



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

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE NOVAS NAFTOQUINONAS
SEMISSINTÉTICAS FRENTE A FUNGOS OPORTUNISTAS E
DERMATÓFITOS E ENSAIOS PRELIMINARES DE SEUS
MECANISMOS DE AÇÃO

MARIA DO PERPETUO SOCORRO BORGES CARRIÇO FERREIRA

MANAUS
2013

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

**MARIA DO PERPETUO SOCORRO BORGES CARRIÇO
FERREIRA**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE NOVAS NAFTOQUINONAS
SEMISSINTÉTICAS FRENTE A FUNGOS OPORTUNISTAS E
DERMATÓFITOS E ENSAIOS PRELIMINARES DE SEUS
MECANISMOS DE AÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Desenvolvimento, avaliação da qualidade e da utilização de insumos e produtos farmacêuticos e cosméticos.

Orientador: Prof. Dr. João Vicente Braga Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima

MANAUS

2013

Maria do Perpetuo Socorro Borges Carriço Ferreira

Atividade antifúngica de novas naftoquinonas semissintéticas frente a fungos oportunistas e dermatófitos e ensaios preliminares de seus mecanismos de ação.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Desenvolvimento, avaliação da qualidade e da utilização de insumos e produtos farmacêuticos e cosméticos.

Aprovada em 05 de novembro de 2013

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza (Presidente)
Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas**

**Prof^a Dr^a Ormezinda Celeste Cristo Fernandes (Membro Externo)
FioCruz – Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane/ AM**

**Prof. Dr. Ádley Antonini Neves de Lima (Membro Interno)
Universidade Federal do Amazonas**

*Dedico esta conquista a Deus.
A minha família pelo carinho e apoio
Ao meu marido Fernando, pelo incentivo, apoio irrestrito, suporte emocional,
mas principalmente por seu amor...
E ao meu orientador e amigo João Vicente, por tudo!!*

Agradecimentos

Agradeço à banca de defesa: Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza, Prof. Dr. Ádley Antonini Neves de Lima, Prof^a Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes.

A banca de qualificação: Prof^a Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos, Prof^a Dra Karen Regina Carim da Costa e Prof^a Dra. Sônia Maria da Silva Carvalho, por suas contribuições.

Ao Prof. Dr. Emerson Silva Lima, meu co-orientador, pela oportunidade e pela confiança deposita em mim para desenvolver este trabalho.

Ao Dr. Vitor Francisco Ferreira, da Universidade Federal Fluminense e ao seu grupo de pesquisa.

Ao Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazonia-INPA, um lugar onde tudo pode acontecer, onde tenho a satisfação de compartilhar os meus dias, minhas preocupações, minhas frustrações e principalmente minhas alegrias com todos.

Agradeço imensamente as minhas “filhinas”: Luciana Aires, Silviane Pinheiro e Luciane Fontão pela amizade, ajuda e carinho em todas as horas.

A Dona Lili e a Ana Cortez, além de grandes profissionais são pessoas maravilhosas, que para todos da micologia, são como se fossem uma “segunda mãe”, pra todos nós!

A todos os funcionários do laboratório, seu Ray, seu Rosalvo e ao seu Francis

A Dra Aya e Dr Maurício que sempre foram receptivos e atenciosos quando eu precisava.

À Daiana e a Fernanda pela amizade, sugestões e ajuda; ao Diego pela atenção e amizade, parceiro de congresso. Ao Roberto pela amizade e ajuda com sua experiência e conhecimento. A todos outros que sempre estavam presentes no laboratório, agregados, alunos.

Às amigas da Pós-Graduação: Carol Ralph, Nayana, Ellen e Neila, que desde o início foram minhas amigas e parceiras nas disciplinas angustiantes e nas risadas.

A todos os nossos professores e todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, especialmente à Cleo que sempre nos acolhe na secretaria, e a todos nossos professores.

Às minhas amigas Cissa Farias e Simone Weber pela paciência e grande amizade com que sempre me ouviram e me incentivaram a ultrapassar as dificuldades e seguir em frente durante a realização deste projeto.

A minha querida amiga Dra Erica Simplício de Souza, esposa dedicada do meu orientador. Você foi fundamental em todo trabalho, principalmente pela paciência e amizade. Eu aprendi muito com você...Você é incrível!!!

Ao meu amado marido Fernando Carriço, pelo amor, paciência, e por ter partilhado comigo todas as vitórias e frustrações nessa caminhada para realização desse sonho. Obrigada por acreditar em mim, pelo incentivo e por ajuda nos momentos mais difíceis. Te amo!!!

Finalmente agradeço ao meu amigo João Vicente por tudo, e quando falo tudo, é por todos os momentos que passamos juntos desde a época do PET na faculdade. Obrigada pela sua amizade, compreensão, ajuda, conselhos, paciência, disposição, e principalmente por acreditar em mim, por ter me encaminhado nessa conquista e por todas as horas dispensadas às “infinitas” correções. Com certeza foi muito mais fácil trabalhar com você. Espero que nossa amizade se solidifique cada vez mais.

*Obrigada Senhor pelos meus braços perfeitos...
Quando há tantos mutilados.*

*Pelos meus olhos perfeitos...
Quando há tantos cegos.*

*Pelas minhas mãos que trabalham...
Quando tantas mendigam.*

*É maravilhoso Senhor!
Ter um lar para voltar...
Quando há tantos que não tem aonde ir...*

*Sorrir...quando há tantos que choram.
Amar... quando há tantos que odeiam.
Sonhar...quando há tantos se revolvem em pesadelos.
Viver... quando há tantos que morrem antes de nascer.*

*É maravilhoso Senhor,
ter tão pouco a pedir e tanto agradecer.*

RESUMO

Introdução: O aumento das infecções fúngicas, os efeitos adversos e a resistência aos antifúngicos atualmente utilizados, estimulam novos estudos em busca de melhores agentes antifúngicos. Nesse contexto, as naftoquinonas são amplamente estudadas por possuir várias atividades biológicas, dentre elas antifúngica. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica de novas naftoquinonas semissintéticas frente a fungos oportunistas/dermatófitos e avaliar a interferência de uma naftoquinona selecionada na formação da parede celular, ergosterol de membrana e membrana celular de cepa de *Candida albicans* (ATCC 36232).

Métodos: A atividade antifúngica de quatro novas naftoquinonas semissintéticas foi avaliada frente a 89 culturas pertencentes a coleção de microrganismos do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), incluindo leveduras oportunistas, agentes de dermatofitoses e fungos filamentosos oportunistas. O ensaio de determinação da Concentração inibitória mínima (CIM) foi realizado como descrito pela CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) nos documentos M27-A2 e M38-A/CLSI,2002. A substância que apresentou melhor atividade foi avaliada quanto à ação na parede celular (ensaio sorbitol) e a interferência na membrana associada à interação com ergosterol, ao equilíbrio osmótico (efluxo de K^+) e a um ensaio de extravasamento de substâncias que absorvem a 260 nm. **Resultados:** Todas as novas naftoquinonas testadas exibiram atividade antifúngica, sendo que a IVS320 (1H-cyclopenta[b]naphtho[2,3-d]furan-5,10(3aH,10bH)-dione) apresentou as menores CIMs frente as espécies testadas. A CIM de IV320 foi particularmente baixas para dermatófitos, com médias de CIM variando de 5-28 $\mu\text{g/mL}$ e frente aos isolados do gênero *Cryptococcus* spp. médias de CIM variaram de 3-5 $\mu\text{g/mL}$. Por isso, foi submetida a ensaios preliminares de mecanismo de ação. Nesses ensaios, a IVS320 não causou alteração na parede celular do fungo, mas causou problemas na permeabilidade da membrana celular (efluxo de K^+ e extravasamento de substâncias que absorvem a 260nm), não relacionados à ligação com o ergosterol da membrana.

Palavras Chaves: naftoquinonas, atividade antifúngica, mecanismo de ação.

Abstract

Introduction: The increase in fungal infections, adverse effects and resistance to antifungal agents currently used, stimulate new studies in search of better antifungal. In this context, the naphthoquinones are widely studied for possessing various biological activities, among them antifungal. The aim of this study was to evaluate the antifungal activity of new naphthoquinones semissintéticas against opportunistic fungi / dermatophytes and to evaluate the interference of a naphthoquinone selected in cell wall formation, membrane ergosterol and cell membrane strain of *Candida albicans* (ATCC 36232). **Methods:** The antifungal activity of four new naphthoquinones semi synthetic was evaluated against 89 cultures of microorganisms belonging to the collection of the National Institute for Amazonian Research (INPA), including opportunistic yeast, agents of dermatophytosis and opportunistic filamentous fungi. The test for determining the minimum inhibitory concentration (MIC) was performed as described by the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) documents M27 - A2 and M38-A/CLSI, 2002. The substance showed better activity was assessed as the action in the cell wall (test sorbitol) and interference in the membrane -associated interaction with ergosterol , the osmotic balance (K + efflux) and an essay by leakage of substances that absorb at 260 nm. **Results:** All new naphthoquinones tested exhibited antifungal activity, and the IVS320 (1H - cyclopenta [b] naphtho [2,3 - d] furan- 5 , 10 (3Ah , 10BH) - dione) showed the lowest MICs front species tested. The MIC IV320 was particularly low for dermatophytes , with MIC averages ranging from 5-28 mg / mL and against isolates of the genus *Cryptococcus* spp . Mean MIC ranged from 5.3 mg / mL. So it was subjected to preliminary tests of mechanism of action. In these trials , the IVS320 caused no change in the fungal cell wall , but caused problems in cell membrane permeability (efflux of K + and leakage of substances that absorb 260nm) unrelated to the connection with the ergosterol membrane .

Key Words: naphthoquinones, antifungal activity, mechanism of action.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Lesões causadas por dermatófitos.	19
Figura 2:	Estruturas químicas básicas das p-quinonas	23
Figura 3:	Síntese da β -lapachona a partir do lapachol por catálise ácida.	25
Figura 4:	Síntese do substituído α -e β -2,3-di-hidrofurano naftoquinonas.	27
Figura 5	Mecanismo de ação dos antifúngicos	28
Figura 6	Estruturas químicas das quatro naftoquinonas semissintéticas utilizadas nos bioensaios	32
Figura 7:	Fluxo das atividades do presente projeto de pesquisa	35
Figura 8	Microplaca de 96 poços com esquema em que foi realizado o ensaio antifúngico.	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais características das infecções fúngicas	16
Tabela 2: Manifestações clínicas das micoses oportunistas	22
Tabela 3: Classificação dos agentes antifúngicos	28
Tabela 4: Microrganismos pertencentes à coleção do INPA e padrões ATCC utilizados nos bioensaios.	34

ABREVIATURAS E SIGLAS

µg: Micrograma (10^{-6} g)

µL: Microlitro (10^{-6} L)

mg: Miligrama

mL : Mililitro

AIDS: *Acquired Immunodeficiency Syndrome*

AMB: Anfotericina B

ASD: Agar Sabouraud Dextrose

ATCC: *American Type Culture Collection*

CAN: Nitrato de amônia

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

DMSO: dimetilsulfoxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ErgA: Epoxidase

ERG1: Esqualeno Epoxidase

ERG11: Enzima citocromo P450 14 α -demetilase

Erg11p: Lanosterol 14 α -desmetilase

5FdUMP: S-fluorodeoxiuridina monofosfato

5FU: 5-Fluouracil

5FUDP: 5-fluorouridina difosfato

5FUMP: 5'-uridina monofosfato pirofosforilase

5FUTP: 5-fluorouridina trifosfato

GM: Média geométrica

MOPS: Acido morfolinopropanosulfonico

NCCLS: *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

RNA: Ácido ribonucleico

UFC: Unidade Formadora de Colônias

IVS 320: 1H-cyclopenta[b]naphtho[2,3-d]furan- 5,10(3aH,10bH)-dione

IVS322: 6b,7-dihydro-5H-cyclopenta[b]naphtho[2,1-d]furan-5,6(9aH)-dione

Nor- α -lapachona: 2,2- metil-2,3-di-hidro-nafto[2,3-b]furan-4,9-diona

Nor- β -lapachona: 2,2-dimetil-2,3di-hidro-nafto[1,2-b]furan-4,5-diona

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Micoses	15
2.1.1 Micoses cutâneas.....	16
2.1.2 Micoses oportunistas.....	20
2.2 Atividades Biológicas das naftoquinonas.....	23
2.3 Atividades biológicas da IVS320; IVS322, Nor- α -lapachona e Nor- β -lapachona.....	26
2.4 Mecanismos de ação de antifúngicos.....	27
3. OBJETIVOS	31
3.1 Objetivos gerais.....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Modelo de estudo.....	32
4.2 Universo de estudo.....	32
4.2.1 Naftoquinonas semissintéticas.....	32
4.2.2 Substâncias antifúngicas padrão.....	33
4.2.3 Cultura de fungos.....	33
4.3 Procedimentos.....	33
4.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	36
4.3.1.1 Obtenção dos inóculos.....	36
4.3.1.2 Teste de sensibilidade antifúngica.....	37
4.3.1.3 Leitura dos resultados.....	37
4.3.2 Ensaio de mecanismos de ação.....	38
4.3.2.1 Ensaio proteção do sorbitol.....	38
4.3.2.2 Efeito do ergosterol.....	39
4.3.2.3 Ensaio do efluxo de potássio.....	39
4.3.2.4 Ensaio de extravasamento de substâncias que absorvem a 260nm.....	40
5. RESULTADOS	41
6. CONCLUSÕES	55
7. REFERÊNCIAS	56

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos anos, a ocorrência de infecções fúngicas em humanos vem aumentando, representando um problema para a saúde devido à sua alta morbidade e mortalidade em todo o mundo (BROWN *et al.*, 2012). O tratamento das micoses não é sempre efetivo, pois embora existam agentes antifúngicos eficazes atualmente disponíveis, eles causam efeitos indesejáveis como toxicidade, interações medicamentosas com outras substâncias e insuficientes propriedades farmacocinéticas, além do desenvolvimento de resistência (AYATI *et al.*, 2012). Portanto, é importante a busca e o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos de amplo espectro mais seguros e mais potentes.

Entre as substâncias naturais, as naftoquinonas (encontradas em bactérias, fungos, animais e principalmente em vegetais) têm despertado interesse nos últimos anos, não só devido à sua importância nos processos bioquímicos vitais, como também por apresentarem várias atividades biológicas conhecidas, como atividade antitumoral, antibacteriana e antiviral (FERREIRA *et al.*, 2010). Uma série de estudos também demonstraram que os derivados de naftoquinonas apresentam atividade antifúngica (SHENG & ZHANG *et al.*, 2011). Entre esses, um relatou a síntese, a partir da lausona, de quatro substâncias que apresentaram atividade antifúngica frente a seis espécies de *Candida*, isoladas da cavidade oral de pacientes com próteses removíveis (FREIRE *et al.*, 2010).

