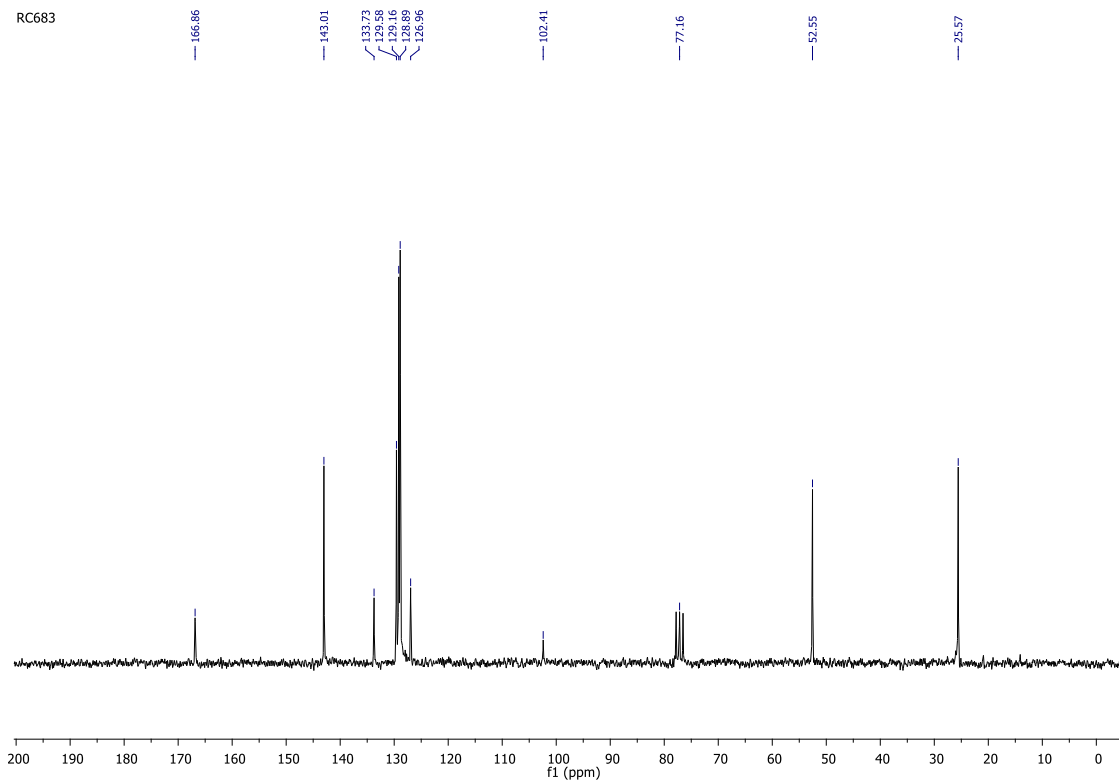


Figure 2. ^{13}C NMR spectra of compound **1a** (50 MHz, CDCl_3)

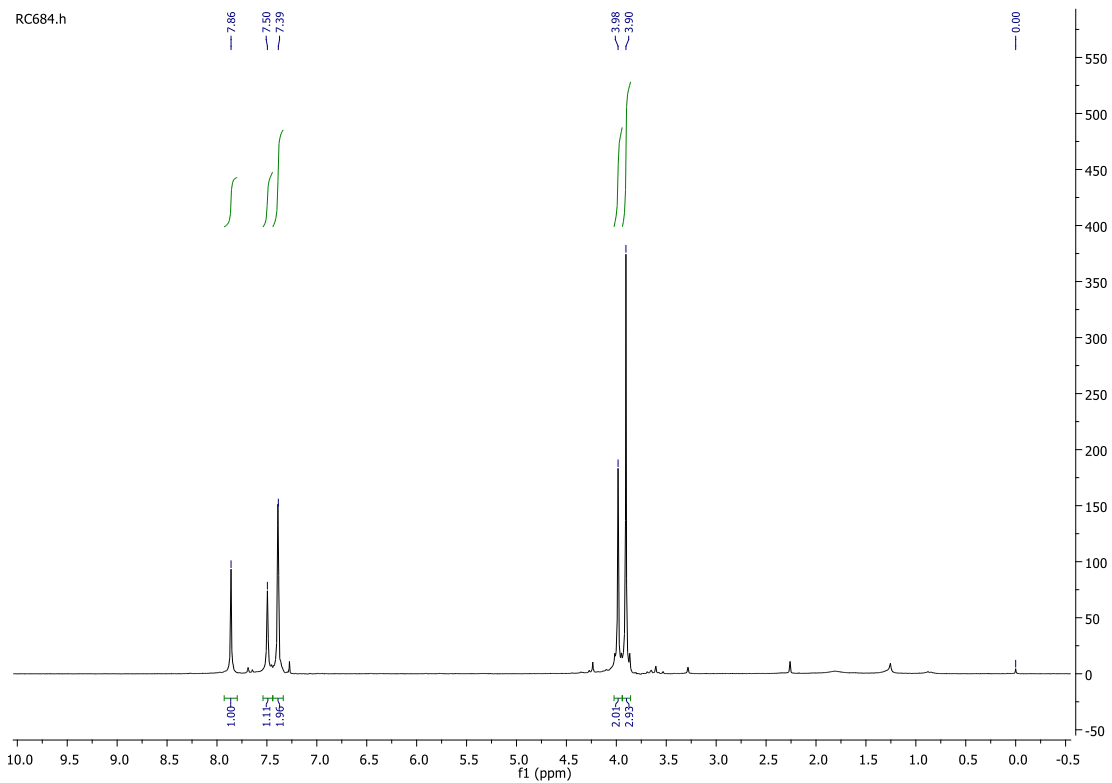


Figure 3. ^1H NMR spectra of compound **1b** (200 MHz, CDCl_3)

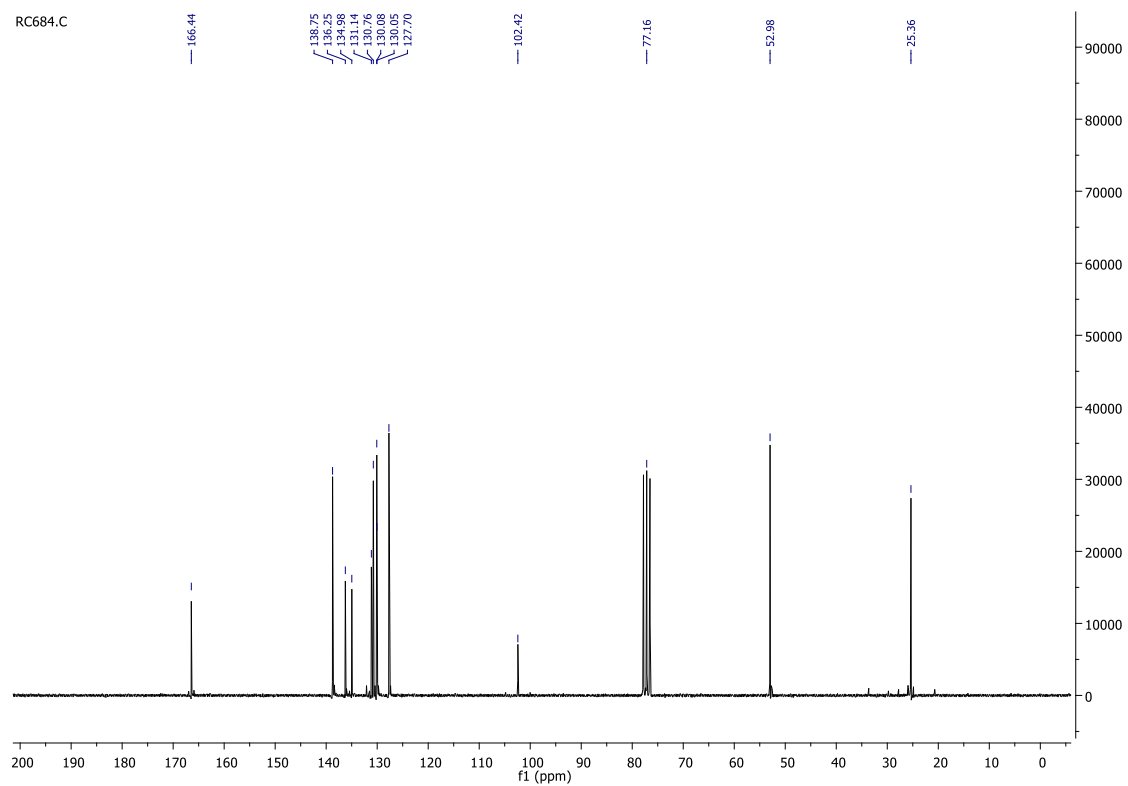


Figure 4. ^{13}C NMR spectra of compound **1b** (50 MHz, CDCl_3)

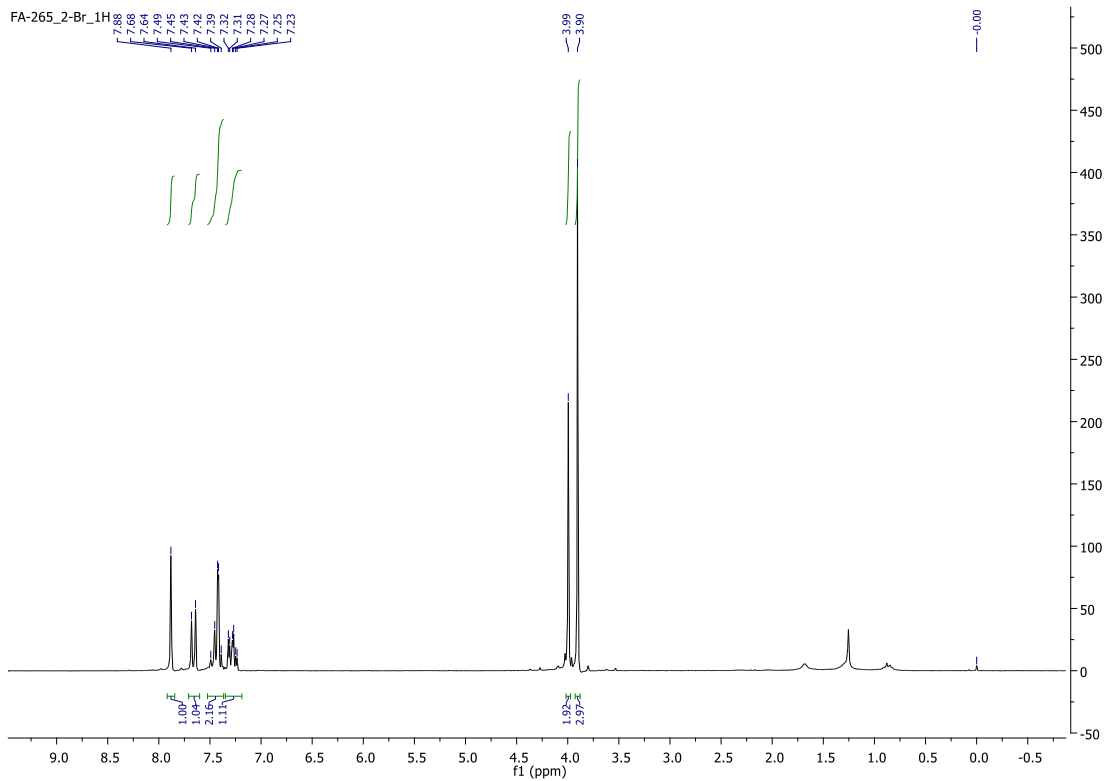


Figure 5. ^1H NMR spectra of compound **1c** (200 MHz, CDCl_3)

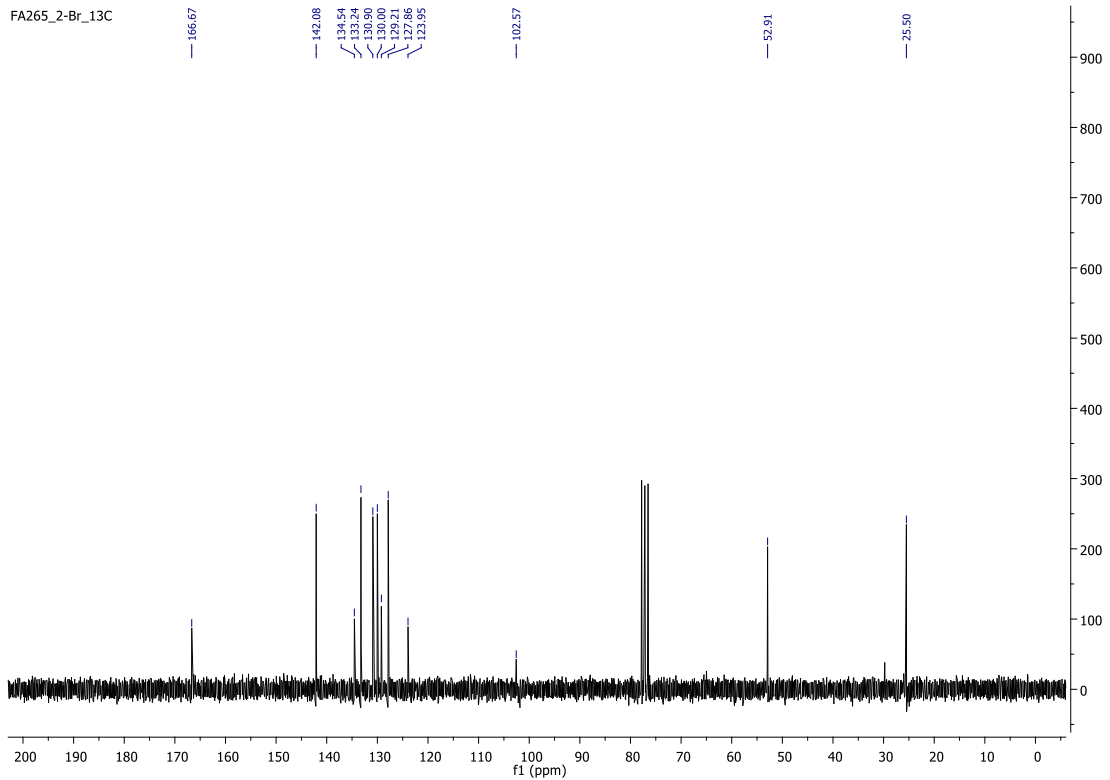


Figure 6. ^{13}C NMR spectra of compound **1c** (50 MHz, CDCl_3)

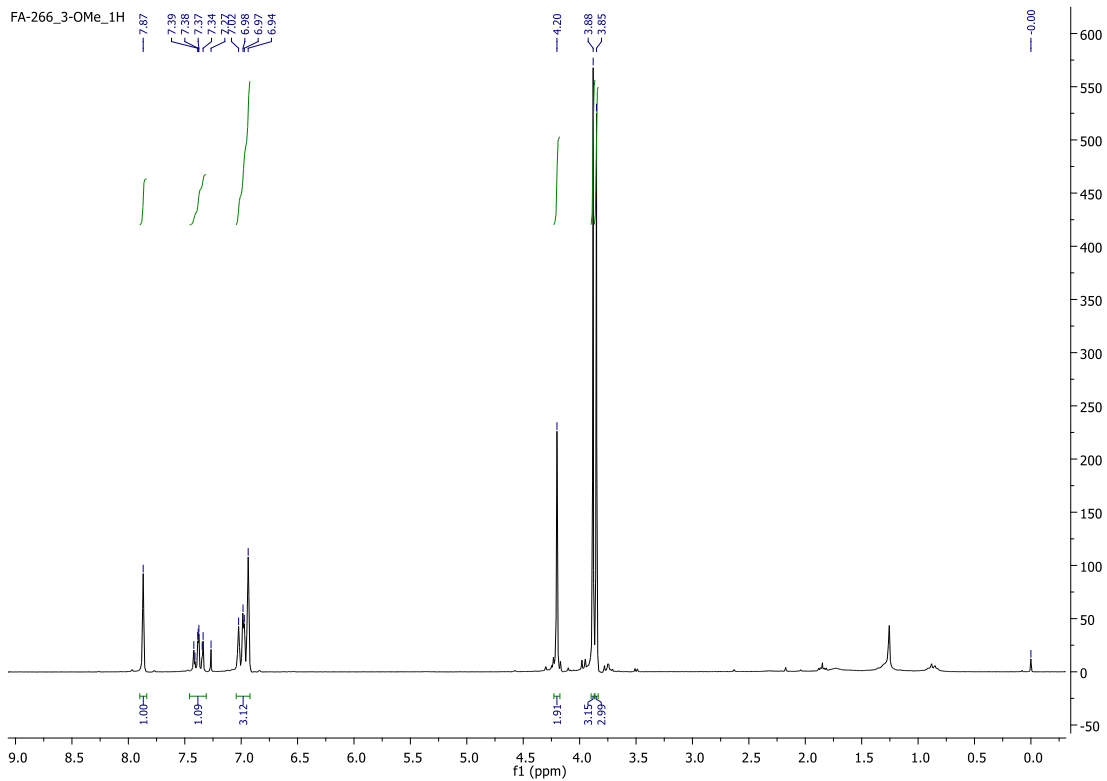


Figure 7. ^1H NMR spectra of compound **1d** (200 MHz, CDCl_3)

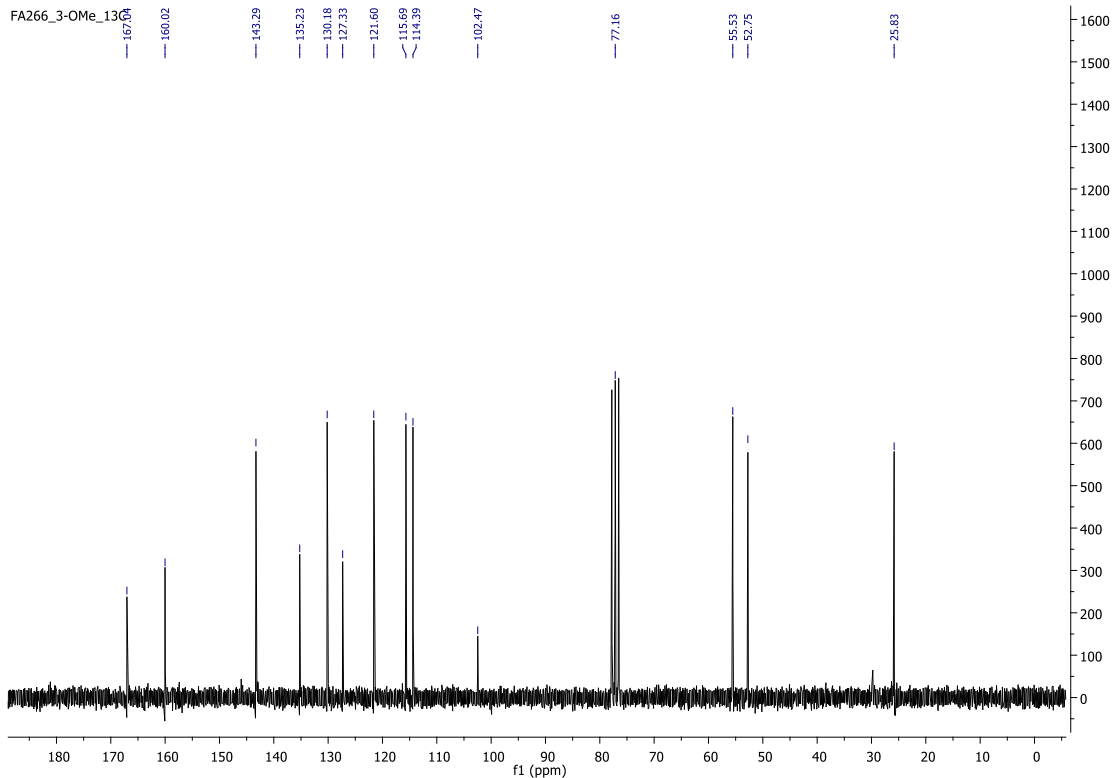


Figure 8. ^{13}C NMR spectra of compound **1d** (50 MHz, CDCl_3)

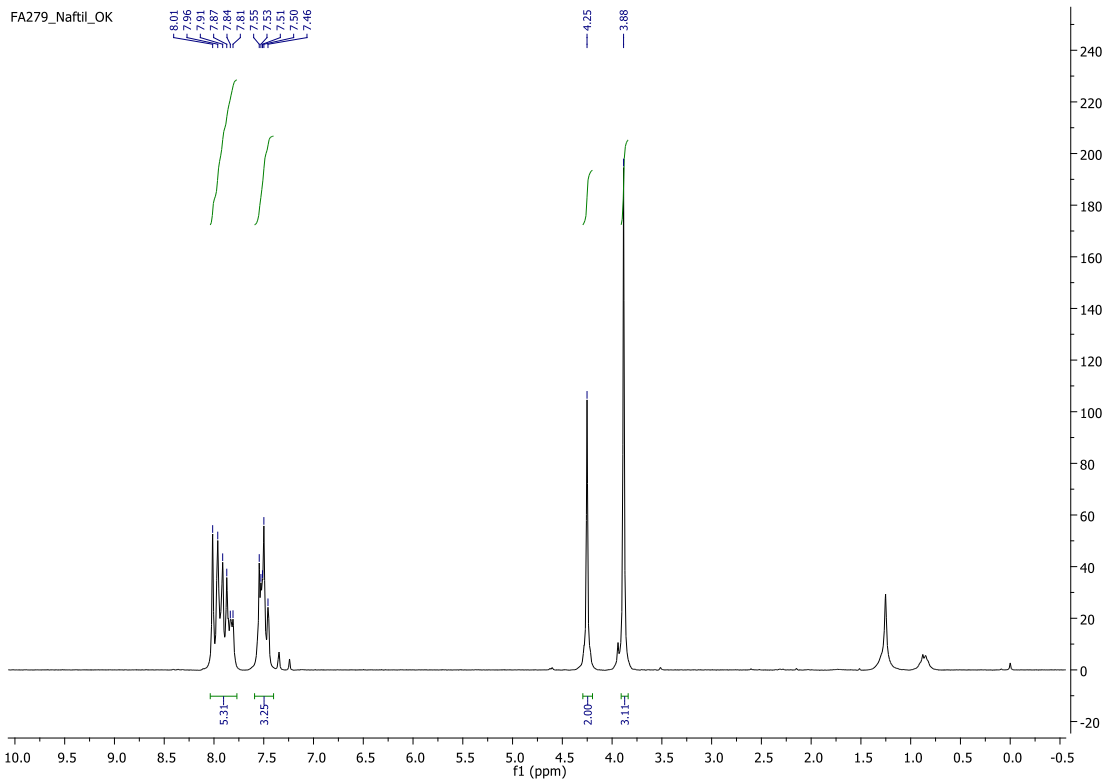


Figure 9. ^1H NMR spectra of compound **1e** (200 MHz, CDCl_3)

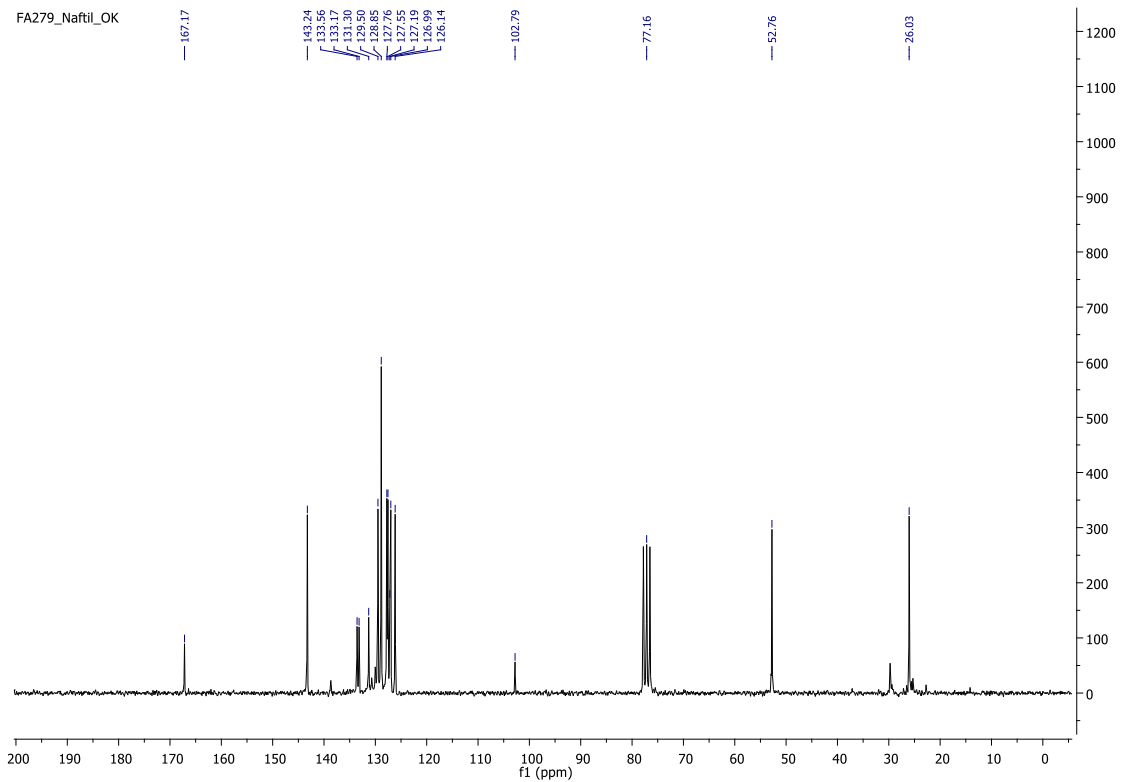


Figure 10. ^{13}C NMR spectra of compound **1e** (50 MHz, CDCl_3)

