UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Nailí Moreira da Silva

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E MECANISMO DE AÇÃO DE DERIVADOS DE 8-HIDROXIQUINOLINA SOBRE DIFERENTES GÊNEROS DE LEVEDURAS E FUNGOS FILAMENTOSOS

Porto Alegre
2019

Nailí Moreira da Silva

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E MECANISMO DE AÇÃO DE DERIVADOS DE 8-HIDROXIQUINOLINA SOBRE DIFERENTES GÊNEROS DE LEVEDURAS E FUNGOS FILAMENTOSOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

Porto Alegre
2019

CIP - Catalogação na Publicação

Silva, Naili Moreira
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E MECANISMO DE AÇÃO DE DERIVADOS DE 8-HIDROXIQUINOLINA SOBRE DIFERENTES GÊNEROS DE LEVEDURAS E FUNGOS FILAMENTOSOS / Naili Moreira Silva. -- 2019.
93 f.
Orientador: Saulo Fernandes Andrade.

Coorientador: Alexandre Meneghello Fuentefria.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Síntese de análogos de 8-hidroxiquinolina. 2. Micologia. 3. Atividade antifúngica. I. Andrade, Saulo Fernandes, orient. II. Fuentefria, Alexandre Meneghello, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“The difference between the impossible and the possible lies in a person’s determination”.

Dadi Janki

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Professor Saulo Fernandes de Andrade, pela confiança, pelas palavras de incentivo e por toda paciência e orientação ao longo desses anos.

Ao meu coorientador, Professor Alexandre Meneghello Fuentefria, pela oportunidade, por acreditar na vontade de uma aluna sem ao menos conhecê-la e por toda orientação antes mesmo da prova de seleção do mestrado.

Aos colegas do laboratório de síntese e do Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada. Com certeza aprendi muito com todos vocês. Em especial às colegas Priscilla Maciel Quatrin, Taís Kaminski, Luana Bazana e Magda Chaves, seja pela companhia no laboratório, pelas discussões acerca dos ensaios ou pela colaboração na realização de testes pertinentes a este estudo. À Vanessa Bergamo Zafanelli, que convivi pouco dentro do laboratório, mas que me recebeu desde o primeiro dia com tanto carinho.

À Josiane dos Santos, pela companhia, pela ajuda dentro do laboratório, por tornar meus dias na síntese mais divertidos e por compartilhar seu conhecimento.

À Marcela Lopes, agradeço com todo meu coração pela presença nesses anos. Indescritivelmente fundamental nesta jornada, não tenho palavras para expressar o quanto aprendi contigo e o quanto a admiro pela pessoa e profissional que és.

À Caroline Gentz, pela dedicação, pelas explicações sobre síntese e por sempre manter o bom humor.

Agradeço imensamente a Paula Reginatto: definitivamente encontrei mais que uma colega de laboratório, mas sim alguém que faço questão de chamar de amiga. Sempre me surpreendeu com tamanha dedicação, paciência, bom humor e incentivo! Se cheguei até aqui é porque pude contar contigo, sempre, para tudo! Gratidão imensa a ti.

À Bruna Pippi pela empatia, pela paciência de me explicar repetidas vezes os mesmos ensaios, pelas conversas e pela companhia no laboratório. Certamente tornou alguns finais de tarde e noites mais alegres.

À Gabriela Machado por estar sempre pronta para ajudar, pela dedicação e atenção, mesmo quando não estava no laboratório.

Ao William Lopes, pela atenção e pelo tempo dedicado a este trabalho.

Aos meus amigos, agradeço a compreensão da minha ausência nesses anos.

Aos colegas do Laboratório Weinmann, pela compreensão da minha ausência e pelo incentivo. Especialmente ao meu time da hematologia: Lauren Trintinaglia, Luciane Lamas, Maína Harres e Natália Lucena, vocês são muito especiais.

À minha dupla querida de todas as manhãs, Graziele Pressi e Guilherme Leal, pelas horas de desabafo e pelas palavras de incentivo.

Aos meus coordenadores, Marcelo Ross e Tarissa Moreira, obrigada pela confiança e pelas folgas concedidas para que eu pudesse me dedicar a este trabalho.

Às minhas queridas amigas, Cláudia Buttura e Camila Wilhelm, que também contribuíram no desenvolvimento desse projeto.

Aos meus pais, Francisco Carlos da Silva e Telmelita Nunes Moreira, e à minha irmã, Ariane Moreira da Silva, pelo incentivo, pelo apoio incondicional, pela presença e pela compreensão da minha ausência.

Ao meu querido Reinaldo Dilly, pela imensa paciência, compreensão e dedicação. Me faltam palavras para agradecer a tua presença, o teu companheirismo e todo o teu apoio nesses anos. Tu tornaste tudo mais fácil.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (PPGMAA), professores, secretaria e colegas.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E MECANISMO DE AÇÃO DE DERIVADOS DE 8-HIDROXIQUINOLINA SOBRE DIFERENTES GÊNEROS DE LEVEDURAS E FUNGOS FILAMENTOSOS[1]

Autor: Nailí Moreira da Silva

Orientador: Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade

Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

RESUMO

As infecções fúngicas aumentaram significativamente nas últimas décadas. A alta taxa de mortalidade e o elevado número de pessoas afetadas mundialmente por essas enfermidades caracterizam as doenças causadas por fungos como um problema de saúde pública global. De forma análoga, a fitopatogenia fúngica vem sendo crescentemente relacionada com consideráveis perdas econômicas no agronegócio mundial. Ademais, em ambos os tipos de patogenia, uma preocupante escalada da resistência aos antifúngicos vem sendo descrita na literatura científica. Em vista desse panorama, urge a necessidade de desenvolvimento de novas moléculas com um potencial antifúngico efetivo e melhor compreendido, uma vez que é muito limitada atualmente as opções terapêuticas antifúngicas frente a fungos patogênicos e fitopatogênicos. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo principal a prospecção de novos compostos triazólicos derivados de 8-hidroxiquinolina, bem como a determinação de suas atividades antifúngicas e possíveis mecanismos de ação sobre diferentes espécies fúngicas patogênicas ao homem e aos produtos agrícolas importantes. Para tais avaliações, realizaram-se ensaios de perfil de suscetibilidade antifúngica, testes de mecanismo de ação e determinação de curvas de morte. As moléculas mais promissoras apresentaram CIM entre 1-16 µg/mL para leveduras, 2-4 µg/mL para dermatófitos e 8-32 µg/mL para *Fusarium* spp. Em geral, um perfil fungistático foi caracterizado para as moléculas testadas; no entanto, a presença de efeito fungicida também foi observado no decorrer dos ensaios para duas espécies: *Candida guilliermondii* e *Microsporum canis*. Essa ação foi verificada em todas as concentrações elaboradas e em diferentes tempos, 6h e 120h, respectivamente. Dessa forma, foi possível identificar um protótipo dentre os derivados sintetizados com expressiva ação antifúngica, sobre leveduras e dermatófitos, indicando baixa toxicidade celular. Contra espécies patogênicas e fitopatogênicas de *Fusarium,* também obteve-se relevante suscetibilidade, com resultados muito próximos ou iguais ao fármaco de escolha para o tratamento clínico, o qual pertence à mesma classe de fungicidas utilizados no controle de pragas na agricultura.

[1]Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (93 p.) julho, 2019.

ESTABLISHING ANTIFUNGAL ACTIVITY AND MECHANISM OF ACTION OF 8-HYDROXYQUINOLINE DERIVATIVES AGAINST DIFFERENT GENERA OF YEASTS AND FILAMENTOUS FUNGI[1]

Author: Nailí Moreira da Silva

Advisor: Prof. Dr. Saulo Fernandes de Andrade

CoAdvisor: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria

ABSTRACT

The number of fungal infections has increased significantly in the last decades. Due to high mortality rates and the increased number of people affected by such illness worldwide, diseases caused by fungi have become a global public health concern. Similarly, phytophatogenic fungi has been increasingly correlated with considerable economic loss in the global agrobusiness sector. Moreover, the scientific literature documents a concerning rise of resistance to antifungal medicine in respect of both pathogeneses. In view of such hazardous scenario, it is necessary to develop new molecules with effective, as well as better understood, antifungal potential, as the current range of antifungal medicines used in pathogenic and phytopathogenic fungi treatment are rather limited. The present study mainly focuses on the investigation of new compounds derivatives of 8-hydroxyquinolines as well as the establishment of their antifungal activity and the possible mechanism of action against different human fungal pathogens and important agricultural products. For such analysis, antifungal susceptibility tests, mechanism of action and time-kill assay were carried out. The most potent compounds showed MIC between 1-16 µg/mL for yeasts, 2-4 µg/mL for dermatophytes and 8-32 µg/mL for *Fusarium* spp. In general, a fungistatic profile was determined to the compounds tested; however, the presence of fungicidal effect was also observed during the assay for *Candida guilliermondii* and *Microsporum canis.* This action was observed in all of the elaborated concentrations and in different time frames - 6h and 120h, respectively. Thus, a prototype among the derivatives synthesized with expressive antifungal action was identified for yeasts and dermatophytes, indicating low cell toxicity. Against pathogenic and phytopathogenic species of *Fusaruim*, relevant susceptibility was also achieved. The results were the same or very close to those achieved by the medicine chosen for clinical treatment, which belongs to the same class of fungicides used for plague-control in agriculture.

[1]Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (93 p.) July, 2019.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1
2. OBJETIVOS 3
2.1 Objetivo Geral 3
2.2 Objetivos Específicos 3
3. REVISÃO DA LITERATURA 4
3.1 Síntese de novos análogos de 8-hidroxiquinolina 4
3.2 Fungos Leveduriformes 7
3.2.1 *Candida* não *albicans* 7
3.2.2 *Trichosporon* spp. 9
3.2.3 Magnusiomyces capitatus 13
3.3 Fungos Filamentosos 16
3.3.1 Dermatófitos 16
3.3.2 *Fusarium* spp. 19
3.3.2.1 Espécies de importância clínica 19
3.3.2.2 Espécies fitopatogênicas 21
4. MATERIAL E MÉTODOS 24
4.1 Local de realização dos ensaios 24
4.2 Seleção dos microrganismos 24
4.3 Síntese de novos análogos de 8-hidroxiquinolina 24
4.3.1 Obtenção de 8-hidroxi-5-nitro-quinolina (**4**) 25
4.3.1.1 Preparação de 8-hidroxi-5-nitroso-quinolina (**3**) 25
4.3.2 Obtenção de 5-amino-8-hidroxi-quinolina (**5**) 25
4.3.3 Obtenção de 5-azido-8hidroxi-quinolina (**6**) 26
4.3.4 Obtenção do acetato de 5-azido-8-quinolinil (**7**) 26
4.3.5 Procedimento geral para reação de Click 26
4.3.5.1 Síntese do Acetato de 5-(4-fenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinil (PH264) 27
4.3.5.2 Síntese do Acetato de 5-(4-(hidroximetil) -1H-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinil (PH266) 27
4.3.5.3 Acetato de 5-(4-(4-(trifluormetil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinil (PH268) 28
4.3.5.4 Acetato de 5-(4-metoxifenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinil (PH270).... 28

4.3.5.5 Acetato de 5-(4-(ciclohex-1en-1-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinil (PH272) 29
4.3.6 Procedimento geral para reação de desacetilação 29
4.3.6.1 Síntese do 5-(4-fenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinol (PH265) 29
4.3.6.2 Síntese do 5-(4-(hidroximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinol (PH267) . 30
4.3.6.3 Síntese do 5-(4-(4-(trifluormetil)fenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinol (PH269) 31
4.3.6.4 Síntese do 5-(4-metoxifenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinol (PH271) ... 31
4.3.6.5 Síntese do 5-(4-(ciclohex-1en-1-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinol (PH273) 32
4.4 Teste de suscetibilidade fúngica 32
4.5 Ensaio de toxicidade 33
4.5.1 Preparo da cultura de leucócitos humanos 34
4.5.2 Viabilidade celular 34
4.6 Mecanismo de ação 34
4.6.1 Ensaio de efeito de ergosterol 34
4.6.2 Ensaio de proteção de sorbitol 35
4.6.3 *Time-Kill assay* 36
4.6.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 37
5. RESULTADOS 39
5.1 Síntese dos análogos de 8-hidroxiquinolina 39
5.2 Testes de suscetibilidade antifúngica 39
5.3 Ensaio de toxicidade 44
5.4 Mecanismo de ação 45
5.4.1 Ensaio de efeito de ergosterol 45
5.4.2 Ensaio de proteção ao sorbitol 46
5.4.3 *Time-kill assay* 47
5.4.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) 49
6. DISCUSSÃO 52
7. CONCLUSÃO 57
8. REFERÊNCIAS 59
9. APÊNDICES 67
9.1 Espectros 67

9.2.1 5-nitro-8-hidroxiquinolina 67
9.2.2 5-amino-8-hidroxiquinolina 69
9.2.3 5-azido-8-hidroxiquinolina 70
9.2.4 Acetato de 5-(4-fenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinil 71
9.2.5 5-(4-fenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinol 72
9.2.6 Acetato de 5-(4-(hidroximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinil 73
9.2.7 5-(4-(hidroximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinol 74
9.2.8 5-(4-(4(trifluormetil)fenil)1H-1,2,3-triazol-1-il-8-quinolinol 75
9.2.9 5-(4-metoxifenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinol 76
9.2.10 5-(4-(ciclohex-1en-1-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinol 77

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Teste de suscetibilidade antifúngica para leveduras..... 40

Tabela 2. Teste de suscetibilidade antifúngica para dermatófitos..... 41

Tabela 3. Teste de suscetibilidade antifúngica para espécies de *Fusarium* 42

Tabela 4. Complexação com ergosterol exógeno – levedura..... 45

Tabela 5. Complexação com ergosterol exógeno – dermatófito..... 45

Tabela 6. Tabela do efeito protetivo de sorbitol – levedura 45

Tabela 7. Tabela do efeito protetivo de sorbitol – dermatófito..... 46

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Representação da estrutura química da quinolina..... 4

Figura 2. Representação da estrutura química da 8-hidroxiquinolina..... 5

Figura 3. Representação dos compostos (**1**) e (**2**)..... 7

Figura 4. Esquema das etapas das reações de síntese..... 39

Figura 5. Gráfico do ensaio de viabilidade celular. CN (controle negativo). CP (controle positivo)..... 45

Figura 6. Curvas de tempo de morte para *C. guilliermondii* (PH265)..... 47

Figura 7. Curvas de tempo de morte para *C. guilliermondii* (PH273)..... 48

Figura 8. Curva de tempo de morte para *M. canis* (PH265)..... 48

Figura 9. Curva de tempo de morte para *M. canis* (PH273)..... 49

Figura 10. Célula tratada com concentração subinibitória do derivado PH265 (CIM/3) (imagem à direita): presença de intensa rugosidade e sulcos. Controle positivo: imagem à esquerda..... 50

Figura 11. Célula tratada com concentração subinibitória do derivado PH265 (CIM/3) (imagem à direita): presença de hifas abreviadas e alteradas quanto à largura. Controle positivo: imagem à esquerda..... 50

Figura 12. Célula tratada com concentração subinibitória do derivado PH273 (CIM/3) (imagem à direita): presença de hifas irregulares. Controle positivo: imagem à esquerda..... 50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	*American Type Culture Collection*
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCS	Cromatografia em coluna de sílica
CEM	Concentração efetiva mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	*Clinical Laboratory Standards Institute*
CMRVS	Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária
CNA	*Candida* não *albicans*
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos da América
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
HIV	*Human immunodeficiency virus*
H_2O_2	Água oxigenada
MOPS	*morpholinepropansulfonic acid*
UFC	Unidade formadora de colônia
PBS	Tampão fosfato-salina
SDA	Ágar Sabouroud destrose
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*
RS	Rio Grande do Sul
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
USA	United States of America

1. INTRODUÇÃO

Das milhares espécies fúngicas que existem no planeta, a minoria é reconhecida como patógenos de humanos, animais, plantas e vegetais. No entanto, esse pequeno grupo, possui alta habilidade de desencadear doenças com diferentes formas de manifestação: através de processos menos dolorosos e com brandas consequências, como as infecções superficiais; ou de formas mais severas, como ocorre em pacientes com sistema imunológico comprometido desencadeando infecções disseminadas; ou ainda, acometendo quilômetros de plantações dos mais variados produtos agrícolas resultando em déficits na economia mundial.

Infelizmente, ainda pode-se afirmar que as infecções fúngicas aumentaram significativamente nas últimas décadas, levando a um número aproximado de 1,5 milhões de mortes por ano e afetando cerca de 1,2 bilhões de pessoas no mundo, caracterizando as enfermidades causadas por fungos como um problema de saúde pública global. Dessa forma, fungos oportunistas e emergentes, como espécies de *Candida* não *albicans* (CNA) e *Fusarium*, vem sendo relatadas na literatura com mais frequência. Candidemia, por exemplo, é a micose invasiva mais prevalente a nível mundial e com alta taxa de mortalidade entre pacientes imunodeprimidos. Já a fusariose é reportada como a segunda infecção fúngica mais comum em alguns países, podendo levar a fungemia nessa mesma população. Ainda, as espécies fitopatogênicas de *Fusarium* são capazes de contaminar alimentos devido a produção de micotoxinas e demonstram-se resistentes a diversos antifúngicos disponíveis no mercado. Dentro deste contexto sobre fungos emergentes, leveduras como *Trichosporon* spp. e *Magnusiomyces capitatus,* observadas e reconhecidas há alguns anos como parte da microbiota de humanos e/ou como contaminantes de isolados clínicos, vem sendo identificadas como potenciais patógenos de indivíduos imunossupressos e hígidos. A tricosporonose invasiva pode ser letal e a geotricose assemelha-se a esse quadro, sendo uma infecção rara, mas potencialmente fatal.

Como dito anteriormente, as infecções por esses microrganismos manifestam-se de muitas formas. Percebe-se na literatura alta prevalência das micoses superficiais, afetando cerca de 25% da população mundial. Os dermatófitos podem ser vistos como os principais agentes causadores de infecções de pele, interferindo negativamente na qualidade de vida da população. Esse tipo de infortuno

em muitos casos acaba por gerar recidivas ou insucesso no resultado da terapia escolhida.

Atualmente, os tratamentos utilizados no combate a essas enfermidades são limitados e há alguns fatores que podem ser relacionados ao fracasso de tais abordagens terapêuticas. O uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro, a profilaxia antifúngica (que culmina no desenvolvimento de mecanismos de resistência) sistema imunológico comprometido do hospedeiro e a utilização crescente de fungicidas agrícolas contribuem para as barreiras no tratamento.

Juntamente com essas condições, percebem-se as limitadas opções de terapias antifúngicas disponíveis. Muitos fármacos não apresentam ação fungicida e demonstram alta toxicidade. Ainda, fungos emergentes, de importância clínica e ambiental apresentam resistência intrínseca a certos agentes antifúngicos: *Candida krusei* é intrinsicamente resistente ao fluconazol, *Magnusyomices capitatus* a anidulafungina e espécies de *Fusarium* aos azóis.

Com base no exposto, destaca-se a importância da prospecção de novas moléculas com ação antifúngica que apresentem alta eficiência antimicrobiana e baixa toxicidade ao indivíduo e/ou ao ambiente. Nesse contexto de busca, o interesse pelas moléculas derivadas de hidroxiquinolinas tem aumentado nas últimas décadas, uma vez que a literatura às apresentam como uma estrutura privilegiada capaz de desempenhar diversas funções biológicas. Essa característica faz da 8-hidroxiquinolina o derivado mais interessante a ser explorado: ela é a única, dentre seus isômeros, capaz de formar complexos com íons metálicos, habilidade responsável por suas ações no âmbito farmacêutico.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Sintetizar novos compostos derivados de 8-hidroxiquinolina e avaliar suas atividades antifúngica, mecanismo de ação e toxicidade sobre espécies fúngicas patogênicas ao homem e também fitopatogênicas, bem como determinar um perfil fungicida ou fungistático para os derivados sintéticos mais promissores.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Estabelecer uma rota de síntese de novos derivados de 8-hidroxiquinolina com ação antifúngica.

2.2.2 Avaliar o perfil de suscetibilidade das cepas fúngicas estudadas em relação as novas moléculas.

2.2.3 Avaliar a citotoxicidade dos compostos mais promissores.

2.2.4 Apontar os possíveis mecanismos de ação antifúngica das moléculas mais efetivas a nível de membrana e parede celular.

2.2.5 Determinar curvas de morte celular de representantes das espécies mais suscetíveis, mensurando o tempo de ação fungicida e/ou fungistático dos compostos em relação a sua concentração.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Síntese de novos análogos de 8-hidroxiquinolina

A ocorrência das infecções por fungos patogênicos aumentou significativamente nas últimas décadas (Oliveri e Vecchio, 2014; Debourgogne et al., 2016; Yaakov et al., 2017). E com isso, a busca por novos fármacos com ação antifúngica também vem crescendo (Lam et al., 2014; You et al., 2018). No entanto, observa-se que as drogas utilizadas no tratamento de infecções fúngicas invasivas disponíveis no mercado são, muitas vezes, insatisfatórias: toxicidade, baixa especificidade, aumento da resistência ou formulações limitadas são algumas das barreiras encontradas atualmente na busca pela melhor terapia (Lam et al., 2014; Yaakov et al., 2017; Pippi et al., 2017; Fuentefria et al., 2017; You et al., 2018).

Dentro deste contexto, os compostos aromáticos e heteroaromáticos chamam atenção no que diz respeito a produção e ao desenvolvimento de novos fármacos, tanto pela indústria farmacêutica quanto pela sociedade acadêmica (Song et al., 2015). A exemplo disso, encontram-se as quinolinas (figura 1) e seus derivados, como a 8-hidroxiquinolina, a qual faz parte de uma classe cuja estrutura é formada por heterociclo contendo nitrogênio (figura 2) (Khusnutdinov et al.; Lam et al., 2014; Oliveri and Vecchio, 2016).

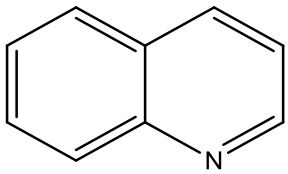


Figura 1. Representação da estrutura química da quinolina.

Quinolinas podem ser extraídas de plantas ou desenvolvidas através do processo de síntese (Prachayasittikul et al., 2013) e seus derivados possuem diversas ações biológicas. Sendo assim, nas últimas décadas, o interesse pela classe das quinolinas vem aumentado (Cherdtrakulkiat et al., 2016; Song et al., 2015; Oliveri e Vecchio, 2016; Prachayasittikul et al., 2013) e diferentes atividades para estes derivados são reconhecidas no âmbito farmacêutico como: antibacteriana, antifúngica, antimalárica, antituberculose, anti-inflamatória, anti-HIV e anticâncer.

Seus derivados também são utilizados na preparação de herbicidas e fungicidas para agricultura (Khusnutdinov et al., 2014; Freitas et al., 2014; Oliveri e Vecchio, 2016; Cherdtrakulkiat et al., 2016). Ainda sobre a variedade de propriedades que tal molécula pode possuir, há relatos do seu potencial uso no tratamento das doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington (Song et al., 2015; Finkelstein et al., 2015; Huntington Study Group, 2015; Mao e Schimmer, 2008). Especificamente, a habilidade das 8-hidroxiquinolinas de quelar íons metálicos é responsável por fazer desta classe de moléculas uma possível opção para a terapia anticâncer e para as doenças neurodegenerativas (El-Megharbel e Refat., 2015; You et al., 2018). Estas podem formar um complexo com íons de cobre, zinco e ferro (Yaakov et al., 2017), sendo o clioquinol e outros derivados, capazes de redistribuir esses íons de áreas onde há agregação, devido abundância dos metais, para áreas citoplasmáticas, onde há deficiência (Finkelstein et al., 2015; El-Megharbel e Refat, 2015; Huntington Study Group, 2015; Franklin et al., 2016). Segundo a literatura, essa estrutura privilegiada é capaz de realizar ligações com os íons metálicos através dos átomos de oxigênio (do grupamento hidroxila) e de nitrogênio (do anel quinolínico), conforme ilustrado na figura 2 (Song et al., 2015; Oliveri e Vecchio, 2016; Cherdtrakultiat et al., 2016).

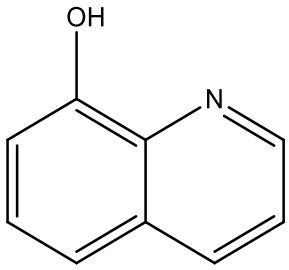


Figura 2. Representação da estrutura química da 8-hidroxiquinolina.

De todos os derivados de hidroxiquinolinas, a 8-hidroxiquinolina se apresenta como o mais diferenciado a ser explorado, devido a suas inúmeras atividades biológicas e potencial terapêutico (Prachayasittikul et al., 2013; Cherdtrakultiat et al., 2016; You et al., 2018).

O clioquinol (5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina), é um derivado halogenado das 8-hidroxiquinolinas e um quelante de cobre lipofílico muito utilizado nas décadas de 1950 e 1960 contra fungos e protozoários (Pushie et al., 2014; Mao e Schimmer,

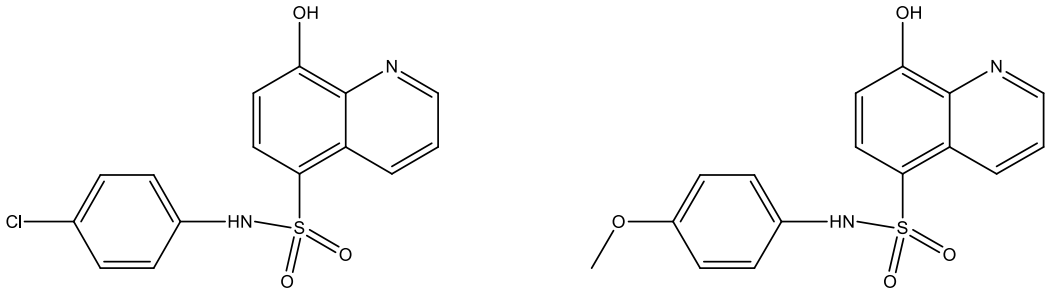
2008). Sua produção inicial ocorreu no ano de 1934 e primeiramente foi designado ao uso tópico como antisséptico e no tratamento de distúrbios gastrointestinais, como giardíase, shigelose e diferentes causas de diarreia (You et al., 2018). Cerca de 30 anos após sua comercialização esse fármaco teve suas indicações restritas ao uso tópico (Mao e Schimmer, 2008), uma vez que sua administração oral foi associada a neuropatia mielo-óptica subaguda (SMON) (Nakae e Yamamoto, 1973; Pushie et al., 2014; Oliveri e Vecchio, 2016). Pacientes com tal neuropatia apresentam sintomas severos envolvendo a degradação da medula espinhal e nervos periféricos, desencadeando distúrbios motores dos membros inferiores e deficiência visual (Pushie et al., 2014; Oliveri e Vecchio, 2016).