Neste trabalho, a atividade antifúngica dos compostos 2,2-dimetil-2,3-di-hidro-nafto[2,3-*b*]furan-4,9-diona, 2,2-dimetil-2,3-di-hidro-nafto[1,2-*b*]furan-4,5-diona, 1H-cyclopenta[*b*]naphtho[2,3-*d*]furan-5,10(3aH,10bH)-dione e (6b,7-dihidro-5H-cyclopenta[*b*]naphtho[2,1-*d*]furan-5,6(9aH)-dione foi avaliada frente 89 culturas fúngicas, sendo 29 de leveduras oportunistas, 40 fungos filamentosos e 20 de filamentos oportunistas e dermatófitos. O composto que apresentou-se como melhor antifúngico teve o seu mecanismo de ação investigado frente a cepa *Candida albicans* ATCC 36232.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Micoses

As infecções fúngicas ou micoses são doenças causadas pelo desenvolvimento e multiplicação de fungos patogênicos primários ou oportunistas em diferentes órgãos. A maioria dos patógenos primários são fungos filamentosos, capazes de estabelecer uma infecção em indivíduos saudáveis. Enquanto que a maioria dos oportunistas são leveduras e algumas espécies de fungos filamentosos, capazes de estabelecer uma infecção no corpo humano devido a uma supressão do sistema imunológico (VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

Apesar de não haver consenso quanto à classificação das infecções fúngicas, uma vez que os autores podem ou não incluir certas doenças fúngicas de acordo com sua experiência em taxonomia de micologia médica, as diferenças existem. As micoses podem ser classificadas de acordo com a localização no corpo humano (Tabela 1) e conforme a apresentação clínica (VANDEPUTTE *et al.*; ARENAS *et al.*, 2012).

As infecções superficiais, estão limitadas à parte mais externa da pele e do cabelo, e que em raríssimos casos invadem a derme e até mesmo órgãos internos, estas infecções são mais frequentemente causada por levedura do gênero *Malassezia*. As infecções cutâneas acometem a camadas mais externas da pele e unha, geralmente causadas por dermatófitos do gênero *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. Enquanto que as Infecções da mucosa são causadas principalmente por leveduras oportunistas, principalmente aquelas pertencentes ao gênero *Candida* (VANDEPUTTE *et al.*, 2012). As micoses subcutâneas são causadas por fungos saprófitas que afetam principalmente a pele e o tecido subcutâneo, ainda que ocasionalmente possam se espalhar para outros locais e causar infecção disseminada ou sistêmica. Os principais agentes causadores são do gênero *Sporothrix* e *Cladosporium* (ARENAS *et al.*; VERA-CABRERA *et al.*, 2012). Micoses sistêmicas causadas por fungos dimórficos que normalmente entram no organismo através do trato respiratório, são capazes

de causar doenças em que o inóculo é suficiente, e 90% das infecções são assintomáticas ou auto limitantes, deixando o hospedeiro específico, com resistência à reinfecção. Os principais gêneros são *Histoplasma* e *Paracoccidioides* (ARENAS *et al.*,2012). Micoses oportunistas são causadas por fungos filamentosos oportunistas e a infecção depende do tamanho do inóculo. Pode acometer qualquer parte do organismo e apresentam sintomas variados. São muito comuns em pacientes imunocomprometidos e são frequentemente associados com uma elevada taxa de mortalidade. Os patógenos mais freqüentemente envolvidos em infecções fúngicas oportunistas são as *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* e *Fusarium* (HAY, 2006; PFALLER e DIEKEMA, 2010, VANDEPUTTE *et al.*, 2012).

Tabela 1: Principais características das infecções fúngicas

Localização corporal	Patógeno	Órgão	Gêneros mais frequentes	Grupos de microrganismos
Superficiais	Primário	Pele e cabelos	<i>Malassezia</i>	Leveduras
Cutâneas/mucosas	Primário e Oportunistas	Pele e unhas vagina, trato digestivo, trato urinário e olhos	<i>Trichophyton</i> <i>Epidermophyton</i> <i>Microsporum</i> <i>Candida</i>	Dermatófitos e Leveduras oportunistas
Subcutâneas	Primários	Pele e tecido subcutâneo	<i>Sporothrix</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Exophiala</i> ,	Dimórficos
Sistêmicas dimórfica	Oportunistas	Pulmão, fígado, baço e linfonodos.	<i>Histoplasma</i> , <i>Paracoccidioides</i>	Dimórficos
Sistêmicas Oportunistas	Oportunista	Diversos órgãos (pulmão, cérebro, sangue)	<i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Candida</i> e outros	Filamentosos oportunistas

FONTE: Adaptado de VANDEPUTTE *et al.*; ARENA *et al.*, 2012.

2.1.1 Micoses cutâneas

As micoses cutâneas estão entre as infecções fúngicas mais comuns e resultam do acometimento de fungos nos tecidos queratinizados da pele atingindo também as unhas, pelos e mucosas. Embora a lesão esteja relacionada à camada da pele e anexos mortos, cornificados, produzem várias respostas imunes celulares. A intensidade da resposta está relacionada com o

estado imunológico do hospedeiro e com cepa ou espécie do fungo (VAN MINNEBRUGGEN *et al.*, 2010). Dentre os principais agentes etiológicos das micoses cutâneas estão os agentes dermatófitos, fungos filamentosos, hialinos, septados, algumas vezes artroconidiados, queratinofílicos, passíveis de colonizar e causar lesões clínicas em pêlos e/ou extrato córneo de homens e animais. Os principais gêneros são *Microsporum*, *Trichophyton*, *Epidermophyton* responsáveis pelas dermatofitoses. Nas infecções mucosas, as leveduras oportunistas, principalmente da espécie *Candida albicans* infectam as mucosas da boca, vagina e da pele, causando os quadros de Candidose (ARENAS *et al.*, 2012)

Estudos epidemiológicos indicam que as micoses cutâneas estão entre as doenças de maior incidência no mundo (VANDEPUTTE *et al.*, 2012). As dermatofitoses afetam aproximadamente 40% da população mundial e representam 30% de todas as infecções micóticas cutâneas (PEREIRA *et al.*, 2011). A prevalência dos agentes etiológicos é variável nas diversas regiões do mundo e dentro de um mesmo país, devido a fatores climáticos, assim como práticas sociais, migração populacional e características individuais (PERES *et al.*, 2010).

No Brasil, estudos demonstram que a distribuição de agentes etiológicos são variáveis conforme a regiões geográficas. Nas regiões sul e sudeste têm apresentado alta incidência de infecções causadas por *Trichophyton rubrum*, seguido por *Microsporum canis* e *Trichophyton mentagrophytes*, enquanto na região Nordeste há maior prevalência de *Trichophyton tonsurans*, *T. rubrum* e *M. canis* (DE ARAÚJO, *et al.*, 2012). Em estudo realizado no Amazonas, as espécies mais prevalentes são *Trychophyton rubrum* (41.5%), *Trychophyton tousurans* (34.1%) e *Trychophyton mentagrophytes* (CORTEZ *et al.*, 2012). *Candida albicans* presente na cavidade bucal e trato gastrintestinal de indivíduos sadios são um dos principais agentes causadores das micoses humanas, sendo a quarta causa mais comum de infecções sistêmicas (SHAO *et al.*, 2007).

O processo infeccioso ocorre quando os fungos superam os mecanismos de defesa inato do hospedeiro e colonizam o tecido (PERES *et. al.*, 2010). Nas dermatofitoses a patogênese ocorre de 3 a 4 horas após ter ocorrido a germinação do artroconídio e a penetração da hifa no estrato córneo. Estas infecções induzem uma resposta específica, com componentes humorais e celulares, mediadas por hipersensibilidade tardia, entretanto o nível de inflamação varia de acordo com hospedeiro, a espécie e do estado patofisiológico do hospedeiro (VERMOUT *et. al.*, 2008). As leveduras do gênero *Candida* são comensais das mucosas sadias da pele, cavidade oral e da vagina e tornam-se patogênicas quando a defesa do hospedeiro é alterada por mudanças fisiológicas, envelhecimento, doenças degenerativas, neoplasias, imunodeficiências congênitas ou adquiridas, e imunodepressão induzida por atos médicos (COLOMBO e GUIMARÃES, 2003).

As manifestações clínicas das micoses cutâneas são variadas e dependem do agente etiológico, do local afetado, do binômio parasito/hospedeiro e também do estado imunológico do hospedeiro. Nas dermatofitoses são utilizadas as denominações *Tinea* seguidas do sítio anatômico das lesões, exemplo: *Tinea corporis*, *Tinea circinata* (tinha de pele glaba, FIGURA 1A) *Tinea capitis* (couro cabeludo), *Tinea pedis* (tinha do pé), *Tinea unguium* (tinha da unha, onicomicose FIGURA 1B). As lesões características nas infecções de pele causadas por dermatófitos são circulares, eritematosa e pruriginosas, devido a reações de hipersensibilidade ao fungo e/ou a seus metabólitos. Nas onicomicoses pode ocorrer aparecimento de manchas brancas, espessamento e descolamento das bordas da unha e até a distrofia total (PERES *et. al.*, 2010). A candidíase oral é a manifestação clínica mais comum lesões mucosas causadas por *Candida* spp..



Figura 1: Lesões causadas por dermatófitos. A) Lesões com bordas avermelhadas características de *tinea corporis*, B) Lesões distais das unhas *tinea unguium* (FONTE: www.doctorfungos.org/imagenban).

O diagnóstico correto das micoses cutâneas é laboratorial, no entanto, é pouco utilizado. A importância deste dá-se pela similaridade das manifestações clínicas por infecções fúngicas com as de outras etiologias, o que ocasiona um tratamento ineficaz devido à terapia empírica. Além disso, os exames laboratoriais podem ajudar a distinguir uma reinfecção por um mesmo agente de outra infecção por um agente novo e fornecer evidência se o próprio fungo é responsável pela falha do tratamento ou se há uma limitação do agente antifúngico. (ALMEIDA *et al.*, 2009).

O tratamento medicamentoso das micoses cutâneas causadas por dermatófitos e leveduras, pode ser realizado com administração por via oral ou tópica, usualmente por derivados azólicos (cetoconazol, fluconazol e itraconazol), terbinafina e griseofulvina (HAY 2006; CHEN&SORRELL *et. al.*, 2007). A terbinafina é um dos antifúngicos mais recomendados para o tratamento, sobretudo de onicomicoses, tanto para uso tópico, quanto oral (FERREIRÓS Jr. *et. al.*, 2012; ALMEIDA *et. al.*, 2009). Contudo, é importante ressaltar que o sucesso do tratamento está vinculado tanto ao correto diagnóstico e prescrição adequada quanto a total adesão ao tratamento pelo paciente (ALMEIDA *et. al.* 2009).

2.1.2 Micoses Oportunistas

São infecções causadas por fungos oportunistas que têm uma baixa virulência inerente e que causam doenças apenas em determinadas circunstâncias, e as manifestações clínicas variam conforme o agente etiológico (Tabela2) . As infecções oportunistas são mais comuns e graves em indivíduos imunocomprometidos, como nos pacientes com HIV/AIDS e os tratados com imunossupressores. A Candidíase, Criptococose são infecções oportunistas graves causadas por leveduras que têm como principais agentes etiológicos *Candida albicans* e *Candida spp*; *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. As hialo-hifomicoses são causadas por fungos filamentosos oportunistas dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. (KANTARCIOGLU, *et al.*, 2009, GARIBOTTO, *et al.*, 2010).

O gênero *Candida* é composto por um grupo heterogêneo de organismos, e mais de 17 espécies diferentes de *Candida* são conhecidos como sendo agentes etiológicos de infecções humana, mais de 90% das infecções invasivas são causadas por *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (SARDI *et al.*, 2013). *C. albicans* é a levedura mais frequentemente isolado em todo o mundo das infecções da corrente sanguínea nosocomiais. Nas infecções associada à infecção por *Candida spp* a mortalidade varia de 14,5 a 49% nos adultos.

Em estudos multicêntricos realizados no Brasil e no México, verificou-se que 4% das infecções da corrente sanguínea nosocomiais são causadas por espécies de *Candida* (SIFUENTES-OSORNIO *et al.*, 2012; TSAI *et al.*, 2013). No Brasil, em estudos de candidemia, *C. albicans* foi responsável por 40,9% dos casos, seguido de *C. tropicalis* (20,9%), *C. parapsilosis* (20,5%) e *C. glabrata* (4,9%) (SIFUENTES-OSORNIO *et al.*, 2012; SARDI *et al.* (2013); TSAI *et al.*, 2013).

Espécies de *Candida* pertencem à microbiota normal da cavidade da mucosa oral, trato gastrointestinal e vagina do indivíduo, e são responsáveis por várias manifestações clínicas de

supercrescimento mucocutânea para infecções da corrente sanguínea. O diagnóstico baseia-se no isolamento do microrganismo na corrente sanguínea, através de hemocultura (SIFUENTES-OSORNIO *et.al.*, 2012)

Na América Latina, a anfotericina B desoxicolato continua a ser o antifúngico mais utilizado, seguido pelo fluconazol. Estudos de resistência a antifúngicos têm sido realizados globalmente e regionalmente. A resistência global à FCZ varia entre 1% e 6%. No entanto, quando analisado por espécie, a resistência ao fluconazol em *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, é inferior a 3%. Resistência ao fluconazol em *C. tropicalis* foi avaliado em até 6% a 8% dos casos, mas estes resultados podem ser influenciados pelo "fenômeno de arrasto" visto em testes de susceptibilidade. *C. glabrata* e *C. krusei* são geralmente mais resistentes, 30% e 70%, respectivamente (SIFUENTES-OSORNIO *et.al.*, 2012).

A criptococose é a segunda doença neurológica mais prevalente em pacientes brasileiros com AIDS (VIDOTTO *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2007; PAPPALARDO *et al.*, 2007). A meningoencefalite é a forma clínica mais comum da criptococose na América Latina, com 85% dos casos causadas por *C. neoformans*, 80% estão associados a infecção com HIV e alguns estudos relataram *Cryptococcus* como o quarto ou quinto microrganismo mais comum isolado em hemoculturas (SIFUENTES-OSORNIO *et.al.*, 2012). O índice de mortalidade de criptococose no SNC é de 15% a 30%, mesmo com o tratamento (CHARLIER *et al.*, 2008).

Cryptococcus neoformans (sorotipos A e D, os genótipos VNI-IV) é o agente da criptococose, que afeta pacientes imunodeprimidos, como pacientes com AIDS. Em contraste, *Cryptococcus gattii* (sorotipos B e C, os genótipos VIG-IV) é o agente da criptococose esporádica que pode afetar imunocompetentes. Apesar de *C. neoformans* ter distribuição mundial, *C. gattii* é encontrado em detritos de árvore (NUCCI *et al.*, 2010; SIFUENTES-OSORNIO *et.al.*, 2012). É a causa mais importante meningoencefalite em todo o mundo,

afetando tanto imunocompetentes, bem como os indivíduos imunocomprometidos. Isso pode causar outros padrões clínicos, tais como fungemia, pneumonia e lesões dos ossos, pele e tecido mole (BROWN *et al.*, 2012).

