

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE – UFF

LAIS CAVALCANTI DOS SANTOS VELASCO DE SOUZA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE DERIVADOS SINTÉTICOS
FRENTE A CEPAS PADRÃO ATCC DO GÊNERO *CANDIDA*

Niterói

2016

LAIS CAVALCANTI DOS SANTOS VELASCO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE DERIVADOS SINTÉTICOS
FRENTE A CEPAS PADRÃO ATCC DO GÊNERO *CANDIDA***

Dissertação apresentada ao programa de Pós
Graduação em Patologia da Universidade
Federal Fluminense, como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre.

Área de concentração: Patologia Geral

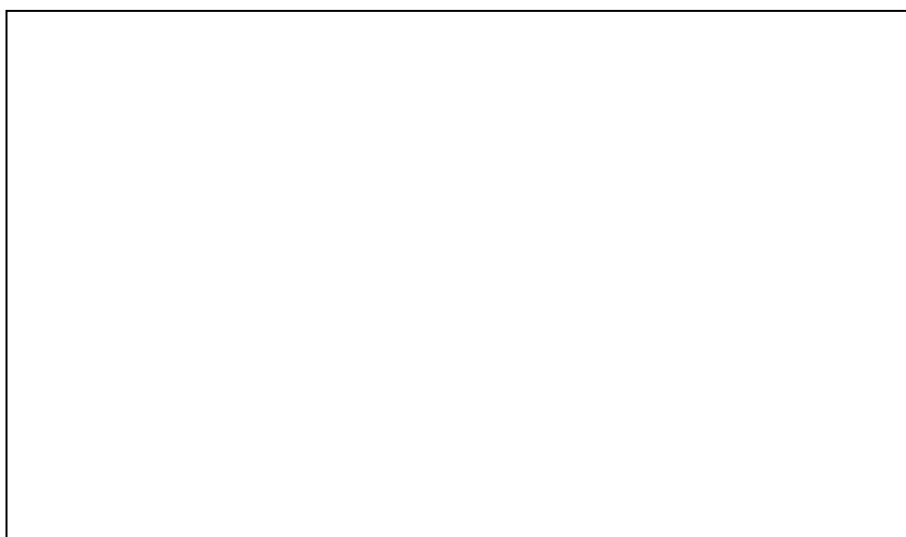
Orientadora: Dra. Helena Carla Castro

**Co-orientadores: Dr. Bruno Leal Alves Ferreira e Dra. Andrea Regina de Souza
Baptista**

Niterói

2016

Ficha Catalográfica

A large, empty rectangular box with a thin black border, positioned in the lower right quadrant of the page. It is intended for a catalog card or a drawing.

LAIS CAVALCANTI DOS SANTOS VELASCO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE DERIVADOS SINTÉTICOS
FRENTE A CEPAS PADRÃO ATCC DO GÊNERO *CANDIDA***

Dissertação apresentada ao programa de Pós
Graduação em Patologia da Universidade
Federal Fluminense, como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre.

Área de concentração: Patologia Geral

Aprovada em 21 de Outubro de 2016.

Banca Examinadora:

Prof. Dr^a. LUCIANA PAIVA
Instituto de Biologia - Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr^a. MAÍRA HALFEN TEIXEIRA LIBERAL
Laboratório de Biotecnologia - Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro
PESAGRO - RIO

Prof. Dr^a. ALESSANDRA MENDONÇA TELES DE SOUZA
Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dedico essa dissertação
com muito amor e gratidão a
minha mãe Deise e toda minha
família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, pois sem Ele nada do que sou ou faço ou sonho faz sentido. Graças a Ele, pois cheguei até aqui e vou muito mais longe segundo a vontade permissiva Dele porque em todo tempo, Ele é bom;

Ao meu esposo Jefferson, pela paciência, atenção, cuidado, amor, infinitas palavras de ânimo e incentivo. Obrigado por acreditar no meu sonho e fazer dele, o seu;

Ao meu filho amado Pedro, pois seu sorriso e abraço renovam as minhas forças;

A minha mãe Deise, por todo amor incondicional a mim oferecido, pelas infinitas noites de joelhos, palavras de ânimo e conforto e os incríveis chocolates;

Aos meus avós, tios pelo amor, palavras de ânimo, cuidado, atenção e orações;

Ao meu pai Eliezer, por acreditar em mim, cuidar e amar incondicionalmente;

As minhas Ics queridas, em especial a Letícia, que mesmo em tantas tribulações esteve presente desde o início com muita presteza, cuidado e carinho;

A minha amiga Gabriela, sempre presente, com muitas risadas, loucuras e chocolates e comidas e palavras e testes, enfim, por todo companherismo e tempo de qualidade a mim oferecido;

Ao meu eterno orientador, professor e amigo Dr Bruno Leal, por me aceitar a alguns anos atrás como Ic e me fazer sonhar, acreditar, ensinar e aguentar meus

infinitos questionamentos, dúvidas e stress, sempre com muita competência. Agradeço por muitas vezes ser mais do que um orientador, um pai, que chama atenção, corrige, e carinhosamente cuida;

As minhas orientadoras Dr^a. Helena C. Castro e Dr^a Andrea Regina, por terem aceitado me orientar e muito me ensinaram. Agradeço pela confiança, e por toda ajuda, sempre com muita competência e carinho;

Ao prof Dr. Marcos Veiga Kalil por todo auxílio, dedicação, presteza e por ceder o laboratório para realização das pesquisas;

A minha amiga Isabeliza, presente dado pela patologia, pelas infinitas risadas, aulas, trabalhos e artigos que com você foram mais divertidos;

Ao Programa de Pós Graduação em Patologia, nas pessoas da professora Karin e Eliane, por todo conhecimento ministrado;

Aos meus amigos do coração, pelas palavras de conforto nos momentos difíceis;

Aos colegas do LABiEMol;

Aos colaboradores da Química Orgânica da UFF;

Agradeço à Banca Examinadora pelos ensinamentos compartilhados;

Aos órgãos de fomento CAPES, FAPERJ e CNPQ pelo incentivo financeiro.

“Vamos unir ciência e piedade, vital, há tanto tempo separadas!”

John Wesley

RESUMO

As espécies de fungo do gênero *Candida* estão frequentemente presentes na boca, na pele, na microbiota gastrointestinal de forma comensal, em mais da metade da população mundial. Contudo, a *C. albicans* é o principal agente causador de micoses sistêmicas. Atualmente, fatores como: a) maior incidência de infecções oportunistas, principalmente por pacientes imunocomprometidos; b) aumento da mortalidade vinculada a esses patógenos; c) aumento de cepas microbianas resistentes, incluindo cepas de *Candida* spp. e d) número limitado de drogas antifúngicas, em sua maioria com significativa toxicidade, tornam necessária a pesquisa de novos protótipos com ação antifúngica e baixa toxicidade. Com o objetivo de determinar o perfil antifúngico de derivados sintéticos oriundos de diferentes classes químicas frente à cepas fúngicas da *American Type Culture Collection* – ATCC do gênero *Candida* e comparar com antifúngicos de uso clínico para determinação de um potencial terapêutico, foram testados 111 derivados de diferentes classes químicas, utilizando-se diferentes métodos incluindo-se testes de sensibilidade antimicrobiana, determinação da concentração inibitória mínima, teste de toxicidade *in silico* e uso de espectrofotometria de absorção para verificação dos efeitos sobre a viabilidade celular no teste de curva de crescimento. Do total de 111 derivados testados de 7 diferentes classes químicas (Hidrazonas; Sulfonamidas; Organofosforados; Pirazol; Pirazolona; Organometálicos e Naftoquinonas), 12 apresentaram atividade antifúngica frente a diferentes espécies de *Candida*, são eles: quatro derivados de Naftoquinona (AN 04, AN 05, AN 06 e AN 07), um derivado de pirazol (PVQD 01), um derivado de pirazolona (PVY 08) e seis derivados organometálicos (VS 01, VS 02, VS 05, VS 07, VS 12 e VS 17). Dentre os derivados ativos, quatro derivados naftoquinônicos e um pirazol (PVQD 01) apresentaram valores de concentração inibitória mínima igual ou menor que 64 ug/mL, valores considerados promissores de acordo com o CLSI, e toxicidade *in silico* com baixo possível risco tóxico. Os testes de curva de crescimento realizado para os derivados que apresentaram concentração inibitória mínima menor ou igual a 64 ug/mL, indicou que o derivado de pirazol apresentou melhor atividade nas 07 primeiras horas com maior inibição do crescimento microbiano no T7, enquanto os derivados de naftoquinona apresentaram variados percentuais de inibição, apresentando um possível perfil fungistático, também observado no controle experimental utilizado, o fluconazol e o cetoconazol. Além disso, eles apresentaram um perfil recorrente e proporcional de acordo com as concentrações testadas, similar ao efeito dose-dependente comum aos fármacos de uso clínico, mostrando-se promissores. O derivado AN 05 mostrou maior destaque pois foi eficaz contra duas espécies de grande importância clínica, *C. albicans* e *C. glabrata* com inibição do crescimento microbiano no T48 de 58,7% e 48,6% respectivamente. Os resultados mostraram que a família das naftoquinonas possui um promissor potencial antifúngico frente às espécies do gênero *Candida*.

Palavras-chave: Antimicrobianos; *Candida*; Resistência aos Antimicrobianos.

ABSTRACT

Fungal species of the genus *Candida* are often present in the mouth, skin and, gastrointestinal microbiota in comensal way, in more than half the world's population. However, *C. albicans* is the main causative agent of systemic mycoses. Currently, factors such as: a) higher incidence of opportunistic infections, especially by immunocompromised patients; b) increase in mortality linked to these pathogens; c) increase in resistant microorganism, including strains of *Candida* spp. and d) limited number of antifungal drugs, mostly with significant toxicity; turn out necessary to research for new prototypes with antifungal activity on and low toxicity. In order to determine the antifungal profile synthetic derivatives from different chemical classes against the fungal strains from the American Type Culture Collection - ATCC genus *Candida* and to compare use antifungals clinical for determining a therapeutic potential has been tested 111 derived from different chemical classes, using different methods including in antimicrobial susceptibility testing, determination of minimum inhibitory concentration, toxicity testing *in silico* and use of absorption spectrophotometry for verification of the effects on cell viability in growth curve test. Of the 111 derivative tested seven different chemical classes (Hydrazones; sulfonamides; Organophosphate; Pyrazole; Pyrazolone; Organometallic and Naftoquinonic), 12 showed antifungal activity against various *Candida* species, they are: four derivatives Naftoquinonic (AN 04, AN 05, AN 06, and AN 07), one pyrazole derivative (PVQD 01), one derivative of pyrazolone (PVY 08) and six organometallic derivatives (VS 01, VS 02, VS 05, VS 07, VS 12 to VS 17). Among the assets derivative four naftoquinonic derivatives and one pyrazole showed values of minimum inhibitory concentration equal to or less than 64 ug / ml and *in silico* toxicity with lowest possible toxic risk. The growth curve tests conducted for the derivatives had lower minimum inhibitory concentration than or equal to 64 ug / ml, indicated that the pyrazole derivative showed a better activity in the 07 first hours with a greater inhibition of microbial growth the T7 as derivatives naphthoquinone presented different inhibition percentage, with a possible fungistatic profile also observed in experimental control used, fluconazole and ketoconazole. In addition, they had a recurring and proportional profile according to the concentrations tested, similar to the common dose-dependent effect of the clinical use of drugs, being promising. The AN 05 derivative showed greater prominence because it was effective against two species of great clinical importance, *C. albicans* and *C. glabrata* with inhibition of microbial growth in T48 58.7% and 48.6% respectively. The results showed that the family of naphthoquinones has a promising potential antifungal front of the species of the genus *Candida*.

Keyword: Antimicrobial; *Candida*; Antimicrobial Resistance.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Informações das cepas ATCC do gênero <i>Candida</i> utilizadas no presente estudo.....	52
Quadro 2: Informações sobre as classes químicas testadas no presente estudo	55
Quadro 3: Valores ideais para os parâmetros do programa Osiris® Property Explorer para caso de biodisponibilidade oral	63
Quadro 4: Parâmetros toxicológicos obtidos no programa Osiris® após desenho estrutural dos derivados organometálicos e do antifúngico utilizado como controle	72
Quadro 5: Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos Organometálicos ativos no TSA, frente a diferentes espécies de <i>Candida</i>	73
Quadro 6: Parâmetros toxicológicos obtidos no programa Osiris® após desenho estrutural do derivado de pirazol, pirazolona e do antifúngico utilizado como controle	75
Quadro 7: Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos derivados de Pirazol e Pirazolona ativos no TSA, frente a diferentes espécies de <i>Candida</i>	76
Quadro 8: Parâmetros toxicológicos obtidos no programa Osiris após desenho estrutural dos derivados de naftoquinona e do antifúngico utilizado como controle	80
Quadro 9: Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos derivados de Naftoquinona ativos no TSA, frente à diferentes espécies de <i>Candida</i>	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de CIM encontrados para o Fluconazol e Cetoconazol frente às cepas ATCC do gênero *Candida* no LABiEMol com o perfil de Sensibilidade encontrado para cepas ATCC, de acordo com M27-A2 67

Tabela 2: Percentual de Inibição do Crescimento Fúngico em diferentes pontos de cortes e concentrações do derivado PVQD 01 frente à *C. albicans* ATCC 24433 ... 78

Tabela 3: Percentual de Inibição do Crescimento Fúngico em diferentes pontos de cortes e concentrações do derivado AN 04 frente à *C. albicans* ATCC 24433 83

Tabela 4: Percentual de Inibição do Crescimento Fúngico em diferentes pontos de cortes e concentrações do derivado AN 04 frente à *C. glabrata* ATCC 90030..... 84

Tabela 5: Percentual de Inibição do Crescimento Fúngico em diferentes pontos de cortes e concentrações do derivado AN 05 frente à *C. albicans* ATCC 24433 85

Tabela 6: Percentual de Inibição do Crescimento Fúngico em diferentes pontos de cortes e concentrações do derivado AN 05 frente à *C. glabrata* ATCC 90030..... 87

Tabela 7: Percentual de Inibição do Crescimento Fúngico em diferentes pontos de cortes e concentrações do derivado AN 06 frente à *C. albicans* ATCC 24433 88

Tabela 8: Percentual de Inibição do Crescimento Fúngico em diferentes pontos de cortes e concentrações do derivado AN 06 frente à *C. tropicalis* ATCC 750 89

Tabela 9: Percentual de Inibição do Crescimento Fúngico em diferentes pontos de cortes e concentrações do derivado AN 07 frente à *C. tropicalis* ATCC 750 91

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Perfil antimicrobiano dos derivados Organometálicos frente às espécies do gênero <i>Candida</i> no TSA.....	70
Gráfico 2: Desempenho dos derivados pirazólicos e pirazolônicos frente às cepas do gênero <i>Candida</i> no TSA	74
Gráfico 3: Curva de Crescimento da <i>C. albicans</i> ATCC 24433 sob a ação do derivado PVQD 01 e do cetoconazol na concentração de 1 CIM.....	77
Gráfico 4: Perfil antimicrobiano dos derivados naftoquinônicos frente às espécies do gênero <i>Candida</i> no TSA.....	79
Gráfico 5: Curva de Crescimento da <i>C. albicans</i> ATCC 24433 sob a ação do derivado AN 04 e do cetoconazol na concentração de 1 CIM.....	82
Gráfico 6: Curva de Crescimento da <i>C. glabrata</i> ATCC 90030 sob a ação do derivado AN 04 e do cetoconazol na concentração de 1 CIM.....	83
Gráfico 7: Curva de Crescimento da <i>C. albicans</i> ATCC 24433 sob a ação do derivado AN 05 e do cetoconazol na concentração de 1 CIM.....	85
Gráfico 8: Curva de Crescimento da <i>C. glabrata</i> ATCC 90030 sob a ação do derivado AN 05 e do cetoconazol na concentração de 1 CIM.....	86
Gráfico 9: Curva de Crescimento da <i>C. albicans</i> ATCC 24433 sob a ação do derivado AN 06 e do cetoconazol na concentração de 1 CIM.....	87
Gráfico 10: Curva de Crescimento da <i>C. tropicalis</i> ATCC 750 sob a ação do derivado AN 06 e do cetoconazol na concentração de 1 CIM.....	89
Gráfico 11: Curva de Crescimento da <i>C. tropicalis</i> ATCC 750 sob a ação do derivado AN 07 e do cetoconazol na concentração de 1 CIM.....	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Colônias de levedura da <i>Candida albicans</i> ATCC 24433	21
Figura 2: Microscopia eletrônica do <i>Conidiobolus</i> spp.....	26
Figura 3: Microscopia eletrônica do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> na fase de levedura (37°C), com aspecto em roda de leme	26
Figura 4: Microscopia eletrônica contendo esporos assexuais do <i>Basidiobolus ranarum</i>	27
Figura 5: Microfotografia de células de levedura da <i>Candida albicans</i>	28
Figura 6: Colônias sugestivas de <i>C. albicans</i> em meio CHROMagar <i>Candida</i> , provenientes de amostras de microbiota oral.....	31
Figura 7: Colônias sugestivas de <i>C. tropicalis</i> em meio Chromagar <i>Candida</i> , provenientes de amostras de microbiota oral.....	32
Figura 8: Colônias sugestivas de <i>C. krusei</i> em meio Chromagar <i>Candida</i> , provenientes de amostras de microbiota oral.....	33
Figura 9: Células de levedura da <i>Candida albicans</i> ATCC 24433	35
Figura 10: Estrutura 2D – Fluconazol	42
Figura 11: Estrutura 2D - Itraconazol.....	42
Figura 12: Estrutura 2D - Cetoconazol.....	43
Figura 13: Estrutura 2D - Anfotericina.....	44
Figura 14: Estrutura 2D – Nistatina.....	44
Figura 15: Estrutura 2D - Caspofungina	45
Figura 16: Estrutura 2D - Anidulafungina.....	46
Figura 17: Estrutura 2D - Micafungina	46
Figura 18: Tubos de meio Sabouraud com repique das espécies de <i>Candida</i> spp.	53
Figura 19: Tubos com inóculo de diferentes espécies de <i>Candida</i> spp.....	54

Figura 20: Núcleo base da série inédita das Sulfonamidas onde modificações estruturais possibilitaram a formação de quinze moléculas de uma série.....	56
Figura 21: Núcleo base da série inédita de Hidrazona onde modificações estruturais possibilitaram a formação de oito moléculas de diferentes séries (MS, GML)	56
Figura 22: Núcleo base da série inédita dos Organofosforados onde modificações estruturais possibilitaram a formação de três moléculas de uma série (ABC)	57
Figura 23: Núcleo base da série inédita dos derivados Organometálicos onde modificações estruturais possibilitou a formação de dezessete moléculas de uma série (VS).....	57
Figura 24: Núcleo base da série inédita de Pirazóis onde modificações estruturais possibilitaram a formação de quarenta e sete moléculas de diferentes séries (MSJ, MSD, MPQ, PVQD e PFVD)	58
Figura 25: Núcleo base da série inédita das Pirazolonas onde modificações estruturais possibilitaram a formação de cinco moléculas de uma série (PVY)	59
Figura 26: Núcleo base da série inédita das Naftoquinonas onde modificações estruturais possibilitaram a formação de dezesseis moléculas de diferentes séries (AN, NO).....	59
Figura 27: Etapas do Teste de Sensibilidade Antimicrobiana.....	61
Figura 28: Halo de inibição do crescimento fúngico de <i>Candida albicans</i> , frente ao Fluconazol, no Teste de Sensibilidade Antimicrobiana	62
Figura 29: Representação da tela do programa Osiris® Property Explorer utilizando como exemplo o controle positivo Fluconazol.....	64
Figura 30: Derivado diluído em poços de microplaca de poliestireno - CIM	66
Figura 31: Pontos de cortes dos agentes antifúngicos previsto pelo CLSI, M27-A2.....	66
Figura 32: Estrutura química dos derivados inéditos de Naftoquinona ativos a diferentes espécies de <i>Candida</i>	79

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ALP – Sequência de Aglutinina (aglutinine-like sequence)

ATCC - American Type Culture Collection

ATP - Trifosfato de Adenosina

CIM – Concentração inibitória mínima

CLSI – Clinical Laboratory Standards Institute

CMRVS - Coleção de Microorganismos de Referência em Vigilância Sanitária

CSI - Laboratório de Catálise e Síntese

C. albicans - *Candida albicans*

C. dubliniensis - *Candida dubliniensis*

C. glabrata - *Candida glabrata*

C. krusei - *Candida krusei*

C. parapsilosis - *Candida parapsilosis*

Candida spp. – Espécies de *Candida*

C. tropicalis - *Candida tropicalis*

DMSO - Dimetilsulfóxido

ERG₁₁ - Ergosterol 11

FARMANGUINHOS – Departamento de Síntese de Fármacos

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

GPOP - Grupo de Pesquisa Organofosforados

GPI - Glicosilfosfatidinosidal

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

Hwp – Hyphall Wall Protein

HYR/IFF – Hyphall Up Regulated Protein

IgA – Imunoglobulina A

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

LABCON – Laboratório de Conversão

LABIEMOL – Laboratório de Antibióticos, Bioquímica, Ensino e Modelagem Molecular

LASINTHET – Laboratório de Síntese de Heterocícl

LIP - Lipases

LSOM – Laboratório de Síntese de Organometálicos

PL – fosfolipases

QSM – Quorum Sensin

Rbt – Repressed By Tup

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

RPM – Rotação por minuto

TSA – Teste de Sensibilidade Antimicrobiana

TSB – Meio de Cultivo Trypticase Soy Broth

YMA - Yeast Malt Agar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	REVISÃO DE LITERATURA	24
1.1.1	Fungos	24
1.1.2	Gênero <i>Candida</i>	29
1.1.3	Principais Antifúngicos Utilizados para Tratamento de Infecções Causadas por Fungos do Gênero <i>Candida</i>	40
1.1.4	Resistência Antifúngica.....	47
1.1.5	Fonte de Novos Fármacos	49
2	OBJETIVO.....	51
2.1	OBJETIVO GERAL.....	51
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	52
3.1	AMOSTRAS BIOLÓGICAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	52
3.2	DERIVADOS QUÍMICOS	54
3.2.1	Derivados de Sulfonamida	55
3.2.2	Derivados de Hidrazona	56
3.2.3	Derivados Organofosforados.....	56
3.2.4	Derivados Organometálicos.....	57
3.2.5	Derivados de Pirazol e Pirazolona.....	58
3.2.6	Derivados de Naftoquinona.....	59
3.3	TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA	59
3.3.1	Preparo das Soluções-estoque.....	60
3.3.2	Controles experimentais	60
3.3.3	Protocolo do Teste de Sensibilidade Antimicrobiana.....	60

3.4	TESTE DE TOXICIDADE <i>IN SILICO</i> - OSIRIS® PROPERTY EXPLORER	62
3.5	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	64
3.5.1	Preparo das Soluções-estoque.....	64
3.5.2	Controles experimentais	65
3.5.3	Protocolo da Concentração Inibitória Mínima	65
3.6	DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO FÚNGICO E VIABILIDADE CELULAR.....	67
3.6.1	Preparo das Soluções-estoque.....	67
3.6.2	Controles experimentais	68
3.6.3	Protocolo da Curva de Crescimento Fúngico	68
4	RESULTADOS	69
4.1	DERIVADOS SINTETIZADOS POR GRUPO DE PESQUISADORES DA FIOCRUZ	69
4.1.1	Derivados de Sulfonamida	69
4.2	DERIVADOS SINTETIZADOS POR GRUPO DE PESQUISADORES DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UFF	69
4.2.1	Derivados de Hidrazonas	69
4.2.2	Derivados de Organofosforados.....	69
4.2.3	Derivados Organometálicos.....	70
4.2.4	Derivados Pirazóis e Pirazolonas	73
4.2.5	Derivados de Naftoquinona.....	78
5	DISCUSSÃO.....	92
6	CONCLUSÃO	99
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
	APÊNDICE.....	110

1 INTRODUÇÃO

Entre milhões de espécies fúngicas existentes, cerca de 600 são patogênicas para o ser humano, sendo o gênero *Candida* um dos mais relevantes no cenário mundial. Relatos mostram que dentre pacientes hospitalizados, 8% podem adquirir uma infecção fúngica hospitalar, e que 80%, dessas infecções, são causadas por *Candida* spp. (AKEME YAMAMOTO *et al.*, 2012).

As leveduras desse gênero têm sido relacionadas a infecções superficiais e/ou sistêmicas, apresentando alto índice de mortalidade (ALBATAINEH *et al.*, 2016; CURVELO *et al.*, 2014; MAYER; WILSON; HUBE, 2013; NETO *et al.*, 2014).

Estudos relatam que infecções oriundas de *Candida* spp. têm aumentado ao longo das últimas décadas a nível mundial (CURVELO *et al.*, 2014; TAN *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2015). Infecções oriundas desse gênero envolvem mais de uma morfologia celular, fator que contribui de forma substancial para virulência desse microrganismo. Relatos mostram que os filamentos (hifas) são responsáveis pela penetração no tecido, enquanto as leveduras são importantes na disseminação precoce e em infecções menos invasivas (CALDERÓN-NOREÑA *et al.*, 2015; MORALES *et al.*, 2013). A identificação correta de espécies de *Candida* em processos infecciosos é de fundamental importância para uma escolha terapêutica adequada (KASHEM *et al.*, 2015). A literatura aponta que as espécies mais isoladas em infecções causadas por *Candida* no estado do Rio de Janeiro são: *C. albicans* (45,4%), *C. parapsilosis* (28,4%), *C. tropicalis* (14,2%), *C. glabrata* (1,4%), *C. krusei* (0,7%), entre outras, 9,9%. Esses isolados foram obtidos de pacientes com diferentes fatores de risco e de diferentes fontes (NEUFELD *et al.*, 2015).

A *Candida albicans* é a principal espécie isolada em infecções superficiais e invasivas, ocupando diferentes sítios anatômicos. Contudo, sua predominância diminuiu nas duas últimas décadas sendo o terceiro ou quarto lugar em prevalência em

alguns países da Ásia e América do Sul (ALBATAINEH *et al.*, 2016; CALDERÓN-NOREÑA *et al.*, 2015; JHA; KUMAR, 2016).

Este microrganismo está presente de forma comensal na microbiota oral, na pele e na microbiota gastrointestinal de aproximadamente 75% da população mundial, podendo causar infecções superficiais e/ou sistêmicas, por se tratar de um patógeno oportunista (Mayer, Wilson, and Hube 2013) (Figura 1).

Diversos fatores de virulência estão relacionados a essa espécie, como por exemplo, a ação de adesinas ou de enzimas como proteases, lípases e fosfolipases, entre outras, a transição da forma de levedura, pseudohifas, crescimento de hifas e formação de biofilme (BROWN *et al.*, 2014; TAN *et al.*, 2016). Este último está relacionado com a redução da sensibilidade dos fármacos utilizados na prática clínica e também aos casos de reinfecção (FOX *et al.*, 2015; MATHÉ; VAN DIJCK, 2013).

Figura 1: Colônias de levedura da *Candida albicans* ATCC 24433



Fonte: Arquivo pessoal. Colônias de leveduras de *Candida albicans* em placa de Petri com meio de cultivo Ágar Sabouraud, mantido à 35°C – Labiemol

Outras espécies de *Candida* também possuem grande importância clínica e também são capazes de formar biofilme, são elas: *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* (CHEN *et al.*, 2014; HOLLAND *et al.*, 2014; SALZER *et al.*, 2015; SCHWARZMÜLLER *et al.*, 2014). A espécie *C. parapsilosis* tem sido relacionada a surtos em unidades neonatais (GIL-ALONSO *et al.*, 2016; HOLLAND *et al.*, 2014), enquanto a *C. tropicalis*, no Brasil é a segunda espécie mais isolada nos hospitais (NETO *et al.*, 2014; NEUFELD *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016). A *C. glabrata* é uma

levedura monomórfica responsável por aproximadamente 15 – 25% dos casos clínicos. Essa espécie apresenta alta tolerância aos azóis (SANCHIS *et al.*, 2016; SAVASTANO *et al.*, 2016; SCHWARZMÜLLER *et al.*, 2014), enquanto a *C. krusei* tem sido descrita como um patógeno multirresistente, pois apresenta resistência intrínseca ao Fluconazol e sensibilidade diminuída à Anfotericina B, Flucitosina e Cetoconazol (BARROS *et al.*, 2016; RICARDO *et al.*, 2014).

A *C. dubliniensis* é um patógeno oportunista presente na cavidade oral de pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e *Diabetes mellitus*, além de ser isolada em outras partes do corpo. Comparações genômicas mostraram que a *C. dubliniensis* possui uma similaridade maior do que 80% com a *C. albicans* (JACKSON *et al.*, 2009; ROBERTS; ALELEW; IWEN, 2016; SALZER *et al.*, 2015).

Os principais agentes antifúngicos utilizados para o tratamento de *Candida* spp. são da classe dos azóis, dos poliênos e das equinocandinas. Os azóis e poliênos atuam sobre a membrana celular fúngica, mais especificamente no ergosterol, principal esterol presente na membrana celular dos fungos. Ao agir na síntese do ergosterol, esses agentes antifúngicos modificam a permeabilidade da membrana facilitando a saída de íons de potássio e açúcares (DA SILVA-ROCHA *et al.*, 2014; VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012). As equinocandinas atuam na síntese de glicanos da parede celular fúngica, inibindo a enzima 1,3-glicano sintase. Essa enzima impede a manutenção da integridade e rigidez da parede celular de fungos, resultando em uma lise celular (AZANZA PEREA, 2016; IMBERT *et al.*, [S.d.]; NAICKER *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2016).

Cepas resistentes têm sido isoladas frequentemente nas últimas décadas, principalmente com resistência à classe dos azóis. A resistência aos derivados azólicos ocorre principalmente após a mutação no gene que codifica o alvo da droga ERG₁₁, alterando assim o domínio de ligação dos azóis. Essa modificação ocorre pela mutação da enzima alvo dos azóis, a 14 α -demetilase, responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol (KABIR; HUSSAIN; AHMAD, 2012; OLIVEIRA CARVALHO *et al.*, 2013; PFALLER, MICHAEL A., 2012). A resistência aos poliênos se dá devido a uma alteração na biossíntese do ergosterol, resultando em uma baixa quantidade do mesmo na membrana fúngica, diminuindo as ligações entre o fármaco e o ergosterol, não havendo assim a formação dos “poros”. Há poucos relatos de resistência relacionados

aos poliênos, contudo esta família possui alta nefrotoxicidade relacionada (PFALLER, MICHAEL A., 2012). A resistência às equinocandinas é pouco relatada na literatura, contudo, ela está associada com substituições dos aminoácidos em duas regiões *hot-spot* altamente conservado dos genes *Fksp* (subunidades que compõem o complexo enzimático, 1,3-glicano sintase) (AZANZA PEREA, 2016; IMBERT *et al.*, [S.d.]; NAICKER *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2016).

Com a maior incidência de infecções oportunistas, principalmente por pacientes imunocomprometidos, o aumento da mortalidade vinculada a esses patógenos, o aumento de cepas microbianas resistentes, incluindo cepas de *Candida* spp. e levando-se em consideração o quadro atual dos fármacos disponíveis no mercado, podemos observar uma ineficiência terapêutica com alta citotoxicidade (ALASTRUEY-IZQUIERDO *et al.*, 2015). Neste cenário se faz necessária a pesquisa por novos fármacos que apresentem maior espectro de ação e menor toxicidade. Assim, a busca de novos antimicrobianos de origem natural, sintética ou semi-sintética, que permitam o tratamento da infecções causadas por esses organismos patogênicos é de grande interesse e relevância para a comunidade mundial (EL-GAMEL; FARGHALY, 2013; MALLADI *et al.*, 2014).