Ainda há controvérsias entre a associação dessa enfermidade ao clioquinol, pois tal neuropatia foi relatada como rara fora do Japão (Selby, 1972; You et al.,2018). A explicação para esses efeitos colaterais não está clara, mas muitos desses casos podem estar relacionados a perturbação da homeostase de vitamina B (Mao e Schimmer, 2008; You et al., 2018). Sabe-se, também, que a deficiência de cobre pode levar a distúrbios associados a ingestão de zinco, os quais acarretam na inibição da absorção de cobre. Tal regulação sugere que o mecanismo do clioquinol, indicado como causa da SMON, seria uma neuropatia por deficiência de cobre induzida por clioquinol (Pushie et al., 2014), uma vez que o complexo formado, clioquinol-zinco, é lipossolúvel e biodisponível (Oliveri e Vecchio, 2016).

Sobre tratamentos com esse fármaco, para micoses superficiais, por exemplo, pode ser promissor no que diz respeito ao seu uso tópico, porém, pode gerar irritações locais se administrado em altas doses. Mas até o momento não foi associado como causa de malignidades na pele (You et al., 2018; Mao e Schirmmer, 2008). Ainda, se combinado com formulações de uso sistêmico reduziria a ocorrência de resistência aos antifúngicos disponíveis e potencializaria os efeitos contra a célula fúngica, uma vez que possui amplo espectro antifúngico e atividade de moderada a forte entre os fungos patogênicos mais comuns (You et al., 2018).

Assim como o clioquinol, outros derivados também podem apresentar importante atividade antimicrobiana. As sulfonamidas acopladas ao anel da 8-hidroxiquinolina mostram resultados interessantes quanto a esse tipo de ação. Em estudo realizado pelo nosso grupo, verificou-se a suscetibilidade de espécies de *Candida* e dermatófitos a esses compostos e o resultado foi satisfatório (Pippi et al.,

2017). Foi realizada a conversão de ácido sulfônico em sulfonamida, conforme descrito por Joaquim et al (2018), resultando nos compostos 8-hidroxiquinolinil-5-(*N*-4-clorofenil)sulfonamida (**1**) e 8-hidroxiquinolinil-5-(*N*-4-metoxifenil)sulfonamida (**2**) (figura 3). Nesse estudo, observaram-se importantes valores de CIMs, o que despertou interesse pela busca de novos substituintes capazes de mimetizar as interações da sulfonamida com a célula fúngica, visando melhorar ainda mais a atividade antifúngica, a potência e a seletividade do composto.



(**1**) (**2**)

Figura 3. Representação dos compostos (**1**) e (**2**).

Sendo assim, as sulfonamidas e os triazóis são moléculas quimicamente distintas, mas farmacologicamente compatíveis (Ezabadi et al., 2008), possibilitando a síntese de derivados de 8-hidroquinolinas ligadas a substituintes triazólicos capazes de fazer interações adicionais não realizadas pelas sulfonamidas.

3.2 Fungos Leveduriformes

3.2.1 *Candida* não *albicans*

O impacto das infecções fúngicas tem aumentado nos últimos anos, e patógenos oportunistas ainda são responsáveis por significativas taxas de morbidade e mortalidade, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (Santos et al., 2011; Tseng et al., 2018). As espécies de *Candida* são reconhecidas como os principais agentes oportunistas nesses pacientes e são a quarta causa mais comum de infecções nosocomiais em unidades de cuidado intensivo (Santos et al., 2011).

Apesar dessa levedura ser considerada parte da microbiota de humanos, não causando danos à saúde, ela pode ser responsável por diferentes manifestações clínicas, podendo levar desde infecções superficiais – nos casos dos pacientes

imunocompetentes, até infecções disseminadas – o que geralmente ocorre em pacientes com sistema imunológico debilitado (Deorukhkar et al., 2014).

Há mais 150 espécies conhecidas de *Candida*. Porém, algumas delas são relatadas na literatura com mais frequência: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. famata*, *C. rugosa* (Yapar, 2014). Dessas espécies, a mais comumente isolada e estudada é *C. albicans,* seguida de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata*, reconhecidas como agentes patogênicos com ampla distribuição geográfica sendo as mais prevalentes (Santos et al., 2011; Yapar, 2014; Whaley et al., 2017). Acredita-se que nas últimas décadas cerca de 95% das infecções por esse gênero são causadas pelas espécies descritas acima (Yapar, 2014). Outra espécie que chama atenção é *C. guilliermondii*, apesar de apresentar virulência reduzida em relação as demais, é considerada um patógeno emergente com grande incidência na América Latina acometendo pacientes hospitalizados (Flevari et al., 2013; Paredes et al., 2013).

A frequência e as taxas de isolamento das espécies de CNA variam de acordo com algumas situações: idade, comorbidade desenvolvida, grau de comprometimento do sistema imunológico, dentre outras. Dessa forma, observa-se que *C. glabrata* é a mais comumente isolada de pacientes idosos e neoplásicos (Yapar, 2014). No que diz respeito a sua distribuição geográfica, segundo o Centro de Controle de Doenças e Prevenção, sua disposição pode ser variável e sua incidência aumentou cerca de quatro vezes nos últimos anos (Pfaller et al., 2014). Nos estados Unidos e no norte da Europa é a mais isolada de indivíduos com candidemia, também sendo prevalente como agente de candidíases vulvovaginais, candidúria e mais frequente do que *C. albicans* em pacientes diabéticos imunossupressos (Whaley et al., 2017). No Brasil, é a segunda ou terceira espécie mais comum referente as infecções invasivas (Hinrichsen et al., 2009). *C. tropicalis* é mais observada acometendo pacientes hospitalizados com leucemia (adultos e adolescentes), baixa contagem de neutrófilos, diabéticos e utilizando cateter venoso central com terapia antibiótica de amplo espectro (Hinrichsen et al., 2009; Yapar, 2014). O desenvolvimento dessas infecções está relacionado, também, a profilaxia antifúngica utilizada. Entre adultos com ou sem câncer, infecções sistêmicas devido a *C. tropicalis* estão associadas a elevadas taxas de mortalidade e infecção disseminada (Hinrichsen

et al., 2009). Quanto a sua distribuição geográfica, pode ser mais comum até mesmo que *C. albicans* em regiões como Europa, América Latina e Ásia. E quanto ao tratamento, essa espécie apresenta menor suscetibilidade ao grupo dos azóis (Xiao et al., 2015). *C. Krusei,* é a mais comum encontrada entre indivíduos com doenças hematológicas, leucemias ou graves neutropenias, pacientes que realizaram transplante de medula e imunocomprometidos administrando fluconazol como profilaxia (Moretti et al., 2013; Yapar, 2014; Whaley et al., 2017). E diferentemente das outras espécies, essa levedura apresenta resistência intrínseca ao fluconazol, fármaco de escolha por diversos clínicos no tratamento das micoses por esse gênero (Pfaller et al., 2014). *C. parapsilosis* é reconhecida pelo acometimento de recém-nascidos, sendo responsável por cerca de 30% dos casos de candidemia relatados nessa população, enquanto entre adultos essa taxa não passa de 15% (Yapar, 2014; Pfaller et al. 2014). Outro estudo complementa essas informações, relevante taxa de fungemia entre crianças e neonatos, bem como, mortalidade por endocardites (Whaley et al., 2017). Ainda, essa espécie é relatada por causar infecções em pacientes que fazem uso de cateter e onicomicose (Henrichesen et al., 2009). Quanto sua distribuição geográfica, localidades como Europa, Austrália, América Latina e Ásia, apresentam a frequência de *C*. *parapsilosis* ou *C. tropicalis* como mais comuns do que mesmo *C. albicans* (Xiao et al., 2015). *C. guilliermondii* é reconhecida por diferentes formas de acometimento dos indivíduos: é capaz de gerar infecções disseminadas em pacientes imunossupressos e acometer indivíduos em ambiente cirúrgico com aparelhos intravasculares (Paredes et al., 2015).

A literatura relata a emergência das espécies de CNA bem como seu potencial desenvolvimento de resistência aos antifúngicos existentes. A resistência ao fluconazol e as equinocandinas foi mais observada nas espécies de CNA do que em *C. albicans*. Isso ocorre devido às resistências intrínsecas desses organismos aos fármacos. E exemplificando tal afirmação, observa-se esse mecanismo em relação ao fluconazol em cepas de *C. Krusei* e há grande propensão de *C. glabrata* desenvolver resistência a esse mesmo azol e a classe das equinocandinas (Pfaller et al., 2014).

3.2.2 *Trichosporon* spp.

Embora espécies de *Candida* e *Aspergillus* sejam os agentes isolados mais frequentes em infecções invasivas em indivíduos imunocomprometidos, agentes

fúngicos menos comuns estão chamando atenção devido ao aumento de sua incidência e de suas limitadas opções terapêuticas disponíveis (Saghrouni et al., 2012). *Trichosporon* spp. possui mais de 50 espécies, das quais apenas 20 são trazidas pela literatura como responsáveis por causar infecções (Rastoji et al., 2016). Dentre as mais citadas estão: *T. inkin*, *T. asahii*, *T. mucoides*, *T. cutaneum*, *T. ovoides*, *T. asteroides* (Rastoji et al., 2016; Kumar et al., 2015; Júnior e Hennequin, 2016; Liao et al., 2015; Cordeiro et al., 2015; Corzo-León et al., 2015). Algumas espécies foram associadas a determinado tipo de infecção, *T. asahii*, *T. mucoides* e *T. capitatum* estão ligadas a infecção disseminada (Kumar et al., 2015). Já em caso relatado por Corzo-León et al (2015), *T. asahii* é apresentado como patógeno causador de infecções invasivas em indivíduo com transplante de medula óssea. Apesar de raro, o isolamento dessa mesma espécie em pacientes imunocompetentes também já foi reportado na literatura (Zuo et al., 2015; Treviño et al., 2014). Ainda, dados epidemiológicos apontam *T. inkin* como a segunda espécie mais frequente nos casos de tricosporonose (Cordeiro et al., 2015; Colombo et al., 2011).

O gênero *Trichosporon* e suas espécies estão amplamente distribuídos na natureza, podendo ser extraídos do solo e da água. Também fazem parte da microbiota dos seres humanos, colonizando a pele, trato gastrointestinal e respiratório (Zuo et al., 2015; Treviño et al., 2014; Cordeiro et al., 2015). Diversos isolados clínicos de tal fungo estão associados à colonização, lesões benignas, como Piedra Branca, ou mesmo infecções superficiais, afetando preferencialmente regiões como couro cabeludo, axilas e pelos pubianos (Cordeiro et al., 2015; Mattede et al., 2015). No entanto, *Trichosporon* spp. vem sendo reconhecido como um agente oportunista emergente responsável por infecções invasivas, sistêmicas e causador de fungemia, principalmente em pacientes com sistema imunológico comprometido (Liao et al., 2015; Treviño et al., 2014; Mattede et al., 2015; Cordeiro et al., 2015).

O resultado das infecções depende da condição do sistema imunológico do hospedeiro e da extensão da infecção (Kumar et al., 2015). Sendo assim, o acometimento por agentes fúngicos está relacionado a diversas situações, dentre as quais o uso de glicocorticoides, imussupressores, pacientes que apresentam tumor maligno, neutropenia, transplante de órgãos, tratamento prolongado com uso de antibióticos, uso de cateter ou indivíduos hospitalizados por longos períodos são algumas das condições que podem servir como porta de entrada para tais patógenos

(Treviño et al., 2014; Zuo et al., 2015; Cordeiro et al., 2015; Kumar et al., 2015; Mattede et al., 2015; Corzo-León et al., 2015). *Trichosporon* spp. representa a segunda levedura mais comum entre as causadoras de fungemia em pacientes com doença hematológica associada (Liao et al., 2015). E, embora a tricosporonose seja uma micose emergente com alta taxa de mortalidade (Mattede et al., 2015; Kumar et al., 2015; Corzo-León et al., 2015), estudo traz dados de até 80% (Cordeiro et al., 2015), informações relacionadas a sua causa ainda são limitadas (Treviño et al., 2014) e geralmente negligenciadas sendo confundidas clinicamente com outras leveduras causadoras de infecção, especialmente pelo gênero *Candida*. (Liao et al., 2015).

Tricosporonose possui distribuição geográfica cosmopolita com alta prevalência no clima tropical e temperado, incluindo América do Sul e Oriente Médio, sendo mais rara na América do Norte e Europa (Mattede et al., 2015). As infecções invasivas causadas por *Trichosporon* spp. caracterizam-se por uma infecção oportunista que ocorre predominantemente em pacientes com imunossupressão e ocasionalmente naqueles sem comprometimento de sistema imunológico (Mattede et al., 2015; Liao et al., 2015). A tricosporonose invasiva pode envolver diversos órgãos do corpo humano, caracterizando fungemia, e envolvendo infecção associada ao uso de cateter (Treviño et al., 2014), o qual representa o principal tipo de infecção oportunista - aproximadamente de 58% a 74% das infecções. O resultado negativo esperado das infecções por *Trichosporon* spp. está ligado a diversos fatores prognósticos, dentre eles, o histórico do uso de antimicrobianos, coinfecção bacteriana, profilaxia/terapia antifúngica empírica (Liao et al., 2015).

O uso de antibióticos em pacientes com doenças severas favorece o desenvolvimento de infecção fúngica, particularmente leveduras, desencadeando o início de infecções oportunistas. O amplo espectro de ação dos antimicrobianos e sua seletividade, favorece o crescimento de agentes fúngicos em pacientes hospitalizados (Mattede et al., 2015). Segundo Kumar et al (2015), *T. asahii* também tem sido reportado como desencadeador de endofiltamites, peritonites e hepatites. O isolamento desse patógeno em amostras de urina vem sendo raramente descrito na literatura, sendo mais frequente em pacientes idosos. O desenvolvimento de agentes fúngicos entre pacientes que fazem uso permanente de cateteres facilita a formação de biofilme, o que poderia explicar a persistência da infecção por tal agente apesar da sua sensibilidade *in vitro* a agentes antifúngicos (Treviño et al., 2014). Esse fator

promove a progressão da infecção sistêmica pelo favorecimento da perpetuação do foco infeccioso, o qual se torna difícil de controlar com agentes antimicrobianos (Mattede et al., 2015). A habilidade de formação de biofilme caracteriza um importante fator de virulência a ser considerado no processo infeccioso (Colombo et al., 2011). Estudos sugerem tal característica como a principal condição para a persistência da infecção, uma vez que as células geradas por tal mecanismo acabam por desenvolver resistência a antifúngicos e proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro. Ainda quanto a geração de biofilmes, a literatura relata desenvolvimento de resistência a anfotericina B e a caspofungina e sua sensibilidade ao grupo dos azóis (Cordeiro et al., 2015).

Durante os anos de 1975 à 2004, o antifúngico mais utilizado foi anfotericina B, e recentemente (2005-2014) os triazóis, especialmente voriconazol, tem sido a principal escolha para o tratamento da tricosporonose e apresentado bons resultados contra as infecções (Liao, et al., 2015). Em pesquisa realizada por Zuo et al (2015), a espécie *T. asahii* foi relatada como sensível a anfotericina B e ao grupo dos azóis, no entanto, sabe-se que resistência ao fluconazol pode ocorrer. Visto que anfotericina B tem atividade limitada *in vitro* e *in vivo*, e sua toxicidade renal pode levar a hipocalemia, náusea, vômito e outros fatores, a dose de tal antifúngico acaba sendo limitada para os pacientes em questão. Em contrapartida, Treviño et al (2014), reportaram a mesma espécie com relativa baixa sensibilidade à anfotericina B. Tal droga tem sido utilizada comumente no tratamento das infecções causadas por *Trichosporon* spp., porém, seu efeito fungicida parece inadequado contra algumas cepas de tal gênero. Kumar et al (2015), no que diz respeito ao teste de sensibilidade aos azóis, concluíram que todos apresentaram atividade: voriconazol, posaconazol, itraconazol, fluconazol. Dentre eles, voriconazol apresentou excelente atividade *in vitro*.

A melhor opção terapêutica ainda não foi definida, no entanto, estudos apontam sucesso no tratamento com voriconazol, enquanto anfotericina B apresenta falha. Equinocandinas, como caspofungina e micafungina apresentam baixa atividade *in vitro* contra *Trichosporon* sp quando utilizadas sozinhas (Corzo-León et al., 2015; Kumar et al., 2015).

Contudo, o prognóstico das infecções sistêmicas causadas pelo agente responsável pela tricosporonose costuma ser desfavorável. A suscetibilidade de

Trichosporon e suas espécies aos diferentes antifúngicos é variável (Mattede et al., 2015; Zuo et al., 2015). Todavia, os relatos têm evidenciado o uso de azóis, sendo voriconazol e fluconazol, como as drogas de maior atividade sobre tal gênero (Kumar et al., 2015; Zuo et al., 2015; Liao et al., 2015; Corzo-León et al., 2015; Cordeiro et al., 2015; Treviño et al., 2014).

Os triazóis estão entre os estudos mais comuns de drogas contra as infecções causadas por *Trichosporon* spp. Recentemente, algumas cepas de *T. asahii* resistentes ao grupo dos azóis foram isoladas de pacientes. Sendo assim, ainda existem incertezas na escolha da melhor terapêutica e há poucos estudos baseados na atividade *in vitro* de tais drogas (Treviño et al., 2014).

Embora tricosporonose seja uma micose emergente com alta taxa de mortalidade, responsável pelo acometimento de pacientes saudáveis e indivíduos com sistema imunológico comprometido, informações relacionadas a sua causa ainda são limitadas (Treviño et al., 2014; Mattede et al., 2015). Visto que tal gênero é capaz de produzir biofilme e que tais células apresentam tolerância a altas concentrações de antifúngicos, juntamente com a baixa produção científica acerca do assunto (Cordeiro et al., 2015), justifica-se a necessidade e a importância do estudo de novas moléculas com ação antifúngica.

3.2.3 Magnusiomyces capitatus

Magnusiomyces capitatus é um fungo oportunista emergente responsável, especialmente, pelo acometimento de indivíduos imunocomprometidos. Tal agente, anteriormente considerado apenas como colonizador da microbiota de humanos, recentemente tem ganhado importância (Brunetti et al., 2016). Esse microrganismo é considerado cosmopolita, saprófita e costuma ser contaminante em diversas situações. Tem seu isolamento a partir de variadas fontes: frutas, vegetais, solo, areia da praia, plantas, produtos alimentícios, como queijos e iogurtes e da microbiota normal da pele, boca e trato gastrintestinal (Supram et al., 2016; Bonifaz et al., 2016). Dessa forma, tal levedura pode ser isolada de amostras de fezes, escarro, urina e corrimento vaginal (Bonifaz et al., 2010; Trabelsi et al., 2015).

Magnusiomyces capitatus, já foi nomeada anteriormente como *Geotrichum capitatum*, *Trichosporon capitatum* ou *Blastochizomyces capitatus* (Brunetti et al, 2016; Bartolomé et al., 2017; Lafayette et al., 2011). Infecções invasivas por

Geotrichum capitatum vem sendo relatadas como *Magnusiomyces capitatus* e a espécie *G. candidum* é menos reportada como causadora de infecção fúngica invasiva ou disseminada, não sendo a responsável pela alta taxa de mortalidade que as infecções por *Geotrichum* spp. apresentam (Graeff et al., 2016). Dentre as espécies do gênero *Geotrichum* mais relatadas na literatura e com potencial patogênico estão *M. capitatus*, *G. candidum* e *G. clavatum* (Bonifaz et al., 2010; Supram et al., 2015; Brunetti et al., 2016; Bartolomé et al 2017; Jiménzes-Guerra et al., 2015; Trabelsi et a., 2015).

O termo “infecção emergente” deve ser utilizado para denotar uma infecção que surgiu recentemente na população, ou uma infecção que está crescendo rapidamente em incidência ou alcance geográfico (Supram et al., 2016; Graeff et al., 2016). Fatores climáticos parecem exercer importante papel na epidemiologia das infecções causadas por *M. capitatus*. Sua distribuição global é observada em maioria na Europa (Brunetti et al., 2016; Vaux et al., 2014; Jiménzes-Guerra et al., 2015), especialmente em áreas de clima mediterrâneo, com casos reportados na Itália, Espanha e França, havendo poucos casos reportados na Ásia e nos Estados Unidos (Supram et al., 2016; Graeff et al., 2016; Trabelsi et al., 2015).

Geotricose invasiva é considerada uma infecção oportunista. De acordo com estudo publicado em 2012 por Özkaya-Parlakay et al, foram reportados 186 casos entre os anos de 1965 e 2011. *Magnusiomyces capitatus* é a espécie mais frequente frente as infecções sistêmicas. Diversos fatores de risco para infecções fúngicas são trazidos pela literatura: uso de corticoides, administração de antibióticos de amplo espectro, quimioterapia, uso de cateter e alteração da barreira imunológica por obstrução ou deterioração da pele e mucosa (Trabelsi et al., 2015). Ainda como fatores de risco para tais infecções estão cirurgias e tratamento com baixa dose de azóis. A colonização por *M. capitatus* pode levar a infecção invasiva e disseminação hematológica, frequentemente levando a um amplo e diverso espectro de enfermidades (Supram et al., 2016; Etienne et al., 2008).

Há poucos registros de infecção cutânea por *Magnusiomyces capitatus*. O aumento do número de casos em novas áreas geográficas indica a possibilidade de um surto silencioso de áreas endêmicas para áreas não endêmicas (Supram et al., 2016). Porém, esse crescimento, também pode ocorrer devido as identificações mais precisas em função de ferramentas diagnósticas mais apuradas, visto que seu

isolamento, por vezes, torna-se difícil e percebe-se na literatura erros de identificação de tal gênero. Atualmente, tais falhas se minimizam devido as técnicas de espectrometria de massa e PCR (Bartolomé et al., 2017).

Magnusiomyces capitatus é um agente incomum no que se refere a infecções fúngicas invasivas em pacientes imunocomprometidos, especialmente aqueles com doenças hematológicas submetidos à quimioterapia, que fazem uso de corticoides ou de antibióticos de amplo espectro e que apresentam severa neutropenia (Etienne et al., 2008). Estudo reporta isolamento de tal espécie em amostras de hemocultura e urina, onde o resultado de tal acometimento foi fatal em alguns casos. É sabido que o prognóstico da geotricose é pobre e apresenta taxa de mortalidade de mais de 50% (Vaux et al., 2014). Sendo assim, entende-se a necessidade de um diagnóstico precoce e de um manejo apropriado do paciente para melhorar o prognóstico de tal enfermidade (Supram et al., 2016; Trabelsi et al, 2015; Bartolomé et al., 2017; Jiménzes-Guerra et al., 2015;). O diagnóstico da infecção pode ser difícil, principalmente no início de sua instalação. E o processo de isolamento do agente em questão pode falhar no que diz respeito a identificação de gênero e espécie (Brunetti et al, 2016; Graeff et al., 2016). A taxa de mortalidade de infecções fúngicas emergentes em pacientes imunocomprometidos chama atenção devido a falta de suspeita clínica e atraso no diagnóstico. Clínicos e microbiologistas devem reconhecer a ameaça que essas infecções representam, bem como, os fatores de risco envolvidos (Supram et al., 2016).

Nenhuma terapia foi estabelecida para o tratamento das infecções sistêmicas causadas por *M. capitatus*. De acordo com a literatura, a droga mais utilizada no acometimento de tal fungo é anfotericina B, isolada ou combinada. Porém, sabe-se da problemática envolvida com a toxicidade renal que tal fármaco pode desencadear (Saghrouni et al., 2012; Bartolomé et al., 2017; Jiménzes-Guerra et al., 2015; Brunetti et al., 2016; Saghrouni et al., 2012; Ikuta et al., 2010; Özkaya-Parlakay et al., 2012). Estudo *in vitro* sobre a atividade de fármacos como anfotericina B, flucitosina, fluconazol, itraconazol e voriconazol revelou alta atividade de anfotericina B e reduzida sensibilidade de algumas cepas a flucitosina, fluconazol e itraconazol. Em artigo publicado por Supram et al (2016), tal hipótese se confirma, entre os azóis testados *in vitro*, fluconazol foi o que apresentou menor atividade. Tal estudo mostrou ainda, que o voriconazol apresenta atividade relevante contra tal levedura. Portanto,

de acordo com tais dados, a terapia combinada com voriconazol (ou altas doses de fluconazol, para cepas sensíveis) e anfotericina B é recomendada, assim como sugerida, também, nos casos de infecções causadas pelo gênero *Trichosporon* spp. (Trabelsi et al., 2015; Bartolomé et al., 2017; Jiménzes-Guerra et al., 2015; Brunetti et al., 2016). Outros autores também reconhecem que a administração de voriconazol pode apresentar sucesso no tratamento das infecções: teste de susceptibilidade *in vitro* mostrou promissora atividade de voriconazol combinado a caspofungina contra *G. capitatum* (Etienne et al., 2008) e boa tolerância quanto ao organismo do paciente (Saghrouni et al., 2012; Ikuta et al., 2010; Özkaya-Parlakay et al., 2012).