Estudos de suscetibilidade antimicrobiana indicam que mais de 99% dos isolados são suscetíveis a anfotericina B, fluconazol, e flucitosina (PFALLER *et al.*, 2010). Diretrizes atuais de tratamento para meningoencefalite criptocócica recomendam o uso de anfotericina B, mais flucitosina, mas na América Latina, 80% dos pacientes são tratados com desoxicolato de anfotericina B e fluconazol, com resultados semelhantes aos do tratamento padrão (VAN MINNEBRUGGEN *et.al.*, 2010; SIFUENTES-OSORNIO *et.al.*, 2012)

Tabela 2. Manifestações clínicas das micoses oportunistas

Doença	Agente etiológico	Quadro clínico mais frequente
Candidemia	<i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida glabrata</i> <i>Candida parapsilosis</i> <i>Candida Krusei</i>	infecções da corrente sanguínea
Criptococose	<i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Cryptococcus gatti</i>	forma lesões nos pulmões ou sistema nervoso central (SNC)
Hialohifomicoses	<i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Candida e outros.</i>	Hematogenicamente disseminam-se para outros órgãos, como pulmão e coração.

FONTE: SIFUENTES-OSORNIO *et.al.*, 2012.

As hialohifomicoses, infecção por *Aspergillus*, *Fusarium* e outros fungos filamentosos oportunistas, têm sido amplamente descrita em pacientes com neoplasias hematológicas, transplante (transplantes de medula óssea), as pessoas com diabetes crônica e paciente em tratamento com alta dose de esteroides. Na América Latina, os fatores de risco mais relevantes foram neutropenia profunda, monócitos menos de 100 células por mais de 4 dias, e elevado nível sérico de proteína C reativa. Depois da *Candida*, os patógenos mais importantes envolvidos são *Aspergillus spp*, *Fusarium spp*. Na América Latina, aspergilose broncopulmonar foi avaliada como a terceira principal causa mais comum de micoses

profundas em alguns hospitais gerais. Caracteristicamente, o diagnóstico só pode ser estabelecido por critérios histológicos, tais como angio invasão ou pelo isolamento desses agentes patogênicos a partir da corrente sanguínea (SIFUENTES-OSORNIO *et.al.*, 2012).

2.2 Atividades biológicas das naftoquinonas

As quinonas representam uma ampla e variada família de compostos oxigenados, formados a partir da oxidação de fenóis. Sua principal característica é a presença de dois grupos carbonílicos formando um sistema conjugado, são altamente reativas e suas propriedades químicas permitem que interajam com alvos biológicos, formando ligações covalentes e, agindo como agentes de transferência de elétrons em reações de oxidação-redução (KUMAGAI, *et al.*, 2012).

Com base na sua estrutura molecular, são classificadas de acordo com o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinonoídica em: benzoquinonas - um anel benzênico; naftoquinonas – um anel naftalênico; antraquinonas – um anel antracênico linear ou angular (Fig. 2). Em decorrência de diferentes arranjos quinonoídicos (isomeria), com um mesmo tipo de anel pode-se ter diferentes quinonas, dependendo das disposições relativas das carbonilas (DA SILVA *et al.*, 2003).

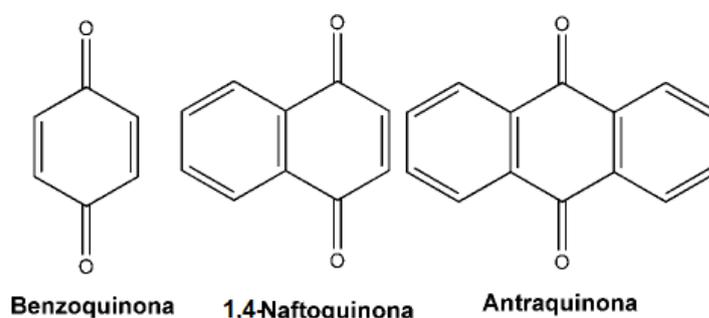


Figura 2 : Estruturas químicas básicas das quinonas.

Nas naftoquinonas, tem-se a forma isomérica *orto*-quinonoídica (posição 1,2) quando as carbonilas são vizinhas, ou a *p*-naftoquinonoídica (posição 1,4) com as carbonilas tendo entre si dois carbonos. Outros arranjos isoméricos são conhecidos, principalmente em

sistemas policíclicos, cujas formas isoméricas diferem muito em suas propriedades físicas, químicas e quanto à sua atuação biológica. A β -lapachona, por exemplo, é muito mais ativa frente a *Trypanosoma cruzi* que seu isômero natural, α -lapachona (DA SILVA *et al.*, 2003)

As naftoquinonas são de particular interesse em virtude de sua ampla ocorrência em produtos naturais, por possuir ou já ter possuído grande importância econômica como corantes, na síntese orgânica e na área farmacológica. Dentre as quinonas mais importantes figuram o Lapachol (2-hidroxi-3-[3-metil-2-butenil]-1,4-naftoquinona), a Lausona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) e a lapachona (3,4-dihidro- 2,2-dimetil-2H-nafto [1,2-*b*] pirano-5,6-diona) (RIBEIRO *et. al.*, 2008).

Dentre as *p*-naftoquinonas, a lausona (Fig. 3-1) e o lapachol (Fig. 3-2) são vastamente estudados. Os primeiros relatos da utilização de extratos vegetais que possuem naftoquinonas datam do Antigo Egito, há cerca de 4.000 anos atrás. O extrato das folhas de *Lawsonia inermis*, rico em lausona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona), uma das naftoquinonas estruturalmente mais simples obtida naturalmente, era empregado como cosmético para a pintura de cabelo, unhas e pele. Posteriormente, o extrato também passou a ser usado no tratamento de micoses e feridas (FERREIRA *et al.*, 2010).

Hooker, 1892 preparou pela primeira vez a síntese da β -lapachona (Fig 3-3) a partir do lapachol. Desde então os protocolos comumente utilizados para a síntese da β -lapachona são baseados na ciclização do lapachol obtidos das *Tabebuia* sp (ipê roxo) por catálise ácida, ou sintetizado a partir da Lausona (FERREIRA S.B., *et. al.*, 2010).

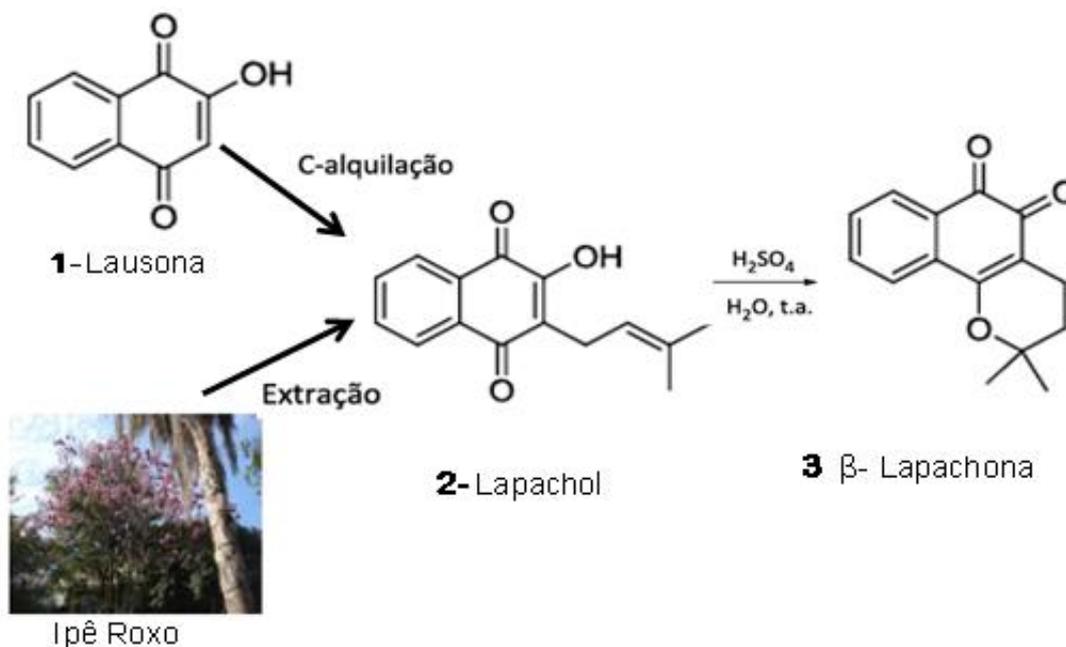


Figura 3. Síntese da β -lapachona a partir do lapachol por catálise ácida. 1- Lausona); 2- Lapachol; 3- β - lapachona. FONTE: adaptado de FERREIRA et. al, 2010.

As naftoquinonas, são comuns na natureza e representam uma importante classe de moléculas biologicamente ativas (FERREIRA et. al., 2010). Em geral, nos últimos anos o interesse por essa classe de substâncias é crescente, devido ao seu potencial uso para fins medicinais. Entre as várias naftoquinonas com atividade farmacológica, foram atribuídas ao grupo lapachol e seus derivados semissintéticos, atividades biológicas tais como: moluscicida, atividade frente a caramujos *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário so *Shistosoma mansoni* (BARBOSA et. al., 2005); leishmanicidas, ação intracelular nas formas amastigotas de *Leishmania (viannia) braziliensis* (TEIXEIRA et. al., 2001), tripanossomida, atividade frente a *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas em sua fase tripomastigota (SALAS et. al., 2008); antitubercular (FERREIRA et. al., 2010); antitumoral (SILVA JUNIOR, et. al., 2010); antibacterial (RAHMOUN et. al., 2012) e antifúngica (TANDON et. al., 2009).

2.3 Atividade biológica da IVS320; IVS 322, Nor- α -lapachona e Nor- β -lapachona

Uma série de estudos têm demonstrado que os derivados de naftoquinonas substituídas mostraram atividade particularmente marcada frente a fungos. Recentemente, Freire *et al.*, (2010) relataram a síntese de naftoquinonas dihidrofurano como novo composto que apresenta um grande potencial na aplicação farmacológica. Nesse trabalho realizaram a síntese de α -e β -2, 3-dihidrofurano naftoquinonas, 1a-i e 2a-i. Entre eles 1h (Nor- α -lapachona), 2h (Nor- β -lapachona), 1i (IVS320) e 2i (IVS322) e avaliou-os como agentes antifúngicos frente a seis espécies de *Candida* (*C.albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. tropicalis* e *C.dublinsiensis*), isoladas a partir da cavidade bucal de pacientes com prótese removíveis. Os resultados revelaram que os substituintes α -furano-naftoquinonas apresentam maior atividade antifúngica do que os compostos β -furano-naftoquinonas.

As sínteses das naftoquinonas foram preparadas a partir de lausona prontamente disponível e olefinas na presença de cério (IV) e nitrato de amônio (CAN) e foram realizadas em uma única etapa. Resumidamente, os compostos (furano naftoquinona) foram obtidos por oxidação, cicloadição de 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (Lausona) para o alceno, mediada por cério (IV) e CAN (Figura 4). Todos os compostos foram obtidos com bons rendimentos (10-86% dos isolados de produtos) e foram completamente caracterizados por espectroscopia de próton e carbono, ressonância magnética nuclear (^1H RMN e ^{13}C RMN, respectivamente), espectroscopia de infravermelho (IR) e análise elementar .

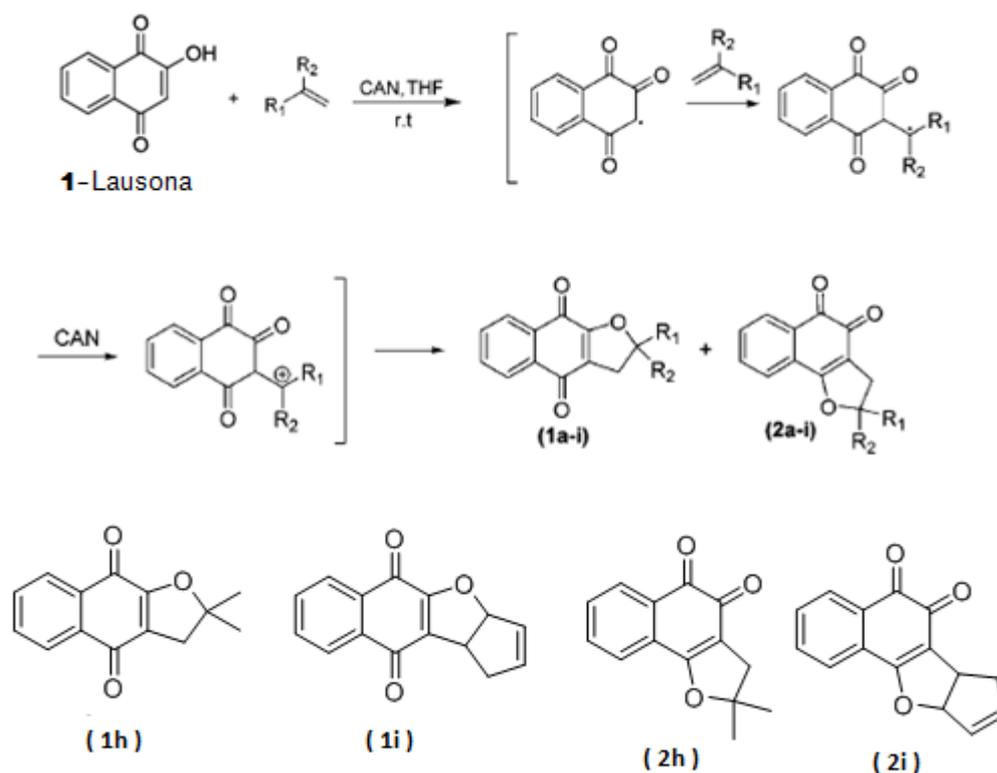


Figura 4. Síntese do substituído α -e β -2,3-di-hidrofurano naftoquinonas, adaptado de Freire et. al, 2010.

Contudo, é necessário conhecer a CIM desses novos compostos naftofuranquinonas frente a uma variedade de microrganismos de outras classes patogênicas causadores de infecções fúngicas.

2.4 Mecanismos de ação de antifúngicos

As classes de agentes antifúngicos usados para o tratamento de micoses são focadas em alvos que agem direta ou indiretamente no envelope celular (parede ou membrana plasmática) do fungo e, particularmente, na biossíntese do ergosterol, que é o principal componente da membrana celular dos fungos (ODDS *et al.*, 2003; KATHIRAVAN *et al.*, 2012). As classificações têm sido baseadas na utilização de classes químicas diferentes dos antifúngicos, tal como os polienos, azólicos, equinocandinas, alilaminas e análogos de piridinas (Tabela 3).

