



Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
FACFAN-Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Farmácia



RENATA LUCICHI SCAPOLATEMPO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE DERIVADOS
NITRO-HETEROCÍCLICOS ISOXAZÓLICOS CONTRA ESPÉCIES DE
*Candida***

Campo Grande, MS

Maio, 2019

RENATA LUCICHI SCAPOLATEMPO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE DERIVADOS
NITRO-HETEROCÍCLICOS ISOXAZÓLICOS CONTRA ESPÉCIES DE
*Candida***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Farmácia, como pré-
requisito para a obtenção do título de
Mestre em Farmácia.

Orientador: Professor Dr. Adriano Cesar de Moraes Baroni
Coorientadora: Professora Dr. Marilene Rodrigues Chang

Campo Grande, MS
Maio, 2019

RENATA LUCICHI SCAPOLATEMPO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE DERIVADOS
NITRO-HETEROCÍCLICOS ISOXAZÓLICOS CONTRA ESPÉCIES DE
*Candida***

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Farmácia, como pré-
requisito para a obtenção do título de
Mestre em Farmácia.

Campo Grande, 30 de maio de 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr Adriano Cesar de Moraes Baroni

Prof. Dr Ozildeia Soares Trefzger

Prof. Dr Eduardo Benedetti Parisotto

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos são sempre carregados daqueles sentimentos insuperáveis e lembranças eternizadas. Primeiramente, meu agradecimento é a Deus, por todos os momentos em que pensei que não conseguiria, e Ele um dia após o outro me fez ver que eu era mais forte do que pensava. Só Ele sabe quantas vezes cheguei em casa com vontade de largar tudo e sair correndo, como também só ele sabe dos dias que cansada chegava em casa com o sentimento de dever cumprido, com amor por aquilo que fazia. À minha família, que mesmo longe, sempre esteve perto. Meu Pai Ramão e minha mãe Gregória, que me apoiaram tanto financeiramente quanto emocionalmente com valores incompráveis. Vocês são um dos principais motivos da minha busca pelo conhecimento. Às minhas irmãs, Clara e Maria, que por diversas vezes em ligações de horas estavam mais juntas do que a distância. Vocês são essenciais em minha vida.

Ao meu querido orientador Adriano Baroni, que mesmo sendo turrão, ainda sim é uma pessoa incrível e um orientador fantástico. Um professor que retira a barreira entre Aluno, técnico e Professor, tornando-se acessível a qualquer dúvida. Meus agradecimentos, por tudo que me ensinou e por todas as preocupações compartilhadas. Não poderia ter escolhido orientador melhor. À minha coorientadora Professora Marilene Chang, pela oportunidade de aprender em seu laboratório.

Àquela japonesa fantástica, Cristiane Shiguemoto, ou Doutora Cris. Você começou como minha coorientadora, mas se tornou mais que isso. O pessoal diz que se tornou minha psicóloga, mas eu digo que foi mais, minha Amiga. Obrigada pelas diversas vezes em que me apoiou e me incentivou! Ao meu querido amigo Diego, que sempre esteve presente e autêntico. Agradeço pelas inúmeras vezes que me escutou, me puxou a orelha e disse verdades que precisava. Obrigada por estar presente ensinando-me Química farmacêutica e pela paciência.

Aos meus amigos do laboratório, em especial à Maria Leticia, que sempre esteve ao meu lado, e previa meus sentimentos. Obrigada Lê pelas inúmeras conversas e apoios que me disponibilizas-te. Ao Jefferson, que sempre foi além de companheiro de laboratório e cantorias, um amigo fiel que ganhei desde a graduação. Obrigada por sua amizade, parceria e apoio, além de inúmeras vezes ter contribuído em meu trabalho. À Angeles, que sempre com sua alegria esteve presente para me ouvir, me

apoiar e me trazer a alegria durante aquelas rotinas puxadas e cansadas de laboratório. Ao Elvis, Deia, Pedro, Rafael, Bruna, Austeclínio, Amarith, Nathália companheiros de laboratório que também tiveram importância neste trabalho, seja pelas conversas nos almoços ou por correções, pelos chamados de socorro nas apresentações ou parcerias em testes microbiológicos. A todo pessoal do laboratório de Química Farmacêutica (LASQUIM) por tudo que fizeram por mim e por todo conhecimento compartilhado.

Meu muito obrigado àquela que se tornaria uma grande parceira para mim, Mariana Fragoso, obrigada pelas inúmeras vezes que me ajudou, escutou e apoiou. Pelos finais de semana, pelas palavras amigas, pelas horas intermináveis de laboratório de microbiologia e por estar sempre presente disposta a ajudar.

À Giovana, migs, que esteve presente nos meus momentos mais importantes desta jornada. Obrigada pela amizade, companheirismo, apoio e paciência. E por todos os momentos, comilanças e palavras de incentivos.

Agradeço às professoras Denise Bentrán e Maria Carolina que participaram da minha banca de qualificação e acrescentaram grandes pontos ao meu trabalho! Grandes professoras. À Deia e a o Prof. Eduardo, que gentilmente aceitaram meu convite para a defesa.

Obrigada a todos, jamais teria conseguido sozinha!

RESUMO

As infecções fúngicas representam importante risco de vida aos pacientes imunocomprometidos, sobretudo àqueles hospitalizados em centros de terapia intensiva. A disponibilidade de terapia medicamentosa torna-se escassa diante de barreiras apresentadas, tais como efeitos colaterais, custos e redução de susceptibilidade microbiana. Nesse contexto, derivados heterocíclicos surgem como potencial alternativa na síntese de novos fármacos, uma vez que esta classe de compostos demonstra atividade antifúngica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade de 36 compostos nitro-heterocíclicos isoxazólicos frente a diferentes espécies de *Candida*. Primeiramente, realizaram-se os testes de disco difusão que serviram como triagem na seleção de compostos com atividade antifúngica. Em seguida, a Microdiluição em caldo foi realizada e forneceu de maneira quantitativa as concentrações inibitórias mínimas (CIM), caracterizando desta forma o perfil microbiológico dos derivados nitro-heterocíclicos. Entre os compostos avaliados, 13 apresentaram atividade biológica contra *Candida* (compostos 1,4,5,8,9,11,13,15,17,19,20,21,36), dentre eles, dez compostos apresentaram atividade dose-dependente (compostos 1,4,5,8,13,15,17,20,21,36) e concentração inibitória mínima comparável ao fluconazol, um dos fármacos mais utilizados na prática clínica. Dentre os resultados, os nitrofuranos apresentaram maior número de compostos ativos quando comparados aos nitrotiofenos, sendo a *C. parapsilosis*, a espécie mais susceptível aos compostos testados. Portanto, os nitro-heterocíclicos isoxazólicos, como evidenciado neste trabalho, apresentaram potencial atividade antifúngica, nos fornecendo importantes resultados que demonstram a necessidade da avaliação *in vivo* destes compostos.

Palavras Chave:

Derivados Nitro-heterocíclicos; *Candida*; Susceptibilidade Fúngica

ABSTRACT

Fungal infections represent an important risk to life for immunocompromised patients, especially those hospitalized in intensive care settings. The availability of drug therapy becomes scarce in the face of barriers presented, such as side effects, costs and reduction of microbial susceptibility. Heterocyclic derivatives arise as an alternative potential in the synthesis of new drugs, since this class of compounds demonstrates antifungal activity. The objective of this work was to evaluate the activity of 36 nitro-heterocyclic isoxazole compounds against different *Candida* species. Disk diffusion tests served as screening in the selection of compounds with antifungal activity. Microdilution in broth provided quantitatively the minimum inhibitory concentrations (MIC), characterizing in this way the microbiological profile of the nitroheterocyclic derivatives. Among the evaluated compounds, 13 presented biological activity against *Candida* (compounds 1,4,5,8,9,11,13,15,17,19,20,21,36), among them ten compounds had dose-dependent activity (compounds 1,4,5,8,13,15,17,20,21,36) and minimum inhibitory concentration comparable to fluconazole, one of the drugs most used in clinical practice. Among the results, nitrofurans had a higher number of active compounds when compared to nitrothiophenes, with *C. parapsilosis* being the most susceptible species to the tested compounds. Therefore, the nitro-heterocyclic isoxazole, as evidenced in this work, presented potential antifungal activity, providing important results that demonstrate the need for *in vivo* evaluation of these compounds.

Key words:

Nitro-heterocyclic derivatives; *Candida*; Susceptibility Fungic

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standard Institute</i>
CNA	Candida não- <i>C.albicans</i>
ICS	Infecção de Corrente Sanguínea
CVC	Cateter venoso central
DMSO	Dimetilsulfóxido
UTI	Unidade de Terapia intensiva
UFC	Unidade Formadora de Colônias
SNC	Sistema Nervoso Central
ETOH	Etanol
NCS	Tiocianato
CH ₃ CN	Acetonitrila
THF	Tetraidrofurano
NaOH	Hidróxido de sódio
NH ₂ OH.HCl	Cloreto de hidroxilamônio
H ₂ O	Água
T.a	Temperatura ambiente
KOH	Hidróxido de potássio
ET ₃ N	Trietilamina
PdCl ₂ (PPh ₃) ₂	Dicloreto de bis-(trifenilfosfina) paládio (II)
CuI	Iodeto de cobre

PPh_3 Trifenilfosfina

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Sulfato de cobre penta-hidratado

CH_2Cl_2 Diclorometano

NaHCO_3 Bicarbonato de sódio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 ESTRATÉGIAS DE MODIFICAÇÃO MOLECULAR	13
1.2 COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS COMO FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS	16
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. METODOLOGIA	21
3.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA POR MEIO DE DISCO DE DIFUSÃO	23
3.1.1 PREPARO DO INÓCULO	23
3.1.2 PROCEDIMENTO:	23
3.1.3 INTERPRETAÇÃO DO TESTE	23
3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)- MÉTODO MICRODILUIÇÃO EM CALDO	24
3.2.1 PREPARO DO INÓCULO	24
3.2.2 PREPARO DOS COMPOSTOS NITRO-HETEROCICLICO ISOXAZÓLICOS	24
3.2.3 PROCEDIMENTO	24
3.2.4 DIFERENCIAÇÃO DAS AMOSTRAS EM FUNGICIDA OU FUNGISTÁTICA	25
4. RESULTADOS	26
4.1 DISCO DE DIFUSÃO	26
4.2 MICRODILUIÇÃO EM CALDO	30
4.3 AMOSTRAS FUNGICIDAS E FUNGISTÁTICAS	31
5. DISCUSSÃO	30
5.1 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	30
5.2 RELAÇÃO ESTRUTURA -ATIVIDADE DE COMPOSTOS SELECIONADOS	31
5.3 PERFIL DE BIORREDUÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA: NITROFURANOS <i>VERSUS</i> NITROTIOFENO	35
6. CONCLUSÃO	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1. INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida de pacientes imunocomprometidos, sejam eles os portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida ou mesmo pacientes transplantados, aumentou também a infecção por microorganismos oportunistas. Entre eles, as infecções fúngicas apresentam grande importância social e econômica.¹

Os dados de infecção hospitalar demonstram o recrudescimento de casos de infecções fúngicas, sobretudo em pacientes internados em centros de terapia intensiva. Tal evidência contribui com o aumento do tempo de internação bem como ao significativo aumento no custo em saúde para debelar este tipo de agravo.²

As infecções promovidas por leveduras do gênero *Candida* são consideradas as principais causas de infecções fúngicas no ambiente hospitalar, podendo causar desde infecções superficiais até sistêmicas.² Esses micro-organismos possuem habitat bastante amplo, incluindo: solo, água, animais, membranas mucocutâneas e intestino de seres humanos. Apesar de fazerem parte da microbiota humana, diante de condições favoráveis, *Candida spp.* podem passar de comensais a agentes infecciosos.³⁻⁷