Em contra partida, outros relatos afirmam que *Saprochaeta clavata* e *Magnusiomyces capitatus* são ambos intrinsicamente resistentes às equinocandinas (Vaux et al., 2014; Supram et al., 2016), sendo *M. capitatus* resistente também ao fluconazol e sensível ao itraconazol, ao posaconazol e ao voriconazol (Bartolomé et al., 2017).

O tratamento e o resultado dos pacientes acometidos por geotricose dependem do grau de invasão do organismo patogênico e do sistema imune do hospedeiro, se alterado ou em condições fisiológicas normais (Saghrouni et al., 2012; Prakash et al., 2012). Sendo assim, apesar da raridade das infecções causadas por *Geotrichum* sp., tal fungo é um patógeno potencial em indivíduos imunodeficientes. A escolha de tratamento precisa ser considerada com cuidado de acordo com os fatores epidemiológicos e com o sistema imunológico da população em risco (Supram et al., 2016).

Contudo, o prognóstico das infecções sistêmicas causadas pelo agente responsável pela geotricose costuma ser desfavorável. A suscetibilidade de *Magnusiomyces capitatus* aos diferentes antifúngicos é variável (Lafayette et al., 2011). Todavia, os relatos têm evidenciado o uso de anfotericina B e voriconazol como as drogas de maior atividade sobre *Magnusiomyces capitatus* e as diferentes espécies de *Geotrichum* (Miguel-Martínez et al., 2011).

3.3 Fungos Filamentosos

3.3.1 Dermatófitos

Desde aproximadamente 1830 que a literatura apresenta infecções causadas por dermatófitos. E até hoje essas micoses são comuns na população,

afetando cerca de 25% da nação mundial e representando a infecção fúngica mais frequente mundialmente (Zhan e Liu, 2016).

Dermatófitos são agentes fúngicos capazes de causar infecções na derme. Através de enzimas queratinolíticas invadem o extrato córneo da epiderme degradando a queratina presente no tecido do hospedeiro. Dessa forma, são caracterizados como agentes queratonolíticos podendo acometer diferentes regiões da pele, cabelos, pelos e unhas (Silva-Rocha et al., 2016).

A família dos dermatófitos possui mais de 40 espécies, divididas entre os gêneros *Trichophyton* sp., *Microsporum* sp. e *Epidermophyton* sp. Dentre eles, podem ser classificados de acordo com suas rotas de transmissão, habitat natural ou tipo de hospedeiro - como antropofílicos, zoofílicos e geofílicos, pois possuem a habilidade de utilizar a queratina humana e animal, bem como detritos de animais mortos (como peles, penas ou unhas) para buscar nutrientes (Segal e Frenkel, 2015; Zhan e Liu, 2016).

Dentre as espécies mais citadas pela literatura estão: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. violaceum*, *T. verrucosum*, *M. canis*, *M. gypseum* e *E. floccosum*. (Martínez et al., 2014; Segal e Frenkel, 2015; Yadav et al., 2015; Zhan e Liu, 2016). Os microrganismos que levam as dermatofitoses possuem distribuição geográfica mundial, sendo variável em relação as suas espécies e as regiões do globo. Uma vez que, áreas mais quentes e úmidas, como as de clima tropical, favorecem esse tipo de infecção (Pires et al., 2014; Zhan e Liu, 2016).

As dermatofitoses estão entre as doenças fúngicas superficiais mais frequentes no mundo, afetando pacientes hígidos e com o sistema imunológico comprometido (Segal e Frenkel, 2015). Fatores como idade, trauma, exercícios físicos, diabetes, HIV, má circulação periférica, ocupação profissional, migração, estilo de vida, contato prolongado com a água, estado imunológico, tratamentos e clima influenciam na prevalência, na etiologia e no resultado do tratamento escolhido para essa micose (Yadav et al., 2015; Silva-rocha et al., 2016). As infecções superficiais causadas por esse grupo, podem, muitas vezes, não desencadear um processo inflamatório com consequências graves em termos de morbidade e mortalidade. Porém, são capazes de desencadear processos crônicos, de difícil tratamento e afetar a qualidade de vida dos indivíduos acometidos. Desencadeando problemas relacionados a autoestima e a discriminação social (Pires et al., 2014).

As lesões causadas por dermatófitos manifestam-se em diferentes regiões do corpo e o termo “tinea” é atribuído a elas: tinea capitis (couro cabeludo), tinea corporis (distintas áreas do corpo), tinea pedis (região plantar dos pés e espações interdigitais) e tinea unguium (unhas) (Pires et al., 2014).

Esses agentes são os mais frequentes isolados das infecções de unhas, sendo *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton interdigitale* (anteriormente *Thichophyton mentagrophytes* var *interdigitale*) os responsáveis por 90% das infecções nas unhas dos pés e 50% nas infecções das unhas das mãos (Yadav et al., 2015). Ainda, essas espécies são importantes agentes etiológicos da tinea pedis. São fungos considerados antropofílicos, uma vez que estão mais associados a infecções em humanos e raramente acometem animais (Ilkit e Durdu, 2015). *T. rubrum* apresenta-se como a espécie mais prevalente entre os dermatófitos e já foi isolada em diversas regiões do mundo: Alemanha, Delhi, Nepal, Portugal, Brasil, Tunísia, Paquistão, Marrocos e Algéria (Yadav et al., 2015; Silva-Rocha et al., 2016).

Microsporum canis é uma espécie zoofílica e geralmente apresenta-se como causadora de tinea capitis em crianças e de tinea barbae (pelos da barba) em adultos (esse último relacionado a pacientes com imunossupressão). Os animais domésticos podem ser reservatórios desse agente, de forma saudável, sem apresentar sintomas da doença. *M. gypseum* é um saprófita do solo, e acomete humanos resultando em tinea corporis e tinea capitis (Erick Martínez et al., 2014). Já *Epidermophyton floccosum* é mais comumente isolado de amostras de pele (tinea cruris, tinea pedis) e considerado raro em infecções de unhas (tinea unguium) (Segal e Frenkel, 2015; Gupta et al., 2016).

O tratamento das lesões dermatofíticas leva em consideração o local e o agente causador da patologia. Ainda, conforme o grau de acometimento do paciente, eficácia da medicação escolhida ou recidivas de infecção podem ser administradas formulações tópicas, orais ou drogas combinadas (Gupta et al., 2016). Apesar disso, em um contexto geral, na terapia oral, o antifúngico mais utilizado para as dermatofitoses é a terbinafina, seguida de itraconazol e de fluconazol (Pires et al., 2014). No entanto, a terapia com essa alilamina pode levar a alguns efeitos colaterais: dores de cabeça, dificuldades de concentração, náusea, diarreia e irritações na pele. E infelizmente, ambos os fármacos da classe dos azóis podem apresentam reações adversas muito similares as da terbinafina (Gupta et al., 2016).

Quanto aos fármacos de ação tópica, ciclopirox tem sido utilizado mundialmente para as lesões superficiais fúngicas causadas por *T. rubrum*, *T. intedigitale*, *E. floccosum* e *M. canis* (Pires et al., 2014; Gupta et al., 2016). O uso combinado de terapias orais e tópicas também é uma opção nos casos mais agressivos da patologia ou aqueles de difícil tratamento. A associação de amorolfina com terbinafina resulta em uma maior taxa de sucesso do que a utilização de terbinafina não combinada (Gupta et al., 2016).

3.3.2 *Fusarium* spp.

3.3.2.1 Espécies de importância clínica

O gênero *Fusarium* spp. é dividido em complexos que abrangem suas diversas espécies (Al-Hatmi et al., 2017). No entanto, apesar de seus definidos complexos, autores diferem quanto a quantidade de espécies que o gênero *Fusarium* spp. possui, e quantas delas são responsáveis por infecções em humanos. Todavia, há um consenso sobre as espécies mais frequentes a essas infecções: *F. solani* e *F. oxysporum* (Buchta et al., 2014; Dabas et al., 2016; Douglas et al., 2016; Rosa et al., 2018), seguidas das espécies *F. verticillioidis*, *F. moniliforme* (Dabas et al., 2016), *F. proliferatum*, *F. sacchari* e *F. dimerum* (Buchta et al., 2014). As espécies do complexo *Fusarium solani* são as mais comuns deste gênero, responsável por aproximadamente metade das infecções causadas por esse fungo (García-Ruiz et al., 2015; Douglas et al; 2016).

Espécies de *Fusarium* são conhecidas como patógenos de plantas, animais e humanos, causando infecções locais e/ou sistêmicas. Produtor de micotoxinas, esse gênero, também pode gerar infecções através da ingestão de alimentos contaminados (Zhang et al., 2006; Buchta et al., 2014). O aumento da incidência das infecções sistêmicas por *Fusarium* sp., e outros fungos filamentosos – como *Aspergillus* sp., *Acremonium* sp. e *Scedosporium* sp. – está associado ao crescente número de pacientes imunocomprometidos (Fleming et al., 2002; Buchta et al., 2014). E em indivíduos imunocompetentes, a fusariose também se manifesta, apresentando infecções de unha (onicomicose) e infecções oculares (ceratites), sendo essas as formas mais observadas de acometimento por esse fungo nessa população (Zhang et al., 2006; Douglas et al., 2016). As lesões na córnea por fungos oportunistas podem levar a sérios problemas visuais e o sucesso do tratamento depende de fatores como

o diagnóstico precoce da espécie, teste de suscetibilidade antifúngica e terapia adequada por longo período (Buchta et al., 2014).

O desenvolvimento dessa micose e a forma como a doença se manifesta no hospedeiro depende do estado em que o sistema imunológico do paciente se encontra (Dabas et al., 2016). A porta de entrada para essas infecções, na maioria das vezes, está ligada à inalação dos esporos, seguida de lesões que possam deixar o tecido ou a mucosa expostos de alguma forma (Fleming et al., 2002; Douglas et al., 2016).

Em pacientes imunossupressos, as infecções culminam em complicações mais sérias. São indivíduos com maior risco aqueles com neutropenia prolongada ou imunodeficiência de células T, resultando em infecção fúngica invasiva e disseminada, caracterizada por altas taxas de mortalidade (Garcia et al., 2014; Dabas et al., 2016; Douglas et al., 2016; Debourgogne et al., 2016; Al-Hatmi et al., 2017; Rosa et al., 2018).

O aumento de infecções invasivas pode ser associado a diferentes fatores: neutropenia, uso prologado de antibióticos de amplo espectro, terapias com corticoides, infecções por HIV, doenças hematológicas, transplantes e outras condições de imunossupressão (Fleming et al., 2002; Dabas et al., 2016; Rosa et al., 2018). Outro fator relevante é a profilaxia antifúngica, que resultou em dois importantes pontos: desenvolveu resistência em alguns agentes fúngicos e trouxe o aparecimento de espécies fúngicas emergentes anteriormente consideradas raras no âmbito clínico (Debourgogne et al., 2016; Dabas et al., 2016).

A fusariose invasiva está associada a alta taxa de mortalidade, dessa forma, seu diagnóstico, através da identificação precisa da espécie, deve ocorrer de forma rápida (Al-Hatmi et al., 2017) e a indicação da terapia antifúngica há de estar de acordo com o teste de suscetibilidade do agente em questão (Zhang et al., 2006; Dabas et al., 2016). Os membros do gênero *Fusarium* spp.são geralmente resistentes aos antifúngicos disponíveis (Garcia et al., 2015; Dabas et al; 2016) e a literatura afirma que há variação da suscetibilidade antifúngica das espécies de *Fusarium*, sendo *F. solani* a mais resistente delas (Buchta et al., 2014; Garcia et al., 2015; Al-Hatmi et al., 2017). A resistência aos azóis e aos polienos é mais observada em *F. solani* e *F. verticillioides* quando comparados a outras espécies, como *F. oxysporum* e *F. moniliforme*, os quais podem ser mais suscetíveis ao voriconazol e ao

posaconazol (Dabas et al., 2016). Um tratamento alternativo nos casos de resistência apresentada por *F. solani*, seria a terapia combinada de diferentes antifúngicos ou o uso de posaconazol ao invés de voriconazol (Buchta et al., 2014). Em caso relatado por Dabas et al., (2016) a monoterapia de voriconazol foi igualmente efetiva a monoterapia com anfotericina B e segundo Rosa et al., (2018), esses mesmos fármacos apresentaram maior atividade antifúngica frente a uma nova espécie possivelmente pertencente ao complexo *F. solani*: *F. riograndense*.

Contudo, observam-se diversas dificuldades para se alcançar uma terapia efetiva nas infecções causadas por esse fungo oportunista. Essas barreiras envolvem tanto a problemática do diagnóstico – identificação correta e breve da espécie em questão (García-Ruiz et al., 2015), quanto a escolha do melhor tratamento – a qual envolve teste de suscetibilidade antifúngica e muitos laboratórios não o realizam como parte da rotina (Buchta et al., 2014). Dessa forma, o mau manejo das enfermidades geradas por *Fusarium* spp. levam ao uso excessivo de drogas, resultando em recidivas, resistência aos antifúngicos comerciais e altas taxas de mortalidade (Al-Hatmi et al., 2017).

3.3.2.2 Espécies fitopatogênicas

Fusarium spp. está amplamente distribuído na natureza: no solo, nas folhas, nas raízes das plantas, nos detritos vegetais em decomposição, infectando sementes e resíduos de plantações anteriores (Marburguer et al., 2014; Niehaus et al., 2017). Ele representa um dos principais fungos patogênicos causadores de doenças que culminam na baixa qualidade e na contaminação de plantas e de grãos por micotoxinas; sendo que, uma vez detectada a presença de toxinas toda produção deve ser descartada, pois representam uma ameaça para a saúde de animais e de humanos (Marburguer et al., 2014; Stumpf et al., 2013; Antonissen et al., 2014). Desse modo, a infecção por este fungo afeta de forma relevante a economia mundial em torno das plantações acometidas, gerando perdas anuais nos lucros dessas produções (O'donnell et al., 2015; Wegulo et al., 2015; Ploetz, 2015).

Fusarium e suas diferentes espécies são responsáveis pelo acometimento de variados produtos agrícolas (Stumpf et al., 2013; Hartman et al., 2015; Wegulo et al., 2015; Ploetz, 2015; McGovern, 2015). *F. verticillioides*, *F. subglutinas* e *F. proliferatum* foram relatadas como agentes responsáveis pelo apodrecimento de

espigas de milho (Stumpf et al., 2013). Demais infecções como a fusariose da espiga, também conhecida como giberela, prejudicam, principalmente, plantações de trigo e cevada, onde as espécies predominantes são *F. graminearum*, *F. culmorum* e *F. avenaceum* (Marburguer t al., 2014, Wegulo et al., 2015). *Fusarium oxysporum* é relatado como causador de infecções em tomates e é apresentado como um grande desafio na produção desse fruto (McGovern, 2015). Atualmente, as doenças causadas por essa espécie tem afetado outros produtos agrícolas como morango, grãos de bico e bananas (Gordon e Koike, 2015; Jiménez-Díaz et al., 2015; Ploetz, 2015). Diversas espécies de *Fusarium* são reportadas na literatura como responsáveis pela infecção em grãos de soja, dentre elas, Hartman et al (2015) apresentaram *F. virgulliforme*, *F. brsiliense*, *F. crassistipitatum* e *F. tucumaniae* como as mais prevalentes.

As espécies de *Fusarium* possuem ampla distribuição geográfica. *F. verticillioides* é a mais prevalente na África e nas regiões do sul da Europa, sendo associada aos danos causados nos grãos de milho e subprodutos na França, Espanha e Itália. No Brasil, essa mesma espécie predomina no centro oeste e regiões tropicais (Stumpf et al., 2013). Já *F. graminearum* é comumente observada nas regiões sul do país e em outros países como Bélgica, Nova Zelândia, América do Norte, Austrália e região sul da China (Sumpf et al., 2013; Wegulo et al., 2015). *F. oxysporum* já foi observada em território brasileiro (McGovern et al., 2015), porém, a doença causada nas frutas foi inicialmente descrita na Austrália. A infecção provocada por essa espécie é encontrada em praticamente todas as áreas onde ocorre esse tipo de cultivo e por isso a principal preocupação está ligada a dispersão da doença, visto que há poucas opções efetivas para o tratamento de tal epidemia (Ploetz, 2015). *Fusarium virguliforme* foi relatado nos Estados Unidos e outras três espécies foram reconhecidas na América do Sul: *F. brasiliense*, *F. crassistipitatum* e *F. tucumaniae*. (Hartman et al., 2015).

Ao colonizar as raízes, o fungo pode produzir toxinas que se dispersam pela planta através do sistema vascular causando diversos sintomas (Hartman et al., 2015). No Brasil, pesquisas abordando micotoxinas nos grãos de milho ocorrem esporadicamente e a maioria dos estudos escolhe por focar na detecção de fumonisinas, grupo de micotoxinas produzidas pelas espécies *F. verticullioides* e *F. subglutinas*. Da mesma forma, há relatos de micotoxinas da classe dos tricotecenos: deoxinivalenol e nivalenol, produzidas, principalmente, por espécies do complexo *F.*

graminearum (Kuhnem Júnior et al., 2013; Stumpf et al., 2015) e a presença de tais toxinas é prejudicial aos homens e aos animais expostos (O'donnell et al., 2015; Wegulo et al., 2015; Antoniessen et al., 2014).

Tendo em vista tal panorama, é essencial que agricultores e produtores desenvolvam estratégias para minimizar as perdas (Wegulo et al., 2015; Marburguer et al., 2014). Alternativas como controles biológico e químico, rotação de culturas, cultivos tolerantes e resistentes e a produção de transgênicos aparecem na literatura como algumas das soluções para o manejo das infeções causadas por *Fusarium* spp. (D'angelo et al., 2014; Hartman et al., 2015; Wegulo et al., 2015). Contudo, curvas de dose-respostas obtidas pelo tratamento deste fungo com os fungicidas azólicos – uma das principais classes utilizadas no tratamento de infecções por este micro-organismo - indicam que o desenvolvimento de resistência tem aumentado (Becher et al., 2010). Dessa forma, compreende-se a necessidade pela busca de novas moléculas com atividade antifúngica, visto que esse patógeno possui extensa distribuição geográfica afetando a economia mundial, o ambiente, a saúde humana e animal (Antoniessen et al., 2014; Ploetz, 2015).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de realização dos ensaios

A síntese dos análogos de 8-hidroxiquinolina foi realizada no Departamento de Produção de Matéria Prima da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) no Laboratório de Síntese Farmacêutica. Os experimentos microbiológicos, *in vitro*, foram desenvolvidos no Laboratório do Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada, situado no Anexo II da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

4.2 Seleção dos microrganismos

Todos os microrganismos selecionados para realização do estudo encontram-se depositados na Micoteca do Laboratório do Grupo de Pesquisa em Micologia Aplicada da UFRGS. São oriundas desta coleção de culturas as seguintes cepas: *Candida Krusei* (ATCC 6258), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida tropicalis* (ATCC 750), *Candida glabrata* (RL750), *Candida guilliermondii* (CGHCPA), *Microsporum canis* (MCA01), *Microsporum gypseum* (MGY50), *Trichophyton mentagrophytes* (TME32), *Trichophyton rubrum* (TRU51), *Fusarium falciforme* (F20), *Fusarium oxysporum* (F35), *Fusarium keratoplasticum* (HCF26), *Fusarium solani* (HCF41), *Fusarium meridionale* (09Mi21) e *Fusarium graminearium* (09Tr26). As cepas de *Trichosporon asahii* (ATCC 90039) e *Magnusiomyces capitatus* (*Geotrichum capitatum* - URM6260) foram recebidas da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS) da Fundação Oswaldo Cruz e da Coleção de Culturas da Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco, respectivamente. Os microrganismos escolhidos totalizam 17 fungos: 7 leveduras, 4 dermatófitos e 6 espécies de *Fusarium* (4 de origem clínica e 2 fitopatógenos), descritos acima.

4.3 Síntese de novos análogos de 8-hidroxiquinolina

Os espectros de ^{1}H e ^{13}C foram obtidos no equipamento Bruker 400 (Billerica, USA). A 8-hidroxiquinolina e os outros reagentes utilizados nas etapas de síntese foram obtidos comercialmente (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) e utilizados sem purificação prévia. Os solventes foram destilados antes do uso. A evolução das reações foi acompanhada por cromatografia em camada delgada de sílica (CCD)

(sílica gel em folhas de alumínio, Sigma Aldrich). As purificações por cromatografia em coluna de sílica (CCS) foram realizadas com sílica gel 60 (0,063-0,200 mm, Sigma Aldrich).

4.3.1 Obtenção de 8-hidroxi-5-nitro-quinolina (**4**)

4.3.1.1 Preparação de 8-hidroxi-5-nitroso-quinolina (**3**)

A uma mistura de 8-hidroxiquinolina (5 g, 0,0345 mmol) em ácido clorídrico (HCl) concentrado (14,38 mL) a 0ºC, foi adicionado nitrito de sódio ($NaNO_3$) (2,46 g) em água (4,0 mL). Ao formar uma massa amarelada precipitada foi filtrada à vácuo e lavado o excesso com água gelada destilada. Em um balão de fundo redondo, adicionou-se o pó resultante da reação acima, juntamente com ácido nítrico concentrado (HNO_3) (11,4 mL) e água (7,6 mL), sob agitação a temperatura de 17ºC. Após 75 minutos sob agitação, a mistura foi diluída com água destilada a 0ºC e adicionado acetato de sódio para se obter um pH de aproximadamente 6,0. O produto foi filtrado à vácuo e lavado o excesso com água destilada gelada. Obteve-se, aproximadamente, 1 g de um sólido amarelo (rendimento: 22%). Este composto foi sintetizado utilizando metodologia adaptada de Mazumber et al (2008).

RMN de ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm), *J* (Hz): 9.34 (dd, 1H, *J*= 1.6, 8.8), 8.89 (dd, 1H, *J*= 1.6, 4.4), 8.61 (d, 1H, J= 8.8), 7.74 (dd, 1H, *J*= 4.4, 8.8), 7.21 (d, 1H, *J*= 8.8). ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 158.48, 148.77, 137.05, 136.10, 133.75, 129.07, 125.21, 122.54, 108.12.

4.3.2 Obtenção de 5-amino-8-hidroxi-quinolina (**5**)

Uma mistura de **4** (1 g, 0,00525 mmol) em isopropanol (50 mL) foi agitada e aquecida até refluxo. Em seguida, o Pd/C (0,125 g) e a solução de hidrazina 16% (3,7 mL, 0,0183 mmol) foram adicionados. A mistura ficou sob agitação por 4h, foi filtrada à vácuo a quente e evaporada em rotavapor. Logo após a secagem obteve-se um pó de cor amarelo escuro tornando-se preto com o tempo. O produto foi utilizado na etapa seguinte sem purificação. Este composto foi sintetizado utilizando metodologia adaptada de Lü et al (2013).

RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-d*6*) δ (ppm), *J* (Hz): 8.77 (dd, 1H, *J*= 1.2, 4.4), 8.47 (dd, 1H, *J*= 1.6, 8.4), 7.43 (dd, 1H, *J*= 4, 8.4), 6.86 (d, 1H, J= 8.4), 6.63 (d, 1H, *J*= 8). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-d*6*) δ (ppm): 148.17, 144.31, 139.07, 137.21, 132.07,

119.94, 119.14, 112.30, 109.14.

4.3.3 Obtenção de 5-azido-8-hidroxi-quinolina (**6**)

O composto **5** foi dissolvido em uma solução de ácido clorídrico concentrado (0,913 mL) e água (11,41 mL), a -3ºC em banho de sal e gelo, sob agitação por 10 minutos. Foi gotejado uma solução gelada de nitrito de sódio (1,1413 g, 0,01654 mmol) em agua (11,41 mL). A mistura foi agitada por 20 minutos e então gotejada solução de azida de sódio (1,3696 g, 0,0210 mmol) em água (91,3 mL), agitada por 1,5 h a 0ºC e então ficou em temperatura ambiente por 24h protegida da luz. Para a extração do produto utilizou-se éter etílico (2 x 100 mL) e água (50 mL) e um sólido marrom escuro foi obtido. Rendimento: 38%. Este composto foi sintetizado utilizando metodologia adaptada de González-Vera et al (2009).

RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-d*6*) δ (ppm), *J* (Hz): 9.94 (s, 1H), 8.92 (dd, 1H, *J*= 1.6, 4.4), 8.35 (dd, 1H, *J*= 1.6, 8.8), 7.61 (dd, 1H, *J*= 4, 8.8), 7.39 (d, 1H, *J*= 8), 7.14 (d, 1H, *J*= 8.4). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-d*6*) δ (ppm): 151.31, 149.58, 139.07, 131.30, 125.76, 122.48, 122.02, 116.66, 111.83.

4.3.4 Obtenção do acetato de 5-azido-8-quinolinil (**7**)

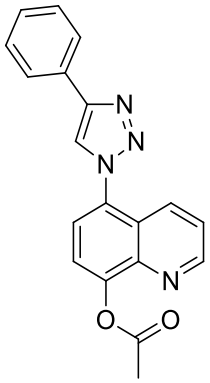
A um balão contendo **6** (0,7326 g, 0,00394 mmol), adicionou-se anidrido acético (0,6024 g, 0,00590 mmol) e piridina (0,190 mL). A mistura permaneceu reagindo por aproximadamente 2 horas. Em seguida adicionou-se água destilada (5 mL) e manteve-se sob agitação por 20 minutos. Após adicionou-se ao balão 40 mL de acetato de etila. A fase orgânica resultante foi lavada com solução de AcOH 1 M (2 x 10 mL), NaOH 0,5 M (10 mL) e água destilada (10 mL). Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e eliminou-se o solvente em evaporador rotatório. O produto foi utilizado na etapa seguinte sem purificação.

4.3.5 Procedimento geral para reação de Click

A um balão de fundo redondo contendo **7** (1 eq.), o alquino apropriado (1 eq.) e *t*-butanol adicionaram-se $CuSO_4.5H_2O$ (0,2 eq.) e solução de ácido ascórbico (0,6 eq.) e bicarbonato de sódio (0,6 eq.) em água destilada. A mistura reacional permaneceu sob agitação magnética. Após o término da reação (24 horas) removeu-se o solvente em evaporador rotatório. O resíduo foi purificado por cromatografia em

coluna (eluente: ciclohexano e acetato de etila).