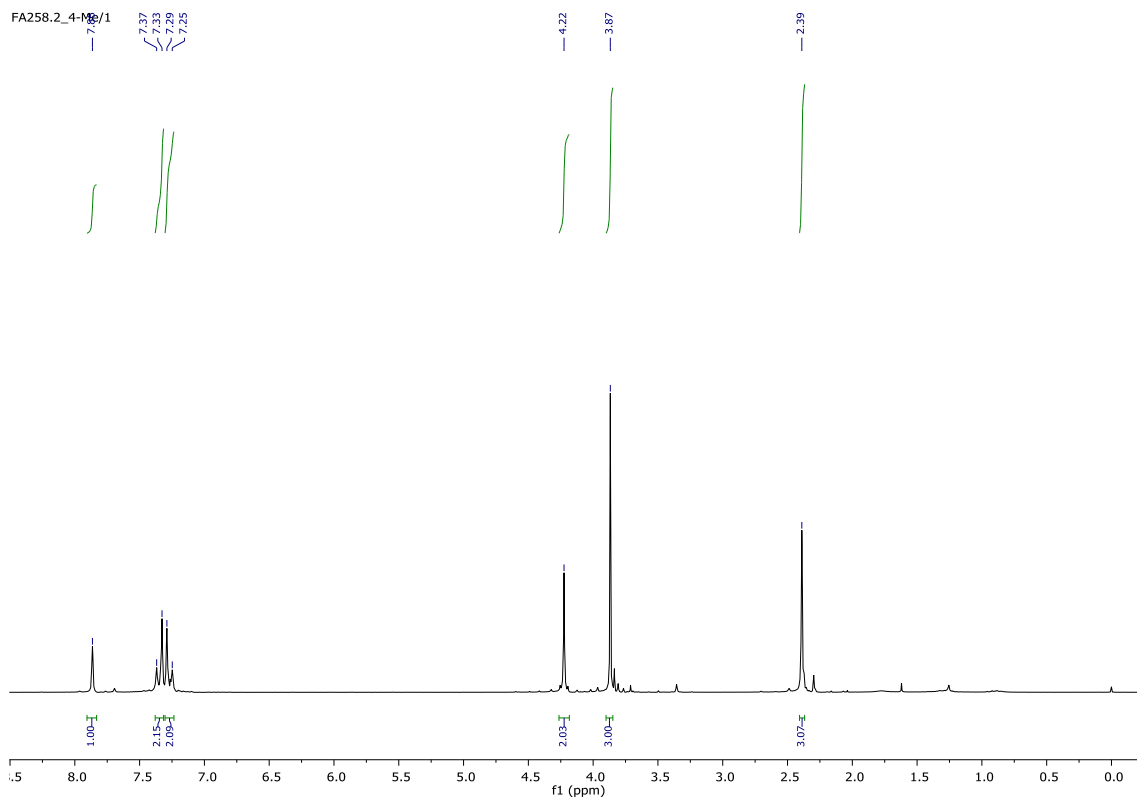


Figure 11. ^1H NMR spectra of compound **1f** (200 MHz, CDCl_3)

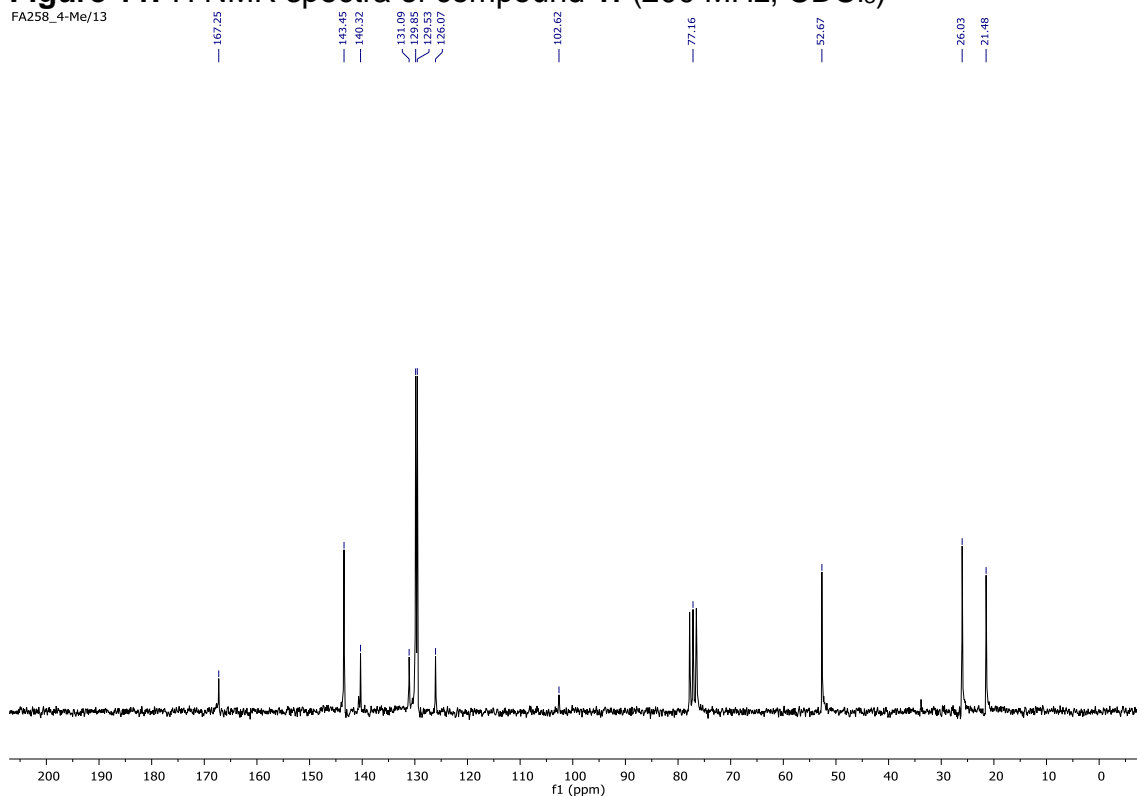


Figure 12. ^{13}C NMR spectra of compound **1f** (50 MHz, CDCl_3)

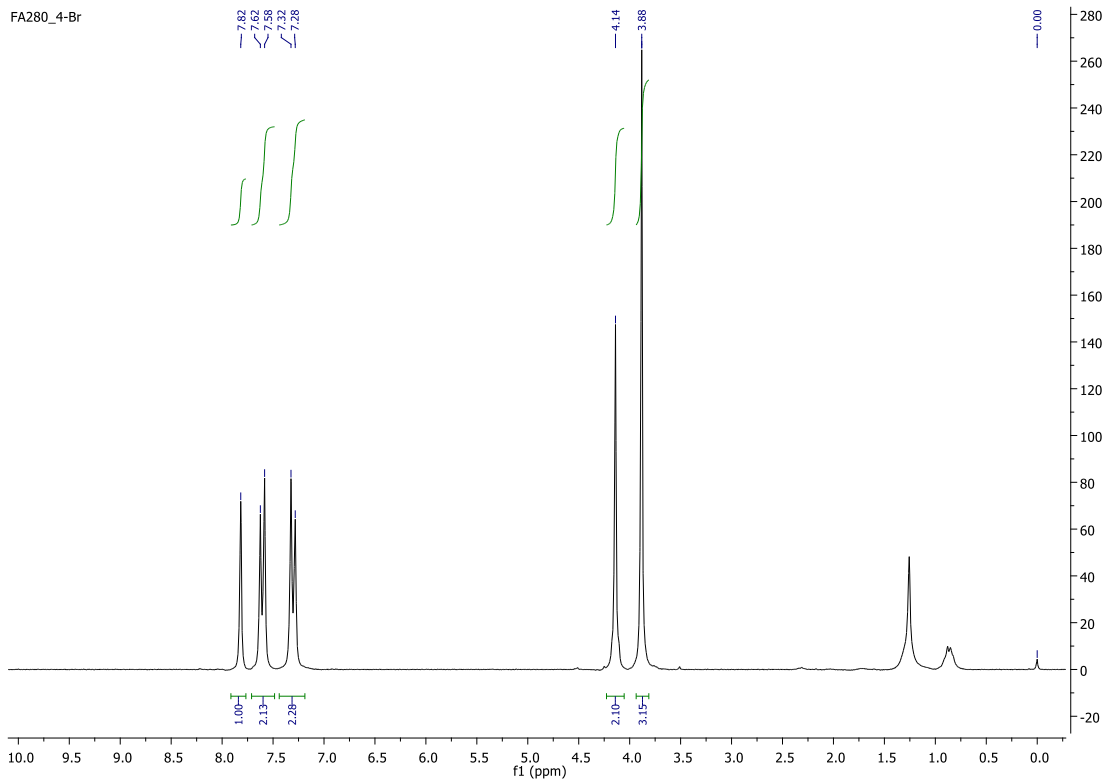


Figure 13. ^1H NMR spectra of compound **1g** (200 MHz, CDCl_3)

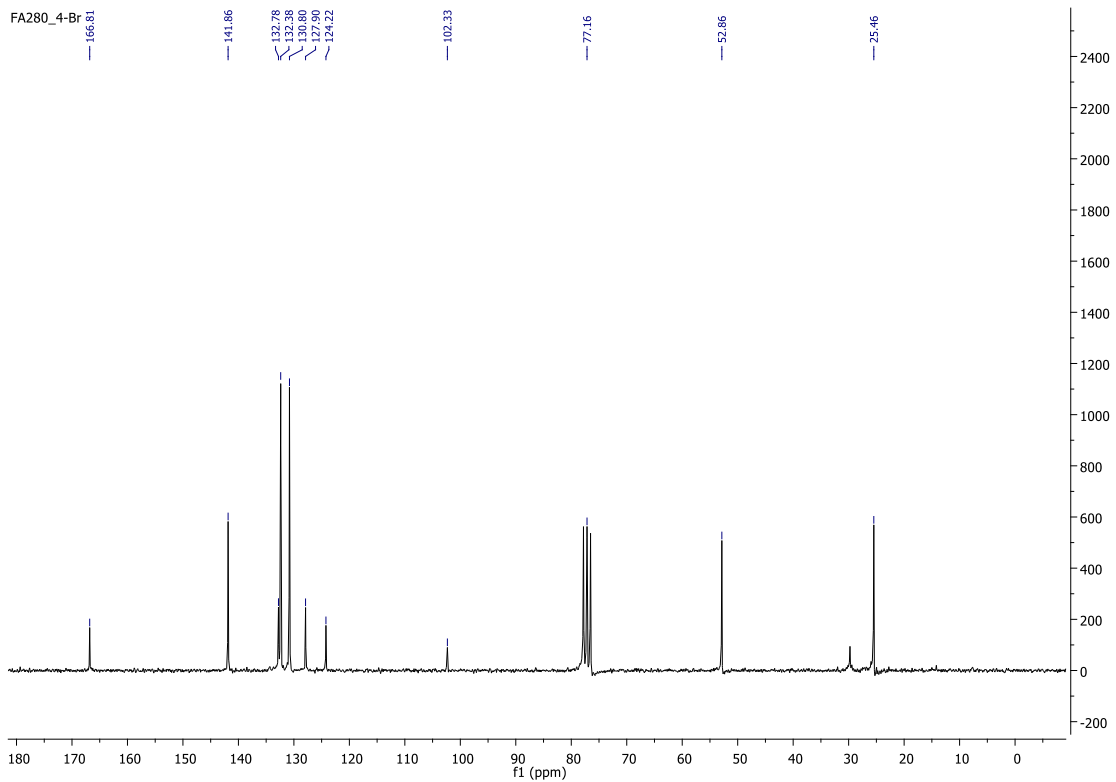


Figure 14. ^{13}C NMR spectra of compound **1g** (50 MHz, CDCl_3)

References

- [1] P. D. Rosa, D. Heidrich, C. Corrêa, M. L. Scroferneker, G. Vettorato, A. M. Fuentefria, L. Z. Goldani, *Mycoses* **2017**, *28*, 1-7.
- [2] CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. Approved Standard – Second Edition. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute* **2008**.
- [3] H. Carrasco, M. Raimondi, L. Svetaz, M. Di Liberto, M. V. Rodriguez, L. Espinoza, A. Madrid, S. Zacchino, *Molecules* **2012**, *17*, 1002-1024.
- [4] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3-26.
- [5] M. E. Burow, C. B. Weldon, Y. Tang, G. L. Navar, S. Krajewski, J. C. Reed, T. G. Hammond, S. Clejan, B. S. Backman, *Cancer Res.* **1998**, *58*, 4940-4946.
- [6] R. R. Tice, D. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J. C. Ryu, Y. F. Sasaki, *Environ. Mol. Mutagen.* **2000**, *35*, 206-221.
- [7] S. Nadin, L. Vargas-Roig, D. Ciocca, *J. Histochem. Cytochem.* **2001**, *49*, 1183-1186.
- [8] A. Hartmann, E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, G. Smith, G. Spleit, V. Thybaud, R. R. Tice, *Mutagenesis* **2003**, *18*, 45-51.
- [9] Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVMA). The Hen's Egg Test–Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method. Research Triangle Park: National Toxicology Program **2010**.

CAPÍTULO III – HUMAN FUSARIOSIS: AN EMERGING INFECTION THAT IS DIFFICULT TO TREAT

Artigo publicado na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical em 01/06/2020.

Fator de impacto 1.540.

DOI 10.1590/0037-8682-0013-2020

Human fusariosis: An emerging infection that is difficult to treat

Batista BG et al. - Emergence of human fusariosis

Bruna Gerardon Batista^[1], ***Magda Antunes de Chaves***^[2], ***Paula Reginatto***^[1],
Otávio Jaconi Saraiva^[3] and ***Alexandre Meneghello Fuentefria***^{[1],[2],[3]}

[1] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, RS, Brasil.

[2] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, RS, Brasil.

[3] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises, Porto Alegre, RS, Brasil.

Corresponding author: PhD Student Bruna Gerardon Batista.

e-mail: bruna_batista@hotmail.com

ORCID: 0000-0002-0599-3318

Received 21 February 2020

Accepted 14 April 2020

Abstract

Fusarium spp. has been associated with a broad spectrum of emerging infections collectively termed fusariosis. This review includes articles published between 2005 and 2018 that describe the characteristics, clinical management, incidence, and emergence of these fungal infections. *Fusarium solani* and *F. oxysporum* are globally distributed and represent the most common complexes. Few therapeutic options exist due to intrinsic resistance, especially for the treatment of invasive fusariosis. Therefore, the use of drug combinations could be an important alternative for systemic antifungal resistance. Increase in the number of case reports on invasive fusariosis between 2005 and 2018 is evidence of the emergence of this fungal infection.

Keywords: *Fusarium* spp. Emerging fungal infection. Human fusariosis.

Introduction

Fusariosis is an infection that affects plants, animals, and humans, and is caused by various fungi of the genus *Fusarium*^{1,2}. *Fusarium* spp. is responsible for significant economic losses in the agricultural field worldwide³ due to difficulties in management of diseases caused by this species⁴. Similarly, in the medical field, different *Fusarium* species have been related to local or invasive infections in both immunodepressed and immunocompetent individuals^{5,6,7}.

However, infections are difficult to treat because of the lack of consensus regarding treatment protocols for fusariosis in humans caused by multi-drug resistant isolates^{2,8,9}. In addition, it is possible that environmental isolates from *Fusarium* spp. acquire resistance due to previous exposure to fungicides that were used in the agricultural fields^{10,11}, and these isolates may disseminate and consequently infect humans^{12,13}. Perhaps this process of infection may be avoided by implementing public control policies regarding the sale and use of fungicides.

As such, the aim of this study is to review the literature to demonstrate the characteristics, clinical management, incidence, and emergence of fungal infections caused by *Fusarium* species. The lack of attention on these cases by public health institutions and the insufficient research on the development of novel antifungal agents as therapeutic options emphasize the need to address the main factors involved in fusariosis, such as clinical forms, treatment, and lack of epidemiological control. To address this problem, articles published between 2005 and 2018 were analyzed, and 23 publications were obtained that included important conclusions regarding this proposition (Table 1).

Emergence of pathogenic *Fusarium* species

Fusarium species exhibit global distribution, and it is believed that approximately ten complexes are related to human pathogens, including *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. fujikuroi*, *F. incarnatum-equiseti*, *F. clamydosporum*, *F. dimerum*, *F. sambucinum*, *F. concolor*, and *F. lateritium*^{5,14}. Among these complexes, members of the *F. solani* complex are the most common and virulent (comprising approximately 40-60% of infections), followed by *F. oxysporum* (~20%), *F. fujikuroi* and *F. moniliforme* (~10%)^{5,14,15}.

Despite global distribution, endemic regions are tropical and subtropical in nature^{7,16}. Although fusariosis is associated with specific climatic conditions, environmental and clinical isolates have been reported to cause infections outside previously established borders¹⁴. This fungus has efficient mechanisms of dispersion, and its conidia reach considerable distances⁹. Moreover, genetic similarities between clinical isolates and environmental isolates of the same species may be related to infections in patients by *Fusarium* spp. in the environment¹⁶.

Clinical aspects of fusariosis

Fusarium species cause a wide spectrum of infections in humans, ranging from superficial and locally invasive to disseminated, with the most prevalent infections being onychomycosis, skin infections, and keratitis¹⁵.

Invasive infections can be widespread involving the skin, brain, bloodstream, lungs, eyes, and bones^{14,17,18}. Patients with severe and prolonged neutropenia, especially those with hematological malignancies, are most susceptible to prevalent infections^{9,18}.

In their epidemiological study, Garnica and Nucci described the worldwide incidence of *Fusarium* spp. as the main non-dermatophyte filamentous fungus that causes onychomycosis¹⁹. These infections are presented as subungual distal and total dystrophic infections that are often associated with paronychia and characterized by purulent periungual inflammation. The most commonly involved complexes are *F. oxysporum* and *F. solani*²⁰. Treatment is difficult and prolonged, usually lasting more than 4 or 6 months, even with the use of topical and systemic antifungal agents²¹.

Keratitis is one of the most common infections caused by *Fusarium* spp. and primarily develops from trauma to the eye, contact lens wear, and use of corticosteroids^{9,19,22}. Trauma is the key predisposing factor and occurs in 40–60 % of patients¹⁹.

Skin infections are the result of dissemination of the fungus primarily in immunocompromised patients¹⁴. The most common pattern of disseminated disease is the combination of multiple painful erythematous papules or nodules, commonly with central necrosis. Such occurrences spread throughout the body and continuously release fungal cells, thereby resulting in a positive blood culture, and often pulmonary involvement, with or without involvement at other sites^{9,17}.

The airways represent the main gateway to infection, followed by the skin at the site of the tissue or onychomycosis, contact lens wear, and possibly mucous membranes^{9,18,22}. Prior to initiating immunosuppressive therapy— given the severity associated with disseminated fusariosis— signs of the presence of skin or nail infections should be carefully investigated, as they comprise the focus of fungal dissemination and are often neglected upon initial physical examinations^{5,9,22}.

Immune response against fusariosis

The immune system impedes the establishment of invasive infections by various species of fungi as high mortality is seen in immunosuppressed individuals²³. However, in terms of the emerging pathogenic species of the genus *Fusarium*, the lymphocyte response via Th2 may facilitate the invasiveness of this disease and explain the self-limiting difficulty related to its complex mycosis²⁴.

When the infective structures of *Fusarium* spp. reach the mucous membranes, the innate cellular immune response of the host is activated, which includes dendritic cells, macrophages, monocytes, neutrophils, and soluble mediators of the complement system²⁵. These responses are initiated by pattern recognition receptors (PRRs), which recognize a series of common and constant molecular patterns that are present in nearly all microorganisms, denominated as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). The activation of PRRs plays a dual role: it initiates processes of the innate immune system, such as phagocytosis, and establishes a link between innate and adaptive immunity via MHC type I and type II expressions²⁵.

The most important PAMPs in filamentous fungi are mannan, β -glucan, and chitin. The primary soluble PRR is pentraxin-3, whereas cellular PRRs are lectins, Toll-like-receptors, and NOD receptors. *Fusarium* species are recognized by type 2 Toll-like-receptors, which are generated in response to the production of anti-inflammatory cytokines (IL4 and IL10), and thus promote an adaptive immune system response that is mediated by Th2 lymphocytes^{26,27}. Thus, invasive *Fusarium* infections stimulate a Th2-type lymphocyte response, in which anti-inflammatory cytokines are produced, thereby leading to an inadequate response by the host to the infection and high morbidity and mortality²⁸.

Despite their minor importance, various humoral factors also participate in the innate response, as the complement is activated by their associated classical and alternating pathways²⁵. However, the predisposing factors of invasive mycoses relate to the dysfunction of the immune system of phagocytosis, rather than defects in humoral immunity. More knowledge on humoral immunity activity in response to fungal infections is required, although some studies have attempted to demonstrate a specific marker of invasive diseases caused by *Fusarium* spp.²⁹.

Antifungal resistance and therapeutic options

Fusarium spp. exhibit intrinsic resistance to echinocandins². Moreover, some isolates exhibit resistance to azoles that are associated with a third analogue of the *CYP51* gene³⁰. On the other hand, the intrinsic resistance of echinocandins is linked to the Y639 region of the *FKS1* gene, which is responsible for encoding the catalytic subunit of β -1-3 glucan synthase³¹. These fungi also exhibit mechanisms that contribute to acquiring resistance to most diverse antifungal agents, such as changes in amino acid sequences, overexpression of the *CYP51* gene, and overexpression of genes that encode efflux pumps³².

Minimal inhibitory concentrations and minimum effective concentrations have not been established for *Fusarium* species²⁰. To present this missing knowledge, Espinel-Ingroff⁸ defined the epidemiological breakpoints for amphotericin B, posaconazole, and itraconazole in relation to the main *Fusarium* species that cause fusariosis. In this scenario, a few options exist to combat this infection, and the frequently used antifungal agents include natamycin, amphotericin B, voriconazole, and posaconazole⁵. Therefore, depending on the clinical case, amphotericin B and voriconazole are the drugs of choice^{9,33}. *In vitro* and *in vivo* tests also reveal natamycin and voriconazole as drugs of choice to treat keratitis induced by *Fusarium* spp.²

In the case of resistance, the use of combinations of drugs may be an important alternative to combat various *Fusarium* species, increase the efficacy and spectrum of action of antifungal agents, and lower drug dosage and thus reduce toxic side effects^{34,35}. Moreover, *in vitro* drug combinations have demonstrated the ability to control fungal biofilms in other fungal species³⁶, and studies focused on *Fusarium* sp. remain scarce. Combinations of antifungal and non-antifungal agents have also been

tested *in vitro* and the results are promising, especially in fusariosis, as a strong association with the inflammatory response has been found^{37,38}. Despite promising results in an *in vitro* context, the use of combinations requires clinical studies to verify its effectiveness *in vivo*. A few reports have been conducted on treating patients with fusariosis using more than one drug. Tortorano et al. (2014) have reported an association between the use of lipid-based amphotericin B and voriconazole, as well as the use of up to three antifungals in the same patient³³.

Factors that contribute to the severity of fusariosis include increased incidence of multidrug resistance to *Fusarium* spp.³⁹ and the lack of research relating to the development of new therapeutic options for treatment. In general, these infections progress with a severe prognosis, especially in terms of ophthalmology, in which cases of fungal keratitis led to negative outcomes, such as loss of vision, in affected individuals. Currently, isavuconazole, characterized as a second generation triazole antifungal, is being studied as an alternative for its potential treatment of fungal diseases in patients with hematological diseases⁴⁰.

Fungicides and resistance in phytopathogenic *Fusarium* species

Fungicides are specific substances that are used in the agricultural field to combat and prevent fungal diseases. Waste from the use of these substances is considered a pollutant with potential risk to the human body, as well as more commonly to the environment⁴¹. Demethylation inhibitors are abundantly used in the agricultural field. Moreover, demethylation inhibitors change the fungal population after multiple applications, thus requiring the application of new fungicides. A substitute used is triazole, and its time of permanence in the soil depends on the concentration used and generally ranges from 67 days to more than 1688 days, with a trend of accumulation based on the frequency of use⁴².

A risk factor that may be associated with fungicides in the environment is the development of microbial resistance⁴ similar to that associated with the overuse of antifungals in humans³⁰. Azoles are the most commonly used of all groups for both pest control and treatment of human infections. Therefore, the potential development of resistance to this specific class is of increasing concern⁴. Some benefits of the azole

class include low cost and high efficacy, thereby rendering it the first-choice antifungal for use as a fungicide agent in crops since the 1970s³².