De acordo com a literatura, existem mais de 150 espécies descritas como pertencentes ao gênero *Candida*.¹ Destas, cinco demonstram maior incidência em infecções nosocomiais, sendo elas: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Candida* do complexo *C. parapsilosis*, *Candida* do complexo *C. glabrata* e *C. krusei*.⁸ A diferenciação das espécies pode ser realizada por meio de biologia molecular.⁹

No ambiente hospitalar, a infecção de corrente sanguínea (ICS) por *Candida spp.* é a apresentação clínica mais grave da doença, sendo ocasionada principalmente por *Candida albicans*, que acomete pacientes gravemente enfermos, em uso de dispositivos invasivos, imunocomprometidos, que fazem uso de fármacos imunossupressores, quimioterápicos e/ou uso prolongado de antibióticos.⁶ Apesar de *Candida albicans* ser o principal agente isolado em casos de ICS, verifica-se nos últimos anos a variabilidade geográfica e temporal das espécies, com aumento crescente de *Candida* não-*C. albicans* (CNA) menos susceptíveis aos azóis.¹⁰⁻¹²

Na China, por exemplo, em casos de candidemia, constatou-se emergência de *C. parapsilosis*, seguida de *C. tropicalis*, *C. glabrata*, e *C. krusei*.¹³ Nos Estados Unidos, esse panorama sofre uma ligeira modificação, onde a predominância é a

espécie *C. glabrata*.¹⁴ No Brasil, um estudo multicêntrico indicou prevalência de *C. tropicalis*, seguida de *C. parapsilosis*, com potencial emergência de *C. glabrata*.¹⁵

Diferente do grande número de antimicrobianos disponíveis para o tratamento de infecções bacterianas, o número de fármacos antifúngicos são poucos. O tratamento de primeira linha envolve a utilização de fármacos da classe das equinocandinas (caspofungina, micafungina, anidulafungina). Estes fármacos são responsáveis por agirem na parede celular por meio da inibição da enzima β -1,3-glicano sintase, que por sua vez, desencadeia um processo de lise na membrana e resulta na morte do fungo. ¹⁶⁻¹⁸

Outra opção disponível é a utilização de derivados azólicos como fluconazol, posaconazol ou voriconazol, que tornam-se segunda opção de tratamento desde que sejam realizados testes prévios de susceptibilidade microbiana.² Atuam na inibição da enzima do complexo citocromo P450, lanosina-14 α -desmetilase, responsável por uma das etapas de síntese do ergosterol, fosfolípido responsável pela estabilidade estrutural da membrana do micro-organismo. ⁷

Uma terceira opção, anfotericina B, é utilizada nos casos de falha dos tratamentos anteriores. Este derivado poliênico é responsável pela interação com o micro-organismo de diferentes formas, seja por agir na membrana através da interação com o ergosterol e, assim, promover poros em sua estrutura desestabilizando-a, seja por alterações morfológicas que desencadeiam o estresse oxidativo, ou então por interferência em canais iônicos, dependendo da concentração utilizada. Pode apresentar-se na forma complexada com desoxicolato ou em complexo lipídico. Este último é considerado a forma mais segura, por produzir menos efeitos colaterais, porém seu custo é consideravelmente alto, dificultando sua utilização. ^{19,20}

Algumas limitações têm sido associadas quanto à farmacoterapia disponível, por exemplo, efeitos colaterais são verificados em todas as classes farmacológicas utilizadas. As equinocandinas estão associadas ao efeito de liberação de histamina, como *rash* cutâneo, urticária, dispneia e até hipotensão. Os derivados triazólicos demonstram distúrbios no Sistema Nervoso Central (SNC) e visual, além de alterações hepáticas.²¹ Por fim, a anfotericina B pode apresentar problemas de

solubilidade quando administrados em altas doses e desencadear processos que podem culminar em nefrotoxicidade.²⁰

Um dos principais problemas e ainda mais preocupantes referentes à farmacoterapia antifúngica é o aparecimento de leveduras resistentes, que por sua vez reduzem as opções terapêuticas disponíveis e dificultam a recuperação de pacientes hospitalizados.²

Alguns estudos têm mostrado o aparecimento de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* com sensibilidade reduzida ao fluconazol. Digno de nota é que *C. krusei* apresenta-se intrinsecamente resistente a este fármaco. O aumento da resistência está muitas vezes relacionado a uma farmacoterapia inadequada, que consequentemente pode levar ao aparecimento de micro-organismos resistentes. A resistência aos triazóis de 3ª geração (voriconazol) tem sido relatada para as espécies *C. tropicalis* e *C. krusei*. Além disso, *C. glabrata* tem se tornado uma das espécies mais preocupantes, pois apresenta sensibilidade reduzida aos triazóis e às equinocandinas.^{5,8,10}

Os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da resistência aos antifúngicos são diversos. No caso dos derivados azólicos, por exemplo, um dos principais mecanismos baseia-se nas bombas de efluxo, onde os fármacos são lançados para o meio extracelular e sua interação com a enzima lanosina-14 α -desmetilase é reduzida. Outra possibilidade são alterações nos genes que codificam estas enzimas, como ERG11, com redução na sensibilidade aos azóis ou no gene ERG3, como formação de produtos como 14- α -metilfecosterol, não tóxicos ao micro-organismo. A classe das equinocandinas desencadeiam mecanismos de resistências similares, onde mutações no gene FKS, codificador da enzima 1,3- β -D-glucanosintetase, podem ocorrer. Além disso, a formação de componentes secundários da membrana como quitina no lugar de glucano, pode surgir como resposta adaptativa ao estresse microbiano. Os polienos por sua vez, além de desencadearem mutações gênicas (ERG3, ERG5, ERG6 ou ERG11), podem levar a formação de enzimas conhecidas como catalases, que são responsáveis por eliminar espécies reativas de oxigênio, produzidas durante o estresse oxidativo.²²⁻²⁷

Ressalta-se que a formação de biofilmes ocasionados por algumas leveduras, tais como *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, apresenta-se como

forma de resistência a múltiplos fármacos. O biofilme consiste em um conjunto celular na forma de hifas e pseudo-hifas intimamente ligadas entre si, envolvidas por uma matriz extracelular de polissacarídeos, que podem favorecer infecções de corrente sanguínea. Além disso, podem originar uma barreira impermeável aos antifúngicos utilizados. Encontra-se principalmente em objetos de procedimentos invasivos, como o cateter venoso central (CVC) e nutrição parenteral. Ressalta-se que a espécie com maior potencial de formação de biofilmes é a *C. parapsilosis*, uma vez que possui grande capacidade de aderência a superfícies sólidas quando comparadas as demais leveduras. Um estudo envolvendo a formação de biofilme em cateter por *C. albicans* revelou que fármacos como anfotericina B e fluconazol não eliminaram a rede de células formadas em torno de dispositivos invasivos. Em adicional, um estudo recente envolvendo camundongos infectados com células de biofilme de *C. glabrata* demonstrou que a utilização de equinocandinas como caspofungina e micafungina não teve impacto significativo na carga fúngica do fígado e rins destes animais, o que evidencia a preocupação deste mecanismo de resistência frente a fármacos utilizados na rotina clínica.²⁸⁻³²

Os casos de resistência têm sido associados ao aumento na mortalidade em 50% dos casos de hospitalização em Unidade de Terapia Intensiva – UTI.^{8,12} Adicionalmente aos efeitos colaterais e ao aparecimento de leveduras resistentes, o custo do tratamento é oneroso, de R\$23.000–R\$112.000 reais, dependendo do tempo de hospitalização.³⁴

A necessidade da utilização de novos fármacos com melhor perfil farmacoterapêutico, menor resistência fúngica e conseqüentemente menores efeitos colaterais, motiva pesquisas no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos. Nesse cenário, a modificação molecular constitui-se como uma das principais estratégias para a aquisição de novos compostos ativos, observando-se casos de sucesso amplamente encontrados na literatura científica como é o caso da família do azóis.³⁵

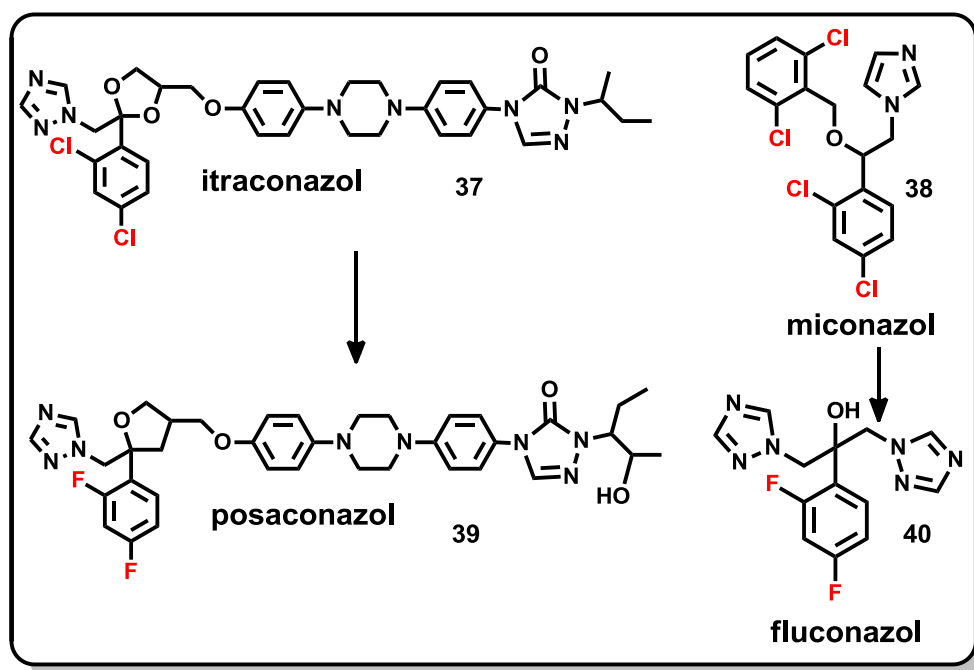
1.1 ESTRATÉGIAS DE MODIFICAÇÃO MOLECULAR

A modificação estrutural de compostos bioativos tem como objetivo melhorar a potência do candidato a fármaco, bem como, o perfil farmacocinético visando o

aumento da absorção, redução da toxicidade, entre outros. Neste contexto, as estratégias de modificação molecular oriundas da química medicinal clássica, tais como o bioisosterismo e hibridização molecular são extensamente utilizados na obtenção de novos compostos.³⁵

O bioisosterismo tem sido uma das estratégias mais utilizadas no desenvolvimento de novos compostos da família dos azóis, que consiste na substituição de um átomo ou grupo de átomos por outros eletronicamente similares resultando em compostos com propriedades biológicas semelhantes ao composto original. Destaca-se nesta abordagem, a troca bioisostérica do átomo de cloro nos compostos itraconazol e miconazol pelo átomo de flúor, originando os compostos posaconazol e fluconazol, respectivamente, que demonstraram a melhora de sua biodisponibilidade, além de redução na toxicidade e ampliação de seu espectro de ação.(Figura 1).³⁵

