



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ATIVIDADE CITOTÓXICA DE NAFTOQUINONAS SEMI-  
SINTÉTICAS EM ESPÉCIES DE *CANDIDA* ISOLADAS DA  
CAVIDADE ORAL**

**CRISTINA PESSÔA VELOSO FREIRE**

**MANAUS  
2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**CRISTINA PESSÔA VELOSO FREIRE**

**ATIVIDADE CITOTÓXICA DE NAFTOQUINONAS SEMI-  
SINTÉTICAS EM ESPÉCIES DE *CANDIDA* ISOLADAS DA  
CAVIDADE ORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre, na área de concentração “Princípios Bioativos Pró-Saúde da Diversidade Amazônica” e na linha de pesquisa “Bioativos para controle, diagnóstico e terapêutica de agravos à saúde”.

**Orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima**

**MANAUS  
2010**

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Freire, Cristina Pessoa Veloso

*F866a* Atividade citotóxica de naftoquinonas semisintéticas em espécies de *Cândida* isoladas da cavidade oral / Cristina Pessoa Veloso Freire. - Manaus: UFAM, 2010.  
f.72; il. color 30 cm

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde, área de concentração em Princípios Bioativos Pró-Saúde da Diversidade Amazônica) — Universidade Federal do Amazonas, 2010.

Orientador: Prof. Dr.. Emerson Silva Lima

1. Cândida 2. Antimicóticos 3. Naftoquinonas – Uso terapêutico 4. Fungo I. Lima, Emerson Silva (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 616.31:616.934(043.3)

**CRISTINA PESSÔA VELOSO FREIRE**

**ATIVIDADE CITOTÓXICA DE NAFTOQUINONAS SEMI-SINTÉTICAS EM ESPÉCIES DE *CANDIDAS* ISOLADAS DA CAVIDADE ORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre, na área de concentração “Princípios Bioativos Pró-Saúde da Diversidade Amazônica” e na linha de pesquisa “Bioativos para controle, diagnóstico e terapêutica de agravos à saúde”

Apresentada em 09 junho de 2010

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Emerson Silva Lima (Presidente)  
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura (Membro Externo)  
FioCruz – Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane/ AM

Prof. Dra. Karen Regina Carim da Costa (Membro Interno)  
Universidade Federal do Amazonas

“Dedico este trabalho aos meus pais, por sempre acreditarem e confiarem em mim, sendo eles os maiores incentivadores.”

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a **Deus**, pela saúde que me permitiu concluir este trabalho.

Aos meus **pais**, pelo amor, incentivo e compreensão.

Ao meu orientador **Dr. Emerson Silva Lima**, pela oportunidade, atenção e pela dedicação dispensados a mim e a este trabalho.

Ao Mestrado em Patologia Tropical da Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade.

Aos colegas, **Victor Souza, Vitor Renato Carvalho e Silva, Nívea Suely Melo de Oliveira, Débora** por terem ajudado na obtenção dos resultados.

A **Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura**, pesquisadora da FioCruz – Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane/ AM., por ter cedido o laboratório de micologia.

E a todos que me ajudaram direta ou indiretamente, meus profundos agradecimentos.

## RESUMO

A candidíase é uma doença infecciosa causada pelo fungo *Candida*, sendo a espécie *albicans* a mais freqüentes. Sete espécies pelo menos, tem sido associadas a doenças no homem: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida stellatoidea*, *Candida pseudotropicalis* (hoje chamada de *C. Kefyr*), *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii* e *Candida krusei*. Há um aumento da ocorrência das infecções por espécies de *Candida*, causada pelo crescimento da população com imunodepressão que grande predisposição ao desenvolvimento de infecções. Números cada vez maiores de cepas fúngicas estão se tornando resistentes aos fármacos disponíveis no mercado. Em virtude disso, existe uma constante procura de novos fármacos antifúngicos mais eficazes, e mais seguros que os já existentes. As naftoquinonas são amplamente distribuídas na natureza, tendo como atividades conhecidas, a atividade antibacteriana, antifúngica e antitumoral. Desta forma o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica e citotoxicidade de naftoquinonas semi-sintéticas em cepas de *Candida* isoladas da cavidade oral. As cepas estudadas foram de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*. A suscetibilidade das naftoquinonas semi-sintéticas foi testada inicialmente, através do teste difusão a partir de orifício no meio de cultura (*hole plate*). Posteriormente para uma análise quantitativa foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo. Padrões antifúngicos conhecidos foram usados, para comparação da atividade antifúngica. A citotoxicidade foi avaliada em hemácias de camundongos através do teste de hemólise e através do teste de viabilidade celular em fibroblastos, utilizando o Alamar Blue. A naftoquinona semi-sintética que apresentou melhor atividade antifúngica na técnica *hole plate* foi a NORALFA, seguida da IVS322 com médias do halo de inibição frente a *C. albicans* de 21,26 e 16,62 mm respectivamente, e na análise quantitativa da atividade antifúngica, as substâncias NORALFA e IVS322 se destacaram com CIM frente a *C. albicans* 0, 125 µg/ml e 0,5 µg/ml. Verificou-se que nenhuma das substâncias testadas a uma concentração de 50 µL/ml provocou hemólise e os fibroblastos testados permaneceram viáveis na concentração de 12,5 µL/ml. Este resultado é favorável, uma vez que o teste de hemólise é um parâmetro de toxicidade e um resultado positivo poderia impossibilitar o uso terapêutico dessas substâncias. Com a realização deste trabalho conseguimos determinar o potencial antifúngico e o perfil citotóxico das substâncias testadas.

**Palavras Chave:** *Candida*, naftoquinona semi-sintéticas, atividade antifúngica, citotoxicidade

## ABSTRACT

Candidiasis is an infectious disease caused by the fungus *Candida albicans* being the species most frequently at least seven species, has been associated with diseases in humans: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida stellatoidea*, *Candida pseudotropicalis* (now called *C. Kefyr*), *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii* and *Candida krusei*. There is an increased occurrence of infections by *Candida* species, caused by population growth that immunosuppression with high predisposition to develop infections. Also, there was an increased use of antifungal agents, where some *Candida* showed a decline in sensitivity to these agents. Increasing numbers of fungal strains are becoming resistant to the drugs available. As a result, there is a constant search for new antifungal drugs more effective and safer than existing ones. The naphthoquinones are widely distributed in nature, with the known activities, the antibacterial, antifungal and antitumor. Thus the objective of this study was to evaluate the antifungal activity and cytotoxicity of naphthoquinones semisynthetic in *Candida* strains isolated from the oral cavity. The strains studied were *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. tropicalis* and *C. dubliniensis*. The susceptibility of semi-synthetic naphthoquinones was tested initially by using the simple diffusion from the hole in the culture medium (hole plate), to obtain a quantitative analysis, and then for a quantitative analysis technique was used in broth. Patterns known antifungals were used, for comparison of antifungal activity. The semi-synthetic naphthoquinone that showed the best antifungal activity in the hole plate technique was NORALFA, followed by IVS322 with average of inhibition zone against *C. albicans* 21,26 mm and 16,62 mm respectively, and quantitative analysis of antifungal activity, substances NORALFA and IVS322 stood out with MIC against *C. albicans* 0,125 µg/ml and 0.5 µg/ml. It was found that none of the substances tested at a concentration of 50 µg/ml caused hemolysis and fibroblasts tested remained viable at a concentration of 12,5 µg/ml. This result is favorable, since the hemolysis test is a measure of toxicity and a positive result would preclude the therapeutic use of these substances. Through this work we determine the potential antifungal and cytotoxic profile of the compounds tested.

**Keywords:** *Candida*, semi synthetics naphthoquinones, antifungal activity, citotoxicity



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Prevalência das espécies de <i>Candida</i> em diferentes situações clínicas.....	17
<b>Tabela 2</b>	Atividade antifúngica de naftoquinonas semi-sintéticas, avaliados através do teste de microdiluição em caldo.....	44
<b>Tabela 3</b>	Avaliação da Concentração inibitória Mínima (CIM µg/ml) de naftoquinonas semi-sintéticas em espécies de <i>Candida</i> através do teste de microdiluição em caldo.....	47
<b>Tabela 4</b>	Avaliação da citotoxicidade de naftoquinonas semi-sintéticas a uma concentração de 12,5 µg/mL, aferindo a viabilidade de fibroblasto murino, pelo método de Alamar blue após 72h de tratamento.....	49
<b>Tabela 5</b>	Avaliação da atividade hemolítica das naftoquinonas semi-sintéticas, a uma concentração de 50 µg/mL.....	51

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estrutura química de antifúngicos disponíveis comercialmente.	25
<b>Figura 2</b>	Estrutura química das quinonas.....	27
<b>Figura 3</b>	Estrutura química das naftoquinonas semi-sintéticas.....	35
<b>Figura 4</b>	Preparação do inóculo das cepas de <i>Candida</i> .....	36
<b>Figura 5</b>	Técnica hole plate.....	37
<b>Figura 6</b>	Microplaca da técnica da microdiluição em caldo.....	39
<b>Figura 7</b>	Microplacas utilizadas na técnica de microdiluição em caldo.....	40
<b>Figura 8</b>	Teste de citotoxicidade em fibroblastos murino – Alamar Blue..	41
<b>Figura 9</b>	Microplaca utilizada na técnica de toxicidade em fibroblasto – Alamar Blue.....	41
<b>Figura 10</b>	Teste de atividade hemolítica em sangue de camundongo.....	43
<b>Figura 11</b>	A- substância 04A frente a <i>C. parapsislosis</i> , B- substância NORALFA frente a <i>C. kefyi</i> , C- substância 03A frente a <i>C. albicans</i> e D- substância NORALFA frente a <i>C. albicans</i> .....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Aids</b>	Síndrome de imunodeficiência adquirida
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>C.</b>	Candida
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CFU</b>	Unidade Formadora de Colônia
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>DMSO</b>	Dimetil Sulfóxido
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>INPA</b>	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sódio
<b>L</b>	Litro
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mol</b>	Molar
<b>mm</b>	Milímetro
<b>min</b>	Minutos
<b>ml</b>	Mililitros
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitro
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>ph</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>PBS</b>	Tampão fosfato
<b>rpm</b>	Rotação por minutos
<b>UFAM</b>	Universidade Federal do Amazonas

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
<b>2.1 Candidíase</b> .....	15
2.1.1 Etiologia e patogenicidade.....	15
2.1.2 Classificação.....	18
2.1.2.1 Candidíase aguda.....	18
2.1.2.2 Candidíase crônica.....	20
<b>2.2 Antifúngicos</b> .....	21
2.2.1 Agente polienos.....	21
2.2.2 Azóis.....	23
2.2.3 Naftoquinonas.....	26
2.2.4 Resistência a antifúngicos.....	28
<b>2.4 Ensaios de Toxicidade</b> .....	31
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	33
<b>3.1 Geral</b> .....	33
<b>3.2 Específicos</b> .....	33
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
<b>4.1 Modelo de Estudo</b> .....	34
<b>4.2 Naftoquinonas semi sintéticas</b> .....	34
<b>4.3 Testes antifúngicos</b> .....	34
4.3.1 Cepas fúngicas.....	34
4.3.2 Teste de difusão a partir de orifício no meio de cultura.....	35
4.3.2.1 Preparação dos inóculos de fungos leveduriformes.....	36
4.3.2.2 Inoculação das placas de teste.....	36
4.3.3 Testes de Microdiluição em Caldo.....	38
4.3.3.1 Preparação do Inóculo.....	38
4.3.3.2 Testes de Microdiluição.....	38
4.3.3.3 Incubação.....	39
4.3.3.4 Determinação dos Pontos Finais da CIM.....	39
<b>4.4 Teste de citotoxicidade em fibroblastos</b> .....	40
<b>4.5 Teste de atividade hemolítica</b> .....	42
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	52

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>53</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>60</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A candidíase é uma doença infecciosa causada por uma levedura, *Candida albicans*, embora também possam ser agentes etiológicos desta patologia outras espécies, tais como, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* (FALCÃO et al., 2004; ZUNT, 2000; CANDIDO et al., 2000). Costa et al., em 2009 afirmam que vinte espécies de *Candida* são reconhecidas como importantes patógenos. No entanto *C. albicans* é a mais comum, seguidas de *C. tropicalis* e *C. glabrata* representando mais de 80% das cepas isoladas das infecções clínicas. A quantidade de leveduras na lesão é normalmente alta, e geralmente, mais de uma espécie é isolada (CANDIDO et al., 2000).

A frequência de infecções por espécies de *Candida* vem se tornando cada vez mais comum. Isto se deve à fatores como tratamentos com antimicrobianos de amplo espectro, uso de nutrição parenteral, cateteres intravenosos, entubação endotraqueal e outros. A maior frequência ocorre em pacientes com predisposição de base como neonatos, pacientes com patologia oncológica, quimioterapia, terapia imunossupressora ou submetidos a cirurgias de grande porte (ZARDO, 2004).

Vários medicamentos antifúngicos já estão consagrados no tratamento da candidíase, porém a resistência primária de leveduras à derivados azóis, especialmente ao fluconazol, é um fenômeno que vem emergindo (SANTOS JR. et al., 2005). Consequentemente faz-se necessário a descoberta novas de substâncias que tenham atividade antifúngica, uma vez que as cepas estão se tornando resistentes ao antifúngicos conhecidos.

Nos últimos anos intensificou-se o interesse nas naftoquinonas, não só devido

à sua importância nos processos bioquímicos vitais, como também ao destaque cada vez maior que apresentam em variados estudos farmacológicos. As naftoquinonas são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em bactérias, fungos, animais e principalmente em vegetais. Pode-se citar algumas atividades biológicas conhecidas dessas substâncias como atividade antibacteriana, antiviral, antimalarial, antifúngica e antitumoral (SIMÕES et al., 2004; RIBEIRO et al, 2008).

Tendo em vista a utilização de naftoquinonas há vários séculos e a escassez de estudos relacionados ao seu potencial antifúngico frente a *Candida*, estudou-se a atividade antifúngica de naftoquinonas semi-sintéticas em cepas de *Candida*, e também a citotoxicidade dessas substâncias.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Candidíase

#### 2.1.1 Etiologia e patogenicidade

A candidíase é uma doença infecciosa causada pelo fungo *Candida*, sendo a espécie *albicans* a mais freqüente (ARAÚJO E ARAÚJO, 1994). Sete espécies ao menos, tem sido associadas a doenças no homem: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. pseudotropicalis* (hoje chamada de *C. Kefyr*), *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei*. (ESTEVES et al., 1990).

Sob diversas condições, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefy*, *C. glabrata* (antes chamada *Torulopsis glabrata*) e *C. parapsilosis* fazem parte da microbiota humana normal. Podem ser encontradas nas mucosas sadias, da cavidade oral, da vagina, do trato gastrointestinal e da região retal. Em torno de 80% da população, podem apresentar colonização dessas regiões na ausência de doença (MURRAY et al., 2003). Estes microorganismos comensais tornam-se patogênicos quando a defesa do hospedeiro é alterada. Essas alterações se dão por mudanças fisiológicas características da infância (prematuridade), envelhecimento, associadas à doenças degenerativas, neoplasias, imunodeficiências congênitas ou adquiridas, e imunodepressão induzida por atos médicos (COLOMBO;GUIMARÃES, 2003).

As leveduras são comuns na cavidade bucal de indivíduos saudáveis, sendo a *Candida albicans* a espécie predominante na cavidade bucal, constituindo 60 a 70% do total de isolamento, seguida pela *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Porém, Nguyen et al.,(1996) em seus estudos afirmam que a ocorrência de *C. glabrata* foi maior que a de *C. tropicalis*. Conforme Martins Neto et al., (2005), como a *C. albicans* está presente na população em geral, esse patógeno apresenta baixa patogenicidade, o



que confirma a necessidade de fatores predisponentes locais e sistêmicos para gerar um estado de doença (Tabela 1).

Os microrganismos do gênero *Candida*, são normalmente comensais, variando de 20% a 50% na população saudável dentada, e mais de 75% nos portadores de próteses dentárias, mas em alguns indivíduos em situações específicas, pode transformar-se na forma parasitária, produzindo candidoses bucais (JORGE et al., 1997; PEREZOUS et al., 2005). As próteses dentárias, podem, por mecanismos interativos, interferir ou colaborar para a evidenciação clínica ou subclínica de processos patológicos, como a candidíase, resultante da associação próteses-microrganismos (FALCÃO et al., 2004).

Algumas mudanças no meio bucal podem predispor ou precipitar a candidíase oral como: antibiótico, corticosteróides, xerostomia, diabetes mellitus, deficiência nutricional, doenças e tratamentos que causam imunodepressão (ZUNT et al., 2000; SCHERMA et al., 2004). Martins Neto et al., (2005) afirmam também, que a deficiência de ferro pode ser considerada um fator predisponente a *Candida* se tornar patogênica, uma vez que a infecção por *Candida albicans* atinge preferencialmente locais que sofrem efeito distróficos da carência de ferro, como: língua, comissuras labiais e unhas das mãos.

Há um aumento da ocorrência das *Candida* não-*albicans*, primeiramente pode-se citar como causa, o crescimento da população com imunodepressão com grande predisposição ao desenvolvimento de infecções, em particular àqueles que recebem quimioterapia e àqueles que se submeteram à transplantes. E também, houve um aumento do uso de antifúngicos, onde algumas *Candida* não-*albicans* apresentaram um declínio da sensibilidade à esses agentes (COLLIN et al., 1999). Segundo Perezous et al., (2005), as *Candida* não-*albicans* são responsáveis por

46% das infecções sistêmicas, *Candida tropicalis* por 25% das infecções, *C. glabrata* por 8%, *C. parapsilosis* por 7%, e *Candida krusei* por 4 %.

Outra espécie de *Candida* recentemente conhecida é a *C. dubliniensis*, que possui características semelhantes a *C. albicans*, mas, causa principalmente, candidíase oral em pacientes com AIDS. No Brasil o primeiro relato de identificação desta levedura foi em 1999 (ALVES et al., 2000).