Proper fungicide management in agricultural fields is a current demand in terms of the economics related to agricultural practices, as well as in terms of negative environmental impact⁴³.

Incidence of human fusariosis

Cutaneous lesions have been observed due to the spread of fungi in patients with hematological diseases. In Brazil, from 2007 to 2009, invasive fusariosis was proved to be the most frequent or probable invasive fungal disease, with 23 episodes among 937 patients with hematologic diseases¹⁹. Based on the information discussed thus far, a bibliographical search was conducted on the PubMed and Science Direct platforms using the term "fusariosis in human," including case reports published between 2005 and 2018. In this review, we included data from articles published only in 2005 and 2018, comprising 14 publications, with the aim to observe possible changes in both the etiology of infections and treatment (Table 2). The factors for inclusion of the case reports involve the presence of relevant information on etiological agents, predisposing factors, and treatments. The exclusion factor was defined as the lack of any required information, as previously cited.

We observed that *F. solani* prevails as the etiological agent of fusariosis. The treatment also did not change over the years, indicating that amphotericin B, voriconazole, and posaconazole are prophylactic agents and treatment options for fusariosis⁴⁴. The clinical forms of the disease in the case reports focused more on infections that present cutaneous lesions, which is characterized by the spread of the disease in patients with hematological dysfunctions.

The increased incidence of fusariosis from 2005 to 2018 can be observed in Figure 1 (A-B), which graphically shows the increase in the number of articles published on the PubMed and Science Direct platforms in this time period.

Conclusion

The efficient mechanisms of the dispersion of *Fusarium* spp. have led to the global distribution of clinical and environmental isolates. *F. solani* and *F. oxysporum* are the most common complexes. Infections in humans range from superficial to

disseminated, and patients with hematological malignancies are the most susceptible. Dissemination of the fungus is seen mainly in immunocompromised patients because of the ease of infection related to the portal of entry of the fungus in the host, such as via the airways or the rupture of tissues and mucous membranes.

Invasive *Fusarium* infections stimulate an inadequate response by the host towards the infection, which accounts for the high mortality caused by this fungus. As such, biofilm formation renders treatment more difficult. *Fusarium* spp. exhibit intrinsic resistance to echinocandins, and some isolates exhibit resistance to azoles. In this scenario, the drugs of choice are amphotericin B and voriconazole, and drug combinations are an important means to combat multi-drug resistance. Just as the determination of the minimum inhibitory concentration provides an overview on *in vitro* resistance, it can also be considered strong evidence for selecting an antifungal treatment. Low investment by the pharmaceutical industry towards developing drugs to combat these infections was observed.

Risk factors of individuals contribute to the occurrence of new cases and *F. solani* continues to be the main etiological agent of fusariosis. Treatment also has not changed over the years, because of the lack of research in the development of new therapeutic options for the treatment of this infection. The increased incidence of fusariosis, as reported in the articles published between 2005 to 2018, is evidence of the emergence of this fungus.

Authors' Contributions

BGB: Investigation, Methodology, Project administration, Supervision, Writing-Reviewing & Editing the final draft; **MAC:** Investigation, Methodology, Writing-Reviewing & Editing the final draft; **PR:** Investigation, Methodology, Writing-Reviewing & Editing the final draft; **OJS:** Writing-Reviewing & Editing the final draft; **AMF:** Methodology, Project administration, Supervision, Writing-Reviewing & Editing the final draft.

Acknowledgements

The authors thank the Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do

Rio Grande do Sul (FAPERGS – EDITAL 04/2016 – PRONUPEQ 2016) for their financial support and research fellowships. The authors also thank ©Canva and ©Marketplace Designers via Canva.com for providing elements to construct the figures.

Conflict of interest

The authors declare no competing interests.

Financial Support

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul.

References

1. Gomes LB, Ward TJ, Badiale-Furlong E, Del Ponte EM. Species composition, toxigenic potential and pathogenicity of *Fusarium graminearum* species complex isolates from southern Brazilian rice. *Plant Pathol.* 2014;64(4):980-7.
2. Al-Hatmi AMS, Bonifaz A, Ranques S, de Hoog GS, Verweij PE, Meis JF. Current antifungal treatment of Fusariosis. *Int J Antimicrob Agents.* 2018;51(3):326–32.
3. Spolti P, Del Ponte EM, Dong Y, Cummings JA, Bergstrom GC. Triazole sensitivity in a contemporary population of *Fusarium graminearum* from New York wheat and competitiveness of a tebuconazole-resistant isolate. *Plant Dis.* 2014;98(5):607-13.
4. Dalhoff A. Does the use of antifungal agents in agriculture and food foster polyene resistance development? A reason for concern. *J Glob Antimicrob Resist.* 2018;13:40–8.
5. Guarro J. Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013;32(12):1491–1500.

6. Dabas Y, Bakhshi S, Xess I. Fatal cases of bloodstream infection by *Fusarium solani* and review of published literature. *Mycopathologia*. 2016;181(3-4):291–6.
7. Van Diepeningen AD, Brankovics B, Iltes J, Van Der Lee TA, Waalwijk C. Diagnosis of *Fusarium* infections: approaches to identification by the clinical mycology laboratory. *Curr Fungal Infect Rep*. 2015;9(3):135–43.
8. Espinel-Ingroff A, Colombo AL, Cordoba S *et al*. International evaluation of MIC distributions and epidemiological cutoff value (ECV) definitions for *Fusarium* species identified by molecular methods for the CLSI broth microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(2):1079-84.
9. Taj-Aldeen SJ. Reduced multidrug susceptibility profile is a common feature of opportunistic *Fusarium* species: *Fusarium* multi-drug resistant pattern. *J Fungi*. 2017;3(2):18.
10. Deising HB, Reimann S, Pascholati SF. Mechanisms and significance of fungicide resistance. *Braz J Microbiol*. 2008;39(2):286-95.
11. Ribas ADR, Spolti P, Del Ponte EM, Donato KZ, Schrekker H, Fuentefria AM. Is the emergence of fungal resistance to medical triazoles related to their use in the agroecosystems? A mini review. *Braz J Microbiol*. 2016;47(4):793-9.
12. Zhang N, O'Donnell K, Sutton SA *et al*. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *J Clin Microbiol*. 2006;44(6):2186–90.
13. Anaissie EJ, Kuchar RT, Rex JH *at al*. Fusariosis associated with pathogenic *Fusarium* species colonization of a hospital water system: a new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. *Clin Infect Dis*. 2001;33(11):1871-8.
14. Van Diepeningen AD, Al-Hatmi ABMS, Brankovics B, de Hoog GS. Taxonomy and clinical spectra of *Fusarium* species: where do we stand in 2014? *Curr Clin Microbiol Rep*. 2014;1(1-2):10–8.
15. Van Diepeningen AD, Feng P, Ahmed S, Sudhadham M, Bunyaratavej S, de Hoog GS. Spectrum of *Fusarium* infections in tropical dermatology evidenced by multilocus sequencing typing diagnostics. *Mycoses*. 2015;58(1):48–57. (b)

16. Al-Hatmi AMS, Hagen F, Menkenm SBJ, Meis JF, de Hoog GS. Global molecular epidemiology and genetic diversity of *Fusarium*, a significant emerging group of human opportunists from 1958 to 2015. *Emerg Microbes Infect.* 2016;5(12):e124. (a)
17. Garcia RR, Min Z, Narasimhan S, Bhanot N. *Fusarium* brain abscess: case report and literature review. *Mycoses.* 2015;58(1):22–6.
18. Douglas AP, Chen SCA., Slavin MA. Emerging infections caused by non-*Aspergillus* filamentous fungi. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(8):670-80.
19. Garnica M and Nucci M. Epidemiology of fusariosis. *Curr Fungal Infect Rep.* 2013;7:301–5.
20. Al-Hatmi AMS, Curfs-Breuker I, de Hoog GS, Meis JF, Verweij PE. Antifungal susceptibility testing of *Fusarium*: a practical approach. *J Fungi.* 2017;3(2):1-14.
21. Varon AG, Nouer AS, Barreiros G *et al.* Superficial skin lesions positive for *Fusarium* are associated with subsequent development of invasive fusariosis. *J Infect.* 2014;68(1):85-9.
22. Nucci F, Nouer AS, Capone D, Anaissie E, Nucci M. Fusariosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 2015;36(5):706–14.
23. Neofytos D, Horn D, Anaissie E *et al.* Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of multicenter prospective antifungal therapy (PATH) alliance registry. *Clin Infect Dis.* 2009;48(3):265–73.
24. Nucci M, Anaissie E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(4):695-704.
25. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol.* 2011;11:275-88.
26. Leal SMJ, Pearlman E. The role of cytokines and pathogen recognition molecules in fungal keratitis - Insights from human disease and animal models. *Cytokine.* 2012;58(1):107-11.

27. Kolar SS, Baidouri H, Mcdermott AM. Role of pattern recognition receptors in the modulation of antimicrobial peptide expression in the corneal epithelial innate response to *F. solani*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58(5):2463-72.
28. Nucci M, Marr KA, Vehreschild MJ *et al*. Improvement in the outcome of invasive fusariosis in the last decade. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(6):580–5.
29. Shoham S, Levitz SM. The immune response to fungal infections. *Br J Haematol*. 2005;129(5):569-82.
30. Homa M, Galgóczy L, Manikandan P *et al*. South Indian isolates of the *Fusarium solani* species complex from clinical and environmental samples: identification, antifungal susceptibilities, and virulence. *Front Microbiol*. 2018;9:1-14.
31. Katiyar SK, Edlind TD. Role for Fks1 in the intrinsic echinocandin resistance of *Fusarium solani* as evidenced by hybrid expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(5):1772-8.
32. Price CL, Parker JE, Warrilow AGS, Kelly DE, Kelly SL. Azole fungicides – understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. *Pest Manag Sci*. 2015;71(8):1054–8.
33. Tortorano AM, Prigitano A, Esposito MC, Arsic Arsenijevic V, Kolarovic J, Ivanovic D *et al*. European Confederation of Medical Mycology (ECMM) epidemiological survey on invasive infections due to *Fusarium* species in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33:1623–30.
34. Spader TB, Venturini TP, Rossato L *et al*. Synergism of voriconazole or itraconazole with other antifungal agents against species of *Fusarium*. *Rev Iberoam Micol*. 2013;30(3):200–4.
35. Fuentefria AM, Pippi B, Dalla Lana DF, Donato KK, de Andrade SF. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. *Lett Appl Microbiol*. 2017;66(1):2-13.
36. Xia J, Qian F, Xu W, Zhang Z, Wei X. *In vitro* inhibitory effects of farnesol and interactions between farnesol and antifungals against biofilms of *Candida albicans* resistant strains. *Biofouling*. 2017;33(4):283-93.

37. Al-Hatmi AMS, Meletiadis J, Curfs-Breuker I, Bonifaz A, Meis JF, de Hoog GS. *In vitro* combinations of natamycin with voriconazole, itraconazole and micafungin against clinical *Fusarium* strains causing keratitis. J Antimicrob Chemoth. 2016;71(4):953–5. (b)
38. Venturini TP, Rossato L, Chassot F *et al.* *In vitro* synergistic combinations of pentamidine, polymyxin B, tigecycline and tobramycin with antifungal agents against *Fusarium* spp. J Med Microbiol. 2016;65(8):770–4.
39. Batista BG, Dalla Lana DF, Silveira GP *et al.* Allylic selenocyanates as new agents to combat *Fusarium* species involved with human infections. ChemistrySelect. 2017;2(35):11926-32.
40. Clinical Trials. Fungal Prophylaxis With Isavuconazole for Patients Undergoing Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplant (HCT). [updated 2020 March 25]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/>
41. Chen ZF, Ying GG. Occurrence, fate and ecological risk of five typical azole fungicides as therapeutic and personal care products in the environment: A review. Environ Int. 2015;84:142-53.
42. Sulowicz S, Cycón M, Piotrowska-Seget Z. Non-target impact of fungicide tetraconazole on microbial communities in soil with different agricultural management. Ecotoxicology. 2016;25(6):1047-60.
43. Bashir MR, Atiq M, Sajid M *et al.* Antifungal exploitation of fungicides against *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici* causing *Fusarium* wilt of chilli pepper in Pakistan. Environ Sci Pollut Res Int. 2018;25(7):6796-801.
44. Herkert PF, Al-Hatmi MAS, Salvador GLO, 6, Muro MD, Pinheiro RL, Nucci M, Queiroz-Telles F, de Hoog GS, Meis JF. Molecular characterization and antifungal susceptibility of clinical *Fusarium* species from Brazil. Front. Microbiol. 2019;10:1-11.
45. Hayashida MZ, Seque CA, Enokihara MMSS, Porro AM. Disseminated fusariosis with cutaneous involvement in hematologic malignancies: report of six cases with high mortality rate. An Bras Dermatol. 2018;93(5):726-9.
46. Simon L, Gastaud L, Martiano D, Bailleux C, Hasseine L, Gari-Toussaint M. First endogenous fungal endophthalmitis due to *Fusarium dimerum*: A severe eye

infection contracted during induction chemotherapy for acute leukemia. *J Mycol Med.* 2018;28:403–6.

47. Boral H, van Diepeningen A, Erdem E, Yagmur M, de Hoog GS, Ilkit M, Meis JF, Al-Hatmi AMS. Mycotic keratitis caused by *Fusarium solani* sensu stricto (FSSC5): A Case Series. *Mycopathol.* 2018;183:835–40.

48. Combalia A, Glavedoni P, Pigem R, Mascaró Jr JM. Ultrasound assessment of a subcutaneous eumycetoma of the eyebrow in a immunocompromised patient. *Actas Dermosifiliogr.* 2018;109(9):836-8.

49. Okada K, Endo T, Hashimoto D, Saga T, Ara T, Ogasawara R et al. Disseminated fusariosis emerged from prolonged local genital infection after cord blood transplantation. *J Infect Chemother.* 2018;24(8):660-3.

50. Puapatanakula P, Lumlertgula N, Thongborc N, Mahamongkholsawatd J, Kanjanabucha T. Intracatheter antifungal lock leading to detrimental complications. *Med Mycol Case Rep.* 2018;22:58–60.

51. Borges DP, Santos AWA, Magalhaes SMM, Sidrim JJ, Rocha MFG, Cordeiro RA et al. *Fusarium solani* infection as an initial manifestation of AML transformation in myelodysplastic syndrome: A case report. *Micol Pathol.* 2018;28(2):390-2.

52. Arnoni MV, Paula CR, Auler ME, Simões CCN, Nakano S, Walderez Szeszs MW et al. Infections Caused by *Fusarium* species in pediatric cancer patients and review of published literature. *Mycopathol.* 2018;183:941–9.

53. Kumari I, Singh SK, Chauhan RK, Kaushal SK. Disseminated cutaneous fusariosis in human immunodeficiency virus-infected patient and dramatic response with oral itraconazole. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2018;84(3):362-8.

54. Yoshida M, Kiyota N, Maruyama K, Kunikata H, Toyokawa M, Hagiwara S et al. Endogenous *Fusarium* endophthalmitis during treatment for acute myeloid leukemia, successfully treated with 25-gauge vitrectomy and antifungal medications. *Mycopathol.* 2018;183:451–7.

55. Rizzello I, Castagnetti F, Toschi PG, Bertaccini P, Primavera L, Paolucci M et al. Successful treatment of bilateral endogenous *Fusarium solani* endophthalmitis in a patient with acute lymphocytic leukaemia. *Mycoses*. 2018;61:53–60.

56. Anandi V, Vishwanathan P, Sasikala S, Rangarajan M, Subramaniyan CS, Chidambaram N. *Fusarium solani* breast abscesso. *Indian J Med Microbiol*. 2005;23(3):198-9.

57. Gardner JM, Nelson MM, Heffernan MP. Chronic cutaneous fusariosis. *Arch Dermatol*. 2005;141(6):794-5.

58. Karam A, Eveillard JR, Ianoto JC, Quinio D, Le Flohic AM, Le Roy JP, Misery L, Berthou C. Disseminated cutaneous and visceral fusariosis in an aplastic patient: an unusual digestive entry. *Ann Dermatol Venerol*. 2005;132(3):255-8.

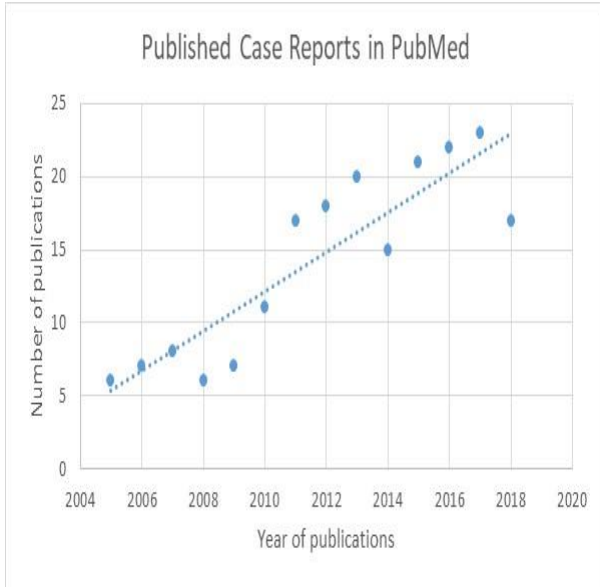


FIGURE 1 A: CASE REPORTS OF FUSARIOSIS PUBLISHED ON THE PUBMED PLATFORM BETWEEN 2005 AND 2018.

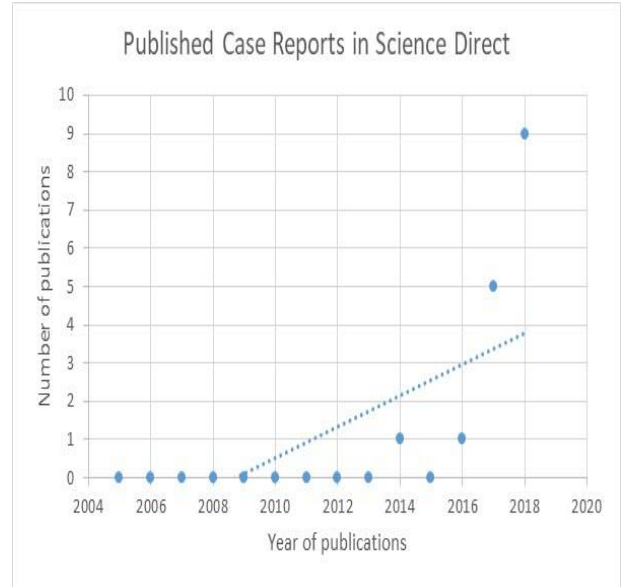


FIGURE 1 B: CASE REPORTS OF FUSARIOSIS PUBLISHED ON THE SCIENCE DIRECT PLATFORM BETWEEN 2005 AND 2018.

TABLE 1: Timeline of fusariosis: publication basis for the review study and conclusions of the last 15 years.

Authors	Year	Journal	Main conclusions
Nucci and Anaissie	2007	Clinical Microbiology Reviews	Infections by the <i>Fusarium</i> species are superficial in healthy patients, and these patients tend to respond well to therapy. Disseminated fusariosis affects the immunocompromised host and is often fatal.
Katiyar and Edlind	2009	Antimicrobials Agents and Chemotherapy	Genetic mutations in Fks sequences result in decreased sensitivity of the <i>Fusarium</i> sp., rendering it difficult to treat human fusariosis.
Romani	2011	Nature Reviews Immunology	When the infective structures of <i>Fusarium</i> spp. reach the mucous membranes, the innate cellular immune response of the host is activated, which includes dendritic cells, macrophages, monocytes, neutrophils, and soluble mediators of the complement system.
Guarro et al.	2013	European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases	Fusariosis is related to high mortality. Recovery from neutropenia remains the most important determinant of outcomes in such patients.
Nucci et al.	2014	Clinical Microbiology and Infection	Significant improvement in the results of invasive fusariosis in the last decade with changes in therapeutic practices, involving a decrease in the use of amphotericin B and increase in the use of voriconazole and combination therapy.
Spolti et al.	2014	Plant Disease	Epidemic of fusariosis in plants can be harmful to humans and animal health, since the ingestion of cereals contaminated with mycotoxins can cause serious food poisoning.
van Diepeningen et al.	2014	Current Clinical Microbiology Reports	The use of molecular techniques is recommended to identify <i>Fusarium</i> species that cause infections.
Varon et al.	2014	The Journal of Infection	Skin lesions may be considered entry points for <i>Fusarium</i> spp. Infections, especially in individuals that exhibit risk factors, such as high-risk hematological patients.
Price et al.	2015	Pest Management Science	<i>Fusarium</i> sp. exhibits mechanisms that contribute to the acquisition of resistance to even the most diverse antifungal agents. These mechanisms include changes in the amino acid sequence, overexpression of the <i>CYP51</i> gene, and overexpression of genes that encode efflux pumps.
van Diepeningen et al.	2015a	Current Fungal Infection Report	Different <i>Fusarium</i> species have been associated with local or invasive infections in both immunosuppressed and immunocompetent individuals.
van Diepeningen et al.	2015b	Mycoses	Members of the <i>F. solani</i> complex are the most common and virulent, followed by <i>F. oxysporum</i> , <i>F. fujikuroi</i> , and <i>F. moniliforme</i> .
Al-Hatmi et al.	2016a	Emerging Microbes & Infections	Treatment given for <i>Fusarium</i> infections varies according to the site of infection.
Al-Hatmi et al.	2016b	The Journal of Antimicrobial Chemotherapy	<i>In vitro</i> combined use of natamycin and voriconazole was found to be synergistic against most <i>Fusarium</i> strains, thereby significantly reducing the concentrations required to inhibit fungal growth.
Dalhoff	2016	Journal of Global Antimicrobial Resistance	Fusariosis is difficult to treat and the use of antimycotics in agriculture and horticulture facilitates the acquisition of antifungal resistance.
Espinel-Ingroff et al.	2016	Antimicrobial Agents and Chemotherapy	A cutoff point for minimum inhibitory concentration values for various <i>Fusarium</i> species was proposed based on laboratory results.
Ribas et al.	2016	Brazilian Journal of Microbiology	Environmental isolates of <i>Fusarium</i> spp. could acquire resistance due to previous exposure to fungicides that are used agriculturally in the field.

Al-Hatmi et al.	2017	Journal of Fungi	No standardization is established regarding MIC cut points for <i>Fusarium</i> , which renders it difficult to classify the susceptibility profile of isolates.
Batista et al.	2017	Chemistry Select	New chemical molecules exhibited low MICs (high potency) against <i>Fusarium</i> spp. and reduced toxicity with promising applicability in the biological and industrial fields.
Fuentefria et al.	2017	Letters in Applied Microbiology	Combination therapy have been an important alternative for combating <i>Fusarium</i> species.
Kolar et al.	2017	Investigative Ophthalmology & Visual Science	Dectin-1 and TLR2 play an important role in the regulation of <i>F. solani</i> -induced AMP expression in corneal epithelial cells, facilitating the eradication of fungal pathogens.
Al-Hatmi et al.	2018	International Journal of Antimicrobial Agents	New identification tools for <i>Fusarium</i> spp. to aid in selecting the most appropriate treatment.
Bashir et al.	2018	Environmental Science and Pollution Research	Evaluated various concentrations of fungicides used to combat fusariosis in plant. The use of carbendazim significantly reduced the incidence of disease by 49.7% after 40 days of application.
Homa et al.	2018	Frontiers in Microbiology	<i>F. falciforme</i> was the most prevalent species of FSSC in South India. Susceptibility and virulence of clinical and environmental isolates were similar.

TABLE 2: The symptoms of patients, treatments, etiological agents, and risk factors for patients described in articles published in 2005 and 2018.

Author	Year	Symptoms of Patients	Treatment	Etiological Agent	Risk Factors
Hayashida et al. ⁴⁵	2018	Erythematous nodules	Amphotericin B and voriconazole	<i>F. solani</i>	Acute myeloid leukemia
Simon et al. ⁴⁶	2018	Pain and decreased vision	Amphotericin B and voriconazole	<i>F. dimerum</i>	Acute myeloid leukemia
Boral et al. ⁴⁷	2018	Blurred vision	Voriconazole	<i>F. solani</i>	Ocular trauma
Combalia et al. ⁴⁸	2018	Lesions on the eyebrow	Complete excision of the lesions	<i>F. solani</i>	Diabetes mellitus Kidney transplant Immunosuppress treatment
Okada et al. ⁴⁹	2018	Lesions forming an ulcer	Liposomal amphotericin B	<i>F. solani</i>	Neutropenia Varicella zoster virus
Puapatanakul et al. ⁵⁰	2018	Peritonitis and septicemia	Amphotericin B	<i>Fusarium</i> spp.	Diabetes mellitus Hypertension End-stage kidney disease
Borges et al. ⁵¹	2018	Lesion	Amphotericin B and itraconazole	<i>F. solani</i>	Acute myeloid leukemia Neutropenia
Arnoni et al. ⁵²	2018	Nodules on the chest	Amphotericin B and voriconazole	<i>F. oxysporum</i>	Acute lymphocytic leukemia
Kumari et al. ⁵³	2018	Lesions with pus discharge	Itraconazole	<i>F. solani</i>	HIV positive
Yoshida et al. ⁵⁴	2018	Blurred vision	Amphotericin B and voriconazole	<i>F. solani</i>	Acute myeloid leukemia
Rizzello et al. ⁵⁵	2018	Pain on eye	Amphotericin B and voriconazole	<i>F. solani</i>	Acute lymphoblastic leukemia Neutropenia
Anandi et al. ⁵⁶	2005	Breast abscess	Ketoconazole	<i>F. solani</i>	Diabetes mellitus
Gardner et al. ⁵⁷	2005	Pruritic plaque on forearm	Amphotericin B and voriconazole	<i>F. solani</i>	Neutropenia
Karam et al. ⁵⁸	2005	Cutaneous nodules	Voriconazole	<i>F. moniliforme</i>	Myeloblastic leukemia

CAPÍTULO IV – *IN VITRO* SYNERGISM OF ORGANOSELENIUM AND ECHINOCANDIN AGAINST *Fusarium* spp.