Figura 1. Fármacos antifúngicos

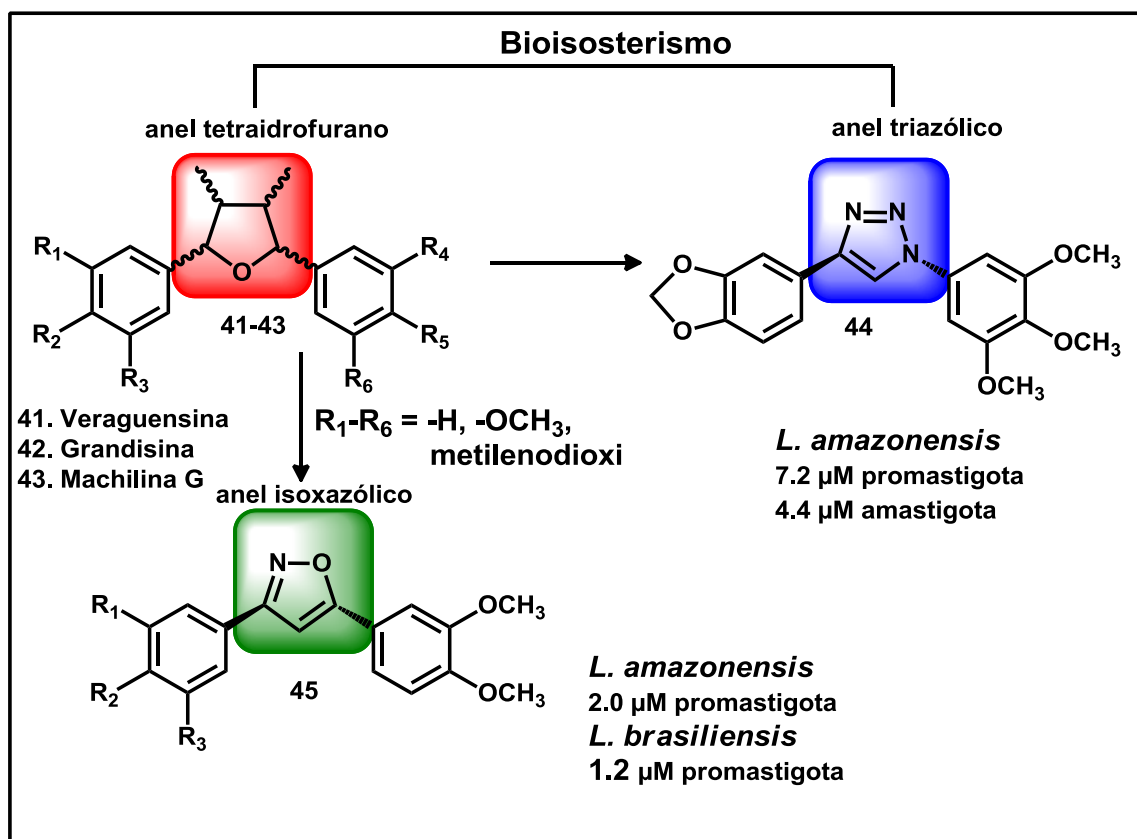


O Laboratório de Química Farmacêutica LASQUIM, utiliza o bioisosterismo e a hibridização molecular como ferramentas na síntese de novos candidatos a fármacos baseados em compostos contendo os heterocíclicos 1,2,3-triazóis e os isoxazóis. Estes heterocíclicos, presentes em inúmeros fármacos, demonstram

diversas atividades biológicas, como anti-inflamatória, antimicrobiana, anticâncer e antifúngica.³⁶⁻⁴¹

Um estudo desenvolvido pelo LASQUIM envolvendo bioisosterismo de anéis foi realizado a partir de produtos naturais como as neolignan Veraguensina, Grandisina e Machilina G. A troca bioisostérica do anel tetraidrofurano presente nas neolignanas pelo anel triazólico resultou na obtenção do composto 44 com atividade contra amastigotas e promastigotas de *Leishmania amazonensis*. A partir disto, em um segundo trabalho, houve a troca bioisostérica do anel tetraidrofurano pelo anel isoxazólico no composto 45, ao qual forneceu, quando comparado ao composto 44, atividade melhorada contra promastigotas de *L. amazonensis* e foi ativa contra promastigotas de *L. brasiliensis* (figura 2).⁴²⁻⁴⁴

Figura 2. Bioisosterismo de anéis 1,4-diaril-1,2,3-triazol e 3,5-diaril-isoxazol baseados nas estruturas 41-43.

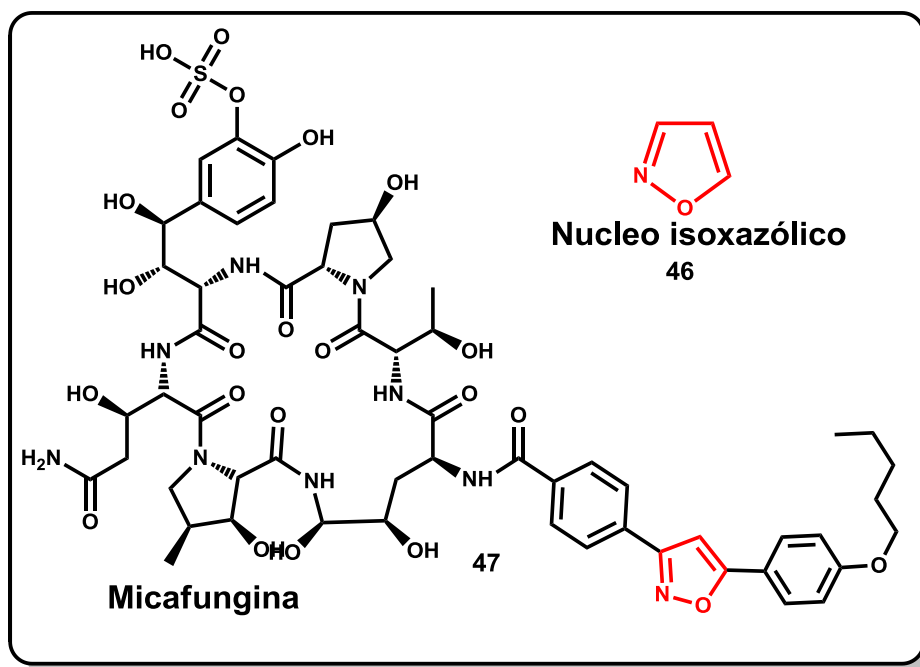


A hibridização molecular é outra estratégia utilizada na descoberta de novos compostos bioativos, e consiste na união de dois grupos farmacofóricos com o objetivo de adquirir uma nova substância com propriedades farmacológicas duais.³⁷

1.2 COMPOSTOS HETEROCÍCLICOS COMO FÁRMACOS ANTIFÚNGICOS

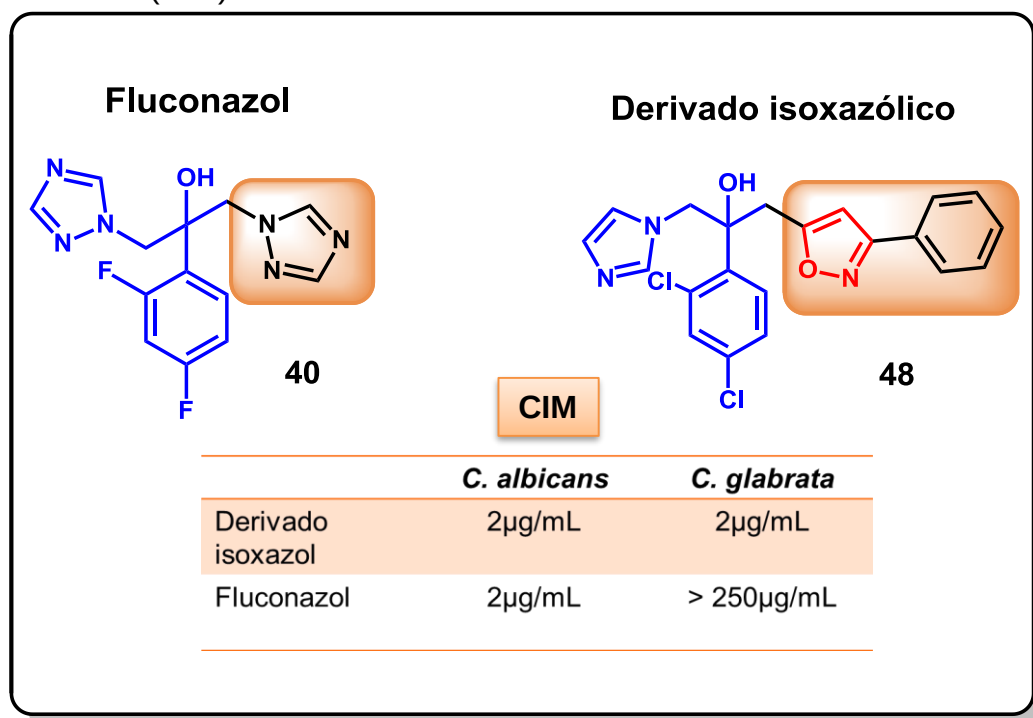
Os isoxazóis são caracterizados por um anel de cinco membros contendo os átomos nitrogênio e oxigênio 46 e amplamente utilizados como *scaffolds* para a descoberta de novos fármacos (Figura 3).⁴¹ Um exemplo de antifúngico contendo este núcleo é a micafungina 47, desenvolvida através da modificação molecular de equinocandinas naturais, cuja inserção de um anel isoxazólico possibilitou a obtenção de um composto com potência antifúngica 10 vezes maior que seu precursor.⁴⁵

Figura 3. Núcleo isoxazólico e estrutura da micafungina 47

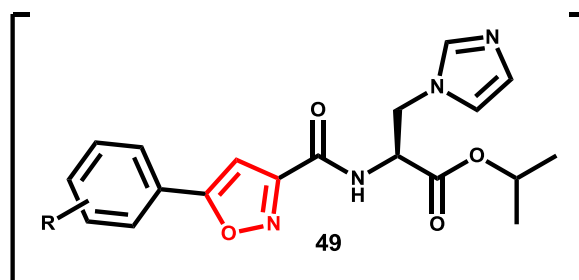


Outro estudo envolvendo derivados isoxazólicos demonstrou que a presença do anel isoxazol com modificações em seus substituintes laterais fornecia atividade contra espécies resistentes aos derivados azólicos, como a *C. glabrata*, tornando-se desta forma, fundamental para a síntese de novos compostos com potencial atividade antifúngica (Figura 4).⁴⁶

Figura 4. Bioisosterismo de anel triazólico pelo anel isoxazólico e concentração inibitória mínima (CIM).