4.3.5.1 Síntese do Acetato de 5-(4-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinil (PH264)



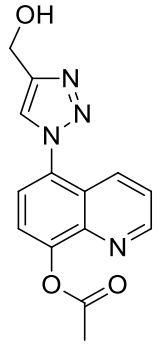
Foi obtido um sólido amarelado com 53% de rendimento.

Fórmula Molecular: $C_{19}H_{14}N_40_2$

Massa Molar: 330,34 g/mol

Obtido conforme descrito anteriormente. Sólido esverdeado. RMN de ^{1}H (400 MHz, CDCl3) δ (ppm), *J* (Hz): 9.01 (dd, 1H, *J*= 1.6, 4), 8.15 (dd, 1H, *J*= 1.6, 8.4), 8.13 (s, 1H), 7.69 (d, 1H, *J*= 8), 7.57 (d, 1H, *J*= 8), 7.53-7.47 (m, 3H), 7.40 (t, 1H, *J*= 7.2), 2.55 (s, 3H). ^{13}C RMN (100 MHz, CDCl3) δ (ppm): 169.47, 151.40, 148.90, 148.07, 141.23, 131.66, 131.22, 129.85, 129.00, 128.63, 125.87, 125.18, 123.38, 123.19, 122.04, 120.67, 20.94.

4.3.5.2 Síntese do Acetato de 5-(4-(hidroximetil) -1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinil (PH266)



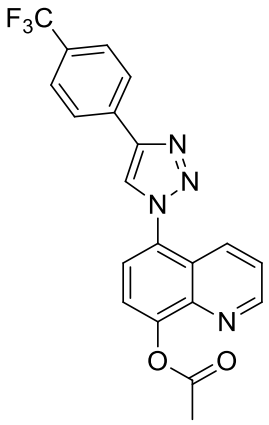
Foi obtido um sólido amarelado com 36% de rendimento.

Fórmula Molecular: $C_{14}H_{12}N_40_3$

Massa Molar: 284,27 g/mol

Obtido conforme descrito anteriormente. Sólido amarelado. RMN de ^{1}H (400 MHz, acetona-d6) δ (ppm), *J* (Hz): 9.01 (dd, 1H, *J*= 1.6, 4), 8.37 (s, 1H), 8.10 (dd, 1H, *J*= 1.6, 8.4), 7.84 (d, 1H, *J*= 8), 7.71-7.65 (m, 2H), 4.85 (s, 2H), 2.45 (s, 3H). ^{13}C RMN (100 MHz, acetona-d6) δ (ppm): 169.72, 152.26, 149.99, 149.94, 149.76, 142.18, 132.53, 125.04, 125.88, 124.71, 124.21, 121.81, 56.79, 20.86.

4.3.5.3 Acetato de 5-(4-(4-(trifluormetil)fenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinil (PH268)



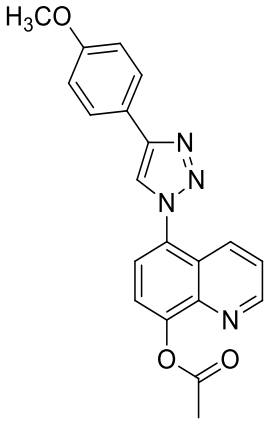
Foi obtido um sólido amarelado com 32% de rendimento.

Fórmula Molecular: $C_{20}H_{13}F_3N_40_2$

Massa Molar: 398,34 g/mol

Foi obtido uma mistura de compostos acetilados e desacetilados.

4.3.5.4 Acetato de 5-(4-(4-metoxifenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinil (PH270)



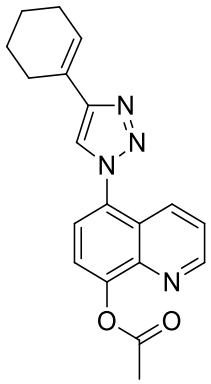
Foi obtido um sólido amarelado com 48% de rendimento.

Fórmula Molecular: $C_{20}H_{16}N_40_3$

Massa Molar: 360,12 g/mol

Foi obtido uma mistura de compostos acetilados e desacetilados.

4.3.5.5 Acetato de 5-(4-(ciclohex-1-en-1-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinil (PH272)



Foi obtido um sólido amarelado com 14% de rendimento.

Fórmula Molecular: $C_{25}H_{22}N_40_2$

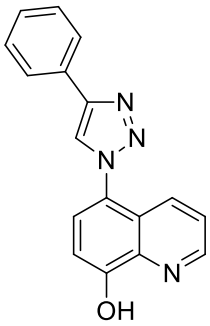
Massa Molar: 334,37 g/mol

Foi obtido uma mistura de compostos acetilados e desacetilados.

4.3.6 Procedimento geral para reação de desacetilação

A um balão contendo o triazol desejado (1 eq.), adicionou-se hidróxido de potássio (KOH) (3 eq.) e etanol (1 mL). A mistura permaneceu reagindo por aproximadamente 1 hora. Em seguida adicionou-se água destilada e manteve-se sob agitação por 20 minutos. Após adicionou-se ao balão acetato de etila. A fase orgânica resultante foi lavada com solução de ácido acético (AcOH) 1 M, hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 M e água destilada. Secou-se a fase orgânica com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e eliminou-se o solvente em evaporador rotatório.

4.3.6.1 Síntese do 5-(4-fenil-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinol (PH265)



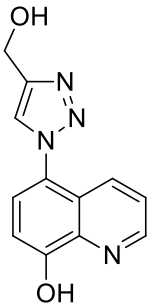
Foi obtido um sólido amarelado com 57% de rendimento.

Fórmula Molecular: $C_{17}H_{12}N_40$

Massa Molar: 288,30 g/mol

Obtido como descrito anteriormente. Sólido esverdeado. RMN de ^{1}H (400 MHz, acetona-d6) δ (ppm), *J* (Hz): 8.97 (d, 1H, *J*= 3.2), 8.78 (s, 1H), 8.20 (d, 1H, *J*= 8.4), 8.04 (d, 2H, *J*= 7.6), 7.81 (d, 1H, *J*= 8), 7.70 (dd, 1H, *J*= 3.6, 8.8), 7.49 (t, 2H, *J*= 7.6), 7.39 (t, 1H, *J*= 7.2), 7.31 (d, 1H, *J*= 8). ^{13}C RMN (100 MHz, acetona-d6) δ (ppm): 154.46, 149.25, 147.19, 137.91, 131.86, 130.99, 128.89, 128.08, 125.58, 125.27, 123.25, 109.24.

4.3.6.2 Síntese do 5-(4-(hidroximetil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinol (PH267)



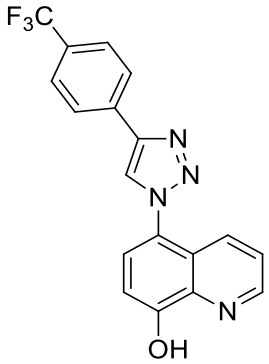
Foi obtido um sólido amarelado com 24% de rendimento.

Fórmula Molecular: $C_{12}H_{10}N_40_2$

Massa Molar: 242,23 g/mol

Obtido como descrito anteriormente. Sólido esverdeado. RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-d6) δ (ppm), *J* (Hz): 8.98 (sl, 1H), 8.43 (sl, 1H), 7.88 (sl, 1H), 7.67 (sl, 2H), 7.23 (sl, 1H), 5.34 (sl, 1H), 4.67 (sl, 2H). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 155.46, 149.65, 148.62, 138.43, 131.56, 126.06, 125.84, 124.83, 124.44, 123.84, 110.86, 55.47.

4.3.6.3 Síntese do 5-(4-(4-trifluormetilfenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinol (PH269)



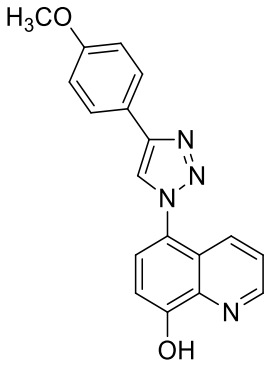
Foi obtido um sólido amarelado com 70% de rendimento.

Fórmula Molecular: $C_{18}H_{11}F_3N_{40}$

Massa Molar: 356,30 g/mol

Obtido conforme descrito anteriormente. RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-d6) δ (ppm), *J* (Hz): 9.26 (s, 1H), 9.01 (dd, 1H, *J*= 1.2, 4.4), 8.22 (d, 2H, *J*= 8), 8.03 (dd, 1H, *J*= 1.6, 8.8), 7.89 (d, 2H, *J*= 8), 7.81 (d, 1H, *J*= 8.4), 7.69 (dd, 1H, *J*= 4.4, 8.4), 7.26 (d, 1H, *J*= 8). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 155.76, 149.76, 145.66, 138.40, 134.90, 131.67, 128.73 (q, 1C, *J*= 32), 126.38, 126.49 (q, 1C, *J*= 4), 126.04, 126.01, 124.73 (q, 1C, *J*= 271), 124.66, 124.02, 124.00, 110.88.

4.3.6.4 Síntese do 5-(4-(4-metoxifenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinol (PH271)



Foi obtido um sólido amarelado com 16% de rendimento.

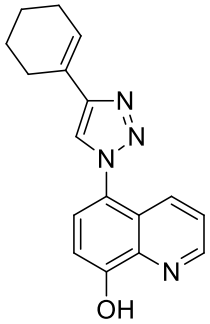
Fórmula Molecular: $C_{18}H_{14}N_40_2$

Massa Molar: 318,33 g/mol

Obtido conforme descrito anteriormente. RMN de ^{1}H (400 MHz, DMSO-d6) δ (ppm), *J* (Hz): 8.99 (dd, 1H, *J*= 1.2, 4), 8.96 (s, 1H), 8.02 (dd, 1H, *J*= 1.6, 8.4), 7.91

(d, 2H, *J*= 8.8), 7.77 (d, 1H, 8.4), 7.69-7.66 (m, 1H), 7.25 (d, 1H, *J*= 8.4), 7.07 (d, 1H, *J*= 8.8), 3.82 (s, 3H). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-d6) δ (ppm): 159.73, 155.59, 149.74, 147.01, 138.45, 131.79, 127.27, 125.91, 124.77, 124.37, 123.96, 123.80, 123.46, 114.92, 110.90, 55.70.

4.3.6.5 Síntese do 5-(4-(ciclohex-1en-1-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinol (PH273)



Foi obtido um sólido amarelado com 99% de rendimento.

Fórmula Molecular: $C_{23}H_{20}N_{40}$

Massa Molar: 292,34 g/mol

Obtido conforme descrito anteriormente. RMN de ^{1}H (400 MHz, acetona-d6) δ (ppm), *J* (Hz): 8.95 (dd, 1H, *J*= 0.8, 4), 8.26 (s, 1H), 8.12 (dd, 1H, *J*= 1.6, 8.4), 7.71 (d, 1H, *J*= 8), 7.67 (dd, 1H, *J*= 4, 8.8), 7.27 (d, 1H, *J*= 8), 6.65-6.62 (m, 1H), 2.51-2.46 (m, 2H), 2.25-2.20 (m, 2H), 1.82-1.76 (m, 2H), 1.73-1.67 (m, 2H). ^{13}C RMN (100 MHz, acetona-d6) δ (ppm): 155.20, 150.12, 149.79, 138.84, 132.83, 128.57, 126.07, 125.86, 125.32, 125.21, 124.37, 122.64, 110.16, 27.00, 25.95, 23.32, 23.13.

4.4 Teste de suscetibilidade fúngica

Os testes de suscetibilidade das espécies fúngicas utilizadas neste trabalho, frente os derivados de 8-hidroxiquinolina, foram realizados através do método de microdiluição em caldo de acordo com as normas padronizadas e publicadas pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI). O protocolo M27-A3 foi utilizado para os fungos leveduriformes e o protocolo M38-A2 foi aplicado aos fungos filamentosos (CLSI, 2008).

Nos ensaios com as leveduras, utilizou-se ágar Sabouraud dextrose (HiMedia) para o crescimento das colônias em 24h a 35ºC. As células fúngicas foram

suspensas em uma solução de salina estéril 0,85% (Dinâmica; Diadema, SP) e lidas em espectrofotômetro (GT220, Global Trade Tecnology) no comprimento de onda de 530 nm. A transmitância desejada é equivalente a escala de 0,5 de McFarland ($1x10^6$ a $6x10^6$ UFC/mL). A solução de trabalho preparada a partir da suspensão das células fúngicas é dividida em duas diluições, sendo a primeira diluida 1:50 e a segunda 1:20, ambas em caldo RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640; Gibco. Nova York) – sem bicarbonato de sódio, tamponado com MOPS ácido morfolinopropanosulfonico; Sigma-Aldrich) ajustado com pH 7,0 - levando a uma concentração de células de 1 a $5x10^3$ UFC/mL. A faixa de concentração utilizada para os derivados testados e para o clioquinol foi de 8 µg/mL a 0,015 µg/mL e de 32 µg/mL a 0,062 µg/mL para o fluconazol.

Os fungos filamentosos foram repicados em ágar dextrose de batata (HiMidia, Índia), sendo os dermatófitos cultivados por cerca de 5 dias e Fusarium spp. por aproximadamente 48h, ambos a 30ºC. Para a suspensão celular dos dermatófitos, utilizou-se solução de salina estéril 0,85% e realizou-se a leitura da transmitância em espectrofotômetro (GT220, Global Trade Tecnology) no comprimento de onda de 530 nm, obtendo-se uma concentração de 2 a $6x10^3$ UFC/mL. Para *Fusarium* spp. a mesma suspensão foi realizada, no entanto, fez-se uso da câmara de Neubauer para quantificar a concentração celular (2 a $6x10^3$ UFC/mL). A faixa de concentração utilizada para os derivados testados, cetoconazol e clioquinol foi de 8 µg/mL a 0,015 µg/mL para dermatófitos. Para *Fusarium* spp. a faixa de concentração dos compostos sintetizados e do voriconazol foi de 64 µg/mL a 0,125 µg/mL, sendo de 32 µg/mL a 0,062 µg/mL para o clioquinol.

As microdiluições ocorreram em microplacas de poliestireno com 96 poços. Para o preparo das moléculas e demais agentes antifúngicos, diluiu-se os compostos 1:2 em meio RPMI. Após, adicionou-se o inóculo preparado previamente. O experimento foi realizado em triplicatas e incubado por 48h para *Fusarim* spp. (30ºC) e leveduras (35ºC), e 120h para dermatófitos (30ºC). Foi definida como concentração inibitória mínima (CIM) a menor concentração dos derivados de 8-hidroxiquinolina e demais agentes antifúngicos em que os microrganismos não tiveram crescimento visível após os tempos de incubação específicos para cada fungo.

4.5 Ensaio de toxicidade

4.5.1 Preparo da cultura de leucócitos humanos

Para o prepare das culturas de leucócitos humanos, utilizou-se 1 mL de sangue venoso, coletado por venopunção de um voluntário com mais de 18 anos e sem uso de medicação. Os leucócitos utilizados no ensaio (linfócitos), foram obtidos através de centrifugação. Imediatamente transferidos para o meio de cultura contendo 9 mL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de sorofetal bovino e 1% de estreptomicina/penicilina (Santos Montagner et al., 2010). A cultura celular foi incubada por 72 horas a 37ºC. O controle negativo foi preparado com tampão PBS com pH 7,4 e o controle positive com H_2O_2 4mM. Protocolo aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal do Pampa: 27045614.0.0000.5323.

4.5.2 Viabilidade celular

A viabilidade celular dos linfócitos cultivados é avaliada através da perda da integridade da membrana leucocitária: utiliza-se 100µl de azul de Tripam e 100µl de amostra (Burow et al., 1998). As células não viáveis são observadas ao microscópio coradas pelo azul de Tripam, uma vez que este corante penetra dentro da célula que perdeu sua integridade.

4.6 Mecanismo de ação

Os testes de mecanismo de ação foram realizados com as moléculas consideradas mais promissoras de acordo com os resultados obtidos a partir da síntese e dos ensaios de suscetibilidade, tendo em vista sua atividade em comum para os três grupos de microrganismos estudados e de acordo com a estabilidade dos derivados. Grupamentos ésteres são conhecidos por serem relativamente lábeis, principalmente ésteres derivados de fenóis, como é o caso dos compostos acetilados PH264, PH266, PH268, PH270 e PH272. Sendo assim, os triazóis utilizados nas próximas etapas do estudo são PH265 e PH273. As cepas escolhidas para dar seguimento aos ensaios constituem o grupo das leveduras e o grupo dos dermatófitos, não contemplando o gênero *Fusarium* sp. nesta parte do estudo.

4.6.1 Ensaio de efeito de ergosterol

Para avaliação do mecanismo de ação das moléculas sintetizadas quanto suas ações na membrana plasmática, realizou-se o estudo de efeito do ergosterol.

Esse ensaio baseia-se na capacidade dos compostos antifúngicos se complexarem ao ergosterol da membrana da célula fúngica. Ao ser alvo desses agentes, a membrana plasmática sofre ações que alteram sua permeabilidade, resultando em ruptura e consequente perda do conteúdo intracelular (Denning e Hope, 2010; Flevari et al., 2013). A presença do ergosterol exógeno no meio de cultura evita que o fármaco se ligue ao ergosterol da membrana, mas sim a esse componente livre no meio, culminando na diminuição da potência do antifúngico (Escalante et al., 2008).

Sendo assim, determinou-se as CIMs das moléculas em questão e do controle positivo por microdiluição em caldo (CLSI M27-A3 para as leveduras e M38-A2 para os filamentosos) na ausência e na presença de ergosterol exógeno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) nas seguintes concentrações: 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL e 200 µg/mL. O ergosterol comercial foi dissolvido em dimetilformamida (Sigma-Aldrich) e diluído no meio de cultura RPMI 1640, de forma que a concentração final do solvente fosse de 0.1%. Os experimentos foram realizados em microplacas de poliestireno de 96 poços em duplicata. Como controle positivo utilizou-se anfotericina B (União Química, São Paulo, Brasil) devido sua afinidade pelo ergosterol e ação na membrana fúngica. Os valores das CIMs foram determinados após 2 dias a 35ºC para leveduras e 5 dias a 30ºC para dermatófitos (Escalante et al., 2008). Entende-se que a ação das moléculas ocorre na membrana plasmática uma vez que a leitura das CIMs revela valores mais elevados na presença de ergosterol exógeno do que na sua ausência (Júnior et al. 2010), aumentado de acordo com as maiores concentrações.

4.6.2 Ensaio de proteção de sorbitol

Para avaliação do mecanismo de ação das moléculas sintetizadas quanto suas ações na parede celular, realizou-se o estudo de proteção de sorbitol. O sorbitol atua como um protetor osmótico, dificultando o acesso do composto em questão a parede celular do fungo, permitindo que ele cresça mesmo na presença do antifúngico (Frost et al., 1995; Júnior et al., 2010). Para que este efeito ocorra, o protetor osmótico é adicionado ao meio de cultura preparado para o ensaio.

Dessa forma, determina-se as CIMs dos agentes antifúngicos testados por microdiluição em caldo (CLSI M27-A3 para leveduras e CLSI M38-A2 para fillamentoso) na ausência e na presença de sorbitol 0,8 M (Sigma-Aldrich). Os

experimentos foram realizados em microplacas de poliestireno de 96 poços em duplicata.

Como controle positivo do teste, anidulafungina (Pfizer®) foi o fármaco de escolha, devido sua ação sobre a parede celular. Para avaliação do controle foi lido a concentração efetiva mínima (CEM), pois não foram obtidos aqui resultados de CIM devido a baixa concentração do fármaco necessária. As CIMs, dos derivados sintetizados, foram determinadas em duas leituras: após 2 e 7 dias para as leveduras (35ºC) e após 5 e 7 dias para os dermatófitos (30º) (Escalante et al., 2008). Identifica-se a ação do antifúngico na parede celular quando o valor da CIM na presença de sorbitol é mais elevado do que na ausência (Júnior et al., 2010).

4.6.3 *Time-Kill assay*

Para a realização do ensaio escolheu-se uma cepa representativa de cada grupo (leveduras e dermatófitos): *Candida guilliermondii* (CGHCPA) e *Microsporum canis* (MCA01). Para a levedura fez-se uma cultura prévia com 24h de incubação a 35ºC em ágar Sabouroud dextrose (HiMedia). Posteriormente, uma suspensão fúngica foi preparada com transmitância de 90%, ajustada para 0,5 na escala de McFarland (1 a $5x10^{6}$ UFC/mL). Uma diluição 1:10 foi realizada adicionando-se parte da suspensão em RPMI 1640, já contendo a quantidade necessária das moléculas teste, incluindo o controle positivo. Tal diluição resulta em uma solução com concentração de inóculo de 1 a $5x10^{5}$UFC/mL (Klepser et al., 1998).

Para *M. canis*, preparou-se uma suspensão das células fúngicas após cultura prévia de aproximadamente 5 dias em ágar Sabouroud dextrose (HiMedia) a 30C. Posteriormente, uma suspensão fúngica foi preparada com transmitância de 80-82% (1 a $3x10^{3}$ UFC/mL) em salina, transferindo-se parte do volume para o meio RPMI 1640, já contendo a quantidade necessária dos análogos, incluindo controle positivo (Ghannoum et al., 2013). Foram utilizadas as mesmas concentrações para cada composto nos testes de ambos os fungos: CIM, CIMx2, CIMx4 e CIMx8. Os experimentos foram realizados em triplicatas e incubados a 35 °C para *C. guilliermondii* e 30 °C para *M. canis.*

Em tempos predeterminados (0, 6, 12, 24 e 48h para *C. guilliermondii*; e 0, 6, 12, 24, 48, 96 e 120h para *M. canis*), alíquotas de 100 µl foram retiradas de cada poço e diluídas em série de 10 (até 10^{-3}) com salina estéril (0,85%). Em seguida, 20µl

diretamente das soluções testes e de cada diluição foram semeadas em placa contendo ágar Sabouroud dextrose (HiMedia) com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 35°C/48h para *C. guilliermondii* e 30°C/120h para *M. canis*. Após esse período de crescimento, a contagem das colônias foi realizada.

Este método tem como objetivo determinar a cinética dos compostos em questão, avaliando a propriedade fungicida das moléculas em função do tempo. As curvas resultantes do teste foram geradas em função da média do $\log^{10}$ UFC/mL contra o tempo de exposição das células fúngicas a diferentes concentrações dos derivados de 8-hidroxiquinolinas, incluindo os desvios padrão. Foi considerado efeito fungicida quando houve diminuição de ≥ 99,9% no $\log^{10}$ do número de UFC/mL em comparação com o inóculo inicial (tempo 0) sem tratamento.

4.6.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As alterações morfológicas observadas nas células fúngicas, causadas pelos derivados de 8-hidroxiquinolinas sintetizados, foram avaliados através do MEV. Previamente, foi realizado o método de macrodiluição em caldo (CLSI, 2008) seguido de MEV, conforme descrito a seguir.

Após o período de incubação necessário para o método de macrodiluição em caldo (*Candida guilliermondii*: 48h a 35 °C, *M. canis*: 120h a 30 °C), células fúngicas tratadas com concentrações subinibitórias de 8-hidroxiquinolinas (MIC/2 e MIC/3) e células não tratadas (controle positivo) foram lavadas três vezes com PBS (tampão fosfato-salino) (3000 rpm durante 5 min, Biosystems MCD2000, Curitiba, Brasil). Após lavagem, as células foram fixadas em 1 mL de fixador de Karnovsky modificado, adaptado de Joubert et al. (2015). Então, os poços foram lavados três vezes (3000 rpm durante 5 minutos) com cacodilato de sódio 0,1 M tamponado a pH 7,2 contendo sacarose 0,2 M e MgCl2 2 mM com o auxílio de duas pipetas, que foram utilizadas para adição e remoção simultânea para evitar exposição das células fúngicas ao ar. As células foram aderidas em lamínulas anteriormente funcionalizadas com poli-L-lisina durante 1h. As células aderidas foram desidratadas em uma série graduada de soluções de acetona recentemente preparadas: 30, 50, 70 (5 min), 95 e 100% (10 min). As amostras foram então submetidas à secagem por ponto crítico (EM CPD 300, Leica), montadas em *stubs* metálicos, revestidas por pulverização com uma camada de ouro e paládio de 15-20nm e visualizadas em um microscópio eletrônico

de varredura (Carl Zeiss EVO® MA10 Carl, Oberkochen, Alemanha) operando a 10kV.

5. RESULTADOS

5.1 Síntese dos análogos de 8-hidroxiquinolina

A rota de síntese de novos análogos da 8-hidroxiquinolina foi estabelecida através de 6 etapas descritas anteriormente: obtenção de 8-hidroxi-5-nitro-quinolina, obtenção de 8-hidroxi-5-amino-quinolina, obtenção de 8-hidroxi-5-azido-quinolina, obtenção do acetato de 5-azido-8-quinolinil, reação de Click e desacetilação (esquema 1). Todos os compostos obtidos (intermediários e finais) apresentaram rendimentos entre 14% e 99%. Os produtos finais foram caracterizados por espectro de RMN de ^{13}C e ^{1}H. Os espectros estão disponíveis no apêndice desta dissertação.