Artigo será submetido para a Revista Mycoses

Fator de impacto 3.575.

O texto completo do Capítulo IV, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo de páginas compreendido entre as páginas 86 – 96, foi suprimido por tratar-se de manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Consta da descrição de uma associação de caspofungina com uma molécula de selenocianato alílico como uma nova estratégia para o combate de ceratite causada por espécies de *Fusarium*. O manuscrito utilizou técnicas de detecção da concentração inibitória mínima por microdiluição em caldo para verificar a atividade antifúngica e ensaio de checkerboard para avaliar possíveis interações sinérgicas.

DISCUSSÃO GERAL

As infecções em humanos causadas por *Fusarium* spp., denominadas fusariose, podem ser tanto superficiais ou disseminadas, bastante relacionadas ao estado imunológico do indivíduo. Esse fungo apresenta um perfil de suscetibilidade variável e resistência intrínseca à classe das equinocandinas, tendo como opção de tratamento a anfotericina B e voriconazol na maioria dos casos.

A busca por novas opções terapêuticas no tratamento de infecções fúngicas que apresentem eficácia clínica com baixa toxicidade ao indivíduo é alvo de diversos estudos. Opções terapêuticas foram descritas por Metwally e colaboradores (2018) com derivados de 4-tiazolidinona, derivados de 1,4-diaril-2-mercaptoimidazole (RANI & SINGH, 2018) e análogos de benzamida (TAHLAN et al., 2018). Os compostos organosselênios são bastante conhecidos devido aos diversos relatos na literatura que comprovam sua atividade biológica, em diversas classes dessas moléculas e frente a diferentes microrganismos (GULARTE et al., 2010; VENTURINI et al., 2016; THANGAMANI et al., 2017; AL-TAMIMIA et al., 2019; FERNÁNDEZ-RUBIO et al., 2019; POESTER et al., 2019; QUATRIN et al., 2019). A determinação do mecanismo de ação de uma molécula promissora como novo antifúngico é extremamente importante a fim de que ela possa também ser utilizada em terapia combinada (KARABURUN et al., 2018).

Baseado nessas evidências científicas, o presente estudo investigou uma classe inédita de compostos organosselênios (selenocianatos alílicos) na busca de atividade frente a *Fusarium* spp., encontrando atividade frente ao fungo, com baixa toxicidade e com o mecanismo de ação relacionado com a biossíntese do ergosterol da célula.

O presente estudo utilizou cepas multirresistentes de *Fusarium* para avaliação do potencial antifúngico de moléculas de selenocianato alílicos, essas cepas apresentavam valores da CIM para o voriconazol variando entre 0,5 e >32 µg/mL e de anfotericina B entre 1 e >16 µg/mL, as caracterizando como sensíveis a esses fármacos e resistente frente a itraconazol, fluconazol e terbinafina devido a CIMs ser >64 µg/mL para ambos antifúngicos. Dados similares dessa espécie fúngica são relatados por McCarthy e colaboradores (2018), que indicam uma suscetibilidade variável frente à anfotericina B e aos triazóis de amplo espectro. Algumas espécies como *F. solani* e *F. verticillioides* tendem a ser resistentes a classe dos azóis, aliados

à altas CIM para anfotericina B. *Fusarium oxysporum* e *F. moniliforme* geralmente apresentam sensibilidade frente aos azóis (NAMBIAR et. al, 2018). Em contrapartida, as cepas utilizadas nesse estudo não apresentam esse mesmo perfil, sendo que apenas duas delas (*F. keratoplasticum* e *F. oxysporum*) possuem valor elevado de CIM para anfotericina B e todas as cepas apresentaram perfil de resistência frente aos azóis de primeira geração, sendo susceptíveis aos triazóis de segunda geração. Por isso, saber com precisão o gênero e espécie do fungo que está causando uma infecção é relevante, podendo melhor direcionar o tratamento.

Em casos de ceratite, especificamente, a eficácia do tratamento convencional é insatisfatória devido o uso de colírios, antifúngico em sua forma tópica de aplicação, estar associado à baixa biodisponibilidade (ZHU et al., 2018). É pensando nos casos de ceratite causadas por *Fusarium* spp. que foi realizado o estudo para propor uma nova estratégia de tratamento. A resistência intrínseca da caspofungina frente ao *Fusarium* spp. elimina essa classe de agentes antifúngicos das escassas opções de escolha ainda existentes, sendo assim, se buscou avaliar possíveis efeitos sinérgicos entre caspofungina e a molécula de selenocianato alílico, organosselênio de síntese inédita, já que os mecanismos de ação de ambas substâncias são diferentes, podendo essa combinação ser uma nova opção terapêutica. Os resultados obtidos e relatados no Capítulo IV mostram sinergismo em uma cepa de *F. solani* e duas de *F. oxysporum*, sendo que nas demais cepas testadas, se observou um efeito aditivo com relação a inibição do desenvolvimento do fungo. Como a caspofungina é utilizada no tratamento de infecções por *Candida* spp. e *Aspergillus* spp., com a combinação de selenocianato alílico, o seu uso poderia se estender para espécies de *Fusarium*, sendo que os resultados *in vivo* dessa combinação necessitam de maiores estudos para que possam ser confirmados.

A incidência de infecções por fungos leveduriformes reduziu e as relacionadas fungos filamentosos aumentou (TUPAKI-SREEPURNA & KINDO, 2018), em específico espécies de *Fusarium*. Por mais que ainda há poucos relatos de caso de fusariose na literatura (GIOCOMAZZI et. al, 2016), pode-se observar um aumento nessas publicações, evidenciando a emergência do fungo atualmente. Fatores de risco do indivíduo contribuem para a ocorrência de novos casos dessas infecções e o *F. solani* ainda é a espécie mais encontrada.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- Conclui-se que as moléculas de selenocianato alílico descritas no Capítulo II apresentam atividade antifúngica frente às espécies patogênicas de *Fusarium*, sendo que a variação encontrada com relação a toxicidade de algumas moléculas pode evidenciar o uso das mesmas como desinfetante ou fungicidas no campo. Separando assim, as moléculas com baixa toxicidade para uso clínico, como uma possível candidata para estudos posteriores, a fim de confirmar a atividade biológica em ensaios *in vivo* e futuramente desenvolver uma formulação para uso tópico em casos de ceratite.
- Com relação a busca de novas estratégias no tratamento de ceratite fúngicas causadas por *Fusarium* spp., conclui-se que a utilização da molécula sintética de selenocianato alílico 1e descrita no Capítulo II aliado a caspofungina corresponde a uma opção terapêutica com sucesso *in vitro*, confirmada pelo sinergismo entre as substâncias em ensaio de *checkerboard*.
- A emergência de infecções causadas por *Fusarium* spp. pode ser confirmada observando o aumento no número de publicações na literatura.
- Como perspectiva futura está a elaboração de um projeto para identificar infecções locais causadas por *Fusarium* spp. e determinar a CIM desses isolados, buscando determinar dados epidemiológicos com relação a incidência do fungo e perfil de suscetibilidade.

COLABORAÇÕES

Durante o período de duração do doutorado, tive a oportunidade de contribuir em projetos de colegas do Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada, resultando na co-autoria de artigos científicos já publicados:

1. DERMATOFITOSE: AGENTES ETIOLÓGICOS, FORMAS CLÍNICAS, TERAPÊUTICA E NOVAS PERSPECTIVAS DE TRATAMENTO

Artigo em colaboração publicado na Revista Clinical & Biomedical Research em 2016.

2. *IN VITRO* SUSCEPTIBILITY AND MULTILOCUS SEQUENCE TYPING OF *Fusarium* ISOLATES CAUSING KERATITIS

Artigo em colaboração publicado na Revista Journal de Mycologie Médicale em 17/05/2018. Fator de impacto 1.56.

ANEXOS

ANEXO I – PATENTE “SELENOCIANATO ALÍLICO, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USOS DO MESMO E COMPOSIÇÃO DE ENXAGUATÓRIO BUCAL”

DOCUMENTO CONFIDENCIAL

CIRCULAÇÃO RESTRITA

ESTE DOCUMENTO É DESTINADO AO USO EXCLUSIVO DO INDIVÍDUO OU ENTIDADE À QUAL O MESMO É ENDEREÇADO E CONTÉM INFORMAÇÕES PRIVILEGIADAS, CONFIDENCIAIS E QUE NÃO DEVEM SER REVELADAS.

Se você ler este documento e não for o destinatário pretendido, estará por meio deste notificado de que qualquer disseminação, distribuição ou reprodução deste documento é estritamente proibida. Se você recebeu este documento por engano, por favor notifique-me imediatamente através dos telefones +55(21)3231-9062 ou +55(11)3087-8200.

Obrigado por sua cooperação.

THIS DOCUMENT IS INTENDED ONLY FOR THE USE OF THE INDIVIDUAL OR ENTITY TO WHICH IT IS ADDRESSED AND CONTAINS INFORMATION THAT IS PRIVILEGED, CONFIDENTIAL AND EXEMPT FROM DISCLOSURE.

If the reader of this document is not the intended recipient, you are hereby notified that any dissemination, distribution or copying of this communication is strictly prohibited. If you have received this document in error, please notify me immediately by telephone on +55(21)3231-9062 or +55(11)3087-8200.

Thank you for your co-operation.

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

SELENOCIANATO ALÍLICO, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USOS DO MESMO E COMPOSIÇÃO DE ENXAGUATÓRIO BUCAL

Campo da Invenção

[1] A presente invenção descreve novos selenocianatos alílicos derivados de (Z)-2-(bromometil)alcenoatos (reagentes oriundos dos adutos de Morita-Baylis-Hillman), assim como seu processo de obtenção. Estes compostos possuem atividade antimicrobiana, mais especificamente sobre células fúngicas leveduriformes e filamentosas. Também é descrito o uso destes compostos em formulações de enxaguatórios bucais. A presente invenção se situa nos campos da química medicinal, química de compostos organocalcogênio, mais especificamente da química de compostos orgânicos contendo selênio.

Antecedentes da Invenção

[2] A constante evolução da resistência fúngica e bacteriana, podendo ser intrínseca ou adquirida, frente a vários fármacos antimicrobianos, é considerada atualmente um dos principais problemas de saúde pública (Srinivasan *et al.*, 2014). As espécies fúngicas relacionadas com micoses superficiais e invasivas há pouco tempo eram facilmente controladas pelos poucos antifúngicos disponíveis, sem a necessidade de avaliar o perfil de susceptibilidade desses isolados. Entretanto, em cerca de duas décadas, um novo panorama tornou-se evidenciado, com espécies até então consideradas não patogênicas infectando tecidos e órgãos até então não susceptíveis, associado à necessidade de doses terapêuticas maiores e por tempo mais prolongado. As consequências desse perfil são os relatos crescentes de patógenos multirresistentes, algumas vezes insensíveis às terapêuticas antimicrobianas disponíveis (Antinori *et al.*, 2016). Em vista disso, a necessidade de implementação de novos fármacos capazes de controlar esses patógenos emergentes tornou-se urgente, seja para uso farmacológico ou como um antisséptico de controle de ambientes (Kacem *et al.*, 2016).

[3] As infecções nos tecidos da cavidade oral devido ao uso contínuo de próteses removíveis, conhecidas como estomatite protética, são geralmente associadas ao gênero *Candida* (Pellizzaro *et al.* 2012). A inflamação ocorre na mucosa do palato em

contato com a superfície da prótese e varia de irritação petequial a irritação generalizada com hiperplasia papilar (Millsap *et al.* 1999; Hahnel *et al.* 2012; Pellizzaro *et al.* 2012). As causas que podem contribuir para o desenvolvimento destas doenças são distúrbios sistêmicos e falta de higiene bucal. Além disso, próteses com superfície hidrofóbica e rugosa podem contribuir para o desenvolvimento de microrganismos, resultando na formação de biofilme (Budtz- Jorgensen *et al.* 1978; Tylenda *et al.* 1989; Paranhos *et al.* 1991; Raab *et al.* 1991; Kulak *et al.* 1994; Wilson *et al.* 1998; Lewis *et al.* 2001; Lazarin *et al.* 2012).

[4] Considerando que a prótese está em contato direto com a mucosa bucal e seus microrganismos naturais, o biofilme formado em sua superfície apresenta complexidade e variedade microbiana semelhante à mucosa subjacente (Brusca *et al.* 2013). Embora o gênero *Candida*, especialmente *C. albicans*, seja predominante e mais patogênico, outras espécies como *C. tropicalis* e *C. glabrata* também podem ser encontradas nestes biofilmes (West *et al.* 2004; He *et al.* 2006; de Freitas Fernandes *et al.* 2011; Gomes *et al.* 2011).

[5] Candidíase é uma preocupação clínica bem conhecida no ambiente médico-dental. Observa-se uma associação de candidíase a pacientes que recebem prótese total (estomatite protética). Pode ocorrer infecção na cavidade oral, justificando o uso de antimicrobianos químicos para controlar rápido crescimento microbiano. Classes de fármaco de antimicrobianos, tais como polienos e azóis são comumente usados para tratar *Candida* spp. Porém, a resistência a estes tratamentos surge em longo prazo ou e tratamentos profiláticos de pacientes imunossuprimidos (Goldman, 2004; Wingeter *et al.* 2007).

[6] Agentes antifúngicos de uso tópico e sistêmico são geralmente usados no tratamento de estomatite. Porém, o tratamento de estomatite protética é mais complexo (Dhir *et al.* 2007), considerando o desenvolvimento de resistência, especialmente do *C. albicans*, aos antifúngicos azóis. Este fenômeno também pode levar seleção de outros microrganismos, favorecendo a ocorrência de infecções por espécies de *Candida* não-*albicans*. Conseqüentemente, é necessário identificar novos compostos que apresentam propriedades antibiofilmes, capazes de inibir a formação de biofilme na superfície da prótese.

[7] Parte dos inventores vem no último triênio prospectando atividade antifúngica de amplo espectro em diferentes classes de moléculas inéditas, sempre com o intuito

de identificar alternativas mais ativas e menos tóxicas que as classes atualmente disponíveis na clínica médica (Ribas *et al.*, 2016; Dalla Lana *et al.*, 2015; Casanova *et al.*, 2015; Rosa *et al.*, 2015).

[8] Por sua vez, derivados alílicos de (Z)-2-(bromometil)alcenoatos, reagentes oriundos dos adutos de Morita-Baylis-Hillman (Basavaiah *et al.*, 2010, Ferreira *et al.*, 2009), têm apresentado expressiva atividade biológica como agentes antitumorais e antimicrobianos (Cisilotto *et al.*, 2012; Sá *et al.*, 2014). Particular atenção vem sendo dada aos derivados alílicos sulfurados, incluindo tiocianatos alílicos com atividade antimicobacteriana (Silveira *et al.*, 2012), os quais são preparados a partir da reação entre (Z)-2-(bromometil)alcenoatos e NaSCN como nucleófilo (Sá *et al.*, 2008). De maneira correlata aos compostos derivados de enxofre, diversos análogos contendo selênio vêm sendo estudados devido às suas propriedades biológicas (Nogueira *et al.*, 2004). A literatura especializada descreve a síntese de selenocianatos alílicos não substituídos ou com substituintes alquila a partir de cianoselenação eletrofílica de silanos alílicos com KSeCN.2CuBr₂ (Guram *et al.*, 1993) ou ainda a utilização de selenocianato como nucleófilo frente a halogenetos de alila (Riague *et al.*, 2002).

[9] Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

[10] Um problema constante do estado da técnica é a resistência de microrganismos aos agentes antimicrobianos atualmente utilizados. Deste modo, se faz necessário o desenvolvimento de novos compostos com ação antimicrobiana.

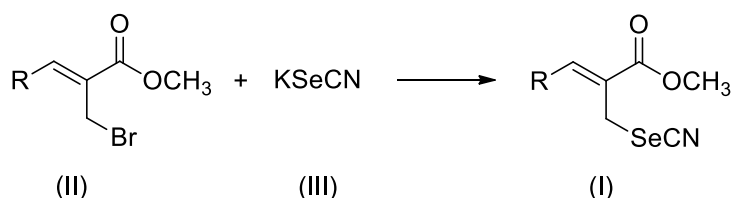
Sumário da Invenção

[11] Dessa forma, a presente invenção tem por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir de novos selenocianatos alílicos (Fórmula I) com potencial aplicação farmacológica como agentes antifúngicos, seu processo para a obtenção, e adicionalmente, composição de enxaguatório bucal compreendendo estes novos compostos, com atividade antibiofilme.

[12] A preparação de selenocianatos alílicos derivados de (Z)-2-(bromometil)alcenoatos ainda não foi descrita na literatura. Os selenocianatos alílicos descritos nesta invenção, apresenta elevada potência e seletiva ação antifúngica.

[13] Antifúngicos são conhecidos como agentes capazes de inibir o crescimento de fungos ou até mesmo matá-los, dependendo do seu mecanismo de ação frente à exposição do microrganismo a essas substâncias. Os antifúngicos podem ter aplicação farmacológica (de uso sistêmico ou tópico), aplicação sanitária (desinfetante de superfícies, conservante na indústria alimentícia) ou aplicação agrônômica (fungicidas agrícolas). O espectro de ação exibido pelos selenocianatos alílicos permite uma ampla utilização, em todo o segmento de aplicabilidade de um agente antifúngico.

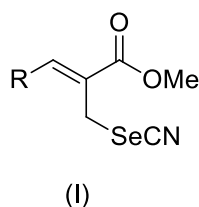
[14] O processo para a obtenção dos compostos da Fórmula I consiste na reação entre brometos alílicos (Fórmula II) e selenocianato de potássio (Fórmula III).



[15] Os selenocianatos alílicos obtidos através do processo descrito apresentam atividade frente a diversas espécies de fungos, relacionados a processos patogênicos superficiais e invasivos, e como contaminantes de alimentos processados e *in natura*, com eficácia equivalente aos principais fármacos e conservantes atualmente disponíveis para uso. As concentrações mínimas capazes de inibir as espécies fúngicas testadas foram extremamente baixas, alcançando concentrações próximas a nanograma por microlitro.

[16] Foi identificada a atividade dos selenocianatos alílicos contra *Candida sp*, e foram desenvolvidas formulações de enxaguatórios bucais antibiofilme compreendendo selenocianatos alílicos como princípio ativo.

[17] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta selenocianato alílico apresentando a Fórmula geral I:



onde o substituinte R é um selecionado do grupo que consiste em: H, (C1-C6)alquila, (C1-C6)alcoxi, ciano, (C3-C7)cicloalquila, (C3-C7)heterocicloalquila, -(C1-C6)-S(O)_mR_a, -(C1-C6)-S(O)_mNR_bR_c, -(C1-C6)-NR_bR_c, -(C1-C6)-C(=O)NR_bR_c, -(C1-

C6)-C(=O)R_a, S(O)_mR_a, S(O)_mNR_bR_c, NR_bR_c, (C=O)NR_bR_c, C(=O)R_a, arila ou heteroarila,

onde (C1-C6)alquila, (C3-C7)cicloalquila ou (C3-C7)heterocicloalquila é, opcionalmente, parcialmente insaturado, e

(C1-C6)alquila, (C3-C7)cicloalquila ou (C3-C7)heterocicloalquila, arila ou heteroarila é, opcionalmente, substituído com arila, ariloxi, heteroarila, heteroariloxi, hidroxí, nitro, halo, ciano, (C1-C6)alquila, (C1-C6)alcanoila, (C1-C6)alcoxicarbonila, (C1-C6)alcanoiloxi, S(O)_mR_a, S(O)_mNR_bR_c, NR_bR_c, C(=O)NR_bR_c, C(=O)R_a,

onde m é 1 ou 2, e

R_a, R_b, e R_c são, independentemente: H, (C1-C6)alquila, (C3-C7)cicloalquila, (C3-C6)heterocicloalquila, heteroarila ou arila.

[18] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta um processo de obtenção de selenocianato alílico, compreendendo a reação de:

- selenocianato de potássio e brometo alílico em uma proporção na faixa de 1:0 a 2:0; e

- solvente orgânico, selecionado do grupo que consiste em: tetraidrofurano, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, etanol, acetona aquosa (80%) ou uma mistura destes;

em que a temperatura é na faixa entre -20 °C e 30 °C; e

em que o tempo de reação é na faixa entre 5 – 60 minutos.

[19] Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta o uso dos selenocianatos alílicos no preparo de um medicamento para o tratamento de doenças causadas por microrganismos.

[20] Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta uma composição de enxaguatório bucal, compreendendo:

- princípio ativo que consiste em selenocianato alílico;
- veículo farmaceuticamente aceitável.

[21] Ainda, o conceito inventivo comum a todos os contextos de proteção reivindicados são as novas moléculas novos selenocianatos alílicos, sendo descrito sua obtenção, atividade e seus usos.

[22] Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

Breve Descrição das Figuras

[23] Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente, são apresentadas as presente figuras:

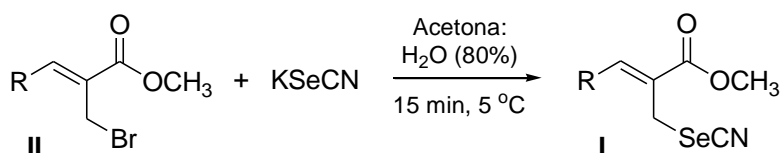
[24] A figura 1 mostra a atividade antibiofilme de *C. tropicalis* 72A, *C. glabrata* RL22 e *C. albicans* ATCC18804 com base no dano de F1, F2, F3 e FAD em comparação com o controle (FA). Valores significativamente diferentes foram detectados por ANOVA de um fator, seguido pelo teste Tukey. ^ap<0,05 em comparação com o controle.

[25] A figura 2 mostra a atividade antibiofilme de *C. tropicalis* 72A, *C. glabrata* RL22 e *C. albicans* ATCC18804 com base no dano de F1*, F2*, F3* e FAD* em comparação com o controle (FA*). Valores significativamente diferentes foram detectados por ANOVA de um fator, seguido por teste Tukey. ^ap<0,05 em comparação com o controle.

[26] A figura 3 mostra a atividade antibiofilme de *C. tropicalis* 72A e *C. albicans* ATCC18804 com base no dano de F2, F3 e F3* em comparação com Listerine®.

Descrição Detalhada da Invenção

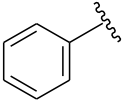
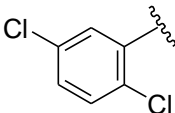
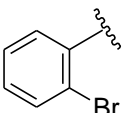
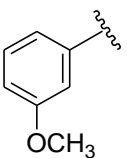
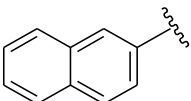
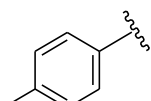
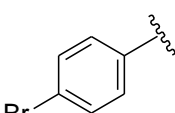
[27] A presente invenção apresenta um processo para a preparação de novos selenocianatos alílicos (Fórmula I) através da reação entre (Z)-2-(bromometil)alcenoatos (reagentes oriundos dos adutos de Morita-Baylis-Hillman - Fórmula II) e selenocianato de potássio (Fórmula III).



[28] No composto da fórmula II R pode ser H, (C1-C6)alquila, (C1-C6)alcoxi, ciano, (C3-C7)cicloalquila, (C3-C7)heterocicloalquila, -(C1-C6)-S(O)_mR_a, -(C1-C6)-S(O)_mNR_bR_c, -(C1-C6)-NR_bR_c, -(C1-C6)-C(=O)NR_bR_c, -(C1-C6)-C(=O)R_a, S(O)_mR_a, S(O)_mNR_bR_c, NR_bR_c, (C=O)NR_bR_c, C(=O)R_a, arila ou heteroarila, onde (C1-C6)alquila, (C3-C7)cicloalquila ou (C3C7)heterocicloalquila é, opcionalmente, parcialmente insaturado e (C1-C6)alquila, (C3-C7)cicloalquila ou (C3C7)heterocicloalquila, arila ou heteroarila é, opcionalmente, substituído com arila, ariloxi, heteroarila, heteroariloxi, hidroxí, nitro, halo, ciano, (C1-C6)alquila, (C1-C6)alcanoila, (C1-C6)alcoxicarbonila, (C1-C6)alcanoiloxi, S(O)_mR_a, S(O)_mNR_bR_c, NR_bR_c, C(=O)NR_bR_c, C(=O)R_a, onde m é 1 ou 2, e R_a, R_b e R_c são, independentemente, H, (C1-C6)alquila, (C3-C7)cicloalquila,

(C3-C6)heterocicloalquila, heteroarila ou arila. Mais especificamente, sem limitar o escopo, R pode ser arila ou arila substituída.