Tabela 1

Prevalência das espécies de *Candida* em diferentes situações clínicas

Incidência de espécies de <i>Candida</i>	Situações clínicas	Referências
<i>C. albicans</i> > <i>C. tropicalis</i> , > <i>C. glabrata</i> > <i>C. krusei</i> > <i>C. guilliermondii</i>	Saudáveis	Candido et al., 2000
<i>C. parapsilosis</i> > <i>C. krusei</i> > <i>C. glabrata</i>	Com candidemia	Nguyenb et al., 1996
70% de <i>C. albicans</i> , 21 % de não- <i>albicans</i> ( <i>C. dubliniensis</i> > <i>C. krusei</i> > <i>C. inconspícua</i> > <i>C. tropicalis</i> > <i>C. guilliermondii</i> > <i>C. fomata</i> )	HIV	Rodrigues et al., 2007
<i>C. albicans</i> > <i>C. tropicalis</i>	Lactante com 4 meses	Scherma et al., 2004
<i>C. albicans</i> > <i>C. tropicalis</i> > <i>Candida parapsilosis</i> > <i>C. glabrata</i>	Com candidemia	França et al., 2008
<i>C. albicans</i> > <i>C. tropicalis</i> > <i>C. glabrata</i> > <i>C. guilliermondii</i> > <i>C. lusitanaeae</i> > <i>C. krusei</i> > <i>C. kefir</i> > <i>C. lipolytica</i> > <i>C. parapsilosis</i> > <i>C. famata</i>	Saudáveis	Jorge et al., 1997
<i>C. albicans</i> > <i>C. krusei</i> > <i>C. tropicalis</i> > Outras espécies	Com candidíase mucosa ou cutânea	Crocco et al., 2004
<i>C. albicans</i> > <i>C. tropicalis</i> > <i>C. glabrata</i> > <i>C. parapsilosis</i> > <i>C. krusei</i> > <i>C. kefir</i> > <i>C. lipolytica</i>	Pacientes HIV positivos usuários de próteses dentárias	Perezous et al., 2005

Em pacientes soropositivos para o HIV, a ocorrência de candidíase mucosa é comum, sendo a *C. albicans* a espécie responsável por 85% das infecções, porém

algumas espécies emergentes de “não-*albicans*” já são encontradas com certa frequência como a *C. dubliniensis* e a *C. glabrata*, e apresentam resistência a alguns antifúngicos (RODRIGUES et al., 2007).

Rodrigues et al., (2007), identificaram duas cepas de *C. dubliniensis* de dois pacientes HIV sendo que: ambos eram usuários de prótese dentária, um deles havia sido submetido à terapêutica antifúngica e não recebia terapia anti-retroviral, enquanto o outro, nunca fizera uso de antifúngicos, mas estava sob terapia anti-retroviral há dez anos. Desta forma, a presença do vírus HIV, somada ao uso de antifúngicos e/ou retrovirais, em especial entre os usuários de próteses dentárias, é referida como predisponente à colonização por *C. dubliniensis*.

Regezi; Sciubba (2000) afirmam que, conforme mostram as evidências da presença de *Candida albicans* na maioria da população, esse patógeno apresenta baixa patogenicidade, o que confirma a necessidade de fatores predisponentes locais e sistêmicos para gerar um estado mórbido.

## **2.1.2 Classificação**

### **2.1.2.1 Candidíase aguda**

Candidíase aguda pseudomembranosa é a forma mais comum e é conhecida como sapinho. Os extremos da infância e da velhice são afetados com frequência, sendo da mesma forma afetados os imunodeprimidos em geral (MARTINS NETO et al., 2005; REGEZI; SCIUBBA, 2000). Caracteriza-se pelo aparecimento de pseudo-membranas branco-acinzentadas ou amareladas semelhantes a nata de leite mole, isoladas ou confluentes, de tamanho variável, aderentes a mucosa, ligeiramente elevadas, às vezes rodeadas por halos eritematosos (LACAZ et al., 2002; TRABULSI, 1998; NEVILLE et al., 2004). Essas

placas são compostas por fungos, resíduos ceratóticos, células inflamatórias, células epiteliais descamadas, bactérias e fribrina (REGEZI; SCIUBBA, 2000), e são facilmente removidas deixando o local com aparência normal, hiperêmico, ou com a superfície mucosa erosada (ZUNT et al., 2000).

As localizações onde ocorre com maior frequência são: mucosa jugal e língua, mas também são vistas no palato, gengiva e assoalho da boca, porém, em casos graves, toda a boca pode estar envolvida (MARTINS NETO et al., 2005). Na maioria dos casos apresenta-se com sintomas leves, consistindo em sensação de queimação e gosto desagradável, descrito como salgado ou amargo (NEVILLE et al., 2004).

A candidíase atrófica aguda também conhecida como eritematosa, muitas vezes pode ser resultado da persistência da candidíase pseudomembranosa, onde esta resulta na perda da pseudomembrana, com apresentação de uma lesão vermelha mais generalizada (MARTINS NETO et al., 2005), dispersa pela mucosa, dolorosa, sendo freqüente o seu relacionamento com o uso de antibióticos (TRABULSI, 1998). Alves et al., (2000), em seus estudos afirmam que a *C. dubliniensis* também está associada à forma eritematosa, sendo mais freqüente em episódios recorrentes.

Este tipo de candidíase, normalmente acomete o dorso da língua, palato duro e palato mole. Nesta forma de candidíase, as lesões evoluem de maneira assintomática, sem dor ou desconforto para o paciente, podendo causar ardência durante a ingestão de alimentos ácidos ou quentes (TOMASI, 2002). Em geral essa sensação de ardência é acompanhada pela perda difusa das papilas filiformes da superfície dorsal da língua, resultado em uma língua avermelhada, “careca” (NEVILLE et al., 2004).

### 2.1.2.2 Candidíase crônica

Candidíase crônica atrófica (estomatite por dentadura) ocorre em até 65% dos pacientes geriátricos que usam prótese dentária completa superior. O aparecimento desta forma de candidíase depende da mucosa estar recoberta por uma prótese. Normalmente acomete a mucosa palatina, sendo menos comum a aparição na arcada inferior (MARTINS NETO et al., 2005). Esta forma de candidíase caracteriza-se por eritema, podendo ou não ser acompanhados por petéquias hemorrágicas, localizadas na área que entra em contato com próteses removíveis superiores (NEVILLE et al., 2004). Segundo Neville et al., (2004), ainda é discutível se este processo representa uma infecção por *C. albicans* ou seria uma resposta do tecido do hospedeiro aos vários microrganismos que colonizam por baixo da prótese.

Nos pacientes com candidíase atrófica relacionada com próteses totais removíveis, observa-se também, a queilite angular, que é encontrada em pacientes com dobras profundas nos ângulos da boca, caracterizada por fissuras ou linhas ulceradas, geralmente associadas a pequenas placas brancas, uni ou bilaterais. A *Candida albicans* é o fungo mais encontrado nestas lesões (FALCÃO et al., 2005; TOMASI, 2002). Outra característica da queilite angular é a formação de pequenas dobras de pele ao nível da comissura em consequência da perda da dimensão vertical. É uma infecção fúngica intertriginosa, cuja cura depende da restauração da dimensão vertical correta, e algumas vezes pode estar associada a carência nutricional, como fosfato, ferro, vitamina B12, e deficiência de riboflavina (ZUNT et al., 2000; GUIMARÃES, 1982).

Candidíase crônica hipertrófica / hiperplásica apresenta-se como placas brancas ou amareladas, com aspecto clínico semelhante à candidíase

pseudomembranosa, sendo a principal diferença é que as placas não conseguem ser removidas com raspagem (TOMASI, 2002). É uma lesão geralmente assintomática, tendo como localização habitual o dorso da língua, bordo lateral da língua e podendo estar presente em qualquer outro lugar da cavidade bucal, inclusive no palato, não podendo ser distinguida clinicamente de uma leucoplasia comum (MARTINS NETO et al., 2005).

A candidíase mucocutânea é caracterizada pela persistência da candidíase simultaneamente na pele, unhas e mucosas. Esta forma de candidíase é resistente a antifúngicos, com remissão temporária e geralmente está relacionada a defeitos imunológicos. (MARTINS NETO et al., 2005; NEVILLE et al., 2004; REGEZI; SCIUBBA, 2000).

## **2.2 Antifúngicos**

### **2.2.1 Agentes polienos**

O principal fármaco na terapia antifúngica, a anfotericina B (1, Figura 1) , foi utilizado pela primeira vez há quase 50 anos (RANG et al., 2004). A anfotericina B foi o primeiro antibiótico ativo no tratamento da maioria das micoses profundas; é um antibiótico obtido a partir de culturas de um estreptomiceto, o *Streptomyces nodosus* e provoca um efeito fungistático e fungicida. Apesar de sua elevada toxicidade, a droga revelou-se eficaz contra infecções micóticas que antes de seu descobrimento apresentavam elevado índice de letalidade. Apesar da introdução de derivados imidazólicos, de baixa toxicidade e ação antifúngica sistêmica, a anfotericina B permanece na linha de frente contra as micoses disseminadas graves, especialmente com hospedeiro imonodeprimido (TAVARES, 1996). Porém casos de insucesso terapêutico com anfotericina B tem sido relatados, bem como de espécies

de *Candida* resistentes a esse fármaco (BOFF et al., 2008).

O mecanismo da ação antifúngica da anfotericina B resulta de sua ligação ao ergosterol, um componente da membrana celular de fungos sensíveis. Esta ligação forma canais na membrana celular, alterando a sua permeabilidade e produzindo extravasamento de íons de sódio, potássio e hidrogênio. A resistência a anfotericina B está associada a uma substituição do ergosterol por outros esteróis na membrana plasmática dos fungos (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004; YAGIELA et al., 2000).

A anfotericina B apresenta utilidade clínica contra *Candida* spp., *Candida glabrata*, sendo que algumas amostras de *Candida lusitaniae* parecem ser relativamente resistentes a esse antifúngico (HARDMAN et al., 1996).

Também descoberta na década de 50, a nistatina (2, Figura 1) é um antibiótico extraído de culturas do *Streptomyces noursei* (TAVARES, 1996), chamou-se primeiro fungicidina. Ativa sobre várias espécies patogênicas, sobretudo dos gênero *Candida*, *Torulopsis* e *Geotrichum* que em regra não desenvolvem resistência (ESTEVES et al., 1990). A nistatina mostra-se eficaz contra a maioria das espécies de *Candida* e é mais comumente utilizada para supressão de infecção locais por *Candida* (KATZUNG, 2006). Assim como a anfotericina, a nistatina é mal absorvida pelo trato gastrointestinal; sendo assim, para a eficácia do tratamento, necessita-se de contato direto com microrganismos, tornando necessária doses diárias que exponha a levedura à droga (NEVILLE et al., 2004).

O mecanismo de ação da nistatina se assemelha ao da anfotericina B. In vitro, algumas espécies de *Candida*, como a *Candida tropicalis*, podem desenvolver resistência à nistatina; porém, raramente observa-se a ocorrência de resistência em condições clínicas (YAGIELA et al., 2000).

### 2.2.2 Azóis

São compostos sintéticos que são classificados em imidazóis ou triazóis, de acordo com o número de átomos de nitrogênio no anel azol de cinco membros (KATZUNG, 2006). Os triazóis sistêmicos são metabolizados mais lentamente e têm um efeito menor sobre a síntese de esteróis humanos que os imidazóis (GOODMAN;GILMAN, 1996).

O mecanismo de ação dos azóis baseia-se na inibição da esterol-14-alfa-desmetilase, um sistema enzimático microssomal dependente do citocromo P450, prejudicando a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática e levando ao acúmulo de 14-alfa- metilesteróis. Esses metilesteróis não possuem a mesma forma e propriedades físicas que o ergosterol e levam à formação da membrana com propriedades físicas alteradas, que não desempenha as funções básicas necessárias ao desenvolvimento do fungo ( BERGOLD ; GEORGIADIS, 2004 ; HITCHCOCK et al., 1993).

Os agentes antifúngicos derivados do imidazol foram descobertos na década de 70, representando um avanço no tratamento das candidíases. Estes são considerados menos tóxicos que a anfotericina B, apresentam largo espectro de atividade e alguns deles podem ser administrados por via oral para exercer ação sistêmica; as drogas mais utilizadas são o clotrimazol e cetoconazol. Os agentes antifúngicos triazóis utilizados para tratamento de candidíase são o fluconazol e itraconazol (BATISTA et al., 1999; NEVILLE et al., 2004).

O cetoconazol foi o primeiro antifúngico azol oral introduzido para uso clínico (KATZUNG, 2006). Foi a primeira droga antifúngica desenvolvida que pode ser absorvida pelo trato gastrintestinal, favorecendo o tratamento sistêmico pela administração por via oral (NEVILLE et al., 2004). O cetoconazol (**3**, Figura 1)



mostra-se eficaz para o tratamento de candidíase oral em pacientes com AIDS avançada, porém deve ser reservado para casos refratários a outros agentes antifúngicos. O desenvolvimento de resistência adquirida aos imidazóis não tem sido um problema clinicamente significativo; porém, pode-se verificar o aparecimento de resistência na *C. albicans* (YAGIELA et al., 2000).

O espectro antifúngico e o mecanismo de ação do clotrimazol (**4**, Figura 1) assemelham-se aos do cetoconazol e dos outros derivados imidazólicos. Embora seja restrito a uso tópico, existe uma preparação comercializada especificamente adequada para aplicação intra-oral (YAGIELA et al., 2000). As pastilhas orais de clotrimazol são disponíveis para o tratamento de candidíase oral e constituem uma alternativa da nistatina de sabor agradável (KATZUNG, 2006). Este antifúngico não é bem absorvido, devendo ser administrado várias vezes ao dia.

O fluconazol é quase completamente absorvido no trato gastrointestinal, não sendo necessário um meio ácido para absorção (GOODMAN; GILMAN, 1996; NEVILLE et al., 2004). É a droga de escolha para o tratamento sistêmico da candidíase (YAGIELA et al., 2000). Devido à menor interação com as enzimas hepáticas e melhor tolerância gastrointestinal, o fluconazol (**5**, Figura 1) apresenta o maior índice terapêutica dos azóis, permitindo uma posologia mais agressiva no tratamento de uma variedade de infecções fúngicas (KATZUNG, 2006). Segundo Goodman;Gilman (1996), não foi descrita a eficácia no tratamento da candidíase profunda em pacientes gravemente neutropênicos, porém Santos Jr et al., (2005) afirma que este antifúngico tem se mostrado efetivo em candidíase oral e esofagiana de paciente com AIDS, infecções na medula óssea e em pacientes transplantados renais.

O fluconazol tem amplo espectro de ação, incluindo espécies de *Candida*. É

ativo contra *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* nas cepas de *Candida krusei* e *Candida glabrata* são menos sensíveis. Isso se dá pelo uso aumentado desta droga (KRCMERY; BARNES, 2002; SANTOS JR et al., 2005). Já a *Candida dubliniensis* segundo Rodrigues et al., (2007) apresenta rápida resistência quando exposta a esse antifúngico.

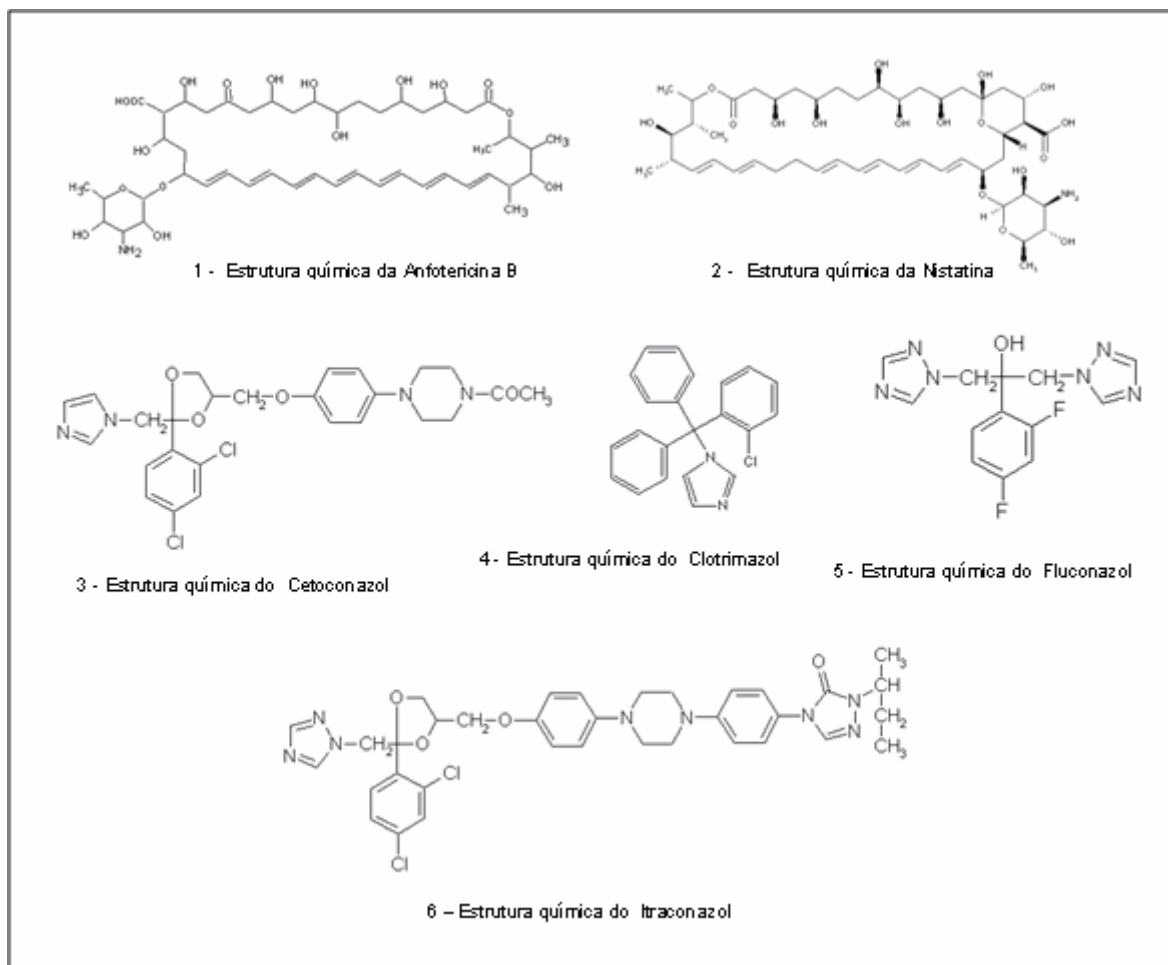


Figura 1 - Estrutura química de antifúngicos disponíveis comercialmente

O itraconazol ( **6**, Figura 1) possui o espectro mais amplo de atividade antifúngica e efeito clínico mais rápido em comparação com o cetoconazol. Assim como o cetoconazol, é bem absorvido no trato gastro intestinal (YAGIELA et al., 2000). À semelhança de outros azóis lipossolúbeis, o itraconazol interage com as

enzimas microssômicas hepáticas, embora em menor grau que o cetoconazol. Apesar de apresentar uma potente atividade antifúngica, a sua eficácia pode ser limitada pela sua biodisponibilidade reduzida (KATZUNG, 2006).

