



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
CITOTÓXICA DE NOVOS COMPOSTOS TRIAZÓLICOS**

IARA FILARDI DA SILVA

MANAUS

2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

IARA FILARDI DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
CITOTÓXICA DE NOVOS COMPOSTOS TRIAZÓLICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, na área de concentração bioanálises e desenvolvimento de produtos farmacêuticos.

Orientador: Prof^o Dr^o Emerson Silva Lima

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Karen Regina Carim da Costa

MANAUS

2012

Ficha Catalográfica
realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

(Catalogação

S586 Silva, Iara Filardi da

Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de novos compostos triazólicos/ Iara Filardi da Silva.- Manaus: UFAM, 2012. 90f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)— Universidade Federal do Amazonas, 2012.

Orientador: Prof.º, Dr.º. Emerson Silva Lima

Co-orientador: Profª Drª Karen Regina Carim da Costa

1. Atividade antimicrobiana 2. Triazóis 3. Farmácia I. Lima, Emerson Silva (Orient.) II. Costa, Karen Regina Carim da (Co - orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU (1997) 615.33(043.3)

**Dedico este trabalho à Deus, razão de tudo na minha vida.
Aos meus pais Alberto e Rosa, ao meu marido Leonardo
e à minha filha Beatriz Serena, pelo amor
que me dedicaram em todos os momentos.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Dr. Emerson Lima pela oportunidade, orientação e ensinamentos que contribuíram para execução do trabalho.

Agradeço à professora Karen pela atenção, compreensão e principalmente pelo desenvolvimento do trabalho.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Atividade Biológica 1 e 2, em especial à Gleyce, Luís, Tatiana e à querida técnica Rose por todo apoio que recebi.

Agradeço às Instituições: Universidade Federal do Amazonas, Universidade Federal Fluminense, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e Fundação Oswaldo Cruz pela colaboração e apoio técnico.

Agradeço à FAPEAM e CNPQ pelo suporte financeiro.

RESUMO

A pesquisa de novos agentes antimicrobianos se faz necessária devido ao surgimento de microrganismos resistentes e de infecções oportunistas fatais, associadas à síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), quimioterapia antineoplásica e transplantes. Os compostos triazólicos são um dos sistemas heterocíclicos mais estudados atualmente e têm despertado muito interesse pelo fato de possuírem um vasto campo de aplicações, que vão desde o uso como explosivos, até como agroquímicos e fármacos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de compostos triazólicos sintéticos em leveduras do gênero *Candida sp*, nas bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e nos fungos filamentosos *Microsporum canis*, *Aspergillus niger* e *Trichophyton rubrum* através da técnica de microdiluição em caldo e avaliar a citotoxicidade dos compostos que apresentaram atividade antimicrobiana pelos testes de viabilidade celular em fibroblastos murinos NIH3T3, potencial hemolítico e atividade anticoagulante. Dos 90 compostos triados, quatro apresentaram significativa atividade anti-*candida* (MIC 0,25-0,06 mmol/L). Esses mesmos compostos também apresentaram atividade para *M. canis* (MIC 50-100 mg/mL), *T. rubrum* (MIC 6.25- 25 mg/mL) e para *A. niger* (MIC 100 mg/mL). Nenhum dos compostos testados apresentou atividade anti-bacteriana para *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. faecalis*. Todos os compostos que apresentaram atividade antifúngica apresentaram baixa citotoxicidade para os testes analisados. A partir do *screening* de 90 novos compostos triazólicos foram identificados quatro os quais podem ter potencial para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade antifúngica.

Palavras-chave: Novos triazóis, Atividade antimicrobiana, Citotoxicidade

ABSTRACT

The search for new antimicrobial agents is necessary due to the emergence of resistant microorganisms and fatal opportunistic infections associated with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), cancer chemotherapy and transplantation. The triazole compounds are one of the most studied heterocyclic systems today and have attracted much interest because they have a wide range of applications, ranging from use as explosives, even as agrochemicals and pharmaceuticals. This study aimed to evaluate the antimicrobial activity of synthetic 1,2,3 triazole compounds in yeasts *Candida* sp, the bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and filamentous fungi *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum* and *Aspergillus niger* using the technique of microdilution and evaluate the cytotoxicity of the compounds showed antimicrobial activity tests for cell viability in fibroblasts NIH3T, hemolytic potential in human blood and anticoagulant activity in human plasma. Of all the compounds screened, four showed good anti-candida (MIC 0.25 to 0.06 mmol/L). These same compounds also show activity for *M. canis* (MIC 50-100 mg/mL), *T. rubrum* (25 MIC 6.25 mg/mL) and *A. niger* (MIC 100 mg/mL). None of the compounds tested showed antibacterial activity for *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *E. faecalis*. All compounds showed antifungal activity showed low cytotoxicity for the tests analyzed. From screening of 90 new compounds were identified four 1,2,3 triazole which may have potential for the development of new drugs with antifungal activity.

Keywords: New triazoles, antimicrobial activity, cytotoxicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma das atividades laboratoriais do projeto	35
Figura 2 – Preparo do inóculo fúngico	37
Figura 3 – Esquema ilustrativo do teste de microdiluição em placa	40

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Antimicrobianos aprovados pelo FDA entre 1983 e 2002, por período de 5 anos **13**

LISTA DE TABELA

Tabela1 - Origem das classes de fármacos antibacterianos disponíveis no mercado	22
Tabela2 - Fórmula molecular e código dos compostos triazólicos a serem testados no projeto	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Doenças Infecciosas	15
2.2 Terapêutica Antimicrobiana	20
2.3 Compostos Triazólicos	24
2.4 Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos	27
2.4.1 Métodos de Difusão	28
2.4.2 Método de Diluição em Caldo	29
2.5 Testes de Citotoxicidade	30
3. OBJETIVOS	31
3.1 Geral	31
3.2 Específicos	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Modelo de Estudo	32
4.2 Compostos Triazólicos	34
4.3 Delineamento Experimental	34
4.4 Avaliação da Atividade Antifúngica	35
4.4.1 Cepas Fúngicas	36
4.4.2 Inóculo dos Fungos Leveduriformes	36
4.4.3 Inóculo dos Fungos Filamentosos	37
4.4.4 Preparo da Solução Padrão Antifúngica	38
4.5. Avaliação da Atividade Antibacteriana	38
4.5.1 Cepas Bacterianas	38
4.5.2 Inóculo Bacteriano	38
4.6 Técnica de Microdiluição em Caldo	39
4.7 Determinação dos Pontos Finais da CIM	40
4.8 Teste Hemólise	40
4.9 Teste da Coagulação	41
4.10 Ensaio citotóxicos	42
4.10.1 Ensaio do Alamar Blue	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Manuscrito	43
6. CONCLUSÃO	56
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
APÊNDICE	62

1.INTRODUÇÃO

A busca por novos antimicrobianos, apesar de decrescente, é ininterrupta. Os grandes laboratórios investem bilhões de dólares anualmente em pesquisa visando a descoberta de novas substâncias potencialmente dotadas de ação antimicrobiana. O desenvolvimento de um novo antimicrobiano é uma tarefa difícil, pois demanda anos de pesquisa, além de ser extremamente dispendioso. Nos últimos anos, muitos estudos têm surgido em diversas partes do mundo, com o objetivo de avaliar a atividade de novos agentes e de compará-los com antimicrobianos mais antigos. Comumente, o que ocorre são modificações estruturais nas moléculas já existentes, sendo a criação de uma nova classe uma situação mais excepcional. Diversos são os métodos empregados nessa busca: a pesquisa pura e simples de novas drogas é um deles; outro, mais comum nos dias de hoje e economicamente mais produtivo, é a manipulação de antimicrobianos existentes, visando, através de modificações químico-moleculares, a obtenção de novos derivados dotados de maiores qualificações, quando comparados à droga-mãe (CAIERÃO et al., 2004).

A indústria farmacêutica está reduzindo substancialmente suas pesquisas para a obtenção de novos antimicrobianos, pois drogas indicadas para outras patologias, que não as infecciosas, vêm proporcionando mais lucro. Antimicrobianos são habitualmente prescritos apenas por alguns dias, em contraste com drogas para doenças crônicas, usadas indefinidamente, como aquelas indicadas para hipertensão, insuficiência cardíaca, retenção hídrica, profilaxia de convulsão, diabetes e muitas outras, incluindo os modernos medicamentos para disfunção erétil. A isto, pode-se acrescentar que antibióticos podem rapidamente perder sua eficácia, devido à frequente emergência de resistência bacteriana; podem sofrer os efeitos das novas propostas científicas, tais como o surgimento de inúmeros “guidelines”, o aperfeiçoamento nos critérios diagnósticos e

o encurtamento da duração de tratamento, o que tem resultado em uma redução na prescrição de antibióticos. Pelos motivos expostos, a maioria das companhias farmacêuticas multinacionais tem fechado ou pelo menos reduzido substancialmente suas pesquisas para a obtenção de novos antibióticos, como mostra no gráfico 1; diversas pesquisas em andamento com novos antimicrobianos, em fases II e III, têm sido interrompidas pela falta de segurança do laboratório com relação ao potencial promissor destas drogas (LOPES, 2006).

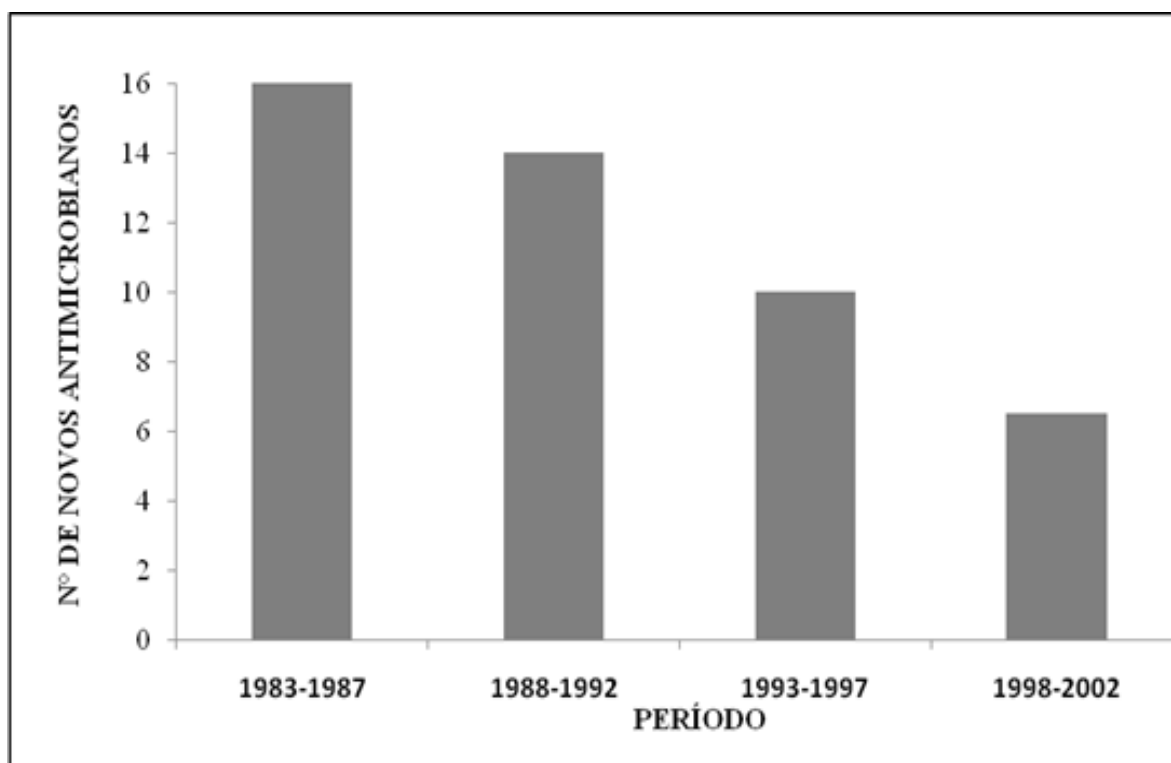


Gráfico1. Antimicrobianos aprovados nos EUA (FDA) entre 1983 e 2002, por período de 5 anos.

Fonte: SPELLBERG et al., 2004.

Além da problemática acima descrita, grandes avanços nos cuidados de saúde ao longo dos últimos anos levaram a um aumento de uma população imunodeprimida com risco de infecções por microrganismos patogênicos e oportunistas. Estas infecções possuem elevada morbidade e mortalidade, são difíceis de prevenir, diagnosticar, tratar

e contribuem para o aumento do número de pessoas com risco de doenças infecciosas (SILVA et al., 2009).

A pesquisa de novos agentes antimicrobianos se faz necessária devido ao surgimento de microrganismos resistentes e de infecções oportunistas fatais, associadas à síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), quimioterapia antineoplásica e transplantes (PENNA et al., 2001). Diversas razões justificam a necessidade urgente por novos agentes antibióticos: doenças infecciosas são a segunda maior causa de mortalidade do mundo; altas taxas de resistência microbiana, especialmente em ambientes hospitalares; o decréscimo constante observado no número total de novos agentes antimicrobianos aprovados pelo FDA a necessidade de agentes que atuem por mecanismos de ação diferentes aos fármacos em uso (GUIMARÃES et al., 2010).

Atualmente, compostos triazólicos e seus derivados ganharam uma grande importância na química medicinal e podem ser usados para a síntese de numerosos compostos heterocíclicos com diferentes atividades biológicas (SINGHAL et al., 2011). Os diversos derivados triazólicos possuem diferentes ações farmacológicas como antiviral, antibacteriana, antifúngica e antituberculose. Assim os triazóis atuam como um agente promissor de medicamentos para os cientistas que trabalham neste este campo (SIDDIQUI et al., 2011).

Portanto, a pesquisa de novos antimicrobianos é premente e cada vez mais se torna uma questão de manutenção da saúde pública, a partir desta afirmativa, o presente trabalho se propõe a avaliar a atividade antimicrobiana de novos compostos triazólicos, frente às cepas de leveduras *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, das bactérias

Pseudomonas aeruginosa, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e dos fungos filamentosos *Microsporium canis*, *Trichophyton rubrum* e *Aspergillus niger*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Doenças Infecciosas

Para uma parte da população, as infecções causadas por microrganismos são a causa predominante de doenças e morte, limitando não apenas as melhorias no conforto pessoal, mas também impedindo o avanço do bem-estar social. Somente no século vinte as melhorias das condições de vida, sanitarismo e intervenção médica tiraram as sociedades da difícil situação causada pelas doenças infecciosas. Infelizmente os beneficiários desses avanços se concentraram em países ricos, excluindo a maioria do mundo (KONEMAN, 2008).

Na década de 1950, os sucessos da medicina moderna e da saúde pública pareciam tão impressionantes que muitos proeminentes cientistas estavam propensos a prever a conquista das doenças infecciosas e a erradicação da “pestes” como causa de miséria da face do planeta. Em 1969, William H. Stewart, diretor nacional de saúde dos EUA, disse a famosa frase: “É o momento de fechar o livro sobre doenças infecciosas.” Infelizmente, sabe-se hoje que esses sábios homens subestimaram muito a capacidade de adaptação das multifárias formas de vida que compartilham o planeta conosco. De igual modo, eles não puderam prever as consequências negativas dos principais avanços médicos que prolongaram a vida humana, às vezes com efeitos desafortunados sobre os efeitos de defesa dos hospedeiros. Eles também não consideraram os efeitos da incursão humana sobre o ambiente ou a consequência do livre movimento das plantas e animais,

incluindo os seres humanos, em todo o planeta. Como resultado, a lista de doenças infecciosas novas ou reemergentes que nos têm afligido desde aquelas previsões errôneas é longa e ainda crescente (KONEMAN, 2008).

As doenças infecciosas podem ser caracterizadas como processos agudos, de alta letalidade ou como processos crônicos, capazes de subsistir durante a maior parte da vida do portador, aparentemente sem produzir maiores prejuízos. Essas doenças constituem um grupo muito heterogêneo e possuem em comum apenas o fato de serem ocasionadas por micro ou macroparasitas: agentes etiológicos vivos, adquiridos em algum momento pelos hospedeiros a partir do ambiente externo (PIGNATTI, 2004).

Uma definição menos ampla de infecção inclui, necessariamente a presença e multiplicação de organismos, tais como bactérias, fungos, protozoários, vírus e helmintos em um hospedeiro vivo, com estimulação de uma resposta imunológica evidente, podendo ser localizada ou generalizada (KONEMAN, 2008). As doenças infecciosas têm seu destaque na história da humanidade por constituírem um grande problema de saúde pública. Malária, cólera, febre tifóide, hanseníase, peste bubônica, entre outras, tiveram uma grande incidência em todo o mundo durante todo o século XIX (SÁ; SOUZA; DINIZ, 1992). A melhoria da qualidade de vida nos países do hemisfério norte, bem como os efeitos da Revolução Industrial e, particularmente, os fenômenos de urbanização e aceleração tecnológica, restringiram essas doenças às “áreas pobres” do mundo, dentre essas as zonas tropicais (SÁ; SOUZA; DINIZ, 1992).

As infecções estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade nas populações dos países em desenvolvimento desde os tempos remotos (COURO; CASTRO, 2001). Elas são importantes causas de mortes prematuras no mundo, com uma estimativa de 50.000 óbitos por dia, e estão juntamente com as doenças crônico-

degenerativas como câncer e doenças cardiovasculares entre as patologias de maior preocupação mundial (WHO, 2009).

No Brasil, o quadro epidemiológico do início da década passada caracterizou-se pela coexistência de doenças crônico-degenerativas (como câncer, doenças cardiovasculares) e endêmicas, e o retorno de velhas doenças infecciosas (como dengue e tuberculose). Nas últimas décadas, as doenças infecciosas têm apresentado valores próximos a 10% do total de internações em todo o país, sendo estes mais elevados nas Regiões Norte e Nordeste (PINHEIRO et al., 2002).