A classe dos pirazóis, pertencentes aos azóis, apresenta diversas propriedades terapêuticas. Isso tem feito com que essa classe seja alvo de estudos que comprovam seu potencial antitumoral *in vitro* e *in vivo*, anti-hiperglicêmico, analgésico, além de ação fungicida e fungistática relatados na literatura (MALLADI *et al.*, 2014). Há relatos também de atividade anti-inflamatória, anti-tuberculose e antiparasitária (BEKHIT *et al.*, 2015) para essa classe.

As pirazolonas também apresentam diversas propriedades farmacológicas já descritas na literatura, incluindo ação analgésica, anti-inflamatória (KHALIL *et al.*, 2014), antipirético, antioxidante, antiproliferativo (ANTRE *et al.*, 2011), antibacteriano e antifúngico (NARAYANA RAO *et al.*, 2014; RAMAN; SELVAGANAPATHY, 2013), além de apresentar um fármaco muito utilizado no mercado, como, por exemplo, a dipirona (MALLADI *et al.*, 2014).

No grupo de moléculas de grande potencial farmacológico, também se inclui as naftoquinonas, pertencentes à classe das quinonas. Elas são importantes na química medicinal devido à atividade biológica contra células tumorais, protozoários

patogênicos (DA CRUZ *et al.*, 2014; SALOMÃO *et al.*, 2013), atividade antifúngica, inclusive para fungos filamentosos (CASTRO *et al.*, 2013), atividade antibacteriana, antipirética (PINHO *et al.*, 2011) e anti-inflamatória (HOOK; MILLS; SHERIDAN, 2014).

Considerando-se todo quadro patogênico causado pela *Candida* spp., além da resistência e toxicidade relacionadas aos fármacos disponíveis hoje no mercado para o tratamento destas infecções, é necessário a premente busca de novos fármacos com ação antifúngica de amplo espectro de ação e baixa toxicidade. Logo, formula-se a hipótese científica de que a partir de novos derivados sintéticos oriundos de diferentes classes químicas, é possível identificar compostos com potencial antifúngico e com menor toxicidade.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 Fungos

1.1.1.1 Morfologia Fúngica

Os fungos podem ser classificados morfológicamente como leveduras (unicelulares), bolores (multicelulares) e dimórficos (apresentam ambas as formas). Na forma de leveduras, esses apresentam - se como células isoladas, esféricas ou ovais, realizando reprodução assexuada por brotamento ou cissiparidade. Os fungos dimórficos em meio de cultivo Agar Sabouraud apresentam o formato de colônias circulares, opacas ou brilhosas (CHENG *et al.*, 2012; GRUMAZ *et al.*, 2013).

Os fungos dimórficos apresentam-se sob duas formas diferentes: a) levedura, quando em tecidos vivos ou em meios de culturas líquidos (temperatura 35-37°C), ou na superfície de meios de cultura sólidos (25-30°C); e b) micelial, sendo essa forma infectante. (MORALES *et al.*, 2013). O gênero *Candida*, do filo Deuteromycota é um exemplo de fungo patogênico contendo algumas espécies que apresentam esse dimorfismo como adaptação ao parasitismo (CHENG *et al.*, 2012; GRUMAZ *et al.*, 2013).

1.1.1.2 Reprodução Fúngica

A reprodução dos fungos na forma leveduriformes ocorre assexuadamente por brotamento ou gemulação. Na forma filamentosa, os fungos podem se reproduzir de

forma sexuada ou assexuada, através da fragmentação de suas hifas, ocorrendo a formação de esporos (CHENG *et al.*, 2012).

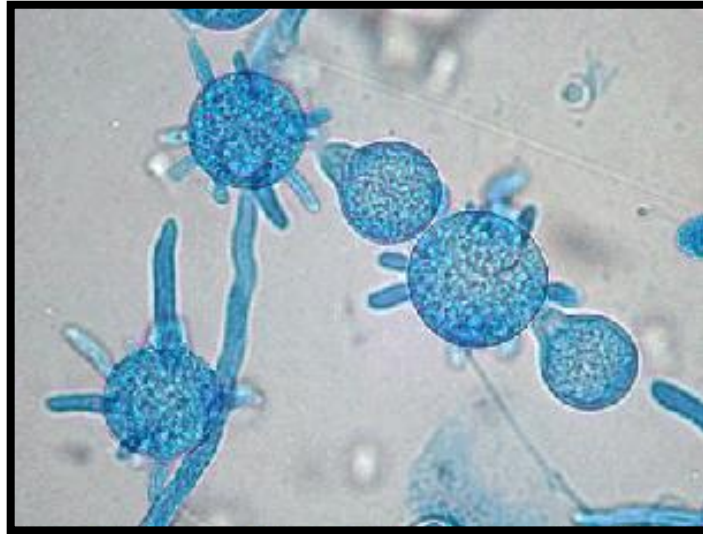
Os esporos uma vez germinados tornam-se geneticamente iguais ao organismo parental, e são produzidos por mitose, não havendo fusão do núcleo das células. Existem dois tipos de esporos assexuais: o conidiósporo ou conídio e o blastoconídeo. Os conidiósporos são esporos uni ou multicelular produzidos em cadeias na extremidade do conidióforo. Os blastoconídeos são originados de um broto da célula parental e são encontrados em algumas leveduras como a *C. albicans* que, por sua vez, produz o clamidoconídio (esporo com paredes espessas formadas pelo arredondamento e alargamento no interior de um segmento de hifa) (GRUMAZ *et al.*, 2013).

1.1.1.3 Classes Fúngicas de Importância Clínica

Os fungos são importantes em muitos aspectos econômicos. Contudo, algumas espécies são patogênicas ao Homem e também aos animais, apresentando, portanto, grande importância médica, como por exemplo:

- *Zigomicetos*: fungos filamentosos saprofíticos, que apresentam hifas cenocíticas. Os esporos assexuais são os esporangiospóros e os esporos sexuais são os zigósporos (esporos grandes presentes no interior de uma parede espessa) (KWON-CHUNG, 2012). Um exemplo é a conidiobolomycose (causada pelo *Conidiobolus coronatus*), infecção rara que acomete o seio facial e depois evolui para um tumor subcutâneo na face (BACHELET *et al.*, 2014). A Figura 2 ilustra tubos simples ou múltiplas hifas que podem tornar-se coniósforos de *Conidiobolus* spp.

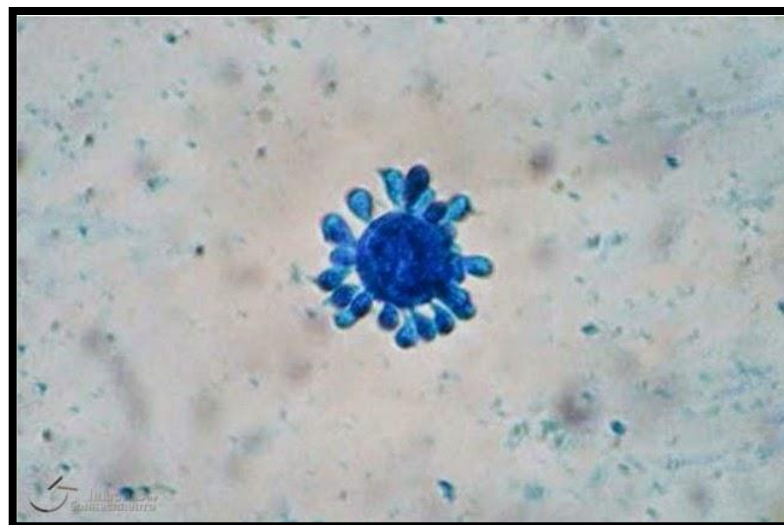
Figura 2: Microscopia eletrônica do *Conidiobolus* spp.



Fonte: www.mycology.adelaide.edu.au/virtual/2006/ID2-Nov06. Extraído em 07/10/2016

- *Ascomicetos*: fungos com hifas septadas e algumas leveduras. Os esporos assexuais desse filo são os conídios que facilmente são liberados e apresentam grande dispersão aérea (PARNMEN *et al.*, 2012). A paracoccidioidomicose, doença endêmica na América Latina, causada pelo *Paracoccidioides brasiliensis* (Figura 3), é um exemplo de infecção humana deste filo, apresentando-se com um quadro de infecção aguda em crianças e adolescentes, ou infecção crônica comumente acometida em adultos (DE SOUZA; JORGE; XAVIER, 2014).

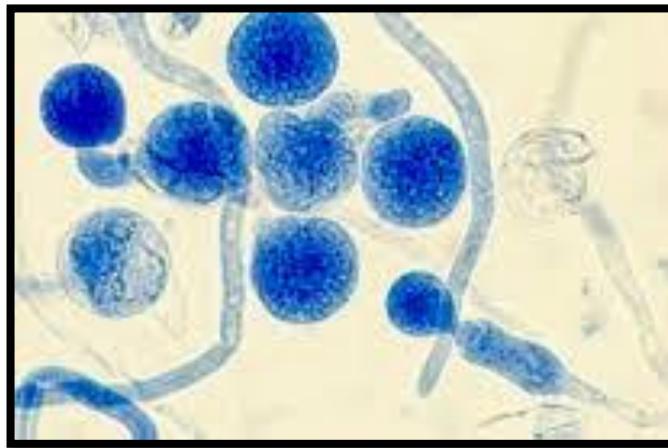
Figura 3: Microscopia eletrônica do *Paracoccidioides brasiliensis* na fase de levedura (37°C), com aspecto em roda de leme



Fonte: www.ufmg.br/imagensdoconhecimento/Imagens/Areas/Ciencias-Biologicas/Enzima-Patricia-Campi. Extraído 07/10/2016

- *Basidiomicetos*: apresentam hifas septadas e, alguns fungos são macroscópicos, também denominados cogumelos. Os basidiomicetos produzem os basidiósporos que são formados externamente no basídio. Em média, existem quatro basidiósporos para cada basídio. Vale ressaltar que alguns basidiomicetos produzem conidiósporos assexuais. (PEAY; BRUNS, 2014). A basidiobolomicose é uma doença rara, endêmica em regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia e América Latina, causada pelo fungo *Basidiobolus ranarum* (Figura 4). O diagnóstico dessa patogenia é difícil, pois a apresentação clínica não é específica (ZABOLINEJAD *et al.*, 2014).

Figura 4: Microscopia eletrônica contendo esporos assexuais do *Basidiobolus ranarum*



Fonte: www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Zygomycetes/Basidiobolus.

Extraído em 07/10/2016

- *Deuteromicetos*: se reproduzem assexuadamente, produzindo conidióforos e conídios. Nesta reprodução ocorrem divisões celulares por mitose, sendo conhecidos como mitospóricos. Os deuteromicetos também podem se reproduzir de maneira sexuada ou ainda das duas formas ao mesmo tempo, sendo esta espécie conhecida como fungos holomorfos, pois produzem conídios ao mesmo tempo em que são formados ascas e ascomas ou basídios e basidiomas. Este filo é o que engloba a maior parte de fungos de importância clínica. O gênero *Candida* é um importante exemplo deste filo (GRUMAZ *et al.*, 2013). A Figura 5 mostra uma microfotografia de células de levedura da *Candida albicans*.

Figura 5: Microfotografia de células de levedura da *Candida albicans*



Fonte: <http://cnaturales.cubaeduca.cu>. Extraído em 07/10/2016

1.1.1.4 Algumas Doenças Causadas por Fungos

Os fungos são microrganismos que podem resistir a altas pressões osmóticas e baixa umidade, causando frequentemente doenças (micoses) cutâneas. As micoses subcutâneas são mais complexas visto que os fungos penetram na pele e podem invadir, por exemplo, o sistema linfático ou outros sistemas, resultando em infecções sistêmicas mais graves. Outros são causadores de micoses sistêmicas endêmicas com peculiar aspecto de risco laboral. As infecções causadas por fungos são uma das principais causas de morbidade e mortalidade, afetando principalmente pacientes imunocomprometidos (ALASTRUEY-IZQUIERDO *et al.*, 2015). A seguir, alguns exemplos de doenças causadas por fungos:

- *Pitiríase versicolor*: infecção superficial da pele que afeta homens e mulheres jovens. Ela é causada pelas leveduras *Malassezia furfur* e *Malassezia globosa*. A principal característica dessa doença é a mudança na pigmentação da pele. Além disso, ela apresenta lesões assintomáticas, múltiplas manchas descamativas, hipo ou hiperpigmentadas que podem variar sua coloração do branco, castanho ou avermelhado. Em alguns casos os pacientes se queixam de leve prurido (GAITANIS *et al.*, 2012; PARK *et al.*, 2012).

- *Histoplasmose*: micose sistêmica causada pelo *Histoplasma capsulatum*. Este fungo é encontrado em cavernas de morcegos, regiões com alto número de pombos ou em galinheiros, pois eles sobrevivem no solo contendo os dejetos (ou excretas) desses animais. A infecção humana acontece após a inalação dos seus

conídios. Os conídios uma vez inalados, vão para os alvéolos pulmonares onde provocam uma resposta inflamatória, se multiplicam dentro dos macrófagos, alcançam os linfonodos e depois a circulação, com disseminação para variados órgãos onde causam focos inflamatórios. Na maior parte das vezes essa infecção é assintomática, contudo os sintomas mais frequentes são: febre, calafrio, cefaléia, dispnéia, tosse, entre outros (SARKAR *et al.*, 2014; TSIODRAS *et al.*, 2012).

- **Candidíase:** doença causada por fungos do gênero *Candida*, capazes de afetar tanto a pele, quanto membranas e mucosas, além de tecidos e órgãos profundos. Esse gênero tem sido considerado um dos principais agentes causadores de infecções sistêmicas e afeta principalmente pacientes imunocomprometidos. A espécie *Candida albicans* é o principal fungo responsável por infecções sistêmicas de origem hospitalar, se tornando uma espécie de grande importância clínica. Seu oportunismo preocupa, pois esse fungo é comum na microbiota humana (gastrointestinal, oral e da pele) (YANG, WEIMING *et al.*, 2014).

1.1.2 Gênero *Candida*

Atualmente existem cerca de 200 espécies que compõe o gênero *Candida*, contudo apenas aproximadamente 10% são consideradas agentes etiológicos de relevância patogênica ao homem. Dessas, as espécies de maior interesse clínico são: *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*. Entre elas a *C. albicans* é a espécie mais frequentemente isolada de infecções invasivas e superficiais em diversos sítios anatômicos (JAIN *et al.*, 2013).

O gênero *Candida* tem sido considerado como um dos principais agentes causadores de micoses sistêmicas de origem hospitalar sendo o principal fungo responsável por candidemias (infecções da corrente sanguínea), afetando principalmente pacientes imunocomprometidos, como pacientes com infecções causadas pelo vírus da imunodeficiência humana HIV (PÉREZ; KUMAMOTO; JOHNSON, 2013). *Candida* está presente na microbiota oral comensal de indivíduos saudáveis sem apresentar sinais de infecção (CHO *et al.*, 2014). Nas últimas décadas os relatos de infecção fúngica pelo gênero *Candida* aumentaram consideravelmente.

Acredita-se que isso ocorreu devido ao aumento da sobrevivência dos pacientes (PÉREZ; KUMAMOTO; JOHNSON, 2013). A espécie de maior prevalência em isolados hospitalares, e que ocupa diferentes sítios anatômicos é a *Candida albicans* (CALDERÓN-NOREÑA *et al.*, 2015; NIM *et al.*, 2016). Outras espécies de *Candida* também possuem grande importância clínica, pois tem sido, relacionadas a infecções sanguíneas (candidemias) e são responsáveis por cerca de 50% de infecções não superficiais. Um estudo realizado no estado do Rio de Janeiro mostrou que as espécies mais isoladas foram: *C. albicans*, 45,4%, *C. parapsilosis*, 28,4%, *C. tropicalis*, 14,2%, *C. glabrata*, 1,4%, *C. krusei*, 0,7%, e outras, 9,9%. Os isolados foram obtidos de pacientes com diferentes fatores de risco e de diferentes fontes (NEUFELD *et al.*, 2015).

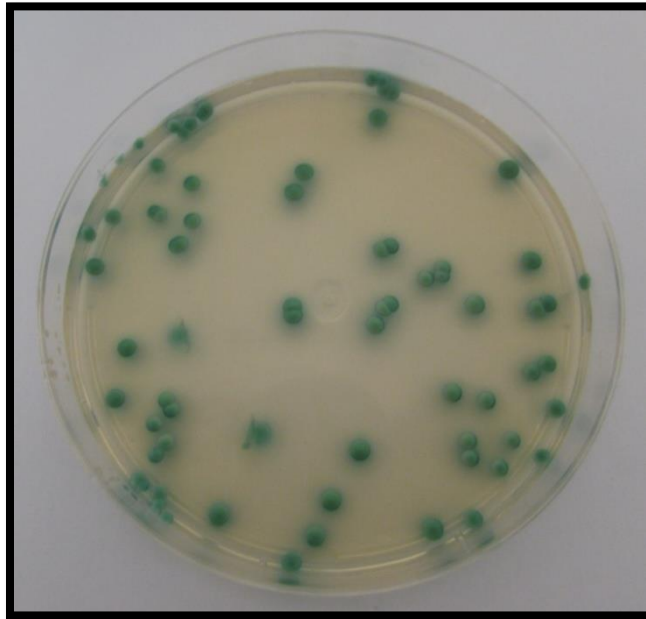
1.1.2.1 Espécies de *Candida*

Candida albicans

Agente fúngico de importância clínica, a *C. albicans* (Figura 6) está presente na forma comensal em diversos sítios anatômicos como, por exemplo, a microbiota da pele, na cavidade oral, no trato gastrointestinal e urogenital. Ela também é frequentemente associada à infecções orais e vaginais em pacientes com HIV (vírus da imunodeficiência humana), indivíduos imunodeprimidos, em pacientes neutropênicos submetidos à quimioterapia ou transplante, podendo colonizar órgãos internos como rins, fígado, baço e cérebro (BROWN *et al.*, 2014; JHA; KUMAR, 2016; THEILL *et al.*, 2016).

Diversos fatores de virulência estão relacionados a esta espécie, como por exemplo, ação de adesinas, ação de enzimas hidrolíticas como as proteases, lipases, fosfolipases, entre outras, transição da forma de levedura, pseudohifas, crescimento de hifas e formação de biofilme (BROWN *et al.*, 2014). O biofilme da *C. albicans* é composto por células com alta aderência e arranjo denso, podendo ser isolado de superfícies abióticas e bióticas (FOX *et al.*, 2015). O biofilme está relacionado com a reinfecção e também com a redução da sensibilidade aos agentes antifúngicos utilizados atualmente na prática clínica (MATHÉ; VAN DIJCK, 2013; TAN *et al.*, 2016).

Figura 6: Colônias sugestivas de *C. albicans* em meio CHROMagar *Candida*, provenientes de amostras de microbiota oral



Fonte: Arquivo pessoal. Células de leveduras de *Candida albicans* em placa de Petri com meio de cultivo Chromagar *Candida*, mantido à 35°C – Labiemol

Candida parapsilosis

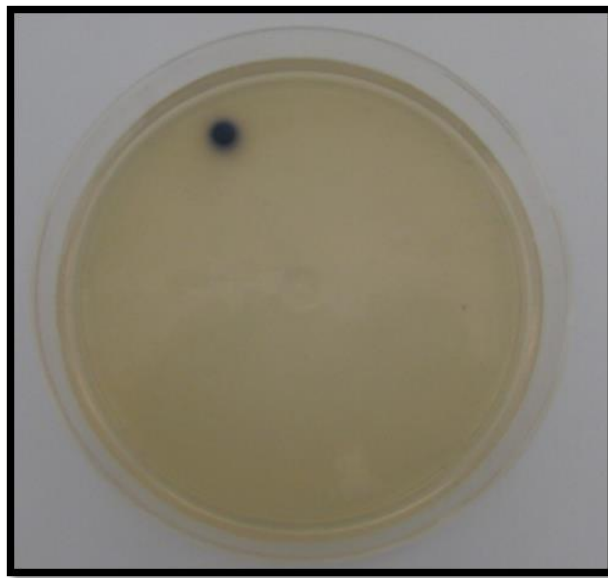
Esta espécie foi isolada pela primeira vez em 1928. Ela pode ser encontrada de forma comensal na pele de seres humanos além de poder ser isolada de ambientes marinhos, insetos e animais domésticos (SINGARAVELU; GÁCSEK; NOSANCHUK, 2014). A *C. parapsilosis* é capaz de ser transferida através das mãos dos profissionais de saúde, sendo por este motivo responsável por provocar surtos de infecção em unidades neonatais. Assim como a *C. albicans*, esta espécie cresce nas superfícies de dispositivos médicos, como cateteres e tubos de alimentação, em forma de biofilme (GIL-ALONSO *et al.*, 2016; HOLLAND *et al.*, 2014).

Candida tropicalis

Semelhante à *C. albicans*, a *C. tropicalis* é capaz de formar tubos germinativos, pseudo-hifas e hifas, contudo os genes responsáveis por esse dimorfismo ainda não foram descritos (CHEN *et al.*, 2014). No Brasil esta espécie é relatada como a segunda

mais isolada nos hospitais (NETO *et al.*, 2014); na Índia é a causa mais comum de candidemias (CHEN *et al.*, 2014; DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014; WANG *et al.*, 2016). Taxas de mortalidade de 40 – 70% estão associadas à presença de *C. tropicalis* na corrente sanguínea, contudo essas taxas estão relacionadas a outros fatores como neutropenia, nutrição parenteral, leucemia e cateteres venosos (CHEN *et al.*, 2014) (Figura 7).

Figura 7: Colônias sugestivas de *C. tropicalis* em meio Chromagar Candida, provenientes de amostras de microbiota oral



Fonte: Arquivo pessoal. Células de leveduras de *Candida tropicalis* em placa de Petri com meio de cultivo Chromagar Candida, mantido à 35°C – Labiemol

Candida krusei

Espécie classificada em quinto lugar, em relação à prevalência em infecções causadas pelo gênero *Candida*, a *C. krusei* (Figura 8) é muitas vezes descrita como patógeno multirresistente por apresentar resistência intrínseca ao Flucanazol e sensibilidade diminuída a Anfotericina B, ao Cetoconazol e ao Flucitosina. Patógeno oportunista com maior prevalência entre pacientes com neoplasias hematológicas e pacientes submetidos a transplante de medula, apresentando nesses casos altas taxas de mortalidade, variando de 60% – 80% (RICARDO *et al.*, 2014). Infecções vaginais causadas por *C. krusei* são relativamente raras, contudo, candidíase vulvovaginal resistente causada por essa espécie é intratável, de acordo a literatura (BARROS *et al.*,

2016; GÜZEL *et al.*, 2013).

Figura 8: Colônias sugestivas de *C. krusei* em meio Chromagar *Candida*, provenientes de amostras de microbiota oral



Fonte: Arquivo pessoal. Células de leveduras de *Candida krusei* em placa de Petri com meio de cultivo Chromagar *Candida*, mantido á 35°C – Labiemol

Candida glabrata

Levedura monomórfica presente na microbiota normal humana, a *C. glabrata* é a segunda causa mais frequente de candidíase, responsável por aproximadamente 15 – 25% dos casos clínicos. Alguns mecanismos de patogenicidade descritos em outras *Candida* spp. não são encontrados nesta, contudo, apresenta caráter altamente patogênico com estratégias de virulência distintas como, por exemplo, a presença de várias adesinas associadas à telômeros, adaptação ao ambiente fagossomal e intrafagossomal (SAVASTANO *et al.*, 2016; SCHWARZMÜLLER *et al.*, 2014), e a capacidade de adquirir nutrientes essenciais como o ferro (SRIVASTAVA; SUNEETHA; KAUR, 2015). A *C. glabrata* apresenta alta tolerância aos azóis, associada muitas vezes ao maior efluxo da droga através de sobre-expressão de ATP (adenosina de trifosfato) (SCHWARZMÜLLER *et al.*, 2014; TATI *et al.*, 2013).

Candida dubliniensis

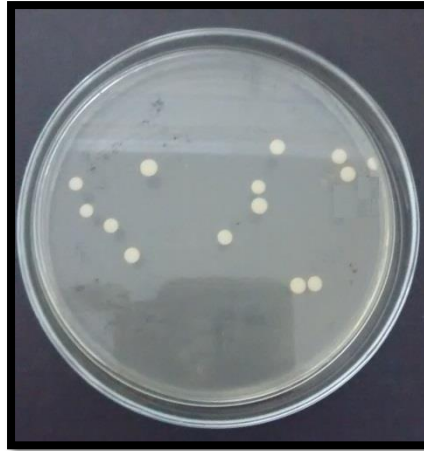
Assim como a *C. albicans*, esta espécie é capaz de formar tubo germinativo e produzir clamidósporo. A *C. dubliniensis* pode alternar entre as formas filamentosas e de levedura, além da capacidade de formar biofilme em superfícies bióticas e abióticas (ROBERTS; ALELEW; IWEN, 2016; SALZER *et al.*, 2015). Comparações genômicas mostraram que a *C. dubliniensis* possui similaridade maior que 80% em relação a *C. albicans* (JACKSON *et al.*, 2009; SALZER *et al.*, 2015). Patógeno oportunista presente na cavidade oral de pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e *Diabetes mellitus*, a *C. dubliniensis* também foi isolada de outras partes do corpo como vias respiratórias e sangue, sendo relacionada a uma taxa maior que 7% de candidemia. A resistência azólica tem sido relatada principalmente em tratamentos repetidos e prolongados (TSANG *et al.*, 2013)

1.1.2.2 Morfogênese

As espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis* apresentam polimorfismo que varia de acordo com a necessidade de adaptação ao parasitismo. Pseudo-hifas e clamidoconídeos são composições da forma de levedura, enquanto hifas verdadeiras são consideradas importantes no processo invasivo do patógeno, uma vez que resistem à ação dos fagócitos e possibilitam a sua entrada pela barreira epitelial (CHEN *et al.*, 2014). As células em forma de levedura são mais adaptadas para disseminação hematogênica, necessárias para melhor difusão da infecção sistêmica. Desse modo, pode-se dizer que o polimorfismo presente nesta espécie é um importante fator de virulência (MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

Células globosas, ovoides, curtas ou alongadas, sem presença de cápsula e com parede fina são características que compõem células leveduriformes, além de apresentar gemulação multilateral. Através da Figura 9 podemos observar células de leveduriformes em placa de Petri com meio de cultivo Ágar Sabouraud.

Figura 9: Células de levedura da *Candida albicans* ATCC 24433



Fonte: Arquivo pessoal. Células de leveduras de *Candida albicans* em placa de Petri com meio de cultivo Ágar Sabouraud, mantido à 35°C – Labiemol

A temperatura em torno de 33°C favorece esse tipo de crescimento. Em temperaturas ao redor de 37°C e pH próximo ao neutro favorecem o crescimento micelial que ocorre através da formação do tubo germinativo. Hifas verdadeiras originam-se dos tubos germinativos e possuem paredes paralelas desde o seu ponto de origem no blastoconídeo. Essas estruturas (blastoconídeos) apresentam-se no estado saprofítico (leveduriforme) (GRUMAZ *et al.*, 2013). Determinadas concentrações de glicose, presença de frutose e concentrações adequadas de íons de sódio podem favorecer a formação de tubos germinativos produzidos *in vitro* das espécies *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*. Cepas de *Candida albicans* formam clamidoconídeos, células de resistência, e clamidiósporos quando em temperaturas ao redor de 25°C (GRUMAZ *et al.*, 2013).

A parede celular da *Candida* spp. é uma estrutura complexa de aproximadamente 100 a 300 nm de espessura, composta de 5 a 8 camadas distintas, tendo como principal componente o carboidrato (80-90%), mas apresenta ainda proteínas e lipídeos. O principal constituinte da parede é um polissacarídeo altamente ramificado denominado manana, que é constituído por resíduos de manose unidos principalmente por ligações alfa- 1,6 alfa- 1,2 e raramente alfa- 1,3, além de moléculas de fosfato ligadas às mananas. Os sorotipos A, B e C de *C. albicans* apresentam diferenças em sua estrutura, graças às mananas. Essas estruturas atuam como

antígenos ativando os linfócitos B e fazendo com que a produção de anticorpos anti-*Candida* ocorra independentemente da interação entre linfócitos B e T. Glicanos, manoproteínas, glicoproteínas e glicomanoproteínas também são considerados antigênicos (HUANG, 2012). O glicano é um polímero importante na estrutura fibrilar da parede celular da *Candida* spp., pois apresenta dois tipos de polissacarídeos altamente ramificados, os β -glicanos, que possivelmente estão relacionados com a integridade estrutural da parede celular (CHENG *et al.*, 2012). As glicoproteínas, manoproteínas e glicomanoproteínas presentes na parede celular da *Candida albicans*, ficam associadas com as mananas ou os glicanos, podendo atuar como ligações entre as cadeias. Quitina e resíduos de N-acetilglicosamina também são encontrados nas paredes. Essa quitina e as manoproteínas podem atuar como adesinas (HUANG, 2012).

1.1.2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

São produtos, estruturas ou estratégias que auxiliam o microrganismo a se instalar e estabelecer relações de parasitismo. A ação de adesinas, das toxinas e a formação de biofilme, são exemplos de fatores de virulência (PFALLER, 2012).

Polimorfologia

O polimorfismo visto em algumas espécies de *Candida* é considerado um importante fator de virulência e característica essencial para formação de biofilme (CHAUVEL *et al.*, 2012). Diversos estímulos ambientais como, por exemplo, o pH, afetam a morfologia da *Candida albicans*. O pH menor que 6 favorece o crescimento de leveduras, enquanto um pH maior que 7 favorece o crescimento de hifas; além disso, outras condições como a temperatura fisiológica, a presença de dióxido de carbono e a presença de N-acetilglucosamina ou soro, favorecem a formação de hifas (MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

A literatura relata que a *Candida albicans* em forma de levedura é reconhecida pelo sistema imunológico do hospedeiro e prontamente fagocitadas (CHENG *et al.*, 2012). Dentro dos macrófagos, ocorre a produção de dióxido de carbono que induz a produção de uma proteína-quinase, AMP cíclico (cAMP) e o guanilato ciclase, responsáveis pela ativação do principal fator de transcrição de levedura para hifa, o *Efg 1p*. A formação de hifas pode ocorrer então dentro dos macrófagos, levando os

mesmos à morte. Desse modo, tal alteração morfológica inibe um importante mecanismo de defesa humana (MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

Outro fator também responsável pela regulação desse polimorfismo é o *Quorum Sensing* (QSM). Comunicação microbiana que detecta altas densidades celulares ($> 10^7$ células por ml) estimulando o crescimento de levedura, e, ao detectar baixa densidade celular ($<10^7$ células por ml), promove a formação de hifas, o Quorum Sensing, possui algumas moléculas e o farnesol, tirosol e dodecanol são as principais quorum moléculas relacionadas à morfogênese (MAYER; WILSON; HUBE, 2013), em particular o farnesol. Este, além de ser uma molécula do QSM responsável por regular o dimorfismo, pode diminuir a viabilidade de macrófagos por meio de indução de espécies reativas de oxigênio (ROS) (CHENG *et al.*, 2012).

Formação de Biofilme

Biofilmes são estruturas microbianas comunitárias revestidas de uma matriz com material exopolissacarídico que aderem a superfícies através de adesinas e polímeros extracelulares. (MORALES *et al.*, 2013). Algumas *Candida* spp. tem a capacidade de formar biofilme em tecidos do hospedeiro, e em dispositivos médicos implantados em pacientes imunocomprometidos. O biofilme está relacionado ao aumento de resistência aos antimicrobianos. Estudos mostram que biofilmes de *C. albicans* em comparação com células planctônicas podem ser 200 vezes mais resistentes a antifúngicos (BARROS *et al.*, 2016; SAPAAR *et al.*, 2014; SHINDE *et al.*, 2012).

A *C. albicans* apresenta uma particularidade na morfologia do seu biofilme em contraste com outras espécies do gênero, pois apresenta uma camada basal de blastoconídios com uma densa matriz composta por exopolissacarídeos e hifas. Ao compararmos com a espécie *Candida parapsilosis*, esta possui menor volume e sua composição é exclusiva por grupos de blastoconídios (MATHÉ; VAN DIJCK, 2013).