Recentemente, a solução de itraconazol foi aprovada para o tratamento de candidose orofaríngea e parece ter eficácia equivalente ao clotrimazol e fluconazol (NEVILLE et al., 2004).

### **2.2.3 Naftoquinonas**

Atualmente, a classe das quinonas tem despertado interesse dos pesquisadores uma vez que cada esta classe tem demonstrado várias atividades biológicas. Com base na sua estrutura molecular, as quinonas são divididas em diferentes grupos, utilizando-se como critério o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinonoídico: benzoquinonas – um anel benzênico (**1**, Figura 2); naftoquinonas - um anel naftalênico (**2**, Figura 2); antraquinonas- um anel antracênico linear ou angular (**3**, Figura 2) (SILVA et al., 2003). Os detalhes químico-estruturais das naftoquinonas estão diretamente relacionados com a potência da atividade, seja como antimicrobiano, antineoplásico ou de toxicidade, podendo ser inativado pela simples retirada de um metileno da cadeia isoprenóide (ARAÚJO et al., 2002).

Os primeiros relatos da utilização pelo homem de extratos de plantas que possuem naftoquinonas datam do Egito (cerca de 4000 anos). O extrato da folha de *Lawsonia inermis* que contém a lawsona era empregado como cosmético, sendo utilizado na pintura de cabelos, pele e unhas. Posteriormente, o extrato também passou a ser aproveitado no tratamento de micoses e feridas (MEDINA, 2006).

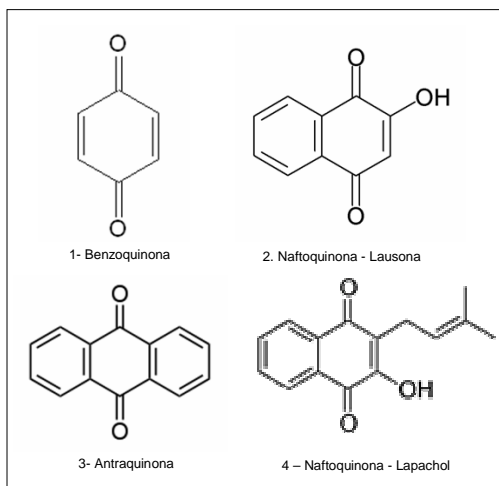


Figura 2 – Estrutura química das quinonas

Segundo Medina (2006), as naftoquinonas e seus derivados, de um modo geral, são antimicrobianos de amplo espectro de ação frente a microorganismos procarióticos, inibindo bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, incluindo isolados meticilina resistente. Quanto a sua atividade antiviral este autor afirma também que vem sendo identificados compostos capazes de inibir enzimas virais como protease do HIV, *Herpes simplex*, citomegalovirus e a integrase do HIV.

McMillan et al., (2004) afirmam que a lawsona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona), é o ativo ingrediente de henna (*Lawsonia alba*), sendo as folhas secas utilizadas como um corante cosmético. Aplicação de henna pode induzir uma anemia hemolítica grave, e a lawsona é indicada como o principal agente causal. Administração de lawsona em ratos foi utilizada para induzir uma resposta hemolítica, que está associada a danos oxidativos aos eritrócitos. No entanto, a exposição direta dos eritrócitos isolados à lawsona não provoca dano oxidativo, sugerindo que a lawsona deve ser submetida extra-eritrocitário bioatividade *in vivo*.

Outra naftoquinona amplamente conhecida é o lapachol (4, Figura 2), que é comumente extraído do gênero de *Tabebuia* da família Bignoniaceae. Em ratos, o

lapachol possui atividades antiinflamatórias em processos agudos, promove proteção significativa contra úlceras gástricas e duodenais em ratos; em humanos possui atividade antineoplásica, antimicrobiana e em ensaios clínicos o lapachol se mostrou eficaz contra bursites, tendinites, otite e sinusite agudas e crônicas (OLIVEIRA et al., 1990; JÁCOME et al., 1999; ARAÚJO et al., 2002).

Segundo Velásquez et al., (2006), a presença de naftoquinonas tem sido reportada em muitas espécies de *Tabebuia*, e se conhece que as naftoquinonas são ativas biologicamente frente a fungos patógenos. Em sua pesquisa, confirmaram a atividade antifúngica de naftoquinonas extraídas da *Tabebuia serratifolia*, frente aos fungos *Gloeophyllum trabeum* e *Trametes versicolor*.

Silva et al., (2003) citam a importância das quinonas, especialmente de benzoquinonas, naftoquinonas e antraquinonas, uma vez que um grande número de drogas neste grupo possuem aplicações práticas reconhecidas. Algumas, inclusive, chegaram a produção industrial, como por exemplo, as vitaminas K6, as mitomicinas e as antraciclina. Já Moreira et al., (2006) em seus estudos, relatam atividade de outras quinonas como a antraquinona e tectoquinona, e afirmam que estas substâncias possuem atividades antifúngica, bactericida e são repelentes a ataques de insetos.

#### **2.2.4 Resistência à antifúngicos**

As infecções fúngicas humanas têm demonstrado um aumento nos últimos anos, sendo as dermatomicoses as principais responsáveis por esse aumento. Os fungos responsáveis por essas infecções são fungos patógenos ou fungos patógenos oportunistas (FENNER et al., 2006).

O mecanismo de resistência da *C. albicans* aos azóis ocorre de duas

maneiras: resistência causada pela diminuição da suscetibilidade do P-450 ao azol, enzima alvo na biossíntese de ergosterol, ou pela resistência da permeabilidade nas células que são incapazes de captar a droga (HICTHCOCK et al., 1993).

Crocco et al., (2004), afirmam que muitas espécies não *albicans* mais comumente isoladas são menos susceptíveis aos derivados azólicos, dificultando o tratamento dessas infecções. Embora a susceptibilidade das leveduras do gênero *Candida* aos antifúngicos disponíveis seja variável, nem sempre uma determinada amostra isolada segue o padrão geral. Essa é uma das razões da crescente importância dos testes de suscetibilidade.

A resistência primária de leveduras a derivados azóis, especialmente ao fluconazol, é um fenômeno que vem emergindo (SANTOS JR. et al, 2005). A importância de realizar cultivo e identificação de cepas isoladas, exclui o feito de que algumas espécies de *Candida* são resistentes naturais a certos imidazóis, como por exemplo *C. krusei*, que é resistente natural ao fluconazol, apesar de que outra leveduras como *C. tropicalis* e *C. glabrata* apresentam uma maior resistência aos azóis em geral. Se pensa que o uso prévio de imidazóis, especialmente o fluconazol, poderia efetuar uma seleção destas espécies resistentes, também podendo induzir a aparição de cepas mutantes de *C. albicans* resistentes a terapia (PANIZO; REVIÁKINA, 2001).

Os azóis como o fluconazol (oral e intravenoso) e o miconazol (tópico) são usados no tratamento e profilaxia da maioria das infecções por *C. albicans*. Enquanto os azóis tem uma pequena ou nenhuma toxicidade neles se encontra geralmente menor atividade fungicida. Conseqüentemente, em pacientes imunodeprimidos os azóis devem ser administrados por longos períodos de tempo. Esta prática, combinada com a aumento do uso dos azóis, atualmente, é

responsável pelo aumento do isolamento de cepas de *C. albicans* azóis-resistentes e de algumas espécies de *Candidas* apresentarem resistência intrínseca aos azóis, como a *C. glabrata* e *C. krusei* (HENRY et al., 2000).

Como visto, *C. glabrata* e *C. krusei* naturalmente apresentam sensibilidade reduzida ao fluconazol, entretanto, tem-se observado taxas de restistência para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. França et al., (2008) em seus estudos, entre os 51 isolados de *Candida*, cuja suscetibilidade a antifúngicos foi analisada, três *C. glabrata* mostraram suscetibilidade dose-dependente ao fluconazol e resistência a itraconazol, um isolado de *C. krusei* apresentou suscetibilidade dose-dependente ao fluconazol e um isolado de *Candida pelliculosa* suscetibilidade dose-dependente ao itraconazol.

Nguyen et al.,(1996) em seus estudos sobre candidemia, relatam a ocorrência desta em pacientes que estavam fazendo tratamento com fluconazol. E em relação a anfotericina B, os mesmos autores, afirmam que a resistência a esse agente é considerada rara nas espécies de *Candida*, porém o aumento da CIM da anfotericina B foi notado para *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C.lusitaniae*, e *C. glabrata* isoladas de pacientes que receberam terapia prolongada com anfotericina B.

O uso de profilaxia antifúngica com azóis, principalmente fluconazol e itraconazol é um procedimento padrão para prevenção de infecções. No entanto, tem sido demonstrado que aquelas células de *C. albicans* que foram expostas aos azóis, estão protegidas de uma subsequente morte se expostas a anfotericina B (DE LOGU et al., 2005).

Estudando a fungemia de *C. krusei*, Abbas et al., (2000), afirmam que esta patologia vem aumentando substancialmente a partir do começo da década de 90. A

*C. krusei* é inerentemente resistente ao fluconazol e, o aumento da infecção vem sendo atribuída ao uso do fluconazol, especialmente em profilaxia antifúngica. Estes autores afirmam também que a fungemia pela *C. krusei* dobrou de 5% em 1989 a 1992, para 10% em 1993 para 1996.

Diversos fungos presentes no meio ambiente ou integrantes da microbiota normal, podem em determinadas situações passarem de sapróbios a patogênicos, provocando quadros clínicos variáveis. Números cada vez maiores de cepas fúngicas estão se tornando resistentes aos fármacos antifúngicos já existentes. Felizmente a resistência a fármacos não é transferível nos fungos. Outro problema é representado pelo aparecimento de novas cepas de fungos comensais que se tornam patógenos (RANG et al., 2004). Em virtude disso, existe uma constante procura de novos fármacos antifúngicos mais eficazes, e mais seguros que os já existentes.

#### **2.4 Ensaio de citotoxicidade**

Ensaio *in vitro* em cultura de células são usados para avaliar a relação entre o efeito terapêutico versus toxicidade. Várias técnicas *in vitro* foram desenvolvidas para avaliações de citotoxicidade de drogas. Existem diversas técnicas para análise da citotoxicidade *in vitro* que permitem com maior rapidez a identificação de compostos tóxicos e podem ser utilizadas para os estudos de mecanismos de toxicidade em nível celular e subcelular (SILVA et al., 2004).

Segundo Rogero et al., (2003), vários métodos tem sido padronizados para avaliar a toxicidade de substâncias, utilizando culturas celulares. Estes testes consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre



os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares.

O Alamar Blue, recentemente identificado como resazurina (O'BRIEN et al., 2000), é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Como com os sais de tetrazólio, o alamar Blue reduz-se em células em proliferação. A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável). Este foi inicialmente utilizado para indicar crescimento e/ou viabilidade celular no monitoramento de proliferação de linfócitos (AHMED et al., 1994) e atualmente apresenta várias aplicações.

Pode-se citar também como um teste para avaliar a citotoxicidade, o teste da atividade hemolítica, onde este mede o potencial das substâncias em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total da membrana (DRESCH et al., 2005).

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antifúngico e a citotoxicidade de naftoquinonas semi-sintéticas em cepas de *Candidas* isoladas da cavidade oral.

### 3.2 Objetivos específicos

2.2.1 Avaliar qualitativamente o potencial antifúngico de naftoquinonas semi-sintéticas em cepas de *Candida* através da técnica *hole plate*.

2.2.2 Verificar a capacidade inibitória mínima pelo método de microdiluição em caldo das naftoquinonas semi-sintéticas nas cepas de *Candida* provenientes da cavidade oral.

2.2.3 Investigar a citotoxicidade de naftoquinonas semi-sintéticas pela atividade hemolítica, e em fibroblastos murino.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Modelo de estudo

Tratou-se de um estudo experimental da citotoxicidade de naftoquinonas semi-sintéticas no qual foi feita a verificação da atividade antifúngica inicialmente através da técnica *hole plate* e posteriormente pela técnica de microdiluição em caldo, e avaliação da toxicidade em fibroblastos murino e através do teste de atividade hemolítica.

### 4.2 Naftoquinonas semi-sintéticas

As naftoquinonas estudadas no presente trabalho (Figura 3) foram cedidas pelo Dr. Vitor Francisco Ferreira do Departamento de Química Orgânica, da Universidade Federal Fluminense. As mesmas foram sintetizadas por metodologia própria a partir da lawsona, isoladas e caracterizadas por métodos espectroscópicos (GAMA, 2008).

### 4.3 Testes antifúngicos (Norma M27-A2 do NCCLS)

#### 4.3.1 Cepas Fúngicas

As cepas fúngicas estudadas foram cedidas pela Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura, pesquisadora da FioCruz – Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane/AM. As cepas foram de *Candida albicans* NFVS9, *Candida krusei* LGM38, *Candida parapsilosis* SML35-2, *Candida kefyr* NAV70-3, *Candida tropicalis* ORSO5P-2, *Candida dubliniensis*. Estas cepas foram identificadas por testes bioquímicos, onde foi usado o kit de identificação Candifast® (International Microbio), através de teste morfológico, em agar fubá com Tween 80 (microcultivo) e por biologia molecular, sendo utilizado o Kit de Biologia Molecular que está em processo de patenteamento,

desenvolvido pelo grupo coordenado pela Dra. Adriana Sotero Martins da FIOCRUZ.

Foram utilizadas também cepas ATCC de *Candida albicans* 90028, para assegurar a atividade das substâncias e a reprodutibilidade dos resultados.

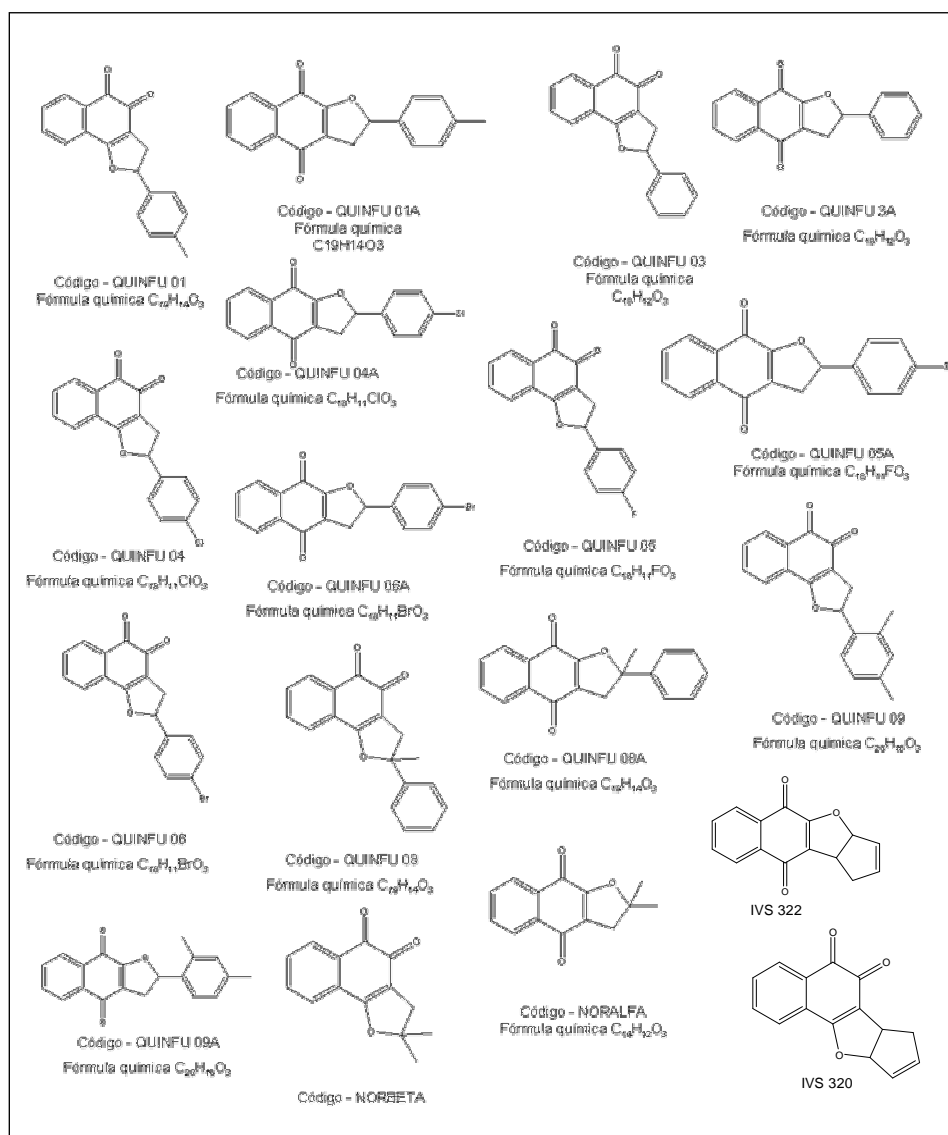


Figura 3. Estrutura química das naftoquinonas semi-sintéticas testadas

#### 4.3.2 Teste de difusão a partir de orifício no meio de cultura (*hole plate*)

A suscetibilidade das naftoquinonas semi-sintéticas foi testada inicialmente, através do teste difusão a partir de orifício no meio de cultura (*hole plate*) (CORDEIRO et al., 2006).