Além disto, atualmente, existe outra grande preocupação entre as patologias infecciosas, o grupo designado de infecções hospitalares ou nosocomiais. Estas infecções são definidas como aquelas adquiridas em hospitais, podendo ocorrer durante, ou ainda, em decorrência desta hospitalização (VILLAS BOAS; RUIZ, 2004). Os quadros infecciosos principalmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) estão associados ao maior tempo de internação, além da elevação da morbidade e da mortalidade. Estas patologias têm um impacto econômico importante, pois requerem dos sistemas de saúde, um alto investimento para o seu controle (BURKEJE, 2003).

Alguns estudos brasileiros avaliaram o impacto das infecções em ambiente hospitalar. Toufen Jr et al. (2003) estudaram a prevalência de infecção nosocomial na UTI de um Hospital Universitário e encontraram uma alta taxa de incidência, aliada ao predomínio de bactérias resistentes a grande parte dos antimicrobianos comumente utilizados. Estudos brasileiros recentes apontaram como agentes responsáveis por essas infecções os bacilos Gram-negativos e cocos Gram-positivos. A taxa de mortalidade de pacientes desses estudos variou de 34,7% até 46,6%. Outro dado importante revelado pelos mesmos estudos apontou que 65% dos casos de infecções evoluíram para um quadro de choque séptico (Lisboa et al., 2007). Vários

fatores contribuem para a prevalência e a dificuldade no controle das infecções, como o aumento do número de pacientes imunocomprometidos, o crescente número de procedimentos invasivos, principalmente pela utilização de cateteres, ventilação mecânica e diálises (MUDIM et al., 2003).

Outros estudos epidemiológicos na Europa e Oceania mostraram que a taxa de mortalidade hospitalar em pacientes com infecções graves variou de 27% a 55%. No México, outro estudo transversal em 254 UTI's demonstrou que 58% dos pacientes estavam infectados e dentre estes 22% faleceram (ENGEL C. et al., 2007; PONCE DE LEON-ROSALES et al.,2000).

O Brasil possui uma população extremamente heterogênea em relação às realidades regionais, incluindo diferentes condições de acesso aos serviços de saúde (Lisboa et al, 2007). Agregado a este fato, está o surgimento de novas doenças ou de novas formas de manifestação das doenças na população, aumento na severidade pelo aparecimento de novas linhagens de bactérias patogênicas resistentes aos antimicrobianos, assim como à persistência de problemas como a desnutrição e doenças endêmicas.

A resistência dos microrganismos emergiu como um problema mundialmente importante fazendo com que muitas classes de antimicrobianos tenham se tornado menos efetivas nos últimos anos. Algumas vezes, parte dessa problemática está relacionada ao uso intensivo ou inadequado desses compostos, ocasionando a seleção de patógenos resistentes. Pacientes infectados por bactérias resistentes necessitam de maior tempo de internação, apresentam risco aumentado de mortalidade e utilizam antimicrobianos mais potentes, que normalmente são mais caros e/ou mais tóxicos. Esses fatores têm motivado a busca por antimicrobianos cada vez mais potentes e estáveis aos mecanismos de resistência bacteriana. Muitas vezes, modificações

estruturais são realizadas nas moléculas de antimicrobianos já utilizados na prática clínica para que esse objetivo seja alcançado (CAIERÃO et al., 2004).

Outro fator importante são os tratamentos com imunossupressores e a disseminação do vírus HIV (Human Immunodeficiency Virus), que fizeram com que as doenças causadas por deficiências nos sistemas imunitários dos seres humanos tornem-se mais prevalentes. Associado a estes problemas há uma predisposição maior para o ataque de processos infecciosos (HOSTETTMANN, 1994).

As infecções fúngicas comumente observadas no hospedeiro imunocomprometido incluem a candidíase oral, infecção fúngica oportunista causada por leveduras do gênero *Candida*, principalmente *C. albicans*; criptococose, causada pela levedura *Cryptococcus neoformans* e aspergilose causada pelos fungos do gênero *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. fumigatus* e *A. niger*). Atualmente, existem poucos antifúngicos disponíveis eficazes para o tratamento de micoses sistêmicas, por isso é importante encontrar novas fontes de antifúngicos (HOSTETTMANN, 1994).

As dermatofitoses, infecções micóticas mais comuns e difundidas em todo o mundo, representam um problema de saúde pública ainda não resolvido. São prevalentes em países tropicais e subtropicais em desenvolvimento por causa das condições de umidade e temperatura. Os gêneros *Trichophyton* sp, *Epidermophyton* sp e *Microsporum* sp são os principais dermatófitos que têm a capacidade de invadir tecidos queratinizados, tais como folículos da pele, de unhas e cabelos para causar infecções em humanos. Pode ser causada particularmente pelo *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, e *Trichophyton rubrum*. A incidência de dermatofitoses tem sido severa nos últimos anos por causa do aumento do número de imunocomprometidos. Modernas drogas antifúngicas têm eficácia limitada e podem causar consideráveis efeitos adversos como distúrbios gastrintestinais, reações cutâneas, hepatotoxicidade e

leucopenia em alguns pacientes tratados. Muitos agentes antifúngicos foram desenvolvidos nas últimas décadas e tornaram-se disponíveis para o tratamento da dermatofitose. No entanto, eles estão confinados relativamente a poucos grupos químicos. Além disso, a ocorrência de resistência ou efeitos colaterais em isolados clínicos leva ao fracasso no tratamento de micoses. Assim, antifúngicos eficazes são necessários e importantes para o extermínio das cepas suscetíveis e resistentes (PARK et al., 2011, PRASAD et al., 2009).

Apesar da existência de potentes agentes antifúngicos, a alta prevalência de infecções fúngicas em seres humanos aumentou o interesse no desenvolvimento de novos antifúngicos que possuam mecanismos de ação diferentes em relação aos já existentes. Medicamentos usados para o tratamento de criptococose e dermatofitoses, como a griseofulvina, anfotericina B e derivados azólicos podem ser tóxicos e apresentarem capacidade limitada para curar a infecção completamente. O busca pelo desenvolvimento de antifúngicos mais eficazes e menos tóxicos para o tratamento dessas micoses se faz necessário e é uma consequência das limitações terapêuticas das drogas existentes, do desenvolvimento de resistência dos fungos, da toxicidade dos fármacos, das significativas interações das drogas ou biodisponibilidade insuficiente das drogas antifúngicas mais comumente utilizadas (SILVA et al.,2009; SOUZA et al., 2009).

Infecções fúngicas e bacterianas invasivas são as principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes seriamente debilitados e imunocomprometidos. Quase todo o fungo tem potencial para causar infecções invasivas, mas os mais importantes patógenos em termos de incidência e de mortalidade são *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. respectivamente (KOLTIN & HITCHCOCK, 1997).

As leveduras do gênero *Candida* spp. são a quarta causa mais comum de infecção nosocomial e representam 8 a 11% de todas as infecções. Os fatores de risco predisponentes a candidíase invasiva são o uso de cânulas intravasculares, cateteres, procedimentos cirúrgicos, o uso prolongado de antibióticos de amplo espectro e o imunocomprometimento (por exemplo, transplantados e pacientes com câncer ou SIDA) (KOLTIN & HITCHCOCK, 1997).

2.2 Terapêutica Antimicrobiana

O estudo de agentes antimicrobianos têm grande abrangência, sendo ponto crucial em vários setores do campo farmacêutico e cosmético. Outro ponto a ser ressaltado é a utilização desse estudo como primeiro *screening* na descoberta da atividade farmacológica de novos agentes, sendo de extrema importância, principalmente em um país como o Brasil que oferece uma imensa biodiversidade. Desta forma, tais pesquisas podem contribuir significativamente no desenvolvimento do campo da saúde em nível mundial, encontrando substâncias mais eficazes e menos tóxicas na corrida contra a resistência e o surgimento de microrganismos patogênicos (OSTROSKY et al., 2008).

Os primeiros relatos do uso de antibióticos pelo homem são muito antigos, como a descrição do uso de sapatos mofados por chineses para curar feridas infeccionadas nos pés (3000 anos a.C.), porém, o primeiro metabólito fúngico de notória eficácia foi, sem dúvida, a penicilina, substância produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum*, cuja capacidade de inibir o crescimento bacteriano foi descoberta acidentalmente por Fleming, em 1928. Seu emprego em larga escala no início da década de 40, fruto dos esforços dos pesquisadores ingleses Forey e Chain,

levou à redução do índice de mortandade de soldados de 39% durante a Primeira Guerra Mundial para 3,9%, na Segunda Guerra. O grande impacto do uso da penicilina motivou sua produção industrial, sendo este o primeiro medicamento produzido em grande escala, originando, portanto, a indústria farmacêutica (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

Durante muitos séculos a literatura médica registrou descrições dos efeitos benéficos resultantes da aplicação em certas infecções, de terra e várias plantas muitas das quais eram provavelmente fontes de fungos e bactérias produtoras de antibióticos (GILMAN; GOODMAN, 2006). O bolor do pão também era utilizado para o tratamento de ferimentos pelos antigos egípcios, porém, ainda não existia nenhum conhecimento sobre o que estes fungos continham (BLACK, 2002).

Somente após a descoberta da estreptomicina, feita por Waxman (1944) a partir de bactérias do gênero *Streptomyces*, ocorreu a introdução do termo antibiótico como sendo uma substância química produzida por bactérias ou fungos, com capacidade de inibir o crescimento ou de destruir bactérias. A quimioterapia antimicrobiana teve seu marco com a descoberta das sulfas, apesar da sua limitada utilização. Após estas descobertas, outros agentes antibacterianos como os aminoglicosídeos, cefalosporinas, foram isolados e desenvolvidos (BLACK, 2002).

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (GUIMARÃES et al., 2010).

Abaixo na tabela 1 está o histórico da descoberta dos principais antibióticos disponíveis no mercado:

Tabela1. Origem das classes de fármacos antibacterianos disponíveis no mercado

Descoberta	Antibacteriano	Classe
1929	Penicilina G	β -lactâmico
1932	Sufapiridina	Sulfonamida
1944	Estreptomicina	Aminoglicosídeo
1945	Cefalosporina	β -lactâmico
1947	Cloranfenicol	Fenilpropanóide
1948	Cloritetraciclina	Tetraciclina
1950	Eritromicina	Macrolídeo
1955	Vancomicina	Glicopeptídeo
1955	Virginamicina	Streptogramina
1955	Anfotericina	Polieno
1955	Lincomicina	Licosamida
1959	Rifamicina	Ansamicina
1962	Ácido nalidixico	Quinolona
1969	Fosfomicina	Fosfonato
2000	Linezolideo	Oxazolidinona
2003	Daptomicina	Lipopeptídeo

Fonte: TAKAHASHI; LUCAS,2008.

A partir de 2000, como mostra na tabela 1, poucos antibióticos foram introduzidos para a terapêutica antimicrobiana. Em 2001, apenas um antibiótico de origem sintética da classe das oxazolidinonas foi introduzido no mercado farmacêutico, a linezolida. Os programas de descoberta de antibióticos de fontes naturais têm sido retomados em algumas indústrias farmacêuticas, levando à aprovação do lipodepsipeptídeo natural daptomicina pelo FDA em 2003. O derivado semi-sintético glicopeptídico dalbavancina encontra-se em fase III de triagens clínicas pelo FDA.(TAKAHASHI; LUCAS,2008)

Mesmo com a descoberta de vários fármacos ao longo desses anos, uma preocupação era notada: a utilização indiscriminada e prolongada de antimicrobianos sem prescrição médica. Este fato, dentre outros, trouxe como consequência a seleção de microrganismos patogênicos mutantes resistentes a diversos antibióticos e quimioterápicos (CRISAN et al., 1995). Com isso, surgiu um novo problema: o da

resistência microbiana, e para agravar a situação a descoberta de antimicrobianos caiu vertiginosamente e a perspectiva da aplicação de drogas antimicrobianas no futuro virou incerta. Portanto, estudos são realizados para que seja possível reduzir este problema, como por exemplo, ressaltar a importância de controlar o emprego indiscriminado de antibióticos, desenvolver pesquisas para melhor compreensão dos mecanismos genéticos de resistência e continuar o estudo de desenvolvimento de novas drogas tanto sintéticas como naturais (BREIMAN et al., 1994; STRAUSBAUGH et al., 1996; NASCIMENTO et al., 2000).

Uma grande quantidade de fármacos é obtida através da síntese orgânica e utilizada no tratamento de infecções micóticas. Os antisépticos como tintura de iodo, violeta de genciana, ácido salicílico e benzóico, derivados sulfamídicos, corantes, quinonas, antifúngicos poliênicos (nistatina, anfotericina) são amplamente utilizados na terapia antimicótica. Ainda, faz-se uso dos chamados antifúngicos modernos, a citar os azóis (cetoconazol, econozal, sulconazol, miconazol, clotrimazol, fluconazol), alilaminas (naftina, terbinafina), hidroxipiridona, morfolina, compostos de selenium e anfotericina B lipossomal. Com frequência, as infecções fúngicas são de difícil tratamento, fato intrinsecamente relacionado à aquisição de resistência frente à ação de antifúngicos por parte de seus agentes etiológicos (LIMA et al., 2006)

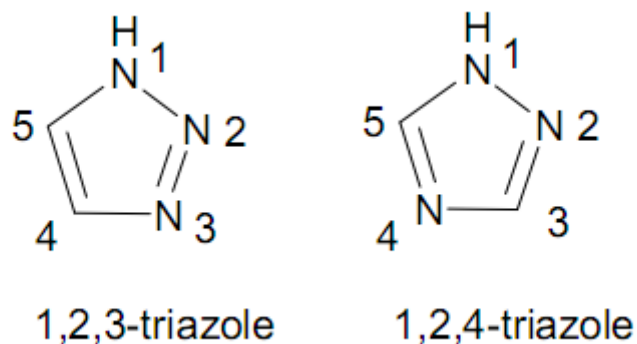
Em contraste com o grande número de antibióticos antibacterianos, há muito poucos agentes antifúngicos que podem ser prescritos para infecções fúngicas onde há risco de morte. A anfotericina B lipossomal e os triazóis de primeira geração, fluconazol e itraconazol, representam um importante avanço no tratamento de infecções fúngicas graves (KOLTIN & HITCHCOCK, 1997).

2.3 Compostos Triazólicos

Compostos triazólicos referem-se a qualquer um de um par de isômeros químicos

com fórmula molecular $C_2H_3N_3$, tendo um anel de cinco membros que contém dois átomos de carbono e três átomos de nitrogênio (SIDDIQUI et al.,2011).

Os dois isômeros triazólicos são:



Os compostos triazólicos são um dos sistemas heterocíclicos mais estudados atualmente e têm despertado muito interesse pelo fato de possuírem um vasto campo de aplicações, que vão desde usos como explosivos, até como agroquímicos e fármacos. Até o ano de 2003 foram publicados mais de 10.500 artigos sobre a química dos triazóis, sendo que destes 4.200 (40%) versavam sobre síntese e mais de 2.400 (22,8%) sobre atividade biológica. Desde o começo do século XX e até o fim da 2ª Guerra Mundial não havia grande interesse quanto ao estudo desta classe de heterocíclicos, que veio a surgir após a descoberta, no início da década de 50, diversas de suas aplicações, resultando na evolução dos estudos referentes aos diversos sistemas triazólicos, condensados ou não. Todos os triazóis são de origem sintética e não há indicações, até o momento, de que estes heterocíclicos possam ser encontrados na natureza (MELO et al., 2006).

O anel triazólico é um potente farmacóforo, é a fração heterocíclica biodinâmica que tem ganhado interesse nos últimos anos. Vários derivados já mostraram importantes atividades biológicas e alguns foram relatados por serem

eficazes no tratamento de várias infecções (AUFORT et al., 2008; SIDDIQUI et al.,2011).

Os compostos triazólicos e seus derivados têm atraído químicos por causa de suas variadas atividades biológicas, tais aplicações encontram-se no desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de alergia, hipertensão arterial, a inflamação, esquizofrenia, antibacterianos, nas infecções por HIV, hipnóticos e mais recentemente, para o tratamento da dor, como receptor de fibrinogênio antagonistas com atividade antitrombótica (VIJESH, 2010). Vários derivados triazóis também são relatados por mostrar atividade antibacteriana, antifúngica, anticonvulsivante e anti-inflamatória (SIDDIQUI et al.,2011).

Exemplos de compostos triazólicos como medicamentos antifúngicos incluem fluconazol, isavuconazol, itraconazol, voriconazol, pramiconazol e posaconazol. Os fungicidas incluem o epoxiconazole, triadimenol, propiconazole, metconazol, ciproconazol, tebuconazole, flusilazol e paclobutrazol (SIDDIQUI, 2011).

Os novos triazólicos, fluconazol e itraconazol, de administração oral ou intravenosa, são comumente utilizados no tratamento das micoses. Esses fármacos são utilizados na profilaxia de pacientes com risco de desenvolverem infecções fúngicas, pois são menos tóxicos do que os poliênicos. A anfotericina B, uma droga poliênica, tem sido considerada o padrão "ouro" para o tratamento de infecções fúngicas, mas sua toxicidade limita seu uso. Com a introdução dos antifúngicos azólicos, especialmente o fluconazol e itraconazol, que possuem boa biodisponibilidade via oral e baixa incidência de efeitos adversos, uma nova era no tratamento das infecções fúngicas se iniciou. Seu espectro de ação inclui leveduras e fungos dimórficos. O itraconazol pode ser utilizado, também, no tratamento das dermatofitoses e aspergilose. O fluconazol, azol com maior penetração no sistema nervoso central, mostra-se efetivo também em outras situações

clínicas tais como: na candidíase oral e esofagiana de pacientes com SIDA, infecções na medula óssea e em pacientes transplantados renais. Nos pacientes com SIDA, apesar do sucesso na terapêutica ser alta, pode ocorrer falha quando o uso desse antifúngico for por longos períodos (ZARDO & MEZZAR, 2004; KOLTIN & HITCHCOCK, 1997).