Tabela 3: Classificação os agentes antifúngicos

Classificação dos antifúngicos	Substância	Microrganismo Alvo	Modo de ação
Polienos	Anfotericina B Nistatina	<i>Candida spp.</i> <i>Cryptococcus spp.</i>	Ligação ao ergosterol e desestabilização da membrana plasmática
Azólicos	Cetoconazol, Fluconazol, Itraconazol	<i>Candida spp.</i> Dermatófitos, <i>Cryptococcus spp.</i>	Biossíntese do Ergosterol 14 α -Demetilase (citocromo P450 -14DM)
Alilaminas	Naftifina e terbinafina	Dermatófitos	Biossíntese do Ergosterol, Esqualeno epoxidase
Equinocandinas	Micafungina, caspofungina	<i>Candida spp.</i> <i>Aspergillus spp.</i>	Bloqueio da Síntese da parede celular β -(1,3)-D- glucano sintetase
Pirimidinas	Flucitosina (5FC)	<i>Cryptococcus spp.</i>	Síntese de DNA e RNA

Quanto ao alvo, os mecanismos de ação estão divididos em inibidores da síntese do ergosterol fúngicas (azóis), inibidores de esqualeno epoxidase (alilaminas), desreguladores do ergosterol (polienos antibióticos), inibidores da síntese de Glucan parede celular (equinocandinas), inibidores da síntese de ácidos nucleicos (Flucitocina) e inibidores da síntese de microtubules (griseofulvina), ilustrados na figura 5. (KATHIRAVAN, *et al.*, 2012).

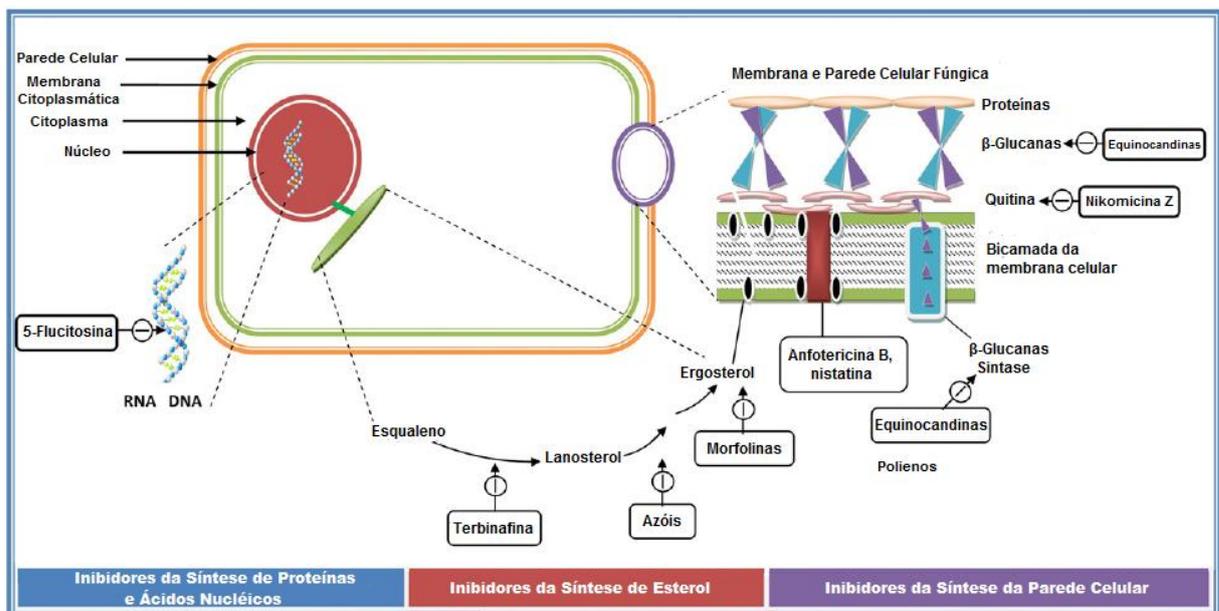


Figura 5: Mecanismo de ação dos antifúngicos. FONTE: Adaptado de KATHIRAVAN *et al.*, 2012

Os azóis são compostos sintéticos que são classificados em imidazóis (miconazol e cetoconazol) ou triazóis (fluconazol, itraconazol e voriconazol), de acordo com o número de átomos de nitrogênio no anel azol de cinco membros (KATHIRAVAN, *et al.*, 2012). Eles agem na biossíntese do ergosterol inibindo a enzima 14- α demetilase, formando um complexo do azol com uma parte do citocromo P450 do fungo, impedindo assim a conversão de lanosterol em ergosterol (GARNACHO-MONTERO & JIMÉNEZ PARRILLA, 2011). Esse acúmulo de metilesteróis, com forma e propriedades físicas diferentes do ergosterol, levam à formação da membrana com propriedades físicas alteradas, as quais não são capazes de desempenhar as funções básicas necessárias ao desenvolvimento fúngico (BERGOLD ; GEORGIADIS, 2004).

A classe dos polienos incluem três compostos principais: natamicina, nistatina e anfotericina B e suas formulações lipídicas (GARNACHO-MONTERO & JIMÉNEZ PARRILLA, 2011). Os polienos se ligam a uma porção esterol, basicamente ergosterol, presente na membrana de fungos sensíveis. Esta ligação forma canais na membrana celular, alterando a sua permeabilidade e produzindo extravasamento de íons de sódio, potássio e hidrogênio, causando a morte do fungo. (THOMPSON, 2002; CARRILLO-MUNÓZ *et. al.*, 2004). E ainda, interage com o colesterol na membrana celular humana, o que provavelmente confere seus efeitos tóxicos que frequentemente obrigam a interrupção do tratamento (PAUW, 2000).

As equinocandinas representadas pela caspofungina, micafungina e anidulafungina são lipopeptídeos que surgem como as novas classes de substâncias que têm como alvo a parede da célula fúngica. Elas inibem a β -1,3-glucan sintase, que é responsável pela biossíntese da parede celular do fungo, e assim capazes de destruí-la (PERLIN, 2007).

Outro agente antifúngico é a flucitosina (5-FC), que é um análogo da pirimidina hidrossolúvel relacionado ao agente quimioterápico fluorouracil (5-FU). A flucitosina causa

inibição da síntese de DNA (ácido desoxirribonucleico) e de RNA (ácido ribonucleico), respectivamente, após ser captada pelas células fúngicas através da enzima citosina permease, que no interior da célula é convertida em inicialmente em 5-FU e posteriormente em 5-fluorodesoxiuridina monofosfato (F-dUMP) e fluorouridina trifosfato (FUTP). Todos os fungos sensíveis são capazes de desaminar a 5-FC em 5-FU, mas as células humanas não são capazes de converter a flucitosina em fluorouracila (PAUW, 2000; BERGOLD; GEORGIADIS, 2004; KATZUNG, 2006).

As alilaminas, representadas pela naftifina, terbinafina e butenafina, interferem na biossíntese do ergosterol, como os azóis, contudo agem sobre o lanosterol, que é precursor do ergosterol. Elas atuam inibindo a enzima fúngica esqualeno epoxidase (ErgA) envolvida na síntese do lanosterol (OSBORNE et. al., 2006).

Comparado a outros patógenos, os fungos possuem estruturas celulares similares a dos seres humanos, o que limita o escopo de descoberta e desenvolvimento de medicamentos, tendo em vista que um antifúngico ideal deveria ter atividade fungicida e não causar toxicidade ao hospedeiro. Além disso, é cada vez maior a resistência aos fármacos antifúngicos existentes assim como a problemática do aumento da má resposta terapêutica, associadas a recidivas que se seguem à interrupção da terapia antifúngicas (PERES et. al., 2010; BROWN *et al*, 2012). Em virtude disso, este trabalho justifica-se pela importância da avaliação *in vitro* de novas naftoquinonas, visando o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos, bem como a avaliação do possível mecanismo de ação e a abertura para futuros trabalhos *in vivo*.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar a atividade antifúngica de novas naftoquinonas semissintéticas.

3.2 Específicos

3.2.1 Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das novas naftoquinonas semissintéticas frente a leveduras oportunistas, dermatófitos e fungos filamentosos oportunistas.

3.3.2 Avaliar a interferência de uma naftoquinona selecionada na parede celular, ergosterol de membrana e membrana celular de cepa de *C. albicans* ATCC 36232.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Modelo de estudo

Estudo experimental laboratorial que investigou a atividade antifúngica de novas naftoquinonas semissintéticas.

4.2 Universo de estudo

4.2.1 Naftoquinonas semissintéticas

As naftoquinonas que foram analisadas no presente trabalho são identificadas como de IVS320 (1H-cyclopenta[b]naphtho[2,3-d]furan-5,10(3aH,10bH)-dione) ; IVS 322 (6b,7-dihydro-5H-cyclopenta[b]naphtho[2,1-d]furan-5,6(9aH)-dione); Nor- α -lapachona (2,2-dimetil-2,3-di-hidro-nafto[2,3-*b*]furan-4,9-diona) e Nor- β -lapachona (2,2-dimetil-2,3di-hidronafto[1,2-*b*]furan-4,5-diona) (Figura 6). As quais foram sintetizadas por metodologia própria, pelo grupo de pesquisa do Doutor Vitor Francisco Ferreira do Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal Fluminense-UFF, a partir da lausona, isoladas e caracterizadas por métodos cromatográficos e espectroscópicos.

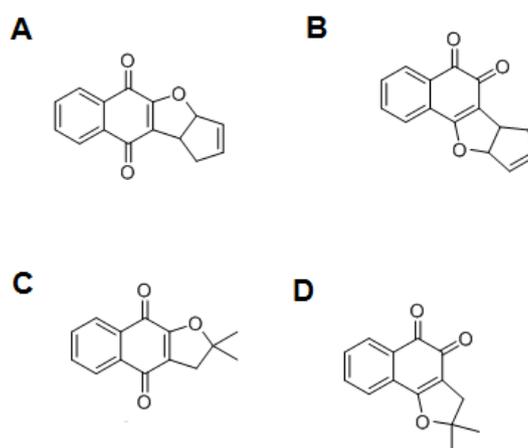


FIGURA 6: Estruturas químicas das quatro naftoquinonas semissintéticas utilizadas nos bioensaios. **A)** IVS320 (1H-cyclopenta[b]naphtho[2,3-d]furan-5,10(3aH,10bH)-dione) ; **B)** IVS 322 (6b,7-dihydro-5H-cyclopenta[b]naphtho[2,1-d]furan-5,6(9aH)-dione) **C)** Nor- α -lapachona (2,2-dimetil-2,3-di-hidro-nafto[2,3-*b*]furan-4,9-diona) e **D)** Nor- β -lapachona (2,2dimetil-2,3di-hidro-nafto[1,2-*b*]furan-4,5-diona)

4.2.2 Substâncias antifúngica padrão:

O antifúngico cetoconazol, e anfotericina B (Sigma) foram diluídos conforme especificado no protocolo M27-A2 do CLSI, 2002. O cetoconazol foi diluído em água estéril e a anfotericina B foi dissolvida em (DMSO, 0,5%) para preparo das soluções estoque 2mg/mL. Após as diluições, obtivemos as concentrações finais de 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 e 0,125 μ g/mL em RPMI.

4.2.3 Culturas de fungos:

Foram testadas 29 culturas de leveduras oportunistas, 40 de fungos filamentosos e 20 de fungos filamentosos oportunistas de isolados clínicos pertencentes à Coleção de Microrganismos do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia- INPA e ainda uma cepa ATCC (American Type Culture Collection) (Tabela 4).

4.3 Procedimentos

O presente trabalho de pesquisa possui como fluxo de atividades representados na Figura 7 foram realizados ensaios para determinação da CIM das Naftoquinonas e em seguida foram realizados ensaios preliminares dos mecanismo de ação antifúngico da IVS320, por ser o composto que apresentou melhor atividade antifúngica

Tabela 4 – Microrganismos pertencentes à coleção do INPA e padrão ATCC utilizados nos bioensaios.

Grupo de organismos	Espécies (n)	Código das Linhagens
Leveduras oportunistas	<i>Candida albicans</i> (n=01)	ATCC 36232
	<i>Candida albicans</i> (n=10)	56/04; 377/06; 839/10; 113/01; 07/10; 143/05; 62/08; 100/04; 322/05; E2/09
	<i>Candida parapsilosis</i> (n=10)	U.1068/08; U.968/07; U.784/07; U.1047/08; 248/95; U1059/08; U864/07; U840/08; U1018/08
	<i>Candida glabrata</i> (=10)	U52; 87/10; U40/06; U332/02; 59/08; U200/05; 40/01; 67/03; U44/02; U876/06
	<i>Criptococcus neoformans</i> (n=05)	12/98; 81/08; WM 148/10; WM626/10; WM628/10; WM629/10
	<i>Criptococcus gattii</i> (n=04)	WM 161/10; WM178/10; WM179/10; WM 779/10
Dermatófitos	<i>Microsporium canis</i> (n=10)	T capt 93/02; Tcapt 178/04; D42/04; Tcapt 794/05; U233/05; PV 78/02; Tcapt 209/03; Tcapt274/; 88; Tcapt 215/03
	<i>Trichophyton rubrum</i> (n=10)	U80/99; U548; U656; U1185; U819; U1077; U855; Tp13; Tp269; Tcorp18
	<i>Trichophyton tousurans</i> (n=10)	T. capt 300/08; U763/06; U763/06; U654/06; T corp 327/03; U1113/09; T corp 07; U68; U104; Tp 10 Tp42
	<i>Microsporium gypseum</i> (n=10)	Tcorp 66/99; U1197/08; 680/07; 91/94; Tcorp 401/07; Tcorp 8/10; T corp 56/99; Tcorp 494/08; T corp 282/02
Filamentosos oportunistas	<i>Aspergillus spp</i> (n=10)	U72/05; U841/08; U896/08; U918/08; U1124/10; Tp465/06; U17/05; P640/07; PV672/07; P218/06
	<i>Fusarium spp</i> (n=10)	U1048/08; U37/10; U57/10; U998/08; U1028/08; U500/04; U1012/08; U557/04; U1128/09; U1118

U= unha; T capt = *tinea capitis*; Tcorp= *tinea corporis*; Tp= *tinea pedis*.