Tabela 1. Exemplos de preparação de selenocianatos alílicos

Entrada	Exemplo	R	Rendimento (%)
1	1a		93
2	1b		89
3	1c		78
4	1d		70
5	1e		90
6	1f		83
7	1g		82

[29] A quantidade de selenocianato de potássio (Fórmula III) utilizada na reação pode variar, sem implicar qualquer limitação, entre 1,0 e 2,0 equivalentes. Preferencialmente são utilizados 1,2 equivalentes do composto de Fórmula III. O solvente utilizado para conduzir o processo pode ser, sem implicar qualquer limitação, um solvente orgânico como tetraidrofurano, dimetilformamida, dimetilsulfóxido ou etanol. Preferencialmente o processo é conduzido em acetona aquosa (80%). A temperatura utilizada para conduzir o processo pode variar, sem implicar qualquer limitação, entre -20 °C e 30 °C, preferencialmente a reação é conduzida a 5 °C. O tempo reacional pode variar entre 5 – 60 minutos, preferencialmente o processo é conduzido durante 15 minutos. Após a reação se completar, a mistura reacional é diluída em um solvente orgânico, preferencialmente acetato de etila. A solução de acetato de etila é lavada com água, seca e evaporada. O resíduo obtido desta maneira

é purificado através de uma técnica cromatográfica se necessário, preferencialmente através de cromatografia em coluna de sílica gel.

[30] Em um procedimento típico, o brometo alílico é solubilizado em acetona aquosa e resfriado a 5 °C, então o selenocianato de potássio é adicionado e a mistura reacional é agitada por 15 minutos nesta temperatura. Ao final a reação é diluída com acetato de etila e a fase orgânica resultante é lavada com água, seca e evaporada. O resíduo é purificado através de cromatografia em coluna de sílica gel.

[31] Conforme demonstrado na Tabela 1 acima, a presente invenção apresenta um bom escopo e grande tolerância em relação a grupos funcionais. A Tabela 1 indica rendimentos superiores para os substratos substituídos nas posições *para* em relação às demais posições do anel aromático, com uma boa tolerabilidade em relação a grupos funcionais. Bons rendimentos são obtidos na maioria dos exemplos apresentados.

[32] Foram desenvolvidas formulações de enxaguatórios bucais, utilizando como princípio ativo as moléculas da presente invenção. Os selenocianatos alílicos 1-3 mostraram uma expressiva atividade antibiofilme contra *Candida albicans*, *C. glabrata*, e *C. tropicalis*, de acordo com o método de cristal violeta (150 µg mL⁻¹, Tabela 6), permitindo o desenvolvimento das formulações de enxaguatório bucal, compreendendo 150 µg mL⁻¹ (0,015%) destes compostos como princípio. Também foram realizados ensaios de toxicidade tais como HET-CAM para verificar o potencial alérgico destes compostos. De acordo com este ensaio, 1-3 não são irritantes em mucosa embrionária.

Foi realizado o teste de HET-CAM para verificação do potencial alérgico dos compostos. O teste mostrou potencial alérgico para as moléculas SeCN1 com score de 9,71 e para a molécula SeCN2 com score de 7,63, as demais moléculas não demonstraram irritação de acordo com a metodologia utilizada. O Gráfico 1. abaixo demonstra os resultados, onde o score de irritação é determinado como não irritante resultados de 0-4,9 e irritante os resultados com valores de 5,0-21.

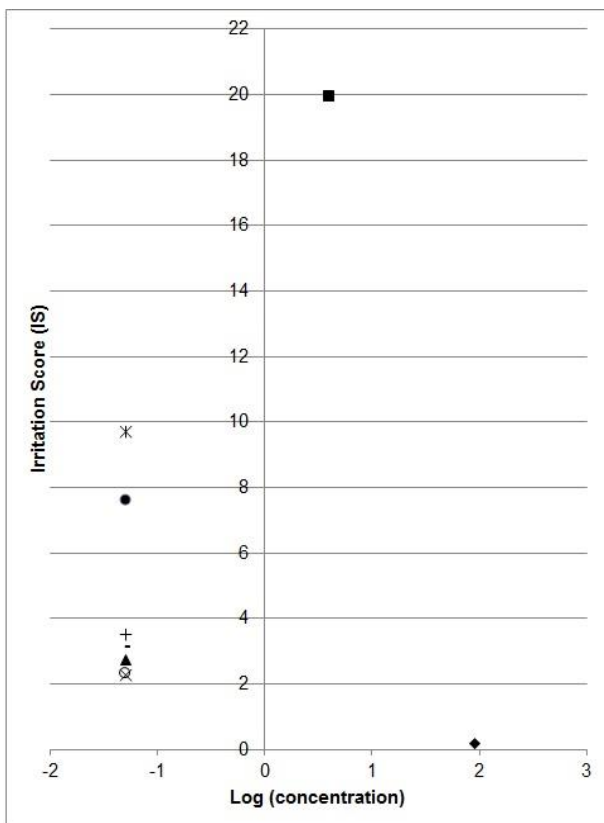
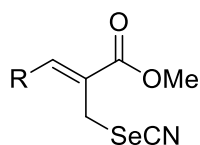


Gráfico 1. Relação dose-resposta para as moléculas de selenocianatos alílicos. SeCN1 na concentração de 50µg/mL⁻¹ (*), SeCN2 na concentração de 50µg/mL⁻¹ (●), SeCN3 na concentração de 50µg/mL⁻¹ (▲) , SeCN4 na concentração de 50µg.mL⁻¹ (○), SeCN5 na concentração de 50µg/mL⁻¹ (+), SeCN6 na concentração de 50 µg.mL⁻¹ (-), Concentração de 50µg/mL⁻¹ (x), controle negativo (NaCl a 0,9%) (◆) e controle positivo (NaOH 0,1M) (■). Cada ponto representa um experimento com N de três ovos. As concentrações foram transformadas logaritmicamente: -1,4 a 3,0.

O exagatório bucal Listerine® apresenta capacidade de reduzir a viabilidade do biofilme fúngico de *Candida* spp (Meiller *et al.* 2001; Nogueira Filho, 2005; Lamfon *et al.*, 2004), porém resultados obtidos para F2, F3 e F3* são relacionados aos resultados apresentados pelo Listerine® (figura 3). É observado que a concentração dos selenocianatos alílicos nas formulações desenvolvidas na presente invenção é menor (0,015%) do que as concentrações dos princípios ativos de Listerine® (princípios

ativos: eucaliptol (0,092% v/v), timol (0,064% v/v), Salicilato de metila (0,060% v/v), mentol (0,042% v/v) e etanol (26,9% v/v) (Ramage *et al.* 2011; Ful *et al.* 2014), sendo necessários cinco princípios ativos para preparar Listerine®, enquanto as formulações obtidas necessitam somente de um princípio ativo, demonstrando melhoria no processo de produção em relação ao produto comumente utilizado, proporcionando um processo de menor custo.

[33] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta selenocianato alílico apresentando a Fórmula geral I:



(I)

onde o substituinte R é um selecionado do grupo que consiste em: H, (C1-C6)alquila, (C1-C6)alcoxi, ciano, (C3-C7)cicloalquila, (C3-C7)heterocicloalquila, -(C1-C6)-S(O)_mR_a, -(C1-C6)-S(O)_mNR_bR_c, -(C1-C6)-NR_bR_c, -(C1-C6)-C(=O)NR_bR_c, -(C1-C6)-C(=O)R_a, S(O)_mR_a, S(O)_mNR_bR_c, NR_bR_c, C(=O)NR_bR_c, C(=O)R_a, arila ou heteroarila,

onde (C1-C6)alquila, (C3-C7)cicloalquila ou (C3-C7)heterocicloalquila é, opcionalmente, parcialmente insaturado, e

(C1-C6)alquila, (C3-C7)cicloalquila ou (C3-C7)heterocicloalquila, arila ou heteroarila é, opcionalmente, substituído com arila, ariloxi, heteroarila, heteroariloxi, hidroxil, nitro, halo, ciano, (C1-C6)alquila, (C1-C6)alcanoila, (C1-C6)alcoxicarbonila, (C1-C6)alcanoiloxi, S(O)_mR_a, S(O)_mNR_bR_c, NR_bR_c, C(=O)NR_bR_c, C(=O)R_a,

onde m é 1 ou 2, e

R_a, R_b, e R_c são, independentemente: H, (C1-C6)alquila, (C3-C7)cicloalquila, (C3-C6)heterocicloalquila, heteroarila ou arila.

[34] Em uma concretização, o substituinte R é um selecionado do grupo que consiste em: fenila, 2,4-diclorofenila, 2-bromofenila, 3-metoxifenila, naftalen-2-ila, 4-tolila e 4-bromofenila.

[35] Em uma concretização, o substituinte R do selenocianato alílico é um selecionado do grupo que consiste em: naftalen-2-ila, 4-tolila e 4-bromofenila.

[36] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta um processo de obtenção de selenocianato alílico, compreendendo a reação de:

- selenocianato de potássio e brometo alílico em uma proporção na faixa de 1:0 a 2:0; e

- solvente orgânico, selecionado do grupo que consiste em: tetraidrofurano, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, etanol, acetona aquosa (80%) ou uma mistura destes;

em que a temperatura é na faixa entre -20 °C e 30 °C; e

em que o tempo de reação é na faixa entre 5 – 60 minutos.

[37] Em uma concretização, o processo de obtenção de selenocianato alílico, compreende:

- selenocianato de potássio e brometo alílico na proporção de 1,2:1;

- acetona aquosa (80%);

em que a temperatura de reação é de 5 °C; e

em que o tempo de reação é de 15 minutos.

[38] Em uma concretização, o processo de obtenção de selenocianato alílico, compreende as etapas de:

i. solubilizar o precursor em brometo alílico em acetona (80%);

ii. manter temperatura do meio reacional em 5°C;

iii. adicionar selenocianato de potássio ao produto obtido na etapa i, na proporção selenocianato de potássio:brometo alílico de 1,2:1;

iv. adicionar água ao produto obtido na etapa iii;

v. agitar o produto obtido na etapa iv por 15 minutos;

vi. adicionar acetato de etila ao produto obtido na etapa v;

vii. lavar fase orgânica formada na etapa vi com água e salmoura;

viii. secar produto obtido na etapa vii com MgSO₄ anidro; e

ix. evaporar fase orgânica obtida na etapa viii;

[39] Em uma concretização, o processo de obtenção de selenocianato alílico, compreende uma etapa adicional de purificação do selenocianato alílico obtido na etapa vii em cromatografia em coluna de sílica gel

[40] Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta o uso dos selenocianatos alílicos no preparo de um medicamento para o tratamento de doenças causadas por microrganismos.

[41] Em uma concretização, o microrganismo é fungo.

[42] Em uma concretização, o fungo é do gênero *Fusarium* spp., *Microsporium* spp., *Trichophyton* spp. ou *Candida* spp.

[43] Em uma concretização, o fungo é *Fusarium petroliphilum*, *Fusarium keratoplasticum*, *Fusarium falciforme*, *Fusarium xysporum*, *Fusarium solani*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* ou *Trichophyton rubrum*,

[44] Em uma concretização, fungo é *C. tropicalis*, *C. glabrata* ou *C. albicans*.

[45] Em uma concretização, a doença é estomatite protética.

[46] Em um quarto objeto, a presente invenção apresenta uma composição de enxaguatório bucal, compreendendo:

- princípio ativo que consiste em selenocianato alílico;
- veículo farmacologicamente aceitável.

[47] Em uma concretização, o veículo farmacologicamente aceitável compreende:

- pelo menos um aromatizante;
- pelo menos um edulcorante; e
- pelo menos um agente conservante.

[48] Em uma concretização, a quantidade de:

- princípio ativo é 0,015%v/v;
- aromatizante é 0,3% v/v;
- edulcorante é 0,05% v/v; e
- o agente conservante ser sorbato de potássio é 0,1 v/v%.

[49] Em uma concretização:

- o aromatizante é essência hidroetanólica de hortelã-pimenta;
- o edulcorante é sacarina sódica; e
- o agente conservante é sorbato de potássio.

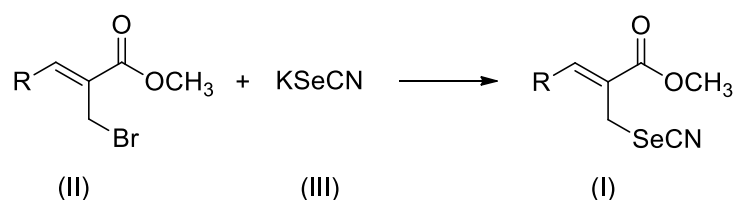
[50] Em uma concretização, o princípio ativo dissolvido em DMSO.

Exemplos – Concretizações

[51] Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

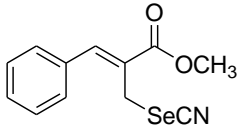
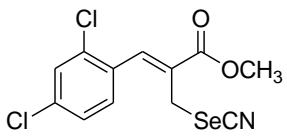
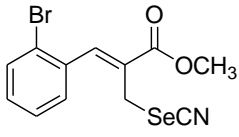
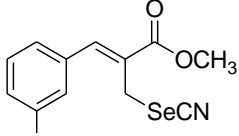
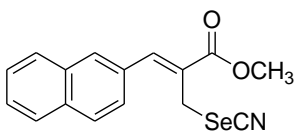
Preparação dos compostos

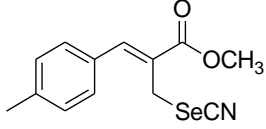
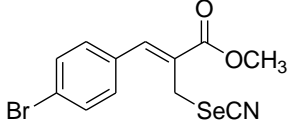
[52] Em um balão, munido de barra magnética de agitação, é solubilizado o brometo alílico (Fórmula II) (0,25 mmol) em acetona (3 mL). O meio reacional é resfriado sobre banho de gelo até 5 °C. É então adicionado ao meio reacional KSeCN (0,3 mmol) seguido de água (1 mL). A mistura reacional é agitada a 5 °C por 15 min. Após este período é adicionado acetato de etila ao meio reacional e a fase orgânica formada é lavada com água e salmoura e seca com MgSO₄ anidro. Após filtrar o agente secante, a fase orgânica é evaporada e o resíduo resultante é purificado através de cromatografia em coluna de sílica gel (se necessário) para obtenção do selenocianato alílico (Fórmula I).



[53] Para a identificação dos compostos obtidos (Ia – Ig), foram realizadas análises de Ressonância Magnética Nuclear (¹H RMN e ¹³C RMN), Infravermelho (IV) e Espectrometria de Massa de Alta Resolução (EMAR). São apresentados abaixo os resultados das análises.

Tabela 2. Análises¹H RMN, ¹³C RMN, IV e EMAR dos selenocianatos alílicosobtidos

<p>1a</p> 	<p>(Z)-3-fenil-2-(selenocianatometil) acrilato de metila</p> <p>IV (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3057, 3027, 2951, 2845, 2148, 1713, 1626, 1436, 1273, 1203, 773, 702. ¹H RMN (200 MHz, CDCl₃): δ = 3,86 (s, 3H); 4,17 (s, 2H); 7,43 (s, 5H); 7,88 (s, 1H). ¹³C RMN (50 MHz, CDCl₃): δ = 25,6; 52,5; 102,4; 127,0; 128,9; 129,2; 129,6; 133,7; 143,0; 166,9. EMAR (APPI) m/z calculado para C₁₂H₁₁NO₂Se [M+NH₄] 299,0294; encontrado 299,0291.</p>
<p>1b</p> 	<p>(Z)-3-(2,4-diclorofenil)-2-(selenocianatometil) acrilato de metila</p> <p>IV (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3088, 2951, 2845, 2150, 1715, 1630, 1583, 1436, 1287, 763. ¹H RMN (200 MHz, CDCl₃): δ = 3,90 (s, 3H); 3,98 (s, 2H); 7,39 (s, 2H); 7,50 (s, 1H); 7,86 (s, 1H). ¹³C RMN (50 MHz, CDCl₃): δ = 25,4; 53,0; 102,4; 127,7; 130,0; 130,1; 130,8; 131,1; 135,0; 136,2; 138,8; 166,4. EMAR (APPI) m/z calculado para C₁₂H₉Cl₂NO₂Se [M+NH₄] 366,9509; encontrado 366,9505.</p>
<p>1c</p> 	<p>(Z)-3-(2-bromofenil)-2-(selenocianatometil) acrilato de metila</p> <p>IV (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3059, 3031, 2923, 2851, 2150, 1677, 1632, 1585, 1438, 1295, 1089, 759. ¹H RMN (200 MHz, CDCl₃): δ = 3,90 (s, 3H); 3,99 (s, 2H); 7,23-7,49 (m, 3H); 7,66(d, J = 8,2 Hz, 1H); 7,88 (s, 1H). ¹³C RMN (50 MHz, CDCl₃): δ = 25,5; 52,9; 102,6; 124,0; 127,9; 129,2; 130,0; 130,9; 133,2; 134,5; 142,1; 166,7. EMAR (APPI) m/z calculado para C₁₂H₁₀BrNO₂Se [M+NH₄] 376,9395; encontrado 376,9391.</p>
<p>1d</p> 	<p>(Z)-3-(3-metoxifenil)2-(selenocianatometil) acrilato de metila</p> <p>IV (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3002, 2953, 2837, 2148, 1713, 1626, 1597, 1577, 1436, 1250, 1154, 789. ¹H RMN (200 MHz, CDCl₃): δ = 3,85 (s, 3H); 3,88 (s, 3H); 4,20 (s, 2H); 6,94-7,02 (m, 3H); 7,27-7,39 (m, 1H); 7,87 (s, 1H). ¹³C RMN (50 MHz, CDCl₃): δ = 25,8; 52,8; 55,5; 102,5; 114,4; 115,7; 121,6; 127,3; 130,2; 135,2; 143,3; 160,0; 167,0. EMAR (APPI) m/z calculado para C₁₃H₁₃NO₃Se [M+NH₄] 329,0399; encontrado 329,0403.</p>
<p>1e</p> 	<p>(Z)-3-(naftalen-2-il)-2-(selenocianatometil) acrilato de metila</p> <p>IV (KBr) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3059, 3002, 2925, 2853, 2142, 1707, 1617, 1589, 1434, 1254, 1152, 814, 755. ¹H RMN (200 MHz, CDCl₃): δ = 3,88 (s, 3H); 4,25 (s, 2H); 7,46-7,55 (m, 3H); 7,81-8,01 (m, 5H). ¹³C RMN (50 MHz, CDCl₃): δ = 26,0; 52,8; 102,8; 126,1; 127,0; 127,2; 127,5; 127,6; 127,8; 128,8; 129,5; 131,3; 133,2; 133,6; 143,2; 167,2. EMAR (APPI) m/z calculado para C₁₆H₁₃NO₂Se [M+NH₄] 349,0450; encontrado 349,0450.</p>

If		<p>(Z)-2-(selenocianatometil)-3-(4-tolil) acrilato de metila</p> <p>IV (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3027, 2951, 2856, 2148, 1711, 1626, 1609, 1436, 1273, 1203, 812, 763. ¹H RMN (200 MHz, CDCl₃): δ = 2,39 (s, 3H); 3,87 (s, 2H); 4,22 (s, 2H); 7,27 (d, J = 8,4 Hz, 2H); 7,35 (d, J = 8,4 Hz, 2H); 7,86 (s, 1H). ¹³C RMN (50 MHz, CDCl₃): δ = 21,5; 26,0; 52,7; 102,6; 126,1; 129,5; 129,8; 131,1; 140,3; 143,4; 167,2. EMAR (APPI) m/z calculado para C₁₃H₁₃NO₂Se [M+NH₄] 313,04502; encontrado 313,04496</p>
Ig		<p>(Z)-3-(4-bromofenil)-2-(selenocianatometil) acrilato de metila</p> <p>IV (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3064, 3033, 2925, 2853, 2156, 1709, 1626, 1583, 1487, 1273, 1197, 808. ¹H RMN (200 MHz, CDCl₃): δ = 3,88 (s, 3H); 4,14 (s, 2H); 7,30 (d, J = 8,4 Hz, 2H); 7,60 (d, J = 8,4 Hz, 2H); 7,82 (s, 1H). ¹³C RMN (50 MHz, CDCl₃): δ = 25,5; 52,9; 102,3; 124,2; 127,9; 130,8; 132,4; 132,8; 141,9; 166,8.</p>

Exemplo II – Espectro de ação dos selenocianatos

[54] As tabelas abaixo apresentam o espectro de ação dos selenocianatos alílicos frente a espécies patogênicas de fungos, detalhando brevemente suas concentrações inibitórias mínimas (em $\mu\text{g}/\text{mL}$) obtidas conforme metodologia padrão do protocolo de referência em relação aos testes de suscetibilidade (microdiluição em caldo), para fungos filamentosos e leveduriformes - *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI M38-A2, 2008; CLSI M27-S4, 2012). O espectro de ação mostra um alcance não somente de fungos superficiais (espécies de dermatófitos), mas também de micoses invasivas e de alta morbidade (espécies de *Candida* e de *Fusarium*), além de espécies relacionadas com contaminações fúngicas de alimentos.

Tabela 3. Perfil de susceptibilidade de isolados de *Fusarium* aos selenocianatos alílicos.

ISOLADO	la	lb	le	lf	lg
<i>Fusarium spp.</i> *	12,5	3,125	3,125	25	25
<i>Fusarium petroliphilum</i> *	6,25	3,125	3,125	6,25	6,25
<i>Fusarium keratoplasticum</i> *	6,25	6,25	3,125	6,25	12,5
<i>Fusarium falciforme</i>	25	6,25	6,25	25	25
<i>Fusarium xy Sporum</i> *	6,25	3,125	3,125	12,5	6,25
<i>Fusarium solani</i> *	12,5	6,25	6,25	25	12,5

*isolado multirresistente

Tabela 3. Perfil de susceptibilidade de isolados de *Fusarium* aos selenocianatos alílicos.

ISOLADO	la	lb	lc	ld	le	lf	lg
<i>Fusarium solani</i> *	12,5	3,125	50	25	3,125	12,5	12,5
<i>Fusarium solani</i> *	6,25	3,125	50	25	3,125	6,25	50
<i>Fusarium keratoplasticum</i> *	12,5	3,125	25	25	3,125	25	25
<i>Fusarium xy Sporum</i> *	6,25	3,125	50	25	3,125	6,25	6,25

*isolado multirresistente

Tabela 4. Perfil de susceptibilidade de isolados de *Candida* aos selenocianatos alílicos.

ISOLADO	la	lb	le	lf
<i>Candida albicans</i> (CA ATCC 18804)	<50	<50	<50	<50
<i>Candida krusei</i> (CK 02)	<50	<50	<50	<50
<i>Candida glabrata</i> (CG 09)	<50	<50	<50	<50
<i>Candida tropicalis</i> (CT 72A)*	<50	<50	<50	<50

*isolado multirresistente

Tabela 5. Perfil de susceptibilidade de isolados de dermatófitos aos selenocianatos alílicos.

ISOLADO	la	lb	le	lf
<i>Microsporum canis</i> (MCA 01)	<50	<50	<50	<50
<i>Microsporum gypseum</i> (MGY 42)	<50	<50	<50	<50
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (TME 16)*	<50	<50	<50	<50
<i>Trichophyton rubrum</i> (TRU 50)	<50	<50	<50	<50

*isolado multirresistente

Atividade antibiofilme

[55] A atividade antibiofilme dos selenocianatos alílicos foi avaliada através do ensaio de cristal violeta, utilizando microplacas de 96 poços. As formulações de enxaguatório bucal foram quantificadas pela amostra de resina acrílica (\log CFU cm^2) e os espécimes artificialmente contaminados foram determinados pelo ensaio em placa de 24 poços. A concentração de selenocianatos alílicos necessária para inibir completamente os biofilmes de *Candida spp.* (atividade antibiofilme) foi determinada através de ensaio de cristal violeta, como sendo $150 \mu\text{g ml}^{-1}$. Esta concentração foi utilizada para preparar formulações de enxaguatório bucal apresentando atividade antibiofilme sobre a superfície da resina acrílica. Além disso, o teste MTT foi utilizado para verificar e comparar a atividade antibiofilme do enxaguatório bucal desenvolvido de acordo com a presente invenção com a formulação de enxaguatório bucal comercialmente disponível, Listerine®.