O principal mecanismo de ação dos azólicos é a inibição da biossíntese do ergosterol, que é importante para a integridade e a manutenção da função da membrana celular dos fungos. Os imidazóis inibem a incorporação do acetato de ergosterol, inibindo a lanosterol desmetilase, por interferência no citocromo P-450 da levedura, trazendo como consequência alterações na fluidez e permeabilidade da membrana citoplasmática do fungo, prejudicando a captação dos nutrientes, o que se traduz por inibição do crescimento fúngico, originando alterações morfológicas que resultam em necrose celular (RICHARDSON & WARNOCK, 1993; ALVES *et al.*, 1999). A metabolização dos azóis é principalmente por via hepática, sendo os efeitos colaterais mais comuns náuseas e vômitos quando utilizados por via sistêmica, além de eritema, ardência, descamação, edema, prurido, urticária e formação de vesículas no uso tópico (SANDE & MANDELL, 1987; ARENAS, 1993).

A primeira geração de antifúngico triazólicos, fluconazol e itraconazol, revolucionaram o tratamento de doenças graves causadas por infecções fúngicas, como candidíase mucosa, invasiva e meningite criptocócica. No entanto, o tratamento de algumas infecções fúngicas, especialmente aspergilose, ainda está longe de satisfatória e, portanto, há um requisito importante para antifúngico de largo espectro (KOLTIN & HITCHCOCK, 1997).

2.4 Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos

Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos compostos antimicrobianos. Os mais conhecidos são o método de difusão em ágar e método de diluição em caldo, que engloba a macrodiluição e microdiluição. Para determinar a CIM, ou seja, a Concentração Inibitória Mínima de amostras a serem testadas, utiliza-se um método sensível de microdiluição em placa desenvolvido por Eloff em 1998 (OSTROSKY et al., 2008).

Os métodos de diluição em caldo são igualmente aceitáveis para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano. Para realizar o teste, preparam-se vários tubos de ensaio ou placas com meio caldo, aos quais são acrescentadas diversas concentrações dos agentes antimicrobianos. A seguir, os tubos ou as placas são inoculados com uma suspensão padrão do microrganismo a ser testado. Após incubação de um dia para outro, a 35° C, examinam-se os testes e determina-se a concentração inibitória mínima (CIM). O resultado final é influenciado, de maneira significativa, pela metodologia, que deve ser cuidadosamente controlada para se obter resultados reprodutíveis intra e interlaboratório (NCCLS, 2002 b).

Diversas modificações já foram realizadas nas metodologias para avaliar a atividade antimicrobiana a fim de se obter resultados mais confiáveis, uma vez que alguns fatores, tais como composição do meio de cultura, microrganismos testados, método de extração, pH e solubilidade das amostras no meio de cultura, podem alterar os resultados, sendo difícil, portanto, padronizar um procedimento. Para um resultado confiável, é preciso trabalhar com uma metodologia padronizada. O CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute*, é o órgão internacional que padroniza e controla a realização dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos (ALVES et al, 2008).

2.4.1 Métodos de Difusão

O teste de difusão em ágar, também chamado de difusão em placas, é um método físico, no qual um microrganismo é exposto a uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo com a concentração da substância avaliada (PINTO et al., 2003). O método de difusão em ágar pode ser realizado através das técnicas do disco, do poço ou *template* (OSTROSKY et al, 2008).

Quando se utiliza o método de difusão vários fatores podem se tornar fontes de erros, tais como composição do meio de cultura, preparação incorreta do meio de cultura, espessura do meio de cultura, densidade do inóculo incorreta, uso de *swab* com excesso da suspensão para inoculação das placas, temperatura e tempo de incubação inadequados, interações entre o antimicrobiano e o meio de cultura, utilização errada da atmosfera de CO₂ quando necessária leitura prematura, erro na medida das zonas de inibição ou uso de culturas mistas ou contaminadas (ALVES et al.,2008).

O método de difusão em ágar geralmente é utilizado para microrganismos de crescimento rápido e para alguns de crescimento fastidiosos. Para um resultado confiável, é preciso trabalhar com uma metodologia padronizada. O método padronizado que é atualmente recomendado pelo NCCLS (atualmente CLSI) se baseia no originalmente descrito por Bauer e colaboradores. (ALVES et al.,2008).

2.4.2 Método de Diluição em Caldo

O método de diluição em caldo considera a relação entre o crescimento do microrganismo (densidade da turbidez provocada pelo crescimento microbiano) exposto

ao meio líquido e a concentração da substância ensaiada. A avaliação do crescimento microbiano é comparada frente a um padrão de crescimento de uma cepa de referência da espécie inoculada somente no meio líquido, na ausência de agentes antimicrobianos (PINTO et al., 2003).

Atualmente, o método de diluição é usado para determinar a concentração mínima de um agente necessária para inibir ou eliminar um microrganismo. Os agentes antimicrobianos são geralmente testados em diluições consecutivas, e a menor concentração capaz de inibir o crescimento de um organismo é considerada como a Concentração Inibitória Mínima (CIM). As CIM's são consideradas excelentes ferramentas para determinar a susceptibilidade dos organismos aos antimicrobianos e, portanto, usadas para julgar a performance das demais metodologias. Nos laboratórios, as CIM's são também usadas como uma ferramenta de pesquisa para determinar a atividade *in vitro* de novos antimicrobianos (ALVES et al., 2008).

A macrodiluição é o tipo de método de diluição em caldo que envolve testes em tubos de ensaio, com volume de meio de cultura variando de 1 e 10 mL. Por ser laborioso, consome muito tempo, requer muito espaço no laboratório e gera grande quantidade de resíduos.

A técnica de microdiluição em caldo é uma adaptação da macrodiluição em caldo. É assim denominada, porque envolve o uso de pequenos volumes de caldo colocados em placas de 80, 96 ou mais poços de fundo redondo ou cônico estéreis, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 mL (ALVES et al, 2008). Eloff (1998) utilizou a técnica de microdiluição para verificar a atividade antimicrobiana em extratos vegetais e observou inconvenientes na técnica, tais como células de alguns microrganismos que se aderiam à base do poço, enquanto as de outros permaneciam em suspensão. Todavia, concluiu que o método de microplacas é barato, tem

reprodutibilidade, é 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura, requerem pequena quantidade de amostra e pode ser usado para grande número de amostras (ALVES et al., 2008).

2.5 Testes de Citotoxicidade

A cultura de células humanas *in vitro* forneceu perspectivas importantes na biologia celular, nos processos de doença e em potenciais terapias. O advento da cultura de células embrionárias humanas abriu uma geração nova de possibilidades que incluem seu potencial para a aplicação à medicina regenerativa humana (KEIRA et al., 2004).

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (*International Standard Organization*), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos e depois de comprovada a sua não toxicidade é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório. O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com auxílio de corantes vitais como Alamar blue (ROGERO et al., 2003).

O Alamar Blue é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Em células em proliferação o Alamar Blue é reduzido. A forma oxidada é azul e não fluorescente (indicando célula não viável) e a forma reduzida é rósea e fluorescente (indicando célula viável). Portanto é possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas, pela medida de intensidade de cor da cultura celular (AHMED, GOGAL, WALSH, 1994).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve o objetivo de verificar a atividade antimicrobiana e citotóxica de novos compostos triazólicos.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Avaliar o potencial antifúngico dos compostos triazólicos sintéticos nas leveduras de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida kefyr*, *Candida krusei* e nos fungos filamentosos *Microsporium canis*, *Trichophyton rubrum* e no *Aspergillus niger*;

3.2.2 Avaliar o potencial antibacteriano de compostos triazólicos sintéticos nas bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*;

3.2.3 Determinar a concentração inibitória mínima dos compostos triazólicos frente às cepas fúngicas e bacterianas mencionadas acima;

3.2.4 Avaliar o potencial hemolítico em hemácias de camundongos dos compostos triazólicos que apresentem atividade antimicrobiana frente aos microrganismos avaliados;

3.2.5 Determinar a citotoxicidade em fibroblastos NIH3T3 dos compostos triazólicos que apresentem atividade antimicrobiana frente aos microrganismos avaliados;

3.2.6 Avaliar a interferência dos compostos triazólicos, que apresentam atividade antimicrobiana frente aos microrganismos avaliados, na atividade da protrombina através do teste de coagulação.

4.MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Modelo de Estudo

Tratou-se de um estudo experimental do potencial antimicrobiano e citotóxico de novos compostos triazólicos no qual foi verificada a atividade antimicrobiana *in vitro* através da técnica de microdiluição em caldo, a avaliação da atividade hemolítica e de coagulação sanguínea em sangue humano e o teste de citotoxicidade em fibroblastos.

4.2 Compostos Triazólicos

Foram avaliados 90 novos compostos triazólicos cedidos gentilmente pelo professor Dr. Vitor Francisco Ferreira do Departamento de Química Orgânica, da Universidade Federal Fluminense. O monitoramento das reações foi realizado através da Cromatografia em Camada Fina (CCF), em cromatofolhas de silicagel 60F-254, com 0,2 mm de espessura de camada (REF 5554 Merck). Os eluentes foram preparados volume a volume (v/v) e a visualização das substâncias efetuada por revelação com reagente sulfato de amônio e vanilina etanólica 3% em ácido sulfúrico. Para purificação de substâncias por cromatografia em coluna foi utilizada sílica flash (0,035-0,070 mm, Acros Organics). A determinação estrutural das substâncias sintetizadas foi realizada através dos métodos instrumentais de espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C , espectroscopia na região do Infravermelho (IV) e análise elementar CHN. Segue abaixo a fórmula molecular dos compostos estudados:

Tabela2. Fórmula molecular e código dos compostos triazólicos testados no projeto.

Nº	Código da Substância	Fórmula Molecular
01	PM01	C9H8CIN3O
02	PM02	C9H7CL2N3O
03	PM03	C11H10CIN3O2
04	PM04	C11H9CL2N3O2
05	PM06	C9H9N3O
06	PM10	C9H6CIN3O
07	PM13	C10H8CIN3
08	PM23	C9H7CL2N3O
09	PM25	C10H11N3O
10	PM27	C10H7CL2N3O
11	PM31	C10H7CL2N3
12	PM32	C11H11N3O
13	PM33	C9H5CL2N3O
14	PM35	C10H7CL2N3
15	PM41	C9H8CIN3O
16	PM42	C9H8N4O3
17	PM43	C9H6N4O3
18	PM44	C10H9N3O2
19	PM45	C11H11N3O
20	PM46	C10H8N4O2
21	PM55	C9H6CIN3O
22	PM56	C10H9N3O
23	PM57	C9H6FN3O
24	LMF01	C ₁₀ H ₉ N ₃ O
25	LMF03	C11H13CL2N ₃ O
26	LMF04	C9H7N3O
27	LMF 05	C10H10N3O
28	LMF06	C9H10N3O2
29	LMF07	C14H15CLN3O
30	LMF08	C9H7CLN3O
31	LMF09	C10H9N3O2
32	LMF10	C9H7CLN3O
33	LMF11	C10H12N3O2
34	LMF12	C10H8F3CLN3O
35	LMF13	C9H10N3O2
36	T ₂ ANISOL	C10H9F3N3O2
37	A-CANSS	C9H9FN3O
38	T-HEPTINO	C9H9N3O
39	T-ÁLCOOL	C9H9CLN3
40	A-CANPCL	C11H13CLN3O
41	T-HEXINO	C11H14N3O
42	TRZ20	C11H13CLN3O
43	TRZ21	C12H16N3O
44	TRZ22	C11H13CLN3O
45	BRU11	C11H11N3O3
46	BRU28	C9H9N3O2
47	BRU30	C15H11N7O3
48	BRU31	C16H11N7O
49	BRU38	C16H12CLON7O
50	RC04	C10H8N4O2
51	BRU88	C10H11N3O
52	BRU76	C9H8CLN3O
53	MA1	C11H13N3O

54	MA2	C12H15N3O
55	KF11	C9H7N3O
56	KF10b	C10H9N3O
57	BRU92	C10H9N3O2
58	BRU95	C9H6CLN3O
59	BRU96	C10H9N3O
60	MA5	C10H6N4O
61	BRU29	C17H16N6O3
62	BRU97	C9H6FN3O
63	IM01	C12H11F2N3O
64	IM02	C12H12CLN3O
65	IM03	C13H15N3O
66	IM04	C13H15N3O2
67	PTRF19	C10H9N3O
68	PTRF15	C9H6N4O3
69	PTRF31	C11H11N3O3
70	HBnNHTRI	C19H20N4O2
71	N-CL,CL-TRIAZOL	C12H12CL2N4O2
72	N-BR-TRIAZOL	C12H13BRN4O2
73	N-H-TRIAZOL	C12H14N4
74	N-CL-TRIAZOL	C12H13CLN4O2
75	N-F-TRIAZOL	C12H13FN4O2
76	HIDRA-N-CL,CL	C10H10CL2N6O
77	HIDRA-N-BR	C10H11BRN6O
78	HIDRA-N-CL	C10H11CLN6O
79	HIDRA-N-F	C10H11FN6O
80	N-H-TRI-OH	C10H12N4O
81	N-H-TRI-CHO	C10H10N4O
82	PTRF20	C10H9F2N3
83	PTRF12	C9H6CLF2N3
84	PTRF33	C10H9F2N3O
85	TR01	C11H11CL2N3O
86	MRFA	C17H21N3O4
87	MREFP	C18H23N3O5
88	TR05	C11H12CLN3O
89	PM24	C9H5CL2N3O
90	LMF03	C13H15N3O

4.3 Delineamento Experimental

Primeiramente, esses compostos foram triados, para selecionar os compostos com atividade antimicrobiana, através dos testes de sensibilidade antifúngica e antibacteriana pela técnica de microdiluição em caldo para as espécies de *C. albicans*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Após essa etapa, apenas os compostos pré-selecionados, ou seja, que apresentaram concentração inibitória mínima menor ou igual à 0,5 mmol/L, foram analisados para os testes de citotoxicidade (viabilidade celular), coagulação

sanguínea, potencial hemolítico e uma avaliação quantitativa da atividade antimicrobiana por meio da técnica de microdiluição em caldo para as espécies *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *M. canis*, *A. niger* e *T. rubrum* e para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (a mais baixa concentração de um agente antimicrobiano que inibe o crescimento visível de um microrganismo em meio a uma diluição feita em meio líquido) dos compostos selecionados. Abaixo segue um fluxograma de trabalho:

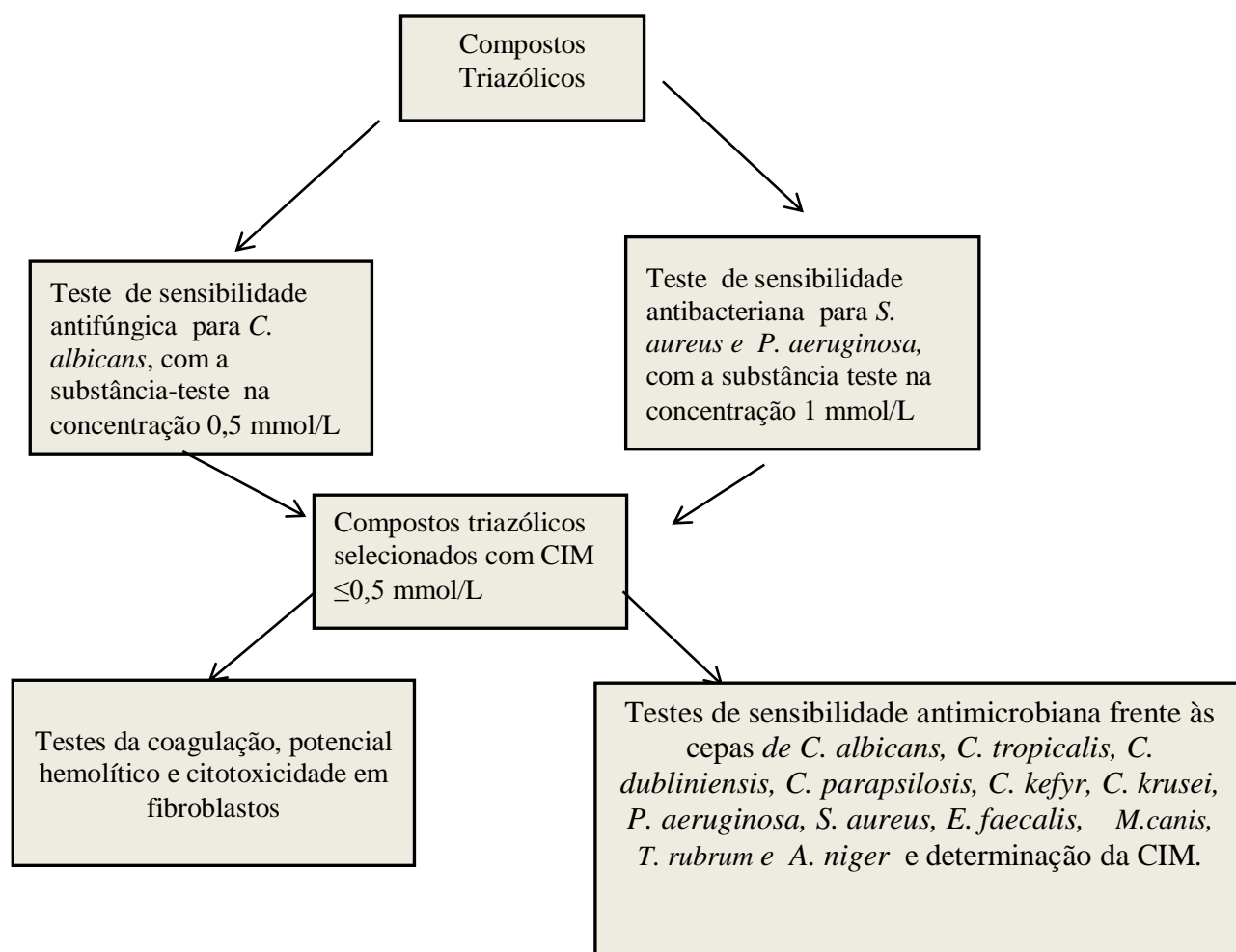


Figura 1- Fluxograma das atividades laboratoriais do projeto.