#### 4.3.2.1 Preparação dos inóculos de fungos leveduriformes

Para o preparo do inóculo foram utilizadas as cepas *Candida* já citadas. Os fungos foram repicados em tubos estéreis com ágar Sabourau dextrose, executando passagens para assegurar sua pureza e viabilidade. A temperatura de incubação foi de 35° C por 24 horas . Após a incubação, foram transferidas para um tubo estéril contendo 5 ml de solução salina estéril 0,145 mol/L (8,5g/L NaCl; salina a 0,85%) 5 colônias de aproximadamente 1mm de diâmetro. Esta suspensão foi colocada para agitar durante 15 segundos em um agitador de vórtex, e a densidade celular medida por um espectrofotômetro obtendo-se a transmitância equivalente de uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5 em comprimento de onda de 530 nm. Desta forma o procedimento forneceu uma suspensão-padrão de levedura contendo  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células por mL (Figura 4).

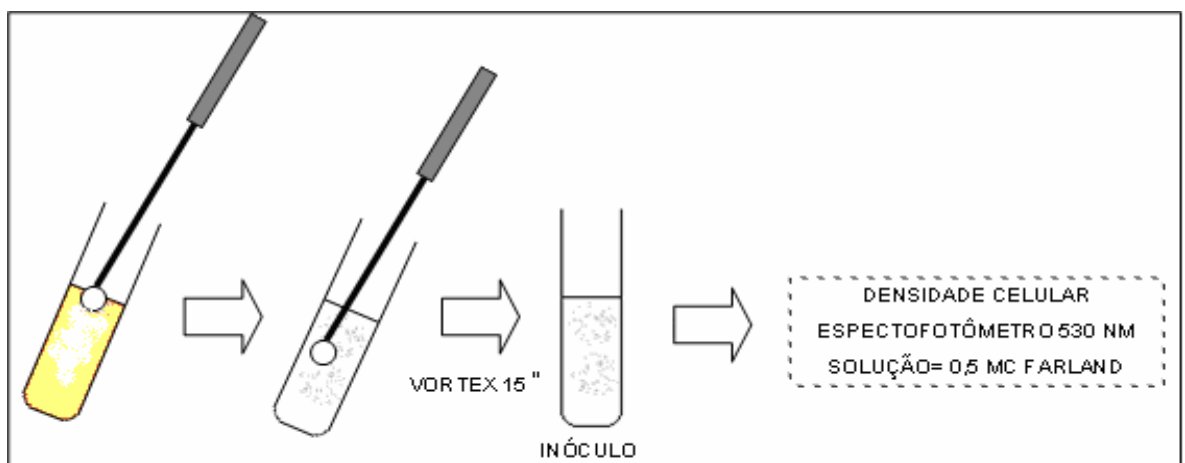


Figura 4. Preparação do inóculo

#### 4.3.2.2 Inoculação das placas de teste

Foi utilizado um swab de algodão estéril onde este foi mergulhado na suspensão ajustada, até 15 minutos após ajustar a turbidez da suspensão de inóculo. O swab foi girado várias vezes e apertado firmemente contra a parede

interna do tubo, acima do nível do líquido.

A superfície seca da placa de ágar foi inoculada esfregando o swab em toda a superfície. Este procedimento foi repetido outras três vezes, girando a placa aproximadamente 60° cada vez, com intuito de garantir uma distribuição homogênea do inóculo. Como passo final, passou-se o swab na margem da placa de agar Saboutau dextrose.

Logo após, foram utilizadas placas semeadas, onde foram feitos 4 orifícios de 6 mm de diâmetro com auxílio de pipeta Pasteur estéril. Em 3 orifícios foram colocados 20 µL das substâncias com concentração de 250 µg/mL, e em 1 orifício foi colocado 20 µL de DMSO. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após a incubação foi realizada a leitura com um paquímetro, medindo-se o halo de inibição do crescimento fúngico (Figura 5). Foram utilizadas substâncias padrão, como fluconazol e itraconazol, para comparação da atividade antifúngica (CORDEIRO et al., 2006).

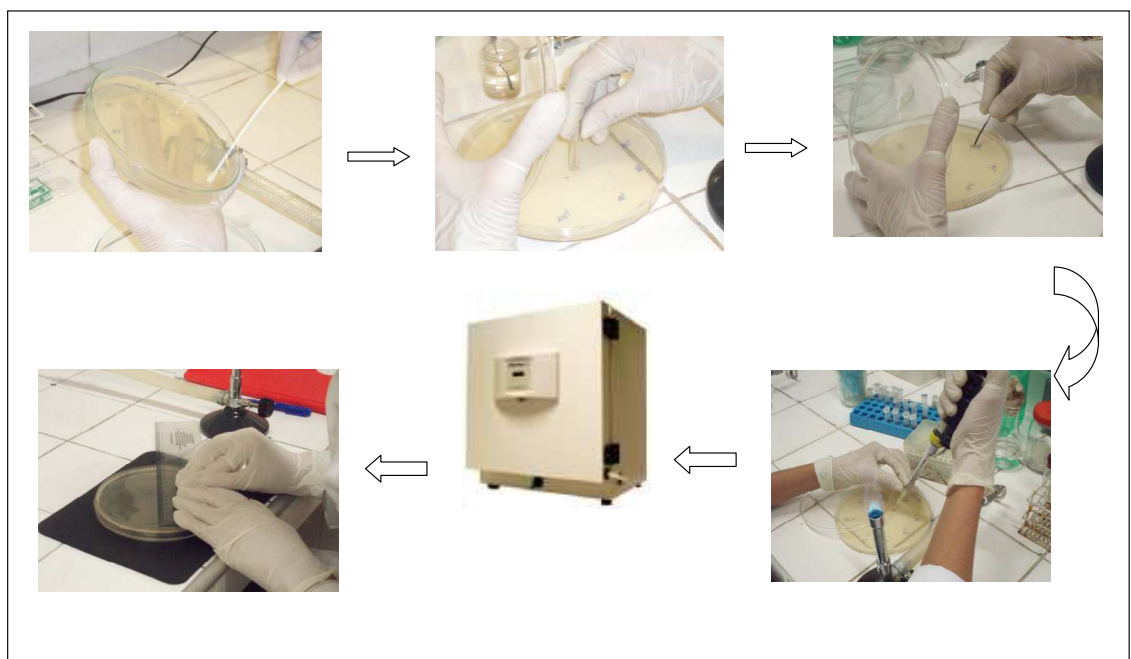


Figura 5. Técnica hole plate  
Fonte: BASTOS, (2007)

### **4.3.3 Testes de Microdiluição em Caldo (NCCLS)**

#### **4.3.3.1 Preparação do Inóculo**

Os inóculos foram preparados conforme citado no item 4.3.2.1. A suspensão padrão de levedura foi agitada durante 15 segundos em vórtex, diluída 1:50 e depois 1:20 com o meio de cultura, para se obter o inóculo duas vezes concentrado usado no teste (de  $1 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  CFU/mL). O inóculo concentrado foi diluído a 1:1 quando os poços foram inoculados, chegando à concentração final de (de  $0,5 \times 10^3$  a  $2,5 \times 10^3$  CFU/mL).

#### **4.3.3.2 Testes de Microdiluição**

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 1 a 10 das placas de microdiluição, em volumes de 100 $\mu$ L, com uma pipeta multicanal. A fileira 1 continha maior concentração da droga (800  $\mu$ g/mL das substâncias ou 16 $\mu$ g/mL dos padrões) e a fileira 10 a menor concentração da droga (1,562  $\mu$ g/mL das substâncias ou 0,01 $\mu$ g/mL dos padrões).

Cada poço da placa de microdiluição foi inoculado, com 100 $\mu$ L da correspondente suspensão concentrada do inóculo. Os poços controle de crescimento tinham 100 $\mu$ L de meio estéril, isento de droga, e foram inoculados com 100 $\mu$ L das suspensões concentradas dos inóculos. A fileira 12 da placa de microdiluição foi usada para efetuar o controle da esterilidade com apenas meio, sem conter drogas (Figura 6 e 7).

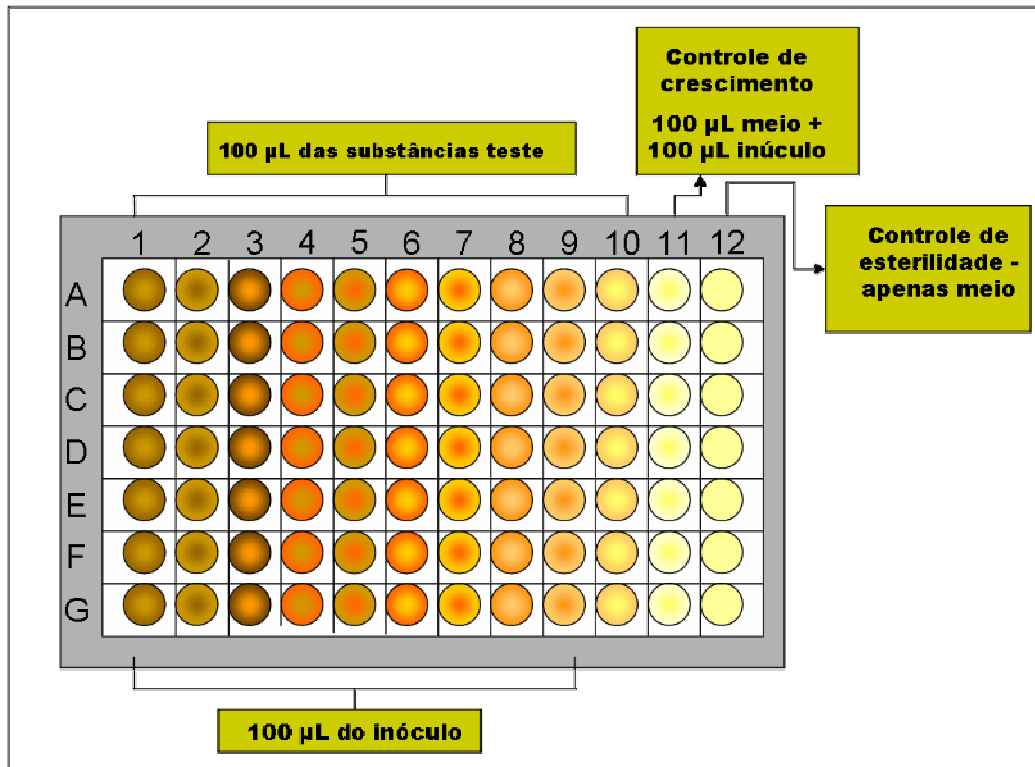


Figura 6. Microplaca da técnica da microdiluição em caldo.

#### 4.3.3.3 Incubação

As placas de microdiluição foram incubadas a 35°C por 24 horas.

#### 4.3.3.4 Determinação dos Pontos Finais da CIM

Os poços de microdiluição receberam uma pontuação, o crescimento em cada poço foi comparado com o do poço controle do crescimento (sem droga) com ajuda de um espelho de leitura. Cada poço da placa de microdiluição recebeu um valor numérico, usando a seguinte escala: 0 = opticamente claro; 1 = crescimento indefinido; 2 = redução proeminente de crescimento; 3 = ligeira redução do crescimento; e 4 = nenhuma redução do crescimento. O valor de CIM de azóis foi definido como a menor concentração em que se observa o escore 2 (redução proeminente de crescimento).



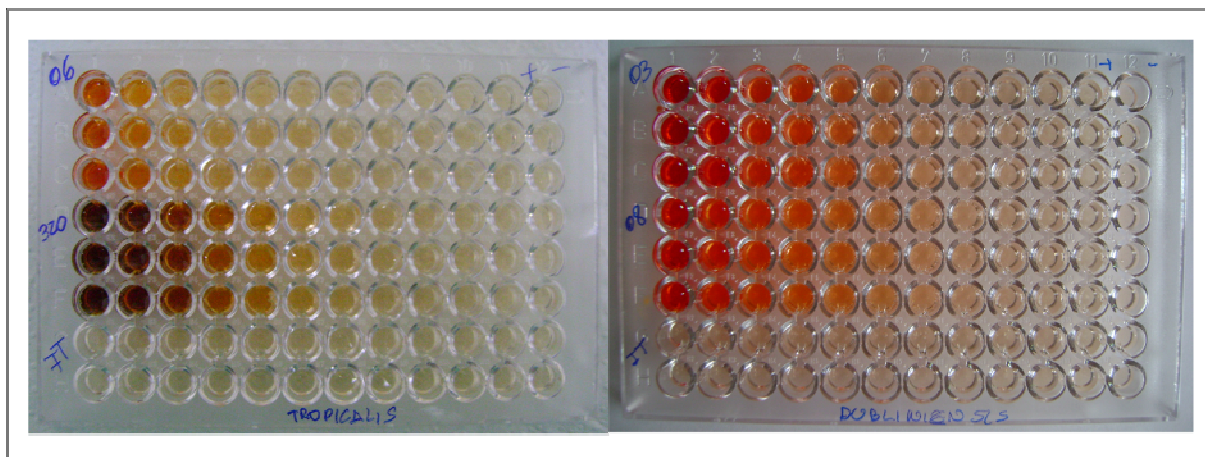


Figura 7. Microplacas utilizadas na técnica de microdiluição em caldo

#### 4.4 Teste de citotoxicidade em fibroblastos

Com o intuito de se investigar a citotoxicidade das naftoquinonas semi-sintéticas frente a células normais, foi realizado o teste do Alamar Blue segundo metodologia descrita por Nakayama et al., (1997) com pequenas modificações. Foram utilizados fibroblastos (NIH 3T3) doados gentilmente pela Professora Dra. Silvy Stuch Maria-Engler (USP). Os fibroblastos foram mantidos em Dulbecco's Modified Eagle Médium (DMEM) com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de ampicilina e 1% de estreptomicina em garrafas. Em placas de 96 poços foram plaqueadas  $1 \times 10^4$  células por poço. Após 24 horas de incubação, as células foram tratadas em triplicata com 12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  das naftoquinonas semi-sintéticas. Após 71 horas de incubação em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$  foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de solução de alamar Blue em cada poço e placa foi novamente encubada em estufa de  $\text{CO}_2$  por uma hora e foi realizada a leitura da fluorescência com filtro de 440 de excitação e 585 de emissão no leitor de microplacas DTX 800 (Beckman Coulter). A Doxorubicina foi usada como controle positivo (12,5; 6,25; 3,125;  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Os grupos controle receberam a mesma quantidade de dimetilssulfóxido (DMSO), veículo de

diluição das substâncias (Figura 8 e 9). A porcentagem de viabilidade celular foi calculada conforme a fórmula abaixo:

$$\% \text{viabilidade} = \frac{\text{fluorescência da amostra} \times 100}{\text{fluorescência do controle}}$$

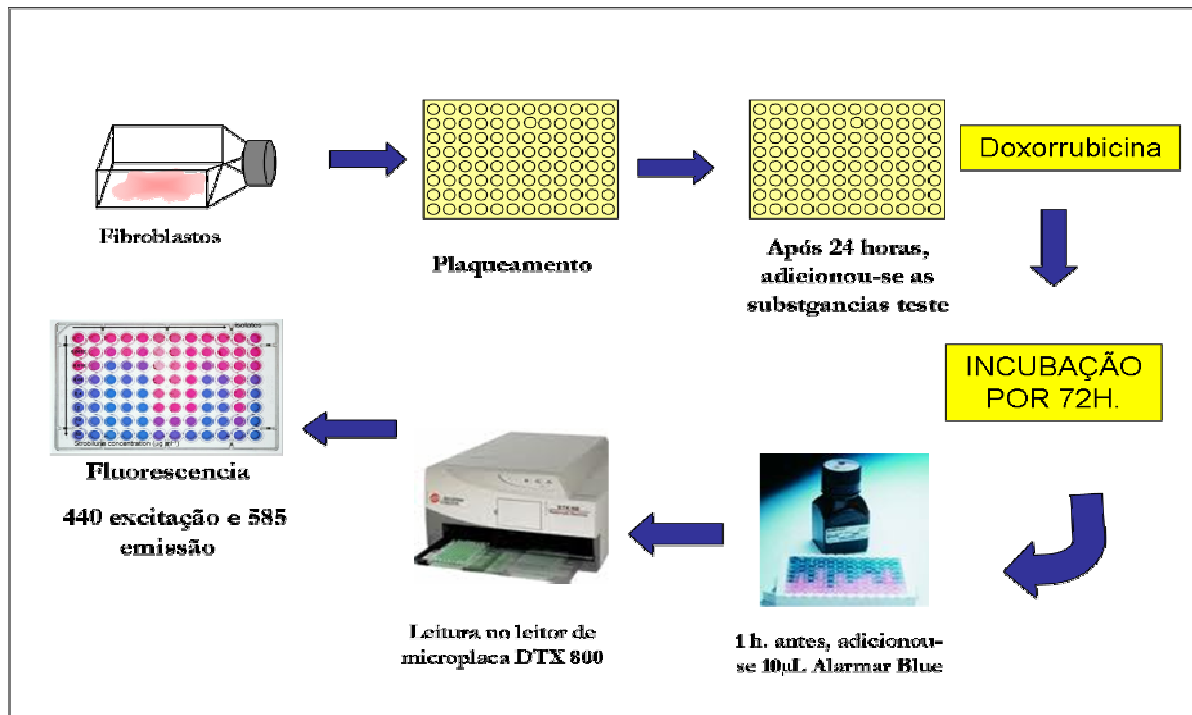


Figura 8. Teste de citotoxicidade em fibroblastos – Alamar Blue

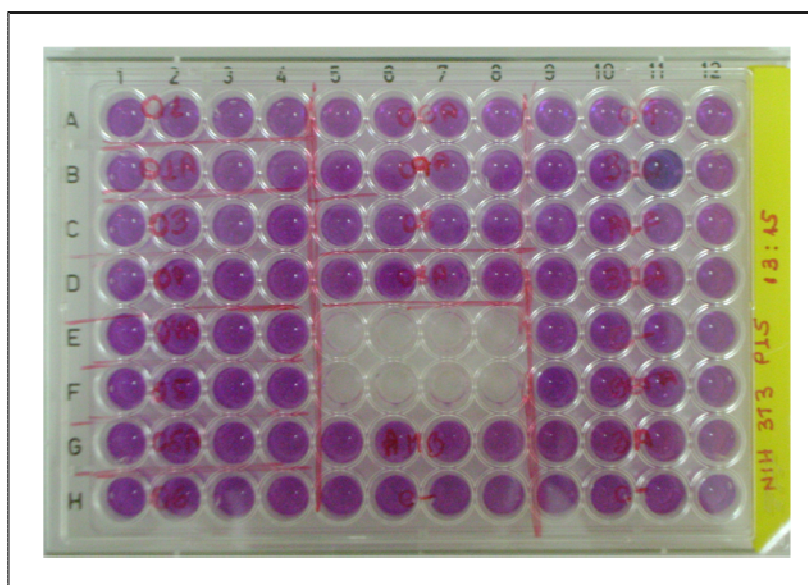


Figura 9. Microplaca utilizada na técnica de toxicidade em fibroblasto – Alamar Blue

#### 4.5 Teste de atividade hemolítica

Para o teste, foram coletados 200  $\mu\text{L}$  de sangue de um camundongo para confecção da solução de eritrócito a 2%. Para a lavagem, transferiu-se o sangue para um tubo de falcon com 2 mL de solução salina, centrifugou-se a 1500 rpm por 5 min, em seguida o sobrenadante foi removido, descartado e o pellet foi ressuspenso em solução salina. Esta lavagem foi repetida 3 vezes, e em seguida foi adicionado 10 ml de solução salina para obtermos um solução de eritrócitos a 20%.