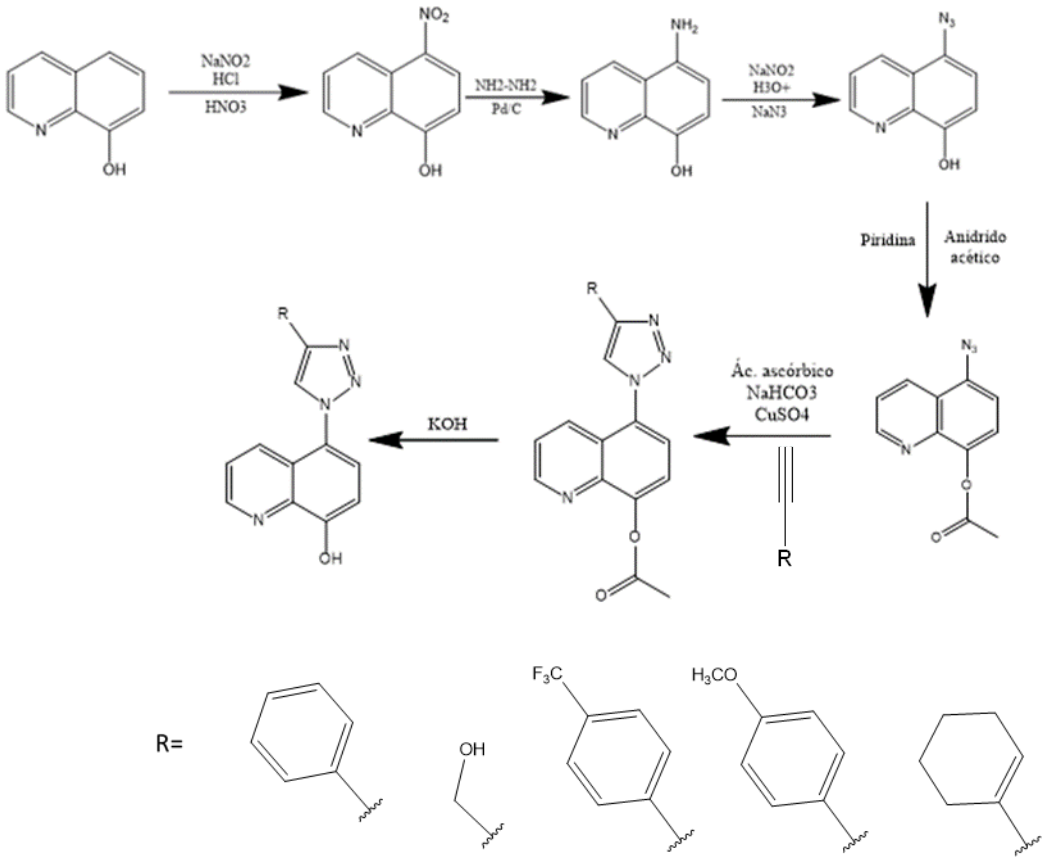


Figura 4. Esquema das etapas das reações de síntese.

5.2 Testes de suscetibilidade antifúngica

A maioria dos análogos de 8-hidroxiquinolina sintetizados foram testados, com exceção dos compostos PH268, PH270 e PH272, pois degradaram-se de forma

mais rápida que o esperado, mantendo apenas suas formas desacetiladas (PH269, PH271 e PH273). Dessa forma, dos 10 triazóis sintetizados, 7 foram testados quanto a atividade antifúngica frente aos isolados de leveduras, dermatófitos e *Fusarium* spp. No entanto, pode-se perceber que a suscetibilidade antifúngica foi variável de acordo com a espécie fúngica e com o composto testado, conforme descrito nas tabelas abaixo (Tabela 1, Tabela 2 e Tabela 3).

Teste de suscetibilidade antifúngica para leveduras

	Clioquinol (µg/mL)	Fluconazol (µg/mL)	PH264 (µg/mL)	PH265 (µg/mL)	PH266 (µg/mL)	PH267 (µg/mL)	PH269 (µg/mL)	PH271 (µg/mL)	PH273 (µg/mL)
C. parapsilosis (ATCC 22019)	1,0	8,0	2,0	4,0	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	4,0
C. tropicalis (ATCC 750)	0,5	8,0	2,0	2,0	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0
C. glabrata (RL 49)	0,5	8,0	1,0	1,0	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	4,0
C. krusei (ATCC 6258)	1,0	>32,0	4,0	4,0	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	8,0
C. guilliermondii (CG HCPA)	0,5	8,0	8,0	2,0	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	8,0
T. asahii (ATCC 90039)	4,0	2,0	2,0	8,0	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	4,0
M. capitatus (URM 6260)	1,0	4,0	2,0	1,0	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	4,0

Tabela 1. CIM's das leveduras frente aos antifúngicos controles e as moléculas sintetizadas.

Teste de suscetibilidade antifúngica para dermatófitos

	Clioquinol (µg/mL)	Cetoconazol (µg/mL)	PH264 (µg/mL)	PH265 (µg/mL)	PH266 (µg/mL)	PH267 (µg/mL)	PH269 (µg/mL)	PH271 (µg/mL)	PH273 (µg/mL)
M. canis (MCA 01)	2,0	2,0	2,0	2,0	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	2,0
M. gypseum (MGY 50)	4,0	4,0	2,0	4,0	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	4,0
T. mentagrophytes (TME 32)	2,0	1,0	2,0	2,0	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	2,0
T. rubrum (TRU 51)	1,0	2,0	2,0	2,0	>8,0	>8,0	>8,0	>8,0	2,0

Tabela 2. CIM's dos dermatófitos frente aos antifúngicos controles e as moléculas sintetizadas.

Teste de suscetibilidade antifúngica para espécies de *Fusarium*

	Clioquinol (µg/mL)	Voriconazol (µg/mL)	PH264 (µg/Ml)	PH265 (µg/mL)	PH267 (µg/mL)	PH269 (µg/mL)	PH271 (µg/mL)	PH273 (µg/mL)
F. falciforme (F20)	2,0	>64,0	16,0	>64,0	>64,0	>64,0	>64,0	>64,0
F. oxysporum (F35)	1,0	32,0	8,0	>64,0	>64,0	>64,0	>64,0	>64,0
F. keratoplasticum (HCF26)	2,0	16,0	16,0	>64,0	>64,0	>64,0	>64,0	>64,0
F. solani (HCF41)	1,0	16,0	32,0	>64,0	>64,0	>64,0	>64,0	>64,0
F. meridionale (09Mi21)	1,0	16,0	16,0	>64,0	>64,0	>64,0	>64,0	16
F. graminearium (09Tr26)	1,0	16,0	16,0	16,0	>64,0	>64,0	>64,0	>64,0

Tabela 3. CIM's de *Fusarium* spp. frente aos antifúngicos controles e as moléculas sintetizadas.

Os resultados obtidos de CIM's para as leveduras variam de 1 µg/mL a 16 µg/mL para os análogos sintetizados. Enquanto que para o grupo dos dermatófitos a maior CIM foi de 8 µg/mL. Quanto as espécies de *Fusarium*, a molécula PH264 obteve valores de CIM como 8, 16 e 32 µg/mL, valores esses, muito semelhantes ao controle positivo utilizado: voriconazol. No entanto, esse composto não foi estudado a nível de mecanismo de ação, uma vez que, sua forma acetilada possui baixa estabilidade e degrada-se mais facilmente que os compostos desacetilados. Por isso, preferiu-se dar seguimento aos estudos com o mesmo derivado na sua versão desacetilada. Apesar dessa escolha, tal molécula será considerada para futuros estudos nessa população.

As moléculas com melhores CIM's, em comum para as leveduras e dermatófitos, foram escolhidas para dar seguimento aos testes de mecanismo de ação e toxicidade, sendo elas: PH265 e PH273.

5.3 Ensaio de toxicidade

Os testes de ensaio de toxicidade foram realizados com as moléculas mais promissoras, como descrito anteriormente, PH265 e PH273. É possível observar que ambos compostos apresentaram baixo nível de toxicidade celular em relação ao controle positivo. Sendo que a PH265 manteve as células humanas 100% viáveis quando na concentração de 4 ug/mL. Nas demais concentrações (64, 32, 16 e 8 ug/mL) essa molécula também se mostrou pouco tóxica, mantendo a viabilidade celular muito próxima dos 100%, conforme indicado na Figura 5.

A molécula PH273, também apresentou comportamento muito positivo na concentração mais baixa, mantendo praticamente todas as células viáveis. Com o aumento das contrações, observou-se um declínio da viabilidade celular, porém, nenhuma contração foi tóxica como o controle positivo (figura 5).

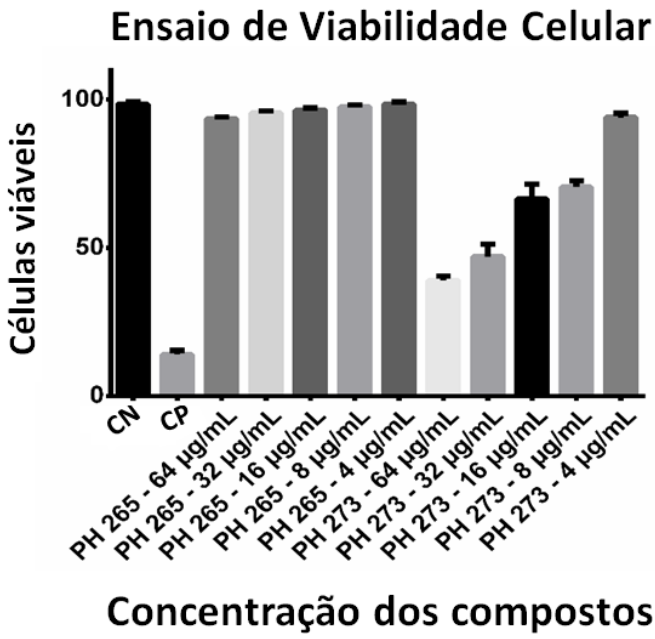


Figura 5. Ensaio de viabilidade celular. CN (controle negativo). CP (controle positivo).

5.4 Mecanismo de ação

5.4.1 Ensaio de efeito de ergosterol

Para o ensaio de complexação com ergosterol exógeno selecionaram-se duas cepas: uma representante do grupo das leveduras (*Candida guilliermondii* CGHCPA) e a outra do grupo dos dermatófitos (*Microsporum canis* MCA01). Ambas moléculas testadas não demonstraram mecanismo de ação por este efeito. Espera-se que compostos que atuam na membrana celular fúngica apresentem CIM's elevadas de acordo com o aumento das concentrações de ergosterol e tal achado não foi observado (Tabelas 4 e Tabela 5).

Complexação com ergosterol exógeno

	PH265 (µg/mL)	PH273 (µg/mL)	Anfotericina B (µg/mL)	Concentração de ergosterol
C. guiliiermondii (CGHCPA)	8,0	16,0	0,5	Sem ergosterol
	4,0	8,0	2,0	50 µg/mL
	2,0	4,0	8,0	100 µg/mL
	2,0	4,0	8,0	150 µg/mL
	4,0	2,0	16,0	200 µg/mL

Tabela 4. Ensaio de ergosterol levedura.

Complexação com ergosterol exógeno

	PH265 (µg/mL)	PH273 (µg/mL)	Anfotericina B (µg/mL)	Concentração de ergosterol
M. canis (MCA01)	1,0	2,0	1,0	Sem ergosterol
	1,0	2,0	4,0	50 µg/mL
	1,0	2,0	8,0	100 µg/mL
	1,0	2,0	8,0	150 µg/mL
	1,0	2,0	16,0	200 µg/mL

Tabela 5. Ensaio de ergosterol dermatófito.

5.4.2 Ensaio de proteção ao sorbitol

Para o ensaio de sorbitol também fez-se uso dos mesmos isolados selecionados para o teste de complexação de ergosterol. É possível que as moléculas sintetizadas atuem por essa via, tendo seu mecanismo de ação agindo na parede celular fúngica. De acordo com os resultados obtidos, tanto para *M. canis* quanto para *C. guilliermondii*, observou-se elevação na CIM na presença de sorbitol. Esse resultado é esperado quando um fármaco tem a parede celular como alvo. Assim como ocorreu com o controle utilizado, anidulafungina, que atua inibindo enzima que sintetiza componentes da parede celular (Tabela 6 e Tabela 7).

Tabela do efeito protetivo de sorbitol

	Sorbitol 0,8 mol/L	PH265 (µg/mL)	PH273 (µg/mL)	Anidulafungina (µg/mL)
C. guilliermondii (CGHCPA)	Presença	16,0	16,0	>1,0
	Ausência	8,0	8,0	0,25

Tabela 6. Ensaio de proteção ao sorbitol levedura.

Tabela do efeito protetivo de sorbitol

	Sorbitol 0,8 mol/L	PH265 (µg/mL)	PH273 (µg/mL)	Anidulafungina (µg/mL)
M. canis (MCA01)	Presença	4,0	4,0	1,0
	Ausência	2,0	2,0	0,0002

Tabela 7. Ensaio de proteção ao sorbitol dermatófito.

5.4.3 *Time-kill assay*

Ambos os compostos testados, PH265 e PH273, apresentaram em algum tempo ação fungicida para as duas cepas escolhidas. No que diz respeito ao tratamento com PH265, para *C. guilliermondii* no tempo 6h, foi possível observar a inibição completa do crescimento fúngico em todas as concentrações testadas, caracterizando um efeito fungicida. Nos demais tempos testados, o composto foi capaz de manter o crescimento das células fúngicas abaixo do inóculo inicial (Figura 6), caracterizando um efeito fungistático. Há exceção nos tempos 24h na concentração CIMx1 e 48h, onde percebe-se crescimento fúngico maior ou igual ao inóculo inicial, porém não atingindo o controle positivo (figura 6).

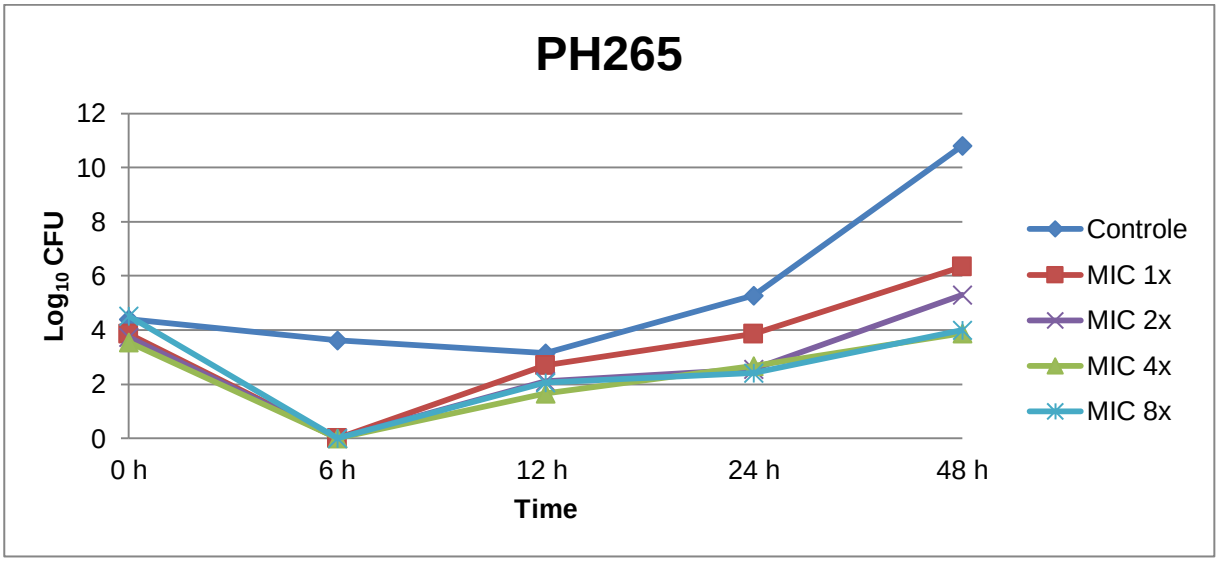


Figura 6. Curvas de tempo de morte para *C. guilliermondii* (PH265).

Quanto o tratamento com PH273 para esta mesma cepa, a ação fungicida

se deu nas concentrações CIMx1 e CIMx4 no tempo 6h. A ação fungistática ocorreu nos tempos 12h e 24h para todas as concentrações, com exceção da CIMx2 no tempo 24h, pois percebe-se crescimento fúngico maior em relação ao inóculo inicial, porém não atingindo o controle positivo (figura 6).

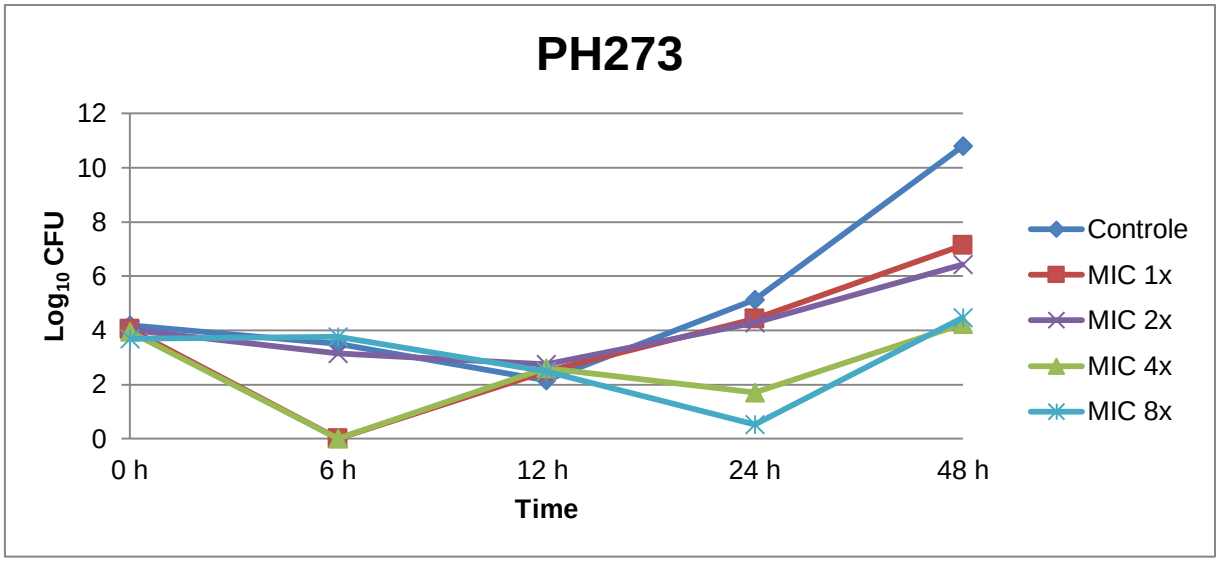


Figura 7. Curvas de tempo de morte para *C. guilliermondii* (PH273).

O composto PH265 demonstrou-se fungicida para a cepa de *M. canis* em todas concentrações nos tempos 96h e 120h. Sua ação fungistática foi verificada apenas nos tempos 12h para CIMx1, CIMx2 e CIMx8; 24 h para CIMx1, CIMx2 e em 48h somente na concentração de CIMx1 (figura 8).

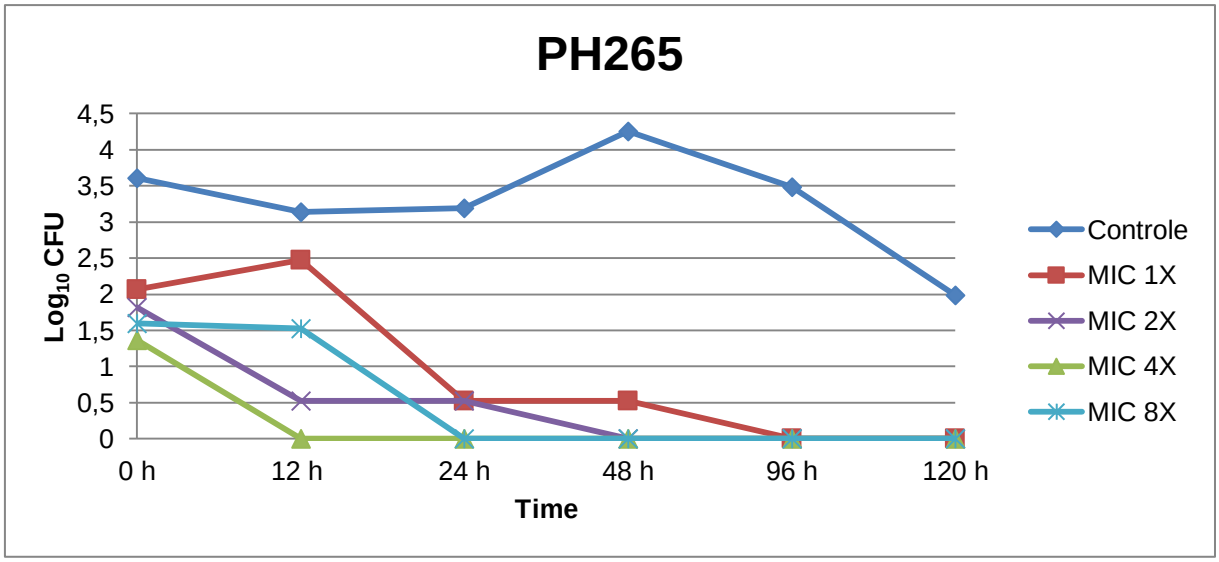


Figura 8. Curva de tempo de morte para *M. canis* (PH265).

Para a cepa de dermatófito (tratamento com PH273), foi observado comportamento fungicida em todas as concentrações no tempo 120h. Essa ação também ocorreu nos tempos 48h (CIMx1 e CIMx2) e 96 h (CIMx2 e CIMx4), porém em diferentes concentrações. Foi caracterizada como ação fungistática os seguintes tempos e concentrações: 12h (CIMx1 e CIMx4), 24h (todas as concentrações), 48h (CIMx4) e 96h (CIMx1). Nas demais concentrações e intervalos de tempo (CIMx2 12h, CIMx8 12h e 96h), percebe-se crescimento fúngico maior em relação ao inóculo inicial, porém não atingindo o controle positivo, conforme ilustrado na figura 9.

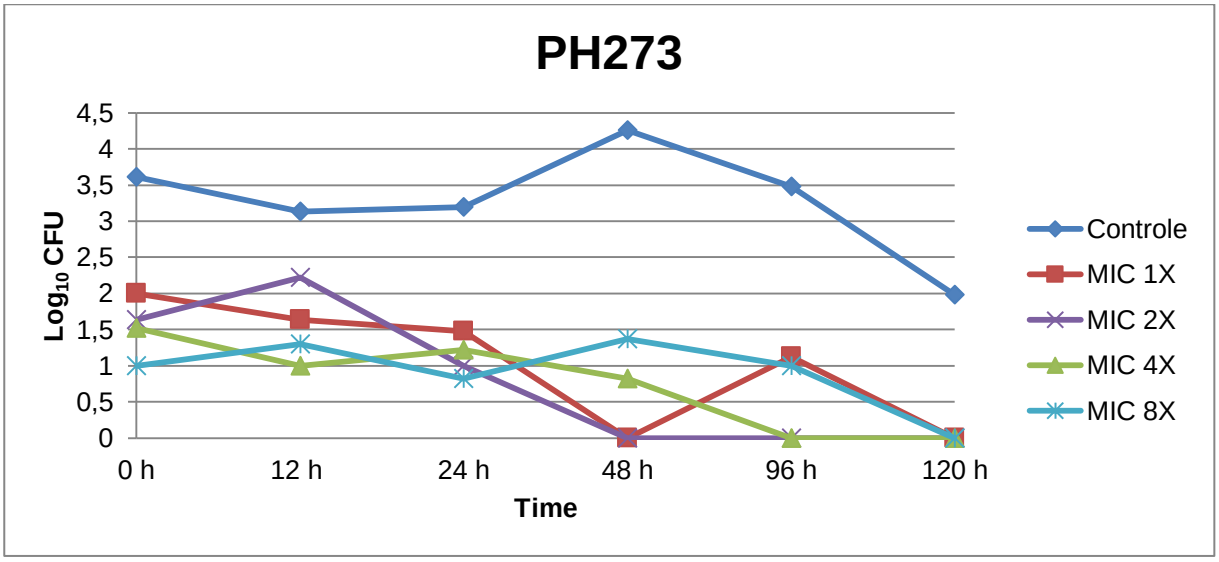


Figura 9. Curva de tempo de morte para *M. canis* (PH273).

5.4.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As imagens obtidas através da MEV foram realizadas a partir de ensaios com uma cepa de *Microsporum canis* MCA01, conforme descrito anteriormente. Foi possível identificar alguns possíveis efeitos das moléculas em relação ao controle positivo. Observa-se nas figuras seguintes (10, 11 e 12) (indicado pelas setas em branco) intensa rugosidade, parede celular irregular com a presença de sulcos, bem como, alteração da sua largura e comprimento, (hifas abreviadas) em relação à imagem do controle positivo.

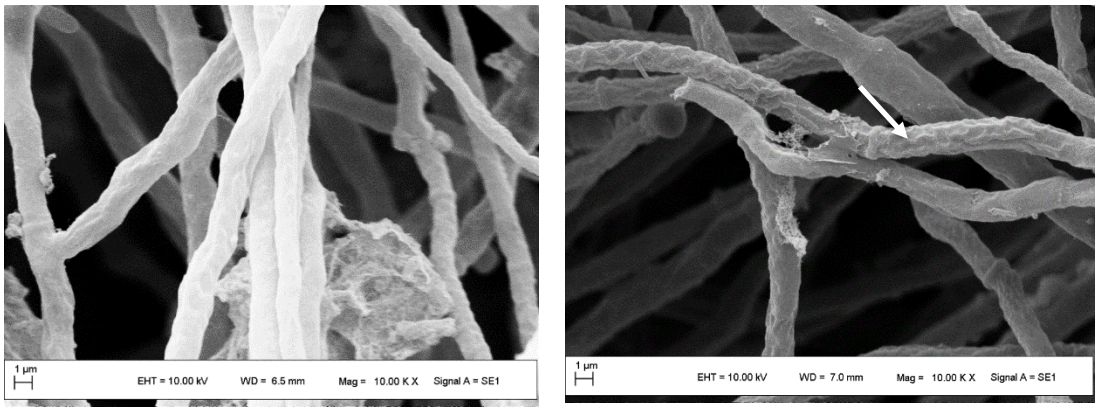


Figura 10. Célula tratada com concentração subinibitória do derivado PH265 (CIM/3) (imagem à direita): presença de intensa rugosidade e sulcos. Controle positivo: imagem à esquerda.