4.4 Avaliação da Atividade Antifúngica

A avaliação da atividade antifúngica dos compostos foi verificada através da metodologia proposta pelo Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI, EUA. Para os testes com fungos leveduriformes seguiu-se a norma M27-A2: Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica (Norma Aprovada) (CLSI, 2002b) e para os testes com fungos filamentosos a norma M38-A: Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos (CLSI, 2002 a).

4.4.1 Cepas Fúngicas

As cepas leveduriformes (*C. albicans* NFVS9, *C. krusei* LGM38, *C. parapsilosis* SML35-2, *C. kefyr* NAV70-3, *C. tropicalis* ORSO5P-2, *C. dubliniensis*) utilizadas nos testes foram cedidas pela FioCruz – Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane/ AM, através da pesquisadora da instituição Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura. Estas cepas foram identificadas por testes bioquímicos, por meio do kit de identificação Candifast® (International Microbio), por teste morfológico, em ágar fubá com Tween 80 (microcultivo) e por biologia molecular, utilizando o Kit de Biologia Molecular que está em processo de patenteamento, desenvolvido pelo grupo coordenado pela Dra. Adriana Sotero Martins da FIOCRUZ. Já as cepas filamentosas (*M. canis*, *A. niger*, *T. rubrum*) foram cedidas pelo INPA, através do pesquisador Dr. João Vincente Braga de Souza do Laboratório de Micologia Médica.

4.4.2 Inóculo dos Fungos Leveduriformes

Para o preparo do inóculo foram utilizadas as cepas já citadas. Os fungos foram repicados em tubos estéreis com ágar Sabouraud dextrose, executando passagens para assegurar sua pureza e viabilidade. A temperatura de incubação foi de 35° C por 48 horas. Após a incubação, a suspensão inicial do inóculo foi preparada em água destilada equivalente à escala 0,5 de McFarland. Em seguida foi ajustada através da contagem de células em câmara de Neubauer (Brand, Alemanha), para obtenção de um inóculo de concentração igual $1-5 \times 10^6$ UFC/mL. Após essa etapa, a suspensão inicial de cada microorganismo foi diluída 1:1000 em RPMI-1640 para obtenção de uma suspensão-trabalho com o dobro da concentração final desejada.

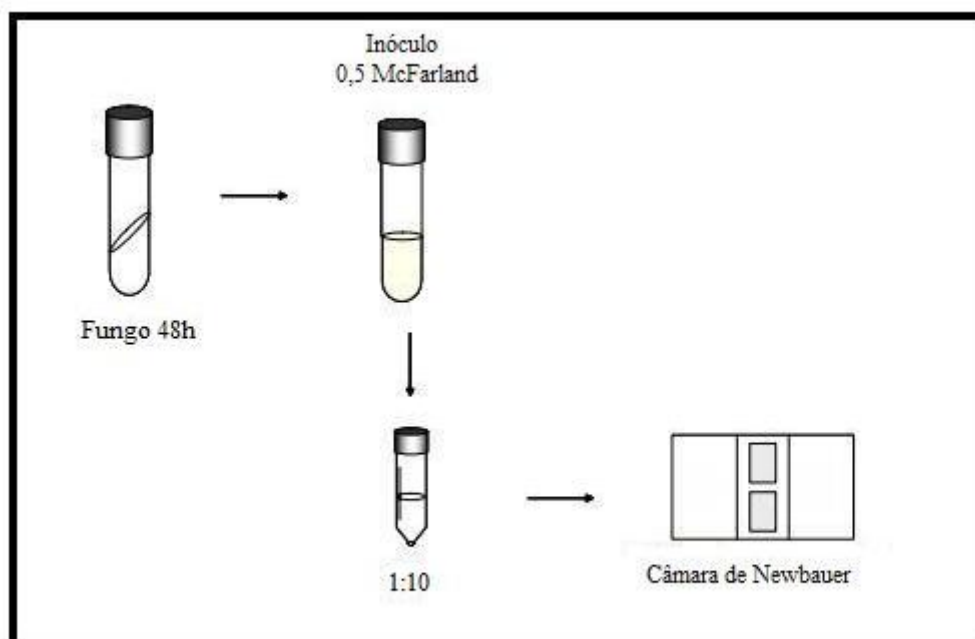


Figura 2- Preparo do inóculo fúngico.

4.4.3 Inóculo dos Fungos Filamentosos

Para induzir a formação de conídios, os fungos filamentosos foram cultivados em ágar batata dextrose durante sete dias a 35°C. Após a incubação, a suspensão inicial do inóculo foi preparada em água destilada e a suspensão adicionada em RPMI 1640 tamponado com MOPS de modo a obter concentração igual à $1-3 \times 10^3$ conídios/ ml⁻¹ (GHANNOUM, 2009).

4.4.4 Preparo da Solução Padrão Antifúngica

As soluções-padrão de antifúngicos foram preparadas em concentrações de, pelo menos, 1280 µg/mL ou dez vezes a concentração mais alta a ser testada, sendo sempre a maior das duas. Para os fungos leveduriformes foi utilizado o itraconazol como solução-padrão e para os fungos filamentosos foi utilizada a anfotericina B (Cristália).

4.5. Avaliação da Atividade Antibacteriana

Os testes de atividade antibacteriana foram realizados segundo a metodologia proposta pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI, EUA. Para os testes com bactérias de crescimento aeróbico seguiu-se a norma M7-A6: Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada - Sexta Edição (Norma Aprovada) (CLSI, 2002).

4.5.1 Cepas Bacterianas

As cepas bacterianas (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis*) utilizadas nos testes foram cedidas pela FioCruz – Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane/ AM, através da pesquisadora da instituição Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi Nogueira. Estas cepas foram identificadas por testes bioquímicos, por teste morfológico e por biologia molecular.

4.5.2 Inóculo Bacteriano

As bactérias foram repicadas em tubos estéreis com ágar Sangue, executando passagens para assegurar sua pureza e viabilidade. A temperatura de incubação foi de 35° C por 24 horas. Após a incubação, a suspensão inicial do inóculo foi preparada em água destilada e inóculo equivalente à escala 0,5 de McFarland. Em seguida foi ajustada através da contagem de células em câmara de Neubauer (Brand, Alemanha), para obtenção de um inóculo de concentração final de bactérias de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL (ou 5×10^4 UFC/poço).

4.6 Técnica de Microdiluição em Caldo

O teste de microdiluição foi realizado em placas de microdiluição estéreis, com 96 poços em formato de U. As concentrações duas vezes concentrada da droga foram dispensadas nos poços das fileiras 2 a 6 e 7 a 11 das placas de microdiluição, em volumes de 100µL, com uma pipeta multicanal. A fileira 2 ou 7 continham maior concentração da droga e a fileira 6 ou 11 a menor concentração da droga.

Cada poço da placa de microdiluição foi inoculado, com 100 µL da correspondente suspensão concentrada do inóculo. Os poços controle de crescimento

continham 100 μL de meio estéril, isento de droga, mais 100 μL das suspensões concentradas dos inóculos. A fileira 12 da placa de microdiluição foi usada para efetuar o controle da esterilidade com apenas 200 μL meio, sem conter drogas. Em seguida, as placas de microdiluição foram incubadas a 35° C por 24-48 horas.

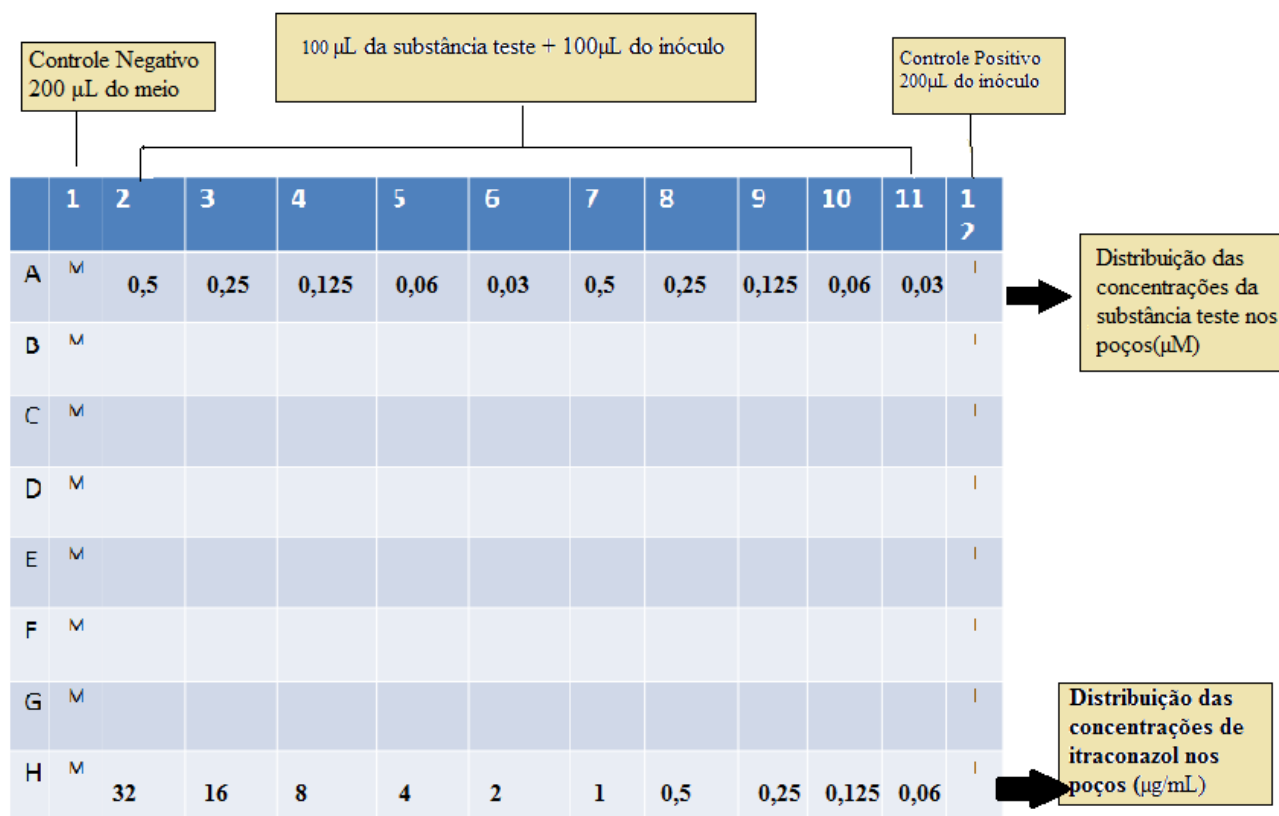


Figura 3- Esquema ilustrativo do teste de diluição em microplaca

4.7 Determinação dos Pontos Finais da CIM

Para os ensaios com azólicos, a menor concentração capaz de induzir inibição em torno de 90% do crescimento verificado no microrganismo avaliado, em relação ao poço controle, foi identificada como concentração inibitória mínima- CIM da droga para este microrganismo.

4.8 Teste Hemólise

O teste foi realizado segundo a metodologia descrita em Huang et al., 2001. Foi utilizado sangue de camundongo saudáveis, coletado em tubos com anticoagulante tampa azul (9 partes de sangue: 1 parte de citrato de sódio 3,8%) e os glóbulos vermelhos (hemácias) foram separados por centrifugação a 2500 rpm por 10 min. As células foram então lavadas uma vez com 2 volumes de solução de cloreto de sódio a 0,9% e então ressuspensas em solução de cloreto de sódio a 0,9% para dar 1% de suspensão de hemácias. Em seguida 0,25 ml de suspensão de hemácias foi adicionada a igual volume de solução salina 0,9% contendo as substâncias a 1mmol/L e, em seguida, incubados a 37 ° C por 5 min com agitação. O DMSO Foi testado como controle negativo e o triton x como reagente para controle positivo (100% de hemólise. Depois foram centrifugadas a 1100 rpm por 5 min, e coletados 0,2 ml do sobrenadante para se realizar a leitura da absorbância em 550 nm (Eamostra). A porcentagem de hemólise (H%) de cada amostra foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$H\% = A_{amostra} / A_{100} \times 100$$

Onde A100 é a absorbância de 100% de hemólise das células.

4.9 Teste da Coagulação

A avaliação da interferência dos compostos triazólicos na atividade da protrombina foi avaliada em plasma pobre em plaquetas (PPP) pelo método de Brown (1988) modificado por Osoniyi e Onajobi (2003). Foi realizado o teste de tempo de protrombina (TP) utilizando-se coagulômetro (Teco, modelo Coatrom M1, Alemanha) e

o kit comercial TP BIOCLIN (MG, Brasil). O plasma foi obtido a partir de sangue com citrato de sódio centrifugado por 15 min a 1500 rpm. Para o TP, serão adicionados 100 μL de reagente a 50 μL de PPP previamente incubado com 5 μL dos respectivos compostos na concentração de 1 mmol/L. Os valores do teste obtidos a partir da adição dos compostos ao PPP foram comparados com os resultados dos testes com o solvente dimetilsulfóxido (DMSO).

4.10 Ensaios citotóxicos

4.10.1 Ensaio do Alamar Blue

O teste do Alamar Blue foi realizado conforme metodologia descrita por Ahmed e colaboradores (1994) com o intuito de se analisar a viabilidade celular de fibroblastos murinos na presença dos compostos triazólicos. Os fibroblastos foram cultivados em garrafa de cultura com meio DMEM completo. Eles foram contados em câmara de Neubauer e plaqueados em placas de 96 poços, cada poço contendo 1×10^4 células em 200 μL de meio de cultura. As placas foram então incubadas por 24 h em estufa a 37 °C com atmosfera de 5 % de CO_2 . Após este tempo, os fibroblastos foram tratados com as respectivas substâncias na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O grupo controle recebeu no poço a mesma quantidade de DMSO da maior concentração da diluição dos compostos com DMSO. Passadas 48 h do tratamento, dez microlitros da solução de uso de Alamar Blue (solução estoque 0,4 % 1:5 em meio de cultura sem soro fetal bovino) foi adicionada em cada poço da placa. Após 3 h de exposição ao Alamar Blue, retirando da estufa meia hora antes do término, a fluorescência foi medida usando-se um leitor de placas de elisa (marca Beckman e Coulter).

A viabilidade celular foi calculada conforme a fórmula abaixo, onde $\Delta F_t =$ (fluorescência da célula + meio + extrato + resazurina) - (fluorescência da célula + meio

+ extrato) e $\Delta F_c = (\text{fluorescência da célula} + \text{meio} + \text{DMSO} + \text{resazurina}) - (\text{fluorescência da célula} + \text{meio} + \text{DMSO})$.

$$\% \text{ viabilidade} = \Delta F_t / \Delta F_c \times 100$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito, cujo título é “*Evaluation of antifungal activity and cytotoxicity of 1,2,3-triazoles*” que será submetido a revista *Medicinal Chemistry* e está anexado abaixo. Também estão inseridos o item “Discussão” e as “Referências” utilizadas no manuscrito. Os demais resultados que não serão publicados estão em forma de tabelas no item apêndice.

5.1 Manuscrito

Antifungal and cytotoxicity activities of 1,2,3-triazoles .

Iara F. da Silva^a, Priscila R. C. Martins^b, Emanuely G. da Silva,^a Sabrina B. Ferreira^c, Vitor F. Ferreira^c, Karen Regina C. da Costa^a, Marne C. de Vasconcellos^a, Emerson S. Lima^a, Fernando de C. da Silva^{a,*}

ggofernando@vm.uff.br

To be subbimeted at Medicinal Chemistry <http://www.benthamscience.com/mc>

^a*Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, 69010-300, Manaus – AM – Brazil.* ^b*Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Campus do Valonguinho, CEG, 24020-150, Niterói, RJ- Brazil.* ^c*Departamento de Química Orgânica-Macaé, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, RJ- Brazil.*

Abstract

We report herein, the antifungal screening oh twelve 1,2,3-triazoles against *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida kefyr*, *Candida tropicalis* and *Candida dubliniensis*, *Tricophyton rubrum*, *Microporum canis* and *Aspergillus. niger*. All the 1,2,3-triazoles were prepared from 1,3-dipolar cyclization between aryl azides and alkynes catalyzed by Cu(I) and some them showed to be active with low cytotoxicity. The results demonstrated the potential and importance of developing new 1,2,3-triazoles compounds with antifungal activity.