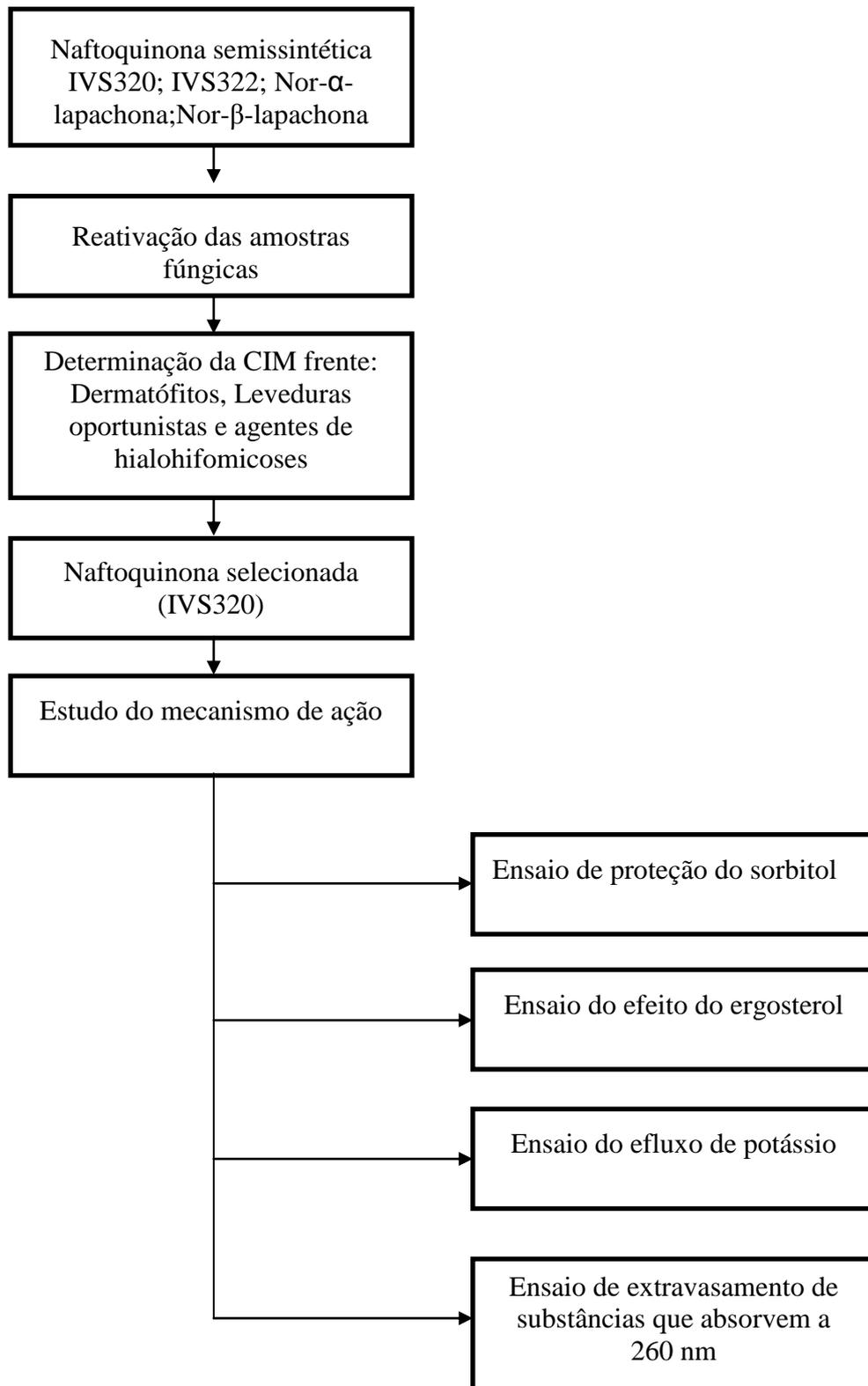


Figura 7. Fluxo das atividades realizadas no trabalho.

4.3.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

4.3.1.1 Obtenção dos inóculos

Dos subcultivos das leveduras oportunistas em meio Agar Sabouraud Dextrose (24 horas para espécies de *Candida* ou de 48 horas para espécies de *Cryptococcus*) foram escolhidas cinco colônias com diâmetro de aproximadamente 1mm que foram suspensas em 5 mL de solução salina estéril a 0,85% para contagem de células em câmara de Neubauer. A partir desta suspensão-padrão o número de células foi ajustado e diluído com meio líquido RPMI-1640, obtendo um inóculo com concentração final de $2,5 \times 10^3$ CFU/mL, conforme o documento M27-A2 do CLSI(2002).

Os inóculos dos dermatófitos foram obtidos a partir de subcultivos de *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum gypseum* e *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum* com 15 dias. O preparo foi realizado conforme o documento M38-A do CLSI(2002), descrito para os fungos filamentosos oportunistas com modificações e foi obtida uma suspensão de esporos em meio de cultura RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) com e $2,5 \times 10^5$ células/mL (GUARRO et. al., 2001).

Os fungos filamentosos oportunistas (*Aspergillus* spp e *Fusarium* spp) foram subcultivados em meio Sabouraud dextrose sólido. Após sete dias de desenvolvimento, as colônias foram cobertas com aproximadamente 1mL de solução salina estéril a 0,85%, e desprendidas delicadamente, gerando uma suspensão contendo conídios e fragmentos de hifas. Essa suspensão foi transferida para um tubo estéril contendo 4 mL de solução salina, homogeneizada em agitador de tubos (vortex) por 15 segundos e da qual fez-se a leitura em câmara de Neubauer. A quantidade de células foi ajustada, com o intuito de obter um inóculo com concentração final de $2,5 \times 10^4$ CFU/mL, diluído em meio líquido RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) conforme documento M38-A do CLSI, 2002.

4.3.1.2 Teste de sensibilidade antifúngica

Foi realizado seguindo os documentos M27-A2 (teste de suscetibilidade para leveduras) e M38-A (teste de susceptibilidade para fungos filamentosos) sugerido pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), agora denominado CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)

Os testes foram realizados em placas de microtitulação de 96 poços (Figura 8), com fundo plano, distribuídos em oito fileiras horizontais (A-H) e doze colunas verticais (1-12), ensaiando dez concentrações das substâncias que foram estudadas. Foram adicionadas alíquotas de 100µL de meio líquido RPMI 1640 em todos os poços com uma pipeta multicanal. Em seguida foram adicionados aos poços na primeira coluna de A-H 100 µL da concentração mais alta das naftoquinonas (diluídas em 0,5% de DMSO) e do cetoconazol (200 µg/mL das naftoquinonas e 64 µg/mL cetoconazol). Na sequência foram realizadas diluições sucessivas até a coluna dez da placa de microdiluição, desprezando-se os últimos 100 µL da solução de diluição. Em seguida, foram adicionados 100 µl de inóculo do fungo já preparado em cada poço, da primeira a décima primeira coluna. As outras duas colunas foram destinadas a controles internos de qualidade, sendo a coluna 11(onze) o controle no qual foi comprovado o crescimento de cada amostra do fungo e a coluna 12 (doze) destinada ao controle de esterilidade do meio usado na reação. As placas foram tampadas e incubadas a 35°C por 24 horas para Leveduras, de 24 a 48 horas para filamentosos oportunistas e de 5 a 6 dias para filamentosos dermatófitos.

4.3.1.3 Leitura dos resultados

Após esta etapa foi realizada a leitura macroscópica (visualmente) da placa sendo a CIM determinada como o poço com crescimento menor que 50% do crescimento do poço controle. O mesmo procedimento foi realizado com as cepas controle, com CIM pré-conhecidas para cada experimento realizado, para a validação dos resultados obtidos nas

amostras. Para cada placa de 96 poços foram testadas uma cepa de fungo e quatro naftoquinonas, sendo realizada uma placa de antifúngico padrão separadamente.

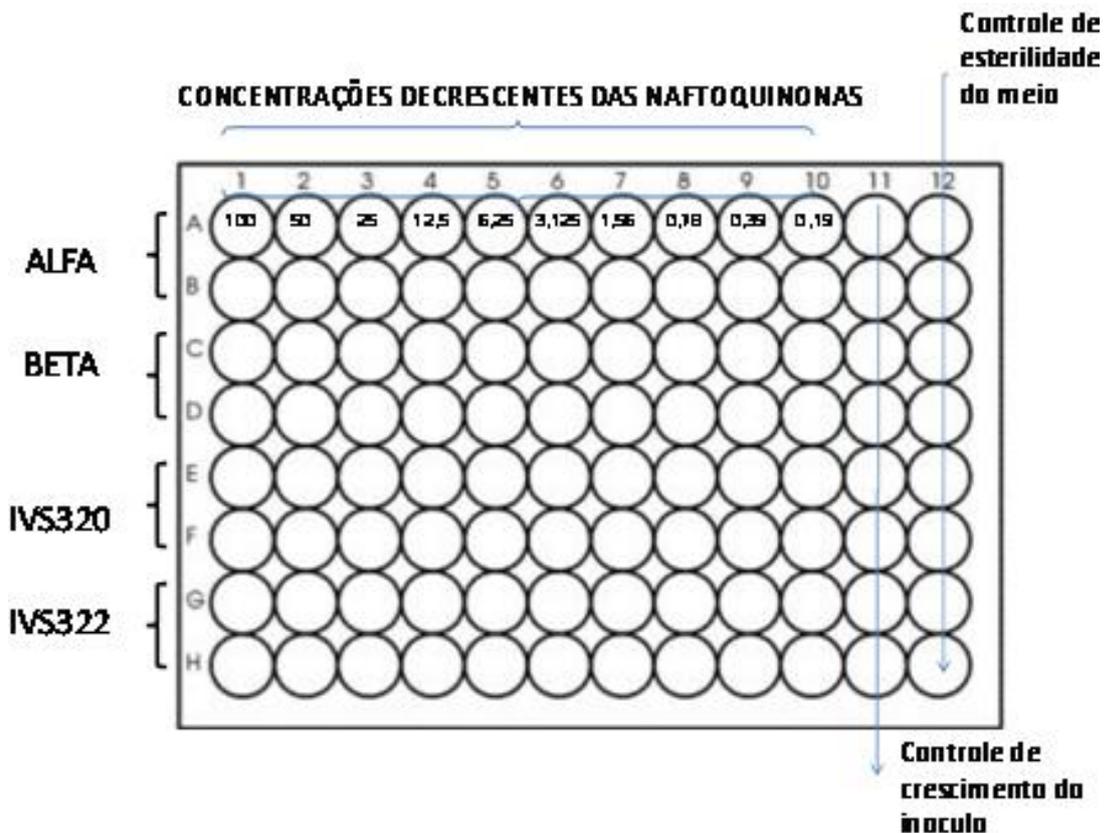


Figura 8: Microplaca de 96 poços com esquema em que foi realizado o ensaio antifúngico.

4.3.2 Ensaios preliminares dos mecanismos de ação

4.3.2.1 Ensaio proteção do sorbitol

Com o objetivo de avaliar a interferência das naftoquinonas na formação da parede celular fúngica foi avaliada a influência do sorbitol, que é um osmoprotetor, no crescimento de uma levedura oportunista. Valores de CIM foram determinados utilizando *C. albicans* ATCC 36232, pelo procedimento de microdiluição padrão descrito acima. Foram preparadas placas em duplicata: uma delas contendo diluições de IVS 320 com concentrações finais de substância variando de 100-0,2 $\mu\text{g/mL}$ e a outra contendo IVS320, nas mesmas concentrações, mais 0,8M de sorbitol, em cada poço, como suporte osmótico. Após incubação

a 35 ° C, as CIM foram lidas em 24 h. Este ensaio foi realizado em duplicada e os valores médios geométricos foram calculados (FROST *et. al.*, 1995).

4.3.2.2 Ensaio do efeito ergosterol

A CIM de IVS320 frente a *C. albicans* (ATCC 36232) foi determinada seguindo as diretrizes do CLSI M27-A2 (2002), como explicado anteriormente, na ausência e na presença de diferentes (200-800 µg/mL) concentrações de ergosterol (Sigma Chemical Co.) adicionado ao meio de ensaio, em linhas diferentes da mesma placa. A anfotericina B foi usada como substância controle. A CIM foi lida às 24 h de acordo com o controle do crescimento de fungos (LUNDES *et. al.*, 2000).

4.3.2.3 Ensaio do efluxo de potássio

Com o objetivo de avaliar a ação das naftoquinonas nas trocas iônicas celulares foi utilizado o ensaio descrito por Hao *et. al* (2009). O ensaio foi realizado com *C. albicans* (ATCC 36232), na CIM que a IVS320 apresentou atividade. As suspensões de *C.albicans* ($2,5 \times 10^3$ células/ mL) em 1 mL de água deionizada foram incubadas em tubos de ensaios juntamente com a IVS320 (50µg/ mL) a 35°C, em diferentes tempos (0, 2, 3 e 4 horas). Após a incubação, as suspensões de células foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos e os sobrenadantes foram separados e realizado a leitura em fotômetro de absorção atômica (Sprectr AA 2380, PERKIN-ELMER). A quantidade de K⁺ liberado foi mensurada e comparada com cultura controle (ausência da naftoquinona). O procedimento foi realizado em triplicata.

4.3.2.4 Ensaio de extravasamento de substâncias que absorvem a 260 nm

Células de *C. albicans* (ATCC 36232) foram cultivadas por agitação a 35 ° C até à fase estacionária precoce (18 horas de crescimento). Após Incubação foram lavadas e resuspendidas com MOPS a 0,16M, pH 7,0). (Sigma-Aldrich) para preparar os inóculos (TANG, *et al.*, 2008; CARRASCO, *et al.*, 2012) . Eppendorfs (volume final 500 ul) contendo inóculos (5×10^4 células/mL) e a IVS320, em 1 x, 4x CIM foram deixados de 1 a 6 h. Às 1, 2, 4, e 6 horas, eppendorfs foram centrifugados (5 min a 3000 rpm), e os sobrenadantes (100 uL) foram diluídos 10 vezes. Os materiais extraíveis de 260 nm de absorção foram determinados em duplicado(Gene Quant DNA/RNA). Considerando-se 100% de libertação a absorbância produzida pelas células tratadas com 1,2 mol/ L de HClO₄ a 100 ° C, 30 min (CARRASCO, *et al.*, 2012).

5. RESULTADOS

Os resultados da presente dissertação foram apresentados em forma de um artigo no formato do jornal *Annals Clinical Microbiology and Antimicrobials*.

Atividade antifúngica de novas naftoquinonas semissintéticas frente a fungos oportunistas e dermatófitos: ensaios preliminares do seu mecanismo de ação

Maria P. S. B. C Ferreira¹, Ivson Lelis Gama², Vitor Francisco Ferreira², Emerson Silva Lima¹ e João Vicente Braga Souza³.

1. Universidade Federal do Amazonas/ UFAM - Brasil

2. Departamento de Química Orgânica Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal Fluminense-UFF, RJ, Brasil

3 . Laboratório de Micologia Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/INPA – BRASIL

Informações para contato:

Tel.: +55 (92) 9114-7815; E-mail: joao.souza@inpa.gov.br (J.V.B. Souza).

Resumo

Introdução: O aumento das infecções fúngicas, os efeitos adversos e a resistência aos antifúngicos atualmente utilizados, estimulam novos estudos em busca de melhores agentes antifúngicos. Nesse contexto, as naftoquinonas são amplamente estudadas por possuir várias atividades biológicas, dentre elas antifúngica. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica de novas naftoquinonas semissintéticas frente a fungos oportunistas/dermatófitos e avaliar a interferência de uma naftoquinona selecionada na formação da parede celular, ergosterol de membrana e membrana celular de cepa de *Candida albicans* (ATCC 36232).