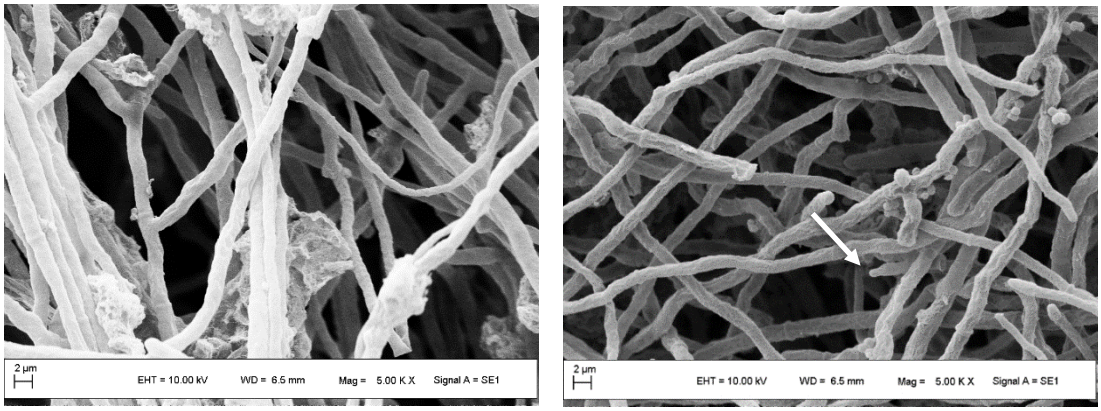


Figura 11. Célula tratada com concentração subinibitória do derivado PH265 (CIM/3) (imagem à direita): presença de hifas abreviadas e alteradas quanto à largura. Controle positivo: imagem à esquerda.

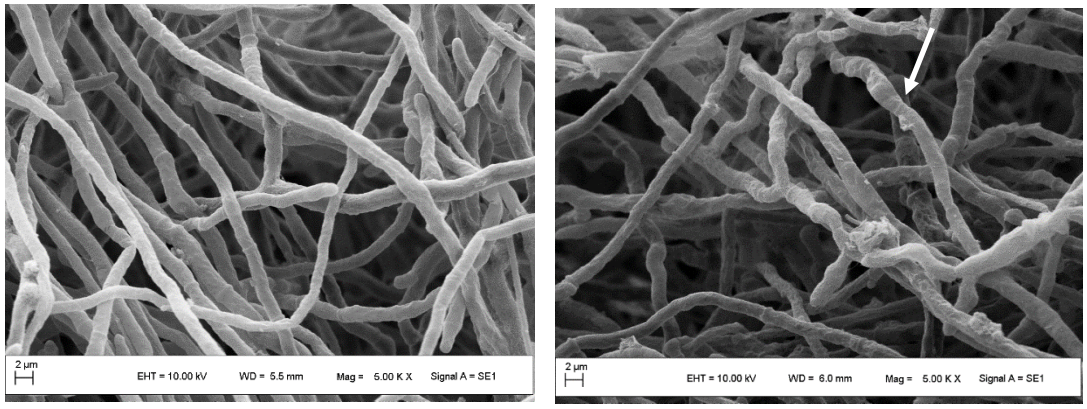


Figura Figura 12. Célula tratada com concentração subinibitória do derivado PH273 (CIM/3) (imagem à direita): presença de hifas irregulares.

Controle positivo: imagem à esquerda.

6. DISCUSSÃO

Os testes de suscetibilidade com os derivados de 8-hidroxiquinolina foram realizados em 7 espécies de leveduras, 4 espécies de dermatófitos e 6 espécies de *Fusarium*. Fluconazol, cetoconazol e voriconazol foram os fármacos controles utilizados para esses ensaios, pois são amplamente utilizados pela clínica no tratamento das infecções geradas por esses fungos e, ainda, por pertencerem a mesma classe de antifúngicos do produto da síntese desenvolvida: azóis (Gupta et al., 2016; Campoy e Adrio, 2017). Em função da classe à qual derivam os compostos sintetizados, clioquinol também foi utilizado como controle. Os resultados revelaram importante ação antifúngica das moléculas PH264, PH265 e PH273, frente as cepas dos três grupos de fungos patogênicos e fitopatogênicos trabalhados (Tabela 1, Tabela 2 e Tabela 3). Diante dos resultados obtidos destaca-se que a atividade antifúngica exercida pelos compostos PH265 e PH273 ocorreu em todas as espécies testadas, com exceção do gênero *Fusarum* sp., o qual foi suscetível ao composto PH264. Esses dados caracterizam um importante achado nesse estudo, pois atendem um dos aspectos da problemática dos antifúngicos atuais: mesmo as espécies mais críticas, de difícil tratamento – seja pela resistência desenvolvida aos fármacos, pela recidiva das infecções ou pelo grave acometimento do sistema imunológico do paciente - demonstraram suscetibilidade a algum dos novos compostos desenvolvidos, os quais apresentaram valores de CIM's iguais ou semelhantes as exibidas pelos fármacos controles.

Dentre os análogos avaliados o composto PH265 caracterizou-se como um protótipo para estudos e desenvolvimento posteriores de derivados triazólicos de 8-hidroxiquinolina. Ambas moléculas, PH265 e PH273, possuem taxas de suscetibilidade muito próximas ou iguais aos fármacos utilizados comercialmente no tratamento das patologias fúngicas. Danielli et al (2018), apresentaram teste de suscetibilidade ao ciclopirox com resultados de 2-4 µg/mL para as mesmas espécies de dermatófitos aqui estudadas. O mesmo foi observado para as leveduras, os dois compostos demonstraram resultados mais positivos, de forma geral, do que o fármaco controle, utilizado de forma comercial para as micoses por esse grupo (Sanglard, 2016).

As moléculas PH265 e PH273 não apresentaram atividade contra *Fusarium*

spp., mas foi observada suscetibilidade deste gênero ao composto PH264, incluindo as espécies fitopatogênicas. Apesar dos altos valores de CIM obtidos, pode-se considerar um resultado significativo, pois o composto apresentou valores similares aos do fármaco utilizado como controle: voriconazol (Tabela 3). A literatura reporta o quanto oneroso e complexo é o manejo das doenças causadas por *Fusarium* spp. aos produtos agrícolas (Wegulo et al., 2015) e, extrapolando-se este panorama, na clínica não é diferente. É sabido que a fusariose é uma doença com difícil tratamento, tanto pela limitada opção terapêutica quanto pela resistência que este patógeno desenvolve aos antifúngicos disponíveis, além de ser uma infecção com alta taxa de mortalidade (Al-Hatmi et al., 2017; Dabas et al., 2016). Sendo assim, os resultados obtidos quanto a PH264 demonstram a necessidade e a importância de seguir estudos com essa população e talvez outros fungos não contemplados neste estudo, já que voriconazol é considerado uma droga de primeira linha para o tratamento de outras infecções causadas por fungos filamentosos (Campoy e Adrio, 2017).

Analisando os resultados obtidos com os produtos sintetizados, podemos entender que o melhor desempenho quanto a atividade antifúngica pode estar relacionado a natureza dos substituintes do anel triazol. Há um indicativo de os que substituintes mais apolares presentes em PH265 e PH273 são mais favoráveis a atividade. Além disso, a presença de grupos na posição 4 do anel benzênico (-CF3, -OCH3) também não favoreceram a atividade antifúngica, apresentando CIM mais elevadas. O efeito da variação da posição dos substituintes não pode ser avaliado, pois todos estão na posição 4 do triazol, 4 do benzeno (quando pertinente) e na posição 5 do anel quinolínico. A molécula PH264 apresentou ótimos resultados quanto a suscetibilidade antifúngica, no entanto, trata-se de derivado acetilado de PH265 que poderia sofrer desacetilação e gerar *in situ* PH265, atuando como um pró-fármaco. Contudo, é curioso que contra cepas de *Fusarium* spp. apenas PH264 foi ativa mostrando que para esta espécie, possivelmente, a atividade é inerente do composto e, certamente, uma avaliação mais detalhada poderá vir a ser realizada para esta cepa. Sendo assim, deu-se seguimento aos testes com as moléculas PH265 e PH273. Cabe ressaltar aqui, que assim como estudos posteriores poderão ser realizados quanto ao composto PH264, avaliações quanto a variação da posição dos substituintes em relação a atividade antifúngica também é uma perspectiva deste estudo.

O mecanismo de ação dos derivados de 8-hidroxiquinolina em células

fúngicas e demais organismos não está bem elucidado. A literatura reporta que derivados dessa molécula são capazes de inibir enzimas relacionadas a replicação de DNA em vírus e a síntese de RNA em leveduras (Auld et al., 1974; Fraser e Creanor, 1974). E ambos efeitos somente ocorrem devido a propriedade de quelar metais que a 8-hidroxiquinolina possui (Oliveri e Vecchio, 2016). Baseado na deficiência de informações acera do assunto, foram realizados dois ensaios buscando esclarecer o mecanismo de ação dos análogos sintetizados: ensaio de proteção ao sorbitol e teste de complexação ao ergosterol.

A parece celular da célula fúngica é essencial para o crescimento e para a viabilidade do fungo em um meio hipotônico, o que faz dela alvo de fármacos antifúngicos. No entanto, havendo um protetor osmótico no ambiente, essa estrutura seria dispensável sobre condições específicas, uma vez que a célula não estaria ameaçada osmoticamente (Frost et al., 1995). De acordo com o exposto e baseado nos resultados obtidos no ensaio de proteção ao sorbitol, é provável que essa estrutura da célula fúngica possa realmente ser o alvo das moléculas sintetizadas, já que após a adição de sorbitol ao meio os valores de CIM aumentaram em comparação ao ensaio sem adição deste protetor osmótico (Tabela 6). Este efeito também foi observado em ensaio realizado por Pippi et al (2019), onde clioquinol e ácidos sulfônicos derivados de 8-hidroxiquinolinas foram avaliados, também apresentando CIM mais elevadas em meio com adição de sorbitol. As células de *M. canis* MCA01, exibiram deformidade na parede celular, e este efeito corrobora com as alterações observadas nas imagens da MEV. Para a realização desta microscopia, foram utilizadas concentrações subinibitória da CIM. Essas sub concentrações de PH265 e PH273 não são ativas para impedir o crescimento fúngico, mas ainda possuem atividade capaz de alterar a morfologia do microrganismo (Escalante et al., 2008). As imagens apresentam intensa rugosidade, sulcos, alteração na largura das hifas, bem como, hifas abreviadas em relação ao controle positivo (figura 5, figura 6 e figura 7).

Ainda sobre o possível modo de ação dos análogos o teste de complexação ao ergosterol foi executado. É sabido que agentes que atuam causando danos na membrana da célula fúngica, fazem deste esterol seu alvo principal. Tal alvo é um componente estrutural da membrana e os fármacos atuantes aqui formam poros levando a alterações na sua permeabilidade, o que culmina na perda de conteúdos intracelulares e consequente ruptura desta membrana. Caso fosse este o mecanismo

de atuação dos análogos, o ergosterol exógeno impossibilitaria a ligação com o ergosterol da célula fúngica, o que elevaria a CIM dos compostos (Escalante et al., 2008). O controle utilizado para este ensaio foi a anfotericina B, pois este agente é reconhecido pelo seu potencial de romper a membrana da célula fúngica através da sua complexação com o ergosterol, permitindo a permeabilidade de íons essenciais para a sobrevivência do fungo (Scorzoni et al., 2017). No entanto, observou-se que as CIM dos derivados sintetizados não aumentaram conforme o esperado, não caracterizando esta via como mecanismo de ação das moléculas em teste.

Além das análises acerca da via a qual as moléculas atuam, os possíveis efeitos fungicidas e fungistáticos dos análogos também foram explorados. De uma forma geral, ambas moléculas apresentaram ação fungicida em algum tempo da curva de morte avaliada. No entanto, houve um comportamento distinto para os grupos testados: pode-se observar que o efeito fungicida na levedura ocorreu nas horas iniciais do ensaio e para o dermatófito esse resultado foi oposto, diminuindo o número de UFC de acordo com os tempos finais da curva. Para *C. guilliermondii*, em 6 horas houve efeito fungicida em todas as concentrações testadas para PH265. Para PH273, este efeito não foi observado nas concentrações CIMx2 e CIMx8, caracterizando um efeito fungistático neste mesmo tempo. Os demais tempos e concentrações apresentaram caráter fungistático para ambos compostos. De acordo com a literatura, é considerada atividade fungistática quando há inibição de crescimento (morte) superior ou igual a 99,9% comparado ao inóculo inicial, e este efeito pode ser observado através do $\log_{10}$ do número de UFC/mL (Pfaller et al., 2004). Dessa forma, cabe reportar que a taxa de crescimento máxima obtida foi de 30% (CIMx8, 48h) e 24% (CIMx1, 24h) no tratamento com PH265 e PH273, respectivamente, para a espécie de *Candida* testada. Apesar de determinados intervalos de tempo e concentrações caracterizados como fungistaticos, obteve-se taxas de crescimento muito baixas: 0,34% (CIMx8, 12h) e 1,27% (CIMx4) no tratamento com PH265; e 1,35% (CIMx2, 6h) e 2,72% (CIMx1, 12h) para PH273. Dados reportados por Pippi et al (2017) ao realizar ensaio de curva de morte com derivados de 8-hidroxiquinolina, apresentou uma taxa de 50% de crescimento em levedura do mesmo gênero na concentração de CIMx8 com tratamento com clioquinol, evidenciando que o derivado aqui colocado em prova desempenhou melhor efeito.

Referente ao mesmo ensaio, para a cepa de dermatófito, foram observados

os seguintes números quanto ao crescimento fúngico mínimo obtido para PH265 e PH273, respectivamente: 2,85% (CIMx1, 24h e 48h) e 13,30% (CIMx1, 96h). A taxa de crescimento máxima obtido para esses tratamentos para o dermatófito foi maior ou igual do que para a levedura (82,50% - PH265; 30% - PH273). No entanto, neste ensaio obtiveram-se mais tempos e concentrações fungicidas: todas as concentrações testadas apresentaram esta ação em 120h para ambos compostos. No tratamento com PH265 esse resultado também foi observado nos intervalos de 48h e 96h (todas as concentrações); e para PH273 em 48h (CIMx2) e 96h (CIMx2 e CIMx4). O ensaio foi avaliado até 120h, pois este é o tempo de incubação considerado nos testes de suscetibilidade.

Contudo, pode-se afirmar que os resultados obtidos neste trabalho, desde a caracterização de uma rota sintética para os novos análogos de 8-hidroxiquinolina até os ensaios microbiológicos com diferentes gêneros fúngicos, foram estimulantes e promissores. A maioria dos microrganismos relatados aqui apresentam algum tipo de resistência aos antifúngicos existentes no mercado ou são de difícil tratamento (adesão do paciente e recidivas) e os compostos prospectados mais promissores demonstraram ser ativos perante praticamente todas as cepas avaliadas. Certamente ficam abertas perspectivas de sucesso ao dar continuidade ao trabalho já desenvolvido.

7. CONCLUSÃO

Dos objetivos propostos para esse estudo todos foram atingidos:

- Uma rota de síntese de novos análogos foi estabelecida dando origem a 10 produtos inéditos quanto ao teste de suscetibilidade antifúngica. Três dos derivados prospectados apresentaram melhor desempenho quanto a atividade antifúngica: PH264, PH265 e PH273. Com base nos ótimos resultados obtidos percebe-se o quanto promissor foi este estudo, uma vez que as moléculas sintetizadas foram ativas para fungos patogênicos e fitopatogênicos, os quais expressam resistência frente aos fármacos utilizados atualmente.
- O perfil de suscetibilidade nos permitiu identificar duas moléculas como as mais promissoras neste quesito: PH265 e PH273.
- A avaliação de citotoxicidade dos compostos verificou PH265 como uma molécula que permite praticamente 100% de viabilidade celular em todas as concentrações testadas, o que faz dessa molécula um importante protótipo para futuros estudos mais aprofundados. A molécula PH273 também apresentou bons resultados quanto as concentrações mais baixas. E mesmo em sua concentração mais alta demonstrou melhor viabilidade celular comparada ao controle positivo.
- Foi possível identificar que o provável mecanismo de ação dessas moléculas atue a nível de parede celular, uma vez que os resultados foram positivos quanto ao teste de sorbitol e negativos no que diz respeito a complexação ao ergosterol.
- O ensaio de curva de morte nos possibilitou interpretar o efeito dos compostos como fungistático na maioria do tempos e concentrações analisados para ambas as cepas. No entanto, percebemos sua ação fungicida no tempo 6h para *C. guilliermondii* em todas as concentrações com tratamento de PH265; para PH273 esse efeito foi percebido apenas nas concentrações CIMx1 e CIMx4 neste mesmo tempo. Nas demais concentrações e intervalos de tempo, para os dois compostos obteve-se atividade fungistática.
- Para *M. canis*, ambas moléculas foram fungicidas no tempo 120h, sendo também em 96h para a molécula PH273 em todas as concentrações utilizadas no ensaio e em 48h na CIMx1 e CIMx2. As demais concentrações utilizadas e intervalos

de tempo em ambos tratamentos foram caracterizados como ação fungistática.

- Quanto as perspectivas deste trabalho, cabe destacar a necessidade de otimizar a estrutura de algumas moléculas, como PH265, que apresentou ótimos resultados em relação a todos os testes propostos, mas que apresenta dificuldades quanto a sua solubilidade. A molécula PH264 também necessita de estudos posteriores, uma vez que apresentou interessante atividade contra cepas de *Fusarium* spp., mas que neste trabalho não pode ser contemplada por motivos expostos anteriormente.

8. REFERÊNCIAS

Al-Hatmi AMS, Curfs-Breuker I, Hoog GS, Meis JF, Verweij PE. 2017. Antifungal susceptibility testing of *Fusarium*: a pratical approach. Journal of Fungi. 3, 19.

Antonissen G, Martel A, Pasmans F, Ducatelle R, Verbrugghe E, Vandenbroucke V, Li S, Haesebrouck F, Van Immerseel F, Croubels S. 2014. The Impact of *Fusarium* Mycotoxins on Human and Animal Host Susceptibility to Infectious Diseases. Toxins. 6. 430-452.

Auld SD, Kawaguchi MD, Livingston MD, Vallee LB. 1974. RNA-Dependent DNA Polymerase (Reverse Transcriptase) from Avian Myeloblastosis Virus: A Zinc Metalloenzyme. Vol. 71. No. 5. 2091-2095.

Bartolomé J, Lozano MA, Lucena R, Candel FJ. 2017. Celulitis peristomal por *Magnusiomyces capitatus* em uma paciente portadora de gastrostomá percutânea. Revista Española de quimioterapia. Vol. 30(1). 59-61.

Becher R, Hettwer U, Karlovsky P, Deising HB, Wirsel SG. 2010. Adaptatium of *Fusarium graminearum* to tebuconazole yielded descendants diverging for levels of fitness, fungicide resistence, virulence, and mycotoxin production. Phytophatology. v. 100, n. 5, p. 444-453.

Bonifaz A, Vázquez-González D, Macías B, Paredes-Farrera F, Hernández MA, Araiza J, Ponce RM. 2010. Oral geotrichosis: report of 12 cases. Journal of Oral Science. Vol. 52. No. 3. 477-483.

Brunetti G, Visconti V, Ghezzi MC, Mantovani S, Ferretti G, Raponi G. 2016. Management and treatment of *Magnusiomyces capitatus* (*Geotrichum capitatum*) pleural infection in a non-neutropenic patient with posaconazole. A new therapeutic opportunity? New Microbiology. 307-309.

Buchta V, Feuermannová A, Váša M, Bašková L, Kutová R, Kubátová A, Vejsová M. 2014. Outbreak of fungal endophthalmitis due to *Fusarium oxysporum* following cataract surgery. Mycopathology. 177: 115-121.

Burow ME, Weldon CB, Tang Y, Navar GL, Krajewski S, Reed JC, Hammond TG, Clejan S, Beckman BS. 1998. Differences in susceptibility to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants. Cancer Res. 58(21):4940-6.

Campoy S, Adrio JL. 2017. Antifungals. Biochemical Pharmacology. 133. 86-96.

Cherdtrakulkiat R, Boonpangrak S, Sinthupoom N, Prachayasittikul S, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. 2016. Derivatives (halogen, nitro and amino) of 8-hydroxyquinoline with highly potent antimicrobial and antioxidant activities. Biochemistry and Biophysics Reports. Vol. 6. 135–141.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition. CLSI Document M27-A3. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard – Second Edition. CLSI Document M38-A2. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.

Colombo LA, Padovan BCA, Chaves MG. 2011. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and Trichosporonosis. Clinical Micrbiology Reviews. Vol. 24. 682-700.

Cordeiro AR, Serpa R, Alexandre CFU, Marques FJF, Melo CVS, Franco JS,

Evangelista AJJ, Camargo ZP, Brilhante RSN, Rocha MFG, Moreira JLB, Bandeira TJPG, Sidrim JJC. 2015. *Trichosporon inkin* biofilms produce extracelular proteases and exhibit resistence to antifungals. Journal of Medical Microbiology. Vol. 64. 1277-1286.

Corzo-León ED, Satlin MJ, Soave R, Shore TB, Schuetz AN, Jacobs SE, Walsh TJ. 2015. Epidemiology and outcomes of invasive fungal infections in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipientes in the era of antifungal prophylaxis: a single-centre study with focus on emerging pathogens. Mycoses. Vol. 58. 325-336.

D'Angelo DL, Bradley CA, Ames KA. Willyerd KT, Madden LV, Paul PA. 2014. Effect of Fungicide Applications During and After Anthesis Agaisnt *Fusarium* Head Blight and Deoxynivalenol in Soft Red Winter Wheat. Plant Disease. Vol. 98. No. 10. 1387-1397.

Dabas Y, Bakhshi S, Xess I. 2016. Fatal cases of bloodstream infection by *Fusarium solani* and review of published literature. Mycopathologia Vol. 181. No. 3–4. 291–96.

Danielli LJ, Pippi B, Duarte JÁ, Maciel AJ, Lopes W, Machado MM, Oliveira LFS, Vainstein MH, Teixeira ML, Bordignon SAL, Fuentefria AM, Apel, MA. 2018. Antifungal mechanism of action of *Schinus lentiscifolius* Marchand essencial oil and its synergistic effect in vitro with terbinafine and ciclopirox against dermathophytes. Journal of Pharmacy and Pharmcology. 70. 1216-1227.

Debourgogne A, Dorin J, Machouart M. 2016. Emerging Infections Due to Filamentous Fungi in Humans and Animals: Only the Tip of the Iceberg?. Environmental Microbiology Reports. Vol. 8, n. 3. p. 332–42.

Denning DW, Hope WW. 2010. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. Trends in Microbiology. Vol.18. No. 5.

Deorukhkar SC, Saini S, Mathew S. 2014. Non-albicans *Candida* Infection: An Emerging Threat. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases. Article ID 615958, 7 páginas.

Douglas AP, Chen SCA, Sçavin MA. 2016. Emerging infections caused by non-*Aspergillus* filamentous fungi. Clinical Microbiology and Infection. 22. 670-680.

El-Megharbel SM, Refat MS. 2015. Ligational behavior of clioquinol antifungal drug towards Ag(I), Hg(II), Cr(III) and Fe(III) metal ions: Synthesis, spectroscopic, thermal, morphological and antimicrobial studies. Journal of Molecular Structure. Vol. 1085. 222–234.

Escalante A, Gattuso M, Pérez P, Zacchino S. 2008. Evidencefot the Mechanism og action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. J. Nat. Prod. 71, 1720-1725.

Etienne A, Datry A, Gaspar N, Morel V, Delabesse E, Lmimouni B, Vernant JP, Dhédin N. 2008. Successful treatment of disseminated *Geotrichum capitatum* infection with a combination of caspofungin and voriconazol in an immunocompromised patient. Mycoses. Vol. 51. 270-272.

Ezabadi IR, Camoutsis C, Zoumpoulakis P, Geronikaki A, Soković M, Glamočilija J, Ćirić A. 2008. Sulfonamide-1,2,4-triazole derivatives as antifungal and antibacterial agents: synthesis, biological evaluation, lipophilicity, and conformational studies. Bioorganic & Medicinal Chemistry 16, 1150-1161.

Finkelstein DI, Hare DJ, Billings JL, Sedjahtera A, Nurjono M, Arthofer E, George S, Culvenor JG, Bush AI, Adlard PA. 2015. Clioquinol improves cognitive, motor function, and microanatomy of the alpha-synuclein HA53T transgenic mice. ACS

Chemical Neuroscience. Vol. 7. No. 1. 119–129.
Fleming RV, Walsh TJ, Anaissie EJ. 2002. Emerging and less common fungal pathogens. Infect Dis Clin N Am. 16. 915-933.
Flevari A, Theodorakopoulou M, Velegraki A, Armaganidis A, Dimopoulos G. 2013. Treatment of invasive candidiasis in the elderly: a review. Clinical Interventions in Aging. 8. 1199–1208
Franklin RB, Zou J, Zheng Y, Naslund MJ, Costello LC. 2016. Zinc ionophoro (Clioquinol) inhibition of human ZIP1-Deficient prostate tumor growth in the mouse ectopic xenograft model: a zinc approach for the efficacious treatment of prostate cancer. Int J Cancer Clin Res. 3(1).
Fraser RSS, Creanor J. 1974. Rapid and Selective Inhibition of RNA Synthesis in Yeast by 8-Hydroxyquinoline. Eur. J. Biochem. 46. 67-73.
Freitas LBO, Borgati TF, Freitas RP, Ruiz ALTG, Marchetti GM, Carvalho JE, Cunha EFF, Ramalho TC, Alves RB. 2014. Synthesis and antiproliferative activity of 8-hydroxyquinoline derivatives containing a 1,2,3-triazole moiety. European Journal of Medicinal Chemistry. Vol. 84. 595–604.
Frost DJ, Brandt KD, Cugier D, Goldman R. 1995. The Journal of Antibiotics. Vol 48. No 4. 306-310.
Fuentefria AM, Pippi B, Dalla Lana DF, Donato KK, Andrade SF. Antifungals discovery : an insight into new strategies to combat antifungal resistance. 2017. Letters in Applied Microbiology. 66. 2-13.
Garcia RR, Min Z, Narasimhan S, Bhanot N. 2014. *Fuasarium* brain abscess: case report and litrrature review. Mycoses. 58. 22-26.
García-Ruiz JC, Olazábal I, Pedroso RMA, López-Soriac L, Velasco-Benito V, Sánchez-Aparicio JA, Navajas A, Montejo M, Moragues MD. 2015. Disseminated fusariosis and hematologic malignancies, a still devastating association. Report of three new cases. 32(3):190–196.
Ghannoum M, Isham N, Verma A, Fleischer Jr A, Hardas B. 2013. In vitro antifungal activity of naftifine Hydrochloride against dermatophytes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol. 57. No. 9. 4369-4372.
Graeff DL, Seidel D, Vehreschild MJ, Hamprecht A, Kindo A, Racil Z, Demeter J, De Hoog S, Aurbach U, Ziegler M, Wisplinghoff H, Cornely OA. 2017. Invasive infections due to *Saprochaete* and *Geotrichum* species: report of 23 cases from the FungiScope Registry. Mycoses. Vol. 60. 273-279.
González-Vera JA, Lucović E, Imperiali B. 2009. Synthesis of Red-Shifted 8-Hydroxyquinoline Derivatives Using Click Chemistry and Their Incorporation into Phosphorylation Chemosensors. J Org. Chem. 74, 7309-7314.
Gupta KA, Foley AK, Versteeg GS. 2016. New antifungal agents and new formulations agaisnt dermathophytes. Mycopathologia.
Hartmann GL, Chang XN, Leandro LF. 2015. Research advances and management of soy bean sudden death syndrome. Crop Protection. 73. 60-65.
Hinrichsen SL, Falcão É, Vilella TAS, Rêgo L, Lira C, Almeida L, Martins M, Araújo C, Duarte M, Lopes G. 2009. *Candida* isolates in tertiary hospitald in Northeastern Brazil. Brazilian Journal of Microbiology. 40:325-328.
Huntington Study Group Reach2HD Investigators. 2015. Safety, tolerability, and efficacy of PBT2 in Huntington's disease: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet Neural. 14. 39-47.
Ilkit M, Durdu M. 2014. Tinea pedis: the etiology and global epidemiology of a common fungal infection. 41(3): 374-388.