Um estudo desenvolvido por Zhao e colaboradores (2017) evidenciou que a troca bioisostérica de anéis pelo anel isoxazólico demonstrou atividade contra leveduras como *C. albicans* e *C. tropicalis* comparáveis ao fármaco padrão de escolha, fluconazol e itraconazol (Figura 5). Além disso, possibilitou que novas modificações em sua estrutura, como a inserção de átomo flúor em seu anel benzeno terminal, pudessem originar compostos com atividade contra leveduras resistentes de amostras clínicas, como *C. albicans*.⁴⁷

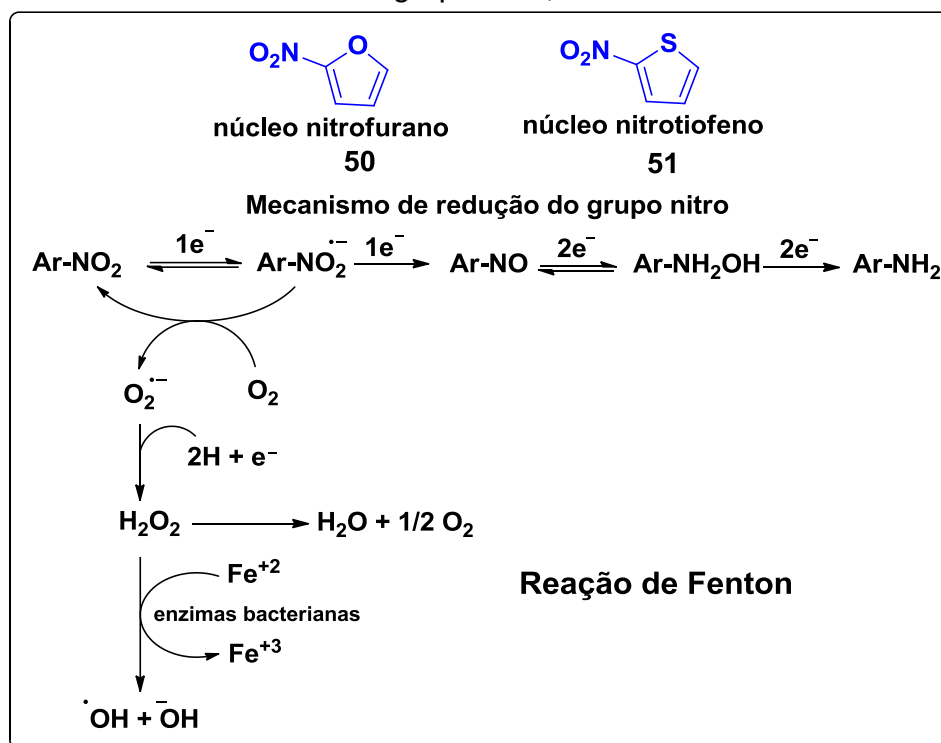
Figura 5. Modificações de heteroátomos Zhao 2017

Concentração inibitória Mínima (µg/mL)		
Substituinte	<i>C. albicans</i> ATCC SC5314	<i>C. albicans</i> 100
R ₁ : H	0,0625	-
R ₂ : F	0,03125	0,125
Padrão		
Itraconazol	0,03125	0,125
Fluconazol	1	>64

Os nitrofuranos 50 são outra classe importante de compostos heterocíclicos utilizados na síntese de novas moléculas com potencial atividade antifúngica (Figura 4). Estudos têm demonstrado que a presença deste farmacóforo tem favorecido a atividade anticandida. Em especial, o grupo nitro ligado ao anel furano, pode favorecer a formação de espécies reativas, como hidroxilaminas e radicais livres que desestabilizam a membrana e o DNA do fungo, conforme a Figura 6.⁴⁸⁻⁵⁰

Os anéis nitrotiofênicos 51 representam outra classe importante de compostos heterocíclicos na química medicinal, pois possuem atividade antimicrobiana em relação às *Candida* spp., e estabilidade química que possibilita várias modificações estruturais.^{51,52}

Figura 6. Núcleos nitrofuranos 50 e nitrotiofenos 5; e mecanismo de redução do grupo nitro;



2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antifúngica de compostos nitro-heterocíclicos isoxazólicos frente a diferentes espécies de *Candida*.

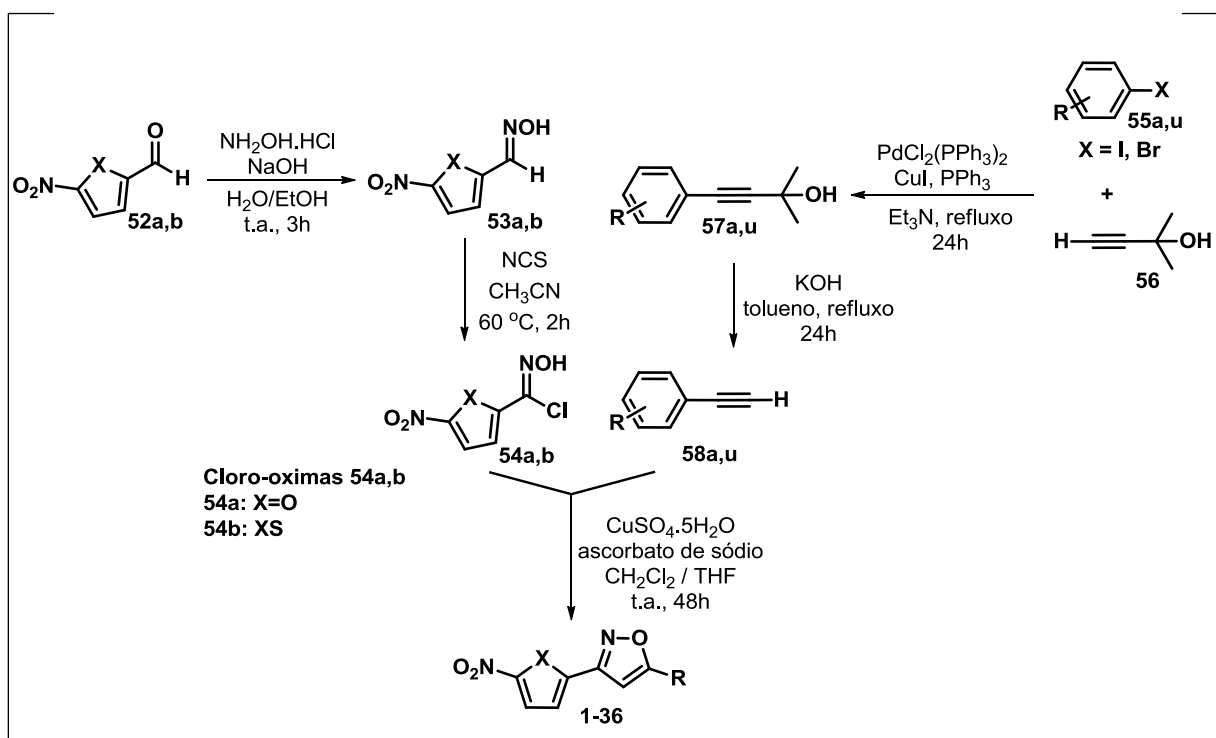
2.2 Objetivos específicos

- a) Investigar a atividade antifúngica de 36 compostos nitro-heterocíclicos isoxazólicos frente a *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*
- b) Selecionar os compostos com atividade antifúngica no teste de Disco de Difusão.
- c) Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos selecionados frente a espécies de *Candida*.

3. METODOLOGIA

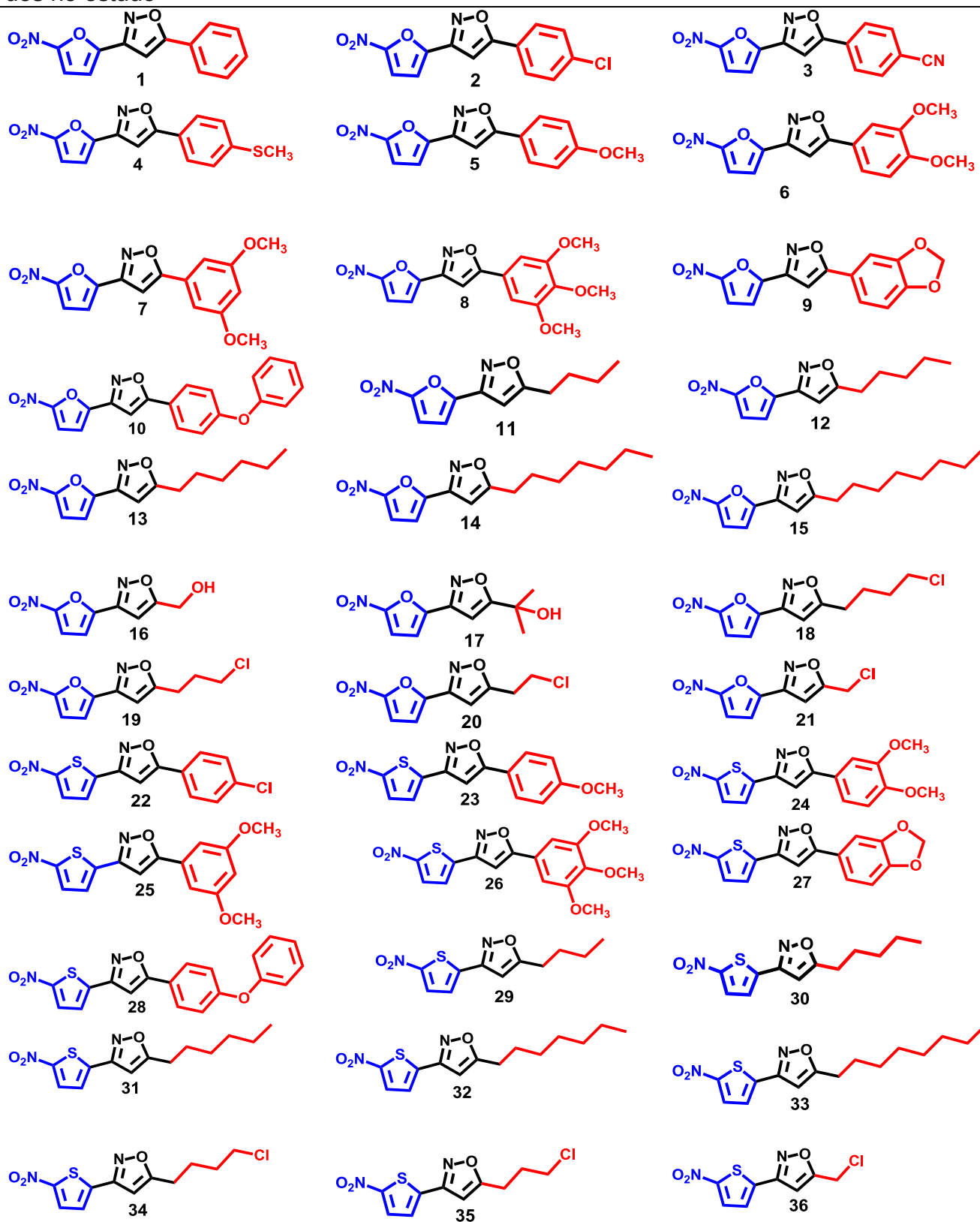
Os trinta e seis derivados nitro-heterocíclicos isoxazólicos (Tabela 1) foram sintetizados previamente por Trefzger⁴⁴ por meio de uma reação do tipo click-chemistry, a partir de dois blocos de construção distintos, as cloro-oximas 54 e os acetilenos terminais 58. A rota sintética para a síntese dos derivados é apresentada conforme o esquema abaixo. (Esquema 1)

Esquema 1. Rota sintética utilizada para a síntese dos derivados heterocíclicos 1-36.



As leveduras estudadas neste trabalho foram selecionadas por apresentarem maior incidência em casos de infecções fúngicas pelo gênero *Candida*, tais como: *Candida glabrata* (ATCC 2001), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida tropicalis* (ATCC 750) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), as quais foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia Clínica, UFMS, Brasil.

Tabela 1. Estruturas químicas de derivados nitro-heterocíclicos isoxazólicos 1-36 utilizados no estudo



3.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA POR MEIO DE DISCO DE DIFUSÃO

O teste de susceptibilidade antifúngica das leveduras incluídas no estudo foi determinada pela técnica de disco de difusão de acordo o documento M44-A2-2009, do *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2009), com pequenas modificações.⁵³⁻⁵⁵

3.1.1 PREPARO DO INÓCULO

As leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud-dextrose (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) e incubadas à temperatura de 35°C (±2°C) por 24 horas. Após esse período, com 1-3 colônias foi feita uma suspensão com turbidez semelhante à escala 0,5 MacFarland que corresponde à 1×10^6 - 5×10^6 células por mL.

3.1.2 PROCEDIMENTO:

Os compostos foram utilizados em concentrações de 2,5mg/mL e 5mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO-SIGMA ALDRICH, França).^{54,55}

Um swab umedecido na suspensão da levedura foi semeado em toda a superfície de uma placa ágar Mueller-Hinton contendo 0,5 µg/mL de azul de metileno e 2% de glicose. Em seguida, discos estéreis (diâmetro 6,35mm, CECON) foram adicionados sobre a semeadura. Com auxílio de uma micropipeta, foram colocados 5µl das concentrações dos compostos nos discos.

Os testes foram realizados em duplicatas e o fármaco padrão de escolha foi o fluconazol com 25µg/disco. Para o controle do solvente utilizou-se apenas disco impregnado com DMSO.