Em uma microplaca de 96 poços foram colocados 15  $\mu\text{L}$  das substâncias teste, a (1 mg/ mL) e 135  $\mu\text{L}$  de solução salina. 150  $\mu\text{L}$  da suspensão de eritrócitos foram distribuídos nos poços, e a placa foi encubada por 1 hora sob agitação constante a temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C}$  mais ou menos 2). Em seguida as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 min. sendo feita a leitura do sobrenadante em 452 nm. As amostras foram testadas em triplicata em uma concentração de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Como controle positivo foi utilizado 60  $\mu\text{L}$  de TritonX e 90 mL de salina, como branco 15  $\mu\text{L}$  das substâncias em 285  $\mu\text{L}$  de solução salina (Figura 10).

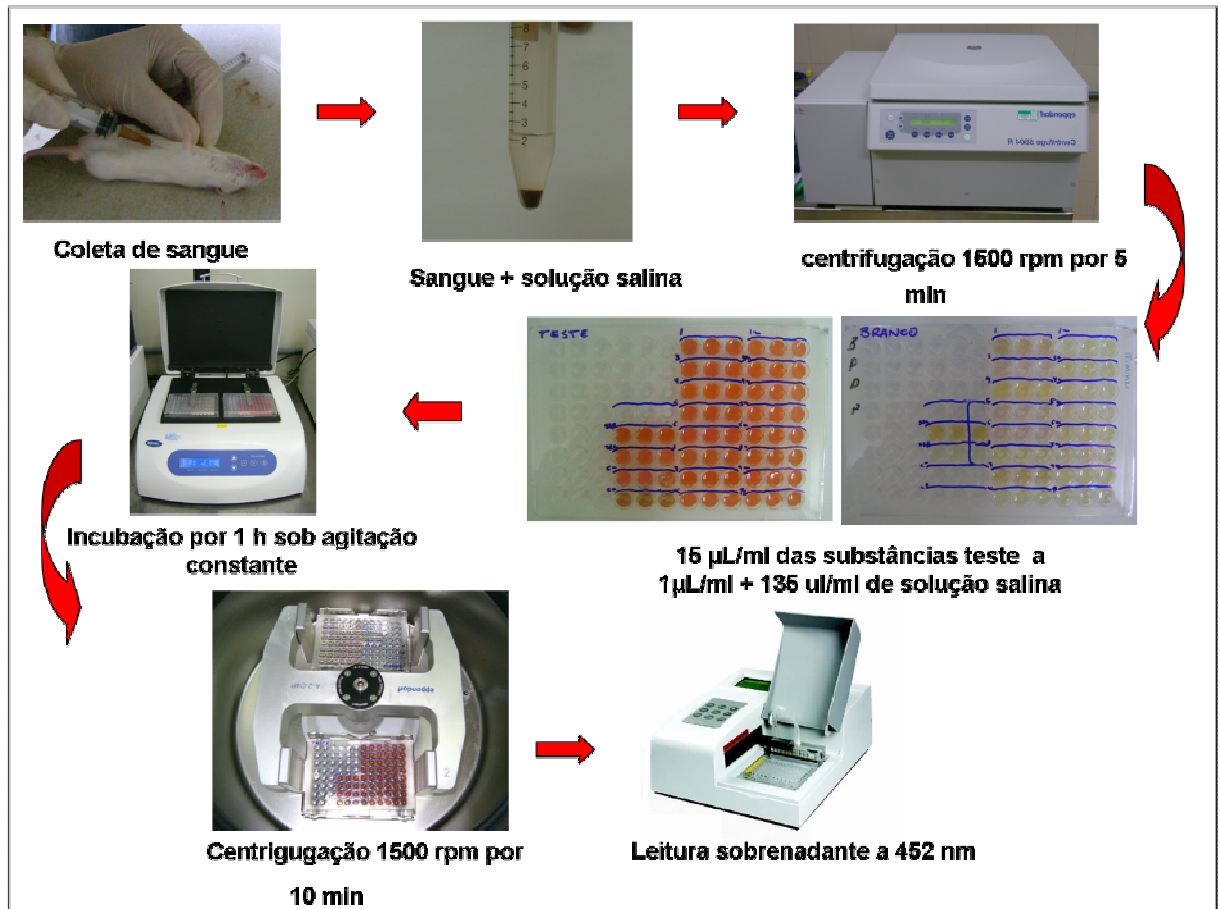


Figura 10. Teste de atividade hemolítica em sangue de camundongo

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou por duas metodologias a atividade inibitória *in vitro* de naftoquinonas semi-sintéticas frente ao crescimento de seis espécies de *Candida*: *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida kefyr*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*. Avaliou também, a citotoxicidade em fibroblastos utilizando o *Alamar Blue*, e a atividade hemolítica em eritrócitos de camundongo.

A primeira técnica empregada foi a difusão em meio sólido através de orifício, possibilitando uma análise qualitativa da atividade antifúngica. Os resultados estão apresentados na tabela 2 e na Figura 6.

Tabela 2

Atividade antifúngica das naftoquinonas semi-sintéticas, avaliados através do teste difusão em meio de cultura através do orifício.

Substâncias 250 (µg/ml)	Espécies de <i>Candida</i>					
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. kefyr</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C dubliniensis</i>
QUINFU 1	0,39 ± 0,78 <sup>a</sup>	2,26 ± 2,08	0	0	5,77 ± 0,53	6,44 ± 1,02
QUINFU 1A	10,43 ± 2,62	7,28 ± 2,18	4,27 ± 3,71	0	4,94 ± 1,15	2,75 ± 0,92
QUINFU 3	7,37 ± 1,74	5,7 ± 0,65	10,84 ± 3,14	7,22 ± 1,13	11,99 ± 2,43	11,95 ± 0,48
QUINFU 3A	16,97 ± 4,02	7,7 ± 2,4	1,96 ± 3,4	6,88 ± 1,15	8,29 ± 2,55	4,3 ± 1,00
QUINFU 4	1,5 ± 1,3	2,21 ± 0,83	1,96 ± 3,4	6,11 ± 0,82	5,65 ± 1,41	9,01 ± 0,10
QUINFU 4A	1,5 ± 1,10	2,49 ± 0,07	5,27 ± 4,66	0	6,14 ± 1,00	0
QUINFU 5	1,37 ± 0,47	8,59 ± 1,53	8,96 ± 1,06	8,12 ± 1,23	9,8 ± 1,36	1,70 ± 1,28
QUINFU 5A	10,34 ± 2,95	3,31 ± 1,35	7,28 ± 1,14	3,86 ± 4,59	9,12 ± 2,32	2,66 ± 1,26
QUINFU 6	6,17 ± 1,64	0	8,68 ± 6,77	7,75 ± 0,51	11,28 ± 2,59	9,23 ± 0,78
QUINFU 6A	1,39 ± 0,40	0	0	9,18 ± 2,10	7,50 ± 2,36	0,49 ± 0,38
QUINFU 8	8,41 ± 0,4	3,48 ± 0,79	10,08 ± 0,54	7,34 ± 1,01	8,52 ± 1,92	12,88 ± 0,55
QUINFU 8A	16,14 ± 4,25	3,83 ± 2,14	7,42 ± 0,98	0	7,05 ± 1,32	4,63 ± 1,20
QUINFU 9	2,93 ± 0,71	7,51 ± 2,84	9,28 ± 0,59	9 ± 0,05	10,83 ± 1,91	4,19 ± 0,05
QUINFU 9A	1,38 ± 1,02	6,42 ± 1,84	0	0	9,87 ± 1,88	2,02 ± 0,33
NORBETA	1,64 ± 0,71	4,78 ± 0,47	8,27 ± 1,16	7,41 ± 1,17	9,01 ± 2,54	0,10 ± 0,21
NORALFA	21,26 ± 0,87	5,63 ± 2,76	18,44 ± 0,77	9,29 ± 0,62	14,63 ± 1,42	15,23 ± 1,45
IVS320	5,85 ± 0,60	7,19 ± 1,57	10,70 ± 0,86	6,14 ± 0,80	8,80 ± 1,40	18,53 ± 1,36
IVS322	16,62 ± 1,99	7,8 ± 1,77	9,3 ± 1,24	0	10,76 ± 3,50	16,60 ± 0,59
Itraconazol	23,06 ± 0	23,63 ± 2,03	30,88 ± 2,20	26,01 ± 0,93	30,34 ± 4,32	19,45 ± 1,21
Fluconazol	12,99 ± 2,75	14,97 ± 3,56	21,23 ± 0,83	10,38 ± 0,95	9,64 ± 0,91	12,84 ± 1,05

<sup>a</sup>Medidas dos halos de inibição do crescimento em (mm) (média de experimento em triplicata diminuído da média de DMSO; ± desvio padrão).



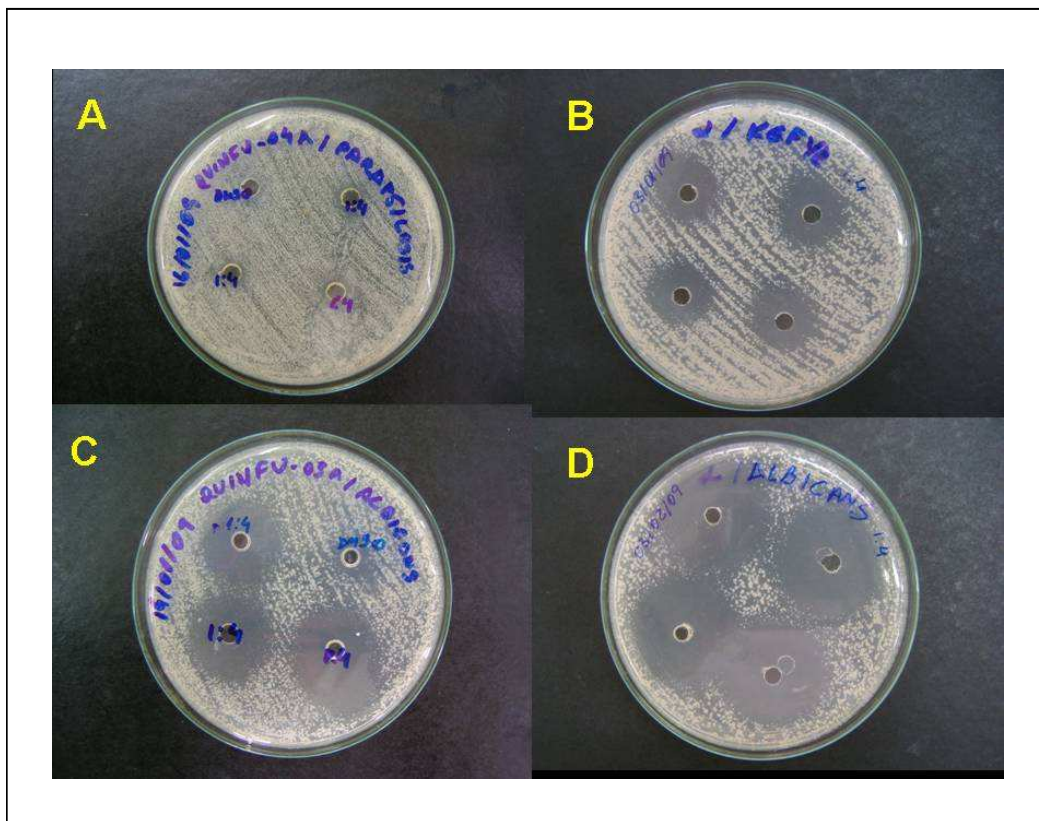


Figura 11. A- substância QUINFU 04A frente a *C. parapsislosis*, B- substância NORALFA frente a *C. kefir* C- Substância QUINFU 03A frente a *C. albicans* e D- substancia NORALFA frente a *C. albicans*

Foram interpretados como atividade moderada os halos de 9 – 14mm, maior que 14 – 17 mm, ativo; maior que 17 mm, muito ativo (AYRES et al., 2008). A naftoquinona semi-sintética, que apresentou melhor atividade a uma concentração de 250 µg/ml, foi a NORALFA frente *C. albicans*, *C. kefir*, *C. krusei* e frente a *C.dublinsiensis*, seguida da IVS322 que se mostrou ativa frente a *C. albicans* e frente a *C. Dublinsiensis*.

Utilizando a mesma técnica, Antunes et al., (2006) testaram em fungos leveduriformes e cepas ATCC a atividade do Lapachol, seus análogos e produtos obtidos por síntese. A concentração usada foi de 200 µg/ml, e nessa concentração não apresentou halo de inibição.

Vários derivados de 1,4-naftoquinonas (lapachol) foram sintetizados a partir

do 3-diazo-naftoleno-1,2,4-triona e foram avaliados como potenciais agentes microbianos. Os derivados naftoquinônicos mostraram maior atividades antibacteriana, ao nível preliminar em disco, que o lapachol, naftoquinona muito conhecida pelas suas variadas atividades biológicas (OLIVEIRA et al, 2001). Chohan et al., 2009, estudaram também a atividade antifúngica de substâncias sintéticas, sendo estas derivadas de sulfonamidas. A uma concentração de 200 µg/ml, testaram em cepas de *C. albicans* e *C. glabrata*, obtendo halo de inibição maior que 16 mm, o que denota que tais substâncias sintéticas possuem atividade antifúngica significativa. Desta forma pode-se afirmar que a técnica de difusão em agar é muito utilizada no que se refere a atividade antifúngica e antibacteriana de substâncias sintéticas e extratos (CORDEIRO et al., 2006; ALVES et al., 2009; MENEZES et al., 2009; ROSA et al., 2006).

A segunda técnica utilizada foi a de microdiluição em caldo, em que foi avaliada de forma quantitativa a atividade antifúngica. As culturas foram expostas aos antifúngicos por 24h. Decorrido este tempo foi determinada a percentagem de redução de crescimento por inspeção visual da turbidez das amostras nas diferentes concentrações de antifúngico. A norma desenvolvida pelo NCCLS define o conceito de concentração inibitória mínima (MIC – “Minimal inhibitory concentration”) como sendo 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. Esta técnica é o método de referência para a determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica. Vários autores a utilizam como recurso para a descoberta de novos agentes antifúngicos, tanto sintéticos como naturais, ou para testar o perfil de resistência de determinadas cepas aos antifúngicos já existentes (SILVA et al., 2007; WINGETER et al., 2007; DE LOGU et al., 2005; PESSINI et al.,

2005; PESSINI et al, 2003; CUENCA-ESTRELLA et al., 2003; MORAM et al., 1997; HITCHCOCK et al., 1993; YAMASHITA et al., 2009). Os valores da Concentração Inibitória Mínima de todas as substâncias testadas estão apresentados na tabela 3, junto com alguns dos principais antifúngicos presentes na literatura, e, aqui, utilizados como padrões para efeito de comparação.

Tabela 3

Avaliação da Concentração inibitória Mínima (CIM µg/ml) de naftoquinonas semi-sintéticas em espécies de *Candida* através do teste de microdiluição em caldo.