[56] Três isolados clínicos de *C. tropicalis* (72A), *C. glabrata* (RL22), e uma cepa de *C. albicans* comercial (ATCC18804), foram usados neste teste. O isolado 72A é resistente ao Fluconazol (Cristália®, Porto Alegre, Brazil), Anfotericina B (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), Voriconazol (Sigma), e Anidulafungina (Pfizer®). Os isolados da mucosa oral ou de candidíase utilizados neste estudo foram identificados pelo cartão de identificação de levedura Vitek®.

[57] Foram preparadas três formulações de selenocinatos alílicos 1 a 3 (F1, F2 e F3) contendo: princípio ativo (0,015% de 1-3 dissolvida em DMSO), aromatizante (0,3% de essência hidroetanólica de hortelã-pimenta - Delaware, Porto Alegre, Brasil), edulcorante (0,05% de sacarina sódica (Dinamica, São Paulo), corretor de pH (0,05% de ácido láctico (Dinamica, São Paulo, Brasil), agente conservante (sorbato de potássio a 0,1%, Dinamica, São Paulo, Brasil) e água (*quantité suffisante pour* - qsp para 100 ml). Todas as formulações (F1*, F2* e F3*) foram preparadas com os mesmos componentes, porém sem sorbato de potássio. Além disso, preparou-se uma formulação apenas com os adjuvantes (FA) na mesma proporção descrita para F, e outra com os adjuvantes sem sorbato de potássio (FA*). Finalmente, preparou-se uma formulação com os adjuvantes e DMSO (2%) (FAD), e outra formulação com DMSO (2%) sem sorbato de potássio (FAD*) (Tabela 6). Listerine® foi utilizado como controle positivo (Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil, lote 0895B24). Ingredientes ativos: eucaliptol (0,092% v/v), timol (0,064% v/v), salicilato de metila (0,060% v/v), mentol

(0,042% v/v) e etanol (26,9% v/v). Ingredientes inativos: água, álcool (21,6%), solução de sorbitol, aromatizante, poloxamer 407, ácido benzóico, sacarina sódica e benzoato de sódio.

Tabela 6. Componentes e suas proporções em formulações de enxaguatório bucal.

Formulação	F1–F3	(F1–F3)*	FA	FA*	FAD	FAD*
Sacarina sódica	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Sorbato de potássio	0,1	-	0,1	-	0,1	-
Essência de hortelã-pimenta	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Ácido láctico	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
1–3	0,015	0,015	-	-	-	-
DMSO	1,5	1,5	-	-	2	2
Água	qspp.	qspp.	qspp.	qspp.	qspp.	qspp.

Todos os números são em porcentagem. * Sem sorbato de potássio. FA: formulação com adjuvantes. FAD: formulação com adjuvantes e DMSO.

Ensaio de formação de biofilme

[58] A identificação da formação de biofilme foi realizada utilizando uma placa de microtitulação de 96 poços em triplicata, com modificações. Os isolados de fungos foram cultivados em ágar Sabouraud durante 24 h a 35 °C. 20 µl de cada solução fúngica contendo 10⁶ UFC ml⁻¹ foi transferida para placas de microtitulação e suplementada com 180 µl de caldo tripton de soja (TSB). Após incubação durante 48 h a 35 °C adicionou-se água destilada estéril a cada poço para remover as células soltas. Em seguida, distribuiu-se 150 µl de metanol em cada poço e removeu-se o solvente. As placas de microtitulação foram coradas durante 15 min com 150 µl de cristal violeta (0,5%), em temperatura ambiente, e depois foram limpas com água. O biofilme adsorvido foi ressuspensão em 150 µl de etanol, e a absorção (A) foi medida após 30 min utilizando um espectrofotômetro ($\lambda = 450 \text{ nm}$). A seguinte classificação foi aplicada: um forte produtor de biofilme > 0,280 A, médio produtor de biofilme 0,170-0,279 A, fraco produtor de biofilme 0,070-0,170 A, e não produtor de biofilme <0,070 A.

[59] A produção de biofilmes nos poços de microplaca pelos isolados de *C. tropicalis* 72A e *C. glabrata* RL22 foram classificados como médios, fortes ou fracos (para o

isolado de 72A) e fortes ou fracos (para o isolado RL22), respectivamente, após 48 h a 35 °C. A cepa *C. albicans* ATCC18804 formou biofilmes fracos no mesmo período e temperatura (Tabela 7 - controle).

Ensaio de atividade de biofilme

[60] Os selenocinatos alílicos 1-3 foram adicionados às microplacas de 96 poços, em diferentes concentrações e deixados durante 48 h a 0-10 °C. Após 48 h, a solução de cada amostra foi removida da microplaca. Em seguida, transferiram-se 20 µl do inoculo recém-preparado a 10^6 UFC ml⁻¹ para as microplacas e suplementou-se com 180 µl de TSB. Após incubação durante 48 h a 35 °C, a cultura foi removida com uma pipeta multicanal sem tocar nas paredes. Em seguida, adicionou-se água destilada em cada poço estéril para enxaguar as células soltas. Depois, adicionou-se 150 µl de metanol, deixando descansar por 20 minutos, inverteu-se, deixou-se secar durante 30 minutos e corou-se com 150 µl de cristal violeta a 0,5% durante 15 minutos em temperatura ambiente. Subsequentemente, o excesso de cristal violeta foi retirado com o auxílio de uma pipeta multicanal, sem tocar nas pontas nos poços, e lavado em água corrente até lavar o corante. O corante foi suspenso com 150 µl de etanol e deixado repousar durante 30 min. Foi verificada a taxa de adesão do agente fúngico medindo a absorbância através de leituras utilizando um espectrofotômetro ($\lambda = 450$ nm) e os resultados foram quantificados.

[61] Os selenocinatos 1 e 2 inibiram parcialmente o crescimento do biofilme de *C. tropicalis* de médio para fraco e forte para médio a 150 µg ml⁻¹, respectivamente (Tabela 7, entradas 1 e 4). Entretanto, o selenocianato 3 inibiu completamente a formação de biofilme 72A na mesma concentração (Tabela 7, entrada 7).

[62] Na presença de *Candida glabrata*, o selenocianato 2 não foi capaz de modificar o perfil fenotípico do biofilme na concentração de 150 µg mL⁻¹. Ao mesmo tempo, o selenocianato 1 causou a diminuição no biofilme RL22 de forte para fraco a 150 µg mL⁻¹ e o selenocianato 3 inibiu sua formação de biofilme a 150 µg mL⁻¹ (Tabela 7, entradas 1 e 7).

[63] Não foram observadas diferenças na formação fraca de biofilme para *C. albicans* na presença do selenocinatos alílicos 1 nas concentrações testadas. No entanto, os selenocinatos 2 e 3 inibiram completamente sua formação de biofilme a 150 µg mL⁻¹ (Tabela 7, entradas 4 e 7).

Tabela 7. Inibição do biofilme de *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. albicans* na presença de três concentrações de selenocinatos 1-3 depois de 48 h a 35°C.

Cepas composto/controle

<i>Entrada</i>	<i>Composto</i>	<i>Concentrações (µg mL⁻¹)</i>	<i>C. tropicalis</i> 72^a	<i>C. glabrata</i> RL22	<i>C. albicans</i> ATCC18804
1	1	150	W/M	W/S	W/W
2		75	M/M	M/S	W/W
3		37.5	M/M	M/S	W/W
4	2	150	M/S	W/W	N/W
5		75	S/S	M/W	W/W
6		37.5	S/S	S/W	W/W
7	3	150	N/W	N/W	N/W
8		75	W/W	N/W	W/W
9		37.5	W/W	W/W	W/W

S: formação de biofilme forte. M: formação de biofilme média. W: formação de biofilme fraca. NBP: nenhuma formação de biofilme. Controle: biofilme formado sem pré-tratamento com selenocinatos 1-3.

Ensaio de formação de biofilme e avaliação da atividade antibiofilme em resina acrílica

[64] Foram preparadas peças de resina acrílica pré-estéreis (1 cm²) para o teste de formação de biofilme. As resinas acrílicas foram mantidas em 9 ml de água peptona com 1 ml de inóculo fúngico (10⁶ CFU ml⁻¹) durante 24 h a 32 °C. Em seguida, as resinas foram lavadas com água peptona para remover as células soltas. As resinas foram transferidas para outra garrafa contendo 5 ml de água e sonicadas para libertar as células de biofilme. Finalmente, foi realizada uma diluição (10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³) e uma alíquota de 20 µl de cada diluição foi plaqueada em ágar Saboraud pelo método da gota. As placas de microtitulação foram incubadas a 32 °C durante 24 h para contar as colônias e os valores de CFU cm² foram determinados em triplicata.

[65] Foi avaliada a atividade antibiofilme através do uso de resinas acrílicas estéreis (1 cm²), imergindo-as nas formulações F1-F3, F1-F3*, FA, FA*, FAD, FAD* e Listerine® durante 1 min. Em seguida, secaram-se ao ar livre (2 min) e imergiram-se em 9 ml de água peptona contendo 1 ml de inóculo (10⁶ CFU ml⁻¹, 24 h a 32 °C). Após a incubação, as amostras de resina acrílica inoculadas foram lavadas 3 vezes com água peptona para remover células soltas. As amostras lavadas foram sonicadas durante 10 min a 5 ml de água peptona para recolher o biofilme para quantificação.

Foram realizadas diluições decimais (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) e uma alíquota de 20 μ l de cada diluição foi plaqueada em ágar Sabouraud pelo método de gota. As placas de microtitulação foram incubadas a 32 °C durante 24 h e as colônias formadas foram contadas em triplicata.

[66] *C. tropicalis* (72A), *C. glabrata* (RL22) e *C. albicans* (ATCC18804) foram capazes de formar biofilmes (Tabela 8 - BF) sobre a superfície das amostras de resina acrílica (CFU cm²). 72A e RL22 produziram biofilmes maiores (5,9) que a cepa ATCC18804 (5,3).

[67] A atividade antibiofilme da formulação F1, F1*, F3 e F3* foi de 0,0 para *C. tropicalis* (Tabela 8, entradas 1, 2, 5 e 6). Além disso, a atividade antibiofilme apresentada a F1 e F2 foi 4,5, 5,0 a *C. albicans*, respectivamente. Para a formulação F2*, a atividade antibiofilme foi 5,0 e 4,5 para 72A e *C. glabrata*, correspondentemente, assim como 5,2 para *C. albicans*. Entretanto, a atividade antibiofilme de F2* foi 5,0 e 4,5 para 72A e isolados RL22. F3 demonstrou uma atividade antibiofilme de 4,9 e 4,5 para *C. glabrata* e *C. albicans*, respectivamente. F3* mostrou valores de inibição de 4,3 para a cepa ATCC18804. Com relação à inibição do biofilme, os controles FA e FA* apresentaram valores de log (CFU cm²) de 5,1 - 5,3 e 5,3 - 5,7, respectivamente (Tabela 8, entradas 7 e 8), enquanto FAD apresentou 5,5 - 5,7 e FAD* apresentou 5,3 - 5,5 (Tabela 8, entradas 9 e 10).

Tabela 8. Atividade antibiofilme das formulações contra *C. tropicalis*, *glabrata* e *albicans*.

Entry	Formulations	Antibiofilm activity log (CFU cm ⁻²)		
		Fungi strains		
		<i>C. tropicalis</i> 72 ^a	<i>C. glabrata</i> RL22	<i>C. albicans</i> ATCC 18804
1	F1	0	5,2	4,5
2	F1*	0	5,4	5,3
3	F2	5,7	5,7	5,0
4	F2*	5,0	4,5	5,2
5	F3	0	4,9	4,5
6	F3*	0	5,3	4,3
7	FA	5,1	5,3	5,3
8	FA*	5,3	5,7	5,4
9	FAD	5,5	5,5	5,3
10	FAD*	5,5	5,5	5,3
11	^a BF	5,9	5,9	5,3

^aFormação de biofilme (BF) *Sem sorbato de potássio. FA: formulação com adjuvantes. FAD: formulação com adjuvantes e 2% de DMSO. [selenocinatos alílicos 1-3]: 150 µg ml (0,015%).

Ensaio de formação de biofilme e ensaio de atividade antibiofilme em resina acrílica usando microplacas de 24 poços

[68] Utilizaram-se placas de 24 poços e os isolados foram cultivados em ágar Sabouraud durante 24 h a 32 °C. O inóculo foi preparado em meio de cultura TSB contendo uma suspensão fúngica de 10⁶ CFU ml⁻¹. 200 µl de inóculo foram adicionados a cada poço de poliestireno (placa de 24 poços) e cada resina acrílica (1 cm²) foi inserida em 1,8 ml de TSB (24 h a 35 °C). As resinas foram lavadas com água estéril para remover células soltas. Foram adicionados 150 µl de reagente colorimétrico MTT (5 mg ml⁻¹, 150 µl) em cada poço (3 h a 32 °C). Foram utilizados 150 µl de álcool isopropílico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e a absorbância foi medida (leitor de placas de microtitulação SpectraMax - Molecular Devices, Sunnyvale, CA, comprimento de onda duplo de 570-690 nm) em triplicado.

[69] Para o ensaio de atividade de antibiofilme, as resinas foram pré-tratadas com as formulações F1-F3, F1-F3*, FA, FA*, FAD, FAD* e Listerine[®] durante 1 min. Em seguida, foram realizados os mesmos processos de crescimento de biofilme e o procedimento colorimétrico MTT.

[70] As formulações F2 e F3 apresentaram diferenças estatísticas para o controle (FA) para *C. tropicalis* e *C. albicans* ($p < 0,05$) (Fig. 1-1,3). Contrariamente, F1-F3 não apresentou diferenças estatísticas para *C. glabatra* em comparação com o controle (FA) ($p > 0,05$) (Fig. 1-2).

[71] Adicionalmente, F3* (formulação sem sorbato de potássio) demonstrou atividade antibiofilme que é estatisticamente diferente em relação ao controle (FA*) para *C. tropicalis* ($p < 0,05$) (Figura 2-1). Para *C. albicans*, as formulações F1*, F2* e F3* mostraram ser estatisticamente diferentes para o controle (FA*) ($p < 0,05$) (Fig. 2-3). Por outro lado, a formulação F1* não apresentou atividade contra o isolado RL22 ($p < 0,05$) (Fig. 2-2).

[72] F2, F3 e F3* foram identificadas como as formulações mais promissoras pela amostra de resina acrílica (\log CFU cm^2) e o ensaio MTT sobre a resina acrílica. Além disso, estas formulações não apresentam adjuvantes nem substâncias interferentes. Elas foram comparadas com a capacidade antibiofilme de Listerine® contra *C. tropicalis* e *C. albicans* e mostraram-se semelhantes ($p > 0,05$) (Fig. 3, 1,2).

[73] Os resultados obtidos pelas formulações contendo sorbato de potássio (F1-F3) foram comparados com os resultados das formulações sem sorbato de potássio (F1-F3)*, assim como com os controles sem princípio ativo com e sem sorbato de potássio (FA e FA*). Os resultados de contagem de placas (CFU cm^2) e ensaio MTT indicaram que F2, F3 e F3* exibiram o mesmo nível atividade antibiofilme contra *C. tropicalis* e *C. albicans*, mostrando que o sorbato de potássio não desempenha atividade antifúngica e/ou antibiótica na formulação, a sua presença parece ser importante para as formulações aqui desenvolvidas uma vez que F2* não demonstrou ser tão potencial quanto F2 para inibir a formação de biofilme.

[74] Notou-se que a presença de DMSO nas formulações (FAD e FAD*, 1,5%). não interferiu na atividade antibiofilme. De acordo com a literatura, formulações contendo mais que 2% de DMSO não influenciam na nas células fúngicas (Rodríguez-Tudela *et al.* 2001), sendo concluído que a atividade antifúngica observada nas formulações sobre as resinas acrílicas foi devido aos selenocinatos alílicos 1-3.

[75] Como esperado a ausência dos selenocinatos alílicos 1-3 nos controles FA e FA* não resultou em formulações com propriedades antibiofilme (Tabela 8, Fig. 1 e Fig. 2), comprovando sua atividade antibiofilme.

[76] Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

Referências

Antinori S, Milazzo L, Sollima S, Galli M, Corbellino M. (2016) Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. *Eur J Intern Med* **21**, 28-34.

Basavaiah D, Reddy BS, Badsara SS. (2010) Recent contributions from the Baylis-Hillman reaction to organic chemistry. *Chem Rev* **5447**, 5674-110.

Budtz-Jorgensen E., Knudsen A.M. (1978) Chlorhexidine gel and Steradent employed in cleaning dentures. *Acta Odontol Scand* **36**, 83-7.

Casanova BB, Muniz MN, de Oliveira T, de Oliveira LF, Machado MM, Fuentefria AM, Gosmann G, Gnoatto SC. (2015) Synthesis and biological evaluation of hydrazone derivatives as antifungal agents. *Molecules* **9229**, 9241- 20(5).

Cisilotto J, Ferreira M, Filippin-Monteiro FB, Bortoluzzi AJ, Sá MM, Creczynski-Pasa TB. (2015) Isothiouonium Salts reduce NRAS expression, induce apoptosis and decrease invasion of melanoma cells. *Anticancer Agents Med Chem* **353**, 362-15.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. Approved Standard – Second Edition. CLSI document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Fourth Informational Supplement. CLSI document M27-S4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

Dalla Lana DF, Donato RK, Bündchen C, Guez CM, Bergamo VZ, de Oliveira LF, Machado MM, Schrekker HS, Fuentefria AM. (2015) Imidazolium salts with antifungal potential against multidrug-resistant dermatophytes. *J Appl Microbiol* **377**, 388-119(2).

Ferreira M, Fernandes L, Sá MM. (2009) A highly efficient and general method for the preparation of (*Z*)-allylic bromides derived from Morita-Baylis-Hillman adducts. *J Braz Chem Soc* **564**, 568-20.

Guram AS. (1993) Synthesis of Allylic Selenocyanates via Electrophilic Cyanoselenation of Allylic Silanes. *Synlett*, 259-264.

Hahnel, S., Rosentritt, M., Bürgers, R., Handel, G. and Lang, R. (2012) *Candida albicans* biofilm formation on soft denture liners and efficacy of cleaning protocols. *Gerodontology* **29**, 383-91.

Kacem N, Roumy V, Duhal N, Merouane F, Neut C, Christen P, Hostettmann K, Rhouati S. (2016) Chemical composition of the essential oil from *Algerian Genista quadriflora* Munby and determination of its antibacterial and antifungal activities. *Ind Crops Prod* **87**, 93-90.

Kulak, Y., Akiran, A. and Delibalta, N. (1994) Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *J Prosthet Dent* **72**, 283-8.

Lamfon, H., Porter, S.R., McCullough, M. and Pratten, J. (2004). Susceptibility of *Candida albicans* biofilms grown in a constant depth film fermenter to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: a longitudinal study. *J Antimicrob Chemother* **53**, 383–385.

Lazarin, A.A., Zamperini, C.A., Vergani, C.E., Wady, A.F., Giampaolo, E.T. and Machado, A.L. (2014) *Candida albicans* adherence to an acrylic resin modified by experimental photopolymerised coatings: an *in vitro* study. *Gerodontology* **31**, 25-33.

Lewis, A.L., Cumming, Z.L., Goreish, H.H., Kirkwood, L.C., Tolhurst, L.A. and Stratford, P.W. (2001) Crosslinkable coatings from phosphorylcholine-based polymers. *Biomaterials* **22**, 99-111.

Meiller, T.F., Kelley, J.I., Jabra-Rizk, M.A., Depaola, L.G., Baqui, A.A. and Falkler, W.A. (2001) *In vitro* studies of the efficacy of antimicrobials against fungi. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **91**, 663-70.

Millsap, K.W., Bos, R., van der Mei, H.C. and Busscher, H.J. (1999) Adhesion and surface-aggregation of *Candida albicans* from saliva on acrylic surfaces with adhering bacteria as studied in a parallel plate flow chamber. *Antonie Van Leeuwenhoek* **75**, 351-9.

Nogueira CW, Zeni G, Rocha JB. (2001) Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev* **6255**, 285-104.

Nogueira Filho, G.R. (2005) Racionalização do uso de enxaguatórios bucais SOBA Boletim **7**.

Pellizzaro, D., Polyzois, G., Machado, A.L., Giampaolo, E.T., Sanitá, P.V. and Vergani, C.E. (2012) Effectiveness of mechanical brushing with different denture cleansing agents in reducing *in vitro* *Candida albicans* biofilm viability. *Braz Dent J* **23**, 547-54.

Paranhos, H.F.O., Malachias, A., Pardini, L.C. (1991) Materiais para limpeza de dentaduras: revisão da literatura. *Rev Fac Odontol Lins* **4**, 15-8.

Raab, F.J., Taylor, A., Bucher, J.A. (1991) Scanning electron microscopic examination of ultrasonic and effervescent methods of surface contaminant removal from complete dentures. *J Prosthet Dent* **65**, 255-8.

Ramage, G., Jose, A., Coco, B., Rajendran, R., Rautemaa, R., Murray, C., Lappin, D.F., Bagg, J. (2011) Commercial mouthwashes are more effective than azole antifungals against *Candida albicans* biofilms *in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **111**, 456-60.

Riague EH, Guillemin J. C. (2001) Synthesis and characterization of allylic and propargylic selenols. *Organometallics* **68**, 73-21.

Ribas AD, Del Ponte EM, Dalbem AM, Dalla Lana D, Bündchen C, Donato RK, Schrekker HS, Fuentefria AM. (2016) Imidazolium salts with antifungal potential for the

control of head blight of wheat caused by *Fusarium graminearum*. *J Appl Microbiol* **445**, 452-121.

Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Díaz-Guerra TM, Mellado E. (2001) Standardization of antifungal susceptibility variables for a semiautomated methodology. *J Clin Microbiol* **39**, 2513-7.

Rosa HS, de Camargo VB, Camargo G, Garcia CV, Fuentefria AM, Mendez AS. (2015) Ecdysteroids in *Sida tuberculata* R.E. Fries (Malvaceae): chemical composition by LC-ESI-MS and selective anti-*Candida krusei* activity. *Food Chem* **193**, 199-182.

Sá MM, Fernandes L, Ferreira M, Bortoluzzi AJ. (2008) Synthesis of allylic thiocyanates and novel 1,3-thiazin-4-ones from 2-(bromomethyl)alkenoates and S-nucleophiles in aqueous medium. *Tetrahedron Lett* **1228**, 1232-49.

Sá MM, Ferreira M, Lima ES, Santos I, Orlandi PP, Fernandes L. (2014) Antimicrobial activity of allylic thiocyanates derived from the Morita-Baylis-Hillman reaction. *Braz J Microbiol* **807**, 812-45.

Silveira GP, Ferreira M, Fernandes L, Moraski GC, Cho S, Hwang C, Franzblau SG, Sá MM. (2012) Allylic thiocyanates as a new class of antitubercular agents. *Bioorg Med Chem Lett* **6486**, 6489-22.

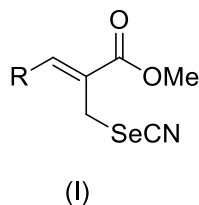
Srinivasan A, Opez-Ribot JL, Ramasubramanian AK. (2014) Overcoming antifungal resistance. *Drug Discovery Today: Technologies. Drug resistance* **11**.

Tylenda, C.A., Larsen, J., Yeh, C.K., Lane, H.C. and Fox, P.C. (1989) High levels of oral yeasts in early HIV-1 infection. *J Oral Pathol Med* **18**, 520-4.

Wilson, J. (1998) The etiology, diagnosis and management of denture stomatitis. *Br Dent J* **185**, 380-4.

Reivindicações

1. Selenocianato alílico **caracterizado** por apresentar a Fórmula geral I:



onde o substituinte R é um selecionado do grupo que consiste em: H, (C1-C6)alquila, (C1-C6)alcoxi, ciano, (C3-C7)cicloalquila, (C3-C7)heterocicloalquila, -(C1-C6)-S(O)_mR_a, -(C1-C6)-S(O)_mNR_bR_c, -(C1-C6)-NR_bR_c, -(C1-C6)-C(=O)NR_bR_c, -(C1-C6)-C(=O)R_a, S(O)_mR_a, S(O)_mNR_bR_c, NR_bR_c, C(=O)NR_bR_c, C(=O)R_a, arila ou heteroarila,

onde (C1-C6)alquila, (C3-C7)cicloalquila ou (C3-C7)heterocicloalquila é, opcionalmente, parcialmente insaturado, e

(C1-C6)alquila, (C3-C7)cicloalquila ou (C3-C7)heterocicloalquila, arila ou heteroarila é, opcionalmente, substituído com arila, ariloxi, heteroarila, heteroariloxi, hidroxí, nitro, halo, ciano, (C1-C6)alquila, (C1-C6)alcanoila, (C1-C6)alcoxicarbonila, (C1-C6)alcanoiloxi, S(O)_mR_a, S(O)_mNR_bR_c, NR_bR_c, C(=O)NR_bR_c, C(=O)R_a,

onde m é 1 ou 2, e

R_a, R_b, e R_csão, independentemente: H, (C1-C6)alquila, (C3-C7)cicloalquila, (C3-C6)heterocicloalquila, heteroarila ou arila.