3.1.3 INTERPRETAÇÃO DO TESTE

A interpretação dos halos de inibição foi realizada conforme a descrição abaixo:

- a) **Atividade antifúngica:** Qualquer halo de inibição de crescimento
- b) **Sem atividade:** Nenhum halo de inibição de crescimento

c) **Atividade Dose-dependente:** aumento do halo de inibição com o aumento da concentração do composto teste de 2,5mg/mL para 5 mg/mL.

3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)-MÉTODO MICRODILUIÇÃO EM CALDO

A concentração inibitória mínima (CIM) definida neste estudo foi realizada de acordo com o documento M27-A3-2008, do *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2008).⁵⁶

3.2.1 PREPARO DO INÓCULO

As leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud-dextrose (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) e incubadas à temperatura de 35°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) por 24 horas. Após esse período, com 1-3 colônias foi feita uma suspensão com turbidez semelhante à escala 0,5 MacFarland que corresponde à 1×10^6 - 5×10^6 células por mL. Em seguida a suspensão foi diluída em meio RPMI 1640, sem antibiótico e bicarbonato (NaHCO_3), à proporção de 1:50 (concentração 2×10^4 - 1×10^5 UFC/mL). A partir desta solução, uma segunda diluição foi realizada na proporção de 1:20 (concentração 1×10^3 - 5×10^3 UFC/mL).

3.2.2 PREPARO DOS COMPOSTOS NITRO-HETEROCÍCLICOS ISOXAZÓLICOS 1-36

A partir de uma concentração de 5mg/mL dos compostos testes foram retiradas alíquotas com volumes de 51,2 μL e adicionadas a volumes de 1948,8 μL de RPMI 1640, originando soluções com concentrações finais de 128 $\mu\text{g/mL}$. O mesmo procedimento foi realizado para testar o solvente, onde soluções foram preparadas contendo apenas DMSO e RPMI 1640.

3.2.3 PROCEDIMENTO

Em placas com 96 poços contendo 12 colunas, foram divididos na coluna 1, controle negativo de crescimento fúngico, contendo apenas o meio de cultura RPMI

1640 (200µl), e a coluna 12, controle positivo de crescimento fúngico, onde foram colocados RPMI 1640 (100µl) e a suspensão contendo o inóculo (100µl).

Nas colunas de 2 até 11 foram colocados RPMI 1640 (100µl) e as soluções com as amostras (100µl), em seguida diluições seriadas foram realizadas resultando em concentrações finais que variaram de 64µl/mL a 0,125µl/mL. A suspensão contendo o inóculo foi adicionada em seguida (100µl) nos poços contendo as amostras testes.

Os padrões foram escolhidos de acordo com a prática clínica farmacológica, onde o fluconazol foi utilizado em concentrações que variaram de 64µl à 0,125µl/mL, e a anfotericina B, em concentrações de 16µg/mL à 0,03µg/mL. Todos os testes foram realizados em triplicata. As placas foram vedadas com Parafilm M® e incubadas à temperatura de 35°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) por 24 horas com posterior leitura visual e em aparelho de espectrofotômetro (Spectramax 190 microplate reader) a um comprimento de onda em 530nm.⁴⁰ Considerou-se como Concentração Inibitória Mínima a menor concentração em que não foram verificados turbidez quando comparados ao controle positivo de crescimento fúngico.⁵⁷

3.2.4 DIFERENCIAÇÃO DAS AMOSTRAS EM FUNGICIDA OU FUNGISTÁTICA

Após a leitura de 24h das placas em meio RMPI 1640, foram selecionados poços que não apresentavam turbidez quando comparados ao controle de crescimento positivo.

Estes poços foram semeados em placas contando ágar sabouraud dextrose e em seguida foram incubadas à temperatura de 35°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) por 24 horas com posterior leitura.

Considerou-se como fungicida as amostras que nos poços não demonstraram turbidez e nas placas não demonstram crescimento. Para as amostras fungistática, foram consideradas as que não apresentaram turbidez nos poços e quando semeadas, demonstraram crescimento.⁵⁸

4. RESULTADOS

4.1 DISCO DE DIFUSÃO

No teste de disco difusão a triagem realizada com 36 compostos (2,5 mg/mL e 5 mg/mL) revelou que 13 compostos (36% do total) mostraram atividade antifúngica a pelo menos uma das espécies de *Candida* e 23 deles (64% do total) não apresentaram atividade frente as leveduras testadas. As medidas dos halos de inibição dos derivados nitro-heterociclicos estudados frente às *C. albicans* (ATCC 90028), *C. krusei* (ATCC 6258), *C. glabrata* (ATCC 2001), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. tropicalis* (ATCC 750) estão apresentadas na Tabela 2.

O composto **21** mostrou atividade anticandida frente a todas as cepas testadas no teste de disco difusão. Dez deles (27,7% do total) mostraram atividade dose-dependente (**1, 4, 5, 8, 13, 15, 17, 20, 21** e **36**).

Frente a *C. parapsilosis* (ATCC 22019), os compostos **1, 4, 5, 8, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 20, 21** e **36** mostraram halos de inibição que variaram de 11 a 23,5 mm. Para *C. albicans* (ATCC 90028) os compostos **19-21** e **36**, tiveram halos de 14 a 24 mm, na *C. krusei* (ATCC 6258) os compostos **4, 20, 21** e **36** tiveram halos de 8 a 19mm, para *C. tropicalis* (ATCC 750) o composto **21**, teve halo de 18mm e para *C. glabrata* (ATCC 2001) os compostos **21** e **36** tiveram halos que variaram de 9 à 22mm.

Tabela 2. Diâmetros (mm) do halo aferidos no teste de disco difusão realizado com 36 nitro-heterocíclicos isoxazólicos frente as cinco espécies de *Candida*, nas concentrações de 2,5mg/mL(12,5µg/disco) e 5mg/mL (25 µg/disco) em 24h

C	PM	Diâmetro									
		<i>C..parapsilosis</i> ATCC 22019		<i>C. albicans</i> ATCC 90028		<i>C. krusei</i> ATCC 6258		<i>C. tropicalis</i> ATCC750		<i>C. glabrata</i> ATCC2001	
		[2,5]	[5]	[2,5]	[5]	[2,5]	[5]	[2,5]	[5]	[2,5]	[5]
01	256,04	11	15	-	-	-	-	-	-	-	-
02	290,66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
03	281,23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
04	302,31	11	12	-	-	-	8,5	-	-	-	-
05	286,05	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-
06	316,27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
07	316,27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
08	346,30	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-
09	300,23	11	12	-	-	-	-	-	-	-	-
10	348,31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	236,23	11	12	-	-	-	-	-	-	-	-
12	250,25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	264,28	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-
14	278,31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	292,33	-	12,5	-	-	-	-	-	-	-	-
16	210,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	238,20	11	15	-	-	-	-	-	-	-	-
18	270,67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	256,02	11	12,5	11	14	-	-	-	-	-	-
20	224,04	11	13	11	15	-	8	-	-	-	-
21	227,99	15	23,5	22	24	13,5	19	14,5	18	15	22
22	305,99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	302,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	332,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	332,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	362,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	316,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	364,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	252,06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	266,07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	280,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	294,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	308,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	286,74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	272,71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	244,66	14	15,5	15	17,5	8	9,5	-	-	-	9
Flu	306,27	20	22	26	30	14,5	19	23	28	16	21

(Flu) Fluconazol, fármaco padrão (25µg/disco); (C) Composto; (PM) Peso molecular; (-) Nenhum halo de inibição

4.2 MICRODILUIÇÃO EM CALDO

No teste de Microdiluição em caldo realizado com 13 amostras previamente selecionadas por Disco de difusão, foram obtidas concentrações inibitórias mínimas que variaram de 1µg/mL à >64 µg/mL, conforme Tabela 3.

O teste do solvente demonstrou que o DMSO não influenciou no crescimento das leveduras testadas, tendo havido crescimento de 100% nos poços controle inoculados.

Tabela 3. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) em leitura de 24h

Composto	Concentração Inibitória Mínima (CIM)				
	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	<i>C. glabrata</i> ATCC 2001
	[µg/mL]				
01	8	-	-	-	-
04	8	-	-	-	-
05	32	-	-	-	-
08	2	-	-	-	-
09	16	-	-	-	-
11	32	-	-	-	-
13	2	-	-	-	-
15	1	-	-	-	-
17	16	-	-	-	-
19	8	32	-	-	-
20	16	32	32	-	-
21	4	8	16	8	4
36	2	32	16	-	32
Flu	2,0	0,25	32	1	32
Anf	1,0	0,6	4	4	16

(Flu) Fluconazol, fármaco padrão(µg/mL); (Anf) Anfotericina B, fármaco padrão (µg/mL);(C) Composto; (-) Nenhum Concentração inibitória Mínima

4.3 AMOSTRAS FUNGICIDAS E FUNGISTÁTICAS

As amostras foram consideradas fungicidas e fungistática conforme a Tabela 4.

Tabela 4. Leitura de 24h de repiques para compostos fungicidas e fungistáticos

Levedura	Resultados	Compostos
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	Fungistático	01,05,11,13,17,19,21
	Fungicida	04,08,09,15,20,36
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	Fungicida	19,20,21
	Fungistático	36
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	Fungistático	20,21,36
<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	Fungicida	21
	Fungistático	36
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	Fungicida	21
Todas as leveduras acima, exceto <i>C. krusei</i>	Fungistático	Fluconazol
Todas as leveduras acima	Fungicida	Anfotericina B

5. DISCUSSÃO

A seleção dos compostos com atividade antifúngica se deu inicialmente pelo emprego de teste de susceptibilidade por disco de difusão, ao qual nos fornece de maneira qualitativa a presença ou ausência de atividade anticandida através da presença ou ausência de halos de inibição, realizados na concentração de 2, 5mg/mL e 5mg/mL, com o objetivo de selecionar amostras com atividade biológica para a próxima etapa, Microdiluição em caldo.

5.1 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Os fungos da espécie *Candida* são caracterizados como dimórficos, isto é, apresentam duas formas morfológicas identificáveis denominadas hifas e leveduras. Cada forma está associada ao ciclo patológico do micro-organismo em questão, sendo responsáveis pela patogênese, e habilidade das espécies de *Candida* penetrarem nas células e tecidos do hospedeiro.

Considerando a morfologia de *Candidas*, faz-se necessário entender o conceito de ação dos fármacos antifúngicos, que por sua vez podem ser fungistáticos ou fungicidas. Tal abordagem identifica a inibição do crescimento das células fúngicas, não permitindo a mudança da forma de levedura para a forma de hifa ou mesmo a completa eliminação dos microrganismos respectivamente.⁵⁹

Meta-análise realizada por Kumar e colaboradores (2017) demonstrou que os agentes fungicidas, como a anfotericina B, apresentam maior probabilidade de sucesso terapêutico contra infecções invasivas de *Candida* se comparada aos fármacos de perfil fungistático, tal como os derivados azólicos. Assim, um perfil fungicida é desejável em processos de descoberta de novos candidatos a fármacos anti-fúngicos.⁶⁰

Os compostos testados neste trabalho demonstraram perfil que variaram entre fungistáticos e fungicidas, ao qual dependeram do tipo de levedura utilizada. Para *C. parapsilosis*, 46% dos compostos com atividade biológica demonstraram-se fungicidas (04,08,09,15,20,36), enquanto que 54% demonstraram-se fungistáticos (01,05,11,13,17,19,21). Para *C. albicans*, o resultado mostra-se com um percentual maior para atividades fungicidas, em torno de 75% (19,20,21), ao passo que para *C.*

tropicalis, o único composto com atividade antifúngica (21), demonstrou-se fungicida. Em *C. glabrata* o perfil dos compostos foi de 50% fungicida (21), enquanto que para a espécie *C. krusei*, todas as amostras mostraram-se fungistáticas (20,21,36).