Em biofilmes de *C. albicans* podem ser observadas células de levedura, hifas verdadeiras e pseudo-hifas. Acredita-se que leveduras são liberadas quando os biofilmes estão maduros, disseminando assim a infecção, enquanto as hifas expressam inúmeras adesinas e por isso são provavelmente responsáveis pela integridade do biofilme (DESAI *et al.*, 2013).

A formação de biofilme é um importante fator de virulência desse patógeno, pois esse mecanismo está associado à resistência contra antifúngicos visto que o biofilme se apresenta como uma barreira, dificultando a permeabilização do antifúngico, além de facilitar a reinfecção. Relatos de resistência são comumente observados frente aos antifúngicos azólicos, pois estes são a primeira escolha em tratamento de candidíase (BARROS *et al.*, 2016; DESAI *et al.*, 2013; TSANG; BANDARA; FONG, 2012).

Este tipo de comunidade organizada é regulado pela troca de sinais químicos entre células, o QSM, no qual metabólitos extracelulares transmitem informações sobre a densidade celular em um mecanismo de regulação gênica, sendo considerados, pela literatura especializada, importante para formação do biofilme (YU *et al.*, 2012). Estudos mostram que a principal molécula do QSM, o farnesol, age como um inibidor da transição de levedura para hifa em determinada concentração. Isso ocorre, em razão do farnesol atuar mantendo o biofilme em fase estacionária, não permitindo sua maturação (YU *et al.*, 2012). Além disso, as leveduras não apresentam boa aderência, logo se acredita que inibindo essa transição morfológica, o biofilme é disperso. Essa dispersão pode levar a uma disseminação e à formação de novos biofilmes, tolerantes à droga anteriormente utilizada (HUSAIN *et al.*, 2013).

Ação de Adesinas

A aderência dos microrganismos no tecido do hospedeiro é um dos primordiais fatores de virulência, pois, se não houver adesão, não haverá invasão e posterior infecção. A espécie *C. albicans* apresenta um conjunto de proteínas, mais conhecidas como adesinas, que interagem com receptores das células epiteliais do hospedeiro ou superfícies abióticas. As proteínas presentes na parede celular, as glicoproteínas, as mananoproteínas, as glucanas, a quitina e os lipídeos, são possíveis adesinas. Segundo a literatura, cerca de 60 – 70% da composição química da parede celular de *Candida* spp. é formada por quitina, carboidratos β -1, 3 - e β -1,6-glucano e diversas glicoproteínas. A maior parte das proteínas da parede celular são as denominadas glicosilfosfatidinositol (GPI). Essas estão presentes na parte externa da parede, também são responsáveis pela regulação de interações entre o hospedeiro e o agente patogênico, e estão ligadas covalentemente ao carboidrato β -1,6-glucano (DE GROOT *et al.*, 2013). Relatos atuais mostram três principais famílias de genes relacionados à

produção de adesinas em *C. albicans*, são eles as *aglutinine-like sequence* (ALS), *hyphal wall protein* (Hwp) e *hyphally up regulated protein* (HYR/IFF) (DE GROOT *et al.*, 2013; MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

As ALS formam uma família de oito membros (ALS₁ – ALS₇ e ALS₉). A adesina ALS₃, importante na aderência, é regulada de forma positiva durante a infecção vaginal (*in vivo*) e na infecção de células epiteliais bucais (*in vitro*). Os genes dessas proteínas ALS têm a capacidade de codificar glicoproteínas da superfície celular, GPI (MAYER; WILSON; HUBE, 2013). As adesinas Hwp₁, Hwp₂ e Rbt₁ (repressed by tup) formam uma única família. Elas são expressas somente na fase filamentososa e estão presentes quando há a formação de biofilme, agregação célula-célula, adesão de proteínas da superfície celular e acoplamento (DE GROOT *et al.*, 2013). A proteína Hwp₁ apresenta um importante papel na ligação epitelial e está vinculada a GPI. Esta proteína forma uma ligação forte, pois seu domínio N-terminal funciona com um substrato para transglutaminases epiteliais se ligarem covalentemente a outras proteínas epiteliais. Além disso, a Hwp₁ também pode contribuir para formação de biofilmes em superfícies orais (MAYER; WILSON; HUBE, 2013)

A família *HYR / IFF* é composta por doze genes com alto grau de similaridade de sequência nos seus domínios. Estudos ainda não identificaram os substratos moleculares dessa família, mas sabe-se que ela tem grande importância clínica. O gene *IFF₁₁*, por exemplo, tem um relevante papel na organização da parede celular, pois ele ocasiona alterações significativas nessa parede. Já o gene *IFF₄* é responsável pela codificação da proteína que aumenta a adesão às células epiteliais e ao plástico, enquanto o gene *Hyr1* codifica uma proteína que tem demonstrado relação com aumento de resistência à morte dos neutrófilos (DE GROOT *et al.*, 2013).

Atividade Enzimática e Toxinas

A atividade enzimática tem grande relevância na patogenicidade, pois é um fator que facilita a penetração do patógeno no tecido do hospedeiro. As enzimas fosfolipases (PL) e lipases (LIP) desempenham funções de adesão, invasão epitelial e aquisição de nutrientes em *Candida* spp. Foram identificados até o momento dez genes que formam a família das LIP (LIP₁ – LIP₁₀) e sete genes de PL (PLA, PLB₁, PLB₂, PLC₁, PLC₂,

PLC3 e PLD1). A produção de ambas as enzimas pode estar diretamente relacionada na facilitação de penetração no tecido do hospedeiro devido o fato delas estarem concentradas nas pontas das hifas (WILLIAMS *et al.*, 2013).

A *C. albicans*, por exemplo, produz enzimas conhecidas como proteases (proteínases, peptidases ou enzimas proteolíticas), capazes de degradar IgA presente na saliva, diminuindo assim o efeito protetor desses anticorpos, facilitando a ação do microrganismo na mucosa oral. Além disso, a atividade de proteases está diretamente relacionada à degradação, não somente de hemoglobinas, mas também de albumina, caseína, queratina e colágeno (HUANG, 2012). Estudos mostram que as proteases estão relacionadas à aderência, alterações na resposta imunitária, danos nos tecidos, invasão das hifas em um epitélio oral e apoptose de células epiteliais (WILLIAMS *et al.*, 2013).

Substâncias proteicas (toxinas) produzidas por *Candida* spp. são consideradas fatores de virulência pois possuem efeito antibiótico para outros fungos e bactérias. Essas substâncias são denominadas fatores *killer*. O fator *killer* tem ação direta na membrana citoplasmática, ocasionando um aumento da permeabilidade, inibição do transporte ativo de aminoácidos, perda de íons de potássio e acidificação no interior das células, resultando na morte celular (WILLIAMS *et al.*, 2013).

1.1.3 Principais Antifúngicos Utilizados para Tratamento de Infecções Causadas por Fungos do Gênero *Candida*

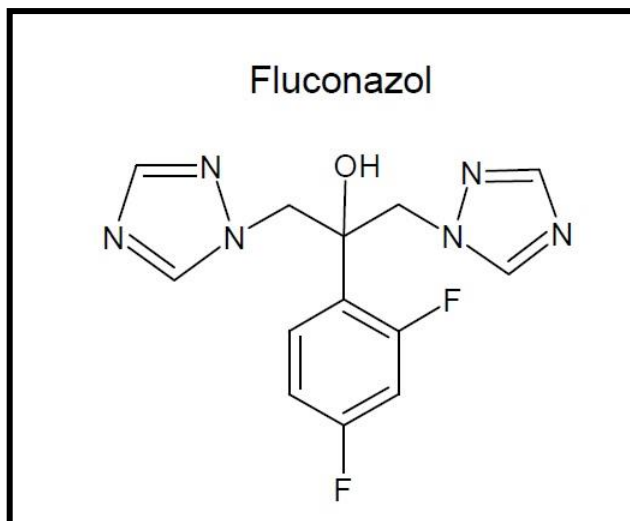
Os antifúngicos são classificados de acordo com sua ação biológica, podendo ser *fungicidas*, substâncias que matam as células, ou *fungistáticos*, substâncias que inibem o crescimento fúngico. Cada antifúngico apresenta um mecanismo de ação e eles são classificados de acordo com a ação exercida nas células fúngicas. A terapia antifúngica requer cuidados, pois existem semelhanças fisiológicas e bioquímicas entre as células do hospedeiro humano e a célula fúngica. A espécie *C. albicans* é a mais frequentemente isolada, contudo, outras espécies também são identificadas em porcentagens menores, por isso é de vital importância a identificação da espécie para uma terapia adequada (DA SILVA-ROCHA *et al.*, 2014; KONSTANTYNER *et al.*, 2013).

Os principais antifúngicos usados para tratamento de candidíase são os da classe dos poliênos e azóis. Não é incomum, na utilização dos antifúngicos de uso clínico, a falha terapêutica. A formação de biofilme dificulta o tratamento de infecções por cepas de *Candida* spp., pois diminui a permeabilidade do antifúngico e, em consequência, a sua ação. Logo, esse fator é importante para seleção de cepas resistentes aos antifúngicos de uso clínico (MORALES *et al.*, 2013; SHINDE *et al.*, 2012)

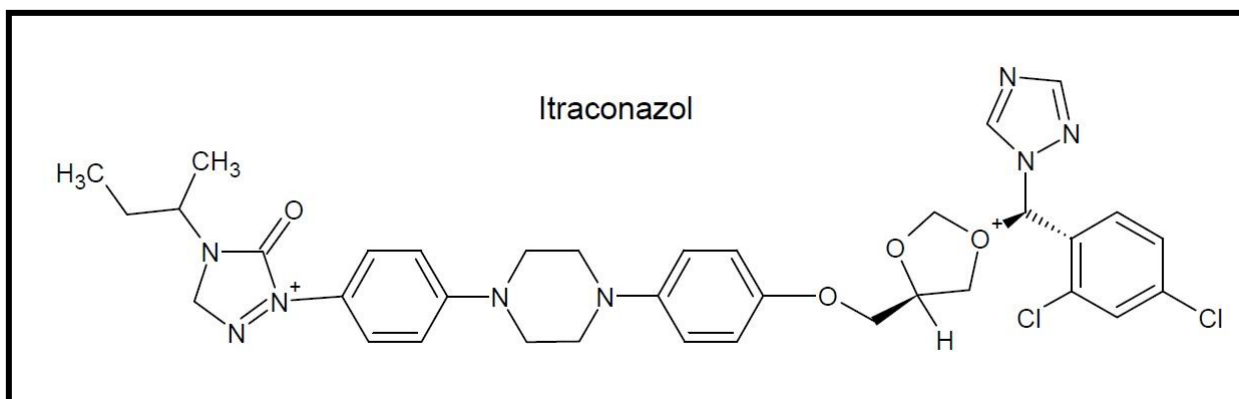
1.1.3.1 Derivados Azólicos

Os fármacos pertencentes à família dos azóis, heterocíclicos, possuem um amplo espectro, biodisponibilidade oral e baixa toxicidade. Os imidazóis apresentam dois átomos de nitrogênio no anel heterocíclico nas posições um e três e os substituintes ligados numa orientação espacial fixa (VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012). Os triazóis apresentam três átomos de nitrogênio no mesmo anel citado acima. Os triazóis são metabolizados mais lentamente e exercem menos efeito sobre a síntese de esteróis humanos em comparação aos imidazóis. A família dos imidazóis inclui principalmente o cetoconazol (Figura 12), miconazol, econazol e o clotrimazol. Já a família dos triazóis apresenta principalmente o fluconazol (Figura 10), itraconazol (Figura 11), voriconazol e o posaconazol. Os azóis atuam sobre a membrana celular fúngica, mais especificamente no ergosterol (inibindo a conversão do lanosterol em ergosterol), principal esterol presente na membrana celular dos fungos. Ao agir na síntese do ergosterol, esses antifúngicos modificam a permeabilidade da membrana facilitando a saída de íons de potássio e açúcares (ÁLVAREZ-PÉREZ *et al.*, 2016; HUSAIN *et al.*, 2013).

Esses agentes antifúngicos, em geral apresentam ação fungistática, e são os de primeira escolha para o tratamento de infecções relacionadas à *Candida* spp. (EDDOUZI *et al.*, 2013).

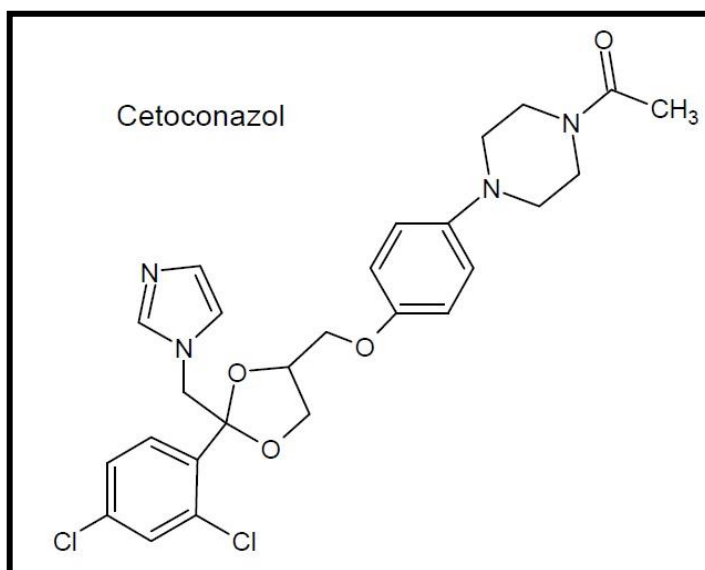
Figura 10: Estrutura 2D – Fluconazol

Fonte: Produção própria. Programa de Desenho de Estruturas Químicas –
CHEMSKETCH

Figura 11: Estrutura 2D - Itraconazol

Fonte: Produção própria. Programa de Desenho de Estruturas Químicas –
CHEMSKETCH

Figura 12: Estrutura 2D - Cetoconazol



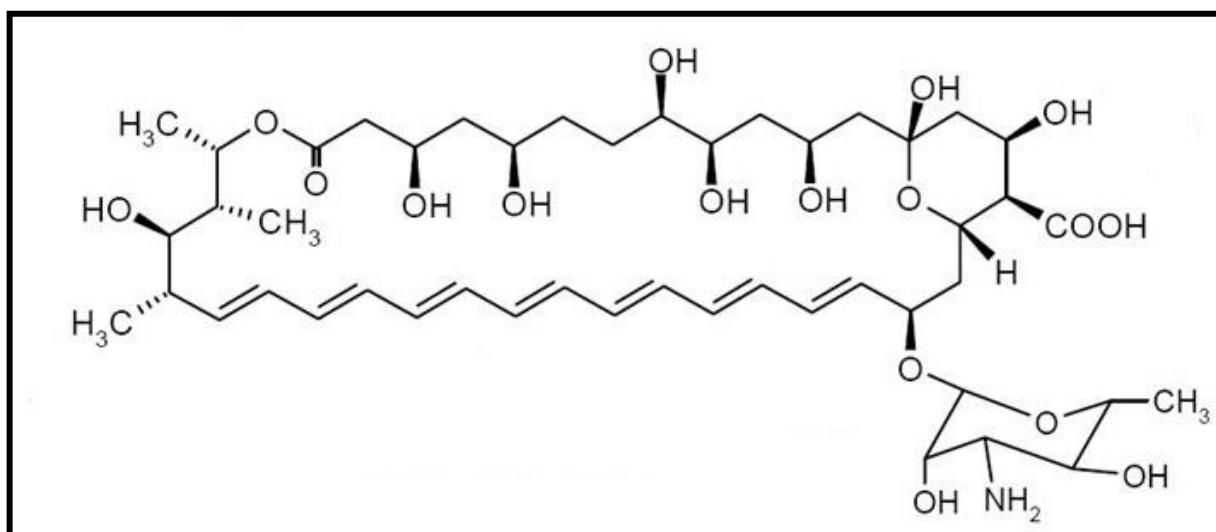
Fonte: Produção própria. Programa de Desenho de Estruturas Químicas – CHEMSKETCH

1.1.3.2 Derivados dos Poliênos

A classe dos poliênos é representada principalmente pela Anfotericina B (Figura 13) e a Nistatina (Figura 14), para o tratamento de infecções por *Candida* spp. (EDDOUZI *et al.*, 2013). Eles são macrolídeos de grande importância, pois apresentam um amplo espectro de atividade e baixa tendência de desenvolvimento de resistência antifúngica. Os poliênos atuam em infecções fúngicas superficiais e invasivas, contudo, apresentam alta toxicidade principalmente em relação às células do rim, pois são vulneráveis a ação hemolítica do poliêno (THEILL *et al.*, 2016; VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012) O mecanismo de ação dessa classe ocorre com a formação de “poros” na membrana celular fúngica quando o antifúngico se liga ao ergosterol presente na membrana, facilitando a saída de íons de potássio e açúcares.

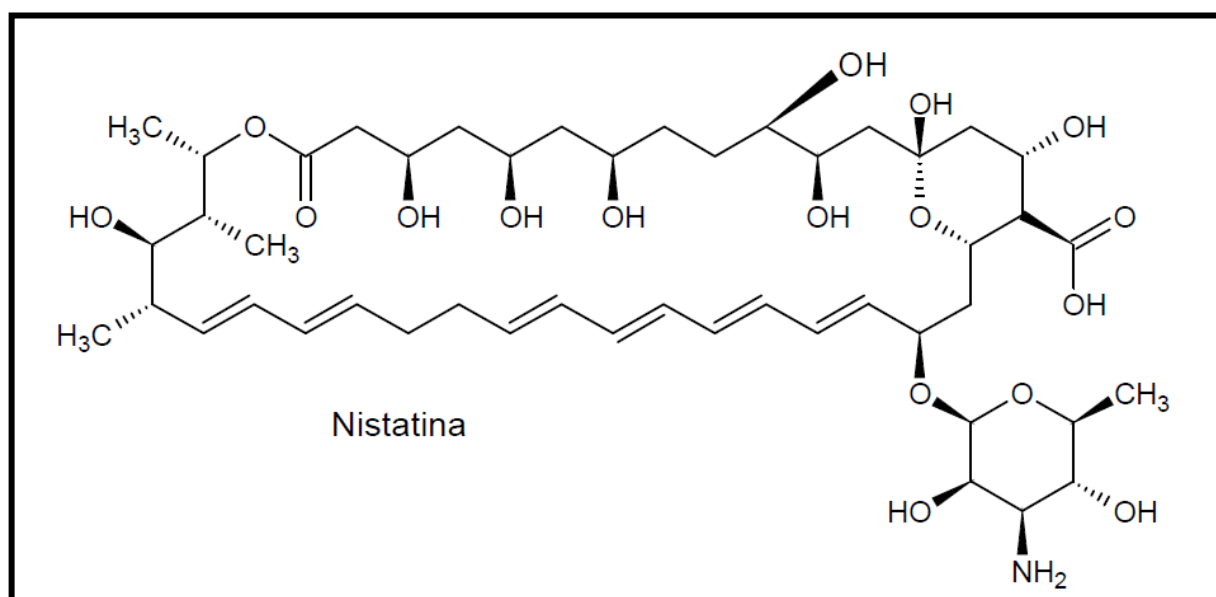
A anfotericina B é o principal exemplo de Poliêno, introduzida em 1958 pela Squibb Laboratories, e por 40 anos foi o fármaco utilizado para infecções antifúngicas. Mesmo com sua nefrotoxicidade (PFALLER, 2012), permanece atualmente como antifúngico de escolha no tratamento de infecções graves. Esse fármaco é insolúvel em água, pois apresenta uma porção lipofílica.

Figura 13: Estrutura 2D - Anfotericina



Fonte: Produção própria. Programa de Desenho de Estruturas Químicas –
CHEMSKETCH

Figura 14: Estrutura 2D – Nistatina



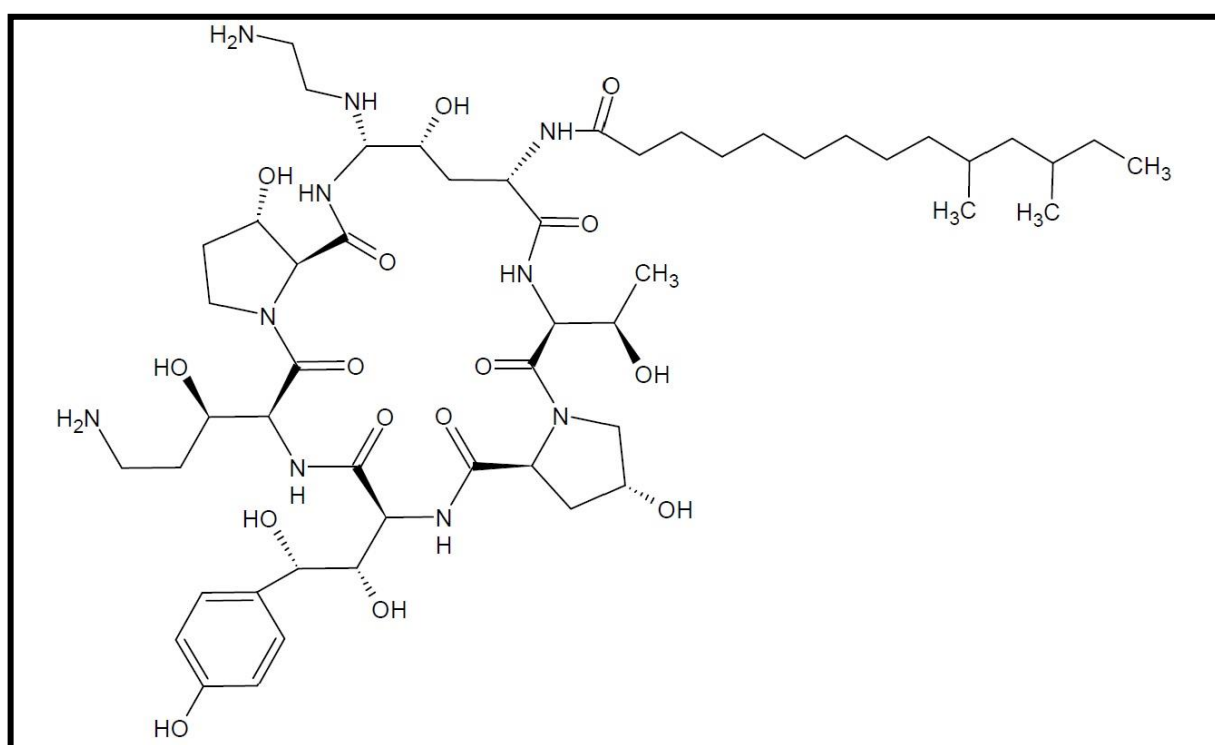
Fonte: Produção própria. Programa de Desenho de Estruturas Químicas –
CHEMSKETCH

1.1.3.3 Derivados das Equinocandinas

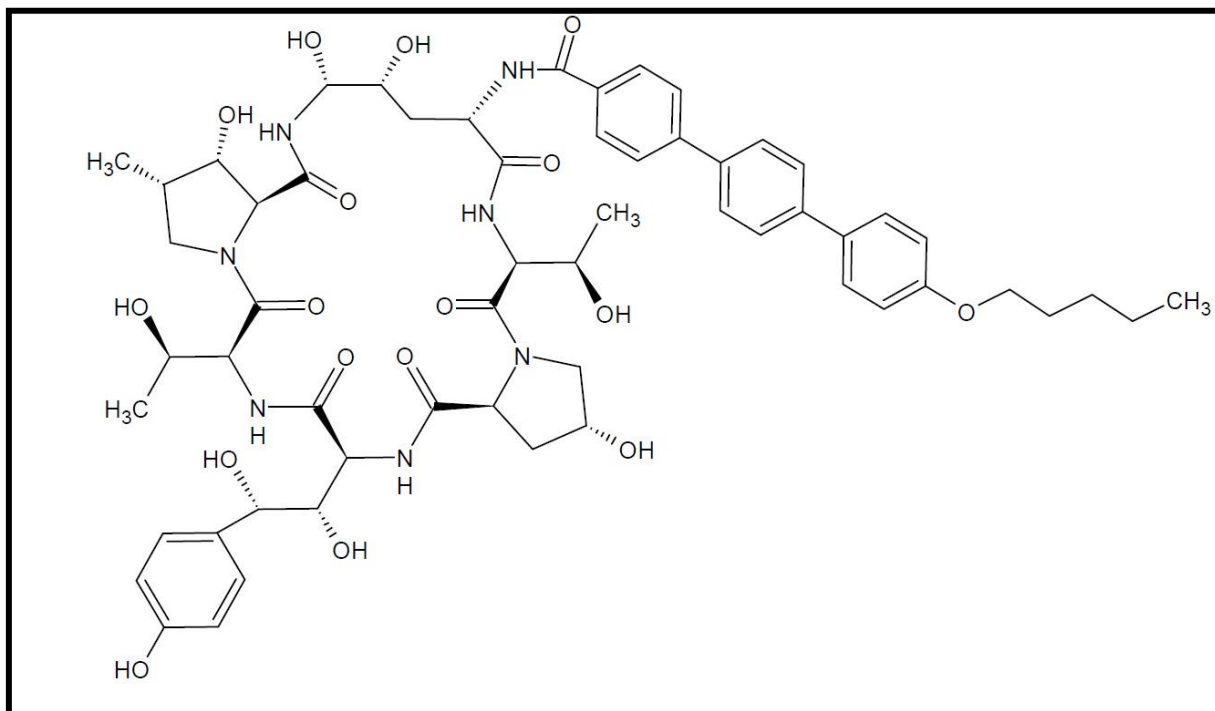
Usada como primeira escolha para o tratamento por infecções de *C. glabrata* devido à sensibilidade diminuída aos azóis, a classe das equinocandinas é composta

por lipopeptídeos semissintéticos, são eles: caspofungina, micafungina e anidulafungina (NAICKER *et al.*, 2016). A caspofungina (Figura 15) foi originalmente obtida a partir da espécie *Glarea lozoyensis*, enquanto a micafungina (Figura 17) foi obtida a partir da espécie *Coleophoma empetri*, e a anidulafungina (Figura 16) do *Aspergillus nidulans*. Essas moléculas sofreram alterações laboratoriais após suas obtenções e elas apresentam peso molecular superior 1200 Da. Infecções fúngicas sistêmicas em pacientes imunocomprometidos também são tratadas com essa família, que tem seu mecanismo de ação na síntese de glicanos da parede celular fúngica, inibindo a enzima 1,3-glicano sintase. Essa enzima impede a manutenção da integridade e rigidez da parede celular de fungos, resultando em uma lise celular. Devido à equinocandinas terem facilidade de se ligar à proteínas plasmáticas, e a baixa absorção destes fármacos pelo trato gastrointestinal devido aos altos pesos moleculares, sua administração costuma ser intravenosa (AZANZA PEREA, 2016; IMBERT *et al.*, 2016; NAICKER *et al.*, 2016; YANG, QIANTING *et al.*, 2016).

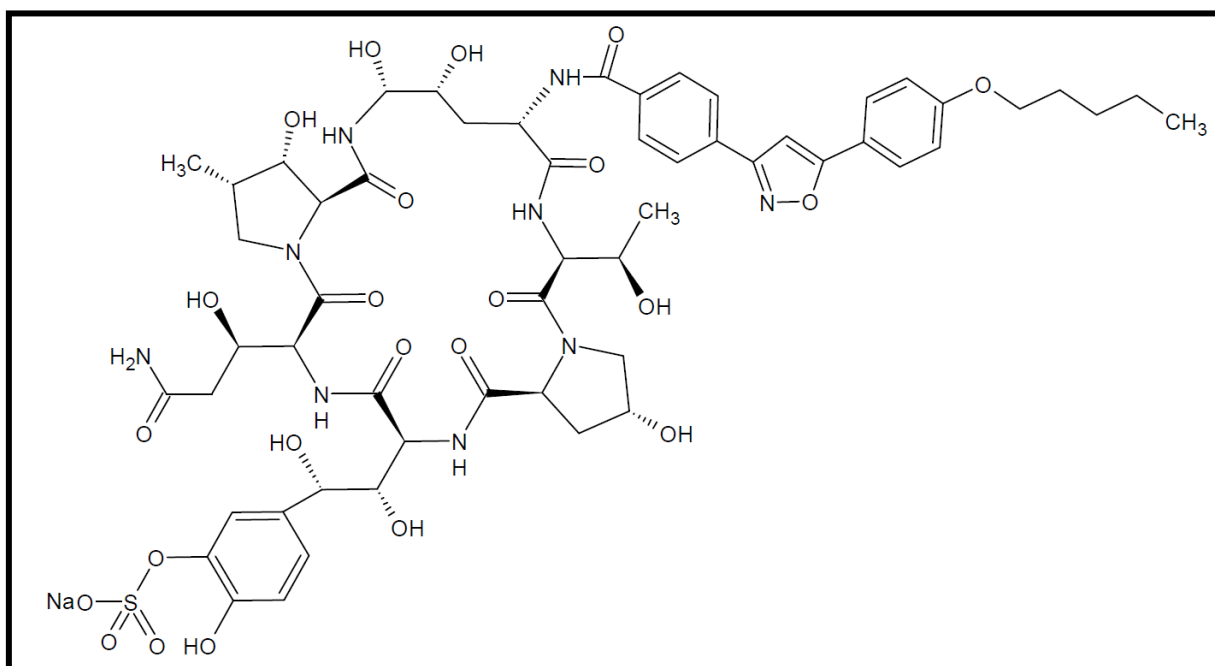
Figura 15: Estrutura 2D - Caspofungina



Fonte: Produção própria. Programa de Desenho de Estruturas Químicas –
CHEMSKETCH

Figura 16: Estrutura 2D - Anidulafungina

Fonte: Produção própria. Programa de Desenho de Estruturas Químicas –
CHEMSKETCH

Figura 17: Estrutura 2D - Micafungina

Fonte: Produção própria. Programa de Desenho de Estruturas Químicas –
CHEMSKETCH

1.1.4 Resistência Antifúngica

Infecções ocasionadas por diferentes espécies de fungos têm acometido principalmente pacientes imunocomprometidos como portadores de leucemia, *Diabetes mellitus*, AIDS, linfoma, entre outros. Atualmente no mercado há poucas opções de agentes antifúngicos, e nos últimos anos o isolamento de cepas susceptíveis a esses antifúngicos tem aumentado consideravelmente por causa do uso indiscriminado de antimicrobianos de amplo espectro, instalações de sondas e cateteres, aumento do número de pacientes com doenças base, aumento do uso terapêutico que deprime o sistema imunológico, e aumento de infecções imunossupressivas (EDDOUZI *et al.*, 2013). A utilização indiscriminada e inadequada de agentes antifúngicos tem induzido uma pressão seletiva sobre as cepas fúngicas, sendo observados principalmente dois tipos de resistência: primária e secundária (ALASTRUEY-IZQUIERDO *et al.*, 2015).

Um microrganismo é considerado resistente quando o mesmo não é inibido *in vitro* pelas concentrações normalmente prescritas do antimicrobiano (MULU *et al.*, 2013). A resistência primária ou intrínseca é observada no momento em que uma cepa é “naturalmente” resistente antes de ser exposta ao fármaco, como por exemplo, a *C. glabrata* e a *C. krusei* frente ao fluconazol (ALASTRUEY-IZQUIERDO *et al.*, 2015), e chamamos de resistência secundária ou adquirida quando a resistência é originada por aquisição ou modificação do material genético, permitindo que tais microrganismos possam sobreviver e se reproduzir mesmo na presença do fármaco. Existem também alguns tipos de mecanismos de resistência microbiana que variam de acordo com o fármaco (EDDOUZI *et al.*, 2013).