Métodos: A atividade antifúngica de quatro novas naftoquinonas semissintéticas foi avaliada frente a 89 culturas pertencentes a coleção de microrganismos do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), incluindo leveduras oportunistas, agentes de dermatofitoses e fungos filamentosos oportunistas. O ensaio de determinação da Concentração inibitória mínima (CIM) foi realizado como descrito pela CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) nos documentos M27-A2 e M38-A/CLSI,2002. A substância que apresentou melhor atividade foi avaliada quanto à ação na parede celular (ensaio sorbitol) e a interferência na membrana associada à interação com ergosterol, ao equilíbrio osmótico (efluxo de K^+) e a um ensaio de extravasamento de substâncias que absorvem a 260 nm. **Resultados:** Todas as novas naftoquinonas testadas exibiram atividade antifúngica, sendo que a IVS320 (1H-cyclopenta[b]naphtho[2,3-d]furan-5,10(3aH,10bH)-dione) apresentou as menores CIMs frente as espécies testadas. A CIM de IV320 foi particularmente baixas para dermatófitos, com médias de CIM variando de 5-28 $\mu\text{g/mL}$ e frente aos isolados do gênero *Cryptococcus* spp. médias de CIM variaram de 3-5 $\mu\text{g/mL}$. Por isso, foi submetida a ensaios preliminares de mecanismo de ação. Nesses ensaios, a IVS320 não causou alteração na parede celular do fungo, mas causou problemas na permeabilidade da membrana celular (efluxo de K^+ e extravasamento de substâncias que absorvem a 260nm), não relacionados à ligação com o ergosterol da membrana.

Palavras Chaves: naftoquinonas, atividade antifúngica, mecanismo de ação.

1. INTRODUÇÃO

O aumento recente da incidência das infecções fúngicas é devido ao crescente número de pacientes imunocomprometidos, tais como os infectados com HIV e submetidos a transplantes de órgãos ou a quimioterapia, uma vez que são mais suscetíveis as infecções por fungos oportunistas [1]. Embora existam agentes antifúngicos eficazes atualmente disponíveis, eles causam efeitos indesejáveis como toxicidade, interações medicamentosas com outras substâncias e insuficientes propriedades farmacocinéticas, além do desenvolvimento de resistência [2]. Portanto, é importante a busca e o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos de amplo espectro mais seguros e mais potentes.

Entre as substâncias naturais, as naftoquinonas (encontradas em bactérias, fungos, animais e principalmente em vegetais) têm despertado interesse nos últimos anos, não só devido à sua importância nos processos bioquímicos vitais, como também por apresentarem várias atividades biológicas conhecidas, como atividade antitumoral, antibacteriana e antiviral [3]. Um série de estudos também demonstraram que os derivados de naftoquinonas apresentam atividade antifúngica [4,5]. Entre esses, um relatou a síntese, a partir da lausona, de quatro substâncias que apresentaram atividade antifúngica frente a seis espécies de *Candida*, isoladas da cavidade oral de pacientes com próteses removíveis [6].

Neste trabalho, a atividade antifúngica dos compostos 2,2-dimetil-2,3-di-hidro-nafto[2,3-*b*]furan-4,9-diona, 2,2-dimetil-2,3-di-hidro-nafto[1,2-*b*]furan-4,5-diona, 1H-cyclopenta[*b*]naphtho[2,3-*d*]furan-5,10(3aH,10bH)-dione e (6b,7-dihidro-5H-cyclopenta[*b*]naphtho[2,1-*d*]furan-5,6(9aH)-dione) foi avaliada frente 89 culturas fúngicas, sendo 29 de leveduras oportunistas, 40 fungos filamentosos e 20 de filamentos oportunistas e dermatófitos. O composto que apresentou-se como melhor antifúngico teve o seu mecanismo de ação investigado frente a cepa *Candida albicans* ATCC 36232

2- MATERIAIS E MÉTODOS

Naftoquinonas

Os compostos utilizados no presente trabalho foram as naftoquinonas IVS320 (1H-cyclopenta[*b*]naphtho[2,3-*d*]furan-5,10(3aH,10bH)-dione) ; IVS 322 (6b,7-di-hidro-5H-cyclopenta[*b*]naphtho[2,1-*d*]furan-5,6(9aH)-dione), Nor- α -lapachona (2,2-dimetil-2,3-di-hidro-nafto[2,3-*b*]furan-4,9-diona) e Nor- β -lapachona (2,2-dimetil-2,3-di-hidro-nafto[1,2-*b*]furan-4,5-diona), as quais foram sintetizados pelo grupo de pesquisa de Desenvolvimento de Métodos e Moléculas Biologicamente Ativas em Síntese Orgânica do Departamento de

Química Orgânica da Universidade Federal Fluminense-UFF, como descrito por Freire et al. [6]. Uma solução de estoque (2 mg/mL) de cada substância foi preparada e, em seguida, diluiu-se em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) para se obter as concentrações necessárias para os ensaios.

Isolados clínicos e cepa de referência

Foram utilizadas nesse estudo 89 culturas (Tabela 1) pertencentes à Coleção de Microrganismos do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia- INPA. Essas estavam sendo preservadas em óleo mineral. Foram realizados subcultivos em meio Sabouraud para assegurar a sua pureza e viabilidade até que o teste fosse realizado. Uma cultura American Type Culture Collection (ATCC) *C. albicans* (36232) foi utilizada como controle nos testes de susceptibilidade e como principal microrganismo nos ensaios de mecanismo de ação.

Tabela 1 – Microrganismos pertencentes à coleção do INPA e padrão ATCC utilizados nos bioensaios.

Grupo de organismos	Espécies (n)	Código das Linhagens
Leveduras oportunistas	<i>Candida albicans</i> (n=01)	ATCC 36232
	<i>Candida albicans</i> (n=10)	56/04; 377/06; 839/10; 113/01; 07/10; 143/05; 62/08; 100/04; 322/05; E2/09
	<i>Candida parapsilosis</i> (n=10)	U.1068; U.968/07; U.784/78; U.1047/08; 248/95; U1059/08; U864/07; U840; U1018/08
	<i>Candida glabrata</i> (=10)	U52; 87/10; U40/06; U332/02; 59/08; U200/05; 40/01; 67/03; U44/02; U876/06
	<i>Criptococcus neoformans</i> (n=05)	12/98; 81/78; WM 148/10; WM626/10; WM628/10; WM629/10
	<i>Criptococcus gattii</i> (n=04)	WM 161/10; WM178/10; WM179/10; WM 779/10
Dermatófitos	<i>Microsporium canis</i> (n=10)	T capt 93/02; Tcapt 178/04; D42/04; Tcapt 794/05; U233/05; PV 78/02; Tcapt 209/03; Tcapt274/; 88; Tcapt 215/03
	<i>Trichophyton rubrum</i> (n=10)	U80/99; U548; U656; U1185; U819; U1077; U855; Tp13; Tp269; Tcorp18
	<i>Trichophyton tonsurans</i> (n=10)	T. capt 300/08; U763/06; U763/06; U654/06; T corp 327/03; U1113/09; T copr 07; U68; U104; Tp 10 Tp42
	<i>Microsporium gypseum</i> (n=10)	Tcorp 66/99; U1197/08; 680/07; 91/94; Tcorp 401/07; Tcorp 8/10; T corp 56/99; Tcorp 494/08; T corp 282/02; Tcorp 467/08

Filamentosos oportunistas	<i>Aspergillus spp</i> (n=10)	U72; U841; U896; U918; U1124; Tp465; T corp 17; P640; PV672; P218
	<i>Fusarium spp</i> (n=10)	U1048/08; U37/10; U57/10; U998/08; U1028/08; U500/04; U1012/08; U557/04; U1128/09; U1118

Ensaio de Atividade antifúngica

Os ensaios para determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) foram realizados pelo método de microdiluição em caldo, como descrito pela CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), nos documentos M27-A2/CLSI [7] e M38-A [8]. Resumidamente, em microplacas de 96 poços, foram colocados 100 µl de solução das substâncias avaliadas diluídas em caldo padrão RPMI 1640, as concentrações finais das substâncias variaram de 100-0,2 µg/mL (naftoquinonas) e 64-0,06 µg/mL (cetoconazol). Em seguida, foi adicionado 100 µl do inóculo contendo $2,5 \times 10^3$ células/mL das leveduras oportunistas ou $2,5 \times 10^5$ células/mL dos agentes Dermatofitoses ou $2,5 \times 10^4$ células/mL dos fungos filamentosos oportunistas. As placas de microdiluição foram incubadas a temperatura ambiente a 35°C, durante 24 a 48 horas (de levedura oportunista), 15 dias (agentes Dermatofitose) e 3 dias (fungos oportunistas filamentosos). Leitura visual foi realizada após 24h para leveduras oportunistas, 48 horas para os filamentosos oportunistas e 120h para os dermatófitos. A CIM foi definida como a mais baixa concentração da substância que causou 50% de inibição de crescimento do microrganismo em comparação com o ensaio controle (realizado sem substâncias inibidoras).

Ensaio de Mecanismo de ação

Foi avaliada a influência da naftoquinona IVS320 (1H-cyclopenta[b]naphtho[2,3-d]furan-5,10(3aH,10bH)-dione), substância destacada nos ensaios antifúngicos, em alguns dos possíveis alvos de interação presentes na levedura *C. albicans* ATCC 36232: a) Parede celular (ensaio de proteção do sorbitol), b) ergosterol da membrana plasmática (ensaio efeito do ergosterol) e na membrana celular (Ensaio efluxo de K^+ e extravasamento de substâncias que absorvem a 260 nm).

Ensaio proteção do sorbitol: Foi determinada a CIM da IVS320 frente a *C. albicans* (ATCC 36232) seguindo as diretrizes da CLSI (100-0,20 µg/mL), na ausência e na presença de 0,8 M de sorbitol (Sigma-Aldrich), substância utilizada como suporte osmótico. As CIMs foram determinadas após 24h após incubação a 35 °C [9,13].

Ensaio do efeito ergosterol: A CIM de IVS320 frente *C. albicans* (ATCC 36232) foi determinada seguindo as diretrizes da CLSI, como previamente descrito, na ausência e na presença de diferentes concentrações (200-800 µg/mL) de ergosterol (Sigma-Aldrich) adicionado ao meio de ensaio [10, 13]. A anfotericina B foi usada como substância padrão nesse ensaio. As CIMs foram determinadas após 24h após incubação a 35 °C.

Ensaio do efluxo de potássio: As células de *C albicans* (ATCC 36232) foram cultivadas por 18 horas, a 35°C em meio RPMI. As células foram lavadas e resuspendidas na concentração de $2,5 \times 10^3$ células/mL em água deionizada. Um mililitro desta suspensão foi incubada com IVS320 na concentração da CIM (50µg/mL) em tubos de ensaio a 35°C para vários tempos [11]. Células de *C. albicans* incubadas somente com água deionizada foram usadas como controle. Após centrifugação a quantidade de K^+ liberada no sobrenadante foi mensurada em espectrofotômetro de absorção atômica (Sprectr AA 2380, PERKIN-ELMER).

Ensaio de extravasamento de substâncias que absorvem a 260 nm

Células de *C. albicans* (ATCC 36232) foram cultivadas por agitação a 35°C até à fase estacionária precoce (18 horas de crescimento) em meio RPMI. Após incubação, essas foram lavadas e re-suspendidas em tampão MOPS (0,16M, pH 7,0) [12, 13]. Microtubos (volume final 500 µl) contendo os inóculos (5×10^4 células /mL) e a IVS320, em 1 x e 4x a CIM foram incubados por 6 h. Após 1, 2, 4, e 6 h de incubação, microtubos foram centrifugados (5 min a 3000 rpm) e os sobrenadantes (100 uL) foram lidos a 260 nm (Gene Quant DNA/RNA-Eppendorf). Nesse ensaio, foi considerado 100% de extravasamento a absorbância produzida pelas células tratadas com $HClO_4$ (1,2 M, 100 ° C, 30 min) [13].

3. RESULTADOS

3.1 Atividade antifúngica das novas naftoquinonas

Com o intuito investigar o potencial antifúngico de novas naftoquinonas semissintéticas, foram determinadas as suas CIMs frente a 89 culturas de fungos, entre leveduras oportunistas, dermatófitos e fungos filamentosos oportunistas (Tabela 1). A substância IVS320 (1H-cyclopenta[b]naphtho[2,3-d]furan-5,10(3aH,10bH)-dione) apresentou as menores CIMs frente todas as culturas testadas e foi especialmente ativa frente a dermatófitos e leveduras do gênero *Cryptococcus* (Tabela 2). Frente aos dermatófitos,

apresentou médias de CIM variando de 5-28 µg/mL e frente à *Cryptococcus* spp. as médias da CIM variaram de 3-5 µg/mL.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) das novas naftoquinonas frente aos diferentes espécies avaliadas. Média geométrica e intervalo foram descritos para cada grupo de culturas de espécies de fungos frente aos compostos avaliados.

Grupo de microrganismos	Culturas (n= 89)	Concentração Inibitória Mínima (CIM) µg/ mL									
		Nor-α		Nor-β		IVS320		IVS322		Cetoconazol	
		MG	Inter.	MG	Inter.	MG	Inter.	MG	Inter.	MG	Inter.
Leveduras	<i>C. albicans</i>	66	6.3 – 100	86	6.3 – 100	35	3.1-50	78	6,3-100	1	0,125-2
	(n=10)										
	<i>C. parapsilosis</i>	50	-	75	25-100	25	13-50	86	25-100	0,06	-
	(n=10)										
Oportunistas	<i>C. neoformans</i>	15	12.5-50	100	100	5	1,56-6,25	56	25-50	-	-
	(n=05)										
	<i>C. gattii</i>	25	12.5-50	100	100	3	1,56-6.25	44	25-50	-	-
	(n=04)										
Dermatófitos	<i>T. rubrum</i>	16	6.3-25	19	6.3-100	5	3,3-12,5	10	6,3-25	29	2-64
	(n=10)										
	<i>M. canis</i>	43	25-50	30	12,5-100	8	3,1-12,5	24	3,1-100	5	1-16
	(n=10)										
Filamentosos	<i>M. gypseum</i>	78	50-100	67	25-100	28	12,5-50	122	50-200	5	2-8
	(n=10)										
	<i>T. tonsurans</i>	35	12,5-50	34	6.3-200	8	3,11-25	38	25-50	1	0,5-4
	(n=10)										
Oportunistas	<i>Fusarium</i> sp.	117	50-200	67	25-100	36	25-50	103	50-200	6	1-16
	(n=10)										
	<i>Aspergillus</i> sp.	90	50-100	75	50-100	33	6,3-50	85	50-100	32	4-64
	(n=10)										

MG= média geométrica; Inter= Intervalo; - = Ensaio não realizado; n= número de diferentes isolados

3.2 Ensaios de investigação do mecanismo de ação da IVS320 frente a *C. albicans* ATCC 36232

Ação na parede celular

O ensaio conhecido como “Proteção do Sorbitol” foi realizado para determinar a existência de influência da IVS 320 sobre a integridade da parede celular de fungos [9]. Neste ensaio, as determinações da CIM da IVS320 frente *C. albicans* ATCC 36232 foram realizadas, em paralelo, na presença e ausência de sorbitol (0,8 M), um protetor osmótico utilizado para a estabilização de protoplastos fúngicos. Entende-se que um composto que interfere negativamente na parede celular do fungo deslocará a CIM para um valor mais elevado, na presença do suporte osmótico [9]. A CIM de IVS320 não variou na presença de sorbitol (50 µg/mL), após 72 horas de incubação, o que sugere que IVS 320 não atua através da inibição dos mecanismos que controlam a síntese ou a existência da parede celular.