5.2 RELAÇÃO ESTRUTURA-ATIVIDADE DE COMPOSTOS SELECIONADOS

Conforme na Tabela 2, o composto nitrofurânico **1** que contém um anel benzênico sem substituintes apresentou halo de inibição para *C. parapsilosis*. Aqueles compostos contendo grupos retiradores de elétrons (Cl e CN), compostos **2** e **3** respectivamente, não apresentaram halo de inibição. Os compostos **4**, **5** e **8** contendo grupos doadores de elétrons como SCH₃ e OCH₃, ligados ao anel benzeno respectivamente, mostraram atividade contra *C. parapsilosis*, sendo que o composto **4** ainda apresentou atividade antifúngica contra *C. krusei*. A mudança de posição das metoxilas (compostos **6** e **7**) não favoreceu a atividade antifúngica.

O composto **9**, com um grupo metilenodioxi, apresentou halos de inibição para *C. parapsilosis*, enquanto que a adição de um grupo O-fenil, composto **10**, não demonstrou atividade antifúngica, podendo estar relacionado ao maior impedimento estérico apresentado pelo anel aromático de seis membros, uma vez que estes tendem a ser menos ativos biologicamente que os primeiros.⁶¹

Os nitrofuranos com a adição de grupos alquil, compostos **11**, **13**, **15** revelaram atividade contra *C. parapsilosis*, enquanto que os compostos **12** e **14** com números ímpares de carbono não apresentaram atividade (**Figura 7**). Tal fato pode ser explicado pela interação que os grupos alquil (CH₂) podem fazer com o possível alvo enzimático fúngico, no qual a energia rotacional exercida por este grupo reflete na formação de uma curva atividade-carbono em forma de zigzag, onde conforme se altera o número de carbonos, altera-se a atividade exercida pelos compostos testados.⁶² (**Figura 8**)

Figura 7. Compostos com cadeia alquílica testados contra *C.parapsilosis*

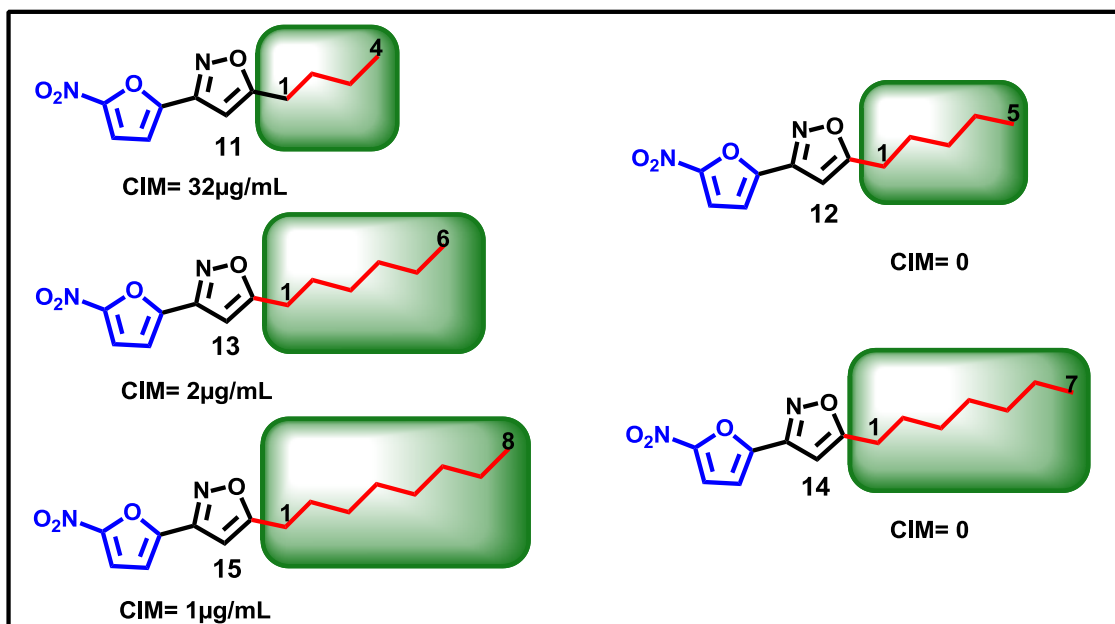
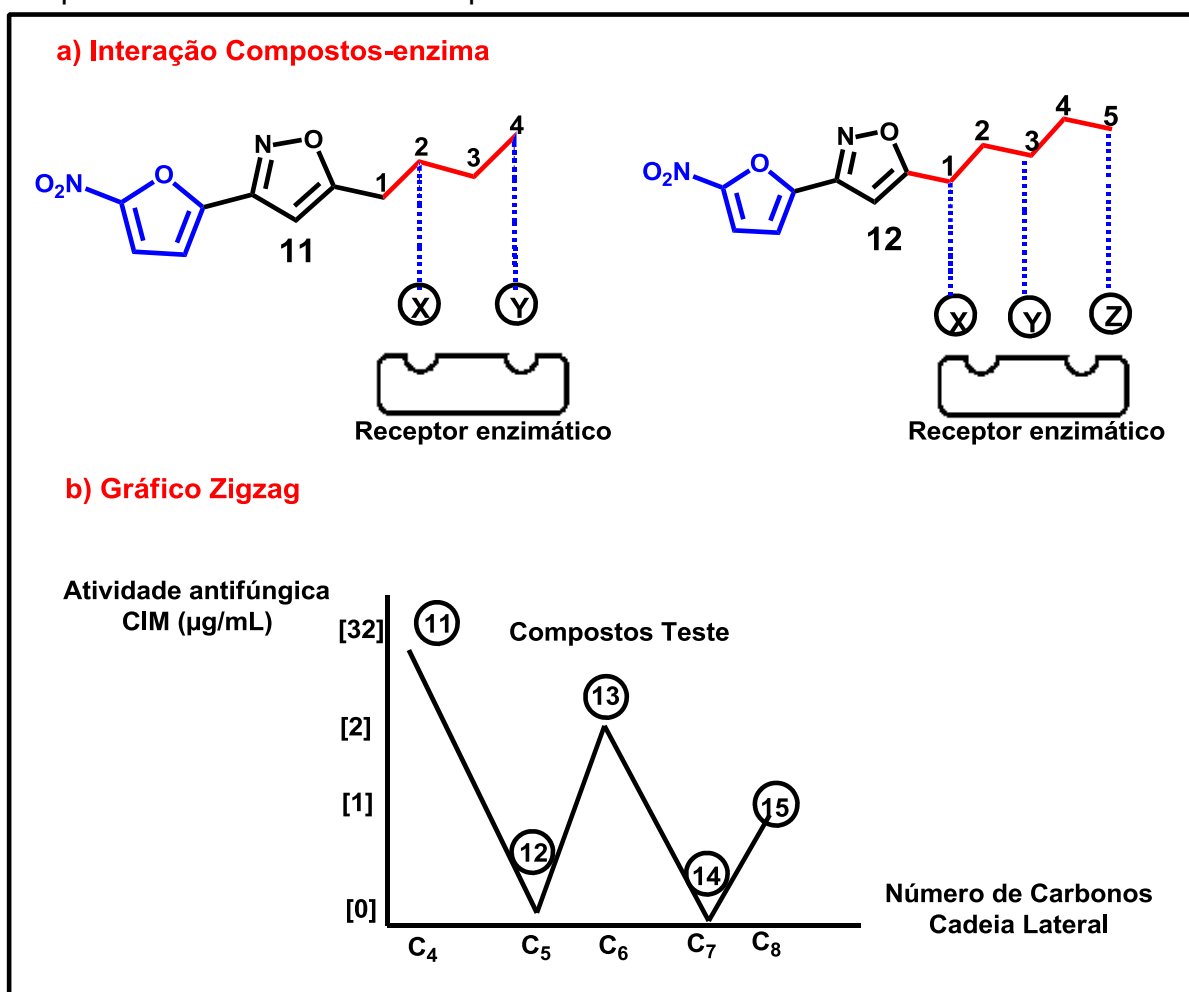


Figura 8. a) Modelo de interação grupo alquil e enzima fúngica; b) Gráfico Zigzag de compostos com cadeia lateral alquil.



Para os compostos hidroxilados, **16** e **17**, apenas o segundo apresentou halo de inibição contra *C. parapsilosis*. A redução do LogP de 1,71 para 0,90, respectivamente, pode ter favorecido a perda de atividade fúngica.⁶³

Dentre os compostos nitrofurânicos, a série alquil-clorada teve a maior incidência de halos inibitórios quando comparados aos demais compostos. O homólogo **18**, por exemplo, (contendo 4 grupos CH₂) não apresentou atividade antifúngica. Porém, quando o número de grupos metilenos (CH₂) diminui, a atividade aumentou, sendo que os compostos **19** e **20** apresentaram halo para *C. parapsilosis* e *C. albicans*. O composto **21**, contendo o menor número de metilenos apresentou halos de inibição contra todas as cepas testadas inclusive *C. glabrata* (Tabela 2).

O nitrotiofênico **36** apresentou halos de inibição contra a maioria das cepas como: *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. Kusei* e *C. glabrata*. Porém, quando comparado ao composto **21**, não apresentou halo contra *C. tropicalis*.

Dentre os trinta e seis compostos testados, dez (**1, 4, 5, 8, 13, 15, 17, 20, 21** e **36**) foram considerados dose-dependentes, onde o critério utilizado foi estabelecido pelo aumento da concentração destes compostos na proporção em que se observou o aumento dos halos de inibição, conforme Tabela 2.

Portanto, foram selecionados para a segunda etapa, Microdiluição em caldo, treze compostos (**1, 4, 5, 8, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 20, 21** e **36**) que apresentaram halos de inibição a pelo menos uma das leveduras testadas. A microdiluição em caldo consiste em um teste de susceptibilidade microbiana com o intuito de avaliar a atividade *in vitro* de antimicrobianos contra diferentes tipos de micro-organismos. Através de diluições seriadas, concentrações inibitórias mínimas (CIM) são obtidas e caracterizam de forma quantitativa a atividade microbiológica de um determinado composto, logo serve como uma ferramenta fundamental na avaliação de novos candidatos a fármacos.⁶³

A partir dos resultados obtidos na microdiluição em caldo, conforme tabela 4, pôde verificar-se que as treze amostras demonstraram CIM variados para as diferentes leveduras testadas. O composto **1** com a presença do anel aromático apresentou atividade fungistática contra *C. parapsilosis* (CIM = 8µg/mL). Na série dos grupos doadores de elétrons, o composto **5** (CIM= 32µg/mL) com a presença do grupo OCH₃ na posição *para* no anel aromático apresentou atividade fungistática para *C. parapsilosis*. Por outro lado, o composto trimetoxilado **8** apresentou uma

CIM = 2µg/mL, o qual é a melhor atividade antifúngica observada para a série de metoxilas contra *C. parapsilosis* e similar a um dos padrões utilizados, Fluconazol (CIM=2µg/mL). Deve-se destacar que o aumento das metoxilas, observado no composto **8**, fez com que este apresentasse atividade fungicida.

Para o composto **4**, a troca bioisostérica do átomo de oxigênio pelo átomo de enxofre favoreceu atividade fungicida contra *C. parapsilosis* (CIM= 8µg/mL). O composto **9**, contendo o grupo metilenodióxi, exibiu atividade fungicida contra *C. parapsilosis* (CIM= 16µg/mL).