Mesmo com uma gama de agentes antimicrobianos atualmente disponíveis no mercado, o surgimento de cepas resistentes a esses fármacos tem aumentado significativamente nos últimos tempos. Atualmente, os antimicrobianos utilizados na prática clínica apresentam pelo menos um relato de cepa resistente, sendo de grande preocupação tal situação. Podemos ressaltar a necessidade do controle da utilização adequada desses agentes antimicrobianos, até mesmo quimioterápicos e a importância da pesquisa e descoberta de novos medicamentos com ação antifúngica (MULU *et al.*, 2013).

1.1.4.1 Resistência aos fármacos azólicos

A resistência aos fármacos azólicos ocorre principalmente após a mutação no gene que codifica o alvo (14 α -demetilase CYP51) da droga ERG₁₁, alterando assim o domínio de ligação dos azóis. Essa modificação se dá devido à modificação da enzima alvo dos azóis, a 14 α -demetilase, que é responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol (KABIR; HUSSAIN; AHMAD, 2012; OLIVEIRA CARVALHO *et al.*, 2013; PFALLER, 2012). Outro mecanismo de resistência é a alteração na expressão da bomba de efluxo, CDR1, CDR2, MDR1 (ÁLVAREZ-PÉREZ *et al.*, 2016; VASICEK *et al.*, 2014).

1.1.4.2 Resistência aos fármacos poliênos

Ao tratarmos de polienos, mais precisamente da Anfotericina B, há poucos relatos de resistência, contudo, o mecanismo utilizado é a alteração na biossíntese do ergosterol, resultando em uma baixa quantidade do mesmo na membrana fúngica, diminuindo as ligações entre o fármaco e o ergosterol, não havendo assim a formação dos “poros”. Outro mecanismo é o aumento na produção de catalase, diminuindo o dano oxidativo do fármaco associado (PFALLER, 2012).

1.1.4.3 Resistência aos fármacos equinocandinas

Há poucos relatos relacionados à resistência as equinocandinas, contudo, a enzima que inibe um componente essencial à parede celular fúngica, a enzima 1,3-glicano sintase, é um complexo de enzimas compostas por subunidades, Fksp e Rho1p (subunidade catalítica). Estudos relatam que as equinocandinas se ligam à FKsp e esta é codificada por três genes (*Fks1*, *FKS2* e *FKS3*), logo, a diminuição da sensibilidade à equinocandinas está associada com substituições dos aminoácidos em duas regiões *hot-spot* altamente conservadas dos genes Fksp (AZANZA PEREA, 2016; NAICKER *et al.*, 2016; YANG, QIANTING *et al.*, 2016).

1.1.5 Fonte de Novos Fármacos

A maior incidência de infecções oportunistas principalmente por pacientes imunocomprometidos, o aumento da mortalidade vinculada a esses patógenos e o aumento de cepas microbianas resistentes, incluindo cepas de *Candida* spp., mostra a necessidade da busca de novos fármacos com amplo espectro de atividade biológica. A busca de novos antimicrobianos de origem vegetal, animal, sintética ou semissintética que permitam o tratamento de infecções causadas por organismos patogênicos é de grande interesse e relevância mundial (EL-GAMEL; FARGHALY, 2013; MALLADI *et al.*, 2014).

1.1.5.1 Pirazol

O primeiro pirazol foi descrito por Buchner e o mesmo foi extraído de uma planta da Ásia tropical (HUSAIN *et al.*, 2013; MALLADI *et al.*, 2014). As elevadas propriedades terapêuticas dos compostos pirazólicos tem sido alvo de estudo, pois apresentam potencial contra atividade tumoral *in vitro* e *in vivo*, anti-hiperglicêmica, além de apresentar relatos sobre essa estrutura estar relacionada com ação fungicida e fungistática (MALLADI *et al.*, 2014), anti-inflamatória, anti-tuberculose, antiparasitária, anticancerígena, anti-neoplásica, antimicrobiana com potencial microbicida contra o papilomavírus, e o vírus da imunodeficiência humana (KENDRE; LANDGE; BHUSARE, 2015), ação antimalárica e anti-leshmanicida (BEKHIT *et al.*, 2015).

1.1.5.2 Pirazolona

As pirazolonas apresentam diversas propriedades farmacológicas já descritas na literatura, são elas: ação analgésica, com fármaco muito utilizado no mercado como, por exemplo, a dipirona (MALLADI *et al.*, 2014), além de ação anti-inflamatória (KHALIL *et al.*, 2014), antipirético, antioxidante, antiproliferativo (ANTRE *et al.*, 2011), antibacteriano e antifúngico (NARAYANA RAO *et al.*, 2014; RAMAN; SELVAGANAPATHY, 2013). Essa classe apresenta atividade promissora para o tratamento de doenças neurodegenerativas fatais, doenças cardiovasculares, isquemia cerebral e do miocárdio (ANTRE *et al.*, 2011).

1.1.5.3 Quinonas

A classe das quinonas e seus análogos heterocíclicos apresentam facilidade em processos de oxidação-redução e por isso estão envolvidos em processos bioquímicos como: transporte de elétrons, oxidação e fosforilação, além de apresentarem diversas atividades biológicas. Esta classe pode ser dividida em: benzoquinonas, naftoquinonas e antraquinonas, entre outras. As naftoquinonas podem ser isoladas a partir de bactérias, líquens, algas, plantas superiores, fungos e insetos (HOOK; MILLS; SHERIDAN, 2014). Essas estruturas são importantes na química medicinal devido a atividade biológica contra células tumorais e protozoários patogênicos (DA CRUZ *et al.*, 2014; SALOMÃO *et al.*, 2013). A literatura relata ainda uma vasta atividade biológica como, por exemplo, atividade antifúngica (CASTRO *et al.*, 2013), antibacteriana, antimalárica, antipirético (PINHO *et al.*, 2011) e anti-inflamatória (HOOK; MILLS; SHERIDAN, 2014).

Considerando-se todo quadro patogênico causado pela *Candida* spp., além da resistência e toxicidade relacionadas aos fármacos disponíveis hoje no mercado para o tratamento destas infecções, é necessário a premente busca de novos fármacos com ação antifúngica de amplo espectro de ação e baixa toxicidade. Logo, formula-se a hipótese científica de que a partir de novos derivados sintéticos oriundos de diferentes classes químicas, é possível identificar compostos com potencial antifúngico e com menor toxicidade.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o perfil antifúngico de derivados sintéticos oriundos de diferentes classes químicas frente à cepas fúngicas da *American Type Culture Collection* - ATCC do gênero *Candida* e comparar com antifúngicos de uso clínico para determinação do potencial terapêutico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antifúngica através do Teste de Sensibilidade Antimicrobiana por Disco Difusão de derivados sintéticos frente às cepas padrão do gênero *Candida*.
- Avaliar a toxicidade *in silico* dos derivados que apresentarem atividade no teste de sensibilidade, no programa Osiris Property Explorer.
- Estabelecer a Concentração Inibitória Mínima dos derivados que apresentarem atividade no teste de sensibilidade.
- Avaliar o efeito inibitório dos derivados testados, bem como seus efeitos sobre a viabilidade celular através da Curva de Crescimento, usando espectrofotometria de absorção.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS BIOLÓGICAS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

As cepas do gênero *Candida* da *American Type Culture Collection* (ATCC) utilizadas neste estudo para verificação do efeito antifúngico, seletividade e espectro dos novos protótipos sintéticos a antifúngicos foram doadas pelo Dr. Ivano de Filippis, curador da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS) da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, mantida no Laboratório de Microrganismos de Referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fiocruz.

Foram utilizadas 06 espécies fúngicas do gênero *Candida*, conforme descritas no Quadro 1.

Quadro 1: Informações das cepas ATCC do gênero *Candida* utilizadas no presente estudo

Cepa Fúngica	Origem Clínica	Local de Isolamento	Meio de Cultivo
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90028	Sangue	Virgínia, EUA	Sabouraud Dextrose a 2%
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	Infecção de unha	Não relatado	YMA
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	Saliva do paciente	Não relatado	YMA
<i>Candida krusei</i> ATCC 34135	Espécime clínico	Minnesota, EUA	YMA
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	Fezes	Não relatado	YMA
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC MYA 646	Cavidade oral de paciente infectado com HIV	Dublin, Irlanda	YMA

Legenda: YMA – “Yeast Malt Agar” meio de cultura para crescimento de leveduras. Fonte: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS. Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS) da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

As cepas liofilizadas foram reativadas seguindo as recomendações/orientações do Instituto ‘Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS, assim como o meio indicado para cada microrganismo (Quadro 1). Com o auxílio de uma alça bacteriológica o conteúdo foi semeado em placas de Petri contendo meio de cultivo apropriado para cada espécie e levado à estufa á 35°C pelo período de 24 h.

Após a reativação das cepas, uma parte foi mantida em temperatura ambiente e outra parte (0,3 mL) foi congelada a - 20°C, conforme orientações do INCQS, em leite glicerinado (90% Leite Molico® desnatado e 10 % glicerol). Para a execução de cada ensaio microbiológico realizado neste estudo, foi feito um repique fúngico em tubos inclinados com meio de cultivo Sabouraud sólido, conforme Figura 18.

O meio de cultivo para o crescimento microbiano foi produzido a partir de uma base desidratada comercial da marca INTERLAB. Para o meio sólido utilizamos o Ágar Sabouraud Dextrose 4% – SDA, enquanto para o meio líquido utilizamos concentrações proporcionais de peptona e dextrose. A esterilização dos meios foi realizada em autoclave sob a pressão de um (1) atm e temperatura constante de 120°C, pelo período de 15 minutos. O pH do meio preparado nestas condições ficou entre 5.4 e 5.6. Todo o procedimento de condição de crescimento e controle biológico seguiu a padronização do *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI* (“CLSI- Metodologia Dos Testes de Sensibilidade microbiana”, 2008; DANIEL J. SHEEHAN, PH.D. *et al.*, 2009).

Figura 18: Tubos de meio Sabouraud com repique das espécies de *Candida* spp.



Fonte: Arquivo pessoal. Tubos contendo meio Sabouraud, com repique de diferentes espécies de *Candida*, mantidas à 35°C, no LabiemoL.

Uma vez realizado o repique, as cepas foram incubadas por 24 horas a 35°C ± 2. Após esse período, as colônias foram suspensas em 5 mL de solução salina estéril (8,5g/L NaCl), conforme ilustrado na Figura 19. Após a suspensão das colônias, a solução foi agitada com auxílio do vortex, durante 15 segundos, e a densidade celular foi ajustada de acordo com a solução-padrão da escala 0,5 de McFarland. A temperatura de incubação foi de 35°C ± 2°C, durante 5 a 10 minutos, para os seguintes testes: Sensibilidade Antimicrobiana - TSA e Concentração Mínima Inibitória - CIM. Todo esse procedimento fornece uma suspensão-padrão de leveduras contendo 1 x 10⁶ a 5 x 10⁶ células por mL.

Figura 19: Tubos com inóculo de diferentes espécies de *Candida* spp.



Fonte: Arquivo pessoal. Tubos com colônias de diferentes espécies *Candida* spp. suspensas em 5 mL de solução salina estéril (8,5g/L NaCl) – LabiemoL

3.2 DERIVADOS QUÍMICOS

Neste estudo, foi testado um total de 111 derivados sintéticos pertencentes a sete diferentes classes orgânicas, sintetizados por diferentes Grupos de Pesquisadores da Química da UFF e da FIOCRUZ, mencionadas no Quadro 2.

Quadro 2: Informações sobre as classes químicas testadas no presente estudo

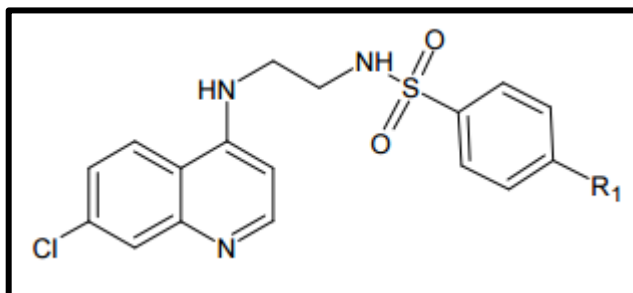
Classe Química	Número de Moléculas Sintetizadas	Grupo de Pesquisadores Responsáveis pela Síntese	Coordenador / Instituto
Sulfonamidas	15	Laboratório de Síntese de Fármacos – FARMANGUINHOS	Dr. Luiz Pinheiro – FIOCRUZ
Hidrazonas	8	Laboratório de Conversão – LABCON/NAB	Dr. Gilberto A. Romeiro – UFF
Organofosforados	3	Grupo de Pesquisa em Organofosforados – GPOP	Dr. Marcos Costa – UFF
Organometálicos	17	Laboratório de Síntese Organometálica – LSOM	Dr ^a Maria Vargas –UFF
Pirazóis	47	Laboratório de Síntese de Heterociclos – LASINTHET	Dr ^a Alice Rolim – UFF
Pirazolonas	5	Laboratório de Síntese de Heterociclos – LASINTHET	Dr ^a Alice Rolim – UFF
Naftoquinonas	16	Laboratório de Catálise e Síntese – CSI	Dr ^a Daniela Luna - UFF

Devido ao ineditismo e a possibilidade de patente, a estrutura dos derivados não será divulgada neste estudo, logo iremos ilustrar somente o núcleo base de cada série testada.

3.2.1 Derivados de Sulfonamida

O Departamento de Síntese de Fármacos coordenado pelo professor Dr. Luiz Pinheiro sintetizou quinze derivados inéditos de sulfonamida (**01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15**), sendo o mestrando Carlos Candido responsável pela síntese. A seguir a Figura 20 ilustra o núcleo base da série inédita de sulfonamidas testadas.

Figura 20: Núcleo base da série inédita das Sulfonamidas onde modificações estruturais possibilitaram a formação de quinze moléculas de uma série

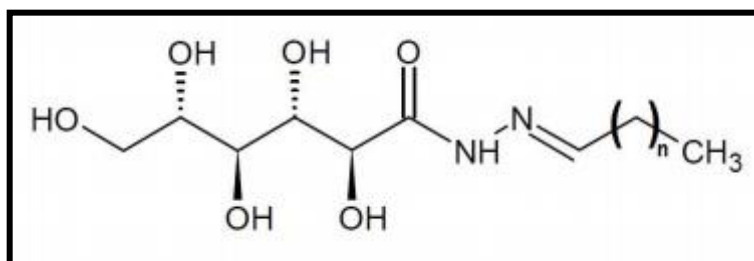


Fonte: Produção Própria – Auxílio do Programa de desenho de moléculas – CHEMSKETCH

3.2.2 Derivados de Hidrazona

O Laboratório de Conversão coordenado pelo professor Dr. Gilberto A. Romeiro sintetizou oito derivados inéditos de hidrazonas (**MS2, GML 020, GML021, DEC, DOD, NON, OCT, UND**), sendo o aluno Bruno Salarini responsável pela síntese. A seguir a Figura 21 ilustra o núcleo base da série inédita de hidrazonas testadas.

Figura 21: Núcleo base da série inédita de Hidrazona onde modificações estruturais possibilitaram a formação de oito moléculas de diferentes séries (MS, GML)

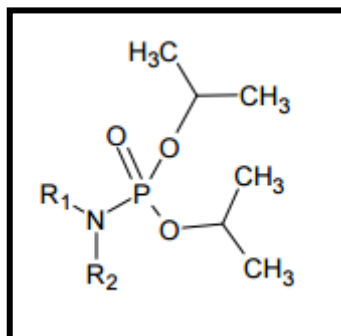


Fonte: Produção Própria – Auxílio do Programa de desenho de moléculas - CHEMSKETCH

3.2.3 Derivados Organofosforados

O Grupo de Pesquisa em Organofosforado coordenado pelo professor Dr. Marcos Costa sintetizou três derivados inéditos de organofosforados (**ABC 11; ABC 45; ABC 46**), sendo a doutoranda Carlene Rodrigues responsável pela síntese. A seguir a Figura 22 ilustra o núcleo base da série inédita de derivados organofosforados testados.

Figura 22: Núcleo base da série inédita dos Organofosforados onde modificações estruturais possibilitaram a formação de três moléculas de uma série (ABC)

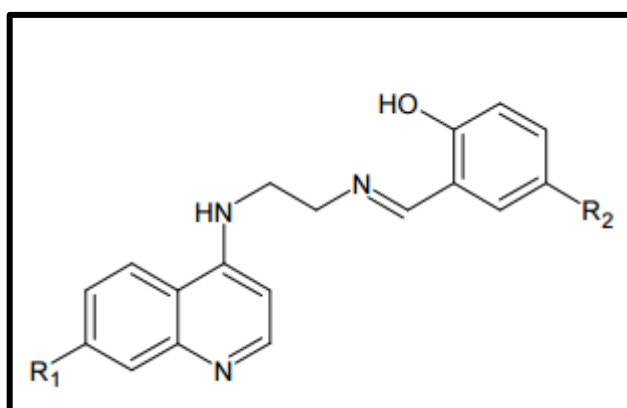


Fonte: Produção Própria – Auxílio do Programa de desenho de moléculas – CHEMSKETCH

3.2.4 Derivados Organometálicos

O Laboratório de Síntese Organometálica coordenado pela professora Dr^a Maria Domingues Vargas sintetizou dezessete derivados inéditos (**VS 01, VS 02, VS 03, VS 04, VS 05, VS 06, VS 07, VS 08, VS 09, VS 10, VS 11, VS 12, VS 13, VS 14, VS 15, VS 16, VS 17**), sendo a mestrandia Vanessa Zannon responsável pela síntese. A seguir a Figura 23 ilustra o núcleo base da série inédita de derivados organometálicos testados.

Figura 23: Núcleo base da série inédita dos derivados Organometálicos onde modificações estruturais possibilitou a formação de dezessete moléculas de uma série (VS)



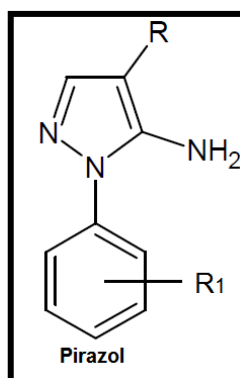
Fonte: Produção Própria – Auxílio do Programa de desenho de moléculas – CHEMSKETCH

3.2.5 Derivados de Pirazol e Pirazolona

O Laboratório de Síntese de Heterociclos coordenado pela professora Dr^a Alice Maria Rolim Bernardino sintetizou trinta derivados inéditos da classe dos pirazóis, sendo o pós - doc Júlio Borges responsável pela síntese, e os derivados divididos em 03 séries, são elas: MSJ (**MSJ 01, MSJ 02, MSJ 04, MSJ 05, MSJ 07, MSJ 08, MSJ 11, MSJ 13, MSJ 14, MSJ 20**), MSD (**MSD 01, MSD 03, MSD 04, MSD 05, MSD 10, MSD 11, MSD 12, MSD 14, MSD 20**), MPQ (**MPQ 01, MPQ 02, MPQ 03, MPQ 04, MPQ 05, MPQ 07, MPQ 08, MPQ 12, MPQ 13, MPQ 14, MPQ 20**).

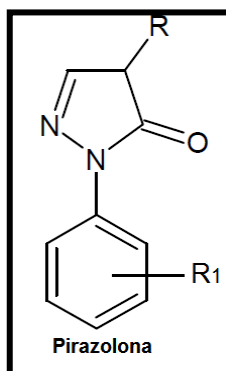
Foram sintetizados mais vinte e dois derivados inéditos, sendo dezessete pirazóis (séries PVQD e PFVD) e cinco pirazolonas (série PVY), sendo a doutoranda Percilene Fazolin responsável pela síntese, e os derivados divididos em 3 séries, PVY (**PVY 05, PVY 08, PVY 09, PVY 10, PVY 16**), PVQD (**PVQD 01, PVQD 10, PVQD 13, PVQD 14, PVQD 15**), PFVD (**PFVD 01, PFVD 03, PFVD 04, PFVD 05, PFVD 07, PFVD 09, PFVD 10, PFVD 12, PFVD 13, PFVD 14, PFVD 16, PFVD 17**). A seguir as Figura 24 e 25 ilustram o núcleo base da série inédita de derivados de pirazol e pirazolona testados, respectivamente.

Figura 24: Núcleo base da série inédita de Pirazóis onde modificações estruturais possibilitaram a formação de quarenta e sete moléculas de diferentes séries (MSJ, MSD, MPQ, PVQD e PFVD)



Fonte: Produção Própria – Auxílio do Programa de desenho de moléculas – CHEMSKETCH

Figura 25: Núcleo base da série inédita das Pirazolonas onde modificações estruturais possibilitaram a formação de cinco moléculas de uma série (PVY)

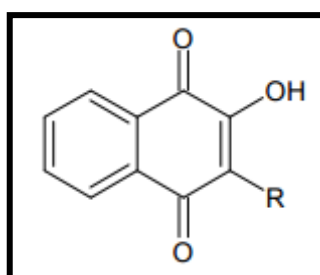


Fonte: Produção Própria – Auxílio do Programa de desenho de moléculas – CHEMSKETCH

3.2.6 Derivados de Naftoquinona

O Laboratório de Catálise e Síntese coordenado pela professora Dr^a Daniela Luna Martins sintetizou dezesseis derivados inéditos de naftoquinona (**AN 02, AN 03, AN 04, AN 05, AN 06, AN 07, AN 08, AN 10, AN 11, AN 12, AN 13, AN 14, AN 15, AN 16, NO 01 e NO 03**), sendo a mestrandia Aline Louvis responsável pela síntese. A seguir a Figura 26 ilustra o núcleo base da série inédita de derivados de naftoquinona testados.

Figura 26: Núcleo base da série inédita das Naftoquinonas onde modificações estruturais possibilitaram a formação de dezesseis moléculas de diferentes séries (AN, NO)



Fonte: Produção Própria – Auxílio do Programa de desenho de moléculas – CHEMSKETCH

3.3 TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA

O Teste de Sensibilidade Antimicrobiana (TSA) por disco difusão teve por objetivo determinar a presença da atividade antimicrobiana frente às cepas testadas através da presença do halo de inibição microbiano existente ao redor dos discos embebidos com os novos derivados e controles experimentais. Todos os ensaios foram

realizados em triplicatas independentes (“CLSI-Metodologia Dos Testes de Sensibilidade microbiana”, 2008).

3.3.1 Preparo das Soluções-estoque

Todos os derivados testados foram pesados em distintos *eppendorfs*, devidamente identificados, sendo a diluição desses realizada com o volume necessário do solvente dimetilsulfóxido – DMSO a 99,9% do laboratório Sigma-Aldrich®. A Concentração Final foi de 5 mg/mL para cada molécula, inclusive os controles experimentais.

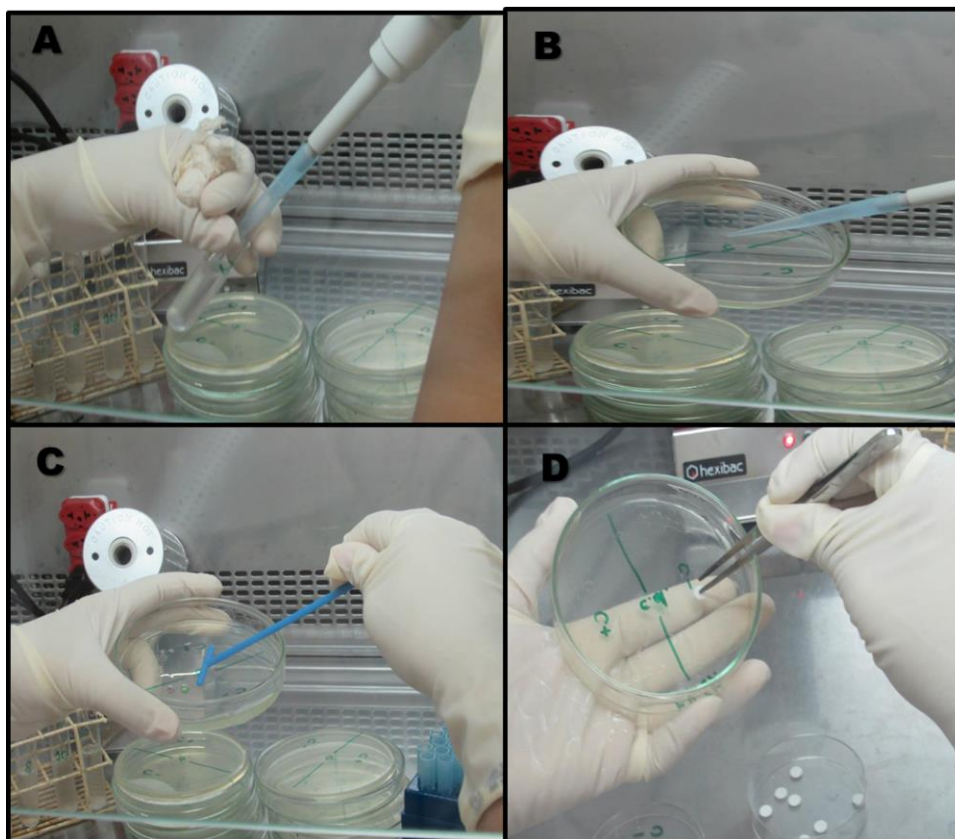
3.3.2 Controles experimentais

Nos ensaios foram utilizados como controles positivos, o Fluconazol (Sigma-Aldrich®) e o Cetoconazol (Sigma-Aldrich®), e como controle negativo o diluente dos derivados, o DMSO a 99,9% (Sigma-Aldrich®).

3.3.3 Protocolo do Teste de Sensibilidade Antimicrobiana

O teste de sensibilidade aos antifúngicos foi realizado pela metodologia de Kirby-Bauer (DANIEL J. SHEEHAN, PH.D. *et al.*, 2009) conforme exemplificado na Figura 27.

Figura 27: Etapas do Teste de Sensibilidade Antimicrobiana

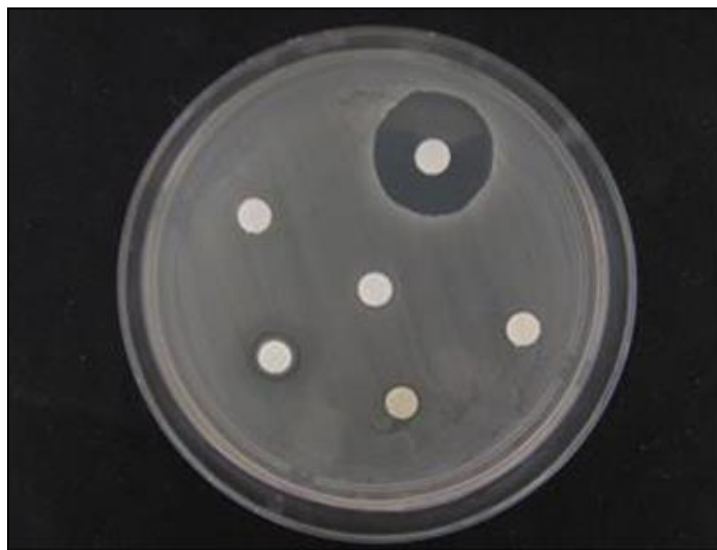


Fonte: Arquivo pessoal. Etapas do TSA: **A:** Retirada de 0,3 mL do inóculo; **B:** Plaqueamento do inóculo, **C:** screening (tapete microbiano); **D:** Colocação dos discos embebidos com o derivado a ser testado. – Labiemol

A partir de um repique de 24h, foi feito um inóculo em 5 mL de solução salina a 0,85% e mantido na estufa durante 10 minutos. Após esse período, ajustou-se o inóculo para escala de Mc Farland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e o mesmo foi semeado na placa de Petri com o auxílio da alça de Drigalski e incubado por 5 minutos para evitar o excesso de umidade. A superfície das placas foi dividida em quadrantes para identificação dos derivados testados. Os discos de papel de filtro esteril foram impregnados com 5 μ L da solução com uma Concentração de 5 mg/mL dos derivados testados e controles experimentais, conforme orientações do CLSI.

A sensibilidade da droga foi determinada através da medida do diâmetro, em milímetros, do halo de inibição do crescimento microbiano conforme Figura 28 (MARCONI *et al.*, 2008).

Figura 28: Halo de inibição do crescimento fúngico de *Candida albicans*, frente ao Fluconazol, no Teste de Sensibilidade Antimicrobiana



Fonte: Arquivo pessoal. Halo de inibição do Fluconazol em placa de Petri com meio de cultivo Ágar Sabouraud, semeada com *Candida albicans* – Labiomol.

3.4 TESTE DE TOXICIDADE *IN SILICO* - OSIRIS® PROPERTY EXPLORER

O preditivo do programa Osiris® avalia o potencial de risco toxicológico das moléculas, além de valores referentes à solubilidade, lipofilicidade, e peso molecular das mesmas. Toda a avaliação é feita através de uma análise comparativa com o banco de dados do programa. O Osiris® dispõe de uma abordagem baseada em fragmentos na estrutura da molécula avaliada que são considerados tóxicos (15.000 substâncias químicas do catálogo Fluka) ou não tóxicos (3.400 fármacos comerciais). Esse programa verifica ainda o índice de semelhança entre as novas moléculas com fármacos comerciais (Druglikeness) e calcula o Drugscore, uma pontuação resultante da combinação dos valores de Druglikeness, lipofilicidade (cLogP), solubilidade (LogS), peso molecular e risco tóxico. O Osiris® é gratuito e disponível na internet através do site: <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>. O Quadro 3, a seguir, mostra os valores ideais de cada parâmetro disponível no programa Osiris® Property Explorer para possíveis novos fármacos com biodisponibilidade oral.

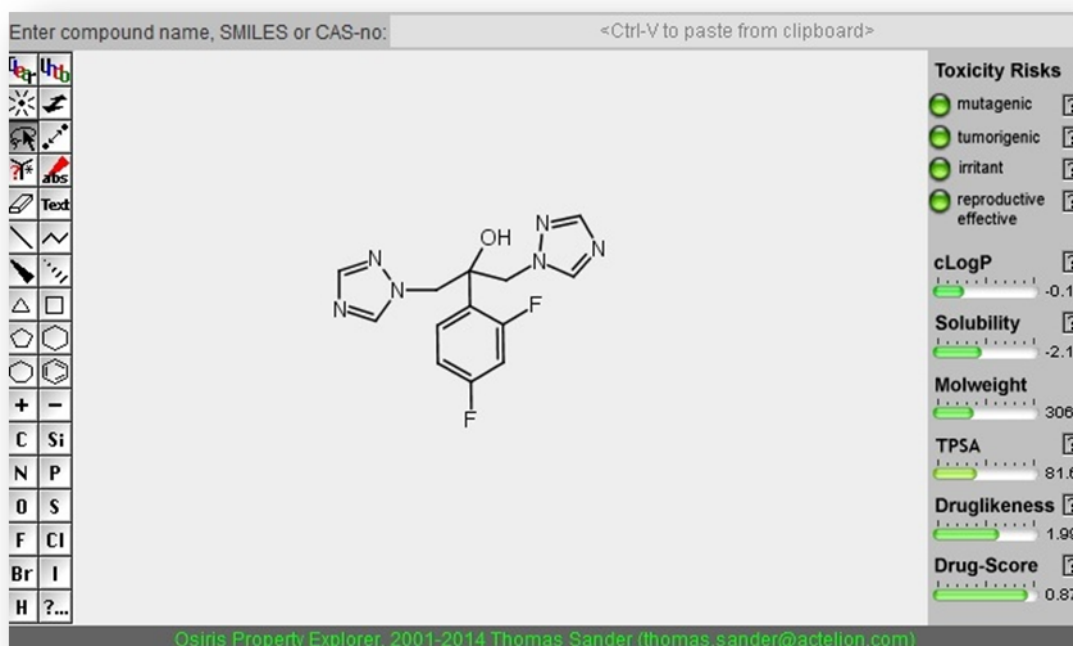
Quadro 3: Valores ideais para os parâmetros do programa Osiris® Property Explorer para caso de biodisponibilidade oral

Parâmetros Avaliados	Valores Ideais
cLogP	Não deve ser maior do que 5
LogS	Não deve ser maior do que -4
Peso Molecular	Não deve ser maior do que 450
<i>DrugLikeness</i>	Valores positivos
<i>DrugScore</i>	Igual a 1

Legenda: cLogP: lipofilicidade; LogS: solubilidade. Fonte: <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>

Atráves do desenho da molécula, o programa faz uma análise dos possíveis riscos toxicológicos através de um quadro com os seguintes padrões: mutagênico, tumorigênico, irritante e efeito reprodutivo, cujas cores correspondem às seguintes informações: verde – molécula apresenta um baixo risco teórico; amarelo – molécula possui médio risco teórico; vermelho – molécula possui alto risco teórico. A Figura 29 exemplifica o quadro do programa com as ferramentas disponíveis para o desenho da molécula e os resultados obtidos na análise toxicológica *in silico* do Fluconazol.