2. Selenocianato alílico, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo substituinte R ser um selecionado do grupo que consiste em: fenila, 2,4-diclorofenila, 2-bromofenila, 3-metoxifenila, naftalen-2-ila, 4-tolila e 4-bromofenila.

3. Selenocianato alílico, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo substituinte R do selenocianato alílico ser um selecionado do grupo que consiste em: naftalen-2-ila, 4-tolila e 4-bromofenila.

4. Processo de obtenção de selenocianato alílico, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** por compreender a reação de:

-selenocianato de potássio e brometo alílico em uma proporção na faixa de 1:0 a 2:0; e

-solvente orgânico, selecionado do grupo que consiste em: tetraidrofurano, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, etanol, acetona aquosa (80%) ou uma mistura destes;

em que a temperatura é na faixa entre -20 °C e 30 °C; e

em que o tempo de reação é na faixa entre 5 – 60 minutos.

No Exemplo I - Preparação dos compostos, do documento "Minuta_Patente_Selenocianatos_Alílicos", nos enviado no dia 8 de fevereiro, estava descrito o processo de obtenção dos compostos como a reação de 0,3 mmol de KSeCN com 0,25 mmol de brometo alílico, sendo a divisão de 0,3 mmol por 0,25 mmol = 1,2. Com base na reivindicação 3. ítem a), que informava uma "quantidade de 1,0 a 2,0 equivalentes de selenocianato de potássio, preferencialmente 1,2 equivalentes", optamos por deixar escrito "selenocianato de potássio e brometo alílico em uma proporção na faixa de 1:0 a 2:0". Pedimos por gentileza que verifiquem se estas e outras informações referentes ao processo de obtenção dos selenocianatos alílicos estão de acordo com a presente invenção.

5. Processo de obtenção de selenocianato alílico, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** por compreender:

- selenocianato de potássio e brometo alílico na proporção de 1,2:1;
 - acetona aquosa (80%);
- em que a temperatura de reação é de 5 °C; e
em que o tempo de reação é de 15 minutos.

6. Processo de obtenção de selenocianato alílico, de acordo com a reivindicação 4 ou 5, **caracterizado** por compreender as etapas de:

- i. solubilizar o precursor em brometo alílico em acetona(80%);
- ii. manter temperatura do meio reacional em 5°C;
- iii. adicionar selenocianato de potássio ao produto obtido na etapa i, na proporção selenocianato de potássio:brometo alílico de 1,2:1;
- iv. adicionar água ao produto obtido na etapa iii;
- v. agitar o produto obtido na etapa iv por 15 minutos;
- vi. adicionar acetato de etila ao produto obtido na etapa v;
- vii. lavar fase orgânica formada na etapa vi com água e salmoura;
- viii. secar produto obtido na etapa vii com MgSO₄ anidro; e
- ix. evaporar fase orgânica obtida na etapa viii;

7. Processo de obtenção de selenocianato alílico, de acordo com a reivindicação 6 **caracterizado** por **compreender** uma etapa adicional de purificação do selenocianato alílico obtido na etapa vii em cromatografia em coluna de sílica gel

8. Uso dos selenocianatos alílicos conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado** por ser no preparo de um medicamento para o tratamento de doenças causadas por microrganismos.

9. Uso dos selenocianatos alílicos de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo microrganismo ser fungo.

10. Uso dos selenocianatos alílicos de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fungo ser do gênero *Fusarium* spp., *Microsporum* spp., *Trichophyton* spp. ou *Cândida* spp.

11. Uso dos selenocianatos alílicos de acordo com a reivindicação 10, **caracterizado** pelo fungo ser *Fusarium petrophilum*, *Fusarium keratoplasticum*, *Fusarium falciforme*, *Fusarium xyloporum*, *Fusarium solani*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* ou *Trichophyton rubrum*,

12. Uso dos selenocianatos alílicos de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fungo ser *C. tropicalis*, *C. glabrata* ou *C. albicans*.

13. Uso dos selenocianatos alílicos de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pela doença ser estomatite protética.

14. Composição de enxaguatório bucal, **caracterizada** por compreender:

- princípio ativo que consiste em selenocianato alílico conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3;

- veículo farmacologicamente aceitável.

15. Composição de enxaguatório bucal de acordo com a reivindicação 14, **caracterizada** pelo veículo farmacologicamente aceitável compreender:

- pelo menos um aromatizante;

- pelo menos um edulcorante;

- pelo menos um agente conservante.

16. Composição de enxaguatório bucal de acordo com a reivindicação 15, **caracterizada** pelo:

- princípio ativo dissolvido em DMSO, ser na faixa de 0,015% v/v;

- aromatizante ser essência hidroetanólica de hortelã-pimenta ser na faixa de 0,3% v/v;

- edulcorante ser sacarina sódica ser na faixa de 0,05% v/v;

- agente conservante ser sorbato de potássio ser na faixa de 0,1% v/v.

Resumo

SELENOCIANATO ALÍLICO, PROCESSO DE OBTENÇÃO E USOS DO MESMO E COMPOSIÇÃO DE ENXAGUATÓRIO BUCAL

A presente invenção descreve selenocianatos alílicos derivados de (Z)-2-(bromometil) alcenoatos, assim como seu processo de obtenção. Estes compostos possuem atividade antimicrobiana, mais especificamente sobre células fúngicas leveduriformes e filamentosas. Também é descrito o uso destes compostos em formulações de enxaguatórios bucais. A presente invenção se situa nos campos da química medicinal, química de compostos organocalcogênio, mais especificamente da química de compostos orgânicos contendo selênio.

FIGURAS

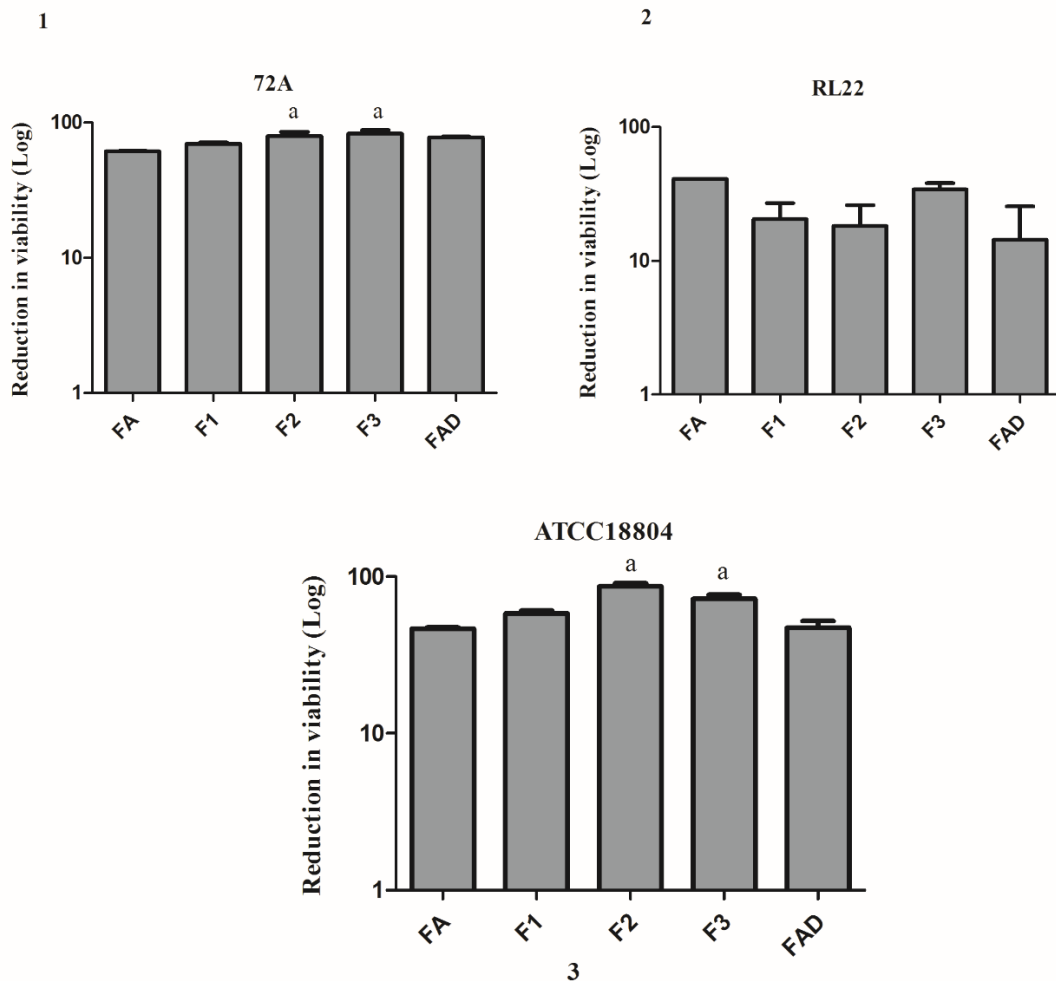


Figura 1

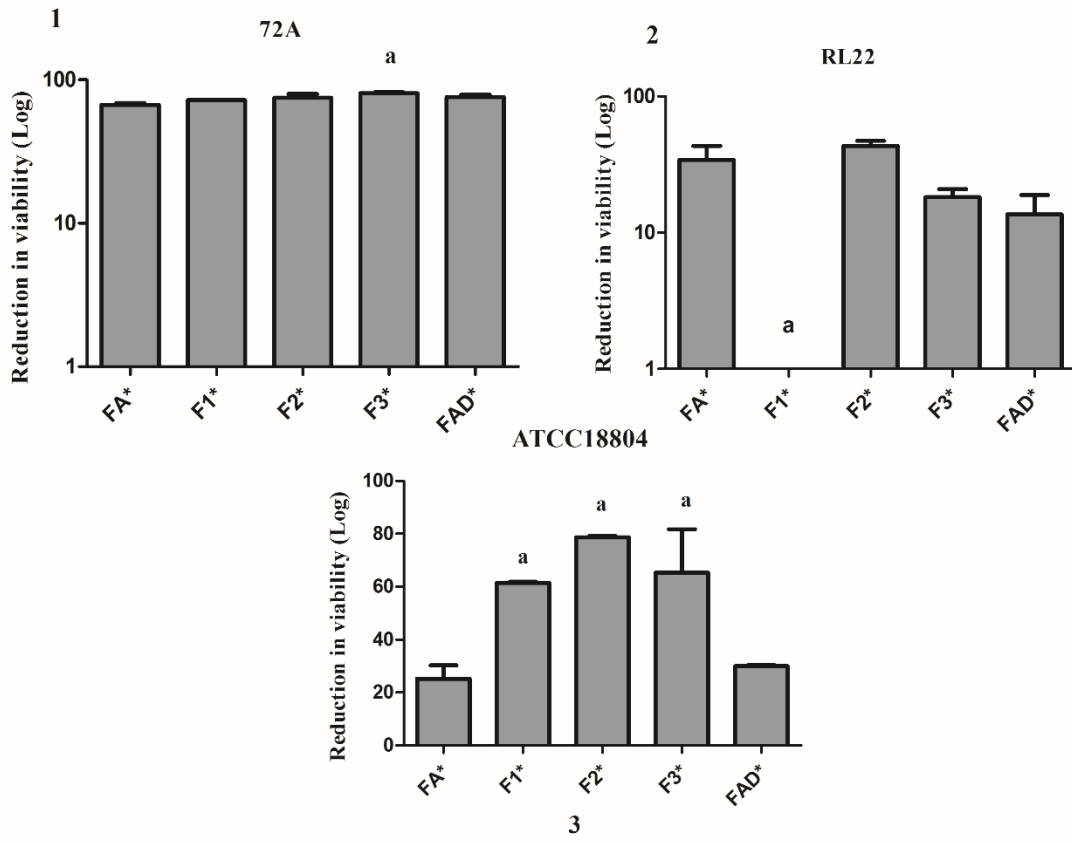


Figura 2

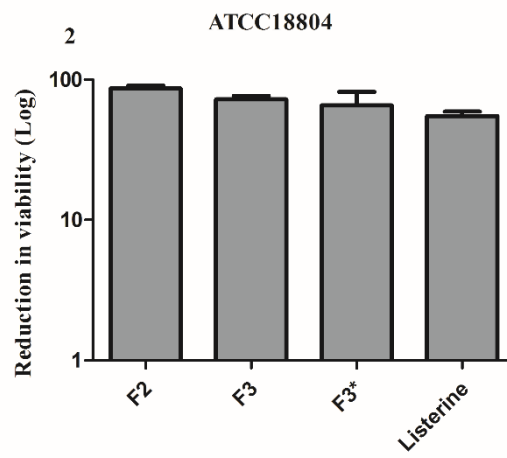
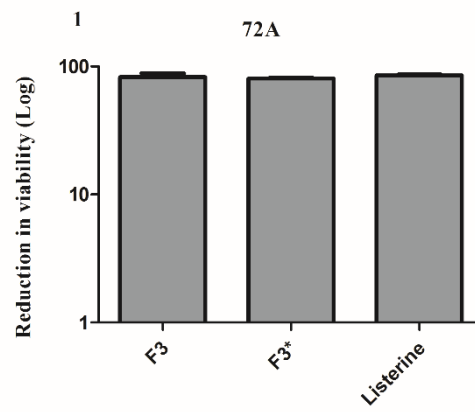


Figura 3

REFERÊNCIAS

ALANIO, A.; DESNOS-OLLIVIER, M.; GARCIA-HERMOSO, D.; BRETAGNE, S. INVESTIGATING CLINICAL ISSUES BY GENOTYPING OF MEDICALLY IMPORTANT FUNGI: WHY AND HOW? **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, V. 30, N. 3, P. 671-707, 2017.

AL-HATMI, A. M. S.; HAGEN, F.; MENKEN, S. B. J.; MEIS, J. F.; DE HOOG, G. S. GLOBAL MOLECULAR EPIDEMIOLOGY AND GENETIC DIVERSITY OF *Fusarium*, A SIGNIFICANT EMERGING GROUP OF HUMAN OPPORTUNISTS FROM 1958 TO 2015. **EMERGING MICROBES & INFECTIONS**, V.5, P. e124, 2016.

AL-HATMI, A. M.S.; BONIFAZ, A.; RANQUE, S.; DE HOOG, G. S.; VERWEI, P. E.; MEIS, J.F. CURRENT ANTIFUNGAL TREATMENT OF FUSARIOSIS. **INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS**, V. 51, N. 3, P. 326-332, 2018.

AL-HATMI, A.M.S.; MEIS, J.F.; HOOG, G.S. *Fusarium*: MOLECULAR DIVERSITY AND INTRINSIC DRUG RESISTANCE. **PLOS PATHOGENS**, V. 12, N. 4, e1005464, 2016.

ALKHAZRAJI, S.; GEBREMARIAM, T.; ALQARIHI, A.; GU, Y.; MAMOUEI, Z.; SINGH, S.; WIEDERHOLD, N. P.; SHAW, K. J.; IBRAHIM, A. S. FOSMANOGEPIX (APX001) IS EFFECTIVE IN THE TREATMENT OF IMMUNOCOMPROMISED MICE INFECTED WITH INVASIVE PULMONARY SCEDOSPORIOSIS OR DISSEMINATED FUSARIOSIS. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, V. 64, N. 3, P. E01735-19.

AL-TAMIMIA, A. S.; ETXEBESTE-MITXELTORENA, M.; SANMARTÍN, C.; JIMÉNEZ-RUIZ, A.; SYRJÄNEN, L.; PARKKILA, S.; SELLERI, S.; CARTA, F.; ANGELI, A.; SUPURAN, C. T. DISCOVERY OF NEW ORGANOSELENIUM COMPOUNDS AS ANTILEISHMANIAL AGENTS. **BIOORGANIC CHEMISTRY**, V. 86, P. 339-345, 2019.

AN, T. J.; SHIN, K. S.; PAUL, N. C.; KIM, Y. G.; CHA, S. W.; MOON, Y.; YU, S. H.; OH, S. PREVALENCE, CHARACTERIZATION, AND MYCOTOXIN PRODUCTION

ABILITY OF *Fusarium* SPECIES ON KOREAN ADLAY (COIX LACRYMAL-JOBI L.) SEEDS. **TOXINS**, V. 8, P. 310, 2016.

ARIF, S.; PERFECT, J.R. EMERGENCE OF THE MOLDS OTHER THAN ASPERGILLUS IN IMMUNOCOMPROMISED PATIENTS. **CLINICS IN CHEST MEDICINE**, V. 38, N. 3, P. 555-573, 2017.

BATISTA, B. G.; DALLA LANA, D. F.; GUSTAVO P. SILVEIRA, G. P.; SÁ, M. M.; MISAEL FERREIRA, M.; RUSSO, T. V. C.; CANTO, R. F. S.; BARBOSA, F. A. R.; BRAGA, A. L.; KAMINSKI, T. F. A.; DE OLIVEIRA, L. F. S.; MACHADO, M. M.; LOPES, W.; VAINSTEIN, M. H.; TEIXEIRA, M. L.; ANDRADE, S. F.; FUENTEFRIA, A. M. ALLYLIC SELENOCYANATES AS NEW AGENTS TO COMBAT *Fusarium* SPECIES INVOLVED WITH HUMAN INFECTIONS. **CHEMISTRYSELECT**, V.2, P. 11926–11932, 2017.

BELLMANN, R.; SMUSZKIEWICZ, P. PHARMACOKINETICS OF ANTIFUNGAL DRUGS: PRACTICAL IMPLICATIONS FOR OPTIMIZED TREATMENT OF PATIENTS. **INFECTION**, V. 45, N. 6, P. 737-779, 2017.

BISWAS, C.; SORRELL, T. C.; DJORDJEVIC, J. T.; ZUO, X.; JOLLIFFE, K. A.; CHEN, S. C. *IN VITRO* ACTIVITY OF MILTEFOSINE AS A SINGLE AGENT AND IN COMBINATION WITH VORICONAZOLE OR POSACONAZOLE AGAINST UNCOMMON FILAMENTOUS FUNGAL PATHOGENS. **JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AND CHEMOTHERAPY**, V. 68, P. 2842–2846, 2013.

CANTURK, Z. EVALUATION OF SYNERGISTIC ANTICANDIDAL AND APOPTOTIC EFFECTS OF FERULIC ACID AND CASPOFUNGIN AGAINST *Candida albicans*. **JOURNAL OF FOOD AND DRUGS ANALYSIS**, V. 26, N. 1, P. 439-443, 2018.

CASTANHEIRA, M.; DUNCANSON, F. P.; DIEKEMA, D. J.; GUARRO, J.; JONES, R. N.; PFALLER, M. A. ACTIVITIES OF E1210 AND COMPARATOR AGENTS TESTED BY CLSI AND EUCAST BROTH MICRODILUTION METHODS AGAINST *Fusarium*

AND *Scedosporium* SPECIES IDENTIFIED USING MOLECULAR METHODS. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, V. 56, P. 352–357, 2012.

CHANG, Y.; YU, S.; HEITMAN, J.; WELLINGTON, M.; CHEN, Y. NEW FACETS OF ANTIFUNGAL THERAPY. **VIRULENCE**, V. 8, N. 2, P. 222-236, 2017.

CORDOBA, S.; RODERO, L.; VIVOT, W.; ABRANTES, R.; DAVEL, G.; VITALE, R. G. *IN VITRO* INTERACTIONS OF ANTIFUNGAL AGENTS AGAINST CLINICAL ISOLATES OF *Fusarium* spp. **INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS**, V. 31, N. 2, P. 171–174, 2008.

COSTA-ORLANDI, C. B.; SARDI, J. C. O.; PITANGUI, N. S.; DE OLIVEIRA, H. C.; SCORZONI, L.; GALEANE, M. C.; MEDINA-ALARCÓN, K. P.; MELO, W. C. M. A.; MARCELINO, M. Y.; BRAZ, J. D.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. FUNGAL BIOFILMS AND POLYMICROBIAL DISEASES. **JOURNAL OF FUNGI**, V. 3, N. 2, P. 22, 2017.

ÇUHADAR, T.; KARABIÇAK, N.; ÖZDİL, T.; ÖZQÜR, D.; OTÄQ, F.; HIZEL, K.; KALKANCI, A. DETECTION OF VIRULENCE FACTORS AND ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITIES OF *Fusarium* STRAINS ISOLATED FROM KERATITIS CASES. **MIKROBIYOLOGI BULTENI**, V.52, N. 3, P. 247-258, 2018.

DA ROSA, P. D.; NUNES, A.; BORGES, R.; BATISTA, B.; FUENTEFRIA, A. M.; GOLDANI, L. Z. *IN VITRO* SUSCEPTIBILITY AND MULTILOCUS SEQUENCE TYPING OF *Fusarium* ISOLATES CAUSING KERATITIS. **JOURNAL DE MYCOLOGIE MÉDICALE**, V. 28, N. 3, P. 482-485, 2018.

DABAS, Y.; BAKHSHI, S.; XESS, I. FATAL CASES OF BLOODSTREAM INFECTION BY *Fusarium solani* AND REVIEW OF PUBLISHED LITERATURE. **MYCOPATHOLOGY**, V. 181, N. 3-4, P. 291-296, 2016.

DANIELESCU, C.; CANTEMIR, A.; CHISELITA, D. SUCCESSFUL TREATMENT OF FUNGAL ENDOPHTHALMITIS USING INTRAVITREAL CASPOFUNGIN. **ARQUIVOS BRASILEIROS DE OFTALMOLOGIA**, V. 80, N.3, P.196-198, 2017.

DAVOUDI, S.; KUMAR, V. A.; JIANG, Y.; KUPFERMAN, M.; KONTOYIANNIS, D. P. INVASIVE MOULD SINUSITIS IN PATIENTS WITH HAEMATOLOGICAL MALIGNANCIES: A 10 YEAR SINGLE-CENTRE STUDY. **JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY**, V. 70, N. 10, P. 2899-2905, 2015.

DEBOURGOGNE, A.; DORIN, J.; MACHOUART, M. EMERGING INFECTIONS DUE TO FILAMENTOUS FUNGI IN HUMANS AND ANIMALS: ONLY THE TIP OF THE ICEBERG? **ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY REPORTS**, V. 8, N. 3, P. 32-342, 2016.

DEEPAK, R.; JAYAPRADHA, R. LIPOPEPTIDE BIOSURFACTANT FROM *Bacillus thuringiensis* PAK2310: A POTENTIAL ANTAGONIST AGAINST *Fusarium oxysporum*. **JOURNAL DE MYCOLOGIE MÉDICALE**, V. 25, P. e15—e24, 2015.

FERNÁNDEZ-RUBIO, C.; LARREA, E.; GUERRERO, J. P.; HERRERO, E. S.; GAMBOA, I.; BERRIO, C.; PLANO, D.; AMIN, S.; SHARMA, A. K.; NGUEWA, P. A. LEISHMANICIDAL ACTIVITY OF ISOSELENOCYANATE DERIVATIVES. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, V. 63, N. 2, P. E00904-18, 2019.

FRAC, M.; GRYTA, A.; OSZUST, K.; KOTOWICZ, N. FAST AND ACCURATE MICROPLATE METHOD (BIOLOG MT2) FOR DETECTION OF *Fusarium* FUNGICIDES RESISTANCE/SENSITIVITY. **FRONTIERS IN MICROBIOLOGY**, V. 7, 2016.

FURLANETTO, R. L.; ANDREO, E. G. V.; FINOTTI, L. G. A.; ARCIERI, E. S.; FERREIRA, M. A.; ROCHA, F. J. EPIDEMIOLOGY AND ETIOLOGIC DIAGNOSIS OF INFECTIOUS KERATITIS IN UBERLANDIA, BRAZIL. **EUROPEAN JOURNAL OF OPHTHALMOLOGY**, V. 20, N. 3, P. 498-503, 2018.

GIACOMAZZI, J.; BAETHGEN, L.; CARNEIRO, L. C.; MILLINGTON, M. A. DENNING, D. W.; ARNALDO L.; COLOMBO, A. L.; PASQUALOTTO, A. P. THE BURDEN OF SERIOUS HUMAN FUNGAL INFECTIONS IN BRAZIL. **MYCOSES**, V. 59, P. 145-150, 2016.

GUARRO, J. FUSARIOSIS, A COMPLEX INFECTION CAUSED BY A HIGH DIVERSITY OF FUNGAL SPECIES REFRACTORY TO TREATMENT. **EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY & INFECTIOUS DISEASES**, V. 32, N. 12, P. 1491-1500, 2013.

GULARTE, M. S.; ANGHINONI, J. M.; ABENANTE, L.; VOSS, G. T.; DE OLIVEIRA, R. L.; VAUCHER, R. A.; LUCHESE, C.; WILHELM, E. A.; LENARDÃO, E. J.; FAJARDO, A. R. SYNTHESIS OF CHITOSAN DERIVATIVES WITH ORGANOSELENIUM AND ORGANOSULFUR COMPOUNDS: CHARACTERIZATION, ANTIMICROBIAL PROPERTIES AND APPLICATION AS BIOMATERIALS. **CARBOHYDRATE POLYMERS**, V. 219, N. 1, P. 240-250, 2019.