Na série alquilada, os compostos com números pares de carbono, como **11** (CIM= 32µg/mL) e **13** (CIM= 2µg/mL) demonstraram atividade fungistática contra *C. parapsilosis*, enquanto que o composto **15** (CIM = 1µg/mL) com maior LogP da série (LogP= 5,20), demonstrou a melhor atividade da série, fungicida contra *C. parapsilosis*, e semelhante a atividade a um dos padrões utilizados, anfotericina B (CIM= 1µg/mL). A diferença no número de carbonos em relação à atividade biológica pode estar relacionada à conformação que estes compostos podem tomar quando interagem com os sítios alvos, fazendo com que desta forma, o número de carbonos pares tenha melhor interação. Outro fator preponderante está relacionado à lipossolubilidade do composto, uma vez que o aumento da cadeia lateral alquílica origina compostos mais lipossolúveis e desta forma podem aumentar a penetrabilidade, ou mesmo sua interação com as membranas lipídicas contidas no fungo.⁶² Em relação aos compostos hidroxilados, o **17** apresentou atividade fungistática contra *C. parapsilosis* (CIM = 16 µg/mL).

Na série alquilclorada, o composto **19** demonstrou atividade fungistática contra *C. parapsilosis* (CIM = 8 µg/mL) e fungicida contra *C. albicans* (CIM = 32 µg/mL). A redução da cadeia lateral de carbonos, composto **20**, possibilitou atividade fungicida contra *C. parapsilosis* (CIM = 16 µg/mL) e *C. albicans* (CIM = 32 µg/mL), e fungistática contra *C. krusei* (CIM = 32 µg/mL). O composto **21**, contendo a menor cadeia lateral dos alquilclorados, demonstrou atividade fungistática contra *C. parapsilosis* (CIM = 4 µg/mL) e *C. krusei* (CIM= 16 µg/mL), enquanto que para *C. albicans* (CIM = 8 µg/mL), *C. glabrata* (CIM = 4µg/mL) e *C. tropicalis* (CIM= 8µg/mL) exibiu atividade fungicida. Este composto foi considerado um dos melhores da série, uma vez que foi ativo contra todas as leveduras testadas e demonstrou menores CIM, como no caso da *C. glabrata*, onde obteve um CIM=4µg/mL, atividade superior

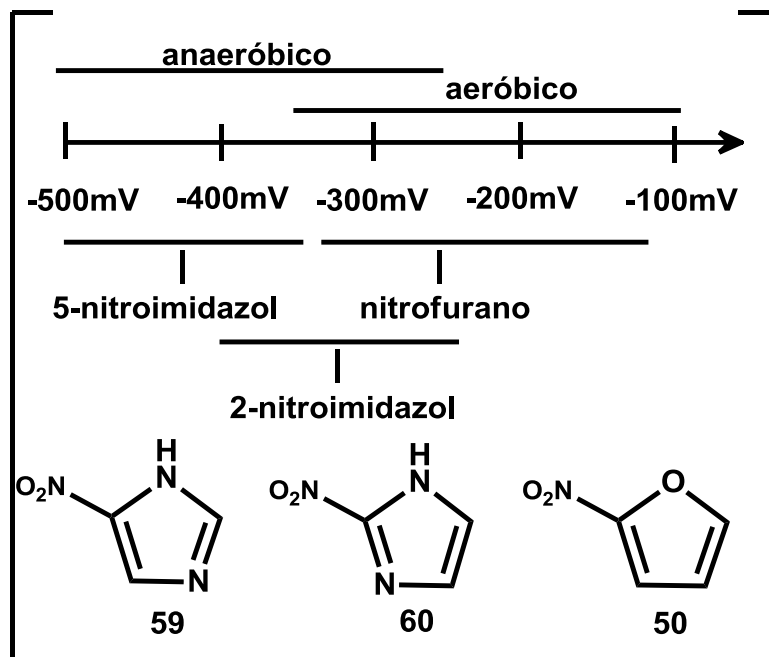
quando comparada aos padrões utilizados, anfotericina B (CIM=16 µg/mL) e fluconazol (CIM=32 µg/mL). Tal fato pode estar relacionado a um ataque de um nucleófilo, ao carbono eletrofílico ligado ao cloro, uma vez que a proximidade do anel isoxazólico, que é retirador de elétrons pode favorecer este mecanismo.³⁵

5.3 PERFIL DE BIORREDUÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA: NITROFURANOS VERSUS NITROTIOFENO

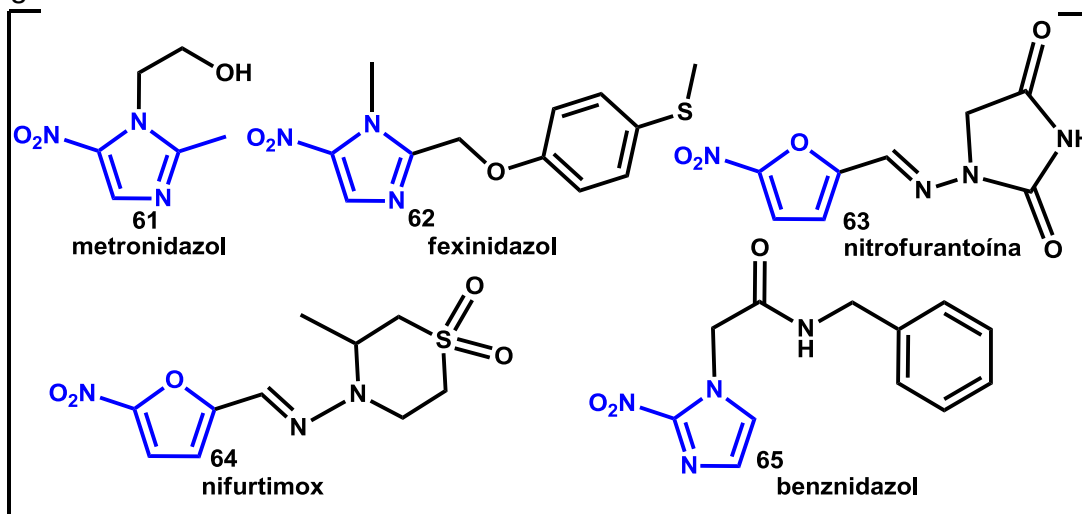
O mecanismo de ação de nitrocompostos está associado a capacidade do grupo nitro sofrer redução formando espécies radicalares ($R-NO_2^{\cdot-}$), e mesmo espécies reativas eletrofílicas de nitrogênio como o grupo nitroso ($R-NO$) e hidroxilamina ($R-NOH$), interagindo com o DNA provocando morte celular.⁴⁹

Se este processo ocorre no interior de bactérias, protozoários e fungos, e não dentro de células de mamíferos, o composto possui seletividade. Por outro lado, se o metabolismo de mamíferos conseguem reduzir nitrocompostos, a formação de espécies reativas pode levar os efeitos colaterais que podem limitar o tratamento, como é o caso do benznidazol, que pode provocar aplasia medular, ou até mesmo mutagenicidade ou carcinogenicidade como é o caso do megalol, que é um antichagássico que não pode ser utilizado em humanos.⁶⁵

As explicações para estes efeitos devem-se ao diferentes potenciais de redução dos nitrocompostos. 5-nitroimidazóis 59, como é o caso do metronidazol, são mais difíceis de serem reduzidos com potencial de redução em torno de -500 e -370mV, enquanto, 2-nitroimidazóis 60, entre -400 e -220 mV, e nitrofuranos 50 de -330 mV a -120 mV. Micro-organismos anaeróbicos conseguem reduzir nitrocompostos em valores próximos a -500mV, e os aeróbicos até no máximo -350mV. Assim os nitrofuranos possuem o maior potencial de promover mutagenicidade/carcinogenicidade, por serem mais fáceis de serem reduzidos em sistemas aeróbicos(Figura 9).^{49,65}

Figura 9. Potencial de redução de derivados nitro-heterocíclicos

Porém, deve ser destacado que modificações moleculares apropriadas que interfiram nestes potenciais, ou mesmo a presença de certos grupos nos compostos planejados podem proporcionar a obtenção de compostos com baixo potencial de mutagenicidade ou carcinogenicidade, como é o caso do metronidazol 61, fexinidazol 62, nitrofurantoína 63, nifurtimox 64, e benznidazol 65 (Figura 10).⁶⁵

Figura 10. Compostos com baixo potencial de mutagenicidade e carcinogenicidade

Assim, a possível explicação para ação antifúngica mais ampla dos nitrofuranos, é que o oxigênio é mais eletronegativo, e, portanto, tendo efeitos retiradores de elétrons maiores que o enxofre, levando a uma maior facilidade de redução do grupo nitro pelo fungo, devido ao aumento de sua eletrofilicidade.⁶²

Os nitrofuranos aqui sintetizados são em geral mais ativos contra todas as espécies de *Candida*, com particular ação sobre a *C. parapsilosis*. O composto **21** é ativo contra todas as espécies, e possui propriedades fungicidas contra *C. albicans*, *C. kruzei*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*. O composto nitrotiofênico **36**, por outro lado não tem ação sobre *C. tropicalis*, é menos potente e fungistático contra todas as outras espécies de *Candida* quando comparado a **21**, exceto *C. parapsilosis*. Outros fatores que também podem estar relacionados a uma maior potência dos derivados nitrofurânicos é a capacidade do oxigênio realizar interações por ligações de hidrogênio.

O átomo de oxigênio constitui-se como um importante acceptor de ligações de hidrogênio, tornando possível a hipótese de que a atividade biológica contra espécies de *Candida* esteja também relacionada a interações por ligação de hidrogênio entre o anel furano dos hits testados e o sítio ativo. Evidências científicas demonstram que as interações de hidrogênio com o átomo de enxofre (troca bioisostérica) dependem de uma geometria mais perpendicular, além de serem mais fracas se comparadas às mesmas interações realizadas como o átomo de oxigênio.⁶⁶

Desta forma, o composto **21** quando comparado ao fluconazol e a anfotericina B demonstra um potencial grande em relação à atividade biológica, pois em leveduras de determinadas espécies, como *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* demonstrou ser fungicida e obteve concentrações próximas aos padrões utilizados.

A espécie mais susceptível foi *C. parapsilosis*, que possui um dos maiores números de incidências nos casos de infecções fúngicas por CNA. Apesar de não ser uma das mais patogênicas, apresenta redução na sensibilidade aos fármacos de rotina clínica pela formação de biofilme, o que desta forma a torna um patógeno em potencial.