Figura 29: Representação da tela do programa Osiris® Property Explorer utilizando como exemplo o controle positivo Fluconazol



Fonte: <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>. À direita, a cor verde observada em todos os alertas de risco tóxicos indica baixo risco, enquanto os parâmetros de lipofilicidade, solubilidade, peso molecular, druglikeness e drug-score estão de acordo com os valores ideais previsto pelo programa OSIRIS. À esquerda observamos os campos com a utilização de “ferramentas” para modelar a molécula no centro da tela.

3.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Os derivados ativos (apresentaram halo de inibição microbiana) no TSA foram submetidos a determinação da concentração inibitória mínima – CIM, definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível da cultura submetida a diferentes concentrações da molécula testada (MULU *et al.*, 2013; PFALLER, M. A.; DIEKEMA, 2012). Os ensaios foram realizados através da técnica da microdiluição em placas de 96 poços (TPP-Europe, Switzerland).

3.5.1 Preparo das Soluções-estoque

Todos os derivados ativos ao TSA foram pesados em distintos *ependorfs* e devidamente identificados, sendo a diluição desses realizada com o volume necessário

do solvente dimetilsulfóxido – DMSO a 99,9% do laboratório Sigma-Aldrich® e a Concentração Final foi de 512µg/mL para cada molécula.

3.5.2 Controles experimentais

Nos ensaios foram utilizados cinco controles experimentais: a) controle positivo do fármaco, o Cetoconazol (Sigma-Aldrich®) - 200µL em cada poço; b) controle positivo de crescimento, 200µL do inóculo; c) controle negativo, o diluente dos derivados, o DMSO a 99,9% (Sigma-Aldrich®) - 200µL; d) o controle experimental, poços com 200µL com meio de cultivo; e) controle experimental do teste, os poços de número 11 da placa contendo 200µL de meio de cultivo e derivado diluído. Todo o procedimento de controle experimental foi realizado em triplicata.

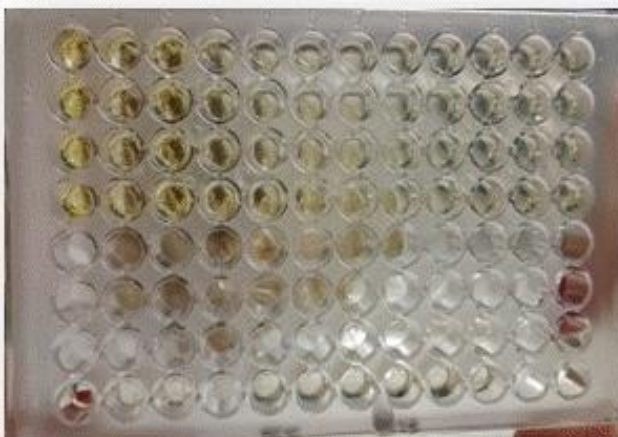
3.5.3 Protocolo da Concentração Inibitória Mínima

A partir de um repique de 24h, foi feito um inóculo em 5mL de solução salina a 0,85%, e mantido na estufa durante 10 minutos. Após esse período, alíquotas foram transferidas para um tubo de ensaio devidamente identificado contendo 9mL de meio de cultivo Sabouraud, até ajustar o inóculo para escala de Mc Farland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) (DANIEL J. SHEEHAN, PH.D. *et al.*, 2009).

Os poços de número um (1) da placa de microtitulação de 96 poços receberam 180µL de meio de cultivo Sabouraud, e os demais receberam 100µL. Em seguida, retirou-se uma alíquota de 20µL da solução estoque do derivado a ser testado e pipetou no poço de número um (1) de cada série, e iniciou-se a diluição seriada pelos próximos 10 poços. Em seguida, adicionou-se aos poços uma alíquota de 100µL do inóculo fúngico na escala de Mc Farland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Podemos observar na Figura 30 a placa de microtitulação preparada com o derivado diluído em diferentes concentrações e o inóculo já acrescido. Após 24 horas de incubação a $35^\circ\text{C} \pm 2$, o CIM foi definido como a menor concentração da molécula capaz de inibir o crescimento fúngico visível (DANIEL J. SHEEHAN, PH.D. *et al.*, 2009). As seguintes faixas de concentração foram adotadas para cada molécula testada:

- Derivados de origem sintética: de 512µg/mL a 0,5µg/mL.

Figura 30: Derivado diluído em poços de microplaca de poliestireno - CIM



. Fonte: Arquivo pessoal. Microplaca de poliestireno com diferentes concentrações do derivado a ser testado para determinar a CIM, mantidos em incubação a 35°C – Labiemol.

Os pontos de corte descritos no documento CLSI, M27-A2 (Figura 31) para as cepas ATCC frente aos controles positivos utilizados, Fluconazol e o Cetoconazol, estão de acordo com os valores encontrados após reprodução do teste de concentração inibitória mínima no laboratório. Os valores encontrados estão descritos na Tabela 1, e a classificação do perfil de sensibilidade se dá de acordo com documento CLSI, M27-A2.

Figura 31: Pontos de cortes dos agentes antifúngicos previsto pelo CLSI, M27-A2

2.4 Número de Concentrações Testadas

As concentrações a serem testadas devem abranger as concentrações dos pontos de corte e as referentes aos resultados esperados para as cepas controle de qualidade. Com base em estudos anteriores, os seguintes intervalos de concentração das drogas são importante: anfotericina B – de 0,0313 a 16µg/mL; flucitosina – de 0,125 a 64µg/mL; cetoconazol – de 0,0313 a 16µg/mL; itraconazol – de 0,0313 a 16µg/mL; fluconazol – de 0,125 a 64 µg/mL; e os novos triazólicos – de 0.0313 a 16 µg/mL.

Fonte: CLSI, M27-A2, parágrafo 2.4.

Tabela 1: Valores de CIM encontrados para o Fluconazol e Cetoconazol frente às cepas ATCC do gênero *Candida* no LABiEMol com o perfil de Sensibilidade encontrado para cepas ATCC, de acordo com M27-A2

Cepa Fúngica	Faixa de CIM (µg/mL) Fluconazol	Faixa de CIM (µg/mL) Cetoconazol
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90028	1	1
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	32	16
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	3	8
<i>Candida krusei</i> ATCC 34135	64	1
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	64	2
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC MYA 646	1	1

3.6 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO FÚNGICO E VIABILIDADE CELULAR

Esta metodologia tem por objetivo analisar a cinética da interação de diferentes concentrações das moléculas frente à cepa microbiana em um determinado intervalo de tempo, e a viabilidade celular através do método indireto, por densidade óptica, com auxílio do espectrofotômetro de absorção a 570nm (CAMARGO *et al.*, 2009; GIL-ALONSO *et al.*, 2015). Nesse estudo, a determinação da curva de crescimento foi realizada para os derivados ativos ao TSA, e que apresentaram CIM menor ou igual a 64µg/mL.

3.6.1 Preparo das Soluções-estoque

Os derivados ativos ao TSA, e que apresentaram faixa de CIM menor ou igual 64µg/mL, foram pesados em distintos *ependorfs* e devidamente identificados, e a concentração final foi correspondente ao valor do CIM da molécula para a cepa

testada. Diluições da solução estoque foram feitas para alcançar a concentração de $\frac{1}{2}$ x CIM e 2x CIM da molécula, sendo a diluição desses realizada com o volume necessário do solvente dimetilsulfóxido – DMSO a 99,9%. Logo, as concentrações testadas nessa metodologia foram: $\frac{1}{2}$ x CIM, 1x CIM e 2x CIM.

3.6.2 Controles experimentais

Nos ensaios foram utilizados quatro controles experimentais: a) controle positivo do fármaco, o Cetoconazol (Sigma-Aldrich®) - 200 μ L em cada poço; b) controle positivo de crescimento, 200 μ L do inóculo; c) controle negativo, o diluente dos derivados, o DMSO a 99,9% (Sigma-Aldrich®) - 200 μ L; d) o branco, poços com 200 μ L com meio de cultivo. Todo o procedimento de controle experimental foi realizado em triplicata.

3.6.3 Protocolo da Curva de Crescimento Fúngico

No dia anterior ao teste, um inóculo microbiano foi preparado a partir de duas a três colônias em (cinco) 5 mL de caldo Sabouraud, e incubados pelo período de 18 h, à $35^{\circ}\text{C} \pm 2$. No dia do ensaio, uma diluição na proporção de 1:100 foi feita com o inóculo, onde 500 μ L foram transferidos para um tubo contendo (cinco) 5mL solução salina a 0,85%. Quatro tubos devidamente identificados com as diferentes concentrações testadas, e o tubo branco (controle experimental) contendo 3,9 mL de meio de cultivo caldo Sabouraud, foram acrescidos de (um) 1mL da suspensão de inóculo, e uma alíquota de 200 μ L foi transferida para poços de placa de microtitulação. Ao atingir absorbância igual ou superior 0,1, adicionou-se 100 μ L dos derivados testados nos respectivos tubos (concentração de $\frac{1}{2}$ x CIM, 1x CIM e 2x CIM), homogeneizados por agitação, e uma alíquota de 200 μ L contendo caldo + inóculo + derivado, foi transferido para os poços de uma placa de microtitulação (GIL-ALONSO *et al.*, 2015).

Uma leitura inicial (tempo 1) foi realizada com auxílio de um espectrofotômetro a 570nm. A placa de microtitulação foi incubada a $35^{\circ}\pm 2$, sendo homogeneizados por agitação a cada hora antes da realização das leituras. Essas foram realizadas nos tempos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 24, 30, e 48hrs. Vale ressaltar que este método foi realizado em duas réplicas de triplicatas independentes, para confirmação dos resultados.

4 RESULTADOS

4.1 DERIVADOS SINTETIZADOS POR GRUPO DE PESQUISADORES DA FIOCRUZ

4.1.1 Derivados de Sulfonamida

4.1.1.1 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana

Os experimentos mostraram que nenhum dos quinze derivados inéditos de sulfonamida (01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15) apresentou inibição do crescimento microbiano frente às espécies fúngicas testadas.

4.2 DERIVADOS SINTETIZADOS POR GRUPO DE PESQUISADORES DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UFF

4.2.1 Derivados de Hidrazonas

4.2.1.1 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana

Os experimentos mostraram que nenhum dos oito derivados inéditos de hidrazonas (MS2, GML 020, GML 021, DEC, DOD, NON, OCT, UND) testados apresentou inibição do crescimento microbiano frente às espécies fúngicas testadas.

4.2.2 Derivados de Organofosforados

4.2.2.1 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana

Os experimentos mostraram que nenhum dos três derivados inéditos organofosforados (ABC 11; ABC 45; ABC 46) apresentou inibição do crescimento microbiano frente às espécies fúngicas testadas.

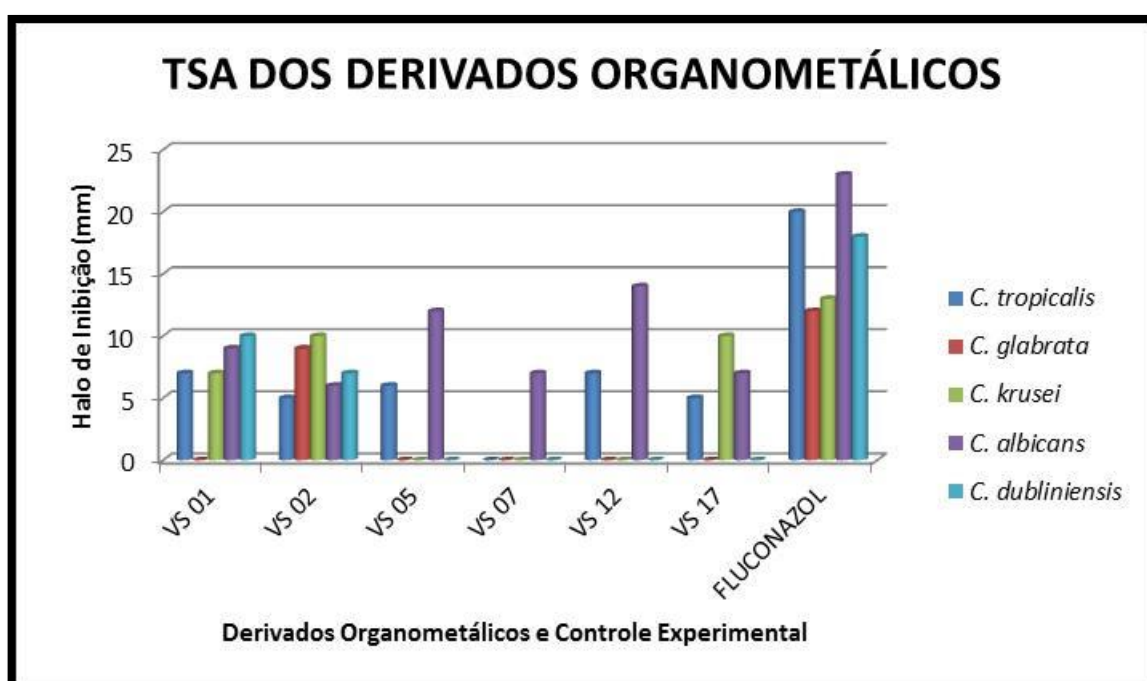
4.2.3 Derivados Organometálicos

4.2.3.1 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana

Dentre os dezessete derivados organometálicos testados (VS 01, VS 02, VS 03, VS 04, VS 05, VS 06, VS 07, VS 08, VS 09, VS 10, VS 11, VS 12, VS 13, VS 14, VS 15, VS 16, VS 17), seis apresentaram atividade de inibição do crescimento microbiano para diferentes espécies de *Candida*. Foram eles: **VS 01**, **VS 02**, **VS 05**, **VS 07**, **VS 12**, **VS 17**.

O derivado **VS 01** apresentou atividade antimicrobiana frente às espécies *C. tropicalis* ATCC 750, *C. krusei* ATCC 34135, *C. albicans* ATCC 24433 e *C. dubliniensis* ATCC MYA 646; enquanto o derivado **VS 02** apresentou atividade antimicrobiana para as espécies *C. tropicalis* ATCC 750, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. krusei* ATCC 34135, *C. albicans* ATCC 24433 e *C. dubliniensis* ATCC MYA 646; e o derivado **VS 05** apresentou atividade antimicrobiana somente para as espécies *C. tropicalis* ATCC 750 e *C. albicans* ATCC 24433. O derivado **VS 07** apresentou atividade antimicrobiana somente para *C. albicans* ATCC 24433; enquanto o derivado **VS 12** apresentou atividade antimicrobiana frente às espécies *C. tropicalis* ATCC 750 e *C. albicans* ATCC 24433; e o derivado **VS 17** apresentou atividade antimicrobiana para as espécies *C. tropicalis* ATCC 750, *C. krusei* ATCC 34135 e *C. albicans* ATCC 24433.

Gráfico 1: Perfil antimicrobiano dos derivados Organometálicos frente às espécies do gênero *Candida* no TSA





Os valores de halo de inibição de crescimento descritos no Gráficos 1 variaram entre 5 e 14mm em relação às novas moléculas testadas, onde o 0 (zero) significa que o derivado não apresentou atividade antimicrobiana frente à cepa testada. Observamos que o derivado **VS 02** apresentou maior espectro de ação com atividade antimicrobiana frente a diversas espécies de *Candida*.

4.2.3.2 Toxicidade *in silico* - Osiris® Property Explorer

A avaliação de toxicidade teórica utilizando o programa Osiris® mostrou que dentre os derivados ativos da família dos organometálicos, todos exibiram alertas de toxicidade relacionadas a possíveis efeitos mutagênicos, apresentando um alto risco. Além disso, o derivado **VS 02** exibiu alerta de alto risco para o efeito reprodutivo enquanto as demais moléculas organometálicas apresentaram um baixo risco para esse aspecto. Os três derivados **VS 01**, **VS 02** e **VS 05** apresentaram alerta de alto risco para o efeito mutagênico. Os pesos moleculares ficaram compreendidos entre 355 a 403 Da, abaixo do valor máximo indicado pelo programa (450 Da). Os valores farmacocinéticos observados indicam a probabilidade da substância ser bem absorvida, pois as mesmas apresentaram cLogP (lipofilicidade) variando entre 2,84 e 4,16 enquanto a previsão da medida de solubilidade ficou entre -4,45 e -5,27, acima do valor indicado pelo programa (-4), sendo considerados bons candidatos para aspectos envolvendo lipofilicidade e peso molecular. O parâmetro Druglikeness mostrou que todos os derivados apresentaram similaridade com os fármacos comercializados, pois não foram observados valores negativos. Para o parâmetro Drugscore, que representa o potencial da molécula tornar-se um fármaco, os derivados testados variaram entre 0,22 e 0,41, valores menores em relação ao controle, o Fluconazol (Quadro 4). Não foi possível realizar o ensaio de toxicidade *in silico* dos derivados **VS 07**, **VS 12** e **VS 17** pois a estrutura química não foi disponibilizada.

Quadro 4: Parâmetros toxicológicos obtidos no programa Osiris® após desenho estrutural dos derivados organometálicos e do antifúngico utilizado como controle

Organometálicos	Riscos de Toxicidade				Farmacocinética				
	MUT	TUM	IRRI	REP	cLog P	SOL	P.M.	DL	DS
VS 01					4,16	- 5,27	403,0	1,94	0,3
VS 02					2,84	- 5,07	372,0	2,4	0,22
VS 05					3,37	- 4,45	355,0	3,8	0,41
FLUCONAZOL					- 0,11	- 2,18	306,0	1,99	0,87

Legenda:  baixo risco;  alto risco; (MUT) Mutagênico; (TUM) Tumorigênico; (IRRI) Irritante; (REP) Reprodutivo; (P.M.) Peso Molecular; (cLogP) Lipofilicidade; (SOL) Solubilidade; (DL) Druglikeness; (DS) Drug-Score.

4.2.3.3 Concentração Inibitória Mínima

Os derivados organometálicos ativos ao TSA, **VS 01**, **VS 02**, **VS 05**, **VS 07**, **VS 12**, **VS 17**, que mostraram atividade antifúngica frente a diferentes espécies de *Candida* foram submetidos ao teste de concentração inibitória mínima. Os valores encontrados variaram entre 64µg/mL e > 512µg/mL como está descrito na Quadro 5.

O derivado **VS 01** apresentou os seguintes CIM frente às diferentes espécies de *Candida*: *C. albicans* ATCC 24433 - CIM > 256µg/mL; *C. krusei* ATCC 34135 – CIM 64µg/mL; *C. tropicalis* – CIM > 512µg/mL; e *C. dubliniensis* ATCC MYA 646 – CIM 512µg/mL. onde o menor CIM observado para essa família foi desse derivado frente à *C. krusei* ATCC 34135. O derivado **VS 02** apresentou maior espectro de ação com atividade antimicrobiana frente a diversas *Candida* spp., com os seguintes CIM: *C. albicans* ATCC 24433 - CIM > 512µg/mL; *C. krusei* ATCC 34135 – CIM 128µg/mL; *C. tropicalis* ATCC 750 – CIM 512µg/mL, *C. glabrata* ATCC 90030 – CIM 128µg/mL e *C. dubliniensis* ATCC MYA 646 – CIM > 512µg/mL. O derivado **VS 05** apresentou atividade antimicrobiana para as espécies *C. albicans* ATCC 24433 e *C. tropicalis* ATCC 750, com CIM > 512µg/mL e CIM > 256µg/mL respectivamente. O derivado **VS 07** foi ativo somente para *C. albicans* ATCC 24433 com CIM > 256µg/mL. O derivado **VS 12** foi ativo para as espécies *C. tropicalis* ATCC 750 e *C. albicans* ATCC 24433,

com CIM > 256µg/mL para ambas, enquanto o derivado **VS 17** foi ativo para as espécies *C. krusei* ATCC 34135 e *C. albicans* ATCC 24433, com CIM > 256µg/mL para ambas.

Quadro 5: Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos Organometálicos ativos no TSA, frente a diferentes espécies de *Candida*

Cepas Fúngicas	CIM (µg/mL) - Organometálicos						Controles Experimentais (µg/mL)		
	VS 01	VS 02	VS 05	VS 07	VS 12	VS 17	FLUCO	CETO	DMSO
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	> 256	> 512	> 512	> 256	> 256	> 256	32	16	----
<i>Candida krusei</i> ATCC 34135	64	128	----	----	----	> 256	64	1	----
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	> 512	512	> 256	----	> 256	----	3	8	----
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	----	128	----	----	----	----	64	2	----
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC MYA 646	512	> 512	----	----	----	----	1	1	----

Legenda: (----) Não apresentou atividade para esta cepa; (FLUCO) Fluconazol - Controle positivo; (CETO) - Controle positivo; (DMSO) Dimetilsulfóxido - Controle negativo.

4.2.4 Derivados Pirazóis e Pirazolonas

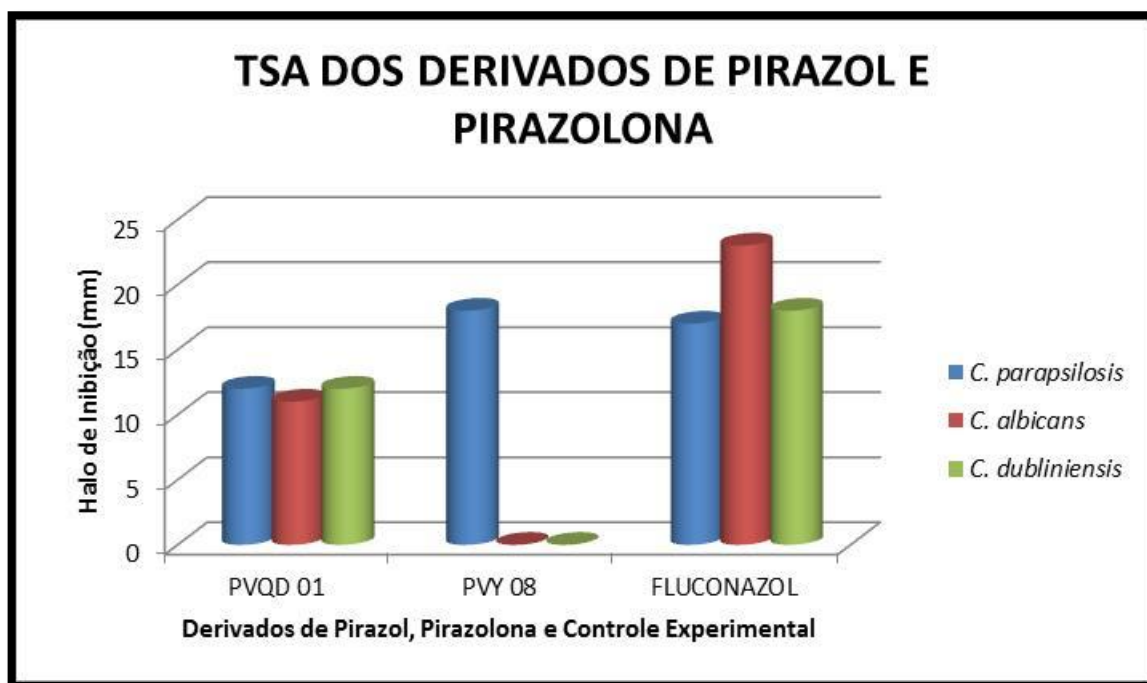
4.2.4.1 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana

Foram testados quarenta e sete derivados de pirazol (MSJ 01, MSJ 02, MSJ 04, MSJ 05, MSJ 07, MSJ 08, MSJ 11, MSJ 13, MSJ 14, MSJ 20, MSD 01, MSD 03, MSD 04, MSD 05, MSD 10, MSD 11, MSD 12, MSD 14, MSD 20, MPQ 01, MPQ 02, MPQ 03, MPQ 04, MPQ 05, MPQ 07, MPQ 08, MPQ 12, MPQ 13, MPQ 14, MPQ 20, PVQD 01, PVQD 10, PVQD 13, PVQD 14, PVQD 15, PFVD 01, PFVD 03, PFVD 04, PFVD 05, PFVD 07, PFVD 09, PFVD 10, PFVD 12, PFVD 13, PFVD 14, PFVD 16, PFVD 17) e somente um, o **PVQD 01**, apresentou atividade de inibição do crescimento microbiano para *Candida parapsilosis* – ATCC 90018 (halo de inibição do crescimento fúngico 12mm); *C. albicans* ATCC 24433 (halo de inibição do crescimento fúngico 11mm) e *C. dubliniensis* ATCC MYA 646 (halo de inibição do crescimento fúngico 12mm).

Dentre os cinco derivados de pirazolona testados (PVY 05, PVY 08, PVY 09, PVY 10, PVY 16), somente um, o **PVY 08**, apresentou atividade de inibição do crescimento microbiano para *Candida parapsilosis* – ATCC 90018, com halo de inibição

do crescimento fúngico 18mm, melhor em comparação com o controle experimental (17mm). Os valores de halo de inibição de crescimento mostrados no Gráfico 2 variaram entre 11 a 18mm, onde o 0 (zero) significa que o derivado não apresentou atividade antimicrobiana frente à cepa testada.

Gráfico 2: Desempenho dos derivados pirazólicos e pirazolônicos frente às cepas do gênero *Candida* no TSA



4.2.4.2 Toxicidade *in silico* - Osiris® Property Explorer



A avaliação de toxicidade teórica utilizando o programa Osiris® mostrou que o derivado ativo da família dos pirazóis, **PVQD 01** exibiu baixo risco para todos os alertas, são eles: mutagênico, tumorigênico, efeito irritante e reprodutivo. O peso molecular observado foi 216 Da, o cLogP (lipofilicidade) foi 1,15, a previsão da medida de solubilidade foi - 1,79. Observamos que o derivado apresentou valores abaixo da média do programa para todos os parâmetros analisados, sendo um bom candidato em relação aos aspectos envolvendo absorção e biodisponibilidade e toxicidade. Para os parâmetros Druglikeness, o derivado mostrou similaridade com os fármacos comercializados e para o parâmetro o Drugscore, a molécula apresentou valor similar ao controle, o Fluconazol, e próximo a 1 (um) (Quadro 6).

O derivado pirazolona, **PVY 08**, exibiu um médio risco para o efeito irritante e baixo risco para os demais alertas. O peso molecular foi 194 Da, o cLogP (lipofilicidade) foi 2,16, a previsão da medida de solubilidade foi - 2,56. O derivado

apresentou valores abaixo da média prevista pelo programa para todos os parâmetros analisados, sendo um bom candidato em relação aos aspectos envolvendo absorção e biodisponibilidade. O parâmetro Druglikeness mostrou que o derivado apresentou similaridade com os fármacos comercializados e para o parâmetro Drugscore, a molécula apresentou valor similar ao controle, o Fluconazol, e próximo a 1 (um) conforme a Tabela 4, a seguir.

Quadro 6: Parâmetros toxicológicos obtidos no programa Osiris® após desenho estrutural do derivado de pirazol, pirazolona e do antifúngico utilizado como controle

Pirazol/ Pirazolona	Riscos de Toxicidade				Farmacocinética				
	MUT	TUM	IRRI	REP	cLog P	SOL	P.M.	DL	DS
PVQD 01					1,15	- 1,79	216,0	0,21	0,74
PVY 08					2,16	- 2,56	194,0	4,35	0,73
FLUCONAZOL					- 0,11	- 2,18	306,0	1,99	0,87

Legenda:  baixo risco;  médio risco; (MUT) Mutagênico; (TUM) Tumorigênico; (IRRI) Irritante; (REP) Reprodutivo; (P.M.) Peso Molecular; (cLogP) Lipofilicidade; (SOL) Solubilidade; (DL) Druglikeness; (DS) Drug-Score.

4.2.4.3 Concentração Inibitória Mínima

O derivado de pirazol, **PVQD 01** foi ativo frente às espécies *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida dubliniensis* exibindo valores de 64µg/mL; >256µg/mL e 128µg/mL respectivamente, enquanto o derivado de pirazolona **PVY 08** foi ativo somente frente à espécie *Candida parapsilosis* exibindo valor de 128µg/mL na CIM (Quadro 7).

Quadro 7: Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos derivados de Pirazol e Pirazolona ativos no TSA, frente a diferentes espécies de *Candida*

Cepas Fúngicas	Pirazol/Pirazolona CIM (µg/mL)		Controles Experimentais		
	PVQD 01	PVY 08	FLUCO	CETO	DMSO
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	64	----	32	16	----
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 90018	> 256	128	1	1	----
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC MYA 646	128	----	1	1	----

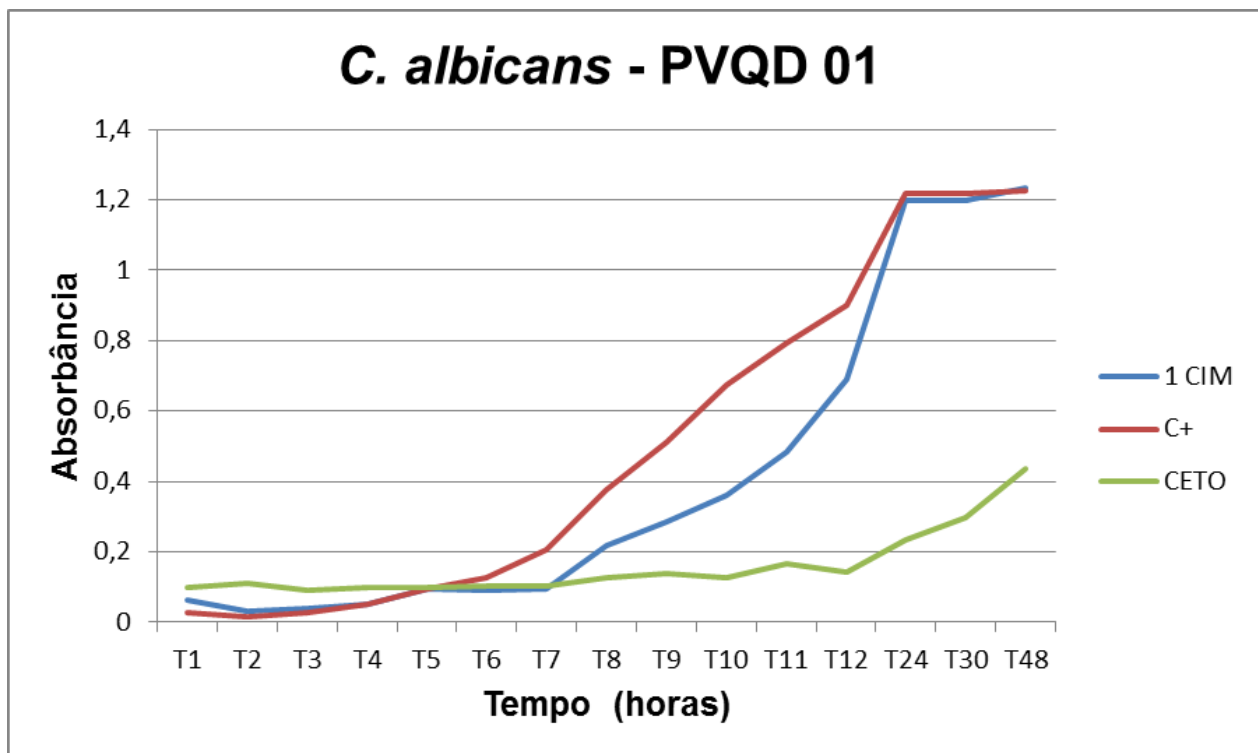
Legenda: (----) Não apresentou atividade para esta cepa; (FLUCO) Fluconazol - Controle positivo; (CETO) - Controle positivo; (DMSO) Dimetilsulfóxido - Controle negativo.