Keywords: 1,2,3- triazoles, antifungal activity, cytotoxicity

Introduction

The 1,2,4- and 1,2,3-triazoles are unique classes of *N*-heterocycles that exert remarkable importance medicinal activities, like many other five-membered heterocyclic compounds. The triazoles have been studied for over a century as an important class of heterocyclic compounds and still continue to attract considerable attention due to the broad range of biological activities. The 1,2,3-triazoles are not natural products, and have showed important biological activity including anti-HIV⁶, β -lactamase inhibition^{7,8}, antitubercular^{8a}, inhibitor of α -glycosidase^{8b}, anti-HSV^{8c} and antiepileptic activities.^{9,10} The 4-aryl-[1,2,3]-triazoles were discovered to be a unique template for the inhibition of the metalloprotease MetAP2.¹¹ In the literature triazoles are described as antiplatelet agents¹², dopamine D2 receptor ligands (related to Schizophrenia¹³) antiinflammatory^{14,15}, antimicrobial agents.¹⁶⁻¹⁸

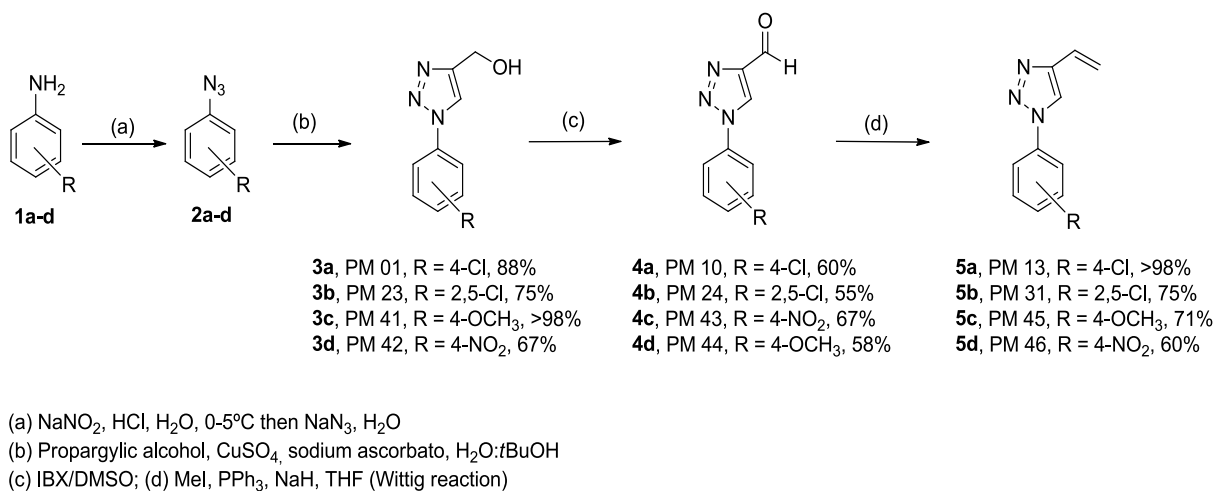
Candidiasis is an opportunistic infection, caused by a yeast-like fungus, *Candida*. Twenty species are recognized as medically important pathogens. The major agent is *C. albicans*¹. The expanding global incidence of candidiasis is a result of increased immunosuppressive disorders, including AIDS and certain chemo- or radiotherapies². A variety of imidazole and triazole drugs that disrupt biosynthesis of ergosterol, a fungal-specific of cellular membranes are commonly prescribed for the treatment of candidiasis³. In recent years, drug-resistance to antifungal agents is widely recognized^{4,5}. The therapeutic arsenal available for treatment of fungal infections is quite restricted, requiring continuous development of new antifungal agents^{6b}.

Material and methods

Chemistry

The syntheses all the 1,2,3-triazoles compounds were performed according with previously methodology.^{8a} The 1,2,3-triazoles **3a-d** were obtained from Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition reaction between aromatic azides **2a-d** (from diazotization and nucleophilic reaction of corresponding anilines **1a-d** with NaNO₂/HCl and NaN₃ respectively) and propargylic alcohol. Then, 4-carboxaldehyde-1,2,3-triazoles (**4a-d**) were prepared by oxidation

reaction of the alcohols (**4a-d**) using 2-iodoxybenzoic acid (IBX) and the vinyl-1,2,3-triazoles **5a-d** were obtained by Wittig reaction from aldehydes **4a-d**.



Scheme 1: Synthetic methodology used for the preparation of 1,2,3-triazoles.

In vitro Antifungal Activity

In vitro antifungal activity of the triazoles were assessed by broth microdilution in accordance with the Clinical Laboratory Standard Institute M27-A2 guidelines and M38-A [CLSI, 2002]. RPMI 1640 with L-glutamine (Life Technologies, Grand Island, NY), buffered to pH 7.0 with 0.165 mol l⁻¹ MOPS and supplemented with 18 g l⁻¹ of glucose, was used as the test medium for all triazoles. The triazoles were suspended in DMSO and diluted in RPMI medium. Strains of *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. tropicalis* and *C. dubliniensis*, *T. rubrum*, *M. canis* e *A. niger* were kindly provided by FIOCRUZ e INPA. To make active strains, were subcultured on Sabouraud's dextrose agar for 48 h at 35°C. A suspension of yeast cells with a turbidity according to the McFarland standard 0.5 was prepared in distilled water, adjusted in a Neubauer chamber (Brand, Wertheim, Germany) and diluted to the final inoculum concentration in the range of 0.5 x 10³– 2.5 x 10³ cfu ml⁻¹. All assays were done in triplicate. The microtiter plates containing triazoles and inoculum were incubated at 35°C for 24 h. Minimum inhibitory concentration (MIC) values were assessed visually by two separate

investigators and defined as the lowest concentration that resulted in no growth. The itraconazole and cetocanazole were used in the tests as standard antifungal.

Hemolytic activity

The test was performed in 96-well plates using a 1% mouse erythrocyte suspension in 0.85% NaCl, following the method described by Huang et al., 2001, 0.25 ml of erythrocytes suspension was added to an equal volume of 0.9% saline solution containing the substances to 1 mmol/L and then incubated at 37 ° C for 5 min with stirring. DMSO was used as negative control and Triton X for positive control (100% hemolysis). They were then centrifuged at 1100 rpm for 5 min and 0.2 ml of the supernatant collected for carrying out reading the absorbance at 550 nm (Sample). The percentage of hemolysis (% H) of each sample was calculated using the following equation:

$$H\% = \text{Sample} / A100 \times 100$$

Where is the A100 absorbance of 100% hemolysis the cells

Coagulation assay

The anticoagulant activity of the compound was investigated on rat whole blood [by the method of Brown (1988) and modified by Osoniyi Onajobi (2003)]. Testing will take place in prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT), using a coagulometer (Teco, model M1 Coatrom, Germany) and commercial kits BIOCLIN APTT and PT BIOCLIN (MG, Brazil). The plasma is obtained from blood centrifuged with sodium citrate for 15 min at 1500 rpm. For the TP will be added 100 mL of reagent to 50 mL of PPP preincubated with 5 mL of the respective compounds at a concentration of 1 mM. For the APTT tests, will be added to 50 mL of CaCl₂ to 45 mL of PPP preincubated in a water bath with 50 mL of reagent Cephaeline and 5 mL of the respective compounds. The test values obtained from the addition

of the compounds of the PPP be compared with the results of tests with the solvent dimethylsulfoxide (DMSO).

Citotoxicity in NIH3T3

The cytotoxicity of triazoles NHI3T3 (fibroblast murine), Alamar Blue™ assay was performed (Ahmed *et al.*, 1994). The cells were grown in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mm glutamine, 100 µg/ml streptomycin and 100 U/ml penicillin, and incubated at 37 °C with a 5% CO₂ atmosphere. For experiments, the cells were plated in 96-well plates (10⁴ cells/well in 100 µl of medium). After 24 h, triazoles (100 µg/ ml) dissolved in DMSO was added to each well and the cells were incubated for 72 h. Control groups received the same amount of DMSO. Doxorubicin (Sigma) was used as positive control. One hour before the end of the incubations, 10 µL of Alamar Blue™ was added to each well. After 3 h of exposure to the Alamar Blue, removing from the oven half hours before termination, the fluorescence is measured using an ELISA plate reader (Beckman mark and Coulter). The viability is calculated using the formula below, where ΔFt = (fluorescence of the cell + medium+extract + resazurin) - (fluorescence of the cell + medium + extract) and ΔFc = (fluorescence of the cell + medium + DMSO + resazurin) - (fluorescence of the cell + medium + DMSO).

$$\% \text{ Viability} = \Delta F_t / \Delta F_c \times 100$$

Results and Discussion

The antifungal tests conducted in this study followed the methodology proposed by the CLSI, as described above. The results of antifungal activity, represented by the minimum inhibitory concentration (MIC), will be presented and discussed later and are expressed in

millimolar units (mM). According to Stein et al. (2006), compounds with values of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) greater than 250 mg/mL did not exhibit antifungal activity

Were used as positive controls the following antifungal drugs: the Ketoconazole for filamentous fungi and itraconazole for yeasts. It was observed that there was correlation between the results of the antifungal agents used as positive controls with the data found in literature. The study of antifungal activity revealed that all compounds screened showed antifungal activity for at least one of the species studied, except that the compound **5d** obtained MIC greater than 0.5 mmol /L for all strains tested. The 4-carboxaldehyde-1,2,3-triazoles (**4a-d**) showed good activity against *Candida* spp (MIC 0,125 to 0,06 mmol/L) shown in the **Table 1**. Furthermore, these aldehydes also showed good antifungal activity for *Trichophyton rubrum* (MIC 6.25 to 25 mg/mL), *Microsporium canis* (MIC 50-100 mg/mL) and *Aspergillus niger* (MIC 100 mg/mL). Only was not determined by the present MIC MIC Greater than 100 mg/mL shown in **Table 2**.

The radical 4-carboxaldehyde in 1,2,3-triazoles ring of the compounds **4a-d** increase the antifungal activity in comparison with other analogues with methylenecarbinol (**3a-d**) and vinyl (**5a-d**) groups in C-4 position that not showed any antifungal activity. Other explanation is the physico-chemical effect of the carbonyl moiety on the solubility of the compound.

We evaluated and compared the cytotoxicity of the compounds in cultured fibroblasts, searching, with this analysis, provide information about the biological behavior of these compounds that can later be used in vivo study. As a result of the test for cytotoxicity, these products showed a low toxicity against NIH3T3/ fibroblasts at the concentration tested. For better interpretation of results the values of the treated wells were compared with control (DMSO) and analyzed by One Way ANOVA and Dunnett's post test, which revealed no statistically significant difference between them ($P = <0.05$). Also after the same statistical analysis was not significant increase in clotting time compounds than the control (DMSO) and the hemolytic potential only two compounds, **3b** and **5b**, caused significant hemolysis compared to DMSO ($P = 0.05$), as shown in **Figure 1**.

The cytotoxicity of 1,2,3-triazoles described in the work indicates good security, however, the need for a standardized method for the assessment of cytotoxicity is required for a better understanding of the biosafety of the compounds and the relationship groups chemical / biological activity.

The azole resistance is emerging with a big problem, particularly for patients at risk of developing fungal infections, as well as patients with AIDS and other types of immunosuppression. [25]. The increased resistance to antifungals points to the need to develop strategies to prevent its spread among the fungi, as has occurred with the bacteria. It is known, for example, occurrence of resistance to the azole in strains of *Candida tropicalis* is due to increased expression of the gene ERG11, associated with a missense mutation in this gene [26]. Therefore, a need exists for these compounds are also tested for future these resistant strains

CONCLUSION

A serie of 15 1,2,3-triazoles were synthesized and purified through the route chosen and the results of the evaluation demonstrated that these compounds are antifungal agents promising due to their low MIC values (0.06 to 0.125 mmol/L) and low or no toxicity.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) for financial support of this research. ESL and FVF are members of the INCT de Processos Redox em Biomedicina-Redoxoma (MCT/CNPq).

REFERENCES

1. Segal E. *Candida*, still number one—what do we know and where are we going from there? *Mycoses*. 2005;48:03–11.
2. Sobel, J. D.; Wiesenfeld, H. C.; Martens, M.; Danna, P.; Hooton, T. M.; Rompalo, A.; Sperling, M.; livengood, C.; et al. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351:876-83.
3. Heimark, L.; Shipkova, P.; Greene, J.; Munayyer, H.; Yarosh-Tomaine, T.; DiDomenico, B.; Hare, H.; Pramanik, B. N. *J. Mass. Spectrom.* 2002; 37:265-69.
4. Pfaller, M. A.; Diekema, D. J.; Sheehan, D. J. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19: 435-47.
5. Spanakis, F. K.; Aperis, G.; Mylonakis, E. *Clin. Infect. Dis.* 2006; 43: 1060-68.
6. Stevens, D. A.; Espiritu, M.; Parmar, R. 2004; 48: 3407-11.
7. NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Publication Of M27-A2: reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard—second edition. NCCLS. 2002;22:1–29.
8. Velazquez, S.; Alvarez, R.; Perez, C.; Gago, F.; De, C.; Balzarini, J.; Camaraza, M.; *J. Antivir. Chem. Chemother.* 1998, 9, 481.
9. Alvarez, R.; Velázquez, S.; San-Félix, A.; Aquaro, S.; De Clercq, E.; Perno, C.F.; Karlsson, A.; Balzarini, J.; Camarasa. M. J.; *J. Med. Chem.* 1994, 37, 4185.
10. Im, C.; Maiti, S. N.; Micetich, R. G.; Daneshalab, M.; Atchison, K.; Philips, O. A.; Kunugita, C.; *J. Antibiot.* 1994, 47, 1030.
11. Micetich, R. G.; Maiti, S. N.; Spevak, P.; Hall, T. W.; Yamabe, S.; Ishida, N.; Tanaka, M.; Yamazaki, T.; Nakai, A.; Ogawa. K.; *J. Med. Chem.* 1987, 30,1469.
12. Palhagen, S.; Canger, R.; Henriksen, O.; van Parys J. A.; Riviere, M. E.; Karolchyk. M. A.; *Epilepsy Res.* 2001, 43, 115.
13. Kelley, J. L.; Koble, C. S.; Davis, R. G.; McLean, E. W.; Soroko, F. E.; Cooper, B. R.; *J. Med. Chem.* 1995, 38, 4131.
14. Kallander, L. S.; Lu, Q.; Chen, W.; Tomaszek, T.; Yang, G.; Tew, D.; Meek, T. D.; Hofmann, G. A.; Schulz-Pritchard, C. K.; Smith, W. W.; Janson, C. A.; Ryan, M. D.; Zhang, G. F.; Johanson, K. O.; Kirkpatrick, R. B.; Ho, T. F.; Fisher, P. W.; Mattern, M. R.; Johnson, R. K.; Hansbury, M. J.; Winkler, J. D.; Ward, K. W.; Veber, D. F.; Thompson, S. K.; *J. Med. Chem.* 2005, 48, 5644. Giffith E. C.; Su Z.; Turk B. E.; Chen S.; Chang Y. H.; Wu Z.; Biemann K.; Liu J. O.; *Chem. Biol.* 1997, 4, 461; Sin, N.; Meng, L.; Wang, M. Q. W.; Wen, J. J.; Bornmann, W. G.; Crews, C. M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997, 94, 6099.
15. Cunha, A. C.; Figueiredo, J. M.; Tributino, J. L. M.; Miranda, A. L. P.; Castro, H. C.; Zingali, R. B.; Fraga, C .A. M.; de Souza, M. C. B. V.; Ferreira, V. F.; Barreiro, E. J.; *Bioorg. Med. Chem.* 2003, 11, 2051.

16. Menegatti, R.; Cunha, A. C.; Ferreira, V. F.; Perreira, E. F. R.; El-Nabawi, A.; Eldefrawi, A.T.; Albuquerque, E. X.; Neves, G.; Rates, S. M. K.; Fraga C. A. M.; Barreiro, E. J.; *Bioorg. Med. Chem.* 2003, *11*, 4807.
17. Biagi, G.; Dell'Omodarme, G.; Ferretti, M.; Giorgi, I.; Livi, O.; Scartoni, V.; *Il Farmaco* 1990, *45*, 1181.
18. Biagi, G. ; Livi, O.; Scartoni, V.; Lucacchini, A.; Mazzoni, M. R.; *Il Farmaco* 1986, *41*, 597.
19. Holla, B. S.; Mahalinga, M.; Karthikeyan, M. S.; Poojary, B.; Akberali, P. M.; Kumari, N. S.; *Eur. J. Med. Chem.* 2005, *40*, 1173.
20. Dabak, K.; Sezer, O.; Akar, A.; Anac, O.; *Eur. J. Med. Chem.* 2003, *38*, 215.
21. Banfi, E.; Scialino, G.; Zampieri, D.; Mamolo, M. G.; Vio, L.; Ferrone, M.; Fermeglia, M.; Paneni, M. S.; Pricl, S.; *J. Antimicrob. Chemother.* 2006, *58*, 76.
22. Yuk,D.Y.,Ryu,C.K.,Hong,J.T.,Chung,K.H.,Kang,W.S.,Kim,Y.,Yoo,H.S.,Lee,M.K.,Lee,C.K.,Yun,Y.P. *Biochemical Pharmacology* 60(7),2000,1001–1008.
23. R.G.S. Berlinck, C.A. Ogawa, A.M.P. Almeida, M.A.S. Andrade, E.L.A. Malpezzi, L.V. Costa, E.M. Hajdu and J.C. Freitas, 115C,1996, pp. 155–163.
24. AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E., v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.
25. STEIN, A. C.; et al., v. 107, p. 95-98, 2006.
26. PEREA, S.; PATTERSON, T.F. 15: 1073-1080, 2002.
27. Vandeputte P, Larcher G, Bergés T, Renier G, Chabaise D, Bouchara JP. 49:4608-4615, 2005.
28. Osoniyi, O.; Onajobi, F. *Journal of Ethnopharmacology*, v.89, p. 101-105, 2003.

Table 1: Minimum inhibitory concentration (mmol/L) of triazoles against *Candida* strains.

Substância	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. kefyr</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. dubliniensis</i>
3a	> 0,5	0,25	> 0,5	> 0,5	0,25	> 0,5
3b	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5	0,25	> 0,5
3c	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5	0,25	> 0,5
3d	> 0,5	0,25	> 0,5	> 0,5	0,25	> 0,5
4d	0,125	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
4c	0,125	> 0,5	0,25	0,25	0,25	0,25
4^a	0,125	0,125	0,25	0,25	0,125	0,125
4b	0,06	0,25	0,06	0,25	0,125	0,25
5c	> 0,5	> 0,5	> 0,5	0,25	> 0,5	> 0,5
5d	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5
5^a	> 0,5	> 0,5	> 0,5	0,25	> 0,5	> 0,5
5b	> 0,5	0,25	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5
Itraconazol*	≤0,04	≤0,04	0,06	0,03	2.6	≤0,04

Table 2: Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/mL}$) of triazoles against *T. rubrum*, *M. canis* e *A. niger*.