6. CONCLUSÃO

Os nitro-heterocíclicos têm demonstrado grande importância na síntese de novos compostos com potencial atividade antifúngica. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram potenciais atividades antifúngicas para os compostos **21** e **36** que apresentaram amplo espectro, uma vez que foram ativos contra a maioria das espécies de leveduras testadas. Adicionalmente, verificou-se a desenvoltura antifúngica de nitrofuranos em relação aos nitrotiofênicos e, desta forma, classificou-se quanto a sua ação fungicida ou fungistática. Verificou-se também, que a espécie mais susceptível foi a *C. parapsilosis*, no geral dos 36 compostos, treze demonstraram perfil de atividade. Logo, novos estudos são necessários para que a avaliação *in vivo* possa ser realizada, e desta forma esses protótipos possam servir como base para que novas modificações sejam realizadas e assim sua atividade microbiológica possa ser melhorada, visando novos fármacos com melhor perfil terapêutico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zaitz, C.etal.Compêndio de micologia médica. Ed.(Reimpressão). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, **2015**.
2. Pappas, P. G. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.*; v.15, n.62, p.1-50, **2016**.
3. Almeida, A. B. Características Das Infecções Em Indivíduos Portadores De Neoplasias Hematológicas Internados No Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani De São Thiago. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, **2014**.
4. Ben-Ami, R. et al. Antibiotic Exposure as a Risk Factor for Fluconazole-Resistant Candida Bloodstream Infection. *Am.Soc. Mic.*; v.56,n.6, **2012**.
5. Lortholary, O. et al. Recent Exposure to Caspofungin or Fluconazole Influences the Epidemiology of Candidemia: a Prospective Multicenter Study Involving 2,441 Patients. *Am.Soc. Mic*;v.55, n.2,**2011**.
6. NAKAMURA, H. Incidence OfFungic Infections In Surgery Patients: A Retrospective. *Rev. SOBECC*; v.18, n.3, p.49-58, **2013**.
7. Lacaz, C. S.; et al. Tratado de Micologia Médica. São Paulo, Savier, 2ed. **2002**.
8. Doi, M. A. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial-Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program.*PLoSONE*, v.11, n.1, **2016**.
9. ANVISA. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica /Agência Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa, **2013**.
10. Shah, D. N. et al.Impact of Prior Inappropriate Fluconazole Dosing on Isolation of Fluconazole-Nonsusceptible Candida Species in Hospitalized Patients with Candidemia. *Am.Soc. Mic.*; v.56, n.6, **2012**.
11. Kang, S. J. et al. Clinical characteristics and risk factors for mortality in adult patients with persistent candidemia. *J. Infect .*; p. 1-8, **2017**.
12. Tigen MD, E. T. et al. Risk factors, characteristics, and outcomes of candidemia in an adult intensive care unit in Turkey. *Am. J. Infect. Cont.*; v.45,**2017**.
13. Xião, M. Antifungal susceptibilities of Candida glabrata species complex, Candida krusei, Candida parapsilosis species complex and Candida tropicalis causing invasive candidiasis in China: 3 year national surveillance. *J Antimicrob Chemother.*; v.3, **2014**.
14. Vallabhaneni S.et al. Epidemiology and Risk Factors for EchinocandinNon-susceptibleCandida glabrata Bloodstream Infections: Data From a Large Multisite Population-Based Candidemia Surveillance Program, 2008–2014. *Open Forum Infectious Diseases.*; v. 163, n. 4, **2015**.
15. Mattos, K. et al. Variability in the clinical distributions of Candida species and the emergence of azole-resistant non-Candida albicans species in public hospitals in the Midwest region of Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*; v.50, n.6, p.843-847, **2017**.
16. Sucher, A.J.; Chahine, E.B.; Balcer, H.E. Echinocandins: the newest class of antifungals. *Ann Pharmacother.*; v.43, n.10, p.1647-165, **2009**.
17. Debono M, et al: Semisynthetic chemical modification of the antifungal lipopeptide echinocandin B (ECB): structure-activity studies of the lipophilic and geometric parameters of polyarylated acyl analogs of ECB. *J Med Chem*; v.38, p.3271–3281,**1995**.

18. Douglas, C.M. Fungal beta(1,3)- D -glucan synthesis. *Med Mycol*;v.39 (suppl 1), p.55– 66, **2001**.
19. FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L. Farmacologia clínica e terapêutica .5. ed.- [Reimpr.] - Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, **2017**.
20. Chudzik, B.; et al. A new look at the antibiotic amphotericin B effect on *C. albicans* plasma membrane permeability and cell viability functions. *Eur Biophys J*;v.44, n.1-2, p.77-90, **2015**.
21. a)Package insert. Cancidas (caspofungin). Whitehouse Station, NJ: Merck & Co., Inc., July **2008**.b) Package insert. Mycamine (micafungin). Deerfield, IL: Astellas Pharma US, Inc., January **2008**.c) Package insert. Eraxis (anidulafungin). New York, NY: Roerig, Division of Pfizer Inc., May **2007**.
22. Park, S.; et al. Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp. isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, v.49, p.3264-73, **2005**.
23. Sanglard, D.; et al. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. *Antimicrob Agents Chemother*; v.39, p.2378–86,**1995**.
24. Loffler, J.et al.; Molecular analysis of cyp51 from fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *FEMS Microbiol Lett* , v.151,p. 263–8, **1997**.
25. Kelly, S.L.;, et al. Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta5,6-desaturation. *FEBS Lett*; v.400, p.80–82,**1997**.
26. Walker, L.A.et al.; Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. *PLoS Pathog*; v.4, **2008**.
27. Walker, L.A.; Gow, N.A.; Munro, C.A.; Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genet Biol*.;v. 47, p.117-26,**2010**.
28. El-Azizi, M.; Farag, N.; Khardori, N.; Antifungal activity of amphotericin B and voriconazole against the biofilms and biofilm-dispersed cells of *Candida albicans* employing a newly developed in vitro pharmacokinetic model. *Clin. Microbiol. Antimicrob*, v.4, n.1, p.14-21, **2015**.
29. Marrie, J. Casterton, W. Scanning and transmission electron microscopy of *in situ* bacterial colonization of intraatrial cateter. *J. Clin. Microbiol*.; v.19, p.687-93, **1984**.
30. Tilton,E.C.F; et al.; Avaliação de biofilme de *candida spp* em cateter venoso central por cultura quantitativa e microscopia eletrônica de varredura. VIII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba, **2004**.
31. Cardoso, B. Produção de biofilme e perfil de susceptibilidade a antifungicos de isolados de *Candida spp* em episódios de candidemia no Hospital das Clínicas da FMRP-USP. Dissertação de mestrado, Ribeirão Preto, **2017**.
32. Rodrigues, C. F.; et. Al.; Inflammatory Cell Recruitment in *Candida glabrata* Biofilm Cell-Infected Mice Receiving Antifungal Chemotherapy. *J. Clin. Med*.; v.8, p.142, **2019**.
33. Lockhart, S. R. Species Identification and Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Bloodstream Isolates from Population-Based Surveillance Studies in Two U.S. Cities from 2008 to 2011. *Journal of Clinical Microbiology*.; v.50,n.11,p.3435–3442, **2012**.
34. Centers for Disease Control and Prevention. Fluconazole-resistant *Candida*. Ed.23, **2013**.
35. Lenke, T. L.; Willians, D. A.; Roche, V. F.; Zito, S. W. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*, 6ª Ed, Lippincot, Willians & Wilkins, **2008**.

36. Patani, G. A.; LaVoie, E. J. Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design. *Chem. Rev.*, v.96, p.3147, **1996**.
37. Viegas-J. et. al. Molecular Hybridization: A Useful Tool in the Design of New Drug Prototypes *M. Curr. Med. Chem.*; v.14, p.1829, **2007**.
38. Daidone, G. et al. Synthesis and pharmacological activities of novel 3-(isoxazol-3-yl)-quinazolin-4 (3 H)-one derivatives. *Arch. Pharm. Med. Chem.*; v.332, n. 50, **1999**.
39. Waldo, J. P. et al. Solution Phase Synthesis of a Diverse Library of Highly Substituted Isoxazoles. *J. Comb. Chem.*, v.10, p.658-663, **2008**.
40. Li, W.-T.; et al. Synthesis and Biological Evaluation of *N*-Heterocyclic IndolylGlyoxylamides as Orally Active Anticancer Agents. *J. Med. Chem.*, v.46, p.1706, **2003**.
41. Agrawal, N. Mishra, P. The synthetic and therapeutic expedition of isoxazole and its analogs. *Med. Chem. Res.*; n. 27, p.1309, **2018**.
42. Cassamale, N; et. al. Synthesis and Antitrypanosomastid Activity of 1,4-Diaryl-1,2,3-triazole Analogues of Neolignans Veraguensin, Grandisin and Machilin G. *J. Braz. Chem. Soc.*; v.27, n.7, **2016**.
43. Costa, et. al. Antileishmanial Activity and Structure-Activity Relationship of Triazolic Compounds Derived from the Neolignans Grandisin, Veraguensin, and Machilin G. *Molecules*, v.21, n.802, **2016**.
44. Trefzger, et. al. Design, synthesis and antitrypanosomatid activities of 3,5-diarylisoaxazole analogues based on neolignans veraguensin, grandisin and machilin G. *Chem Biol Drug Des.*;p.1–12, **2018**.
45. Tomishima, M. et al. Novel echinocandin antifungals. Part 2: Optimization of the side chain of the natural product FR901379. Discovery of micafungin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*; v.18, p. 2886–2890, **2008**.
46. Chevreuil, F. et al. Synthesis of new isoxazoles and dihydroisoxazoles and in vitro evaluation of their antifungal activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*; v. 22, n.5, p. 563-569, **2007**.
47. Zhao, S.; et. al. Design, synthesis and evaluation of aromatic heterocyclic derivatives as potent antifungal agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.137, p. 96-107, **2017**.
48. Petrikaitė, V.; Tarasevičius, E.; Pavilonis, A. New thiazolidones-4 with sulfamethizole-2 substituent as potential antifungal and antimicrobial preparations. *Biologija*. Vol. 53. No. 3. P.45–50. **2007**.
49. Paulai F.; Serrano, S.H.P.; Tavares, L.C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. *Quim Nova*, v. 32, p.1013–1020, **2009**.
50. Charris, J. et al. Synthesis of some 5-nitro-2-furfurylidene derivatives and their antibacterial and antifungal activities. *Laboratorio de Síntesis Orgânica, Universidad Central de Venezuela*, v.8, n. 3, **2002**.
51. Foroumadi et al. Synthesis and in vitro Antifungal Activity of 2-Aryl-5-phenylsulfonyl-1,3,4-thiadiazole Derivatives. *Arzneim.-Forsch. Drug Res*, v.49, n. 12, **1999**.
52. Satheesha Rai, N. et al. Convenient acces to 1,3,4-trisubstituted pyrazoles carrying 5-nitrothiophene moiety via 1,3-dipolar cycloaddition of sydnone with acetylenic ketones and their antimicrobial evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.43, p.1715-1720, **2008**.
53. CLSI. *Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline-Second Edition*. CLSI document M44-A2. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Institute; **2009**.

54. Santos, T. F. et al. Exploring 1,2,3-triazole derivatives by using in vitro and in silico assays to target new antifungal agents and treat Candidiasis. *Med. Chem. Res.* v.26, n.680, **2017**.
55. Pfaller. M. A. et al. Wild-type distribution, epidemiological cut off values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and Candida: Time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. *Drug Resistance Updates*, v. 13, p. 180-195, **2010**.
56. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; **2008**.
57. Beyzeai, H. et al. Green multicomponent synthesis, antimicrobial and antioxidant evaluation of novel 5-amino-isoxazole-4-carbonitriles. *Chemistry Central Journal*, v.12, n.114, **2018**.
58. Fuentes, M. et al. Actividad antifúngica de melanina en cepas clínicas de Candida spp. *Rev Chilena Infectol*; v.31, n.1, p. 28-33, **2014**.
59. Graybill, J.R., Burgess, D.S.; Hardin, T.C. Key issues concerning fungistatic versus fungicidal drugs. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v.16, n. 42, **1997**.
60. Kumar, A. et al. Fungicidal versus fungistatic therapy of invasive *Candida* infection in non-neutropenic adults: a meta-analysis. *Mycology*, v.9, n.2, p.116-128, **2018**.
61. Banim, U.; et al. A mini review on isoxazole. *International Journal of Institutional Pharmacy and Life Sciences*, v.4, n.3, May-June **2014**.
62. Wermuth, C. G. et al. The Practice of Medicinal Chemistry. Fourth Edition. *Elsevier*, **2015**.
63. Souza-Silva, C.M.; et al. Broth Microdilution In Vitro Screening: An Easy and Fast Method to Detect New Antifungal Compounds. *J. Vis. Exp.* v.132, **2018**.
64. Lipinski, C. A; et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.23, n.15, p.3-25, **1997**.
65. Moreth, M.; et al.; Nitroimidazóis – Uma Promissora Classe de Substâncias para o Tratamento da Tuberculose, *Rev. Virtual Quim.*, v. 2, p.105-117, **2010**.
66. J. A. Platts, S. T. Howard, and B. R. F. Bracke. Directionality of Hydrogen Bonds to Sulfur and Oxygen. *J. Am. Chem. Soc.*, v.118, n.1, p. 2726–2733, **1996**.