4.2.4.4 Curva de Crescimento Fúngico

O ensaio da curva de crescimento fúngico permite a análise da interação durante um determinado tempo, da nova molécula, em diferentes concentrações, com o crescimento microbiano. Nesse experimento, realizamos leituras da densidade óptica durante 12 horas, uma leitura em 24h, 30h e a última leitura em 48h. Para a realização desse experimento elegemos os derivados que apresentaram CIM menor ou igual a 64µg/mL, logo, o derivado **PVQD 01** para cepa *C. albicans* ATCC 24433. Preferimos mostrar o valor de 1CIM no gráfico e descrever os demais resultados para facilitar a compreensão e comparação com os controles experimentais.

O derivado **PVQD 01** apresentou CIM de 64µg/mL frente a *C. albicans*, e a concentração do controle para esse experimento, o cetoconazol, foi 16µg/mL. Ao analisar o Gráfico 4, observamos que o novo derivado mostrou uma inibição microbiana similar ao controle entre o T5 e o T6, com melhor ação no T7, inibindo 54,2% do crescimento microbiano contra 50,3% do controle experimental, conforme Gráfico 3.

Gráfico 3: Curva de Crescimento da *C. albicans* ATCC 24433 sob a ação do derivado PVQD 01 e do cetoconazol na concentração de 1 CIM



Legenda: 1CIM= Concentração Inibitória Mínima (cor azul); C+= Controle positivo (vermelho); CETO= Cetoconazol (verde).

A molécula **PVQD 01** mostrou melhor atividade nos primeiros períodos, ativa até o T12, com inibição de crescimento de fúngico de 32,2% na concentração de 1 CIM e 59,2% na concentração de 2x CIM, conforme Tabela 2.

Tabela 2: Percentual de Inibição do Crescimento Fúngico em diferentes pontos de cortes e concentrações do derivado PVQD 01 frente à *C. albicans* ATCC 24433

Leituras	Percentual de Inibição PVQD 01 <i>C. albicans</i> – ATCC 24433			Controle Experimental
	½ CIM	1 CIM	2 CIM	Cetoconazol
12 horas	23,1%	32,2%	59,2%	84,3%
24 horas	1%	2%	1,5%	80,1%
30 horas	> 100%	2%	2%	75,5%
48 horas	> 100%	> 100%	3,4%	64,4%

4.2.5 Derivados de Naftoquinona

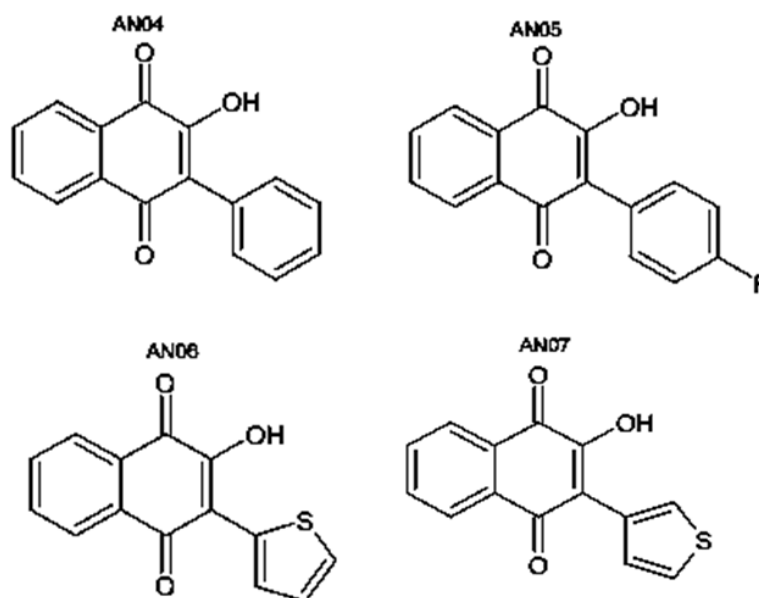
4.2.5.1 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana

Dentre os 16 derivados inéditos de naftoquinona testados (AN 02, AN 03, AN 04, AN 05, AN 06, AN 07, AN 08, AN 10, AN 11, AN 12, AN 13, AN 14, AN 15, AN 16, NO 01 e NO 03), quatro apresentaram atividade de inibição do crescimento microbiano frente à diferentes espécies de *Candida*, são eles: **AN 04, AN 05, AN 06, AN 07** (Figura 32).

O derivado **AN 04** foi ativo frente às seguintes espécies: *C. glabrata* ATCC 90030, com halo de inibição de crescimento 9mm; *C. krusei* ATCC 34135, com halo de inibição de crescimento 13mm, *C. albicans* ATCC 24433, com halo de inibição de crescimento 13mm e *C. dubliniensis* ATCC MYA 646, com halo de inibição de crescimento 7mm. O derivado **AN 05** foi ativo frente às seguintes espécies: *C. tropicalis* ATCC 750, com halo de inibição 11mm; *C. glabrata* ATCC 90030, com halo de inibição de crescimento 15mm; *C. krusei* ATCC 34135, com halo de inibição de crescimento 11mm e *C. albicans* ATCC 24433, com halo de inibição de crescimento 18mm, próximo ao controle experimental, fluconazol (22mm). O derivado **AN 06** foi ativo para três diferentes *Candida* spp., são elas: *C. tropicalis* ATCC 750, com halo de inibição 11mm; *C. krusei* ATCC 34135, com halo de inibição de crescimento 11mm e *C. albicans* ATCC 24433, com halo de inibição de crescimento 11mm. O derivado **AN 07** foi ativo somente frente à espécie *C. tropicalis* ATCC 750, com halo de inibição do crescimento microbiano de 15mm.

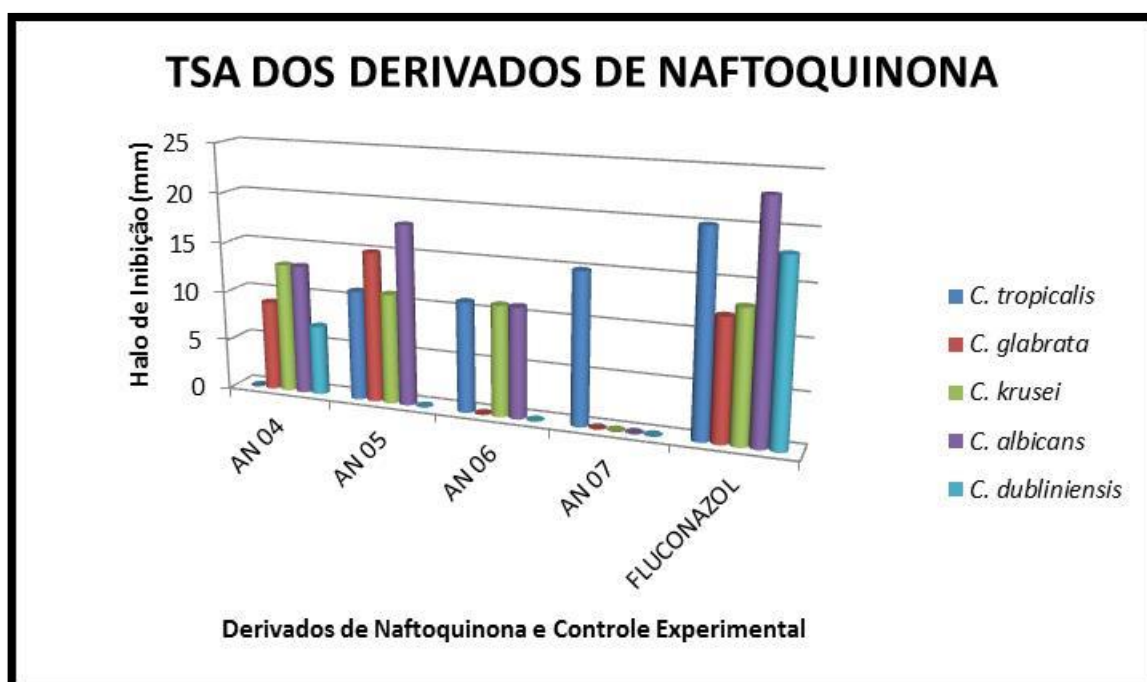
Os valores do halo de inibição de crescimento mostrados no Gráfico 4 variaram 7 a 18mm.

Figura 32: Estrutura química dos derivados inéditos de Naftoquinona ativos a diferentes espécies de *Candida*



Fonte: Arquivo pessoal

Gráfico 4: Perfil antimicrobiano dos derivados naftoquinônicos frente às espécies do gênero *Candida* no TSA



4.2.5.2 Toxicidade *in silico* - Osiris® Property Explorer

A avaliação de toxicidade teórica utilizando o programa Osiris® mostrou que dentre os derivados ativos da família das naftoquinonas, todos exibiram baixo risco toxicológico para todos os aspectos, resultado igualmente encontrado para o controle positivo, o Fluconazol. Os pesos moleculares ficaram compreendidos entre 208 e 256 Da, abaixo do valor máximo indicado pelo programa (450 Da). Os valores de cLogP (lipofilicidade) ficaram compreendidos entre 1,98 e 2,19, abaixo de 5,0, a medida de solubilidade ficou entre -3,73 e -4,04, um pouco acima do valor indicado como ideal pelo programa (-4). O parâmetro Druglikeness mostrou que todos os derivados não apresentaram similaridade com os fármacos comercializados, pois foram observados valores negativos. Para o parâmetro Drugscore, os valores variaram de 0,46 a 0,66 menores em relação ao controle (Quadro 8). Os resultados mostram que as novas moléculas são promissoras em relação aos aspectos envolvendo toxicidade e absorção.

Quadro 8: Parâmetros toxicológicos obtidos no programa Osiris após desenho estrutural dos derivados de naftoquinona e do antifúngico utilizado como controle

Naftoquinonas	Riscos de Toxicidade				Farmacocinética				
	MUT	TUM	IRRI	REP	cLog P	SOL	P.M.	DL	DS
AN 04					2,19	- 3,73	250,0	- 1,12	0,53
AN 05					2,3	- 4,04	208,0	- 1,79	0,46
AN 06					2,06	- 3,74	256,0	0,29	0,66
AN 07					1,98	- 3,83	256,0	- 1,63	0,50
FLUCONAZOL					- 0,11	- 2,18	306,0	1,99	0,87

Legenda: baixo risco; (MUT) Mutagênico; (TUM) Tumorigênico; (IRRI) Irritante; (REP) Reprodutivo; (P.M.) Peso Molecular; (cLogP) Lipofilicidade; (SOL) Solubilidade; (DL) Druglikeness; (DS) Drug-Score.

4.2.5.3 Concentração Inibitória Mínima

Os derivados do sistema de naftoquinonas que apresentaram atividade frente a diferentes *Candida* spp. no TSA, **AN 04**, **AN 05**, **AN 06**, **AN 07**, foram submetidos ao

teste de concentração inibitória mínima. Os valores encontrados variaram entre 08µg/mL e 512µg/mL conforme descrito na Quadro 9.

O derivado **AN 04** apresentou CIM de 16µg/mL frente às espécies *C. albicans* ATCC 24433 e *C. glabrata* ATCC 90030. Para a *C. krusei* ATCC 34135 e *C. dubliniensis* ATCC MYA 646 a CIM foi > 512µg/mL e 128µg/mL respectivamente. A molécula **AN 05** foi ativa a quatro diferentes espécies de *Candida*, sendo elas: *C. albicans* ATCC 24433, CIM 16µg/mL; *C. krusei* ATCC 34135, CIM 128µg/mL; *C. tropicalis* ATCC 750, CIM > 256µg/mL e *C. glabrata* ATCC 90030, CIM 32µg/mL. A molécula **AN 06** apresentou menor CIM frente à espécie mais isolada em infecções nosocomiais, *C. albicans* ATCC 24433, 8µg/mL. Ela também foi ativa frente à *C. krusei* ATCC 34135, CIM 256µg/mL e *C. tropicalis* ATCC 750, CIM 32µg/mL. O derivado **AN 07** foi ativo somente para espécie *C. tropicalis* ATCC 750, com CIM 32µg/mL.

Quadro 9: Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos derivados de Naftoquinona ativos no TSA, frente à diferentes espécies de *Candida*

Cepas Fúngicas	Naftoquinonas CIM (µg/mL)				Controles Experimentais		
	AN 04	AN 05	AN 06	AN 07	FLUCO	CETO	DMSO
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	16	16	08	----	32	16	----
<i>Candida krusei</i> ATCC 34135	> 512	128	256	----	64	1	----
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	----	>256	32	32	3	8	----
<i>Candida glabrata</i> ATCC 90030	16	32	----	----	64	2	----
<i>Candida dubliniensis</i> ATCC MYA 646	128	----	----	----	1	1	----

Legenda: (----) Não apresentou atividade para esta cepa; (FLUCO) Fluconazol - Controle positivo; (CETO) - Controle positivo (DMSO) Dimetilsulfóxido - Controle negativo.

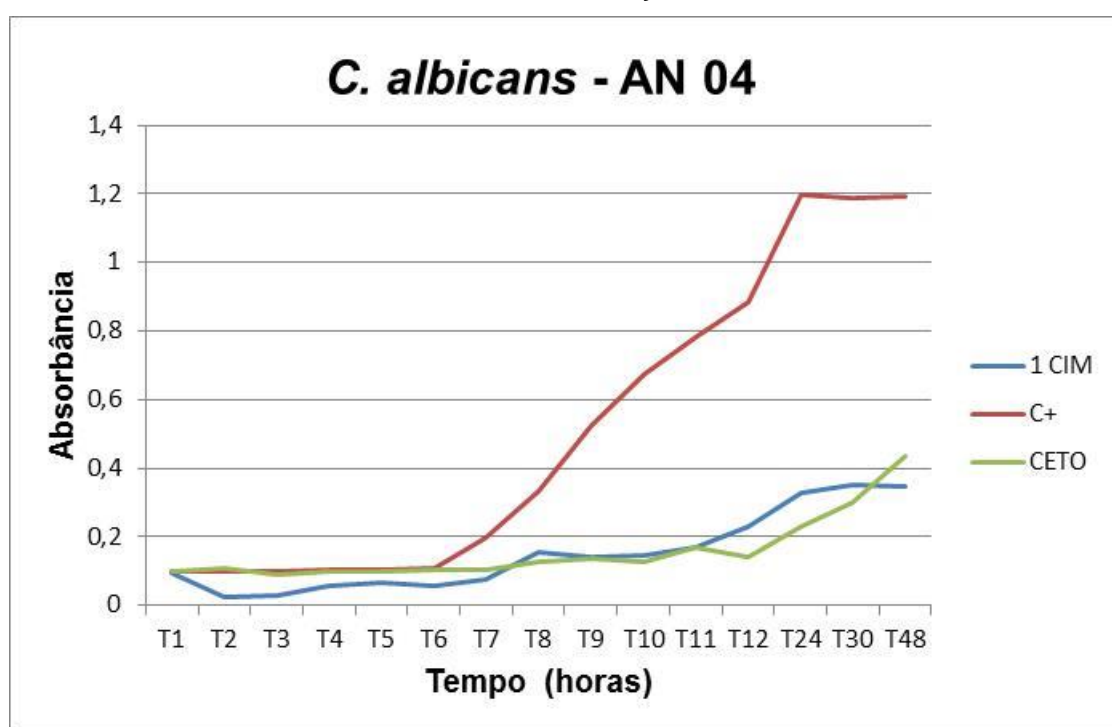
4.2.5.4 Curva de Crescimento Fúngico

Para esse experimento selecionamos as moléculas ativas que apresentaram CIM inferior a 100 µg/mL. Na família das naftoquinonas, os derivados que apresentaram esse perfil foram: **AN 04**, **AN 05**, **AN 06** e **AN 07** frente a diferentes

espécies de *Candida*. Preferimos mostrar o valor de 1CIM no gráfico e descrever os demais resultados para facilitar a compreensão e comparação com os controles experimentais.

Para *C. albicans*, o derivado **AN 04** apresentou CIM de 16µg/mL, igual à concentração do controle, o cetoconazol - 16µg/mL. O novo derivado mostrou uma inibição microbiana melhor em relação ao controle até o T7 e similar ao controle experimental a partir do T8, atingindo um percentual médio de inibição de aproximadamente 72% nos T12, T24, T30 e T48, enquanto o controle apresentou uma média de inibição microbiana de aproximadamente 75,7% nos tempos acima citados, conforme Gráfico 5.

Gráfico 5: Curva de Crescimento da *C. albicans* ATCC 24433 sob a ação do derivado AN 04 e do cetoconazol na concentração de 1 CIM



Legenda: 1CIM= Concentração Inibitória Mínima (cor azul); C+= Controle positivo (vermelho); CETO= Cetoconazol (verde).

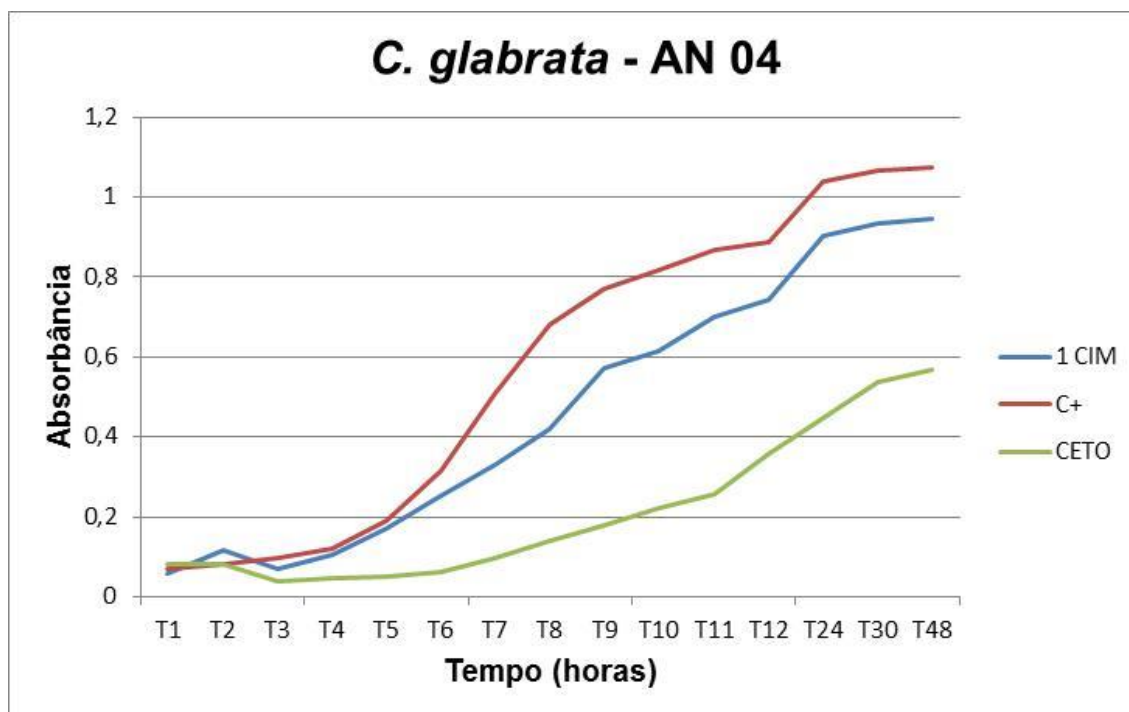
A molécula **AN 04** no tempo 48h, na concentração de 2x CIM, apresentou uma estabilidade melhor do que observado no controle e maior ação antifúngica, apresentando inibição de aproximadamente 75,2% de inibição do crescimento contra 63,4% de inibição do crescimento apresentado pelo cetoconazol, conforme Tabela 3.

Tabela 3: Percentual de Inibição do Crescimento Fúngico em diferentes pontos de cortes e concentrações do derivado AN 04 frente à *C. albicans* ATCC 24433

Leituras	Percentual de Inibição AN 04 <i>C. albicans</i> – ATCC 24433			Controle Experimental
	½ CIM	1 CIM	2 CIM	Cetoconazol
12 horas	47,6%	74%	76,8%	84%
24 horas	45%	72,4%	76%	80,6%
30 horas	44%	70,5%	74,2%	75%
48 horas	47,8%	71%	75,2%	63,4%

O mesmo derivado frente à espécie *C. glabrata*, apresentou CIM 16µg/mL mostrando uma inibição similar em relação ao cetoconazol apenas nos primeiros tempos (T1 ao T3), conforme Gráfico 6.

Gráfico 6: Curva de Crescimento da *C. glabrata* ATCC 90030 sob a ação do derivado AN 04 e do cetoconazol na concentração de 1 CIM



Legenda: 1CIM= Concentração Inibitória Mínima (cor azul); C+= Controle positivo (vermelho); CETO= Cetoconazol (verde).

No T12 observamos uma inibição do crescimento microbiano de 16% na concentração de 1x CIM (16µg/mL) e 20,4% na concentração de 2x CIM (32µg/mL)

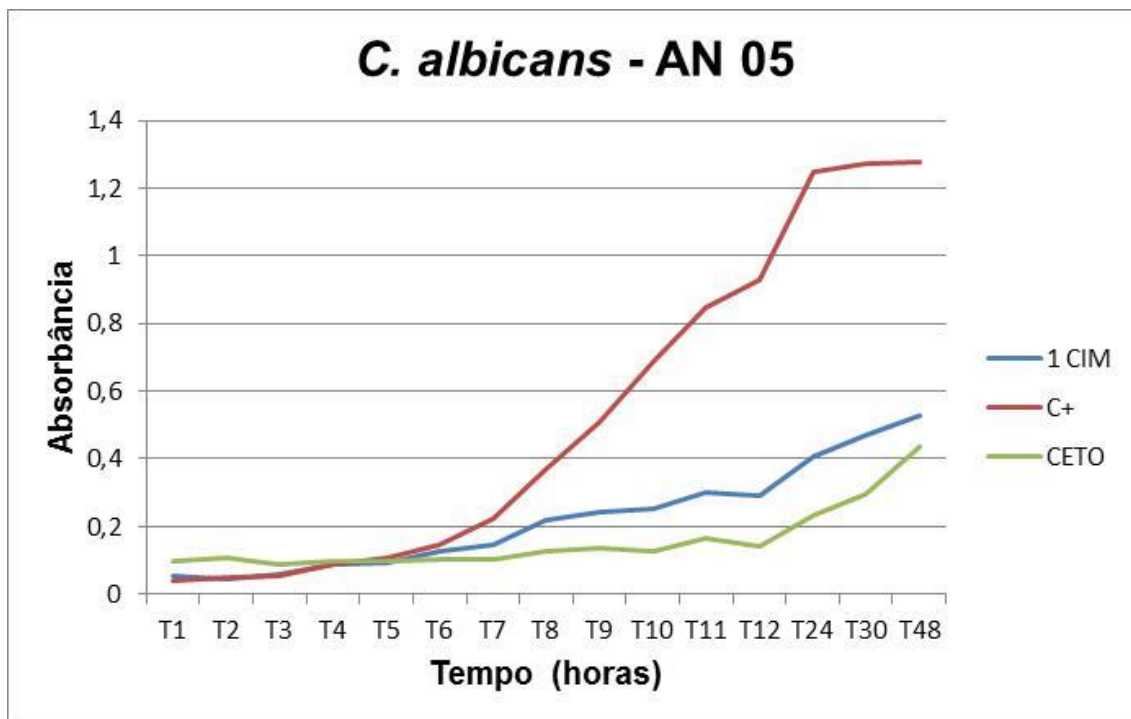
contra 59,8% de inibição do crescimento microbiano observado pelo controle experimental, conforme a Tabela 4.

Tabela 4: Percentual de Inibição do Crescimento Fúngico em diferentes pontos de cortes e concentrações do derivado AN 04 frente à *C. glabrata* ATCC 90030

Leituras	Percentual de Inibição			Controle
	AN 04 <i>C. glabrata</i> – ATCC 90030			Experimental
	$\frac{1}{2}$ CIM	1 CIM	2 CIM	Cetoconazol
12 horas	> 100%	16%	20,4%	59,8%
24 horas	5%	13%	3,5%	57%
30 horas	7,2%	12,5%	2%	49,5%
48 horas	1,5%	12%	> 100%	47,2%

O derivado **AN 05** apresentou CIM 16 μ g/mL frente à cepa *C. albicans*, mostrando uma melhor eficácia em relação ao controle experimental nas 06 primeiras horas e valores de inibição microbiana similar ao cetoconazol nos demais tempos. Esse derivado atingiu um percentual médio de inibição de aproximadamente 64,4% nos T12, T24, T30 e T48, enquanto o controle apresentou uma média de inibição microbiana de aproximadamente 77% nos tempos acima citados, conforme Gráfico 7.

Gráfico 7: Curva de Crescimento da *C. albicans* ATCC 24433 sob a ação do derivado AN 05 e do cetoconazol na concentração de 1 CIM



Legenda: 1CIM= Concentração Inibitória Mínima (cor azul); C+= Controle positivo (vermelho); CETO= Cetoconazol (verde).

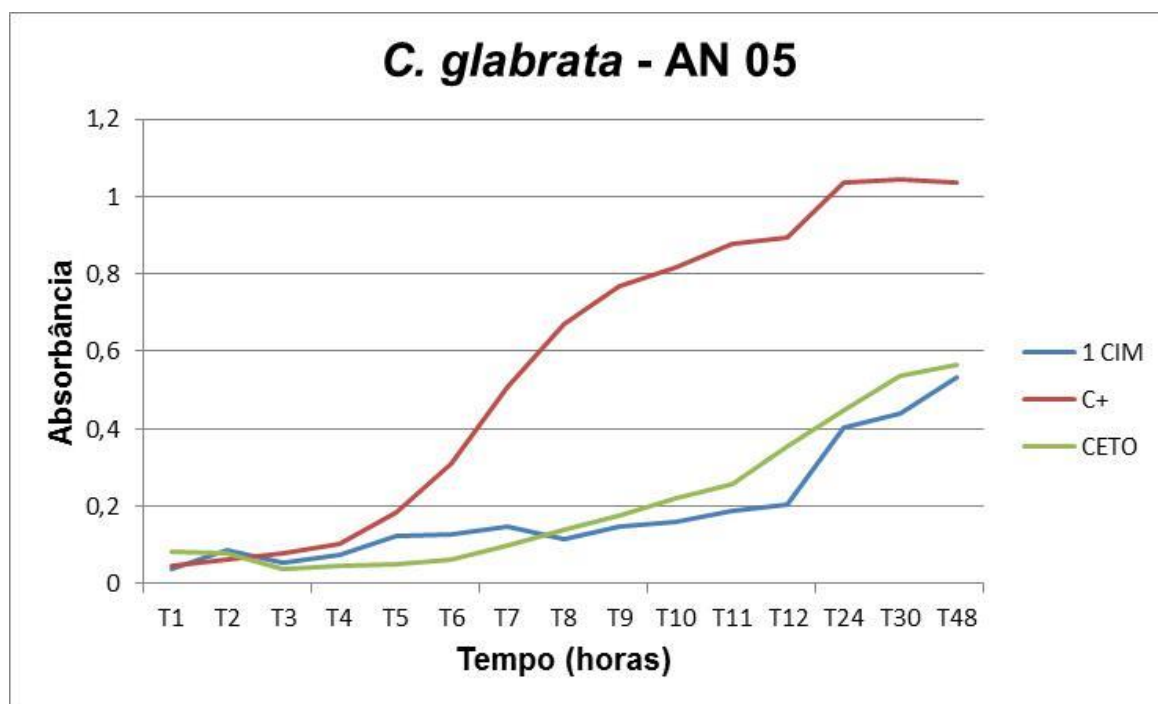
A molécula **AN 05** nos tempos de 30h e 48h, na concentração de 2x CIM, apresentou uma estabilidade melhor do que observado no controle e maior ação antifúngica, apresentando inibição de aproximadamente 77,5% e 72,3 de inibição do crescimento contra 76,6% e 65,8% de inibição do crescimento apresentado pelo cetoconazol, conforme Tabela 5.

Tabela 5: Percentual de Inibição do Crescimento Fúngico em diferentes pontos de cortes e concentrações do derivado AN 05 frente à *C. albicans* ATCC 24433

Leituras	Percentual de Inibição AN 05 <i>C. albicans</i> – ATCC 24433			Controle Experimental
	½ CIM	1 CIM	2 CIM	Cetoconazol
12 horas	55,8%	68,6%	80%	84,7%
24 horas	64%	67,2%	81,2%	81,4%
30 horas	47,7%	63,3%	77,5%	76,6%
48 horas	13,8%	58,7%	72,3%	65,8%

A molécula **AN 05** apresentou atividade frente à espécie *C. glabrata*, CIM 32µg/mL, com perfil de inibição microbiano similar ao cetoconazol (CIM 2µg/mL) até o T7 e melhor atividade nos tempos 12h, 24h, 30h e 48h em comparação ao cetoconazol, conforme Gráfico 8.

Gráfico 8: Curva de Crescimento da *C. glabrata* ATCC 90030 sob a ação do derivado AN 05 e do cetoconazol na concentração de 1 CIM



Legenda: 1CIM= Concentração Inibitória Mínima (cor azul); C+= Controle positivo (vermelho); CETO= Cetoconazol (verde).

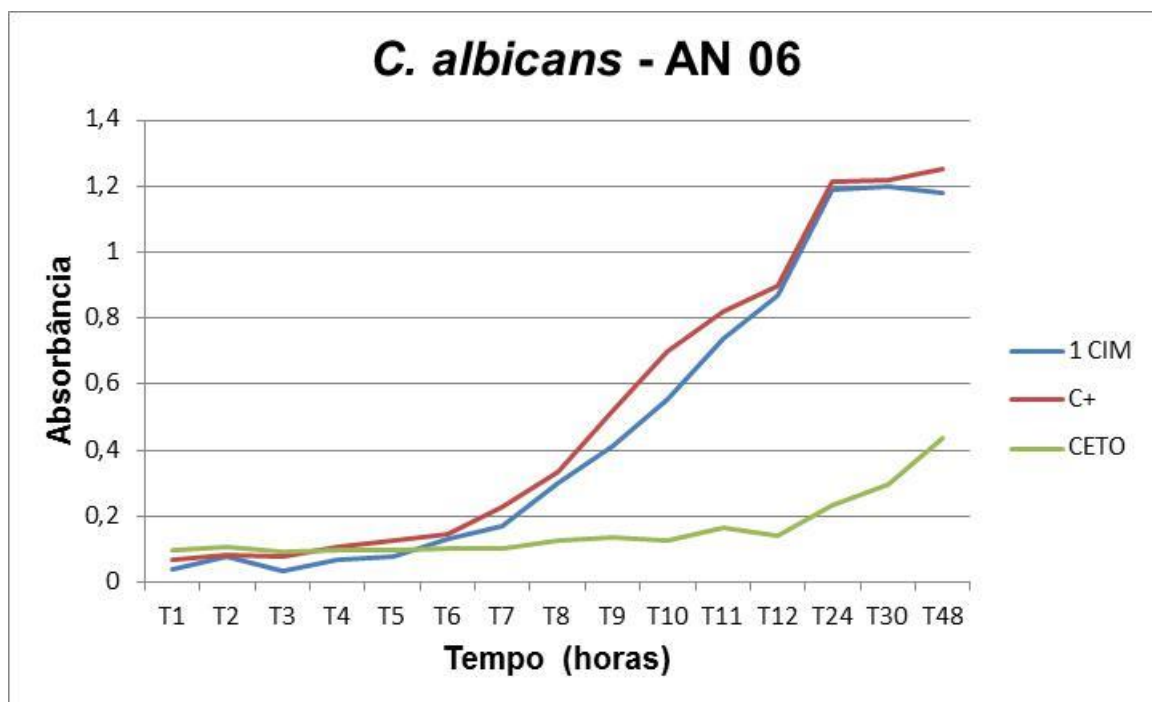
Não foi possível realizar o experimento na concentração de 2x CIM devido à quantidade disponível de derivado. A atividade dessa molécula foi melhor em relação ao controle experimental entre os T12 – T48 com inibição do crescimento microbiano no tempo 12h de 77% contra 60,2% do cetoconazol e em 48h com inibição de 48,6% contra 45,3% do cetoconazol (Tabela 6) frente à *C. glabrata* ATCC 90030.