Substâncias CIM (µg/ml)	Espécies de <i>Candida</i>						
	<i>albicans</i>	<i>tropicalis</i>	<i>kefyr</i>	<i>parapsilosis</i>	<i>krusei</i>	<i>dubliniensis</i>	ATCC <i>albicans</i>
QUINFU 1	3,125	12,5	1,562	3,125	1,562	0,781	3,125
QUINFU 1A	12,5	12,5	25	12,5	25	12,5	25
QUINFU 3	12,5	3,125	1,562	6,25	0,781	1,562	25
QUINFU 3A	3,125	12,5	25	25	25	4,125	25
QUINFU 4	12,5	6,25	1,562	3,125	12,5	12,5	25
QUINFU 4A	3,125	12,5	25	12,5	25	12,5	25
QUINFU 5	12,5	12,5	12,5	12,5	3,125	12,5	25
QUINFU 5A	6,25	12,5	25	12,5	25	12,5	25
QUINFU 6	12,5	3,125	1,562	3,125	1,5625	0,781	25
QUINFU 6A	12,5	12,5	25	12,5	25	25	25
QUINFU 8	12,5	3,125	3,125	12,5	6,25	1,5625	12,5
QUINFU 8A	12,5	12,5	25	12,5	50	12,5	12,5
QUINFU 9	25	12,5	12,5	3,125	1,5625	12,5	25
QUINFU 9A	12,5	12,5	25	25	25	12,5	25
NORBETA	12,5	12,5	25	6,25	25	1,562	25
NORALFA	0,125	0,781	6,25	25	3,062	3,125	12,5
IVS320	1,562	0,781	6,25	3,125	3,125	1,562	3,125
IVS322	0,5	0,781	12,5	3,125	3,062	0,781	3,125
Itraconazol	3,125	0,125	0,0625	0,015	0,5	0,015	0,125
Cetoconazol	0,02	0,010	0,010	0,010	0,5	0,020	0,062
Fluconazol	0,5	96	0,5	0,5	32	0,5	0,5

Estudando a atividade antifúngica de derivados naftoquinônicos, constituídos de Shikon, Sasaki et al., (2002), afirmam que frente a *Candida krusei* obtiveram uma MIC de 4 µg/ml, que seria menor que a do fluconazol, e mostrou a mesma MIC deste



mesmo padrão para *Candida glabrata*. Comparando os resultados expostos na tabela 3, podemos ressaltar que algumas das naftoquinonas semi-sintéticas testadas neste trabalho mostraram resultados semelhantes aos de Sasaki et al., (2002), no que se refere à comparação com os padrões. Podemos ressaltar a substância QUINFU 1 frente a *Candida albicans*, que obteve a CIM 3,125 µg/ml, a mesma encontrada para o padrão itraconazol; a substância NORALFA com a MIC 0,125 µg/ml frente a *Candida albicans* com a CIM menor que os padrões itraconazol e fluconazol. As substâncias NORALFA, IVS320 e IVS322, foram as que se mostraram mais ativas frente as cepas testadas.

Yamashita et al. (2009) sintetizaram, e também avaliaram a bioatividade de naftoquinonas frente a *Candida albicans*, porém o resultado obtido foi apenas discreto potencial antifúngico, com uma CIM de 25 µg/ml. Seguindo a mesma linha de estudo, Kategaonkar et al., (2001), avaliou a atividade antifúngica de substâncias sintéticas em cepas de *Candida albicans*, obtendo melhores resultados, com as MICs de 15 µg/ml e 10 µg/ml.

A fim de verificar a toxicidade das substâncias estudadas, foi realizado o teste de viabilidade celular em fibroblastos utilizando o Alamar Blue® (sal de resazurina) segundo a técnica descrita por Nakayama et al., (1997). As 18 naftoquinonas semi-sintéticas foram testadas utilizando o método Alamar blue, e as células utilizadas foram fibroblastos murino. Os resultados estão expressos na tabela 4, onde podemos verificar que nenhuma das substâncias apresentou toxicidade na concentração testada 12,5 µg/mL, uma vez que a porcentagem de viabilidade de todas as naftoquinonas foi maior que 80 %.

Tabela 4

Viabilidade de fibroblasto, acessada pelo método de Alamar blue após 72h de tratamento com 12,5µg/mL de naftoquinonas.

Concentração 12,5µg/mL	Viabilidade (%) Média e ± D.P.
QUINFU 1	119 ± 2
QUINFU 1A	162 ± 13
QUINFU 3	138 ± 17
QUINFU 4	145 ± 11
QUINFU 4A	149 ± 11
QUINFU 5	133 ± 8
QUINFU 5A	142 ± 11
QUINFU 6	139 ± 7
QUINFU 6A	256 ± 14
QUINFU 9A	172 ± 4
QUINFU 8	155 ± 4
QUINFU 8A	201 ± 3
QUINFU 9	83 ± 2
IVS320	91 ± 3
NORALFA	80 ± 4
IVS322	94 ± 3
c-	100 ± 4
NORBETA	89 ± 4
QUINFU 3A	145 ± 14
c-	100 ± 3
doxorubicina	64 ± 0,6
c-	100 ± 4

Desde 1993 estudos para a determinação da viabilidade celular vêm sendo realizados com a utilização deste método Alamar Blue. O método é simples, rápido, eficiente, confiável, sensível e seguro (HIGUCHI, 2007). Utilizando este método, Barbosa, (2009), fez avaliação citotóxica de plantas medicinais utilizadas como coadjuvantes no tratamento do câncer, em linhagens de células tumorais e em células monocucleares de sangue, os resultados obtidos foi que nem a *Annona muricata* e nem a *Hyptis pectinata* promoveram lise celular.

SCHULTZ et al., 2005 utilizaram o teste de viabilidade celular para testar a citotoxicidade de extrato bruto. A citotoxicidade foi testada através do ensaio de

colorimétrico com sal de tetrazolium ( MTT – [3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium]) frente a células vero, e, a uma concentração de 30 e 60 µg o extrato apresentou viabilidade celular de 55,58 % e 4,54%.

Outro teste utilizado para estudo da toxicidade foi o de verificação da atividade hemolítica. Avaliando a citotoxicidade do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens*, Schultz et al., 2005 empregaram a mesma técnica de atividade hemolítica utilizada no presente trabalho, com a diferença que eles utilizaram em hemácias de carneiro. Os resultados obtidos foi que a 100 µg/mL apresentou atividade hemolítica máxima de 99,4%.

Neste estudo a técnica da verificação de hemólise foi realizada em uma concentração de 50 µg/mL, no qual nenhuma das substâncias testadas causou hemólise. Os resultados estão expressos na tabela 5. Estes resultados sobre os ensaios de toxicidades são favoráveis, pois um resultado positivo poderia impossibilitar o terapêutico dessas substâncias.

Tabela 5

Atividade hemolítica em sangue de camundongo

Concentração 50µg/mL	% de Hemólise Média / Desvio padrão
QUINFU 1	5,2797 ± 1,5606
QUINFU 1A	-0,7863 ± 0,7394
QUINFU 3	1,9771 ± 0,4124
QUINFU 3A	-1,4379 ± 0,4118
QUINFU 4	-1,5053 ± 2,0455
QUINFU 4A	1,1608 ± 0,5145
QUINFU 5	-0,2022 ± 0,9721
QUINFU 5A	-1,9546 ± 0,1839
QUINFU 6	4,5907 ± 0,7305
QUINFU 6A	2,5313 ± 0,6171
QUINFU 8	-1,1982 ± 0,6933
QUINFU 8A	4,5383 ± 0,9046
QUINFU 9	4,3735 ± 0,4883
QUINFU 9A	-0,2172 ± 1,1121
NORBETA	-2,4040 ± 3,0406
NORALFA	2,1044 ± 2,8491
IVS320	5,9163 ± 0,1911
IVS322	-1,6326 ± 1,2598
C -	6,6951 ± 0,2224
C +	99,48 ± 5,887

## 6. CONCLUSÕES

- Na análise da atividade antifúngica pela metodologia de difusão em agar através do orifício, e pela técnica de microdiluição em caldo, destacaram-se as substâncias NORALFA, seguida da substância IVS322 que se mostraram mais ativas frente as cepas testadas.
- As naftoquinonas semi-sintéticas não se mostraram tóxicas, nas duas metodologias testadas, atividade hemolítica e em fibroblastos murino.
- Os resultados alcançados são representativos, uma vez que podem contribuir para futuros trabalhos, objetivando o desenvolvimento de novos antifúngicos mais eficazes e menos tóxicos que os já existentes, podendo ser uma alternativa no tratamento de cepas de *Candida* que se apresentam resistentes aos medicamentos existentes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, J.; BODEY, G.P.; HANNA, H.A.; MARDANI, M. GIRGAWY, E. ABI-SAID, D., WHIMBEY, E.; HACHEM, R.; RAAD, I. *Candida Krusei* Fungemia. **Archives of Internal Medicine**. v.160, p. 2659-2664, 2000.

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, P.M.; QUEIROZ, L.M.G.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.S.V. Atividade antimicrobiana, antiaderente, e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n.2, p. 222-224, 2009.

ALVES, S. H.; SILVA, G. M.; SCOPEL, P. A.; OLIVEIRA, L. T. O.; COSTA, J. M.; MILÁN, E. P.; COLOMBO, A. L. Isolamento de *Candida dubliniensis* da mucosa oral de um paciente com SIDA, no Rio Grande do Sul. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**. v. 44, n 3, p. 185-187, 2000.

ANTUNES, .M.; LIMA, E.O.; PEREIRA, M.S.V.; CAMARA, C.A.; ARRUDA, T.A.; CATÃO, R.M.R.; BARBOSA, T.P.; NUNES, S.P.; DIAS, C.S.; SILVA, T.M.S. Atividade antimicrobiana *in vitro* de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.16, n.14, p. 517-524, 2006.

ARAÚJO, N.S.; ARAÚJO, V.C. **Patologia bucal**. São Paulo: Artes Médicas, 1994.

ARAÚJO, E.L.; ALENCAR, J.R.B; ROLIM NETO, P.J. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.12, p.57-59, 2002.

AYRES, M.C.C; BRANDÃO, M.S.; VIERA-JUNIOR, G.M.; MENOR, J.C.A.S; SILVA, H.B.; SOARES, M.J.S.; CHAVES, M.H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista brasileira de farmacognosia**.v.18, n.1. p. 90-97, 2008.

BATISTA, J.M.; BIRMAN, E.G.; CURY, A.E. Susceptibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. **Revista Odontologia da Universidade de São Paulo**. v.13, n. 4.; p. 343-348, 1999.

BASTOS, G.M. **Uso de preparações caseiras de plantas medicinais utilizadas no tratamento de doenças infecciosas**. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

BARBOSA, C.V. **Avaliação do potencial neoplásico de plantas medicinais utilizadas como coadjuvantes no tratamento do câncer pelos pacientes do**

**CACON/UFAL.** (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2009.

BERGOLD, A.M.; GEORGEADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. **Visão acadêmica.** v.5, n.2, p.159-172, 2004.

BOFF, E.; LOPES, P.G.M.; SPADER, T.; SCHEID, L.A.; LORETO, E.; DAL FORNO, N.F.; AQUINO, V.; SEVERO, L.C.; SANTURIO, J.M; ALVES, S.H. Reavaliação da suscetibilidade de *Cândida* à anfotericina B: estudo comparativo com isolados de três hospitais do Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v.41, n.1, p. 36-40, 2008.

CANDIDO, R.C.; AZEVEDO, R.V.P.; KOMESU, M.C. Enzotipagem de espécies do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v.33, n.5, p. 437-442, 2000.

COLLIN, B.; CLANCY, C.J.; NGUYEN, M.H. Antifungal resistance in non-albicans *Candida* species. **Drug Resistance Updates.** v.2, p. 9-14, 1999.

CORDEIRO, H.G.C.; SACRAMENTO, L.V.S.; CORREA, M.A.; PIZZOLITTO, A.C.; BAUAB, T.M. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para higiene bucal. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** v.42,n.2, 2006.

CHOHAN, A.H.; YOUSOUFI, M.H.; JARRAHPOUR, A., HADDA, T.B. Identification of antibacterial and antifungal pharmacophore sites for potent bacteria and fungi inhibition: Indolenyl shulfonamide derivatives. **European Journal of Medical Chemistry.**p. 1-11, 2009.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v.36, n.5, p. 599-607, 2003.

COSTA, K.R.C; FERREIRA, J.C.; KOMESU, M.C.; CANDIDO, R.C. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in Oral Candidosis: Quantitative Analysis, Exoenzyme Activity, and Antifungal Drug Sensitivity. **Mycopathologia.** v. 167, p. 73-79, 2009.

CROCCO, E.I.; SOUZA, V.M.; MIMICA, L.M.J.; RUITZ, L.R.B; MURAMATU, L.H, ZAITZ, C.; GARCIA, C. Identificação de espécies de *Candida* e suscetibilidade antifúngica *in vitro*: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. **Anais Brasileiro de Dermatologia,** v.79, n.6, p.689-697, 2004.

CUENCA-ESTRELLA, M.; LEE-YANG,W.; CIBLAK, M, A.; SKAGGS-ARTHINGTON, B.A.; MELLADO, E.; WARNOCK, D.W.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.. Comparative Evaluation of NNCLS M27-A and EUCAST Broth Microdilution Procedures for Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 46, n. 11, 2002.

DE LOGU, A.; SADDI, M.; CARDIA, M.C.; BORGNA, R.; SANNA, C.; SADDI, B.; MACCIONI, E. *In vitro* activity of 2-cyclohexylidenedihydro-4-phenyl-thiazole compared with those of amphotericin B and fluconazole against clinical isolates of *Candida spp.* And fluconazole-resistant *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**.v. 55, p. 692-698, 2005.

DRESCH, R.R.; HAESER, A.S.; LERNER, C.; MOTHES, B.; VOZÁRIHAMPE, M.M.; HENRIQUES, A.T. Detecção de atividade lectínica e atividade hemolítica em extratos de esponjas (Porífera) nativas da costa atlântica do Brasil. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.15, p.16 - 22, 2005.

ESTEVEES, J.A.; CABRITA, J.D.; NOBRE, G.N. **Micologia Médica**. 2 ed. Lisboa:1990.

FALCÃO, A.F.P.; SANTOS, L.B.; SAMPAIO, N.M. Candidíase associada a próteses dentárias. **Sitientibus**, n.30, p. 135-146, 2004.

FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L.A.; RATES, S.M.K. Plantas utilizadas na medicina popular Brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n.3, p. 369-377, 2006.

FRANÇA, J.C.B.; RIBEIRO, C.E.L.; TELLES, F.Q. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 41. n.1. p. 23-28, 2008.

GAMA, I.L. **Síntese benzofenazinas derivadas de 1,2-naftoquinonas**. (Tese de Mestrado). Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2008.

GOODMAN; GILMAM. **Bases farmacológicas da terapêutica**. 9 ed. Rio de Janeiro,1996.

GUIMARÃES, S.A.C. **Patologia básica da cavidade bucal**.Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

HENRY, K.W.; NICKLES, J.T.; EDLIND, T.D. Upregulation of ERG genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.44, n.10, p. 2693-2700, 2000;

HIGUCHI, C.T. **Byrsonima spp: estudo anatômico e histoquímico foliar, atividade antimicrobacteriana e citotoxicidade de extratos e seus derivados**. (Dissertação de Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

HITCHCOCK, C, A.; PYE, G.W.; TROKE, P.F.; JOHNSON, E, M,; WARNOCK, D.W. Fluconazole Resistance in *Candida Glabrata*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.37, n.9, p.1962-1965, 1993.

JÁCOME, R.L.R.P.; OLIVEIRA, A.B.; RASLAN, D.S.; MULLER, A.; WAGNER, H. Análise de naftoquinonas em extratos brutos de raízes de *Zeyheria Montana M.* (bolsa de pastor). **Química Nova**, v. 22, n. 22, p. 175-177,1999.



JORGE, A.O.C.; KOGA-ITO, C.Y.; GONÇALVES, C.R.; FANTINATO, V.; UNTERKIRCHER, C.S. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**. v.11, n.4, p. 279-285, 1997.

KATEGAONKAR, A.H.; POKALWAR, R.U.; SONAR, S.S.; GAWALI, V.U.; SHINGATE, B.B.; SHINGARE, M.S. Synthesis, in vitro antibacterial and antifungal evaluations of new  $\alpha$ -hydroxyphosphonate and new  $\alpha$ -acetosyphosphonate derivatives of tetrazolo [1,5-a] quinoline. **European Journal of Medinal Chemistry**. p.1-5, 2010.1

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

KRCMERY, V.; BARNES, A.J. Non albicans *Candida* spp. Causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **Journal of Hospital Infection**. v.50, p. 243-260, 2002.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HENS-VACCARI, E.M.; DE MELO, N.T. **Tratado de micologia médica**. São Paulo: Sarvier, 2002.

MARTINS NETO, M.; DANESI, C. C.; UNFER, D.T. Candidíase bucal: revisão de literatura. **Saúde**. v.31, n. 1-2, p. 16-26, 2005.

MCMILLAN, D.C.; SARVATE, S.D.; OATIS, J.E.; JOLLOW, D.J. Role of Oxidant Stress in Lawsonia-Induced Hemolytic Anemia. **Toxicological Sciences**. v.82, p. 647-655, 2004.

MEDINA, L.F.C. **Avaliação das atividades bioquímicas e genotóxicas de aminonaftoquinonas**. (Tese de Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

MENEZES, T.O.A.; ALVES, A.C.B.A.; VIEIRA, J.M.S.; MENEZES, S.A.F.; ALVES, B.P.; MENDONÇA, L.C.V. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da UNESP**. v. 38, n.3, p. 184-91, 2009.

MORAN, G. P.; SULLIVAN, D.J.; HENMAN, M.C.; McCREARY, C.E.; HARRINGTON, B.J.; SHANLEY, D.B.; COLEMAN, D.C. Antifungal Drug Susceptibilities of Oral *Candida dubliniensis* Isolates from Human Immunodeficiency Virus (HIV) – Infected and Non-HIV- Infected Subjects and Generation of Stable Fluconazole-Resistant Derivatives In Vitro. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**. v. 41, n.3, p. 617-623, 1997.

MOREIRA, R.Y.O.; ARRUDA, M.S.P.; ARRUDA, A.C.; SANTOS, L.S.; MULLER, A.H.; GUILHON, G.M.S.P.; SANTOS, A.S.; TEREZO, E. Antraquinonas e naftoquinonas do caule de um espécime de reflorestamento de *Tectona grandis* (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.16, n.3, p. 392-396, 2006.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S. PFALLER, M.I. A. **Microbiologia Médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2003.

NAKAYAMA, G.R.; CATON, M.C.; NOVA, M.P.; PARANDOSSH, Z. *Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro*. **Journal of Immunological Methods**.n.204, p.205-208, 1997.

NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada**—Segunda Edição. NCCLS norma M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.)

NEVILLE, B. W.; DAMM, D. D.; ALLEN, C. M.; BOUQUOT, J. E. **Patologia oral e maxilofacial**. 2. Ed. Ro de Janeiro:Guanabara koogan, 2004.

NGUYEN, M.H.; PEACOCK, J.E.; MORRIS, A.J.; TANNER, D.C.; NGUYEN, M.M.; SNYDMAN, D.R.; WAGENER, M.M.; RINALDI, M.G; YU, V.L. The changing face of Candidemia: Emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. **The American Journal of Medicine**. v.100, p.617-623, 1996.

OLIVEIRA, C.G.T.; MIRANDA, F.F.; FERREIRA, V.F.; FREITAS, C.C.; RABELLO, R.F.; CARBALLIDO, J.M; CORREA, L.C. Synthesis and antimicrobial Evaluation of 3-Hydrazino-Naphtoquinones as Analogs of Lapachol. **Journal Brazilian of Chemistry Society**. v.12, n.3, p.339-345, 2001.

OLIVEIRA, A.B.; RASLAN, D.S.; MIRAGLIA, M.C.M.; MESQUITA, A.A.L. Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de bignoniáceas brasileiras. **Química Nova**. v.13, n. 4, p. 302-307, 1990.

PANIZO, M.M.; REVIÁKINA, V. *Candida albicans* y su efecto patógeno sobre las mucosas. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**.v.21, n.2, 2001.

PESSINI, G.L.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V.; CORTEZ, D.A.G. Antifungal Activity of the Extracts and Neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. Var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Journal Brazilian Chemistry Society**. v. 16, n. 6A, p. 1130-1133, 2005.

PESSINI, G.L.; HOLETZ, F.B.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista da Brasileira de Farmacognosia**. v.13, p. 21-24, 2003.

PEREZOUS, L.F.; FLAITS, C.M.; GOLDSCHMIDT, M.C., ENGELMEIER, R.L. Colonization of *Candida* species in denture wearers with emphasis on HIV infection: A literature review. **The Journal of Prosthetic Dentistry**.v.93, n.3, p. 288 -293, 2005.

RANG, H. P; DALE, M. M.; RITTER, J.M., MOORE P.K.. **Farmacologia**. 4. Ed. Rio de Janeiro:Elsevier, 2004.

REGEZI, J. A.; SCIUBBA J. J. **Patologia Bucal, correlações clinicopatológicas**. , 3. ed. Rio de Janeiro:Guanabara koogan, 2000.

RIBEIRO, C.M.R.; DE SOUZA, P. P.; LETÍCIA L. D. M., FERREIRA L. A. P.; ALMEIDA, L. S.; DE JESUS, J. G. Ciclização do lapachol induzida por sais de tálio III. **Química Nova**. v. 31, n.4, p.759-762, 2008.

RODRIGUES, G.M.C.; CAPOBIANCO, T.D.; ATIQUE, T.S.C.; CONCEIÇÃO, L.M.; FRAGA, V.D.; GIANNINI, M.J.S.M.; MAIA, I.L.; MACHADO, R.L.D.; ALMEIDA, M.T.G.; ROSSIT, A. R.B. Estudo de colonização por *Candida* sp. Na cavidade oral de indivíduos soropositivos e soronegativos para HIV-1 no Noroeste Paulista, Brasil. **Panama Infectology**. v.9, n.3, p. 26-31, 2007.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Testes *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**. v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

ROSA, F.M.; BRUSCO, C.L.; PERES, P.E.C. Análise *in vitro* da eficácia do bicarbonato de sódio e da nistatina na inibição de *Candida albicans*. **STOMATOS**. v.12, n.23, p.17-21, 2006.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAM, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre, 2004.

SANTOS JR, I. D.; SOUZA, I. A. M.; BORGES, R. G.; SOUZA, L. B. S.; SANTANA, W. J.; COUTINHO, H. D. M. Características gerais da ação do tratamento e da resistência ao fluconazol. **Scientia Medica**. V.15, n.3, p. 189-197, 2005.

SASAKI, K.; ABE, H.; YOSHIZAKI, F. *In vitro* antifungal activity of naphthoquinone derivatives. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 25, n.5, p. 669-670, 2002.

SCHERMA, A.P.; SANTOS, D.V.O.; JORGE, A.O.C.; ROCHA, R.F. Presença de *Candida* spp. na cavidade bucal de lactantes durante os primeiros quatro meses de vida. **Ciencia Odontológica Brasileira**. v.7, n.3, p. 79-86, 2004.

SCHULTZ, D.; SIMÕES, C.M.O.; FROHNER, C.R.A.; GABILAN, N.H.; BATISTA, C.R.V. Citotoxicidade do extrato bruto de *Bacillus amyloliquefaciens* frente a hemácias de carneiro e células vero. **Alimentos e Nutrição**.v.16, n.2, p 145-151, 2005.

SILVA, J.O.; FERREIRA, J.C.; CANDIDO, R.C. Atividade enzimática, produção de *slime* e sensibilidade a antifúngicos de *Candida* sp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.40, n.3., p. 354-355, 2007.

SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na beta lapachona e derivados. **Química Nova**.v. 26, n.3, p. 407-416, 2003.

SILVA, T. M. A; AOYAMA, H.; HAUN, M.; FERREIRA, C. V. Citotoxicidade do promotor de tumor e sua ação mutagênica sobre linfócitos humanos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v. 36, n. 4, p. 237-239, 2004.

TOMASI, A. F. **Diagnóstico em patologia bucal**.3 ed. São Paulo: Pancast, 2002.

TRABULSI, L.R. **Microbiologia**.2 ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

VELÁSQUEZ, J; ROJAS, L.B; USUBILLAGA, A. Antifungal activity of naphthoquinone from *Tabebuia serratifolia*. **Ciência**. v.12, n.1, 2006.

WIKIPÉDIA. **Enciclopédia livre**. Disponível em:< <http://pt.wikipedia.org>> Acesso em: 03 fev. 2008.

WINGETER, M.A.; GUILHERMETTI, E.; SHINOBU, C.S.; TAKAKI, I.; SVIDZINSKI, T.I.E. Identificação microbiológica e sensibilidade *in vitro* de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.40, n.3, p. 272-276, 2007.

YAGIELA, J.A.; NEIDLE, E.A.; FRANK, F.J. **Farmacologia e Terapêutica para Dentistas**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

YAMASHITA, M.; KANEKO, M.; TOKUDA, H.; NISHIMURA, K.; KUMEDA, Y.; IIDA, A. synthesis and evaluation of bioactive naphthoquinones from the Brazilian medicinal plant, *Tabebuia avellanedae*. **Bioorganic & Medical Chemistry**. v. 17, p. 6286-6291, 2009.

ZARDO, V.; MEZZARI, A. Os antifúngicos nas infecções por *Candida* sp. **NewsLab**.2004.

ZUNT, S.L. Oral Candidiasis: Diagnosis and Treatment. **The Journal of Practice Hygiene**.p. 31-36, 2000.

## APÊNDICE

### ARTIGO

# Synthesis and biological evaluation of substituted $\alpha$ - and $\beta$ -2,3-dihydrofuran naphthoquinones as potent anti-Candida agents

Cristina Pessoa Veloso Freire<sup>a</sup>, Sabrina Baptista Ferreira<sup>b</sup>, Nivea Suely Melo de Oliveira<sup>a</sup>, Ani Beatriz Jackisch Matsuura<sup>c</sup>, Ivson Lelis Gama<sup>b</sup>, Fernando de C. da Silva<sup>b</sup>, Maria Cecília B. V. de Souza<sup>b</sup>, Emerson Silva Lima<sup>a</sup>, Vitor Francisco Ferreira<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>*Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, 69010-300, Manaus – AM – Brazil.*

<sup>b</sup>*Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Campus do Valonguinho, CEG, 24020-150, Niterói, RJ- Brazil.*

<sup>c</sup>*Centro de Pesquisas Leônidas Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Manaus, AM – Brazil.*

<sup>Address</sup> Correspondence: to Vitor F. Ferreira: Universidade Federal Fluminense, Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, CEG, Campus do Valonguinho, 24020-141 Niterói – RJ- Brazil. Tel.: +55 21 26292345; fax: +55 21 26292362; e-mail: cegvito@vm.uff.br.

**Keywords:** antifungal, naphthoquinone, dihydrofuran, candida

**Abstract:**

We report herein the synthesis and antifungal activity of substituted  $\alpha$ - and  $\beta$ -furan naphthoquinones. The compounds were prepared from readily available lawsone and olefins in the presence of ceric ammonium nitrate (CAN) and were evaluated against six strains of candida: *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida kefyr*, *Candida tropicalis* and *Candida dubliniensis*. The antifungal results revealed that these furan naphthoquinones are active against these fungi and additionally showed low cytotoxicity indicating that they are important scaffold with potential to be become novel antifungal agents.

## 1. Introduction

The increase in the incidence of fungal infections may be attributed primarily to increased numbers of immunocompromised patients, including those with human immunodeficiency virus infection, cancer patients undergoing chemotherapy, and organ transplant recipients taking immunosuppressive drugs.[1] The therapy for fungal infections employing fluconazole and itraconazole is the most commonly used in clinical settings, but there is major weaknesses in its spectra, potency, safety and pharmacokinetic properties. In addition, the emergence of fungi strains resistant to existing antifungal drugs, as is the case of *Candida* resistant to existing antifungal drugs, is becoming a significant problem.[2,3] Thus the development of new effective antifungal agents is strongly needed. [4,5,6]

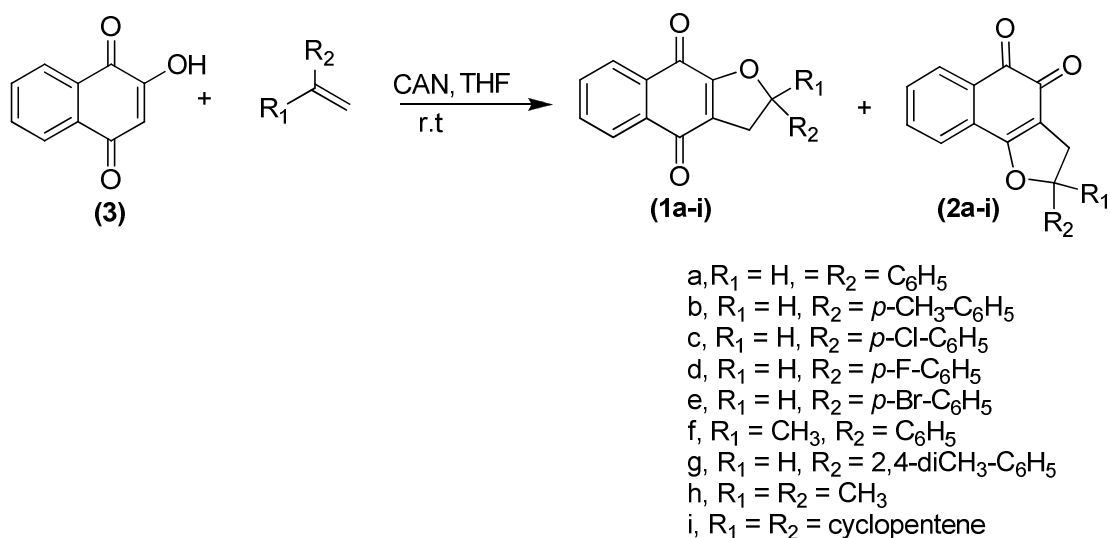
Natural naphthoquinone represent an important class of biologically active molecules that are widespread in nature.[7] The interest in these substances has been intensified in recent years due to its varied types of biological activities and many natural and synthetic naphthoquinones are known to have potent and as antitumor [8,9], molluscicidal [10], leishmanicidal [11], anti-inflammatory [12], tripanocidal,[13] antibacterial [14] and antitubercular [15]. Many studies have demonstrated that substituted naphthoquinone derivatives show a particularly marked activity against fungi. [16-22] Recently, our group reported the synthesis dihydrofuran naphthoquinones compounds that have novel pharmacological applications.[23,24]

The present study was focused on the synthesis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -2,3-dihydrofuran naphthoquinones **1a-i** and **2a-i** and its evaluation against six strains of *Candida* that were isolated from the oral cavity of patients with removable dentures and one ATCC reference strains of *C. albicans*.

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemistry

The preparations of  $\alpha$ - and  $\beta$ -2,3-dihydrofuran naphthoquinones **1a-i** and **2a-i** were carried out in one step by an improved synthetic protocol that was previously reported [25,22]. Briefly, the furan naphthoquinones were obtained by oxidative addition of lawsone (**3**) to alkenes mediated by cerium (IV) ammonium nitrate (CAN) as oxidant (**Scheme 1**). All the compounds were obtained with good yields and were fully characterized by  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, IR (infrared) spectroscopy and elemental analysis.



**Scheme 1.** Synthetic route used for the preparation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -furan naphthoquinones **1a-i** and **2a-i**

## 2.2 *In vitro* antifungal activities

The antifungal activities of  $\alpha$ - and  $\beta$ -furan naphthoquinones **1a-i** and **2a-i** were assessed against *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida kefyr*, *Candida tropicalis* and *Candida dubliniensis* isolated from the oral cavity of patients with removable dentures, by diffusion technique and minimum inhibitory concentration (MIC) assay. There were also used ATCC strains of *C. albicans* (90028), to ensure the activity of the substances and the reproducibility of the results. [26]

### Diffusion technique



The susceptibility of synthetic furan naphthoquinones were tested initially by using the simple diffusion from the hole in the culture medium (hole plate). All fungi were grown in Sabouraud Dextrose Agar (SDA) medium. The procedure provided a standard yeast suspension containing  $1 \times 10^6$  -  $5 \times 10^6$  cells per mL. Soon after, seeded plates were used, where were made four holes of 6 mm in diameter with the aid of sterile Pasteur pipette. In three holes were placed 20  $\mu$ L of substances with a concentration of 1:4, and a hole was placed 20  $\mu$ L of DMSO. The plates were then incubated for 24 h at 37 °C. After incubation it was measured the inhibition zone of fungal growth. We used standard substances, such as fluconazole and itraconazole, for comparison of the antifungal activity. Control disk containing DMSO was used as reference in the assay. All determinations were performed in triplicate and DMSO zone was subtracted.

#### **Minimum inhibitory concentration (MIC) assasy**

In this process the MIC of  $\alpha$ - and  $\beta$ -furan naphthoquinones **1a-i** and **2a-i** were obtained according to standard microbroth dilution. Briefly, MIC assay was performed in flat-bottomed 96-well tissue culture plate in SDA medium. The  $\alpha$ - and  $\beta$ -furan naphthoquinones **1a-i** and **2a-i** were dissolved in DMSO. These plates were incubated at 35 °C for 24 h, before being read. Cetoconazole, fluconazole and itraconazole were used as antifungal standard substances. All determinations were performed in triplicate. MIC was defined as the lowest compound concentration preventing visible fungal growth.

### **3. Results and discussion**

The  $\alpha$ - and  $\beta$ -2,3-dihydropyran naphthoquinones were obtained in good chemical yields in high degree of purity. When a solution of 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone (**3**) and alkenes in THF (1:1) was treated with a solution of CAN (1.5 equiv.) in THF at room temperature during 3 h, two products  $\alpha$ - and  $\beta$ -2,3-dihydropyran naphthoquinones were obtained (**Scheme 1**). It is noteworthy that all the products were formed regioselectively with respect to the alkene

double bond. The isolation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -naphthoquinones was carried out by silica gel column chromatography (**Table 1**).

**Table 1.** Yields of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -dihydrofuran naphthoquinones **1a-i** and **2a-i**

Entry	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	1 (%)	2 (%)
1	H	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	<b>1a (70)</b>	<b>2a (28)</b>
2	H	<i>p</i> -CH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	<b>1b (75)</b>	<b>2b (13)</b>
3	H	<i>p</i> -Cl-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	<b>1c (85)</b>	<b>2c (12)</b>
4	H	<i>p</i> -F-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	<b>1d (65)</b>	<b>2d (12)</b>
5	H	<i>p</i> -Br-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	<b>1e (45)</b>	<b>2e (10)</b>
6	CH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	<b>1f (60)</b>	<b>2f (32)</b>
7	H	2,4-diCH <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	<b>1g (75)</b>	<b>2g (20)</b>
8	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	<b>1h (86)</b>	<b>2h (12)</b>
9	--	cyclopentadiene	<b>1i (15)</b>	<b>2i (30)</b>

All compounds had their structures confirmed by IR spectral data, 1D and 2D NMR techniques and by elemental analysis. The compounds **1a-c**, **1f**, **1h**, **1i**, **2a-c**, **2f**, **2h**, **2i** [25, 27] have been previously described in the literature and their spectroscopic data are consistent with those reported in literature. In general, in the IR spectra we observed the disappearance of an intense absorption band of stretching vibrations of O-H, present in the starting materials. They showed strong carbonyl absorption between 1670-1702 cm<sup>-1</sup>. In their nuclear magnetic resonance spectra (<sup>1</sup>H NMR) all the <sup>1</sup>H expected signals were assigned on the basis of their chemical shifts, multiplicities and coupling constants. In general, the <sup>1</sup>H NMR spectra mainly showed the signal of the hydrogen bonded to the *ortho* carbon of the chromogenic ring, as double doublets between 5.15-6.30 ppm for the  $\alpha$  derivatives. The hydrogen signals of CH<sub>2</sub> furan ring were assigned in the region of 2.00 to 3.67 ppm as double doublets. The assignment of  $\alpha$  or  $\beta$ -furan naphthoquinones were established based on the analysis of the aromatic hydrogen signal region: in  $\beta$ -dihydrofuran naphthoquinones, the aromatic hydrogens are differentiated into four signals, while in the  $\alpha$ -dihydrofuran naphthoquinones there are only two <sup>1</sup>H signals due to more symmetric aromatic ring of this type of compounds. In general, the <sup>13</sup>C NMR spectra of naphthoquinones **1a-i** and **2a-i** were easily distinguished by the

signals between 79.2-80.0 ppm and 81.0-82.0 ppm, respectively, due to the carbon 1 of the chromogenic ring.