	Cetoconazol	4b	4c	4d	4a
<i>T. rubrum</i>	0,062	25	12,5	6,25	6,25
<i>M. canis</i>	<0,031	50	50	100	50
<i>A. niger</i>	4	100	> 100	100	100

Table 3: Anti-hemolytic, coagulant and citotoxicity activities of 1,2,3 triazoles (1mmol/L)

Triazoles	Hemolysis (%)	Coagulation (s)	Cell viability (%)
DMSO	8,7 ± 0,49.	16,4 ± 0,49	101±15
5d	8,5±0,70	16,1±1,48	114±8,32
3c	9,2±1,22	17,4±0,32	107±25,32
3^a	9,5±1,66	16,8±0,14	117±8,30
4d	7,2±0,41	17,2±0,07	129±16,02
4a	7,8±0,50	16,9±1,13	91±71,18
4b	9,5±1,29	12,7±3,67	89±26,77
4c	8,4±0,28	19,6±1,69	80±7,56
5c	8,7±0,75	17,2±1,27	125±7,88
3d	10,3±0,62	17,7±0,63	98±12,95
3b	11,3±0,55	20,9±1,90	106±52,25
5b	12,4±0,54	15,7±0,70	61±10,26
5a	11,0±0,82	16,2±0,07	112±44,32

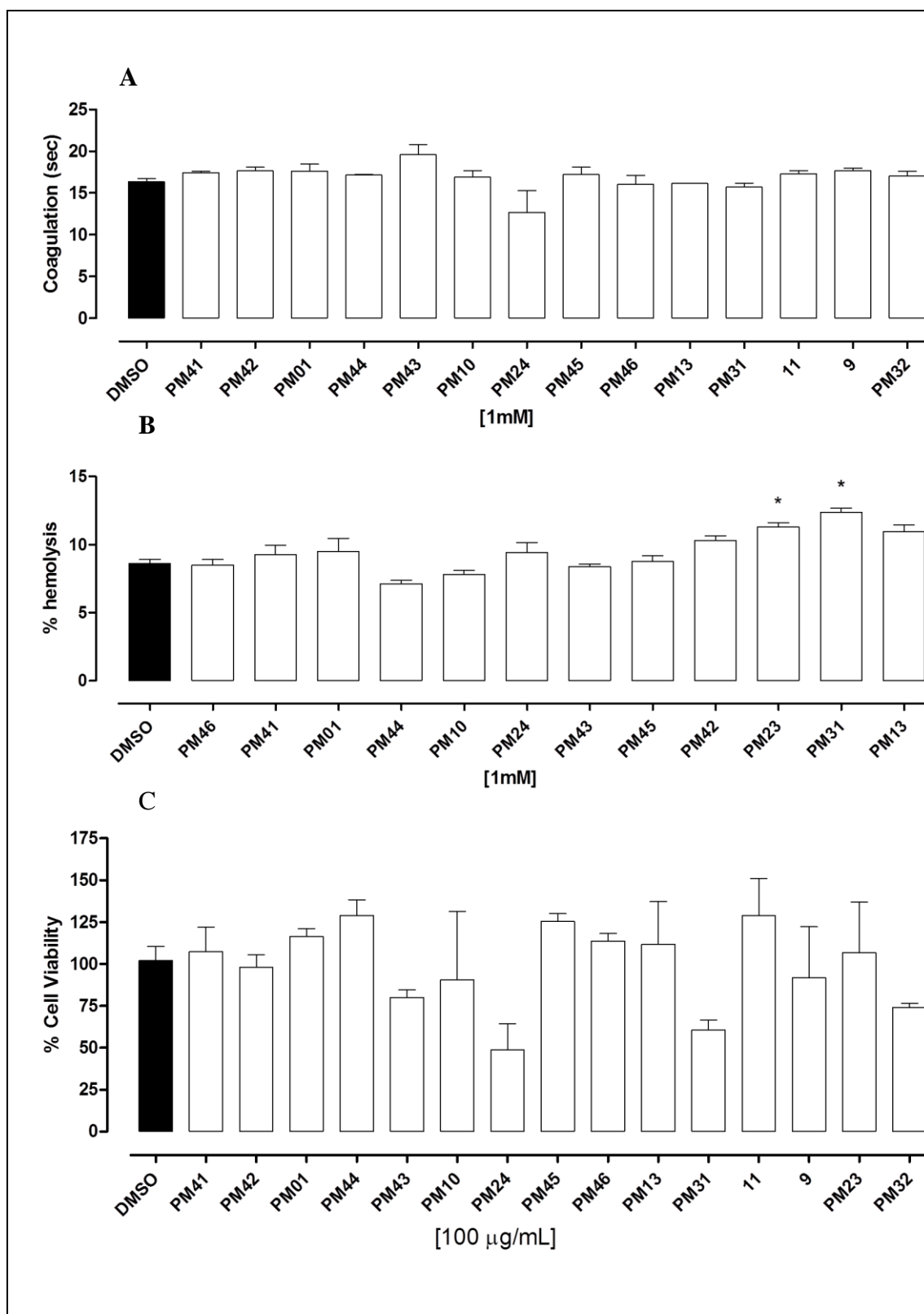


Figure 1. Effects of 1,2,3-triazoles about (A)coagulation , (B) Hemolysis and (C) cell viability.

6. CONCLUSÃO

Todos os compostos triazólicos foram testados para atividade antifúngica através da técnica de microdiluição em caldo, dos noventa compostos, quatro apresentaram atividade anti-*Candida*. Esses mesmos compostos também apresentaram atividade para *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Microsporium canis*, *Trichophyton rubrum* e no *Aspergillus niger*.

Quanto à avaliação da atividade antibacteriana nenhum dos compostos estudados apresentou atividade nas concentrações testadas para as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecal*.

Os quatro compostos que obtiveram atividade antifúngica não apresentaram atividade hemolítica em sangue humano na concentração de 1 mmol/L.

Os compostos com atividade antifúngica não apresentaram citotoxicidade significativa em fibroblastos NIH3T3 na concentração de 100µg/mL.

Os compostos triazólicos selecionados não apresentaram atividade coagulante ou anticoagulante, quando avaliados na concentração de 1mmol/L.

A partir do *screening* de 90 novos compostos triazólicos foram identificados quatro os quais podem ter potencial para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade antifúngica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *Journal of immunological methods*, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.

ALVES, E. G. et al. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Química Nova*, v. 31, n. 5, p.1224-1229, 2008.

ANDERSSON, D.; HUGHES, D. Antibiotic resistance and its cost : is it possible to reverse resistance? *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, n.4, p. 260-271, 2010.

AUFORT, M. et al. Synthesis and antibiotic activity of a small molecules library of 1,2,3-triazole derivatives, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* v.18, p.1195–1198, 2008.

CAIERÃO, J. et al. Novos Antimicrobianos:realidade e perspectivas. *NewsLab*, edição 66 , p. 80-90, 2004

CLSI document **M38-A -Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi**; Approved Standard, Wayne, 2002.

CLSI document **M27-A2—Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**; Approved Standard—Second Edition, 2002.

CLSI document **M7-A6: Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada - Sexta Edição**, 2002.

CRISAN, I.; ZAHARIA, C.N.; POPOVICI, F.; JUCU, V.; BELU, O.; DASCALU, C.; MUTIU, A.; PETRESCU, A. Natural propolis extract Nivcrisol in the treatment of acute and chronic rhinopharyngitis in children. *Romanian Journal of Virology*, v.46, p.115-133, 1995

ENGEL C.; BRUNKHORST F.M.; BONE H.G. et al - Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Medicine*, v.33, p.606-618, 2007.

GHANNOUM ,M. A. Comparison of the in vitro activity of terbinafine and itraconazole against dermatophytes. *Mycoses*, v.53, p. 311–313, 2009.

GUIMARÃES, D.O; MOMESSO, L.S; PUPO, M.T, Antibiotics: therapeutic importance and perspectives for the discovery and development of new agents, *Química Nova*, v.33, n.3, São Paulo, 2010.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. Search for new antifungal compounds from higher plants. *Pure and Applied Chemistry*, v. 66, n.10/11, p. 2231-4, 1994.

KEIRA, S.M. et al. Experimental model for fibroblast culture. *Acta Cirurgica Brasileira*. v. 19 Special Edition, 2004.

KOLTIN, Y.; HITCHCOCK, C. The search for new triazole antifungal agents. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 1, n.2, p. 176-182, 1997.

KONEMAN, E. W. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. 6.ed. São Paulo: MEDSI, p 2, 2008.

LIMA, I. D. O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n.2, p. 197-201, Abr./Jun. 2006.

LISBOA, T. et al. Prevalência de Infecção Nosocomial em Unidades de Terapia Intensiva do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 19 n. 4, Outubro-Dezembro, 2007.

LOPES, H. V. A falta de perspectiva para a obtenção de novos antibióticos. *Revista Panamericana Infectologia*; v.8, n.1, p.48-49, 2006.

MELO, J. O. F. et al. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. *Química Nova*, v.29, n.3, São Paulo, May/June 2006.

OSONIYI, O.; ONAJOBI, F. Coagulant and anticoagulant activities in *Jatropha curcas* latex. *Journal of Ethnopharmacology*, v.89, p. 101-105, 2003.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, n.2, p. 301-307, Abr./Jun. 2008.

PARK, B. J. et al. *In Vitro* Antifungal Activity of Epigallocatechin 3-*O*-Gallate against Clinical Isolates of Dermatophytes. *Yonsei Medical Journal*, v. 52, n.3, p.535-538, 2011.

PENNA C.; MARINO S.; VIVOT E.; CRUAÑES M.C.; MUÑOZ J.D.; CRUAÑES J.; FERRARO G.; GUTKIND G.; MARTINO V. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. *Journal Ethnopharmacol* 77:37-40, 2001.

PIGNATTI, M. G., Saúde e Ambiente: as doenças emergentes no Brasil. *Revista Ambiente & Sociedade*, v.7, n.1, Campinas, Jan./June 2004.

PINHEIRO, R.S. et al. Gênero, morbidade, acesso e utilização de serviços de saúde no Brasil. *Ciência Saúde Coletiva*., v.7, n.4, p.687-707, 2002.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. *Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos*. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, p. 325, 2003.

PONCE DE LEON-ROSALES, S.P.; MOLINAR-RAMOS, F.; DOMINGUEZ-CHERIT G. et al. Prevalence of infections in intensive care units in Mexico: a multicenter study. *Critical Care Medicine*, v.28, p.1316-1321, 2000.

PRASAD, C. S. et al. In vitro and in vivo antifungal activity of essential oils of *Cymbopogon martini* and *Chenopodium ambrosioides* and their synergism against dermatophytes. *Mycoses*, v.53, p.123–129, 2009.

RICHARDSON, M.D.; WARNOCK, D.W. *Fungal infection – Diagnosis and management*. London : Blackwell, Cap.3: 17-43, 1993.

ROGEROA, S. O. et al. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. *Materials Research*, v. 6, n. 3, p.317-320,2003.

SILVA, F. M. E; PAULA, J. E. D.; ESPINDOLA, L. S. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. Blackwell Verlag GmbH. *Mycoses* v.52, p.511–517, 2009.

SINGHAL, N. et al. Department of Pharmaceutical Technology, Meerut Institute of Engineering and Technology, Meerut, India. Recent advancement of triazole derivatives and their biological significance. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, v.3, n.2, p.126-133, 2011.

SOUZA, A. C. M. et al. Antimicrobial activity of *Hymenaea martiana* towards dermatophytes and *Cryptococcus neoformans*. *Mycoses*, v.53, p.500–503, 2009.

SANDE, M.A.; MANDELL, G.L. Drogas antimicrobianas – Drogas antimicóticas e antivirais. In: GOODMAN, L.; GILMAN, A.G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro : Guanabara. Cap.54. p.799-807, 1987.

SIDDIQUI, N. et al. Triazoles : as potential bioactive agents. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, v.8, n.1, p.161-169, 2011.

SPELLBERG, B. et al. Trends in antimicrobial Drug in Development Implications for the future. *Clinical Infectious Diseases*, v.38, n.9, p.1279-1286, 2004.

SPIZEK, J. et al. Do we need new antibiotics ? The search for new targets and new compounds. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 37, n.12, p.1241-1248, 2010.

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. *Química Nova*, v.31, n.7, São Paulo, 2008.

TOUFEN, J. C., et al - Prevalence rates of infection in intensive care units of a tertiary teaching hospital. *Revista Hospital das Clínicas Faculdade Medicina*, v.58, p.254-259, Sao Paulo, 2003.

VIJESH, A.M. Synthesis, characterization and anti-microbial studies of some novel 2,4-disubstituted thiazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.45, p.5460-5464, 2010.

VILLAS-BOAS, P.J.; RUIZ, T. - Ocorrência de infecção hospitalar em idosos internados em hospital universitário. *Revista Saúde Pública* 38(3):372-8, 2004.

ZARDO, V.; MEZZAR, A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida* sp, *NewsLab*, edição 63, p.136-146, 2004 .

APÊNDICES

Tabela1. Atividade anti-bacteriana pela metodologia difusão em ágar (técnica *hole plate*) com as amostras e controle (imipenem) a 1mM.

	<i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus. cereus</i>	<i>E.coli Daec</i>	<i>Estafilococcus sensível</i>	<i>Estafilococcus resistente</i>
PM01	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
PM02	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
PM03	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
PM04	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
PM06	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
PM23	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
PM10	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
PM13	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
PM25	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
PM27	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
PM31	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
PM32	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
PM33	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
PM35	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
PM41	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
PM42	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
Imipenem	22 mm	23 mm	25 mm	55 mm	40 mm

Legenda: S/A: sem atividade

Tabela1. Atividade anti-bacteriana pela metodologia difusão em ágar (técnica *hole plate*) com as amostras e controle (imipenem) a 1mM.

	<i>Pseudomonas</i>	<i>Bacillus. cereus</i>	<i>E.coli Daec</i>	<i>Estafilococcus sensivel</i>	<i>Estafilococcus resistente</i>
PM43	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
PM44	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
PM45	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
PM46	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
PM55	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
PM56	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
PM57	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
LMF01	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
LMF03	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
LMF04	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
LMF05	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
LMF06	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
LMF07	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
LMF08	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
LMF09	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
LMF10	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
LMF11	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
LMF12	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
LMF13	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
T₂ANISOL	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
A-CANSS	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
T-HEPTINO	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A

T-ÁLCOOL	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
A-CANPCL	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
T-HEXINO	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
TRZ20	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
TRZ21	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
TRZ22	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
BRU11	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
BRU28	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
BRU30	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
BRU31	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
BRU38	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
RC04	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
BRU88	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
BRU76	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
MA1	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
MA2	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
KF11	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
KF10b	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
BRU92	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
BRU95	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
BRU96	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
MA5	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
BRU29	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
BRU97	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
IM01	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A

IM02	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
IM03	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
IM04	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
PTRF19	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
PTRF15	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
PTRF31	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
HBnNHTRI	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
N-CL,CL- TRIAZOL	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
N-BR- TRIAZOL	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
N-H- TRIAZOL	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
N-CL- TRIAZOL	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
N-F- TRIAZOL	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
HIDRA-N- CL,CL	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
HIDRA-N-BR	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
HIDRA-N-CL	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
HIDRA-N-F	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
N-H-TRI-OH	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
N-H-TRI- CHO	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
PTRF20	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
PTRF12	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
PTRF33	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
TR01	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
MRFA	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
MREFP	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
TR05	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A

PM24	S/A	S/A	S/A	S/A	S/A
LMF03					
Imipenem	22 mm	23 mm	25 mm	55 mm	40 mm

Legenda: S/A: sem atividade

Tabela2. Atividade anti-candida pela metodologia difusão em ágar (técnica *hole plate*) com as amostras e controle (itraconazol) a 1mM.

Itraconazol*	29,7 mm
DMSO	S/A
LMF01	S/A
LMF03	S/A
LMF04	10,4mm
LMF 05	9,5mm
LMF06	S/A
LMF07	24,4mm
LMF08	S/A
LMF09	S/A
LMF10	S/A
LMF11	S/A
LMF12	S/A
LMF13	S/A
T ₂ ANISOL	S/A
A-CANSS	11,7mm
T-HEPTINO	S/A
T-ÁLCOOL	S/A
A-CANPCL	S/A
T-HEXINO	S/A

Tabela3. Concentração Inibitória Mínima (em mmol/L) em espécies de *Candida*

	<i>C. albicans</i>	<i>C.tropicalis</i>	<i>C. kefyr</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. dubliniensis</i>
LMF04	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5
LMF05	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5
A-CANSS	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5
LMF07	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5	> 0,5
Itraconazol	≤0,04	≤0,04	0,06	0,03	2,6	≤0,04

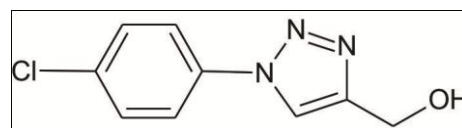
Tabela4. Concentração Inibitória Mínima (em mmol/L) em espécies de *Candida*.