Ikuta K, Torimoto Y, Yamamoto M, Okamura N, Hosoki T, Sato K, Fujiya M, Kohgo Y. 2010. Successful Treatment os Systemic *Geotrichum* capitatum Infection by Liposomal Amphotericin-B, Itraconazole, amd Voriconazole in a Japanese Man. The Japanese Society of Internal Medicine. Vol. 49. 2499-2503.

Jiménez-Díaz RM, Castillo P, Jimenez-Gasco MDM, Landa BB, Navas-Cortes JA. 2015. *Fusarium* wilt of chickpeas: Biology, ecology and management. Crop Protection. Vol. 73. 16-27.

Jiménez-Guerra G, Gutiérrez-Soto B, Navarro-Marí JM, Gutiérrez-Fernández J. 2015. Isolation of *Magnusiomyces capitatus* in a clinical sample of urine. 419-421.

Joaquim AR, Pippi B, Cesare MA, Rocha DA, Boff RT, Staudt KJ, Ruaro TC, Zimmer AR, Araújo BV. Silveira GP, Martins AF, Teixeira ML, Santos FP, Fuentefria AM, Andrade SF. 2018. Rapid tools to gain insights into the interaction dynamics of new 8-hidroxyquinolines with few fungal lines. Chem Biol Drug Des. 00:1-11.

Júnior ANJ, Hennequin C. 2016. Invasive Trichosporon infection: a systematic review on a re-emerging fungal pathogen. Frontiers in Microbiology. v. 7.

Júnior IFS, Raimondi M, Zacchino S, Filho VC, Noldin VF, Rao VS, Lima JCS, Martins DTO. 2010. Evaluation of the antifungal activity and mode of action of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, stem-bark extraxts, fractions and ellagic acid. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 20(3): 422-428.

Khusnutdinov RI, Bayguzina AR, Dzhemilev UM. 2014. Metal complex catalysis in the synthesis of quinolines. Journal of Organometallic Chemistry. Vol. 768. 75–114.

Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA. 1998. Influence of Test Conditions on Antifungal Time-Kill Curve Results: Proposal for Standardized Methods. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1207–1212.

Koike ST, Gordon TR. 2015. Management of Fusarium wilt of strawberry. Crop Protection. Vol. 73. 67-72.

Kuhnem Júnior, PR, Stumpf R, Spolti P, Del Ponte EM. 2013. Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. Ciência Rural. v. 43, n. 4, p. 583-588.

Kumar A, Udayakumaran S, Babu R, Rajamma BM, Prakash A, Panikar D, Karim S, Chowdhary A. 2015. Trichosporon asahii infection presenting as chronic meningoventriculitis and intra ventricular fungal ball: a case report and literature review. Mycoses. Vol. 58. 99-103.

Krysan DJ. 2014. Toward improved anti-cryptococcal drugs: novel molecules and repurposed drugs. Fungal Genet Biol.14. 00216-3.

Lafayette TCS, Oliveira LTO; Landell M; Valente P; Alves SH; Pereira WV. 2011. *Dipodascus capitatus* (*Geotrichum capitatum*): infecção sistêmica fatal em paciente com leucemia mielocítica aguda. Revista da sociedade brasileira de Medicina Tropical. 44(5):648-650.

Lam KH, Gambari R, Lee, KKH, Chem YX, Kok SHL, Wong RSM, Lau FY, Cheng CH, Wong WY, Bian ZX, Chan ASC, Tang JCO, Chui CH. 2014. Preparation of 8-hydroxyquinoline derivatives as potential antibiotics against *Staphylococcus aureus*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. Vol. 24. No. 1. 367–370.

Liao Y, Lu X, Yang S, Luo Y, Chen Q, Yang R. 2015. Epidemiology and outcome of *Trichosporon* fungemia: a review of 185 reported cases from 1975 a 2014. Open Forum Infectious Diseases.

Lü S, Zheng W, Ji L, Luo Q, Hao X, Li X, Wang F. 2013. Synthesis, characterization, screening and docking analysis of 4-anilinoquinazoline derivatives as tyrosine

kinase inhibitors European Journal of Medicinal Chemistry. 61. 84-94.
Mao X, Schimmer AD. 2008. The toxicology of Clioquinol. Toxicology Letters. Vol. 182. No. 1–3. 1–6.
Marburguer DA, Venkateshwaran M, Conley SP, esker PD, Lauer JG, Ané JM. 2014. Crop rotation and management effect on *Fusarium* spp. Populations. Crop Science. Vol. 55. 1-12.
Martínez E, Ameen M, Tejada D, Arenas R. 2014. Microsporum spp. onychomycosis: disease presentation, risk factors and treatment response in na urban population. 18(2): 181-186.
Mattede SGM, Piras C, Mattede KDS, Ferrari AT, Baldotto LS, MSZ Assbu. 2015. Urinary tract infections due to *Trichosporon* spp. in severely ill patients in na intensive care unit. Revista Brasileira de Terapia Intensiva. Vol. 27(3). 247-251.
Mazumder UK, Gupta M, Bhattacharya S, Karki SS, Rathinasamy S, Thangavel S. 2008. Antineoplastic and Antibacterial Activity of some Mononuclear Ru(II) Complexes. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 19:2, 185-192.
McGorvern RJ. 2015. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. Crop Protection. 73. 78-92.
Medeiros AW, Pereira RI, Oliveira DV, Martins PD, d'Azevedo PA, Van der Sand S, Frazzon J, Frazzon AP. 2014. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. Braz J Microbiol. 45(1):327-32.
Miguel-Martínez I, Pintos-Fonseca AM, Rosario-Quintana C, Ojeda-Vargas M. 2011. Infección sistémica em paciente inmunodeprimido. Enfermedades Indecciosas y Microbiología Clínica. 29(7): 545-546.
Moretti ML, Trabasso P, Lyra L, Fagnani R, Resende MR, Cardoso LGO, Chreiber AZ. 2013. Is the incidence of candidemia caused by Candida glabrata increasing in Brazil? Five-year surveillance of Candida bloodstream infection in a university reference hospital in southeast Brazil. Medical Mycology. 51. 225–230.
Nakae K, Yamamoto S. 1973. Relation between subacute myelo-optic neuropathy (S.M.O.N) and clioquinol: national survey. The Lancet. Vol. 299. No. 7741.
Niehaus EM, Kim HK, Münsterkötter M, Janevska S, Arndt B, Kalinina SA, Houterman PM, Ahn P, Alberti I, Tonti S, Kim DW, Sieber CMK, Humpf HU, Yun SH, Idener UG, Tudzynski B. 2017. Comparative genomics of geographically distant *Fusarium fujikuroi* isolates revealed two distinct pathotypes correlating with secondary metabolite profiles. PLOS Pathogens. 13 (10): e1006670.
O'Donnell K, Ward TJ, Robert VARG, Crous PW, Geiser DM, Kang S. 2015. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: current status and future direction. Phytoparasitica. Vol. 43. 583-595.
Oliver V, Vecchio G. 2016. 8-Hydroxyquinolines in medicinal chemistry:a structural perspective. European Journal of Medicinal Chemistry. Vol. 120. 252–274.
Özkaya-Parlakey A, Cengiz AB, Karadağ-Öncel E, Kuşkonmaz B, Sarıbaş Z, Kara A, Oğuz B. 2012. *Geotrichum capitatum* septicemia in a hematological malignancy patient with positive galactomannam antigen: case report and review of the literature. The Turkish Journal of Pediatrics. Vol. 54. 674-678.
Paredes K, Pastor FJ, Capilla J, Sutton DA, E Mayayo, Forthergill AW, Guarro J. 2015. Therapies against murine Candida guilliermondii infection, relationship between in vitro antifungal pharmacodynamics and outcome. Rev Iberoam Micol. 32(1):34–39.

Pfaller MA, Sheehan DJ, Rex JH. 2004. Determination of Fungicidal Activities against Yeasts and Molds: Lessons Learned from Bactericidal Testing and the Need for Standardization. Clin Microbiol Rev.17(2): 268–280.

Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, Horn DL, Reboli AC, Rotstein C, Franks B, Azie NE. 2014. Epidemiology and Outcomes of Invasive Candidiasis Due to Non-albicans Species of Candida in 2,496 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) Registry 2004–2008. Plos one. Vol. 9. e101510.

Pippi B, Reginatto P, Machado MRG, Bergamo ZV, Dalla Lana FD, Teixeira LM, Franco LL, Alves JR, Andrade FS, Fuentefria MA. 2017. Evaluation of 8-hidroxyquinoline derivatives as hits for antifungal drug design. Medical Mycology. 00, 1-11.

Pippi B, Lopes W, Reginatto P, silva KEF, Joaquim RA, Alves JR, Silveira PG, Vainstein HM, Andrade FS, Fuentefria MA. 2019. New insights into the mechanism of antifungal action of 8-hidroxyquinolines. Saudi Pharmaceutical Journal. 41-48.

Pires CAA, Lobato AM, Carneiro FRO, Cruz NFS, Souza PO, Mendes AMD. 2014. Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. An Bras Dermatol. 89(2): 259-264.

Ploetz RC. 2015. Management of *Fusarium* wilt of banana: A review with special reference to tropical race 4. Crop Protection. 73. 7-15.

Prachayasittikul V, Prachayasittikul S, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. 2013. 8-Hydroxyquinolines: a review of their metal chelating properties and medicinal applications. Drug Design, Development and Therapy. Vol. 7. 1157–1178.

Prakash PY, Seetaramaiah VK, Thomas J, Khanna V, Sugandhi PR. 2012. Renal fungal benzoar owing to *Geotrichum candidum*. Medical Mycology Case Reports. Vol. 1. 63-65.

Pushie MJ, Nienaber KH, Summers KL, Cotelesage JJH, Ponomarenko O, Nichol HK, Pickerinhg IJ, George GN. 2014. The solution structure of the copper clioquinol complex. Journal of Inorganic Biochemistry. Vol. 133. 50–56.

Rastoji V, Honnavar P, Rudramurthy SM, Pamidi U, Ghosh A, Chakrabarti A. 2016. Molecular characterization and antifungal susceptibility of clinical Trichosporon isolates in India. Mycoses. 59. 528-534.

Rosa PD, Ramirez-Castrillon M, Valente P, Fuentefria AM, Van Diepeningen AD, Goldani LZ. 2018. *Fusarium riograndense* spp.nov,. a new species in the *Fusarium solani* complex causing fungal rhinosinusitis. Journal of Mycologie Médicale. 28. 29-35.

Saghrouni F, Abdeljelil JB, Youssef YB, Abdeljelil NB, Gheith S, Fathallah A, Said MB. 2012. *Geotrichum capitatum* septicemia in patients with acute myeloide leukemia, report of three cases. Medical Mycology Case Reports. Vol. 1. 88-90.

Sanglard D. 2016. Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. Front. Med. 3:11.

Santos C, Lima N, Sampaio P, Pais C. 2011. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight intact cell mass spectrometry to detect emerging pathogenic Candida species. Diagnostic Microbiology and Infectious disease. 71. 304-308.

Scorzoni L, Silva ACAP, Marcos CM, Assato PA, Melo WCMA, Oliveira HC, Costa-Orlandi CB, Mendes-Giannini MJS, Fusco-Almeida AM. 2017. Antifungal therapy: new advances in the undertanding and treatmet of mycosis. Front. Microbiol. 8:36.

Segal E, Frenkel M. Dermatophyte Infections in Environmental Contexts.Research in Microbiologoy. Vol. 166. No. 7. 564–569. 0

Selby G. 1972. Subacute myelo-optic neuropathy in Australia. The Lancet. Vol. 299. No. 7742. 123–125.

Silva OS, Grunewald J. 1999. Contribution to the sand fly fauna (Diptera: Phlebotominae) of Rio Grande do Sul, Brazil and *Leishmania (Viannia)* infections. Mem Inst Oswaldo Cruz. 94(5):579-82.

Silva-Rocha WP, Azevedo MF, Chaves GM. 2016.pidemiology and fungal species distrobuition of superficial mycoses in Northeast Brazil. Journal De Mycologie Médicale.

Song Y, Xu H, Chen W, Zhan P, Liu X. 2015. 8-Hydroxyquinoline: a privileged structure with a broad-ranging pharmacological potential. MedChemComm. Vol. 6. 61–74.

Supram SH, Gokhale S, Chakrabarti A, Rudramurthy SM, Gupta S, Honnavar P. 2016. Emergence of *Magnusiomyces capitatus* infection in Western Nepal. Medical Mycology. Vol. 54. 103-110.

Stumpf R, Santos J, Gomes LB, Silva CN, Tessmann DJ, Ferreira FD, Machinski Junior M, Del Ponte EM. 2013. *Fusarium* species and fumonisins associated with maize kernels produced in Rio Grande do Sul State for the 2008/09 and 2009/10 growing seasons. Brazilian Journal of Microbiology. 44, 1, 89-95.

Trabelsi H, Néji S, Gargouri L, Sellami H, Guidara R, Cheikhrouhou F, Bellaaj H, Makni F, Elloumi M, Ayadi A. 2015. *Geotrichum capitatum* septicemia: case report and review of the literature. Mycophatologia. 465-469.

Treviño M, García-Riestra C, Areses P, García X, Navarro D, Suárez FJ, López-Dequidt IA, Zaragoza O, Cuenca-Estrella M. 2014. Emerging *Trichosporon asahii* in elderly patients: epidemiological and molecular analysis by the DiversiLab system. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious diseases. Vol. 33. 1497-1503.

Tseng TY, Chen CH, Ho CM, Lin PC, Chou CH, Tsai CT, Wang JH, Chi CY, Ho MW. 2018. Clinical features, antifungal susceptibility, and outcome of Candida guilliermondii fungemia: An experience in a tertiary hospital in mid-Taiwan. Journal og Microbiology, Immunology and Infection. 51. 552-558.

Vaux S, Criscuolo A, Desnos-Ollivier M, Diancourt L, Tarnaud C, Vandenbogaert M, Brisse S, Coignard B, Dromer F, The *Geotrichum* Investigation Group. 2014. Multicenter outbreak of infections by *Saprochaete clavata*, an unrecognized opportunistic fungal pathogen. Vol. 5. e02309-14.

Wegulo SN, Baenziger PS, Nopsa JH, Bockus WW, Hallen-Adams H. 2015. Management of *Fusarium* head blight of wheat and barley. Crop Protection. 73. 100-107.

Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. 2017. Azole Antifungal Resistance in Candida albicans and Emerging Non-albicans Candida Species. Frontiers in Microbiology. 7:2173.

Xiao M, Fan X, Chen SCA, Wang H, Sun ZY, Liao K, Chen SL, Yan Y, Kang M, Hu ZD, Chu YZ, Hu TS, Ni YX, Zou GL, Kong F, Xu YC. 2015. Antifungal susceptibilities of *Candida glabrata* species complex, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* species complex and *Candida tropicalis* causing invasive candidiasis in China: 3 year national surveillance. J Antimicrob Chemother. 70: 802–810.

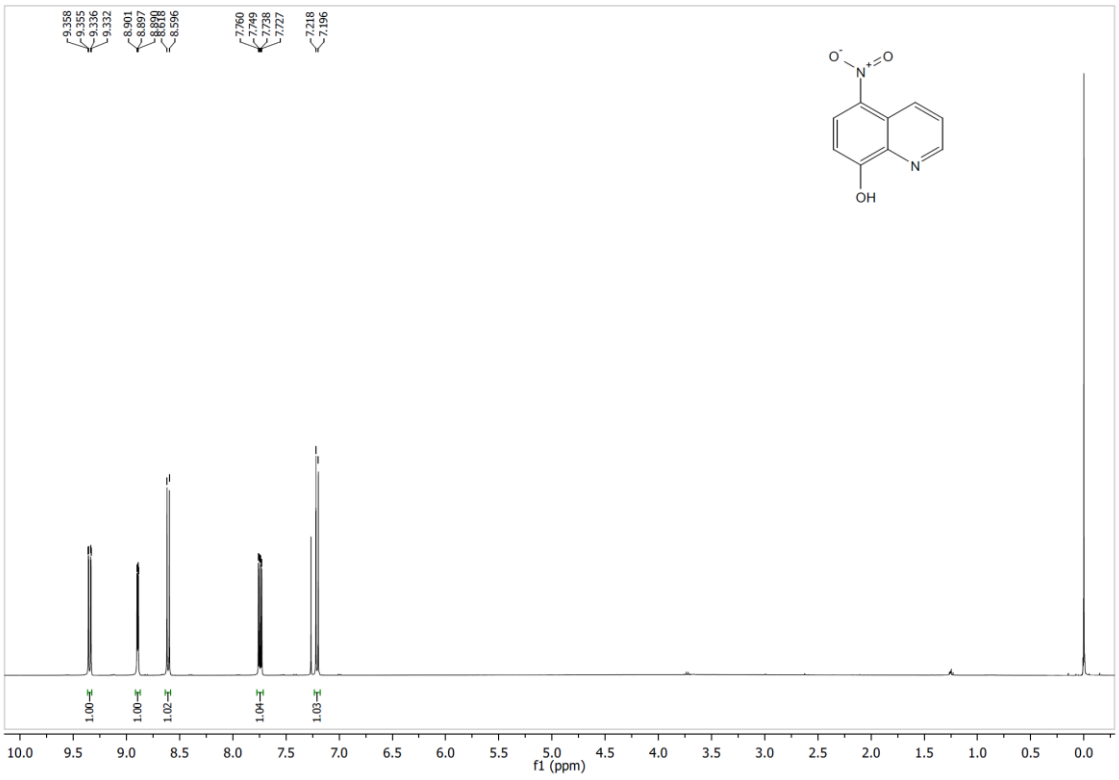
Yaakov DB, Shadkchan Y, Albert N, Kontoyiannis DP, Osherov N. 2017. The Quinoline Bromoquinol Exhibits Broad-Spectrum Antifungal Activity and Induces Oxidative Stress and Apoptosis in Aspergillus Fumigatus. Journal of Antimicrobial

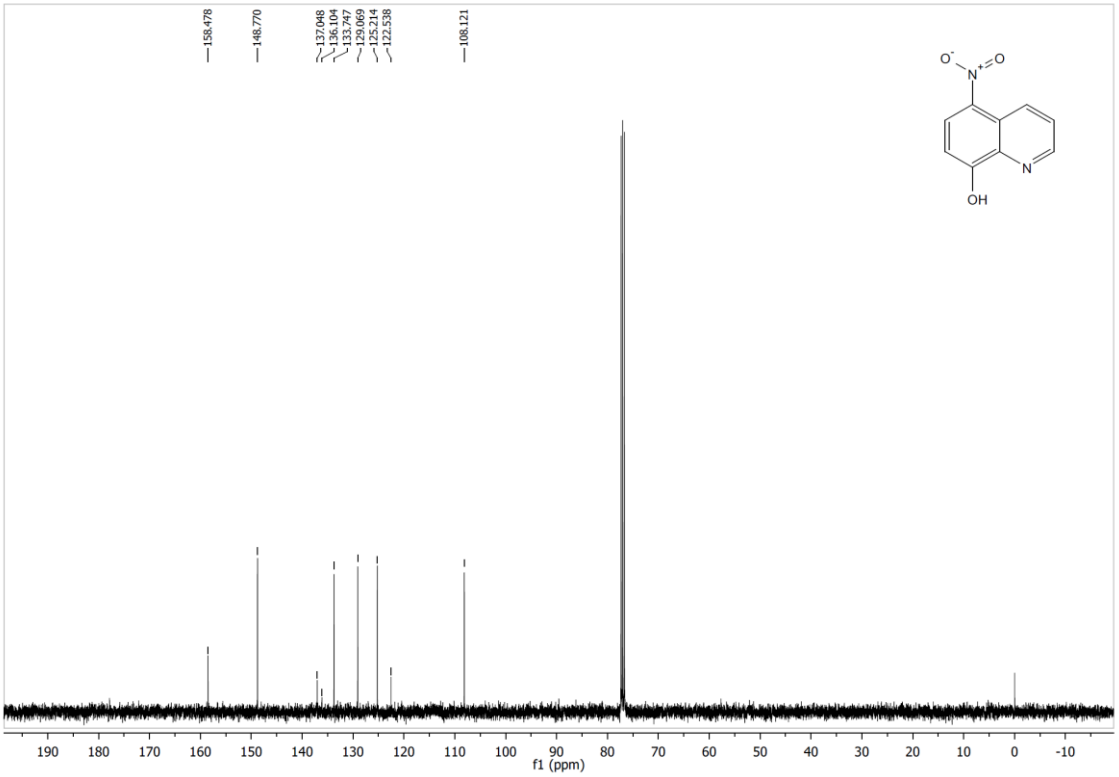
Chemotherapy. Vol. 72. No. 8. 2263–2272.
Yadav P, Singal A, Pandhi D, Das S. 2015. Clinico-mycological study of dermatophyte toenail onycomycosis in New Delhi, India. Indian J Dernatol. 60(2): 153-158.
Yapar N. 2014. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. Therapeutics and Clinical Risk Management. Vol. 10. 95–105.
You Z, Ran X, Dai Y, Ran Y. 2018. Clioquinol, an alternative antimicrobial agent against common pathogenic microbe. Journal de Mycologie Medicale. 788. 1-10.
Zhan P, Liu W. 2016. The Changing Face of Dermatophytic Infections Worldwide. Mycopathologia.
Zhang N, O'Donnell K, Sutton DA, Nalim FA, Summerbell RC, Padhye AA, Geiser DM. 2006. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. Journal of Clinical Microbiology. Vol 44. No6. 2186-2190.
Zuo Q, Dong L, Mu W, Zhou L, Hu T, Zhang H. 2015. *Trichosporon asahii* infection after total knee arthroplasty: a case report and review of the literature. Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology. V. 26(1). 47-51.