Ação sobre o ergosterol

Para determinar se a IVS 320 causava alterações na membrana fúngica, pela interação com ergosterol, foi realizado o “Ensaio do Ergosterol”. Este ensaio identificava se um composto atuava ligando-se ao ergosterol da membrana dos fungos e fundamentava-se no fornecimento de ergosterol exógeno. Um composto que possui afinidade pelo ergosterol forma complexos rapidamente com o ergosterol livre, evitando assim que ocorra a complexação com o ergosterol da membrana fúngica. Como consequência, ocorre um aumento da CIM. Os resultados mostraram (Fig. 2) que a CIM da IVS320 frente a células de *C. albicans* ATCC 36232 permaneceu inalterada na presença de diferentes concentrações (200 a 800 µg/mL) de ergosterol exógeno. Sugerindo, portanto, que esta naftoquinona não atua interagindo com o ergosterol. Em contraste, observou-se um aumento de 4 x da CIM da anfotericina B, substância padrão usada nesse ensaio, uma vez que essa possui uma forte afinidade pelo ergosterol [14].

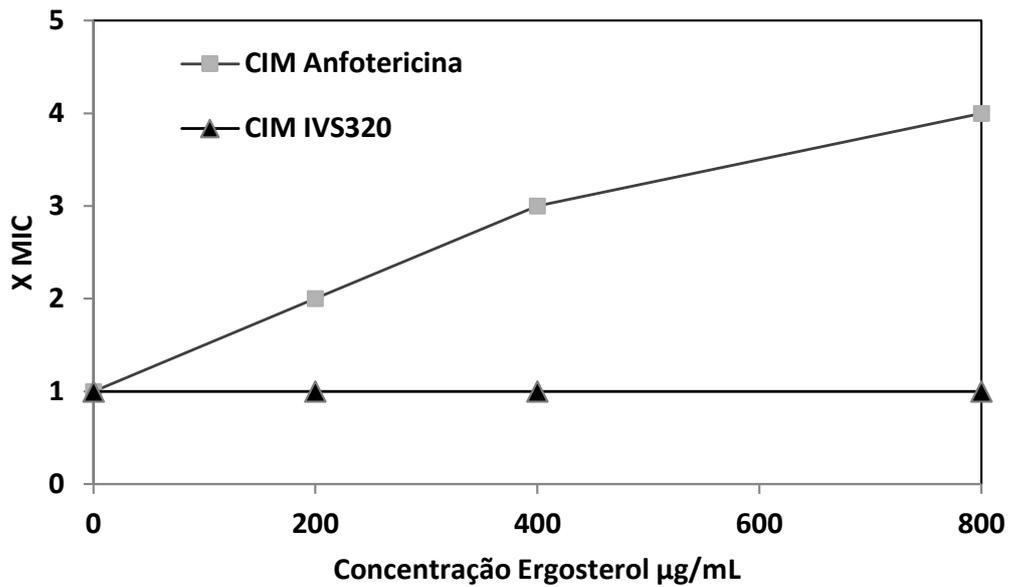


Figura 2. Efeito do ergosterol exógeno (200-800 µg/mL) sobre a CIM de IVS320 e anfotericina B frente a *C. albicans* ATCC 36232. Sobre o "y" eixo: 1 = 1 × CIM , 2 = 2 x CIM, 3= 3 × CIM, 4 = 4 × CIM.

Ação sobre o efluxo de potássio

O ensaio do “Efluxo de potássio” foi realizado com o objetivo de avaliar se o composto IVS320 interferia no equilíbrio osmótico das células de *C. albicans* (ATCC 36232). Esse ensaio se fundamentou no conhecimento de que a membrana celular é responsável pela manutenção do K^+ intracelular. Na Fig. 3 pode ser observado que houve efluxo de K^+ das células *C. albicans* (ATCC 36232) para o meio extracelular quando tratadas com IVS320, enquanto que, a concentração extracelular de K^+ da cultura controle permaneceu constante durante a incubação (Fig.2). O curso de tempo associado com o efluxo K^+ de *Candida* indicou que a permeabilidade da membrana fúngica aumentou até 4h.

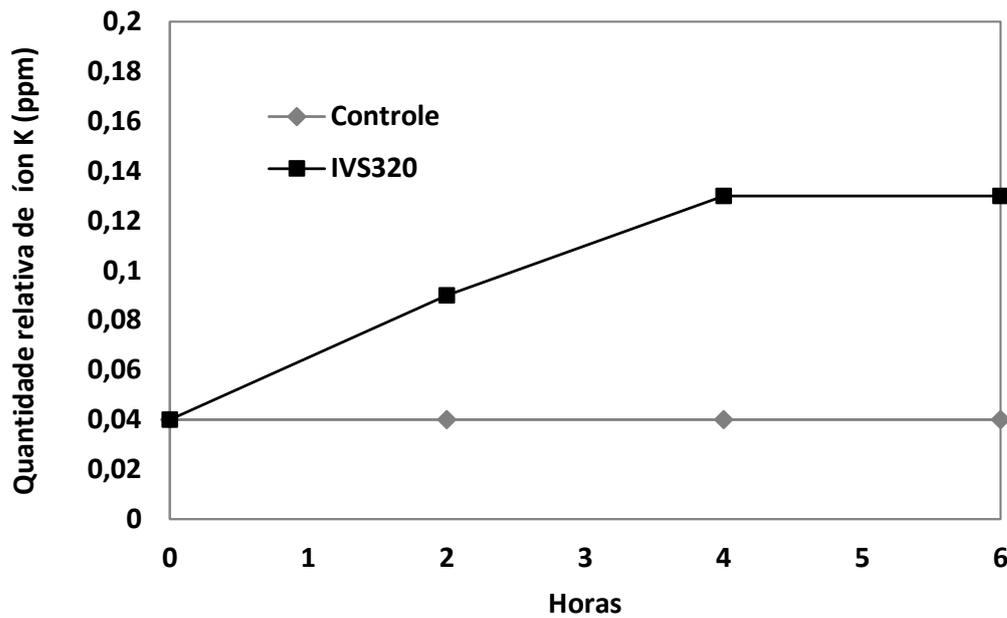


Figura 3. Efeito da IVS320 no efluxo de K^+ das células de *C. albicans* ATCC 36232.

Extravasamento de substâncias que absorvem a 260 nm

Um ensaio adicional, o "Ensaio de extravasamento de substâncias que absorvem a 260 nm" foi realizado para avaliar se o composto IVS320 produzia interferências na membrana de *C. albicans* ATCC 36232. Este ensaio se fundamentou no conhecimento de que a ruptura da membrana faz com que haja a liberação/extravasamento de componentes intracelulares da célula fúngica. Entre os componentes que podem extravazar, os nucleotídeos podem ser monitorados por serem compostos que exibem uma forte absorbância no comprimento de onda de 260 nm. IVS320 ($1 \times \text{CIM}$ e $4 \times \text{CIM}$) foi adicionado a suspensões de células de *C. albicans* e as amostras foram examinadas em vários intervalos de tempo (1, 2, 4 e 6 h). Os resultados mostraram (Fig. 4) que a $1x \text{ CIM}$ da IVS320 causou aumentos de 6, 9, 17 e 21 % em $\text{OD}_{260\text{nm}}$ em 1, 2, 4 e 6 h, em relação ao ácido perclórico, que é considerado por produzir 100% de extravasamento celular. Por sua vez, a concentração de $4 \times \text{CIM}$ causou um aumento de 2,6 x no extravasamento de nucleotídeos, produzindo extravasamentos de 14, 25, 42 e 61%, nos mesmos intervalos.

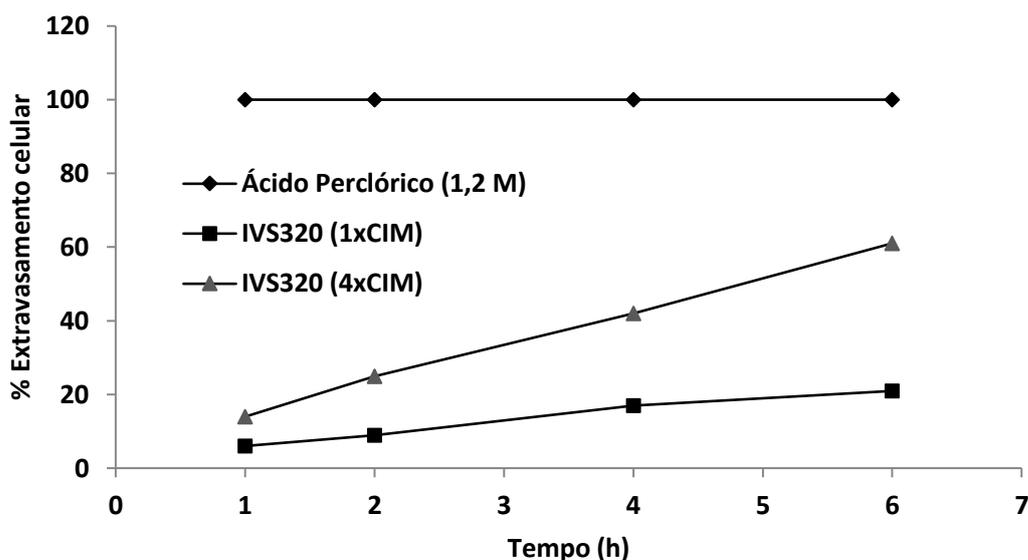


Figura 4- Extravasamento de substâncias que absorvem a 260 nm a partir de células de *C. albicans* ATCC 36232 incubado (1-6 h) com 1x e 4x a CIM de IVS320 .

4. DISCUSSÃO

A estrutura 1,4-naftoquinona é comum em vários produtos naturais e está associada com a atividade antifúngica. Trabalhos prévios já haviam demonstrado o potencial dessa classe de substâncias. Entre esses, o trabalho de Sasaki et al. [15] avaliou a atividade antifúngica de derivados da estrutura 1,4-naftoquinonas e obtiveram valores de CIM de 8 $\mu\text{g/mL}$ e 16 $\mu\text{g/mL}$ frente a culturas de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*, respectivamente. Estudos sobre modificações estruturais e a relação estrutura/atividade de 1,4-naftoquinona foram realizados por Sheng et al. [5], esses evidenciaram que a introdução de cadeias laterais contendo enxofre, oxigênio ou um átomo de nitrogênio na posição C_2 e/ou C_3 de 1,4-naftoquinona conduziram ao aumento da atividade antifúngica. Esses pesquisadores observaram que, após avaliação da atividade de dezessete compostos com introdução de diferentes cadeias laterais, três compostos apresentaram ampla atividade antifúngica e um desses [2-cloro-3-(4-hidroxifenilamino)-naftaleno-1,4-dione] apresentou CIM de 3,12; 1,56 $\mu\text{g/mL}$ e 0,78 $\mu\text{g/mL}$ frente a *Aspergillus fumigatus*, *C. albicans* e *C. neoformans*, respectivamente. O potencial antifúngico dos derivados da 1,4-naftoquinona foram confirmados ainda por Yamashita et al. [16] e Kategaonkar et al. [17].

No presente trabalho, todas as naftoquinonas testadas apresentaram atividade antifúngica. Este resultado corrobora com os de Freire et al [6] que observaram a atividade inibitória dessas mesmas substâncias frente *C. albicans*, com destaque para Nor- α -lapachona. No entanto, os achados de Freire et al [6] necessitavam ser confirmados ensaiando essas

substâncias frente a um número maior de isolados de *Candida albicans*, bem como frente a outras classes de fungos e nesse sentido os resultados do presente estudo demonstram claramente o potencial desses antifúngicos frente a um grande número de isolados de diferentes espécies patogênicas.

IVS320 apresentou as menores CIM frente aos Dermatófitos e *Cryptococcus spp.* Esses resultados são importantes, tendo em vista que este é o primeiro estudo avaliando a ação antifúngica dessa substância para esses agentes. A importância de novos medicamentos para o tratamento das dermatofitoses dá-se pelo fato de que essa classe de doença afeta aproximadamente 40% da população mundial, pelo pequeno número de fármacos disponíveis para o seu tratamento, pelos efeitos adversos causados pelos azóis e alilaminas no trato gastrointestinal e pela frequente recidiva [18,19]. Quanto a criptococose, a anfotericina B e a flucitosina são amplamente utilizadas para o seu tratamento, no entanto, é bem descrita a toxicidade e falha terapêutica dessas substâncias [20].

Devido à naftoquinona IVS 320 ter apresentado bons resultados, essa foi selecionada para os ensaios de avaliação do mecanismo de ação antifúngico. A seleção da cepa de *Candida albicans* (ATCC 36232) foi devido à importância que essa espécie possui na epidemiologia das infecções fúngicas e por tornar o presente trabalho facilmente reproduzível, por ser tratar de um microrganismo ATCC [21].

A IVS320 não causou alteração na parede celular do fungo, mas causou alterações na permeabilidade da membrana celular (efluxo de K^+ e extravasamento de substâncias que absorvem a 260nm), não relacionada à ligação com o ergosterol. Esses resultados são semelhantes aos obtidos por Emadi *et al* [22] que avaliaram o possível mecanismo de ação de binaftoquinonas e chegaram a conclusão que essas substâncias causam despolarização da membrana.

O ergosterol da membrana e a parede celular fúngica são estruturas exclusivas das células fúngicas e são os principais alvos para o desenvolvimento de novos antifúngicos. Portanto, a toxicidade de IVS320 precisa ser extensivamente avaliada frente às células humanas. No entanto, resultados indicativos de baixa toxicidade dessa substância foram apresentados pelos estudos realizados por Freire *et al* [6] que demonstraram nenhuma atividade hemolítica significativa frente a hemácias de camundongos ou citotoxicidade, nas concentrações entre 12,5-50 $\mu\text{g/mL}$, frente a fibroblastos humanos (NIH 3T3) [6].

Os resultados obtidos neste estudo são importantes, pois motivam a realização de estudos *in vivo*, com foco no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos como uma alternativa para o tratamento de dermatofitose e de micoses oportunistas.