The first technique employed was the diffusion in solid medium through hole, which allowed obtaining a qualitative analysis of antifungal activity. In these studies, substances with moderate activity show halos between 9-14 mm and with halos larger than 14-17 mm are considered as active substances and those ones with halos larger than 17 mm are very active antifungals. In this regards, all the naphthoquinones have lower activity than the reference Itraconazole but some of them have better activity than Fluconazole. Compounds **1a**, **1h** and **1i** have significant inhibitory activity on *C. albicans*, with inhibitory zones of 21.26, 16.97 and 16.62 mm, respectively, as shown in **Table 2**. Compound **1h**, **1i** and **2i** have also shown good activity profile against *C. dubliniensis*. [28]

**Table 2.** Antifungal activity of **1a-i** and **2a-i** determined by diffusion technique showing growth inhibition zones (mm). Mean  $\pm$  S.D., in triplicate.

Compound	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. kefyr</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. dubliniensis</i>
<b>1a</b>	16,97 $\pm$ 4,02	7,7 $\pm$ 2,4	1,96 $\pm$ 3,4	6,88 $\pm$ 1,15	8,29 $\pm$ 2,55	4,3 $\pm$ 1,00
<b>1b</b>	10,43 $\pm$ 2,62	7,28 $\pm$ 2,18	4,27 $\pm$ 3,71	0	4,94 $\pm$ 1,15	2,75 $\pm$ 0,92
<b>1c</b>	1,5 $\pm$ 1,10	2,49 $\pm$ 0,07	5,27 $\pm$ 4,66	0	6,14 $\pm$ 1,00	0
<b>1d</b>	10,34 $\pm$ 2,95	3,31 $\pm$ 1,35	7,28 $\pm$ 1,14	3,86 $\pm$ 4,59	9,12 $\pm$ 2,32	2,66 $\pm$ 1,26
<b>1e</b>	1,39 $\pm$ 0,40	0	0	9,18 $\pm$ 2,10	7,50 $\pm$ 2,36	0,49 $\pm$ 0,38
<b>1f</b>	16,14 $\pm$ 4,25	3,83 $\pm$ 2,14	7,42 $\pm$ 0,98	0	7,05 $\pm$ 1,32	4,63 $\pm$ 1,20
<b>1g</b>	1,38 $\pm$ 1,02	6,42 $\pm$ 1,84	0	0	9,87 $\pm$ 1,88	2,02 $\pm$ 0,33
<b>1h</b>	21,26 $\pm$ 0,87	5,63 $\pm$ 2,76	18,44 $\pm$ 0,77	9,29 $\pm$ 0,62	14,63 $\pm$ 1,42	15,23 $\pm$ 1,45
<b>1i</b>	16,62 $\pm$ 1,99	7,8 $\pm$ 1,77	9,3 $\pm$ 1,24	0	10,76 $\pm$ 3,50	16,60 $\pm$ 0,59
<b>2a</b>	7,37 $\pm$ 1,74	5,7 $\pm$ 0,65	10,84 $\pm$ 3,14	7,22 $\pm$ 1,13	11,99 $\pm$ 2,43	11,95 $\pm$ 0,48
<b>2b</b>	0,39 $\pm$ 0,78	2,26 $\pm$ 2,08	0	0	5,77 $\pm$ 0,53	6,44 $\pm$ 1,02
<b>2c</b>	1,5 $\pm$ 1,3	2,21 $\pm$ 0,83	1,96 $\pm$ 3,4	6,11 $\pm$ 0,82	5,65 $\pm$ 1,41	9,01 $\pm$ 0,10
<b>2d</b>	1,37 $\pm$ 0,47	8,59 $\pm$ 1,53	8,96 $\pm$ 1,06	8,12 $\pm$ 1,23	9,8 $\pm$ 1,36	1,70 $\pm$ 1,28
<b>2e</b>	6,17 $\pm$ 1,64	0	8,68 $\pm$ 6,77	7,75 $\pm$ 0,51	11,28 $\pm$ 2,59	9,23 $\pm$ 0,78
<b>2f</b>	8,41 $\pm$ 0,4	3,48 $\pm$ 0,79	10,08 $\pm$ 0,54	7,34 $\pm$ 1,01	8,52 $\pm$ 1,92	12,88 $\pm$ 0,55
<b>2g</b>	2,93 $\pm$ 0,71	7,51 $\pm$ 2,84	9,28 $\pm$ 0,59	9 $\pm$ 0,05	10,83 $\pm$ 1,91	4,19 $\pm$ 0,05
<b>2h</b>	1,64 $\pm$ 0,71	4,78 $\pm$ 0,47	8,27 $\pm$ 1,16	7,41 $\pm$ 1,17	9,01 $\pm$ 2,54	0,10 $\pm$ 0,21
<b>2i</b>	5,85 $\pm$ 0,60	7,19 $\pm$ 1,57	10,70 $\pm$ 0,86	6,14 $\pm$ 0,80	8,80 $\pm$ 1,40	18,53 $\pm$ 1,36
<b>Itraconazole</b>	23,06 $\pm$ 0	23,63 $\pm$ 2,03	30,88 $\pm$ 2,20	26,01 $\pm$ 0,93	30,34 $\pm$ 4,32	19,45 $\pm$ 1,21
<b>Fluconazole</b>	12,99 $\pm$ 2,75	14,97 $\pm$ 3,56	21,23 $\pm$ 0,83	10,38 $\pm$ 0,95	9,64 $\pm$ 0,91	12,84 $\pm$ 1,05

The second technique used for determine the antifungal activity was the microdilution quantitative assay. The fungi cultures were exposed to antifungal agents during 24 hours and after this time it was determined the percentage reduction of growth by visual inspection and by analysis of the turbidity of the samples in different concentrations. The standard developed by the NCCLS [29] defines the concept of minimum inhibitory concentration Minimal inhibitory concentration (MIC), as the lowest concentration of an antimicrobial agent that inhibits visible growth of a microorganism in the midst of a dilution made in liquid medium. The values of minimal inhibitory concentration of all substances tested are shown in **Table 3**, along with some of the major antifungals in the literature, and here used as standards for comparison. In general, the results revealed that substituted  $\alpha$ -furan naphthoquinones have better antifungal activity than  $\beta$ -furan naphthoquinones. Detailed analysis of the data in Table 3, allows the following observations to be made. There was marked variability among the strains with regard to their susceptibilities to the various test compounds and such variability suggests there are biological factor(s) affecting strain/species and test compound bioactivity. For *C. albicans* compound **1h** appeared to have the broadest antifungal activity, showing a stupendous MIC value (0.54  $\mu$ M) below compared with Itraconazole (4.42  $\mu$ M) and fluconazole (1.63  $\mu$ M). Another compound that showed an interesting value was **1i** (2.09  $\mu$ M) for *C. albicans*. Only compounds **1h** (3.42  $\mu$ M), **1i** (3.27  $\mu$ M), **2i** (3.27  $\mu$ M) exhibited a promising antifungal activity for strain *C. tropicalis* on comparison with antifungal drug Fluconazole (313.44  $\mu$ M). Analysis the results for strain *C. kefyr* and *C. krusei* the results revealed that substituted  $\beta$ -dihydrofuran naphthoquinones showed high activity, highlighted compounds **2a**, **2b**, **2c** and **2e**. And for *C. dubliniensis* compounds **1i** (3.27  $\mu$ M), **2b** (2.69  $\mu$ M) and **2e** (2.19  $\mu$ M) showed a small antifungal activity compared with the standard drugs used. Strain *C. parapsilosis* and ATCC 90028 appeared to be the least sensitive, to almost all

the compounds. Only compound **2e**, with an MIC of 8.69  $\mu$ M demonstrated some antifungal activity for *C. parapsilosis*.

**Table 3.** Minimum inhibitory concentration (MIC,  $\mu$ M) for **1a-i** and **2a-i**

Compound	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. kefyr</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. dubliniensis</i>	ATCC 90028
<b>1a</b>	11.31	45.24	90.48	90.48	90.48	14.92	90.48
<b>1b</b>	43.10	43.10	86.20	43.10	86.20	43.10	86.20
<b>1c</b>	10.05	40.22	80.45	40.22	80.45	40.22	80.45
<b>1d</b>	21.23	42.47	84.95	42.47	84.95	42.47	84.95
<b>1e</b>	35.19	35.19	70.38	35.19	70.38	70.38	70.38
<b>1f</b>	45.24	45.24	90.48	45.24	172.2 2	45.24	45.24
<b>1g</b>	41.07	41.07	82.14	82.14	82.14	41.07	82.14
<b>1h</b>	0.54	3.42	27.38	109.53	13.41	13.69	54.76
<b>1i</b>	2.09	3.27	52.46	13.11	12.85	3.27	13.11
<b>2a</b>	45.24	11.31	5.65	22.62	2.82	5.65	90.48
<b>2b</b>	10.77	43.10	5.39	10.77	5.39	2.69	10.77
<b>2c</b>	40.22	20.11	5.02	10.05	40.22	40.22	80.45
<b>2d</b>	42.47	42.47	42.47	42.47	10.61	42.47	84.95
<b>2e</b>	35.19	8.79	4.39	8.79	4.39	2.19	70.38
<b>2f</b>	45.24	11.31	11.31	45.24	22.62	5.65	45.24
<b>2g</b>	82.14	41.07	41.07	10.26	5.13	41.07	82.14
<b>2h</b>	54.76	54.76	109.5 3	27.38	109.5 3	6.84	109.53
<b>2i</b>	6.55	3.27	26.23	13.11	13.11	6.55	13.11
<b>Itraconazole</b>	4.42	0.17	0.08	0.02	0.70	0.02	0.17
<b>Fluconazole</b>	1.63	313.4 4	1.63	1.63	104.4 8	1.63	1.63

Additional toxicity tests, hemolytic activity in mice blood and cytotoxicity against NIH3T3 murine fibroblast culture using fluorescent Alamar Blue assay, were performed for all compounds (supplementary material section). The studied compounds showed no significant hemolytic activities or cytotoxicity at concentrations of 25  $\mu$ g/mL. These results indicate that

the tested compounds do not disrupt the cellular membrane neither present unspecific cytotoxicity.

In conclusion, we have synthesized a series of substituted  $\alpha$ - and  $\beta$ -dihydrofuran naphthoquinones (**1a-i** and **2a-i**) that were evaluated as antifungal against six strains of *Candida*. The result indicated that **1h** was more active than Itraconazole and Fluconazole against *C. albicans* but also compound **1i** showed a good antifungal activity. Compounds **1h**, **1i** and **2i** exhibited a promising antifungal activity for strain *C. tropicalis*. *C. kefyr* and *C. krusei* were sensitive to compounds **2a**, **2b**, **2c** and **2e** and **1i**, **2b** and **2e** showed discrete antifungal *C. dubliniensis* when compared with the standard drugs used. The strain *C. parapsilosis* and ATCC 90028 were the least sensitive to the naphthoquinones. Only compound **2e** demonstrated some antifungal activity against *C. parapsilosis*. The potent antifungal activity found for some of  $\alpha$ -furan naphthoquinones without hemolytic activities or cytotoxicity are promising since few naphthoquinones are described in the literature as having antifungal activity.

### Acknowledgments

The authors thank FAPERJ, CAPES and CNPq for the fellowships and the grants. V.F.F. and E.S.L. are members of the INCT de Processos Redox em Biomedicina-Redoxoma (MCT/CNPq).

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at doi:

### References

- [<sup>1</sup>] D. A. Enoch, H. A. Ludlam and N. M. Brown, *J. Med. Microbiol.*, **2006**, 55, 809-818.
- [<sup>2</sup>] M. M. Canuto and F. G. Rodero, *The Lancet Infectious Diseases*, **2002**, 2, 550-563.

- [<sup>3</sup>] J. B. Anderson, *Nature Reviews Microbiology*, **2005**, 3, 547-556.
- [<sup>4</sup>] J. H. Rex, M. G. Rinaldi and M. A. Pfaller, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1995**, 39, 1-8.
- [<sup>5</sup>] S. Sternberg, *Science*, **1994**, 266, 1632-1634.
- [<sup>6</sup>] K. S. Shin, S. Lee and B. Cha, *Plant Pathol. J.*, **2007**, 23, 113-115.
- [<sup>7</sup>] S. B. Ferreira, F. C. da Silva, A. C. Pinto, D. T. G. Gonzaga and V. F. Ferreira, *J. Heterocyclic Chem.*, **2009**, 46, 1080-1097.
- [<sup>8</sup>] E. N. Silva Jr, M. C. B. V. Souza, A. V. Pinto, M. C. Pinto, M. O. O. Goulart, F. W. A. Barros, C. Pessoa, L.V. Costa-Lotufo, R. C. Montenegro, M. O. Moraes and V. F. Ferreira, *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 7035-7041.
- [<sup>9</sup>] E. N. Silva Jr, C. F. Deus, B. C. Cavalcanti, C. Pessoa, L. V. Costa-Lotufo, R. C. Montenegro, M. O. Moraes, M. C. F. R. Pinto, C. A. Simone, V. F. Ferreira, M. O. F. Goulart, C. K. Z. Andrade and A. V. Pinto, *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 504-508.
- [<sup>10</sup>] A. F. Santos, P. A. L. Ferraz, F. C. de Abreu, E. Chiari, M. O. F. Goulart and A. E. G. Sant'Ana, *Planta Med.* **2001**, 67, 92-95
- [<sup>11</sup>] M. J. Teixeira, Y. M. de Almeida, J. R. Viana, J. G. Holanda, T. P. Rodrigues, J. R. C. Prata, I. V. B. Coelho, V. S. Rao and M. M. L. Pompeu, *Phytother. Res.*, **2001**, 15, 44-48.
- [<sup>12</sup>] E. R. Almeida, A. A. S. Filho, E. R. dos Santos and C. A. C. Lopes, *J. Ethnopharmacol.*, **1990**, 29, 239-245.
- [<sup>13</sup>] E. N. da Silva Jr, R. F. Menna-Barreto, M. C. Pinto, R. S. Silva, D. V. Teixeira, M. C. B. V. Souza, C. A. De Simone, S. L. De Castro, V. F. Ferreira and A. V. Pinto, *Eur. J. Med. Chem.*, **2008**, 43, 1774-1780.
- [<sup>14</sup>] A. P. Neves, C. C. Barbosa, S. J. Greco, M. D. Vargas, L. C. Visentin, C. B. Pinheiro, A. S. Mangrich, J. P. Barbosa and G. L. Costa, *J. Braz. Chem. Soc.*, **2009**, 20, 712-727.
- [<sup>15</sup>] S. B. Ferreira, F. C. da Silva, F. A. F. M. Bezerra, M. C. S. Lourenço, C. R. Kaiser, A. C. Pinto and V. F. Ferreira, *Archiv der Pharmazie*, **2010**, 343, 81-90.
- [<sup>16</sup>] K. T. Vishnu, K. M. Hardesh and K. S. Praveen, K.S., *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, 8, 3130-3137.
- [<sup>17</sup>] A. Riffel, L. F. Medina, V. Stefani, R. C. Santos, D. Bizani and A. Brandelli, *Brazilian J. Med. Biol. Research.*, **2002**, 35, 811-818.
- [<sup>18</sup>] B. H. Kim, J. Yoo, S. H. Park, J. K. Jung, H. Cho, and Y. Chung, *J. Archives Pharmacal Research.*, **2006**, 29, 123-130.



- [<sup>1</sup>9] M. M. M. Santos, N. Faria, J. Iley, S. J. Coles, M. B. Hursthouse, M. L. Martins and R. Moreira, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, 20, 193–195.
- [<sup>2</sup>0] C. S. Medeiros, N. T. Pontes-Filho, C. A. Camara, J. V. Lima-Filho, P. C. Oliveira, S. A. Lemos, A. G. F. Leal, J. O. C. Brandao and R. P. Neves, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2010**, 43, 345-349.
- [<sup>2</sup>1] V. K. Tandon, H. K. Maurya, N. N. Mishra and P. K. Shukla, *Eur. J. Med. Chem.*, **2009**, 44, 3130–3137.
- [22] K. O. Eyong, P. S. Kumar, V. Kuete, G. N. Folefoc, E. A. Nkengfack and S. Baskaran, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, 18, 5387–5390.
- [<sup>2</sup>3] E. N. Silva Jr, C. F. Deus, B. C. Cavalcanti, C. Pessoa, L. V. Costa-Lotufo, R. C. Montenegro, M. O. Moraes, M. C. F. R. Pinto, C. A. Simone and V. F. Ferreira, *J. Med. Chem.*, **2010**, 53, 504-508.
- [<sup>2</sup>4] E. N. Silva Jr, M. C. B. V. Souza, M. C. Fernandes, R. F. S. Menna-Barreto, M. C. F. R. Pinto, F. A. Lopes, C. A. Simone, C. K. Z. Andrade, A. V. Pinto, V. F. Ferreira and S. L. Castro, *Bioorg. Med. Chem.* **16**, **2008**, 5030-5038.
- [<sup>2</sup>5] V. Nair, P. M. Treasa, D. Maliakal and N. Rath, *Tetrahedron*, **2001**, 57, 7705-7710.
- [<sup>2</sup>6] The National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard, M27-A2. **2002**, 22, 1-30.
- [<sup>2</sup>7] K. Kobayashi, A. Sasaki, H. Takeuchi and H. Suginome, *J. Chem. Soc., Perkin Transactions 1: Org. Bio-Org. Chem.*, **1992**, 1, 115-21.
- [<sup>2</sup>8] M.C.C. Ayres, M.S. Brandão, G.M. Vieira Jr, J.C.A.S. Menor, H.B. Silva, M.J.S. Soares, M.H. Chaves. *Revista brasileira de farmacognosia*, **2008**, 18, 90-97.
- [<sup>2</sup>9] <http://www.clsi.org/>