	<i>Candida albicans</i>
PM01	>0,5
PM02	>0,5
PM03	>0,5
PM04	>0,5
PM06	>0,5
PM13	>0,5
PM23	>0,5
PM25	>0,5
PM27	>0,5
PM31	>0,5
PM32	>0,5
PM33	>0,5
PM35	>0,5
PM41	>0,5
PM42	>0,5
PM45	>0,5
PM46	>0,5
PM55	>0,5
PM56	>0,5
PM57	>0,5
LMF01	>0,5
LMF03	>0,5
LMF04	>0,5
LMF 05	>0,5
LMF06	>0,5
LMF07	>0,5
LMF08	>0,5
LMF09	>0,5
LMF10	>0,5
LMF11	>0,5
LMF12	>0,5
LMF13	>0,5
T ₂ ANISOL	>0,5
A-CANSS	>0,5
T-HEPTINO	>0,5
T-ÁLCOOL	>0,5
A-CANPCL	>0,5
T-HEXINO	>0,5
TRZ20	>0,5
TRZ21	>0,5
TRZ22	>0,5
BRU11	>0,5
BRU28	>0,5
BRU30	>0,5
BRU31	>0,5
BRU38	>0,5
RC04	>0,5

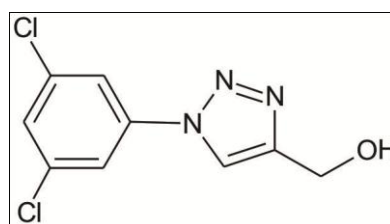
BRU88	>0,5
BRU76	>0,5
MA1	>0,5
MA2	>0,5
KF11	>0,5
KF10b	>0,5
BRU92	>0,5
BRU95	>0,5
BRU96	>0,5
MA5	>0,5
BRU29	>0,5
BRU97	>0,5
IM01	>0,5
IM02	>0,5
IM03	>0,5
IM04	>0,5
PTRF19	>0,5
PTRF15	>0,5
PTRF31	>0,5
HBnNHTRI	>0,5
N-CL,CL-TRIAZOL	>0,5
N-BR-TRIAZOL	>0,5
N-H-TRIAZOL	>0,5
N-CL-TRIAZOL	>0,5
N-F-TRIAZOL	>0,5
HIDRA-N-CL,CL	>0,5
HIDRA-N-BR	>0,5
HIDRA-N-CL	>0,5
HIDRA-N-F	>0,5
N-H-TRI-OH	>0,5
N-H-TRI-CHO	>0,5
PTRF20	>0,5
PTRF12	>0,5
PTRF33	>0,5
TR01	>0,5
MRFA	>0,5
MREFP	>0,5
TR05	>0,5
LMF03	>0,5
Itraconazol	<0,04

Tabela5. Estrutura química compostos triazólicos testados.**PM 01**

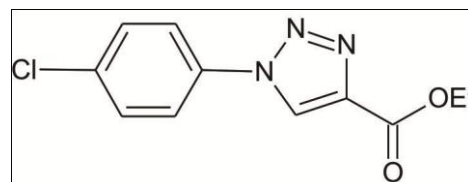
Chemical Formula
 $C_9H_8ClN_3O$
Molecular Weight
209,6323

**PM 02**

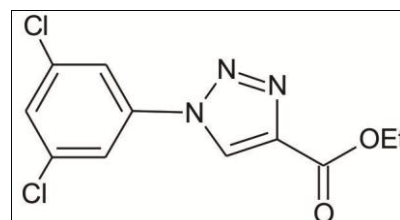
Chemical Formula
 $C_9H_7Cl_2N_3O$
Molecular Weight
244,0774

**PM 03**

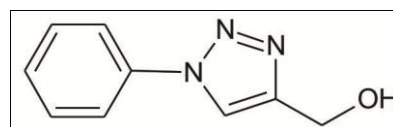
Chemical Formula
 $C_{11}H_{10}ClN_3O_2$
Molecular Weight
251,6690

**PM 04**

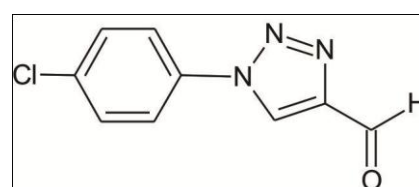
Chemical Formula
 $C_{11}H_9Cl_2N_3O_2$
Molecular Weight
286,1141

**PM 06**

Chemical Formula
 $C_9H_9N_3O$
Molecular Weight
175,1873

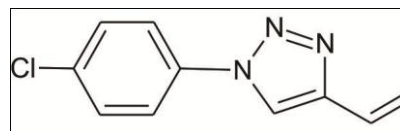
**PM 10**

Chemical Formula
 $C_9H_9ClN_3O$
Molecular Weight
207,6164

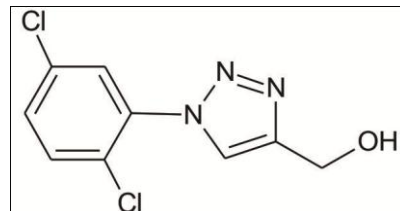


PM 13

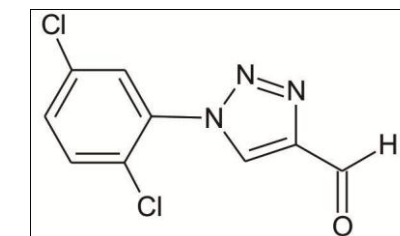
Chemical Formula
 $C_{10}H_8ClN_3$
Molecular Weight
205,6436

**PM 23**

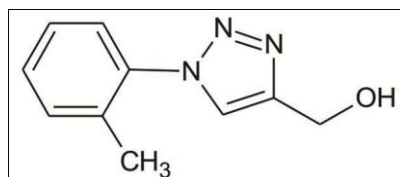
Chemical Formula
 $C_9H_7Cl_2N_3O$
Molecular Weight
244,0774

**PM 24**

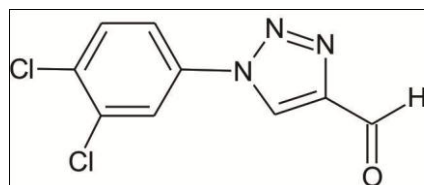
Chemical Formula
 $C_9H_5Cl_2N_3O$
Molecular Weight
242,0615

**PM 25**

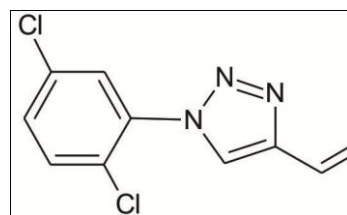
Chemical Formula
 $C_{10}H_{11}Cl_2N_3O$
Molecular Weight
244,0774

**PM 27**

Chemical Formula
 $C_{10}H_7Cl_2N_3O$
Molecular Weight
256,0881

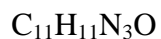
**PM 31**

Chemical Formula
 $C_{10}H_7Cl_2N_3O$
Molecular Weight
240,09



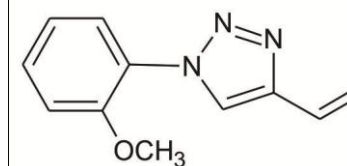
PM 32

Chemical Formula



Molecular Weight

201,22

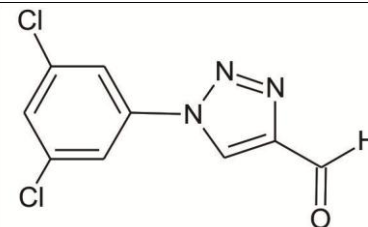
**PM 33**

Chemical Formula



Molecular Weight

242,06

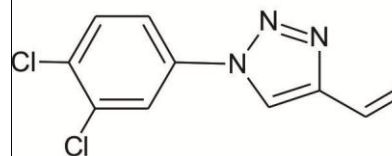
**PM 35**

Chemical Formula



Molecular Weight

240,09

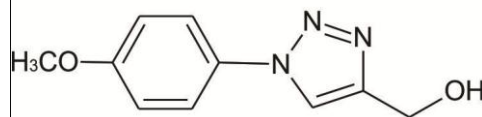
**PM 41**

Chemical Formula



Molecular Weight

209,63

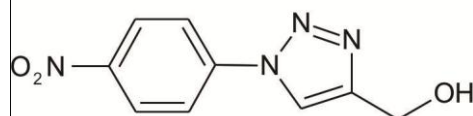
**PM 42**

Chemical Formula

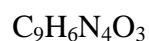


Molecular Weight

220,18

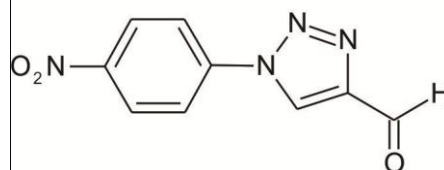
**PM 43**

Chemical Formula



Molecular Weight

218,17



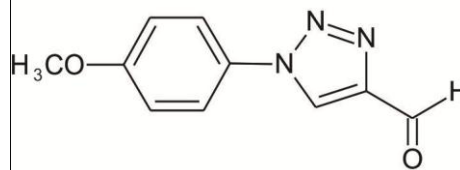
PM 44

Chemical Formula

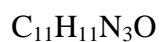


Molecular Weight

203,20

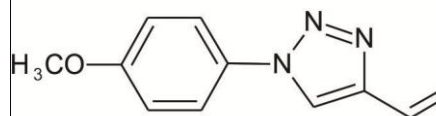
**PM 45**

Chemical Formula



Molecular Weight

201,22

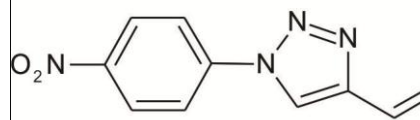
**PM 46**

Chemical Formula



Molecular Weight

216,20

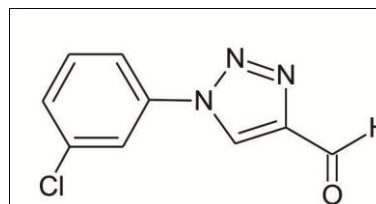
**PM 55**

Chemical Formula



Molecular Weight

207,62

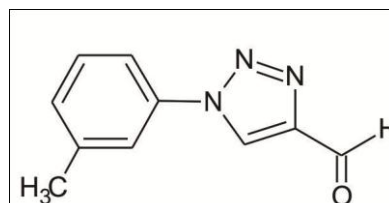
**PM 56**

Chemical Formula



Molecular Weight

187,20

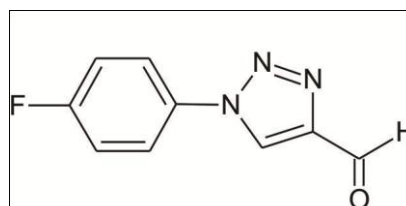
**PM 57**

Chemical Formula



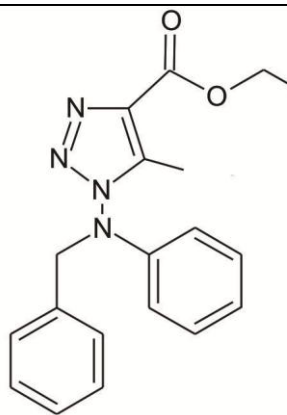
Molecular Weight

191,16

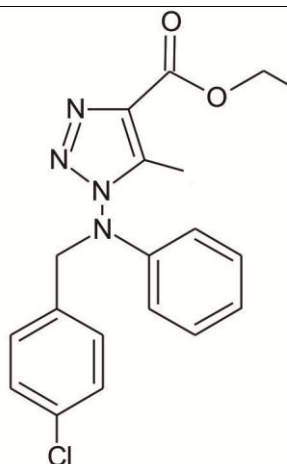


12

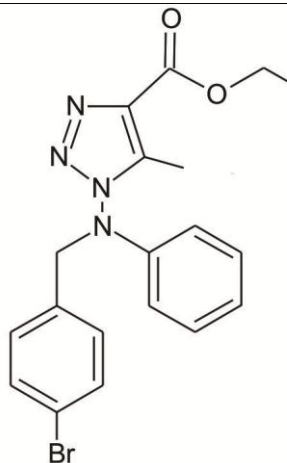
$C_{19}H_{20}N_4O_2$
Exact Mass: 336,1586
Mol.WT.: 336,3879
C.67,84; H. 5,99; N. 16,66; O. 9,51

**13**

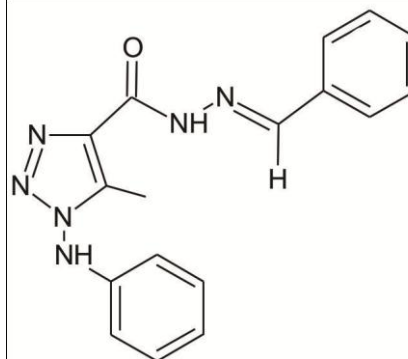
$C_{19}H_{19}N_4O_2$
Exact Mass: 370,1197
Mol.WT.: 370,8326
C.61,54; H. 5,16; N. 15,11; O. 8,63

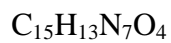
**14**

$C_{19}H_{19}BrN_4O_2$
Exact Mass: 414,0691
Mol.WT.: 370,8326
C.54,95; H. 4,61; Br. 19,24 N. 13,49; O. 7,71

**15**

$C_{17}H_{16}N_6O$
Exact Mass: 320,3488
Mol.WT.: 320,3488
C.63,74; H. 5,03; Br. 26,23 N. 13,49; O. 4,99

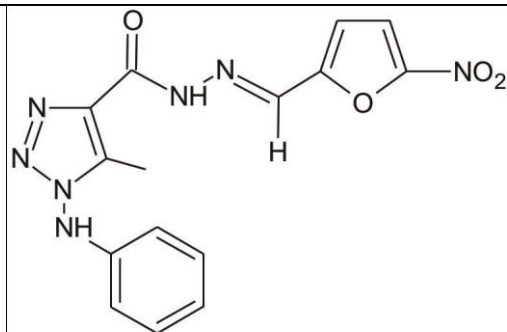


16

Exact Mass: 355,1029

Mol.WT.: 355,3085

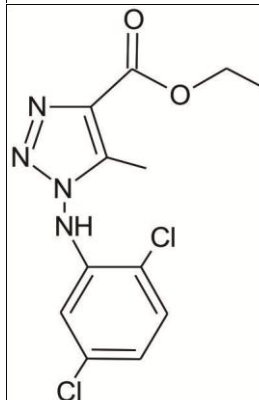
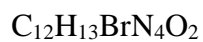
C.50,71; H. 3,69; N. 27,59; O. 18,01

**17**

Exact Mass: 314,0337

Mol.WT.: 315,1548

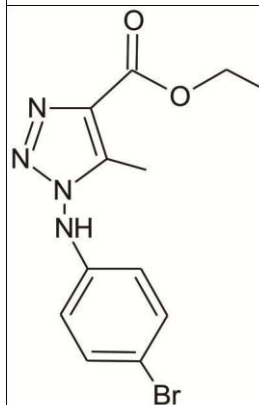
C.45,73; H. 3,84; Cl. 22,50; N. 17,78; O. 10,15

**18**

Exact Mass: 324,0222

Mol.WT.: 325,1614

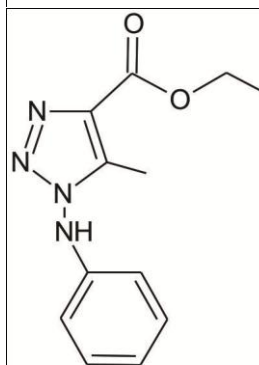
C. 44,33; H. 4,03; Br. 24,57; N. 17,23; O. 9,84

**19**

Exact Mass: 246,1117

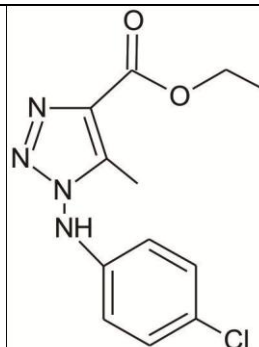
Mol.WT.: 246,2653

C. 58,53; H. 5,73; N. 22,75; O. 12,99

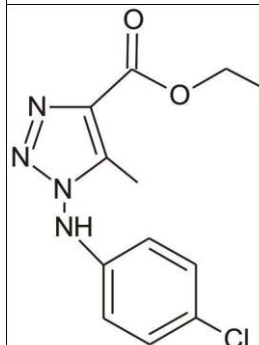


20

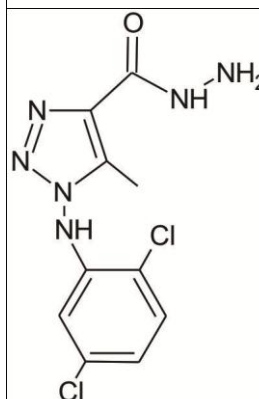
$C_{12}H_{13}ClN_4O_2$
Exact Mass: 280,0727
Mol.WT.: 280,7101

**21**

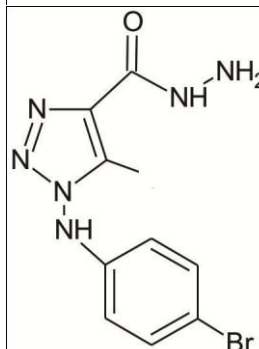
$C_{12}H_{13}FN_4O_2$
Exact Mass: 264,1023
Mol.WT.: 264,2558
C. 54,54; H. 4,96; F. 7,19; N. 21,20; O.12,11

**22**

$C_{10}H_{10}Cl_2N_6O$
Exact Mass: 300,0293
Mol.WT.: 301,1316
C. 39,89; H. 3,35; Cl. 23,55; N. 27,91; O. 5,31

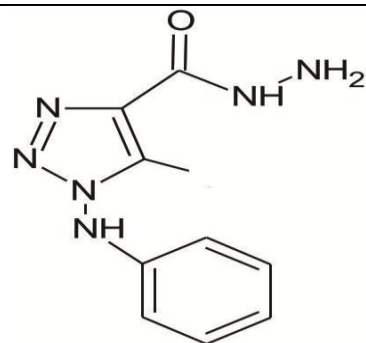
**23**

$C_{10}H_{11}BrN_6O$
Exact Mass: 310,0178
Mol.WT.: 311,1382
C. 38,60;