HADRICH, I.; AYADI, A. EPIDEMIOLOGY OF ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY: REVIEW OF LITERATURE. **JOURNAL DE MYCOLOGIE MÉDICALE**, V. 28, N. 3, P. 574-584, 2018.

HADRICH, I; AYADI, A. EPIDEMIOLOGY OF ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY: REVIEW OF LITERATURE. **JOURNAL DE MYCOLOGIE MÉDICALE**, V. 28, N. 3, P. 574-584, 2018.

HSU, L.; WANG, H, F.; SUN, P.; HU, F.; CHEN, Y. THE ANTIBIOTIC POLYMYXIN B EXHIBITS NOVEL ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST *Fusarium* SPECIES. **INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS**, V. 49, N. 6, P. 740-748, 2017.

IBRAHIM, M. M.; VANINI, R.; IBRAHIM, F. M.; FIORITI, L. S.; FURLAN, E. M. R.; PROVINZANO, L. M. A.; DE CASTRO, R. S.; DE FARIA E SOUSA, S.J.; ROCHA, E.M. EPIDEMIOLOGIC ASPECTS AND CLINICAL OUTCOME OF FUNGAL

KERATITIS IN SOUTHEASTERN BRAZIL. **EUROPEAN JOURNAL OF OPHTHALMOLOGY**, V. 19, N. 3, P. 355-361, 2009.

IBRAHIM, M. M.; VANINI, R.; IBRAHIM, F. M.; MARTINS, W. P.; CARVALHO, R. T. C.; DE CASTRO, R. S.; ROCHA, E. M. EPIDEMIOLOGY AND MEDICAL PREDICTION OF MICROBIAL KERATITIS IN SOUTHEAST BRAZIL. **ARQUIVOS BRASILEIROS DE OFTALMOLOGIA**, V. 74, N. 1, P. 7-12, 2011.

İRIS, N. E.; GÜVENÇ, S.; ÖZÇELİK, T.; DEMIREL, A.; KOÇULU, S.; ESİN ÇEVİK, E.; ARAT, M. SUCCESSFUL TREATMENT OF DISSEMINATED FUSARIOSIS WITH THE COMBINATION OF VORICONAZOLE AND LIPOSOMAL AMPHOTERICIN B. **TURKISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY**, V. 33, N. 4, P. 363-364, 2016.

JENSEN, T. G.; GARHN-HANSEN, B.; ARENDRUP, M.; BRUUN, B. *Fusarium* FUNGAEMIA IN IMMUNOCOMPROMISED PATIENTS. **CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTION**, V. 10, N. 6, P. 499-501, 2004.

JORGENSEN, K. M.; ASTVAD, K. M. T.; HARE, R. K.; ARENDRUP, M. C. EUCAST DETERMINATION OF OLOROFIM (F901318) SUSCEPTIBILITY OF MOLD SPECIES, METHOD VALIDATION, AND MICS. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, V. 62, P.E00487-18, 2018.

KADRI, S. S.; REMY, K. E.; STRICH, J. R.; GEA-BANACLOCHE, J.; LEITMAN, S. F. ROLE OF GRANULOCYTE TRANSFUSIONS IN INVASIVE FUSARIOSIS: SYSTEMATIC REVIEW AND SINGLE CENTER EXPERIENCE. **TRANSFUSION**, V.55, N. 9, P. 2076- 2085, 2016.

KARABURUN, A. C.; ÇEVİK, A. U.; OSMANIYE, D.; SAQLIK, B. N.; ÇAVUSOQLU, B.; LEVENT, S.; ÖZKAY, Y.; KOPARAL, A. S.; BEHÇET, M.; KAPLANCIKLI, Z. A. SYNTHESIS AND EVALUATION OF NEW 1,3,4-THIADIAZOLE DERIVATIVES AS POTENT ANTIFUNGAL AGENTS. **MOLECULES**, V. 23, N. 12, P. e3129, 2018.

KEÇELI, S. A.; WILLKE, A.; TAMER, G. S.; BORAL, O. B.; SONMEZ, N.; CAGATAY, P. INTERACTION BETWEEN CASPOFUNGIN OR VORICONAZOLE AND CEFOPERAZONE-SULBACTAM OR PIPERACILLIN-TAZOBACTAM BY *IN VITRO* AND *IN VIVO* METHODS. **APMIS**, V. 122, N. 5, P. 412-417, 2014.

KREDICS, L.; NARENDRAN, V.; SHOBANA, C. S.; VÁGVÖLGYI, C.; MANIKANDAN, P. FILAMENTOUS FUNGAL INFECTIONS OF THE CORNEA: A GLOBAL OVERVIEW OF EPIDEMIOLOGY AND DRUG SENSITIVITY. **MYCOSES**, V. 58, N. 4, P. 243-260, 2015.

LAMOTH, F.; DIMITRIOS P. KONTOYIANNIS, D. P. THERAPEUTIC CHALLENGES OF NON-ASPERGILLUS INVASIVE MOLD INFECTIONS IN IMMUNOSUPPRESSED PATIENTS. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, V. 63, N. 11, P. 1244-19, 2019.

LASS-FLÖRL, C.; CUENCA-ESTRELLA, M. CHANGES IN THE EPIDEMIOLOGICAL LANDSCAPE OF INVASIVE MOULD INFECTIONS AND DISEASE. **JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY**, V. 72, N. 1, P. 5-11, 2017.

LIONAKIS, M. S.; CHAMILOS, G.; LEWIS, R. E.; WIEDERHOLD, N. P.; RAAD, I. I.; SAMONIS, G.; KONTOYIANNIS, D. P. PENTAMIDINE IS ACTIVE IN A NEUTROPENIC MURINE MODEL OF ACUTE INVASIVE PULMONARY FUSARIOSIS. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, V. 50, N. 1, P. 294–297, 2006.

LIONAKIS, M. S.; LEWIS, R. E.; SAMONIS, G.; KONTOYIANNIS, D. P. PENTAMIDINE IS ACTIVE *IN VITRO* AGAINST *Fusarium* SPECIES. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, V. 47, N.10, P. 3252–3259, 2003

MAHMOUDI, S.; MASOOMI, A.; AHMADIKIA, K.; TABATABAEI, S. A.; SOLEIMANI, S.; REZAIIE, S.; GHAVECHIAN, H.; BANAFSHEAFSHAN, A. FUNGAL KERATITIS:

AN OVERVIEW OF CLINICAL AND LABORATORY ASPECTS. **MYCOSES**, V. 61, N. 12, P. 916-930, 2018.

MCCARTHY, M. W.; KATRAGKOU, A.; IOSIFIDIS, E.; ROILIDES, E.; THOMAS J. WALSH, T. J. RECENT ADVANCES IN THE TREATMENT OF SCEDOSPORIOSIS AND FUSARIOSIS. **JOURNAL OF FUNGI**, V. 4, N. 2, P. 73, 2018.

MCCARTHY, M. W.; KATRAGKOU, A.; IOSIFIDIS, E.; ROILIDES, E.; WALSH, T. J. RECENT ADVANCES IN THE TREATMENT OF SCEDOSPORIOSIS AND FUSARIOSIS. **JOURNAL OF FUNGI**, V. 4, N. 2, P. 73, 2018.

MCCARTHY, M. W.; KONTOYIANNIS, D. P.; CORNELLY, O. A.; PERFECT, J. R.; WALSH, T. J. NOVEL AGENTS AND DRUG TARGETS TO MEET THE CHALLENGES OF RESISTANT FUNGI. **JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASE**, V. 216, N. 3, P. 474-83, 2017.

METWALLY, N. H.; RADWAN, I. T.; EL-SERWY, W. S.; MOHAMED, M. A. DESIGN, SYNTHESIS, DNA ASSESSMENT AND MOLECULAR DOCKING STUDY OF NOVEL 2-(PYRIDIN-2-YLIMINO)THIAZOLIDIN-4-ONE DERIVATIVES AS POTENT ANTIFUNGAL AGENTS. **BIOORGANIC CHEMISTRY**, V. 84, P. 456-467, 2018.

MORETTI, M. L.; BUSO-LOPES, A. F.; TARARAM, C. A.; MORAES, R.; MURAOSA, Y.; MIKAMI, Y.; GONOI, T.; TAGUCHI, H.; LYRA, L.; REICHERT-LIMA, F.; TRABASSO, P.; DE HOOG, G. S.; AL-HATMI, A. M. S.; SCHREIBER, A. Z.; KAME, K. AIRBORNE TRANSMISSION OF INVASIVE FUSARIOSIS IN PATIENTS WITH HEMATOLOGIC MALIGNANCIES. **PLOS ONE**, V. 13, e0196426, 2018.

MURAOSA, Y.; OGUCHI, M.; YAHIRO, M.; WATANABE, A.; YAGUCHI, T.; KAMEI, K. EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF *Fusarium* SPECIES CAUSING INVASIVE AND SUPERFICIAL FUSARIOSIS IN JAPAN. **MEDICAL MYCOLOGY JOURNAL**, V. 58, N. 1, P. 5-13, 2017.

NAMBIAR, P.; COBER, E.; JOHNSON, L.; BRIZENDINE, K. D. FATAL *Fusarium* INFECTION MANIFESTING AS OSTEOMYELITIS FOLLOWING PREVIOUS TREATMENT WITH AMPHOTERICIN B IN A MULTI-VISCERAL TRANSPLANT: CASE REPORT AND REVIEW OF *Fusarium* INFECTIONS IN SOLID ORGAN TRANSPLANTATION. **TRANSPLANT INFECTIOUS DISEASE**, V. 20, N. 3, P. e12872, 2018.

NETT, J. E.; ANDES, D. FUNGAL BIOFILMS: *IN VIVO* MODELS FOR DISCOVERY OF ANTI-BIOFILM DRUGS. **MICROBIOLOGY SPECTRUM**, V. 3, N. 3, P. e30, 2015.

NUCCI, M.; ANAISSIE, E. *Fusarium* INFECTIONS IN IMMUNOCOMPROMISED PATIENTS. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, V. 20, N. 4, P. 695-704, 2007.

NUCCI, M.; MARR, K. A.; VEHRESCHILD, M. J. G. T.; DE SOUZA, C. A.; VELASCO, E.; CAPPELLANO, P. et. al. IMPROVEMENT IN THE OUTCOME OF INVASIVE FUSARIOSIS IN THE LAST DECADE. **CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTION**, V. 20, N. 6, P. 580–585, 2014.

NUCCI, M.; VARON, A. G.; GARNICA, M.; AKITI, T.; BARREIROS, G.; TROPE, B. M.; NOUÉR, S. A. INCREASED INCIDENCE OF INVASIVE FUSARIOSIS WITH CUTANEOUS PORTAL OF ENTRY, BRAZIL. **EMERGING INFECTIOUS DISEASES**, V. 19, N. 10, P. 1567-1572, 2013.

PANDIN, C.; COQ, D. L.; CANETTE, A.; AYMERICH, S.; BRIANDET, R. SHOULD THE BIOFILM MODE OF LIFE BE TAKEN INTO CONSIDERATION FOR MICROBIAL BIOCONTROL AGENTS? **MICROBIAL BIOTECHNOLOGY**, V. 10, N. 4, P. 719-734, 2017.

PEIQIAN, L.; XIAOMING, P.; HUIFANG, S.; JINGXIN, Z.; NING, H.; BIRUN, L. BIOFILM FORMATION BY *FUSARIUM OXYSPORUM F. SPP.* CUCUMERINUM AND SUSCEPTIBILITY TO ENVIRONMENTAL STRESS. **FEMS MICROBIOLOGY LETTERS**, V. 350, N. 2, P. 138-145, 2014.

PFALLER, M. A.; WATANABE, N.; CASTANHEIRA, M.; MESSER, S. A.; JONES, R. N. PRE-CLINICAL DEVELOPMENT OF ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY TEST METHODS FOR THE TESTING OF THE NOVEL ANTIFUNGAL AGENT E1210 VERSUS *Candida*: COMPARISON OF CLSI AND EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING METHODS. **JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AND CHEMOTHERAPY**, V. 66, N. 11, P. 2581-4, 2011.

POESTER, V. R.; MATTEI, A. S.; MENDES, J. F.; KLAFKE, G. B.; RAMIS, I. B.; SANCHOTENE, K. O.; XAVIER, M. O. ANTIFUNGAL ACTIVITY OF DIPHENYL DISELENIDE ALONE AND IN COMBINATION WITH ITRACONAZOLE AGAINST *Sporothrix brasiliensis*. **MEDICAL MYCOLOGY**, V. 57, N. 3, P. 328–331, 2019.

PROENÇA-PINA, J.; KAI, I. S. Y.; BOURCIER, T.; FABRE, M.; OFFRET, H.; LABETOULLE, M. *FUSARIUM* KERATITIS AND ENDOPHTHALMITIS ASSOCIATED WITH LENS CONTACT WEAR. **INTERNATIONAL OPHTHALMOLOGY**, V. 30, N. 1, P. 103-107, 2010.

QUATRIN, P. M.; DALLA LANA, D. F.; BAZANA, L. C.; OLIVEIRA, L. F. S.; TEIXEIRA, M. L.; SILVA, E. E.; LOPES, W.; CANTO, R. F. S.; SILVEIRA, G. P.; FUENTEFRIA, A. M. 3-SELENOCYANATE-INDOLES AS NEW AGENTS FOR THE TREATMENT OF SUPERFICIAL AND MUCOCUTANEOUS INFECTIONS. **NEW JOURNAL OF CHEMISTRY**, V. 43, P. 926-933, 2019.

RANI, N.; SINGH, R. MOLECULAR MODELING STUDIES OF 1,4-DIARYL-2-MERCAPTOIMIDAZOLE DERIVATIVES FOR ANTIMICROBIAL POTENCY. **CURRENT COMPUTER-AIDED DRUG DESIGN**, 2018 [Epub ahead of print].

RIVERO-MENENDEZ, O.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. *IN VITRO* ACTIVITY OF APX001A AGAINST RARE MOULDS USING EUCAST AND CLSI METHODOLOGIES. **JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AND CHEMOTHERAPY**, V. 74, P.1295–1299, 2019.

ROMANO, C.; CAPOSCIUTTI, P.; GHILARDI, A.; MIRACCO, C.; FIMIANI, M. A CASE OF PRIMARY LOCALIZED CUTANEOUS INFECTION DUE TO *Fusarium oxysporum*. **MYCOPATHOLOGIA**, V. 170, N. 1, P. 39-46, 2010.

SADAVA, D. *ET AL.* VIDA: A CIÊNCIA DA BIOLOGIA, VOLUME II EVOLUÇÃO, DIVERSIDADE E ECOLOGIA. **8. ED. PORTO ALEGRE: ARTMED, 2009.**

SANTOS, C. S.; GOMES, A. M. T.; SOUZA, F. S.; MARQUES, S. C.; LOBO, M. P.; DE OLIVEIRA, D. C. SOCIAL REPRESENTATIONS OF HEALTH PROFESSIONALS ON NEGLIGENCED DISEASES. **ESCOLA ANNA NERY**, V. 21, N. 1, P. e20170016, 2017.

SAV, H.; OZDEMIR, H. G.; ALTINBAS, R.; KIRAZ, N.; ILKIT, M.; SEYEDMOUSAVI, S. VIRULENCE ATTRIBUTES AND ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY PROFILE OF OPPORTUNISTIC FUNGI ISOLATED FROM OPHTHALMIC INFECTIONS. **MYCOPATOLOGIA**, V. 181, N. 9, P. 653-661, 2016.

SAV, H.; RAFATI, H.; ÖZ, Y.; DALYAN-CILO, B.; ENER, B.; MOHAMMADI, F.; ILKIT, M.; VAN DIEPENINGEN, A. D.; SEYEDMOUSAVI, S. BIOFILM FORMATION AND RESISTANCE TO FUNGICIDES IN CLINICALLY RELEVANT MEMBERS OF THE FUNGAL GENUS *Fusarium*. **JOURNAL OF FUNGUS**, V. 4, N. 1, P. 16, 2018.

SHI, W.; TAN, Y.; WANG, S.; GARDINER, D. M.; DE SAEGER, S.; LIAO, Y.; WANG, C.; FAN, Y.; WANG, Z.; WU, A. MYCOTOXIGENIC POTENTIALS OF *FUSARIUM* SPECIES IN VARIOUS CULTURE MATRICES REVEALED BY MYCOTOXIN PROFILING. **TOXINS**, V. 9, P. 6, 2017.

SPADER, T. B.; VENTURINI, T. P.; CAVALHEIRO, A. S.; MAHL, C. D.; MARIO, D. N.; LARA, V. M.; SANTURIO, J.; ALVES, S. H. *IN VITRO* INTERACTIONS BETWEEN AMPHOTERICIN B AND OTHER ANTIFUNGAL AGENTS AND RIFAMPIN AGAINST *Fusarium* spp. **MYCOSES**, V. 54, P.131–136, 2011.

SRADHANJALI, S.; YEIN, B.; SHARMA, S.; DAS, S. IN VITRO SYNERGY OF NATAMYCIN AND VORICONAZOLE AGAINST CLINICAL ISOLATES OF *Fusarium*, *Candida*, *Aspergillus* AND *Curvularia* spp.. **BRITISH JOURNAL OF OPHTHALMOLOGY**, V. 102, P. 142–145, 2018.

TAHLAN, S.; RAMASAMY, K.; LIM, S. M.; SHAH, S. A. A.; MANI, V.; NARASIMHAN, B. DESIGN, SYNTHESIS AND THERAPEUTIC POTENTIAL OF 3-(2-(1H-BENZO[D]IMIDAZOL-2-YLTHIO)ACETAMIDO)-N-(SUBSTITUTED PHENYL)BENZAMIDE ANALOGUES. **CHEMISTRY CENTRAL JOURNAL**, V.12, N. 1, P. 139, 2018.

TAJ-ALDEEN, S. J. REDUCED MULTIDRUG SUSCEPTIBILITY PROFILE IS A COMMON FEATURE OF OPPORTUNISTIC *Fusarium* SPECIES: *Fusarium* MULTI-DRUG RESISTANT PATTERN. **JOURNAL OF FUNGI**, V. 3, N. 2, P. 18, 2017.

THANGAMANI, S.; ELDESOUKY, H. E.; MOHAMMAD, H.; PASCUZZI, P. L.; AVRAMOVA, L.; HAZBUN, T. R.; SELEEM, M. N. EBSELEN EXERTS ANTIFUNGAL ACTIVITY BY REGULATING GLUTATHIONE (GSH) AND REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS) PRODUCTION IN FUNGAL CELLS. **BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) - GENERAL SUBJECTS**, V. 1861, N. 1, P. 3002-3010, 2017.

TIGHADOUINI, S.; BENABBES, R.; TILLARD, M.; EDDIKE, D.; HABOUBI, K.; KARROUCHI, K.; RADI, S. SYNTHESIS, CRYSTAL STRUCTURE, DFT STUDIES AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF (Z)-3-(3-BROMOPHENYL)-1-(1,5 DIMETHYL-1H-PYRAZOL-3-YL)-3-HYDROXYPROP-2-EN-1-ONE. **CHEMISTRY CENTRAL JOURNAL**, V. 12, N. 1, P. 122, 2018.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. MICROBIOLOGIA. **12. ED. PORTO ALEGRE: ARTMED, 2017.**

TUPAKI-SREEPURNA, A.; KINDO, A. J. *Fusarium*: THE VERSATILE PATHOGEN. **INDIAN JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY**, V. 36, N. 1, P. 8-17, 2018.

TUPAKI-SREEPURNA, A.; KINDO, A. J. *Fusarium*: THE VERSATILE PATHOGEN. **INDIAN JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY**, V. 36, N. 1, P. 8-17, 2018.

VAN DIEPENINGEN, A. D.; AL-HATMI, A. M. S.; BRANKOVICS, B.; DE HOOG, G.S. TAXONOMY AND CLINICAL SPECTRA OF *Fusarium* SPECIES: WHERE DO WE STAND IN 2014? **CURRENT CLINICAL MICROBIOLOGY REPORTS**, V. 1, N. 1, P. 10-18, 2014.

VAN DIEPENINGEN, A. D.; BRANKOVICS, B.; ILTES, J.; VAN DER LEE, T. A. J.; WAALWIJK, C. DIAGNOSIS OF *Fusarium* INFECTIONS: APPROACHES TO IDENTIFICATION BY THE CLINICAL MYCOLOGY LABORATORY. **CURRENT FUNGAL INFECTION REPORTS**, V. 9, P. 135-143, 2015.

VENTURINI, T. P.; AL-HATMI, A. M. S.; ROSSATO, L.; AZEVEDO, M. I.; KELLER, J. T.; WEIBLEN, C.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. DO ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL COMBINATIONS HAVE BETTER ACTIVITY AGAINST CLINICALLY RELEVANT *Fusarium* SPECIES? *IN VITRO* SYNERGISM. **INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS**, V. 51, N. 5, P. 784-788, 2018.

VENTURINI, T. P.; CHASSOT, F.; LORETO, E. S.; KELLER, J. T.; AZEVEDO, M. I.; ZENI, G.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF DIPHENYL DISELENIDE AND EBSELEN ALONE AND IN COMBINATION WITH ANTIFUNGAL AGENTS AGAINST *Fusarium* spp. **MEDICAL MYCOLOGY**, V. 54, N. 5, P. 550-555, 2016.

VINH, D.; YIM, M.; DUTTA, A.; JONES, J. K.; ZHANG, W.; SITTON, M. PEDIATRIC INVASIVE FUNGAL RHINOSINUSITIS: AN INVESTIGATION OF 17 PATIENTS. **INTERNATIONAL JOURNAL OF PEDIATRIC OTORHINOLARYNGOLOGY**, V. 99, P. 111-116, 2017.

WALTHER, G.; STASCH, S.; KAEGER, K.; HAMPRECHT, A.; ROTH, M.; CORNELY, O. A.; GEERLING, G.; MACKENZIE, C. R.; KURZAI, O.; VON LILIENFELD-TOAL, M.

Fusarium KERATITIS IN GERMANY. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, V. 55, N. 10, P. 2983-2995, 2017.

WANG, X.; FU, X.; YAN, J.; WANG, A.; WANG, M.; CHEN, M.; YANG, C.; SONG, Y. DESIGN AND SYNTHESIS OF NOVEL 2-(6-THIOXO-1,3,5-THIADIAZINAN-3-YL)-N'-PHENYLACETHYDRAZIDE DERIVATIVES AS POTENTIAL FUNGICIDES. **MOLECULAR DIVERSITY**, P. 1-11, 2018.

WATANABE, N. A.; MIYAZAKI, M.; HORII, T.; SAGANE, K.; TSUKAHARA, K.; HATA, K. E1210, A NEW BROAD-SPECTRUM ANTIFUNGAL, SUPPRESSES *Candida albicans* HYPHAL GROWTH THROUGH INHIBITION OF GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL BIOSYNTHESIS. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, V. 56, N. 2, P. 960-71, 2012.

WEI, Y.; PENG, W.; WANG, D.; HAO, S.; LI, W.; DING, F. DESIGN, SYNTHESIS, ANTIFUNGAL ACTIVITY, AND 3D-QSAR OF COUMARIN DERIVATIVES. **JOURNAL OF PESTICIDE SCIENCE**, V. 43, N. 2, P. 88-95, 2018.

WIEDERHOLD, N. P.; LAW, D.; BIRCH, M. DIHYDROOROTATE DEHYDROGENASE INHIBITOR F901318 HAS POTENT *IN VITRO* ACTIVITY AGAINST *Scedosporium* SPECIES AND *Lomentospora prolificans*. **JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AND CHEMOTHERAPY**, V. 72, P. 1977–1980, 2017.

WIEDERHOLD, N. P.; NAJVAR, L.K.; FOTHERGILL, A. W.; MCCARTHY, D. I.; BOCANEGRA, R.; OLIVO, M.; KIRKPATRICK, W. R.; EVERSON, M. P.; DUNCANSON, F. P.; PATTERSON, T. F. THE INVESTIGATIONAL AGENT E1210 IS EFFECTIVE IN TREATMENT OF EXPERIMENTAL INVASIVE CANDIDIASIS CAUSED BY RESISTANT *Candida albicans*. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, V. 59, N. 1, P. 690-2, 2015.

ZHANG, M.; SU, X.; SUM, W. K.; CHEN, F.; XU, X. Y.; SHI, Y. EFFICACY OF THE COMBINATION OF VORICONAZOLE AND CASPOFUNGIN IN EXPERIMENTAL

PULMONARY ASPERGILLOSIS BY DIFFERENT *Aspergillus* SPECIES. **MYCOPATHOLOGIA**, V. 177, P. 11-18, 2014.

ZHU, Z.; ZHANG, H.; YUE, J.; LIU, S.; LI, Z.; WANG, L. ANTIMICROBIAL EFFICACY OF CORNEAL CROSS-LINKING *IN VITRO* AND *IN VIVO* FOR *Fusarium solani*: A POTENTIAL NEW TREATMENT FOR FUNGAL KERATITIS. **BMC OPHTHALMOLOGY**, V. 18, P. 65-74, 2018.