Tabela 6: Percentual de Inibição do Crescimento Fúngico em diferentes pontos de cortes e concentrações do derivado AN 05 frente à *C. glabrata* ATCC 90030

Leituras	Percentual de Inibição AN 05 <i>C. glabrata</i> – ATCC 90030		Controle Experimental
	½ CIM	1 CIM	Cetoconazol
12 horas	3,3%	77%	60,2%
24 horas	0,3%	61,3%	56,8%
30 horas	2%	58%	48,6%
48 horas	2,6%	48,6%	45,3%

A molécula **AN 06** frente à espécie *C. albicans* apresentou CIM igual a 08µg/mL mostrando uma inibição similar em relação ao cetoconazol (CIM 16µg/mL) até T6 (Gráfico 9).

Gráfico 9: Curva de Crescimento da *C. albicans* ATCC 24433 sob a ação do derivado AN 06 e do cetoconazol na concentração de 1 CIM



Legenda: 1CIM= Concentração Inibitória Mínima (cor azul); C+= Controle positivo (vermelho); CETO= Cetoconazol (verde).

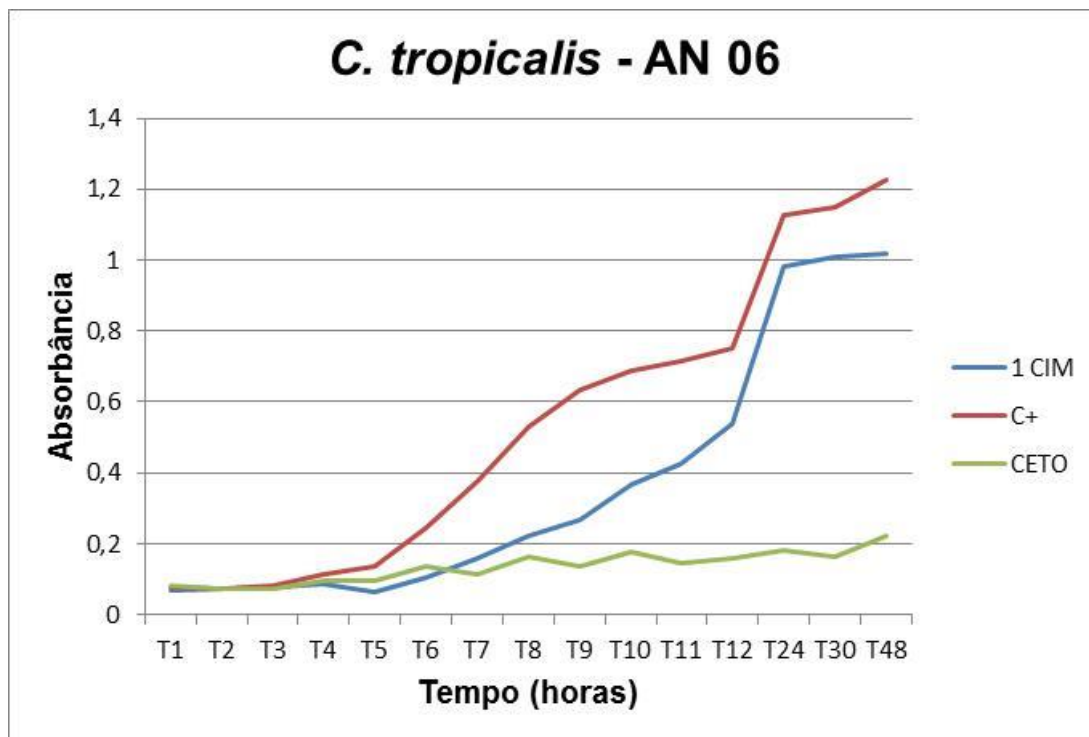
A Tabela 7 mostra os percentuais de inibição do crescimento fúngico do derivado **AN 06** em relação à espécie *C. albicans*. No tempo 48h, na concentração de 2x CIM (16µg/mL) mostrou inibição de 12% contra 65% do cetoconazol.

Tabela 7: Percentual de Inibição do Crescimento Fúngico em diferentes pontos de cortes e concentrações do derivado AN 06 frente à *C. albicans* ATCC 24433

Leituras	Percentual de Inibição AN 06 <i>C. albicans</i> – ATCC 24433			Controle Experimental
	½ CIM	1 CIM	2 CIM	Cetoconazol
12 horas	1%	4%	17%	84%
24 horas	1,3%	2%	12%	81%
30 horas	0,2%	2%	7%	76%
48 horas	0,3%	6%	12%	65%

A molécula **AN 06** apresentou atividade frente à espécie *C. tropicalis*, CIM 32µg/mL, com perfil de inibição microbiano similar ao cetoconazol (CIM 8µg/mL) até o T5, e melhor atividade no T6, mostrando uma inibição do crescimento fúngico em 57,5% contra 44,6% de inibição do controle experimental conforme Gráfico 10.

Gráfico 10: Curva de Crescimento da *C. tropicalis* ATCC 750 sob a ação do derivado AN 06 e do cetoconazol na concentração de 1 CIM



Legenda: 1CIM= Concentração Inibitória Mínima (cor azul); C+= Controle positivo (vermelho); CETO= Cetoconazol (verde).

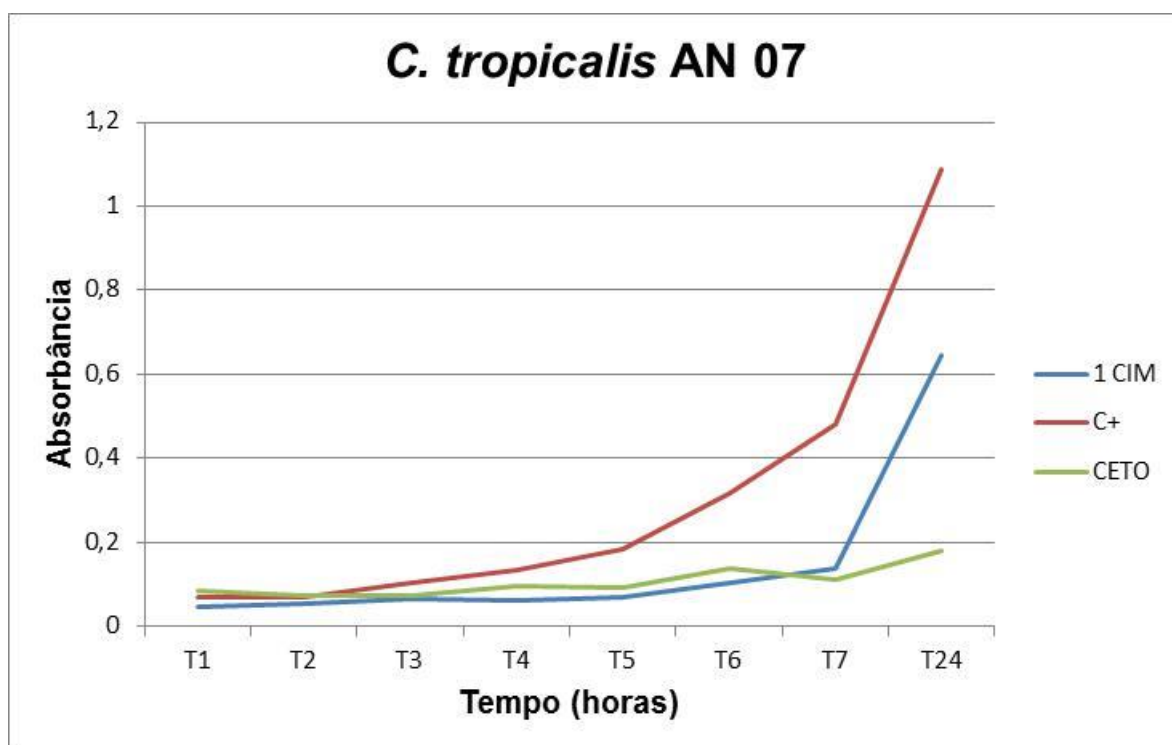
Na concentração de 2x CIM, no T12, a inibição do crescimento fúngico foi 81,3% no derivado **AN 06** contra 79% de inibição do cetoconazol, conforme Tabela 8.

Tabela 8: Percentual de Inibição do Crescimento Fúngico em diferentes pontos de cortes e concentrações do derivado AN 06 frente à *C. tropicalis* ATCC 750

Leituras	Percentual de Inibição AN 06 <i>C. tropicalis</i> – ATCC 750			Controle Experimental
	½ CIM	1 CIM	2 CIM	Cetoconazol
12 horas	> 100%	28,2%	81,3%	79%
24 horas	4,4%	13%	51%	84%
30 horas	5,6%	12,2%	45,6%	86%
48 horas	4,2%	17,2%	43,8%	81,8%

Para o derivado **AN 07** não foi possível repetir o experimento com mais tempos de cortes conforme sugerido devido à escassez de derivado, logo, os resultados obtidos foram das primeiras 07 horas e após 24 horas. O CIM para a molécula foi 32µg/mL e essa mostrou uma melhor inibição do crescimento microbiano em relação ao controle experimental entre T4 e T6, com inibição de 44,3% contra 32% do cetoconazol (8µg/mL) no T6, conforme Gráfico 11.

Gráfico 11: Curva de Crescimento da *C. tropicalis* ATCC 750 sob a ação do derivado AN 07 e do cetoconazol na concentração de 1 CIM



Legenda: 1CIM= Concentração Inibitória Mínima (cor azul); C+= Controle positivo (vermelho); CETO= Cetoconazol (verde).

No T6, na concentração sub-inibitória (1/2 CIM) o derivado apresentou melhor perfil de inibição fúngica, com inibição de 38,4% no T6, em comparação com o controle experimental, 32% (Tabela 9).

Tabela 9: Percentual de Inibição do Crescimento Fúngico em diferentes pontos de cortes e concentrações do derivado AN 07 frente à *C. tropicalis* ATCC 750

Leituras	Percentual de Inibição AN 07 <i>C. tropicalis</i> – ATCC 750			Controle Experimental
	$\frac{1}{2}$ CIM	1 CIM	2 CIM	Cetoconazol
06 horas	38,4%	44,3%	54,2%	32%
24 horas	31,7%	48,5%	65,1%	76,1%

5 DISCUSSÃO

Atualmente, o cenário de fármacos com atividade antifúngica não tem suprido a demanda de tratamento de infecções fúngicas oriundas das *Candida* spp. Relatos mostram que nas últimas décadas houve um aumento de infecções causadas principalmente por *Candida* spp. (CURVELO *et al.*, 2014). O quadro mundial de infecções envolvendo o gênero *Candida* tem como agravante a capacidade desta de formar biofilmes que funcionam como uma barreira para penetração desses antifúngicos, além de contribuírem, também, para os processos de reinfecção (FOX *et al.*, 2015; HOLLAND *et al.*, 2014). Outros fatores agravam o quadro, como o envelhecimento da população, o aumento da sobrevida de pacientes susceptíveis, o uso indiscriminado de antimicrobianos, além da identificação inadequada do patógeno causador da agressão com a consequente terapia incorreta, que leva ao surgimento de cepas resistentes (CHENG *et al.*, 2012).

A terapia antifúngica tem sido um desafio devido às semelhanças estruturais e bioquímicas entre os componentes encontrados nas células do hospedeiro e o alvo dos antimicrobianos na célula fúngica, podendo resultar em moléculas com maior perfil tóxico (DA SILVA-ROCHA *et al.*, 2014) como, por exemplo, a Anfotericina B, utilizada para o tratamento de infecções sistêmicas, que possui um perfil altamente nefrotóxico (PFALLER, MICHAEL A., 2012). Além disso, os fármacos presentes no mercado atualmente, e utilizados como primeira e segunda escolha na terapia, já apresentam alto índice de cepas resistentes, além de apresentarem caráter fungistático ao invés de fungicida (NEUFELD *et al.*, 2015; OLIVEIRA CARVALHO *et al.*, 2013; VASICEK *et al.*, 2014). Com base nesses dados, podemos ressaltar a premente necessidade e a importância do incentivo à pesquisa para descoberta de novos protótipos com ação antifúngica e baixa toxicidade para o tratamento de infecções causadas por espécies de *Candida* (MULU *et al.*, 2013).

Derivados organometálicas tem sido alvo de novos estudos atualmente e possuem potencial biológico já descrito na literatura (KUMAR; CHHIKARA, 2015; PARVEEN *et al.*, 2015). No presente estudo foi testada uma série com dezessete novos derivados organometálicos. Dentre as moléculas testadas, seis apresentaram atividade antifúngica no TSA com halos de inibição compreendidos entre 5 e 14mm enquanto o controle experimental apresentou halos de inibição do crescimento microbiano compreendidos entre 12 e 22mm (Gráficos 1). Todas as seis moléculas ativas no TSA apresentaram alerta de alto risco teórico para o efeito mutagênico e somente a molécula **VS 02** apresentou alerta de médio risco teórico para o efeito reprodutivo, enquanto o controle experimental mostrou baixo risco toxicológico *in silico* para todos os aspectos (Quadro 4). Alterações estruturais podem ser sugeridas para diminuir possíveis efeitos tóxicos e potencializar a ação microbiana já encontrada nessas moléculas. Na concentração inibitória mínima, os resultados obtidos ficaram entre a faixa de 64µg/mL a 512µg/mL (Quadro 5), valores considerados altos em relação à literatura, com possível efeito tóxico que pode ser agravado pela alta concentração do derivado, mostrando a dificuldade de novos fármacos com ação antifúngica e baixa toxicidade relacionada (HAVRYLYUK; ROMAN; LESYK, 2016; KUMAR; CHHIKARA, 2015; PARVEEN *et al.*, 2015).

A classe dos pirazóis é de grande importância farmacológica, pois possuem diversas propriedades terapêuticas com um vasto potencial biológico (MALLADI *et al.*, 2014) e neles a atividade antifúngica tem sido descrita na literatura (MALLADI *et al.*, 2014). Foram testadas no presente estudo cinco novas séries de pirazóis, com um total de quarenta e sete novos derivados testados, sendo que somente a série codificada como PVQD apresentou um (1) derivado com atividade antimicrobiana, o **PVQD 01**. Esse derivado apresentou atividade frente à *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. albicans* ATCC 24433 e *C. dubliniensis* ATCC MYA 646 com halo de inibição do teste de sensibilidade antimicrobiana de 12mm, 11mm e 12mm respectivamente (Gráfico 2), e no teste de concentração inibitória mínima (CIM) para ambas as cepas de > 256µg/mL e 64µg/mL respectivamente (Quadro 7). No teste de curva crescimento para a espécie *C. albicans*, o derivado apresentou inibição microbiana de 54,2% no T7, contra 50,3% do controle experimental, o cetoconazol, e 32,2% no T12 (Gráfico 3; Tabela 2), mostrando ser mais eficiente nas 12 primeiras horas. Este derivado apresenta um anel benzênico ligado ao anel pirazólico, enquanto os demais derivados dessa série

apresentam um grupo retirador de elétrons no anel benzênico, indicando que a atividade biológica encontrada está possivelmente relacionada a uma deficiência eletrônica neste anel benzênico. A possível atividade antifúngica relacionada ao anel benzênico foi descrita na literatura, (B'BHATT; SHARMA, 2013; MERT *et al.*, 2014) corroborando com a veracidade dos nossos resultados. O derivado **PVQD 01** não apresentou efeito mutagênico, tumorigênico ou reprodutivo, resultado igual ao obtido no ensaio *in silico* do Fluconazol (Figura 13) e para os os demais parâmetros oferecidos pelo programa Osiris®. O derivado manteve valores ideais previstos pelo programa (Quadro 3) com Drugscore de 0,74, similar ao controle experimental (0,87), conforme descrito na Quadro 6.

As pirazolonas são estruturas químicas com vasto potencial biológico descrito na literatura, inclusive com atividade antimicrobiana relacionada (ANTRE *et al.*, 2011; KHALIL *et al.*, 2014; NARAYANA RAO *et al.*, 2014; RAMAN; SELVAGANAPATHY, 2013). Este estudo testou uma série, contendo um total de cinco novas pirazolonas, codificadas como PVY. Somente uma molécula mostrou atividade frente à cepa fúngica *C. parapsilosis* ATCC 90018, com halo de inibição no teste de sensibilidade antimicrobiana de 18mm, maior em relação ao halo de inibição do controle experimental (17mm) (Gráfico 2). No teste de concentração inibitória mínima (CIM), encontramos o valor de 128µg/mL (Quadro 7), resultado considerado alto, conforme descrito na literatura, com possível efeito tóxico que pode ser agravado devido à alta concentração do derivado necessário para inibir o crescimento fúngico (HAVRYLYUK; ROMAN; LESYK, 2016; KUMAR; CHHIKARA, 2015; PARVEEN *et al.*, 2015). Este derivado apresenta um anel benzênico ligado ao anel pirazolônico com um átomo de cloro na posição orto (1,2), promovendo uma interação hidrofóbica com o sítio ativo da molécula alvo no fungo, e gerando uma deficiência eletrônica neste anel benzênico. Resultados similares para essa classe com um átomo de cloro sendo relacionado com a possível atividade antimicrobiana estão descritos na literatura (PARVEEN *et al.*, 2015). A nova pirazolona, **PVY 08** mostrou um perfil toxicológico *in silico* promissor, com valores de solubilidade, lipofilicidade, Druglikeness e Drugscore dentro dos padrões previstos pelo programa computacional Osiris®. Contudo, essa molécula apresentou alerta de médio risco *in silico* para o efeito irritante (Quadro 6) de acordo com o programa computacional Osiris®, ainda a ser explorado em ensaios *in vitro* e *in*

vivo, além de alterações estruturais podem ser sugeridas para diminuir possíveis efeitos tóxicos e potencializar a ação microbiana já encontrada nessa molécula.

Os derivados de pirazóis e pirazolonas ativos não apresentaram atividade maior em relação aos fármacos já utilizados na prática clínica, possivelmente devido a basicidade do nitrogênio (N) presente no anel do pirazol e da pirazolona, mostrando a dificuldade, também relatada na literatura, de alcançarmos um protótipo eficaz com atividade antifúngica e baixo efeito tóxico (THUMAR; PATEL, 2011). Vale ressaltar que uma alteração na configuração molecular desses derivados pode favorecer a atividade antifúngica, mostrando assim que os mesmos apresentam potenciais a serem explorados por modificações futuras.

As naftoquinonas são estruturas de interesse, pois apresentam variadas propriedades terapêuticas, incluindo-se a antibacteriana (PINHO *et al.*, 2011) e a antifúngica (CASTRO *et al.*, 2013). Essas estruturas possuem a capacidade de induzir o stress oxidativo (PINHO *et al.*, 2011; SALOMÃO *et al.*, 2013). Em nosso trabalho, a análise da série de 16 derivados inéditos naftoquinônicos codificados como AN revelou 4 (quatro) moléculas com atividade confirmando a literatura que aponta esta classe com potencial para o planejamento de novas moléculas com atividade biológica.

Nessa série, a molécula **AN 04** apresentou atividade frente à *C. glabrata* ATCC 90030 (halo de inibição: 9mm e CIM de 16µg/mL), *C. krusei* ATCC 34135 (halo de inibição:13mm e CIM de > 512µg/mL) e *C. albicans* ATCC 24433 (halo de inibição: 13mm e CIM = 16µg/mL), resultados descritos conforme o Gráfico 4 e Quadro 9. Os resultados obtidos na curva de crescimento para *C. albicans* foram satisfatórios, mostrando uma inibição de aproximadamente 72% entre os T12 e T48, com inibição do crescimento microbiano similar ao controle experimental entre os T12 e T30, e superior ao controle no T 48, mostrando uma inibição fúngica de 71% contra 63,4% do cetoconazol (Gráfico 5; Tabela 3). Para a espécie *C. glabrata* os resultados foram abaixo do esperado com inibição de aproximadamente 13% do crescimento microbiano nas primeiras 24 horas. Contudo, essa molécula mostrou inibição similar ao cetoconazol nos primeiros tempos (T1 a T3), conforme Gráfico 6.

A molécula **AN 05** apresentou maior espectro de ação frente a diferentes espécies de *Candida*, foram elas: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*. Os valores encontrados no teste de sensibilidade antimicrobiana e concentração inibitória

mínima foram: *C. tropicalis* ATCC 750 halo de inibição: 11mm e CIM > 256µg/mL; *C. glabrata* ATCC 90030 com halo de inibição: 15mm e CIM de 32µg/mL; *C. krusei* ATCC 34135 halo de inibição: 11mm e CIM de 128µg/mL e *C. albicans* ATCC 24433 halo de inibição: 18mm e CIM de 16µg/mL, conforme Gráfico 4 e Quadro 9. Esses resultados mostram que esse derivado é promissor visto que o mesmo apresentou atividade antimicrobiana frente à espécie mais isolada em infecções por *Candida* (*Candida albicans*) (CALDERÓN-NOREÑA *et al.*, 2015), além de ser ativo frente a espécies não *albicans* que apresentam resistência intrínseca ou sensibilidade diminuída (*Candida krusei* e *Candida glabrata* respectivamente), ao fármaco usado como primeira escolha para o tratamento dessas infecções, o fluconazol (RICARDO *et al.*, 2014; SCHWARZMÜLLER *et al.*, 2014). Além disso, na metodologia de curva de crescimento essa molécula mostrou o melhor resultado entre as naftoquinonas testadas, com uma estabilidade melhor em relação ao observado pelo controle, e maior ação antifúngica frente à *C. albicans* com aproximadamente 64,3% de inibição do crescimento fúngico na concentração 16 µg/mL, entre os T12 e T48. Ao se dobrar a concentração, houve uma melhor inibição do crescimento microbiano nos tempos 30h e 48h de aproximadamente 77,5% e 72,3 respectivamente, contra 76,6% e 65,8% de inibição do crescimento apresentado pelo cetoconazol, conforme Tabela 5. Em relação à *C. glabrata*, os resultados permaneceram promissores, com inibição de aproximadamente 77% do crescimento microbiano no T12, contra 60,2% de inibição observada pelo controle experimental. Nos tempos seguintes: T24, T30 e T48 a atividade permaneceu melhor, comparado ao controle experimental, com inibição microbiana de 61,3%, 58% e 48,6% respectivamente, contra 56,8% 48,6% e 45,3% respectivamente, conforme descrito no Gráfico 8 e Tabela 6. Essa melhor atividade está possivelmente relacionada ao átomo de flúor (F) ligado ao anel benzênico, presente somente na molécula **AN 05**, (molécula **AN 04** possui somente o anel benzênico), pois o mesmo retira elétrons por indução, mas aumenta a hidrofobicidade (Figura 32). Outra molécula similar ao **AN 05**, mas com um grupamento aldeído ao invés do flúor, o **AN 08**, não apresentou atividade antifúngica, possivelmente devido ao aumento da circulação eletrônica por ressonância, deixando a molécula mais polarizada, logo, menos hidrofóbica, além da mesma também sofrer um possível efeito estérico devido à carbonila. Esses resultados sugerem a atividade relacionada ao flúor, similar a relatos encontrados na literatura (substâncias halogenadas) (CASTRO *et al.*, 2013).

A molécula **AN 06** apresentou maior atividade para espécie de maior importância clínica, a *C. albicans* ATCC 24433, com halo de inibição = 11mm e menor CIM observado no presente estudo, 8µg/mL (Gráfico 4; Quadro 9). Contudo, observamos que no teste de curva de crescimento, o percentual de inibição do crescimento microbiano foi abaixo do esperado, com inibição microbiana de 12% contra 65% do cetoconazol no T48, na concentração de 2x CIM (16µg/mL), essa molécula apresentou uma atividade similar ao controle experimental nas primeiras 06 horas, sugerindo um possível efeito saniante (Gráfico 9; Tabela 7). A mesma molécula frente à espécie *C. tropicalis* ATCC 750, apresentou halo de inibição = 11mm e CIM = 32µg/mL (Gráfico 4; Quadro 9), e no teste de curva de crescimento a mesma mostrou um perfil de inibição microbiano similar ao cetoconazol (CIM 8µg/mL) até o T5, e melhor atividade no T6, mostrando uma inibição do crescimento fúngico de 57,5% contra 44,6% de inibição do controle experimental, conforme Gráfico 10.

A molécula **AN 07** apresentou atividade somente para a espécie *C. tropicalis* ATCC 750, com halo de inibição de 15mm e CIM de 32µg/mL (Gráfico 4; Quadro 9), com inibição de crescimento no T6 de 71% contra 32% do cetoconazol (Gráfico 11; Tabela 9), mostrando melhor atividade nas primeiras 06 horas. As moléculas **AN 06** e **AN 07** apresentam um tiofeno ligado ao anel naftoquinônico diferenciando-se na posição do enxofre (Figura 32), promovendo uma possível atividade devido ao bioisoterismo do anel (tiofeno e benzeno), mas a presença do heteroátomo (enxofre - S) interfere na hidrofobicidade do anel, diminuindo possivelmente o efeito sobre o sítio de ação do microrganismo.

Os derivados naftoquinônicos ativos que apresentaram CIM menor que 128µg/mL frente às diferentes espécies de *Candida*, foram submetidos ao teste de curva de crescimento para observação da interação da nova molécula, em diferentes concentrações, frente à viabilidade celular do microrganismo em diferentes intervalos de tempo, mostraram um perfil recorrente e proporcional, de acordo com a concentração estabelecida. Observamos também um efeito fungistático dos derivados testados frente as cepas microbianas conforme já descrito na literatura em relação a alguns antifúngicos usados na prática clínica como, por exemplo, o fluconazol, o itraconazol, o cetoconazol, a caspofungina e também novas moléculas sintéticas e naturais, corroborando para veracidade dos nossos resultados obtidos e confirmando o

potencial microbiano dessa classe (CASTRO *et al.*, 2013; MOREAU *et al.*, 2002; NETT; ANDES, 2016).

Todos os derivados naftoquinônicos ativos apresentaram perfil toxicológico *in silico* promissor, assim como o pirazol, com baixo risco *in silico* para os alertas de efeito mutagênico, tumorigênico, irritante ou reprodutivo de acordo com o programa computacional Osiris®, e, quando comparados com o controle positivo, o Fluconazol, apresentaram o mesmo resultado (Quadro 8).

Ao fazer uma análise da relação estrutura-atividade da nova série de naftoquinona, observamos que todas as moléculas ativas possuíam sempre uma hidroxila ligada ao anel naftoquinônico, imputando para as mesmas, um caráter ácido, além de um anel benzênico (com/sem a presença de um átomo de flúor) ou tiofeno (anel de 5 átomos ou menos, contendo enxofre). Características possivelmente importantes para a atividade observada, pois o benzeno e o tiofeno podem promover uma interação hidrofóbica com o sítio ativo da molécula alvo no fungo, além da molécula contendo a hidroxila (OH) conferir um caráter um pouco ácido, devido ao átomo de hidrogênio. Algumas moléculas testadas que não apresentaram atividade possuíam em sua estrutura o grupo NH₂ ao invés da hidroxila, observando-se uma mudança de caráter da molécula, agora sendo básico devido ao NH₂, com perda da atividade. Observamos, ainda, algumas moléculas com vários radicais ligados diretamente ao anel naftoquinônico, e essas não apresentaram atividade provavelmente devido a um impedimento estérico (impedimento por espaço devido a um grupo volumoso), inibindo a interação com o sítio ativo no microrganismo. Relatos da literatura mostram atividade dessa classe relacionada com a hidroxila e átomos halogênicos, conforme observado nos nossos resultados, confirmando a veracidade dos mesmos (CASTRO *et al.*, 2013; IBIS *et al.*, 2011). Vale ressaltar que todas essas moléculas são inéditas, e ainda não foram realizados estudos para evidenciar o mecanismo de ação utilizado pelas mesmas.

6 CONCLUSÃO

Foram testados cento e onze (111) novos derivados sendo que aproximadamente 10% (12 derivados) apresentaram atividade antifúngica de acordo com o Teste de Sensibilidade Antimicrobiana. As classes que apresentaram atividade antimicrobiana foram: Organometálicos (**VS 01, VS 02, VS 05, VS 07, VS 12 e VS 17**), Pirazol (**PVQD 01**), Pirazolona (**PVY 08**), e Naftoquinona (**AN 04, AN 05, AN 06 e AN 07**) frente a diferentes espécies de *Candida*.

Quanto ao estudo de toxicidade *in silico*, concluímos que o derivado pirazólico e as naftoquinonas ativas apresentaram resultados promissores com baixo efeito toxicológico teórico para todos os aspectos testados e valores farmacocinéticos de acordo com o previsto pelo programa Osiris®.

Dentre os 12 derivados ativos no TSA, o derivado de pirazol, **PVQD 01** e as naftoquinonas, **AN04, AN 05, AN 06 e AN 07**, apresentaram CIM menor ou igual à 64µg/mL, promissores de acordo com o CLSI e a literatura. Destacam-se os derivados **AN 06 e AN 05**, pois, os mesmos apresentaram menor CIM encontrado no presente estudo, 08 µg/mL, e maior espectro de ação, respectivamente.

Dentre os derivados testados na curva de crescimento, as naftoquinonas exibiram variados percentuais de inibição, apresentando um perfil fungistático, também observado nos controle experimentais, o Fluconazol e o Cetoconazol, além de um perfil recorrente e proporcional, de acordo com as concentrações testadas. O derivado **AN 05** permanece em destaque pois apresentou melhor atividade frente a duas espécies de importância clínica testadas, a *C. albicans* e a *C. glabrata*, com inibição do crescimento microbiano no T 48 de 58,7% e 48,6% respectivamente com atividade similar ao controle experimental.

Através da análise dos resultados obtidos é possível afirmar que a classe das naftoquinonas apresenta um potencial promissor em relação à ação antifúngica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKEME YAMAMOTO, ANA CAROLINE *et al.* Epidemiological and clinical characteristics of nosocomial candidiasis in university hospitals in Cuiabá – Mato Grosso, Brazil. **Revista Iberoamericana de Micología** v. 29, n. 3, p. 164–168 , jul. 2012. Acesso em: 5 set. 2016.

ALASTRUEY-IZQUIERDO, ANA *et al.* SUSCEPTIBILITY TEST FOR FUNGI: CLINICAL AND LABORATORIAL CORRELATIONS IN MEDICAL MYCOLOGY. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** PMID: 26465371PMCID: PMC4711191, v. 57, n. Suppl 19, p. 57–64 , set. 2015. Acesso em: 21 set. 2016.

ALBATAINEH, MOHAMMAD T. *et al.* Update from the Laboratory: Clinical Identification and Susceptibility Testing of Fungi and Trends in Antifungal Resistance. **Infectious Disease Clinics of North America** Fungal Infections. v. 30, n. 1, p. 13–35, mar. 2016. Acesso em: 5 set. 2016.

ÁLVAREZ-PÉREZ, SERGIO *et al.* Acquired multi-azole resistance in *Candida tropicalis* during persistent urinary tract infection in a dog. **Medical Mycology Case Reports** v. 11, p. 9–12 , mar. 2016. Acesso em: 11 out. 2016.

ANTRE, RISHIKESH V. *et al.* Microwave assisted synthesis of novel pyrazolone derivatives attached to a pyrimidine moiety and evaluation of their anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities. **Saudi Pharmaceutical Journal** v. 19, n. 4, p. 233–243, out. 2011. Acesso em: 12 abr. 2015.

AZANZA PEREA, JOSÉ RAMÓN. Equinocandinas: aspectos aplicados de la farmacología. **Revista Iberoamericana de Micología** v. 33, n. 3, p. 140–144 , jul. 2016. Acesso em: 3 out. 2016.