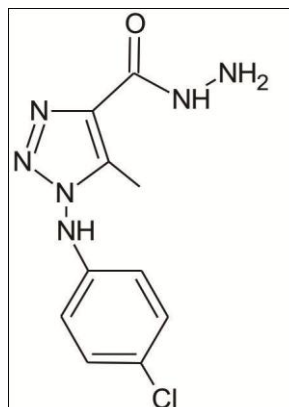


24

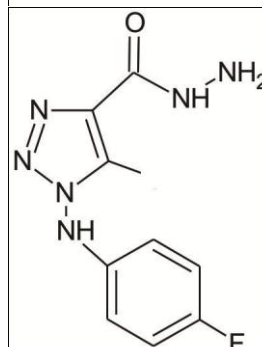
$C_{10}H_{12}N_6O$
Exact Mass: 232,1073
Mol.WT.: 232,2421
C. 51,72; H. 5,21; N. 36,19; O. 6,89

**25**

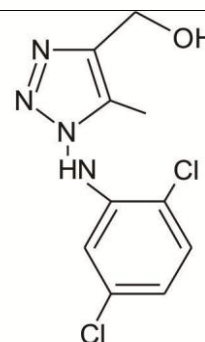
$C_{10}H_{11}ClN_6O$
Exact Mass: 266,0683
Mol.WT.: 266,6869
C. 45,04; H. 4,16; Cl. 13,29; N. 31,51; O. 6,00

**26**

$C_{10}H_{11}FN_6O$
Exact Mass: 250,0978
Mol.WT.: 250,2326
C. 48,00; H. 4,43; F. 7,59; N. 33,58; O. 6,39

**27**

$C_{10}H_{10}Cl_2N_4O$
Exact Mass: 272,0232
Mol.WT.: 273,1182
C. 43,98; H. 3,69; Cl. 25,96; N. 20,51; O. 5,86

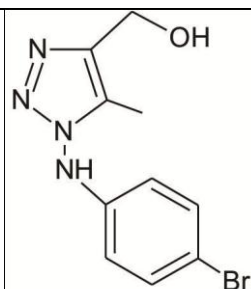
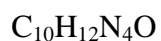


28

Exact Mass: 282,0116

Mol.WT.: 283,1247

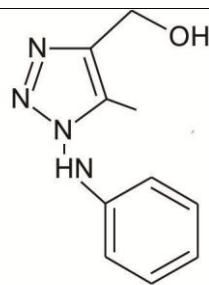
C. 42,42; H. 3,92; Br. 28,22; N. 19,79; O. 5,65

**29**

Exact Mass: 204,1011

Mol.WT.: 204,2286

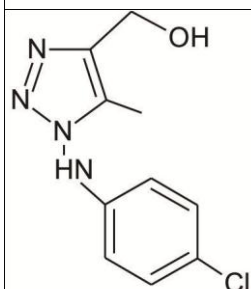
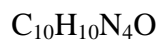
C. 58,81; H. 5,92; N. 27,43; O. 7,83

**30**

Exact Mass: 238,0621

Mol.WT.: 238,6734

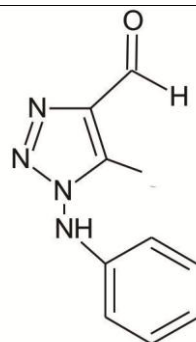
C. 50,30; H. 4,65; Cl. 14,85; N. 23,47; O. 6,70

**31**

Exact Mass: 202,0855

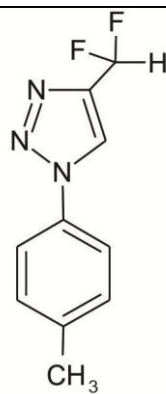
Mol.WT.: 202,2128

C. 59,40; H. 4,98; N. 27,71; O. 7,91



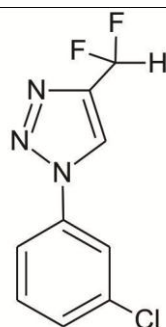
33

$C_{19}H_9F_2N_3$
Mol.WT.: 209,2
PTRF20-



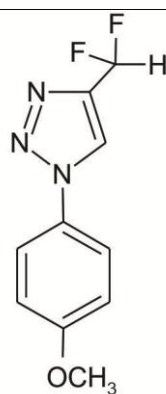
34

$C_9H_6ClF_2N_3$
Mol.WT.: 229,61
PTRF12



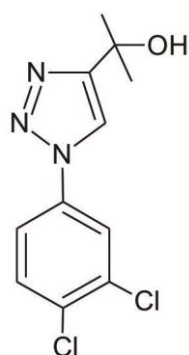
35

$C_{10}H_9F_2N_3O$
Mol.WT.: 225,19
PTRF33



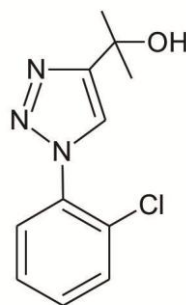
36

$C_{11}H_{11}Cl_2N_3O$
Mol.WT.: 272,13
TR01



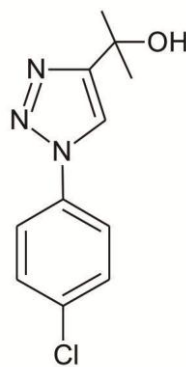
37

$C_{11}H_{12}ClN_3O$
Mol.WT.: 237,69
TR05



38

$C_{11}H_{12}ClN_3O$
Mol.WT.: 237,69
TR06



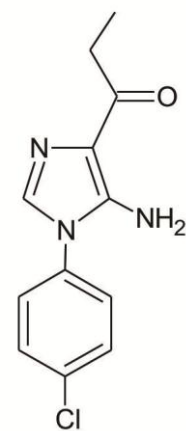
39

$C_{12}H_{11}F_2N_3O$
Mol.WT.: 251,23
IM01



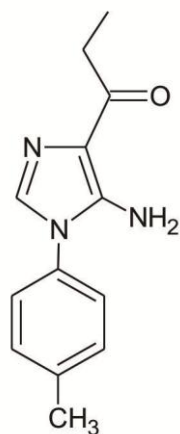
40

$C_{12}H_{12}ClN_3O$
Mol.WT.: 249,7
IM02



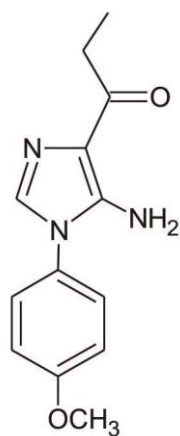
41

$C_{13}H_{15}N_3O$
Mol.WT.: 229,28

IM03

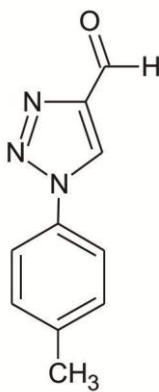
42

$C_{13}H_{15}N_3O_2$
Mol.WT.: 245,28

IM04

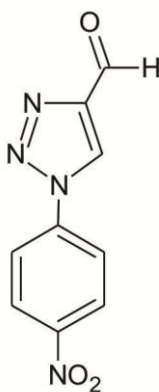
43

$C_{10}H_9N_3O$
Mol.WT.: 187,2

PTPRF19

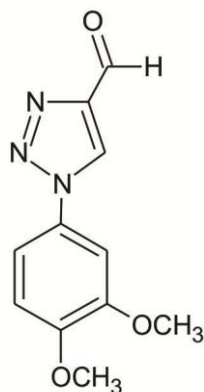
44

$C_9H_6N_4O_3$
Mol.WT.: 218,17

PTRF15

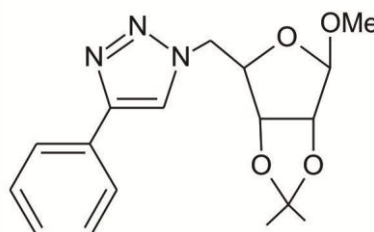
45

$C_{11}H_{11}N_3O_3$
Mol.WT.: 233,22
PTRF31



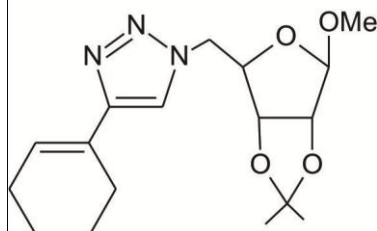
48

$C_{17}H_{21}N_3O_4$
Chemical Formula: 331,1532
Mol.WT.: 331,3663
MRFA



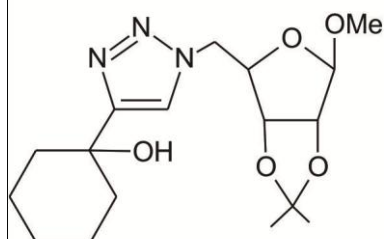
49

$C_{17}H_{25}N_3O_4$
Chemical Formula: 335,1845
Mol.WT.: 335,3981
MRCH



50

$C_{17}H_{27}N_3O_5$
Chemical Formula: 353,1951
Mol.WT.: 353,4134
MRETCOHL

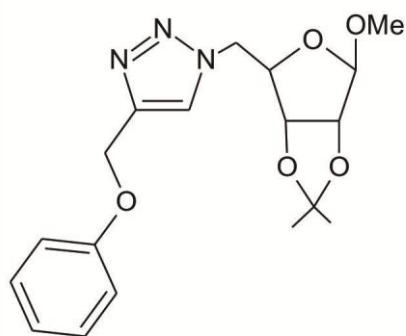


51

 $C_{18}H_{23}N_3O_5$

Chemical Formula: 361,1638

Mol.WT.: 361,3923

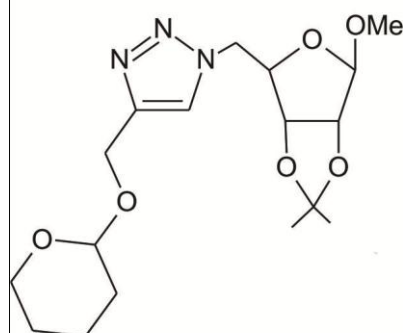
MRFP

52

 $C_{17}H_{27}N_3O_6$

Chemical Formula: 369,19

Mol.WT.: 369,4128

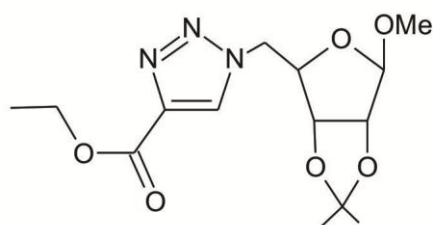
MRTIDRO

53

 $C_{14}H_{21}N_3O_6$

Chemical Formula: 327,143

Mol.WT.: 327,333

MRPRET

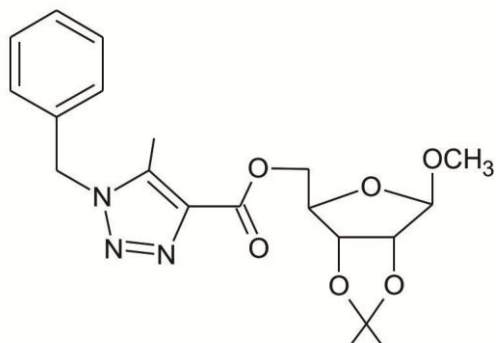
73

 $C_{20}H_{25}N_3O_6$

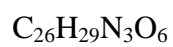
Extract Mass: 403,1743

Mol.WT.: 403,4291

C. 59,54; H. 6,25; N. 10,42; O. 23,80



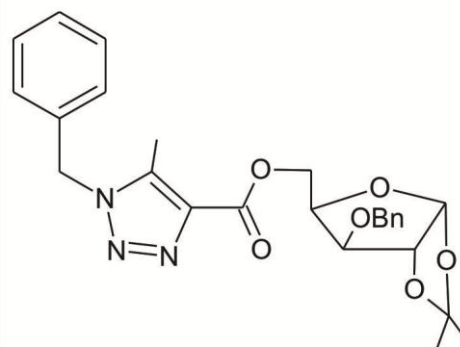
74



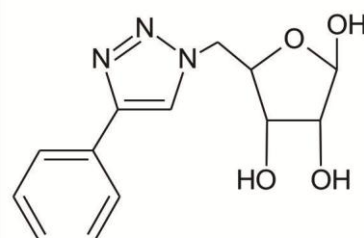
Chemical Formula: 479,2056

Mol.WT.: 479,5251

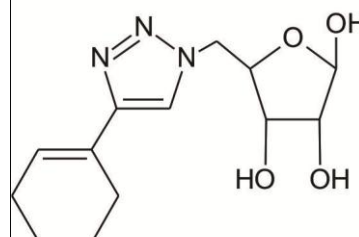
C. 65,12; H. 6,10; N. 8,76; O. 20,02



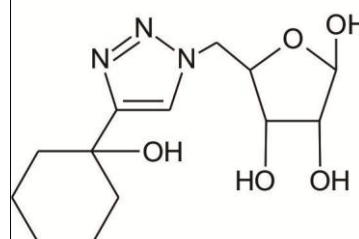
75

CHDES

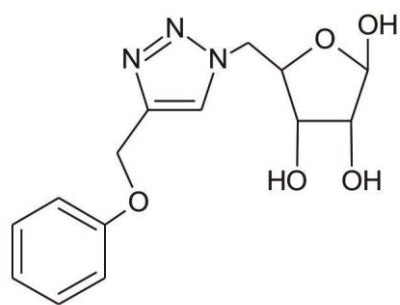
76

COHDES

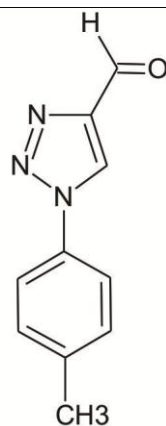
77

EFPDES

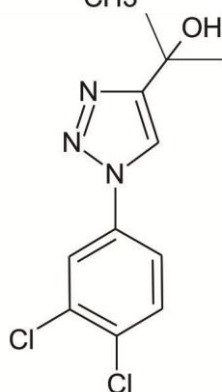
78



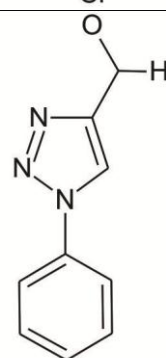
2



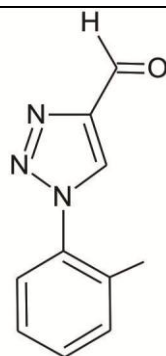
3



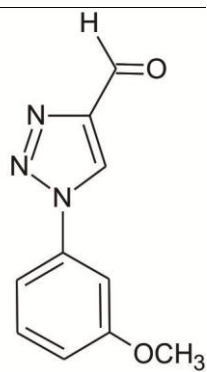
4



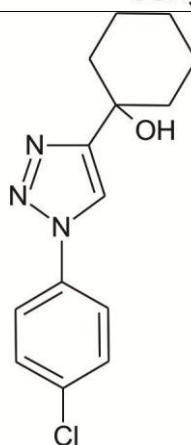
5



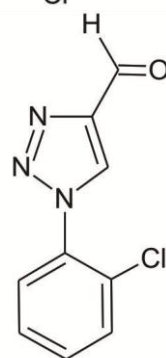
6



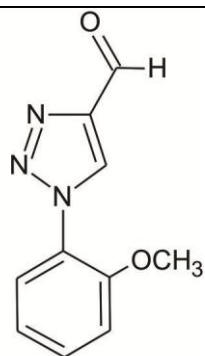
7



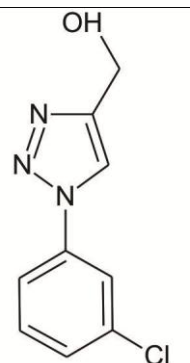
8



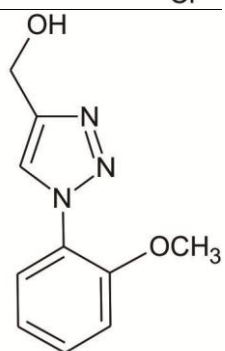
9



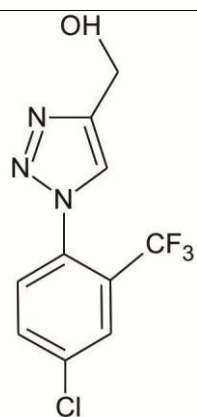
10



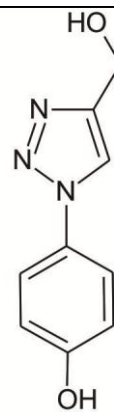
11



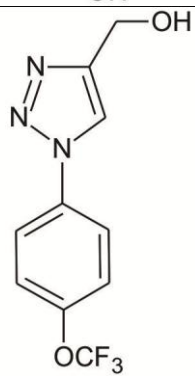
12



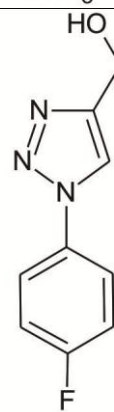
13



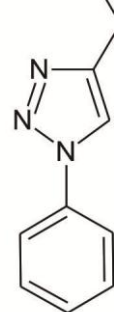
14



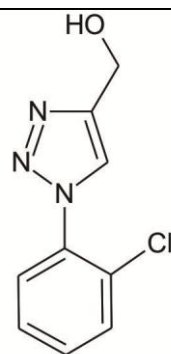
15



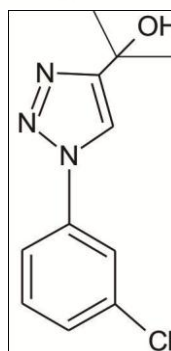
16



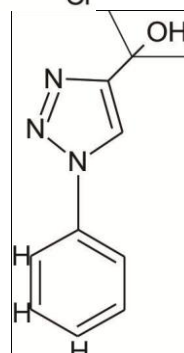
17



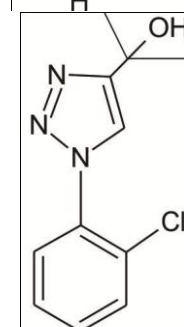
18



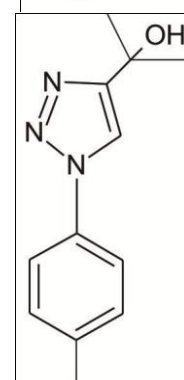
19



20



21



22