5. REFERÊNCIAS

- [1] Borate HB, Sawargave SP, Chavan S.P.: **Novel hybrids of fluconazole and furanones: Design, synthesis and antifungal activity.** *Bioorg. Med. Chem.* 2011, 21: 4873-4878.
- [2] Ayati A, Falahati M, Irannejad H, Emami S: **Synthesis, *in vitro* antifungal evaluation and *in silico* study of 3-azolyl-4-chromanone phenylhydrazones.** *Daru Jour Pharma Scien.*
- [3] Ferreira VF, Ferreira SB, Silva FC: **Strategies for the synthesis of bioactive pyran naphthoquinones.** *Org. Biomol. Chem* 2010, 8:4793-4802
- [4] Raumoun NM, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K, Benabdallah M, Villemin D, Choukchou-Braham N: **Antibacterial and antifungal activity of lawsone and novel naphthoquinone derivatives.** *Medicine et maladies infectieuses* 2012, 42: 270-275.
- [5] Sheng, Chunquan, and Wannian Zhang. "New lead structures in antifungal drug discovery." *Current medicinal chemistry*, 2011, 18,5, 733-766..
- [6] Freire CPV, Ferreira SB, Oliveira NSM, **Synthesis and biological evaluation of substituted α - and β -2,3-dihydrofuran naphthoquinones as potent anticandidal agents.** *Med. Chem. Commun* 2010, 1:229-232.
- [7] National Committee for Clinical Laboratory Standards: **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. Volume NCCLS document M27-A2.** Wayne, PA, Clinical Laboratory Standards Institute; 2002
- [8] National Committee for Clinical Laboratory Standards: **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard. Volume NCCLS document M38-A.** Wayne, PA, Clinical Laboratory Standards Institute; 2002
- [9] Frost, D.; Brandt, K.; Cugier, D.; Goldman, R.: **A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly.** *J. Antibiot.* 1995, 48: 306–310.
- [10] Lunde, C.; Kubo, I.: **Effect of polygodial on the mitochondrial ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000, 44: 1943–1953.
- [11] Hao, G.; Shi, Y-H.; Tang, Y-L.; Le, G-W.: **The membrane action mechanism of analogs of the antimicrobial peptide Buforin 2.** *Peptides.* 2009, 30, 1421-1427.
- [12] Tang, Y. L., Shi, Y. H., Zhao, W., Hao, G., & Le, G. W.: **Insertion mode of a novel anionic antimicrobial peptide MDpep5 (Val-Glu-Ser-Trp-Val) from Chinese traditional edible larvae of housefly and its effect on surface potential of bacterial membrane.** *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis.* 2008, 48: 1187-1194.

- [13] Carrasco, H., Raimondi, M., Svetaz, L., Liberto, M. D., Rodriguez, M. V., Espinoza, L. & Zacchino, S.: **Antifungal Activity of Eugenol Analogues. Influence of Different Substituents and Studies on Mechanism of Action.** *Molecules*. 2012, 17, 1, 1002-1024.
- [14] Baran, M; Borowski, E.; Mazerski, J.: **Molecular modeling of amphotericin B-ergosterol primary complex in water II.** *Biophysical Chemistry*. 2009, 141, 162-168
- [15] Sasaki, Kenroh, Hidetomo Abe, and Fumihiko Yoshizaki.: **In vitro antifungal activity of naphthoquinone derivatives.** *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2002, 25,5: 669-670.
- [16] Yamashita, M., Kaneko, M., Tokuda, H., Nishimura, K., Kumeda, Y., & Iida, A: **Synthesis and evaluation of bioactive naphthoquinones from the Brazilian medicinal plant *Tabebuia avellanae*.** *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2009, 17, 17, 6286-6291.
- [17] Kategaonkar, Amol H., et al.: **Synthesis, in vitro antibacterial and antifungal evaluations of new α -hydroxyphosphonate and new α -acetoxyphosphonate derivatives of tetrazolo [1, 5-a] quinoline.** *European journal of medicinal chemistry*, 2010, 45,3, 1128-1132.
- [18] Kathiravan, M. K., Salake, A. B., Chothe, A. S., Dudhe, P. B., Watode, R. P., Mukta, M. S., & Murata, M.: **The biology and chemistry of antifungal agents: A review.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2012, 20, 19, 5669-5677.
- [19] Pereira, F. D. O., Wanderley, P. A., Viana, F. A. C., Lima, R. B. D., Sousa, F. B. D., Santos, S. G. D., & Lima, E. D. O.: **Effects of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor essential oil on the growth and morphogenesis of *Trichophyton mentagrophytes*.** *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011, 47,1, 145-153.
- [20] Posteraro, B., Posteraro, P., & Sanguinetti, M. (2013). **Update on Antifungal Resistance and its Clinical Impact.** *Current Fungal Infection Reports*, 2013, 1-11.
- [21] Sifuentes-Osornio, J., Corzo-León, D. E., & Ponce-de-León, L. A.: **Epidemiology of invasive fungal infections in Latin America.** *Current fungal infection reports*, 2012, 6,1, 23-
- [22] Emadi, A., Ross, A. E., Cowan, K. M., Fortenberry, Y. M., & Vuica-Ross, MA.: **Chemical genetic screen for modulators of asymmetrical 2, 2'-dimeric naphthoquinones cytotoxicity in yeast.** *PloS one*, 2010, 5, 5, e10846.

6. CONCLUSÕES

- Todas as novas naftoquinonas testadas exibiram atividade antifúngica, sendo que a IVS320 (1H-cyclopenta[b]naphtho[2,3-d]furan-5,10(3aH,10bH)-dione) apresentou as menores CIMs frente as espécies testadas. A CIM de IV320 foi particularmente baixas para dermatófitos, com médias de CIM variando de 5-28 $\mu\text{g/mL}$ e frente aos isolados do gênero *Cryptococcus* spp. médias de CIM variaram de 3-5 $\mu\text{g/mL}$.
- A IVS320 não causou alteração na parede celular do fungo, mas causou problemas na permeabilidade da membrana celular (efluxo de K^+ e extravasamento de substâncias que absorvem a 260nm), não relacionados à ligação com o ergosterol da membrana.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARENAS, R.; COUTIÑO-MORENO, G; WELSH, O. Classification of subcutaneous and systemic mycoses. *Clinics in Dermatology*. v.30, p.369-371, 2012.

ALMEIDA, L. M. M. *et al.* Resposta in vitro de fungos agentes de micoses cutâneas frente aos antifúngicos sistêmicos mais utilizados na dermatologia. *An Bras Dermatol*, v. 84, n. 3, p. 249-55, 2009.

AYATI, Adile *et al.* Synthesis, in vitro antifungal evaluation and in silico study of 3-azolyl-4-chromanone phenylhydrazones. *DARU J Pharmaceut Sci*, v. 20, p. 46, 2012.

BARBOSA, T. P.*et. al.* New 1,2,3,4-tetrahydro-1-aza-anthraquinones and 2-aminoalkyl compounds from norlapachol with molluscicidal activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 13, n.23, p.6464-6469, 2005

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

BROWN, G. D. *et. al.* Human fungal infections: the hidden killers. *Sci Transl Med*. v. 4, p.165rv13, 2012.

CARRASCO, H. *et al.* Antifungal Activity of Eugenol Analogues. Influence of Different Substituents and Studies on Mechanism of Action. *Molecules*, v. 17, n. 1, p. 1002-1024, 2012.

CARRILLO-MUÑOZ, A.J, *et al.* In Vitro Antifungal Active of Sertaconazole Compared With Nine Other Drugs Against 250 Clinical Isolates of Dermatophytes and *Scopulariopsis brevicaulis*. *Chemotherapy*, v. 50, p. 308-313, 2004.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v.6, n.5, p. 599-607, 2003.

CORTEZ, A. C. A. *et al.* Frequency and aetiology of dermatophytosis in children age 12 and under in the state of Amazonas, Brazil. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 29, n. 4, p. 223-226, 2012.

CHARLIER C, NIELSEN K, DAOU S, BRIGITTE M, CHRETIEN F, DROMER F. Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun*. v. 77, n1, p. 120-7, 2008.

CHEN, S.C.A; SORRELL, T. C. Antifungal agents. *Medical Journal of Australia*, v. 187, n. 7, p. 404-409, 2007.

DA SILVA, M. N. *et al.* 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.

DE ARAÚJO, S. M. et al. Agentes fúngicos em diferentes sítios anatômicos nos Serviços de Saúde Pública em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 54, n. 1, p. 5-10, 2012.

DIOGO, C.H. et al, Avaliação da eficácia *in vitro* de butenafina ante os agentes de micoses cutâneas prevalentes no Brasil. *Moreira Jr*, p. 158-168, 2009.

FREIRE et al. Synthesis and biological evaluation of substituted α - and β - 2,3- dihydrofuran naphthoquinones as potent anticandidal agents. *Med .Chem. Commun.*, v. 1, p. 229-232, 2010.

FERREIRA, S.B. et al. beta-Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. *Revista Virtual de Química*, v. 2, n. 2, p. 140-160, 2010.

FERREIRA, V. F., et al., Strategies for synthesis of bioactive pyran naphthoquinones. *Organic&Biomolecular Chemistry*, v. 8, n.21. p. 4793-4802, 2010.

FERREIRÓS JR, P. et al. Actualización en el tratamiento de las micosis cutâneas. *Actas Dermo-Sifilográficas*, v. 103, n. 9, p. 778-783, 2012

FROST D. J., et. al. A whole-cell *Candida albicans* assay for detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. *J. Antibiot*, v. 48, p. 306-310, 1995.

GARIBOTTO, Francisco M. et al. New small-size peptides possessing antifungal activity. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 18, n. 1, p. 158-167, 2010.

GARNACHO-MONTERO, J.; JIMÉNEZ PARRILLA, F. Interacciones farmacológicas en el paciente crítico.¿ Un factor relevante para usar micafungina?. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 29, p. 33-37, 2011

GUARRO, J. et al. In vitro activities of 10 antifungal drugs against 508 dermatophyte strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, p. 2524-2528, 2001.

HAY, R. J. Fungal infections, *Clinics in Dermatology* , v 24, p. 201–212, 2006.

HOOKE, S. C. The constitution of “lapachic acid” (lapachol) and its derivatives. *J. Chem. Soc.*, v.61, p. 611 -650, 1892

KANTARCIOGLU, A. S. et al. Susceptibility testing of *Cryptococcus diffuens* against amphotericin B, flucytosine, fluconazole, itraconazole, voriconazole and posaconazole. *Medical Mycology*, v. 47, n. 2, p. 169-176, 2009

KATHIRAVAN, Muthu K. et al. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 20, n. 19, p. 5678-5698, 2012.

KUMAGAI, Yoshito et al. The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. *Annual review of pharmacology and toxicology*, v. 52, p. 221-247, 2012.

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

LUNDE, C.S.; KUBO, I. Effect of polygodial on the mitochondrial ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 44, n. 7, p. 1943-1953, 2000.

MARTINS M.A, et al. Molecular diversity of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients in the city of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 102(7). p.777-84, 2007.

NUCCI, M. et al. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clinical Infectious Diseases*, v. 51, n. 5, p. 561-570, 2010.

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.

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos fungos filamentosos: Norma Aprovada - segunda Edição. NCCLS norma M38-A [ISBN 1-56238-470-8]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.)

ODDS, F. C.; BROWN A. J.P.; GOW, N.A.R. Antifungal agents: mechanisms of action. *Tren. Microb.*, v. 11, n. 6, p. 272-279, 2003.

OSBONE, C.S., et. al. Biological, biochemical, and molecular characterization of a new clinical *Trichophyton rubrum* isolate resistant to terbinafine. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 50, p. 2234, 2006.

PAUW, B.E. New antifungal agents and preparations. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Nijmegen, v.16, p. 147-150, 2000.

PAPPALARDO, M.C.; PASCHOAL, R.C.; MELHEM, M.S. AIDS-associated central nervous system cryptococcosis: a Brazilian case study. *AIDS*, V. 12;21(14), p. 971-2, 2007.

PERES, N.T.; et al. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. *An. Bras. Dermatol.*, v. 5, p. 657, 2010.

PERLIN, D.S. et. al. A phe389Leu substitution in ErgA confers terbinafine resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 50, p. 2533, 2007.

PEREIRA . F.O., et al., Effects of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor essential oil on the growth and morphogenesis of *Trichophyton mentagrophytes*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* v. 47, n. 1, p. 145-153. 2011

PFALLER, Michael A.; DIEKEMA, Daniel J. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Critical reviews in microbiology*, v. 36, n. 1, p. 1-53, 2010.

PFALLER, Michael A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American journal of medicine*, v. 125, n. 1, p. S3-S13, 2012.

RAHMOUN, N.M. et al., Antibacterial and antifungal activity of lawsone and novel naphthoquinone derivatives. *Medicine et maladies infectieuses*, v.42, n.6, p.270-275, 2012.

RIBEIRO, C.M.R. et al. Ciclização do lapachol induzida por sais de tálio III. *Química. Nova*. v. 31, n.4, p.759-762, 2008.

SALAS et al., Trypanosoma cruzi: activities of lapachol and α - and β -lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. *Bioorganic&Medicinal Chemistry*. V. 16, p. 668-674, 2008

SARDI, J. C. O. et al. Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of medical microbiology*, v. 62, n. Pt 1, p. 10-24, 2013.

SIFUENTES-OSORNIO, Jose; CORZO-LEÓN, Dora E.; PONCE-DE-LEÓN, L. Alfredo. Epidemiology of invasive fungal infections in Latin America. *Current fungal infection reports*, v. 6, n. 1, p. 23-34, 2012.

SILVA JUNIOR, I. F., et al. . Evaluation of the antifungal activity and mode of action of Lafoensia pacari A. St.-Hil., Lythraceae, stem-bark extracts, fractions and ellagic acid, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, p. 422-428, 2010.

SHAO, P. L.; HUANG, L. M.; HSUEH, P. R. Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. *Int .J. Antimicrob. Agents.*, v.30, p.487- 495, 2007

SHENG, C.; ZHANG, W. New lead structures in antifungal drug discovery. *Current Medicinal Chemistry*, v. 18, p.733-766, 2011.

TANDON, K. V. et al, Design, synthesis and biological evaluation of novel nitrogen and sulfur containing hetero-1,4-naphthoquinones as potent antifungal and antibacterial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, p. 3130-3137, 2009.

TANG, Ya-Li et al. Insertion mode of a novel anionic antimicrobial peptide MDpep5 (Val-Glu-Ser-Trp-Val) from Chinese traditional edible larvae of housefly and its effect on surface potential of bacterial membrane. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 48, n. 4, p. 1187-1194, 2008.

TSAI, P.W. et al. Study of *Candida albicans* and its interactions with the host: A mini review. *BioMedicine*, v. 3, n. 1, p. 51-64, 2013.

TEIXEIRA, MJ et al. In vitro and in vivo Leishmanicidal activity of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (lapachol). *Phytotherapy Research*, v.15, p. 44-48, 2001.

THOMPSON, L. M. Antifungal Drugs. *Revista Chilena de Infectologia*. v. 19, 2002.

VANDEPUTTE, P.; FERRARI, S.; COSTE, A.T. Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections. *International Journal of Microbiology*. 1-26: 2012.

VAN MINNEBRUGGEN, G. et al. A general overview on past, present and future antimycotics. *Open Mycol J*, v. 4, p. 22-32, 2010.

VERA-CABRERA, Lucio et al. Host defenses in subcutaneous mycoses. *Clinics in dermatology*, v. 30, n. 4, p. 382-388, 2012.

VERMOUT, S. et al. Pathogenesis of dermatophytosis. *Mycopathologia*, v. 166, n. 5-6, p. 267-275, 2008.

VIDOTTO V, I. et al. Extracellular enzymatic activities in *Cryptococcus neoformans* strains isolated from AIDS patients in different countries. *Rev Iberoam Micol.* v. 23(4). p. 216-20, 2006