BACHELET, J.-T. *et al.* Conidiobolus coronatus infections revealed by a facial tumor]. **Revue De Stomatologie, De Chirurgie Maxillo-Faciale Et De Chirurgie Orale** PMID: 24462378, v. 115, n. 2, p. 114–117 , abr. 2014

BARROS, PATRÍCIA PIMENTEL *et al.* Influence of *Candida krusei* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* gene expression in in vitro biofilms. **Archives of Oral Biology** v. 64, p. 92–101 , abr. 2016. Acesso em: 11 out. 2016.

B'BHATT, H.; SHARMA, S. Synthesis and antimicrobial activity of pyrazole nucleus containing 2-thioxothiazolidin-4-one derivatives. **Arabian Journal of Chemistry** , 30 maio 2013. Acesso em: 12 set. 2016.

BEKHIT, ADNAN A. *et al.* New heterocyclic hybrids of pyrazole and its bioisosteres: Design, synthesis and biological evaluation as dual acting antimalarial-antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 94, p. 30–44 , 13 abr. 2015. Acesso em: 2 abr. 2015.

BROWN, ALISTAIR J. P. *et al.* Stress adaptation in a pathogenic fungus. **The Journal of Experimental Biology** PMID: 24353214PMCID: PMC3867497, v. 217, n. 1, p. 144–155 , 1 jan. 2014. Acesso em: 23 mar. 2015.

CALDERÓN-NOREÑA, DIANA M. *et al.* A Single Nucleotide Polymorphism Uncovers a Novel Function for the Transcription Factor Ace2 during *Candida albicans* Hyphal Development. **PLoS genetics** PMID: 25875512, v. 11, n. 4, p. e1005152 , abr. 2015.

CAMARGO, MARCELA R. *et al.* Modulation of macrophage cytokine profiles during solid tumor progression: susceptibility to *Candida albicans* infection. **BMC infectious diseases** PMID: 19534779 PMCID: PMC2705374, v. 9, p. 98 , 2009.

CASTRO, MA ÁNGELES *et al.* Synthesis and antifungal activity of terpenyl-1,4-naphthoquinone and 1,4-anthracenedione derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 67, p. 19–27 , set. 2013. Acesso em: 6 abr. 2015.

CHAUVEL, MURIELLE *et al.* A versatile overexpression strategy in the pathogenic yeast *Candida albicans*: identification of regulators of morphogenesis and fitness. **PloS One** PMID: 23049891 PMCID: PMC3457969, v. 7, n. 9, p. e45912 , 2012.

CHENG, SHIH-CHIN *et al.* Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense. **Infection and Immunity** PMID: 22252867 PMCID: PMC3318407, v. 80, n. 4, p. 1304–1313, abr. 2012.

CHEN, YING-LIEN *et al.* Calcineurin Controls Hyphal Growth, Virulence, and Drug Tolerance of *Candida tropicalis*. **Eukaryotic Cell** PMID: 24442892PMCID: PMC4135728, v. 13, n. 7, p. 844–854, jul. 2014. Acesso em: 21 mar. 2015.

CHO, TAMAKI *et al.* Importance of Diversity in the Oral Microbiota including *Candida species* Revealed by High-Throughput Technologies. **International Journal of Dentistry** PMID: 24864144 PMCID: PMC4016938, v. 2014, p. 454391 , 2014

CLSI-Metodologia Dos Testes de Sensibilidade microbiana. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluicao para Bacteria de Crescimento Aerobico Norma Aprovada-Sexta-Edicao. Acesso em: 13 out. 2014.

CURVELO, JOSÉ ALEXANDRE DA ROCHA *et al.* Effect of the secretory leucocyte proteinase inhibitor (SLPI) on *Candida albicans* biological processes: a therapeutic alternative? **Archives of Oral Biology** PMID: 24907522, v. 59, n. 9, p. 928–937 , set. 2014.

DA CRUZ, EDUARDO H. G. *et al.* 1,2,3-Triazole-, arylamino- and thio-substituted 1,4-naphthoquinones: Potent antitumor activity, electrochemical aspects, and bioisosteric replacement of C-ring-modified lapachones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v. 22, n. 5, p. 1608–1619 , 1 mar. 2014. Acesso em: 6 abr. 2015.

DANIEL J. SHEEHAN, PH.D. *et al.* *Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline* Volume 24 Number 15, 2009. Disponível em: <http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/M44A2_sample.pdf>. Acesso em: 8 maio 2014. , ago. 2009

DA SILVA-ROCHA, WALICYRANISON PLINIO *et al.* *Candida* species distribution, genotyping and virulence factors of *Candida albicans* isolated from the oral cavity of kidney transplant recipients of two geographic regions of Brazil. **BMC oral health** PMID: 24628850 PMCID: PMC3995545, v. 14, p. 20 , 2014.

DE GROOT, PIET W. J. *et al.* Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick. **Eukaryotic Cell** PMID: 23397570 PMCID: PMC3623432, v. 12, n. 4, p. 470–481 , abr. 2013.

DEORUKHKAR, SACHIN C.; SAINI, SANTOSH; MATHEW, STEPHEN. Virulence Factors Contributing to Pathogenicity of *Candida tropicalis* and Its Antifungal Susceptibility Profile. **International Journal of Microbiology** PMID: 24803934 PMCID: PMC3996979, v. 2014, 2014. Acesso em: 21 mar. 2015.

DESAI, JIGAR V. *et al.* Regulatory role of glycerol in *Candida albicans* biofilm formation. **mBio** PMID: 23572557 PMCID: PMC3622937, v. 4, n. 2, p. e00637–00612 , 2013.

DE SOUZA, SILVANA PEREIRA; JORGE, VALÉRIA MAGALHÃES; XAVIER, MELISSA ORZECOWSKI. Paracoccidioidomycosis in southern Rio Grande do Sul: a retrospective study of histopathologically diagnosed cases. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]** PMID: 24948940 PMCID: PMC4059305, v. 45, n. 1, p. 243–247 , 2014.

EDDOUZI, JAMEL *et al.* Molecular mechanisms of drug resistance in clinical *Candida species* isolated from Tunisian hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** PMID: 23629718 PMCID: PMC3697321, v. 57, n. 7, p. 3182–3193 , jul. 2013.

EL-GAMEL, NADIA E. A.; FARGHALY, THORAYA A. Design and synthesis of novel complexes containing N-phenyl-1H-pyrazole moiety: Ni complex as potential antifungal and antiproliferative compound. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy** v. 115, p. 469–475, nov. 2013. Acesso em: 2 abr. 2015.

FOX, EMILY P. *et al.* An Expanded Regulatory Network Temporally Controls *Candida albicans* Biofilm Formation. **Molecular Microbiology** PMID: 25784162, 18 mar. 2015.

GAITANIS, GEORGIOS *et al.* The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases. **Clinical Microbiology Reviews** PMID: 22232373 PMCID: PMC3255962, v. 25, n. 1, p. 106–141 , jan. 2012

GIL-ALONSO, SANDRA *et al.* Postantifungal effect of caspofungin against the *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* clades. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** v. 86, n. 2, p. 172–177, out. 2016. Acesso em: 11 out. 2016.

GIL-ALONSO, SANDRA *et al.* Postantifungal Effect of Micafungin against the Species Complexes of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. **PloS One** PMID: 26168269, v. 10, n. 7, p. e0132730 , 2015.

GRUMAZ, CHRISTIAN *et al.* Species and condition specific adaptation of the transcriptional landscapes in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. **BMC genomics** PMID: 23547856 PMCID: PMC3626586, v. 14, p. 212 , 2013.

GÜZEL, AHMET BARIŞ *et al.* Clinical Characteristics of Turkish Women with *Candida krusei* Vaginitis and Antifungal Susceptibility of the *C. krusei* Isolates. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology** PMID: 24396265 PMCID: PMC3874352, v., 2013.

HAVRYLYUK, DMYTRO; ROMAN, OLEXANDRA; LESYK, ROMAN. Synthetic approaches, structure activity relationship and biological applications for pharmacologically attractive pyrazole/pyrazoline–thiazolidine-based hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 113, p. 145–166, 4 maio 2016. Acesso em: 12 set. 2016.

HOLLAND, LINDA M. *et al.* Comparative Phenotypic Analysis of the Major Fungal Pathogens *Candida parapsilosis* and *Candida albicans*. **PLoS Pathogens** PMID: 25233198 PMCID: PMC4169492, v. 10, n. 9 , 18 set. 2014. Acesso em: 21 mar. 2015.

HOOK, INGRID; MILLS, CLIVE; SHERIDAN, HELEN. Chapter 5 - Bioactive Naphthoquinones from Higher Plants. In: ATTA-UR-RAHMAN (Org.). **Studies in Natural Products Chemistry**. Elsevier, 2014. 41 v. p. 119–160. Acesso em: 6 abr. 2015.

HUANG, GUANGHUA. Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen *Candida albicans*. **Virulence** PMID: 22546903 PMCID: PMC3442837, v. 3, n. 3, p. 251–261 , 1 maio 2012.

HUSAIN, ASIF *et al.* Synthesis and biological evaluation of di- and tri-substituted imidazoles as safer anti-inflammatory-antifungal agents. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences** PMID: 23833522 PMCID: PMC3697195, v. 5, n. 2, p. 154–161 , abr. 2013.

IBIS, CEMIL *et al.* Synthesis and biological evaluation of novel nitrogen- and sulfur-containing hetero-1,4-naphthoquinones as potent antifungal and antibacterial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 46, n. 12, p. 5861–5867 , dez. 2011. Acesso em: 14 abr. 2015.

IMBERT, S. *et al.* Discontinuation of echinocandin and azole treatments led to the disappearance of an FKS alteration but not azole resistance during clonal *Candida glabrata* persistent candidaemia. **Clinical Microbiology and Infection**. 2016 Acesso em: 3 out. 2016.

JACKSON, ANDREW P. *et al.* Comparative genomics of the fungal pathogens *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. **Genome Research** PMID: 19745113, v. 19, n. 12, p. 2231–2244 , 1 dez. 2009. Acesso em: 23 mar. 2015.

JAIN, CHARU *et al.* The role of *Candida albicans* AP-1 protein against host derived ROS in in vivo models of infection. **Virulence** PMID: 23314569 PMCID: PMC3544750, v. 4, n. 1, p. 67–76 , 1 jan. 2013.

JHA, ANUBHUTI; KUMAR, AWANISH. Development and targeting of transcriptional regulatory network controlling FLU1 activation in *Candida albicans* for novel antifungals. **Journal of Molecular Graphics and Modelling** v. 69, p. 1–7, set. 2016. Acesso em: 11 out. 2016.

KABIR, M. ANAUL; HUSSAIN, MOHAMMAD ASIF; AHMAD, ZULFIQAR. *Candida albicans*: A Model Organism for Studying Fungal Pathogens. **ISRN microbiology** PMID: 23762753 PMCID: PMC3671685, v. 2012, p. 538694 , 2012.

KASHEM, SAKEEN W. *et al.* *Candida albicans* Morphology and Dendritic Cell Subsets Determine T Helper Cell Differentiation. **Immunity** v. 42, n. 2, p. 356–366 , 17 fev. 2015. Acesso em: 16 abr. 2015.

KHALIL, NADIA ABDALLA *et al.* Synthesis and biological evaluation of new pyrazolone–pyridazine conjugates as anti-inflammatory and analgesic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v. 22, n. 7, p. 2080–2089, 1 abr. 2014. Acesso em: 12 abr. 2015.

KENDRE, BABASAHEB V.; LANDGE, MAHADEV G.; BHUSARE, SUDHAKAR R. Synthesis and biological evaluation of some novel pyrazole, isoxazole, benzoxazepine, benzothiazepine and benzodiazepine derivatives bearing an aryl sulfonate moiety as antimicrobial and anti-inflammatory agents. **Arabian Journal of Chemistry**. 2015.

KONSTANTYNER, THAIS CLAUDIA ROMA DE OLIVEIRA *et al.* Factors associated with time free of oral candidiasis in children living with HIV/AIDS, São Paulo, Brazil. **Cadernos De Saúde Pública** PMID: 24233035, v. 29, n. 11, p. 2197–2207 , nov. 2013.

KWON-CHUNG, KYUNG J. Taxonomy of fungi causing mucormycosis and entomophthoromycosis (zygomycosis) and nomenclature of the disease: molecular mycologic perspectives. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America** PMID: 22247451 PMCID: PMC3276235, v. 54 Suppl 1, p. S8–S15 , fev. 2012.

KUMAR, RAJIV; CHHIKARA, BHUPENDER S. Organometallic assemblies: π -electron delocalization, μ -bridging spacers, flexibility, lipophilic nature, bio-accessibility, bioavailability, intracellular trafficking pathways and antimicrobial assimilation. **Journal of Organometallic Chemistry** v. 776, p. 64–76, 15 jan. 2015. Acesso em: 12 set. 2016.

MALLADI, SHRIDHAR *et al.* Synthesis and biological evaluation of newer analogues of 2,5-disubstituted 1,3,4-oxadiazole containing pyrazole moiety as antimicrobial agents. **Arabian Journal of Chemistry** v. 7, n. 6, p. 1185–1191, dez. 2014. Acesso em: 2 abr. 2015.

MARCONI, CAMILA *et al.* Comparison between qualitative and semiquantitative catheter-tip cultures: laboratory diagnosis of catheter-related infection in newborns. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]** PMID: 24031213 PMCID: PMC3768388, v. 39, n. 2, p. 262–267, abr. 2008.

MATHÉ, LOTTE; VAN DIJCK, PATRICK. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. **Current Genetics** PMID: 23974350PMCID: PMC3824241, v. 59, n. 4, p. 251–264 , 2013. Acesso em: 23 mar. 2015.

MAYER, FRANCOIS L.; WILSON, DUNCAN; HUBE, BERNHARD. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence** PMID: 23302789PMCID: PMC3654610, v. 4, n. 2, p. 119–128 , 15 fev. 2013. Acesso em: 6 out. 2014.

MERT, SAMET *et al.* Synthesis, structure–activity relationships, and in vitro antibacterial and antifungal activity evaluations of novel pyrazole carboxylic and dicarboxylic acid derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 78, p. 86–96, 6 maio 2014. Acesso em: 12 set. 2016.

MORALES, DIANA K. *et al.* Control of *Candida albicans* metabolism and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* phenazines. **mBio** PMID: 23362320 PMCID: PMC3560528, v. 4, n. 1, p. e00526–00512 , 2013.

MOREAU, STÉPHANE *et al.* (2-Arylhydrazonomethyl)-substituted xanthenes as antimycotics: synthesis and fungistatic activity against *Candida* species. **European Journal of Medicinal Chemistry** v. 37, n. 3, p. 237–253 , mar. 2002. Acesso em: 5 set. 2016.

MULU, ANDARGACHEW *et al.* Frequent detection of “azole” resistant *Candida* species among late presenting AIDS patients in northwest Ethiopia. **BMC infectious diseases** PMID: 23398783 PMCID: PMC3577436, v. 13, p. 82, 2013.

NAICKER, SERISHA D. *et al.* Two echinocandin-resistant *Candida glabrata* FKS mutants from South Africa. **Medical Mycology Case Reports** v. 11, p. 24–26 , mar. 2016. Acesso em: 21 set. 2016.

NARAYANA RAO, D. V. *et al.* In vitro microbiological evaluation of novel bis pyrazolones. **Annales Pharmaceutiques Françaises** v. 72, n. 2, p. 101–106 , mar. 2014. Acesso em: 12 abr. 2015.

NETO, JOÃO B. A. *et al.* Antifungal Activity of Naphthoquinoidal Compounds In Vitro against Fluconazole-Resistant Strains of Different *Candida* Species: A Special Emphasis on Mechanisms of Action on *Candida tropicalis*. **PLoS ONE** PMID: 24817320PMCID: PMC4015898, v. 9, n. 5 , 9 maio 2014. Acesso em: 21 mar. 2015.

NETT, JENIEL E.; ANDES, DAVID R. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. **Infectious Disease Clinics of North America** PMID: 26739608, v. 30, n. 1, p. 51–83, mar. 2016.

NEUFELD, PAULO MURILLO *et al.* Nosocomial candidiasis in Rio de Janeiro State: Distribution and fluconazole susceptibility profile. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]** PMID: 26273262PMCID: PMC4507539, v. 46, n. 2, p. 477–484, jun. 2015.

NIM, SHWETA *et al.* Atomic modelling and systematic mutagenesis identify residues in multiple drug binding sites that are essential for drug resistance in the major *Candida*

transporter Cdr1. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes** v. 1858, n. 11, p. 2858–2870 , nov. 2016. Acesso em: 11 out. 2016.

OLIVEIRA CARVALHO, VAGNER *et al.* The new mutation L321F in *Candida albicans* ERG11 gene may be associated with fluconazole resistance. **Revista Iberoamericana De Micología** PMID: 23402828, v. 30, n. 3, p. 209–212 , set. 2013.

PARK, HYUN JUNG *et al.* Skin Characteristics in Patients with Pityriasis Versicolor Using Non-Invasive Method, MPA5. **Annals of Dermatology** PMID: 23197911 PMCID: PMC3505776, v. 24, n. 4, p. 444–452 , nov. 2012.

PARVEEN, HUMAIRA *et al.* Synthesis, characterization and biological evaluation of some novel nitrogen and sulphur containing organometallic heterocycles. **Arabian Journal of Chemistry** , 3 maio 2015. Acesso em: 12 set. 2016.

PEAY, KABIR G.; BRUNS, THOMAS D. Spore dispersal of basidiomycete fungi at the landscape scale is driven by stochastic and deterministic processes and generates variability in plant-fungal interactions. **The New Phytologist** PMID: 24975121, v. 204, n. 1, p. 180–191, out. 2014.

PÉREZ, J. CHRISTIAN; KUMAMOTO, CAROL A.; JOHNSON, ALEXANDER D. *Candida albicans* commensalism and pathogenicity are intertwined traits directed by a tightly knit transcriptional regulatory circuit. **PLoS biology** PMID: 23526879 PMCID: PMC3601966, v. 11, n. 3, p. e1001510, 2013.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. **Journal of Clinical Microbiology** PMID: 22740712 PMCID: PMC3421803, v. 50, n. 9, p. 2846–2856 , set. 2012.

PFALLER, MICHAEL A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine** PMID: 22196207, v. 125, n. 1 Suppl, p. S3–13, jan. 2012.

PINHO, BRÍGIDA R. *et al.* Is Nitric Oxide Decrease Observed with Naphthoquinones in LPS Stimulated RAW 264.7 Macrophages a Beneficial Property? **PLoS ONE** PMID: 21887376 PMCID: PMC3162593, v. 6, n. 8 , 26 ago. 2011. Acesso em: 14 abr. 2015.

RAMAN, NATARAJAN; SELVAGANAPATHY, MUTHUSAMY. Pyrazolone incorporating amino acid metallointercalators as effective DNA targets: Synthesis and in vitro biocidal evaluation. **Inorganic Chemistry Communications** v. 37, p. 114–120 , nov. 2013. Acesso em: 12 abr. 2015.

RICARDO, ELISABETE *et al.* In Vivo and In Vitro Acquisition of Resistance to Voriconazole by *Candida krusei*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** PMID: 24867987 PMCID: PMC4136031, v. 58, n. 8, p. 4604–4611, ago. 2014. Acesso em: 23 mar. 2015.

ROBERTS, AMITY L.; ALELEW, AQILAH; IWEN, PETER C. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight mass spectrometry to differentiate

between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** v. 85, n. 1, p. 73–76 , maio 2016. Acesso em: 11 out. 2016.

SALOMÃO, KELLY *et al.* Trypanosoma cruzi mitochondrial swelling and membrane potential collapse as primary evidence of the mode of action of naphthoquinone analogues. **BMC Microbiology** PMID: 24004461PMCID: PMC3848626, v. 13, p. 196, 3 set. 2013. Acesso em: 14 abr. 2015.

SALZER, HELMUT J. F. *et al.* Hematogenous dissemination of *Candida dubliniensis* causing spondylodiscitis and spinal abscess in a HIV-1 and HCV-coinfected patient. **Medical Mycology Case Reports** v. 8, p. 17–20 , jun. 2015. Acesso em: 23 mar. 2015.

SANCHIS, MARTA *et al.* Voriconazole minimum inhibitory concentrations are predictive of treatment outcome in experimental murine infections by *Candida glabrata*. **International Journal of Antimicrobial Agents** v. 47, n. 4, p. 286–288, abr. 2016. Acesso em: 11 out. 2016.

SAPAAR, B. *et al.* Effects of extracellular DNA from *Candida albicans* and pneumonia-related pathogens on *Candida* biofilm formation and hyphal transformation. **Journal of Applied Microbiology** PMID: 24661775, v. 116, n. 6, p. 1531–1542 , jun. 2014.

SARKAR, SUPRIYA *et al.* Non-resolving pneumonia: A rare presentation of progressive disseminated histoplasmosis. **Lung India: Official Organ of Indian Chest Society** PMID: 24669090 PMCID: PMC3960818, v. 31, n. 1, p. 73–75, jan. 2014.

SAVASTANO, CATARINA *et al.* *Candida glabrata* among *Candida* spp. from environmental health practitioners of a Brazilian Hospital. **Brazilian Journal of Microbiology** v. 47, n. 2, p. 367–372 , abr. 2016. Acesso em: 11 out. 2016.

SCHWARZMÜLLER, TOBIAS *et al.* Systematic Phenotyping of a Large-Scale *Candida glabrata* Deletion Collection Reveals Novel Antifungal Tolerance Genes. **PLoS Pathogens** PMID: 24945925PMCID: PMC4063973, v. 10, n. 6 , 19 jun. 2014. Acesso em: 23 mar. 2015.

SHINDE, RAVIKUMAR B. *et al.* Sensitization of *Candida albicans* biofilms to various antifungal drugs by cyclosporine A. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials** PMID: 23035934 PMCID: PMC3508915, v. 11, p. 27 , 2012.

SINGARAVELU, KUMARA; GÁCSEK, ATTILA; NOSANCHUK, JOSHUA D. Genetic determinants of virulence – *Candida parapsilosis*. **Revista Iberoamericana de Micología** v. 31, n. 1, p. 16–21 , jan. 2014. Acesso em: 21 mar. 2015.

SRIVASTAVA, VIVEK KUMAR; SUNEETHA, KORIVI JYOTHIRAJ; KAUR, RUPINDER. The mitogen-activated protein kinase CgHog1 is required for iron homeostasis, adherence and virulence in *Candida glabrata*. **The FEBS journal** PMID: 25772226, 13 mar. 2015.

TAN, YULONG *et al.* Influence of culture conditions for clinically isolated non-albicans *Candida* biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods** v. 130, p. 123–128 , nov. 2016. Acesso em: 11 out. 2016.

TATI, SWETHA *et al.* Histatin 5 Resistance of *Candida glabrata* Can Be Reversed by Insertion of *Candida albicans* Polyamine Transporter-Encoding Genes DUR3 and DUR31. **PLoS ONE** PMID: 23613860PMCID: PMC3632557, v. 8, n. 4 , 22 abr. 2013. Acesso em: 23 mar. 2015.

THEILL, LAURA *et al.* Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida albicans* and its related species *Candida dubliniensis* and *Candida africana* isolated from vulvovaginal samples in a hospital of Argentina. **Revista Argentina de Microbiología** v. 48, n. 1, p. 43–49 , jan. 2016. Acesso em: 11 out. 2016.

TSANG, PAUL WAI-KEI *et al.* Purpurin Triggers Caspase-Independent Apoptosis in *Candida dubliniensis* Biofilms. **PLoS ONE** PMID: 24376900PMCID: PMC3871571, v. 8, n. 12 , 23 dez. 2013. Acesso em: 23 mar. 2015.

TSANG, PAUL WAI-KEI; BANDARA, H. M. H. N.; FONG, WING-PING. Purpurin suppresses *Candida albicans* biofilm formation and hyphal development. **PloS One** PMID: 23226409 PMCID: PMC3511323, v. 7, n. 11, p. e50866, 2012.

TSIODRAS, SOTIRIOS *et al.* An Unusual Cutaneous Tumor: African Histoplasmosis following Mudbaths: Case Report and Review. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** PMID: 22302860PMCID: PMC3269278, v. 86, n. 2, p. 261–263 , 1 fev. 2012. Acesso em: 21 abr. 2015.

THUMAR, NILESH J.; PATEL, MANISH P. Synthesis, characterization, and antimicrobial evaluation of carbostyryl derivatives of 1H-pyrazole. **Saudi Pharmaceutical Journal** v. 19, n. 2, p. 75–83 , abr. 2011. Acesso em: 12 abr. 2015.

VANDEPUTTE, PATRICK; FERRARI, SELENE; COSTE, ALIX T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. **International Journal of Microbiology** PMID: 22187560 PMCID: PMC3236459, v. 2012, p. 713687 , 2012.

VASICEK, ERIN M. *et al.* UPC2 Is Universally Essential for Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell** PMID: 24659578 PMCID: PMC4135735, v. 13, n. 7, p. 933–946, jul. 2014. Acesso em: 1 abr. 2015.

WANG, YING *et al.* Multilocus sequence typing of *Candida tropicalis* shows clonal cluster enrichment in azole-resistant isolates from patients in Shanghai, China. **Infection, Genetics and Evolution** v. 44, p. 418–424, out. 2016. Acesso em: 11 out. 2016.

WILLIAMS, DAVID W. *et al.* Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. **Journal of Oral Microbiology** PMID: 24155995 PMCID: PMC3805843, v. 5 , 2013.

YANG, QIANTING *et al.* Pharmacokinetic/pharmacodynamic adequacy of echinocandins against *Candida* spp. in intensive care unit patients and general patient populations. **International Journal of Antimicrobial Agents** v. 47, n. 5, p. 397–402, maio 2016. Acesso em: 21 set. 2016.

YANG, WEIMING *et al.* Fungal invasion of epithelial cells. **Microbiological Research** v. 169, n. 11, p. 803–810 , nov. 2014. Acesso em: 6 out. 2014.

YU, LI-HUA *et al.* Possible inhibitory molecular mechanism of farnesol on the development of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilm. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** PMID: 22106223 PMCID: PMC3264247, v. 56, n. 2, p. 770–775 , fev. 2012.

ZABOLINEJAD, NONA *et al.* Colonic basidiobolomycosis in a child: report of a culture-proven case. **International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases** PMID: 24614138, v. 22, p. 41–43 , maio 2014.

ZHANG, LEI *et al.* Surveillance of antifungal susceptibilities in clinical isolates of *Candida* species at 36 hospitals in China from 2009 to 2013. **International Journal of Infectious Diseases** v. 33, p. 1–4, abr. 2015. Acesso em: 16 abr. 2015.

APÊNDICE

ORIENTAÇÃO DE ALUNOS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

- Letícia Santos de Saules Silva – 2 anos
Email: le.saules@hotmail.com
- Giulliana de Castilho Barbosa Fortunato – 6 meses
Email: giulli31@hotmail.com
- Danielle Pinto da Silva – 11 meses
Email: daniellepintodasilva@yahoo.com.br
- Lorreinne Gama Cunha São Paio de Menezes – 3 meses
Email: lorreinne.m@gmail.com

APÊNDICE

TRABALHO APRESENTADO EM ANAIS DE CONGRESSO

SÍNTESE DE DERIVADOS PIRAZOLÔNICOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBACTERIANA

Borges, J. C. (IFRJ - Campus Nilópolis), Vegi, P. F. (UFF), Oliveira, C. D. (UFF), Souza, M. C. (UFF), Leal, B. (UFF), *Cavalcanti, L. (UFF)*, Santos, T. A. N. (UFF), Castro, H. C. (UFF), Kalil, M. V. (UFF), Saramago, G. (UFF), Bernardino, A. M. R. (UFF). **Painel - 38ª Reunião Anual da SBQ - 2015**

IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL ANTIFÚNGICO DE DERIVADOS SINTÉTICOS NAFTOQUINÔNICOS FRENTE A CEPAS DO GÊNERO *CANDIDA*

Lais Cavalcanti^{1,2,3}, Letícia Saules^{1,2}, Sabrina Sousa^{1,2}, Gabriela Saramago^{1,2}, Aline Louvis⁴, Bruno Leal^{1,2,3}, Marcos Kalil³, Daniela L. Martins⁴, Helena C. Castro¹. **Painel - III Simpósio em Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Doenças Bacterianas e Fúngicas (FIOCRUZ) - 2015**

ANÁLISE DO PERFIL ANTIFÚNGICO DE NOVOS DERIVADOS SINTÉTICOS NAFTOQUINÔNICOS FRENTE A DIFERENTES ESPÉCIES DO GÊNERO *CANDIDA*

Pamela Antunes de Macedo – Sales¹; Lais Cavalcanti dos Santos Velasco de Souza ^{2,4}; Letícia Santos Saules da Silva ⁴; Gabriela Saramago Gomes de Azevedo^{2,3}; Aline Louvis⁶; Bruno Ferreira Leal^{2,3}; Marcos Veiga Kalil⁵; Daniela Luna Martins⁶; Andréa Regina de Souza Baptista¹, Helena Carla Castro^{2,3,4}. **Painel – VIII Congresso Brasileiro de Micologia (CBMy) - 2016**

APÊNDICE
ARTIGO PUBLICADO


Artigo Publicado na Revista: New J. Chem

Ano da Publicação: 2016

Fator de Impacto: 3,277


Qualis: A2

NJC



PAPER

[View Article Online](#)
[View Journal | View Issue](#)



Cite this: *New J. Chem.*, 2016, 40, 7643

Received (in Montpellier, France)
18th March 2016,
Accepted 4th July 2016

DOI: 10.1039/c6nj00872k

www.rsc.org/njc

Synthesis, characterization and biological activities of 3-aryl-1,4-naphthoquinones – green palladium-catalysed Suzuki cross coupling†

Aline da R. Louvis,^a Nayane A. A. Silva,^a Felipe S. Semaan,^b Fernando de C. da Silva,^a Gabriela Saramago,^c Laís C. S. V. de Souza,^c Bruno L. A. Ferreira,^c Helena C. Castro,^c Juliana P. Salles,^d André L. A. Souza,^e Robson X. Faria,^d Vitor F. Ferreira^{*a} and Daniela de L. Martins^{*a}

Quinones are important scaffolds that are present in a variety of natural products or synthetic bioactive molecules. Arylation is an important strategy for accomplishing structural modifications, leading to new potential candidates for use as drugs. In the present work, palladium-catalysed, ligandless and phosphine-free Suzuki coupling reactions between 2-hydroxy-3-iodo-1,4-naphthoquinone and boronic acids were employed to prepare several 2-hydroxy-3-aryl-1,4-naphthoquinones in aqueous conditions using microwave irradiation or conventional heating. Because of the biological activities of quinones, which are related to their ability to accept electrons to form semiquinones and hydroquinones, the electrochemical behaviour of the synthesized molecules was investigated. The Osiris and Molinspiration Cheminformatics programs, utilizing *in silico* analyses, imply that these naphthoquinones are candidates for use as drugs which was reinforced by the outcomes of the *in vitro* antifungal and trypanocidal activity tests. Our *in vitro* data indicated a MIC value of 8 µg mL⁻¹ against *Candida albicans* ATCC 24433 strains, and an EC₅₀ of 0.67 µM with respect to trypanocidal activity against *Trypanosoma cruzi* epimastigote strains (Y).

APÊNDICE
ARTIGO EM VIAS DE PUBLICAÇÃO

Candida albicans morphogenesis and pathogenicity:
understanding to interfere

Lais Cavalcanti¹, Marcos Kali², Helena C. Castro^{1,2*}, Bruno Leal¹

¹Pathology Post Graduation Program, HUAP, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brazil

²Science and Biotechnology Post Graduation Program (PPBI), Universidade Federal Fluminense,
Niterói, RJ, Brazil

*Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: hcastrorangel@yahoo.com.br
(H.C.C.).