9. APÊNDICES

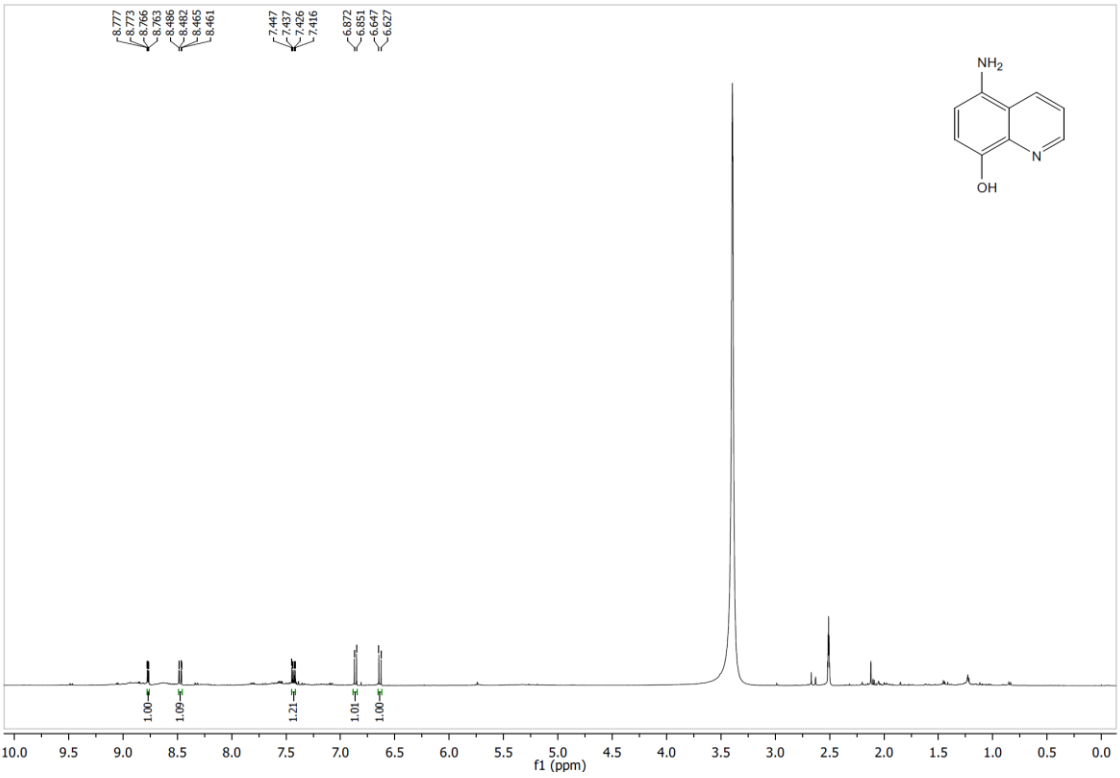
9.1 Espectros

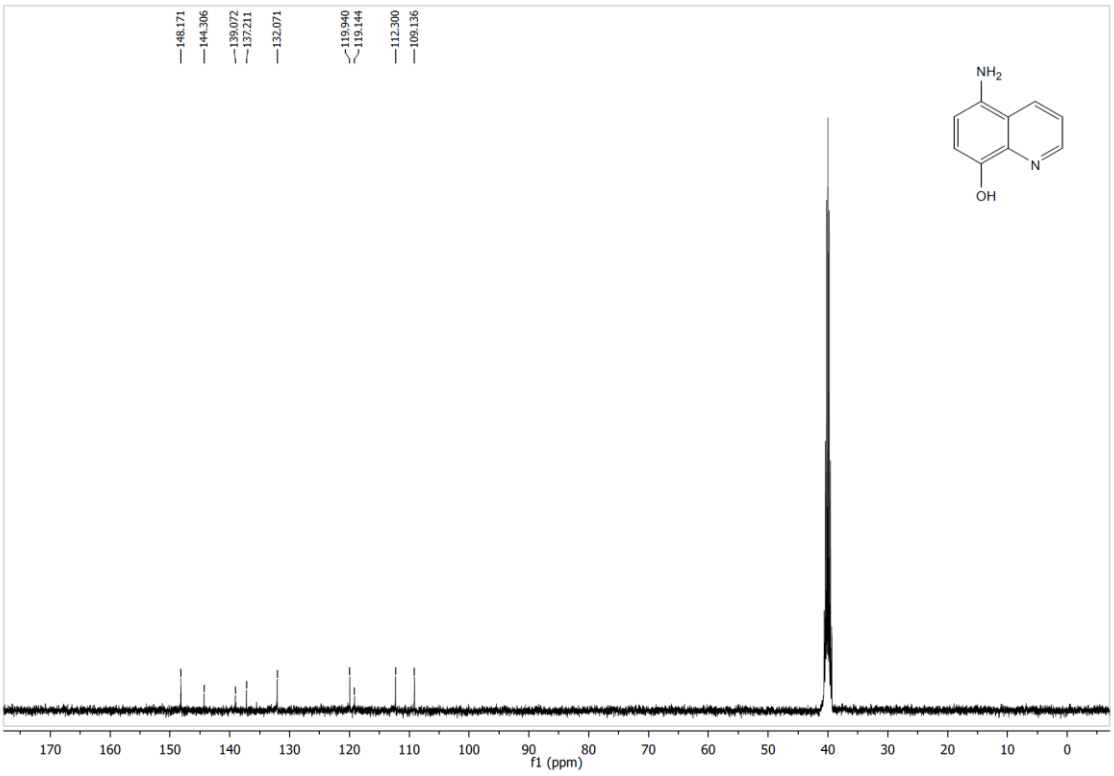
9.1.1 5-nitro-8-hidroxiquinolina



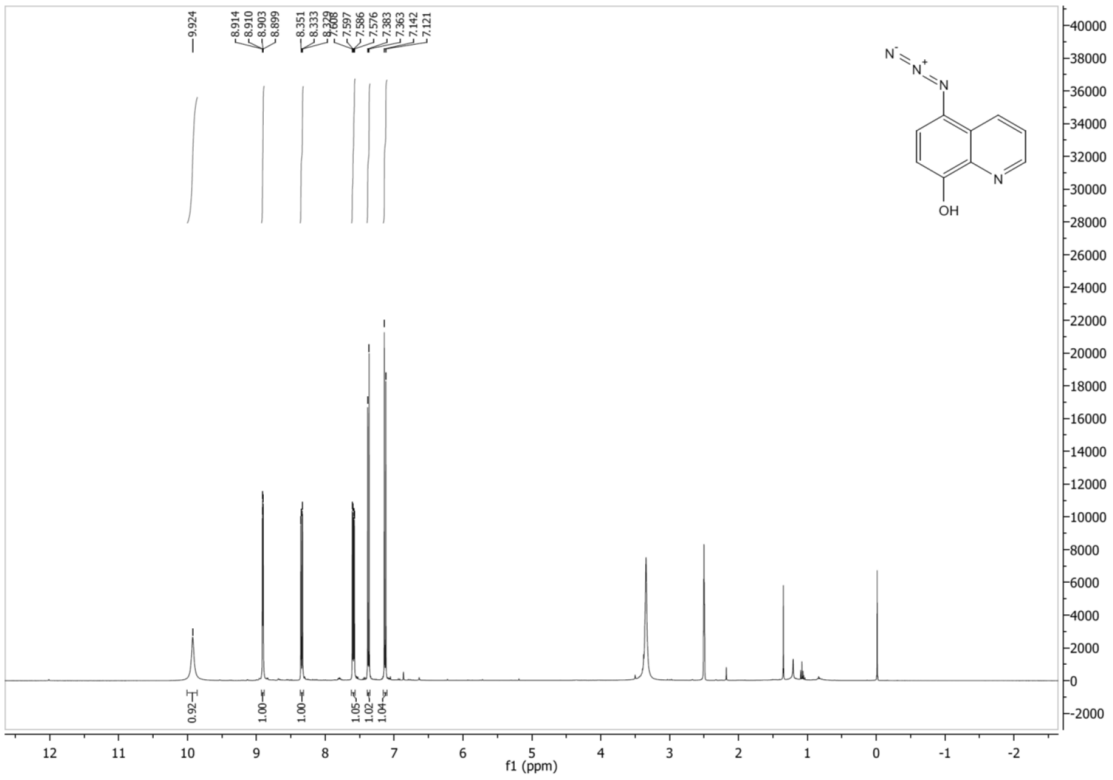

158.478
148.770
137.048
136.104
133.747
129.069
125.214
122.538
108.121
O
N
O
N
OH
190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 -10
f1 (ppm)

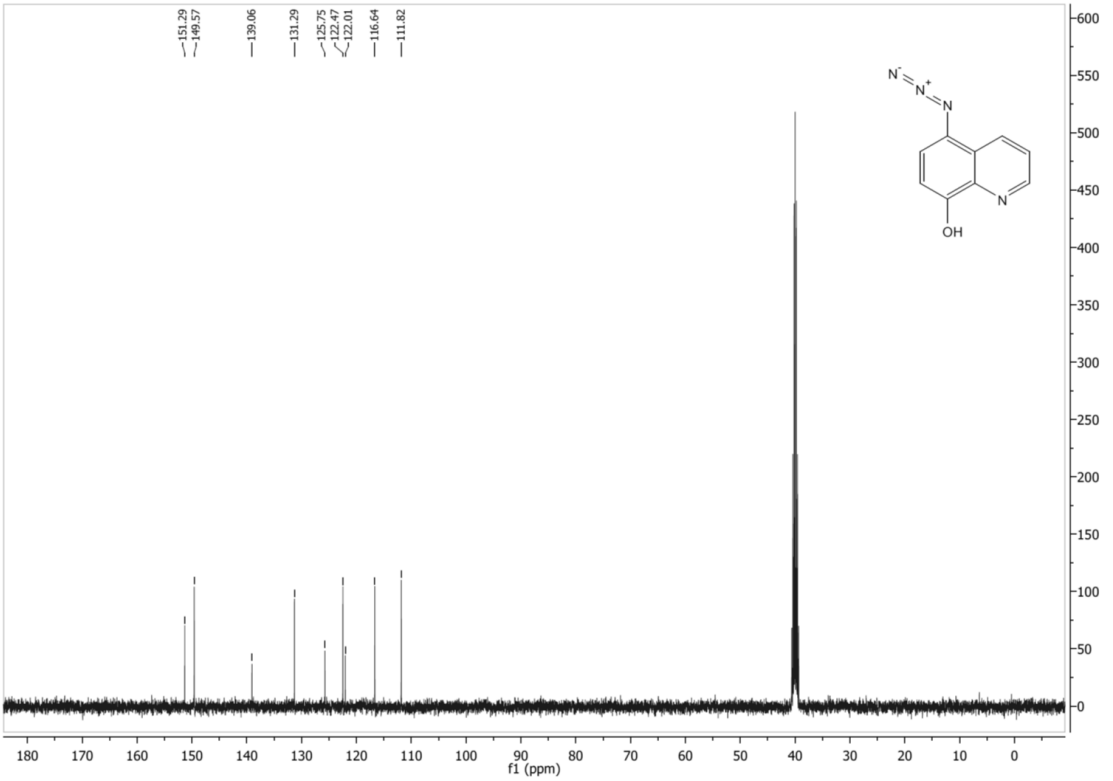
9.1.2 5-amino-8-hidroxiquinolina



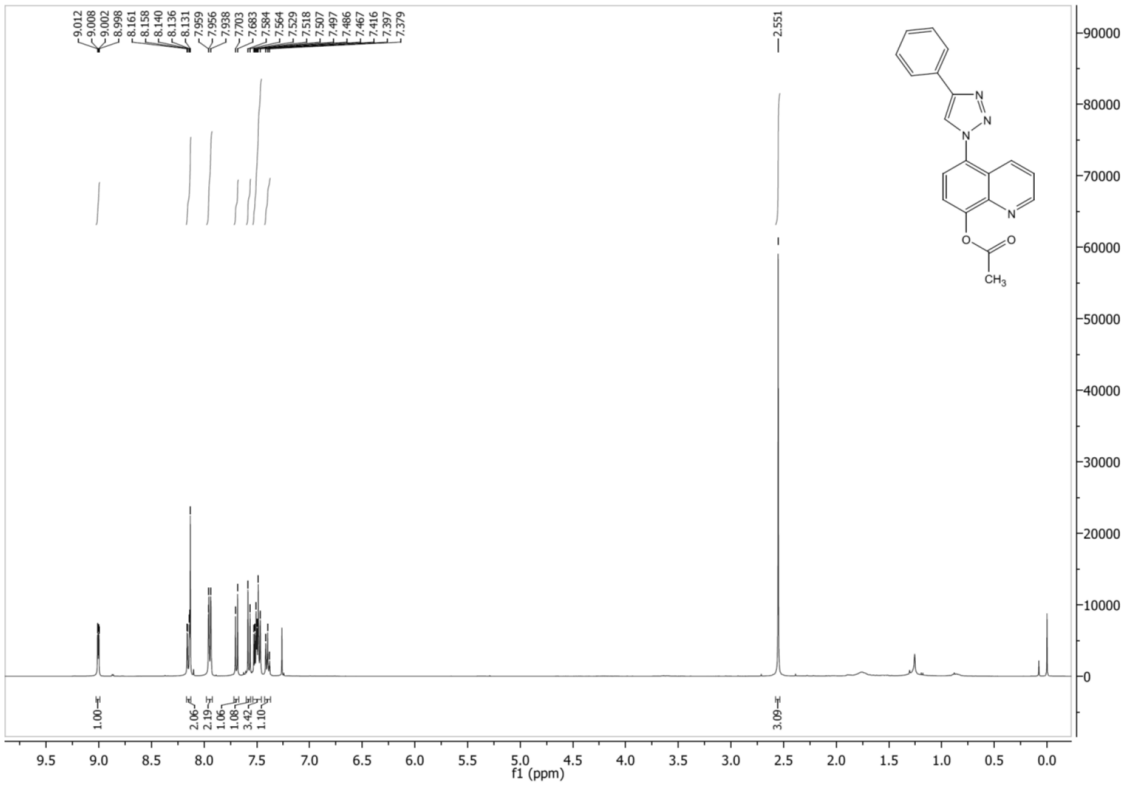


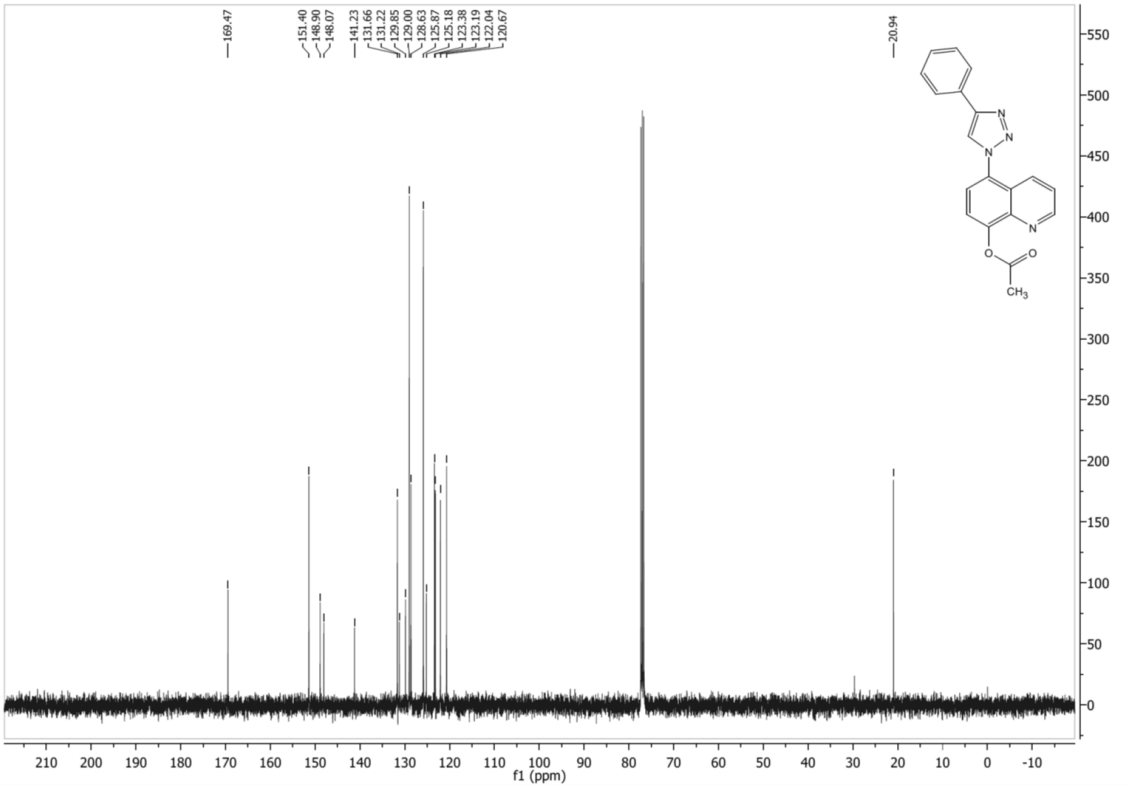
9.1.3 5-azido-8-hidroxiquinolina



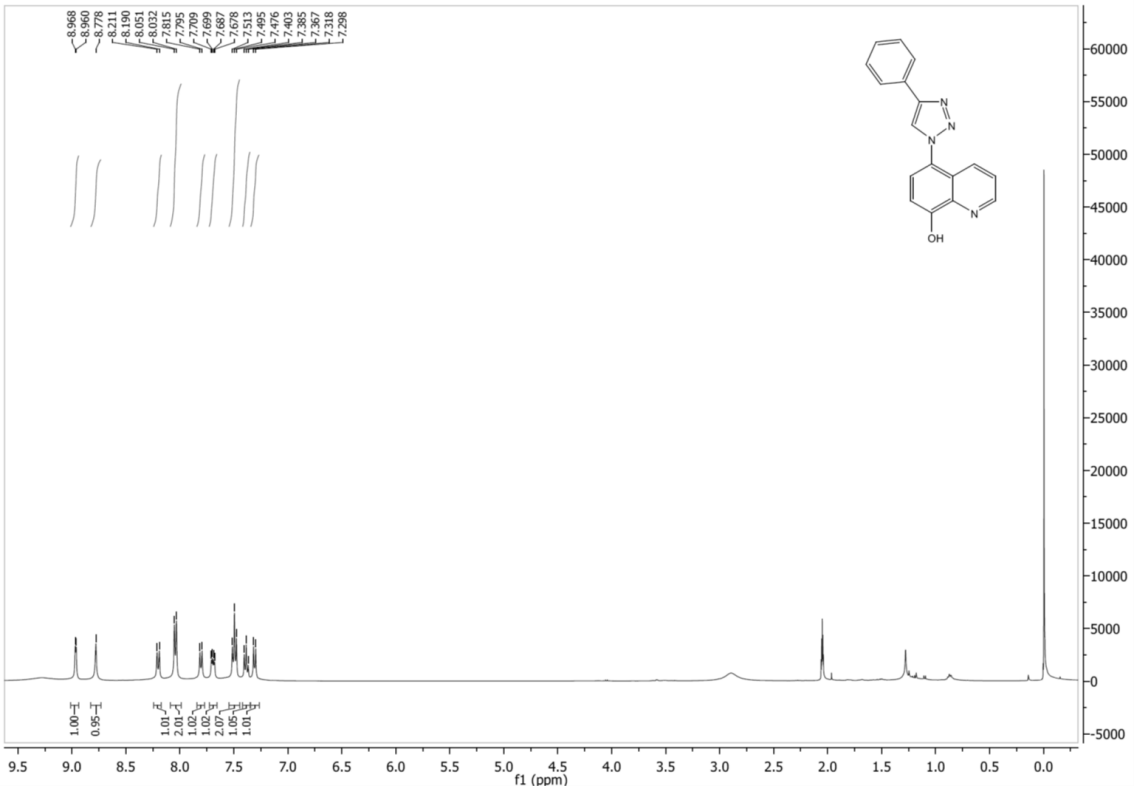


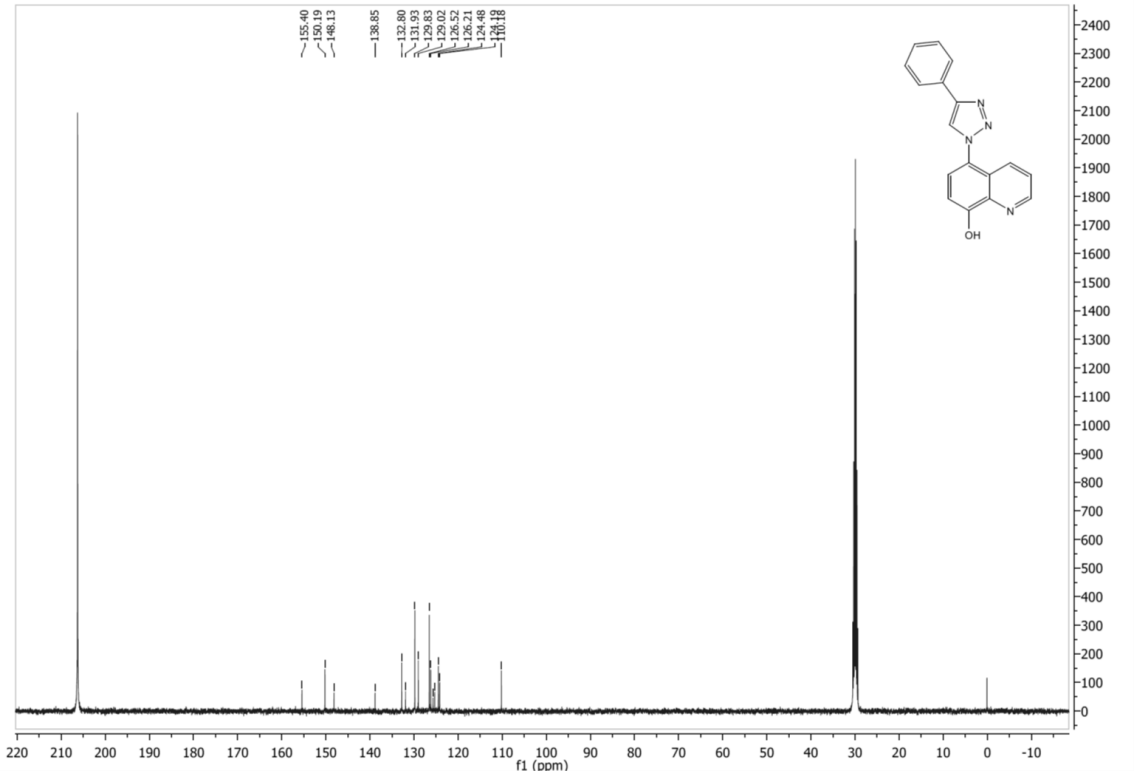
9.1.4 Acetato de 5-(4-fenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinil



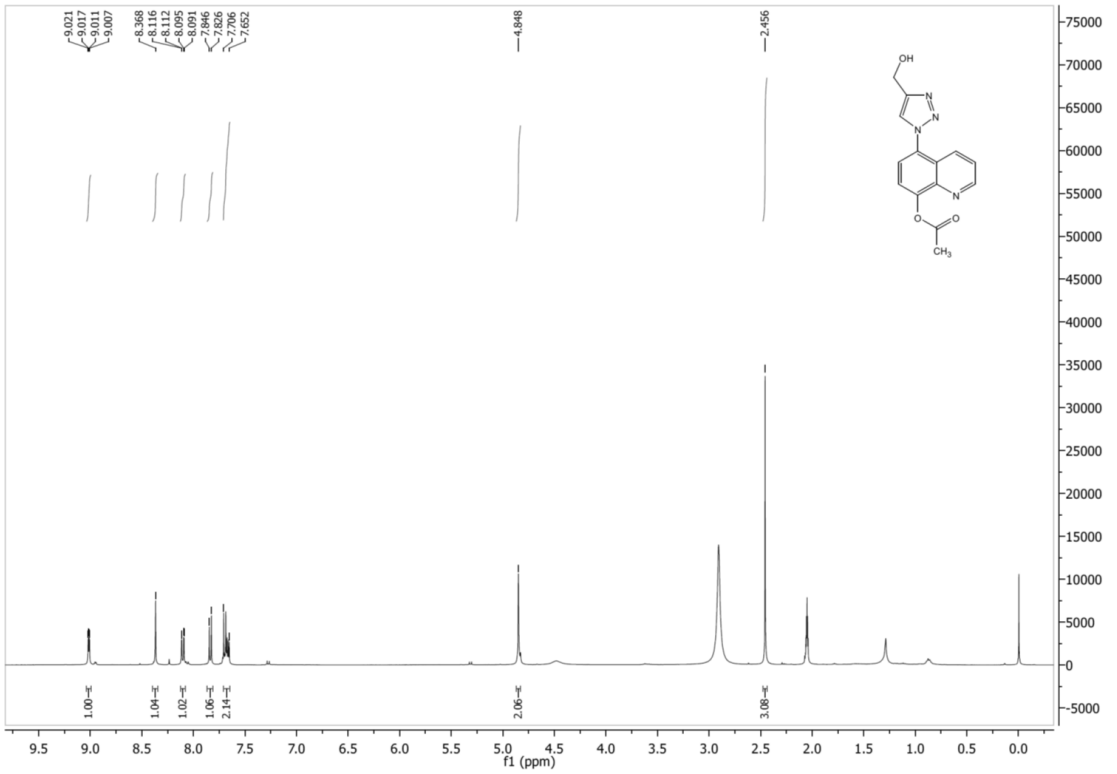


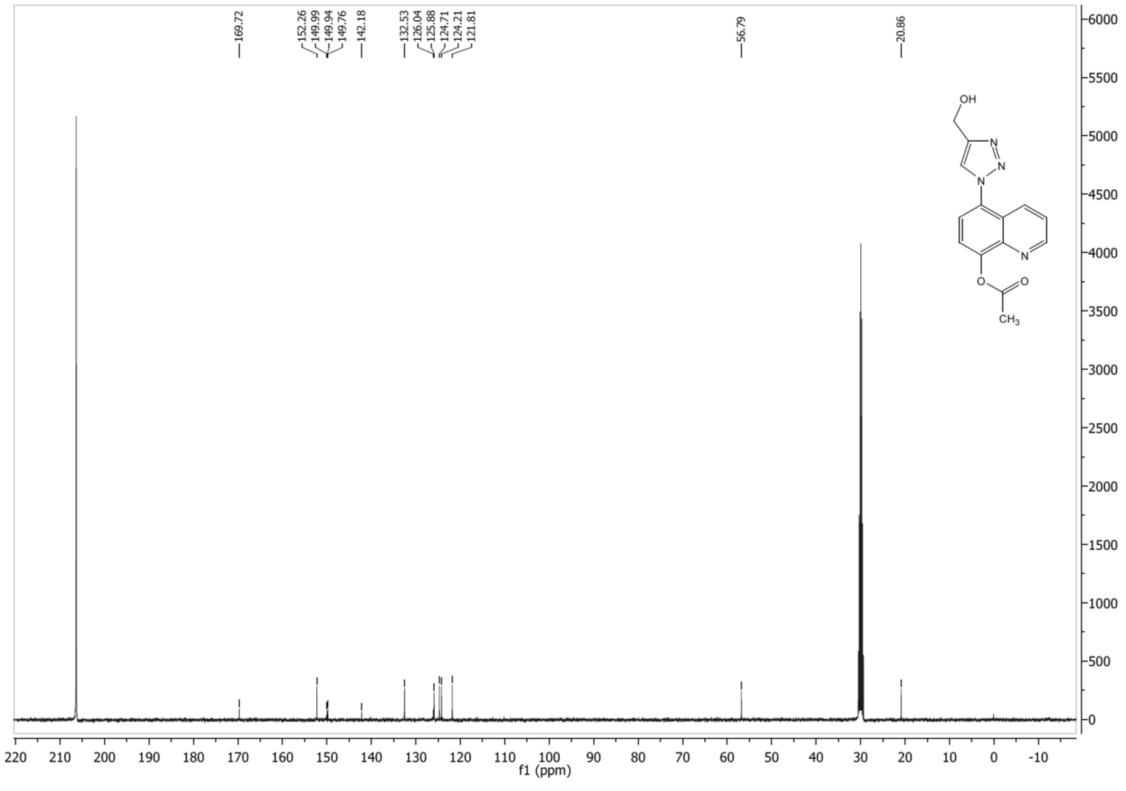
9.1.5 5-(4-fenil-1H-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinol



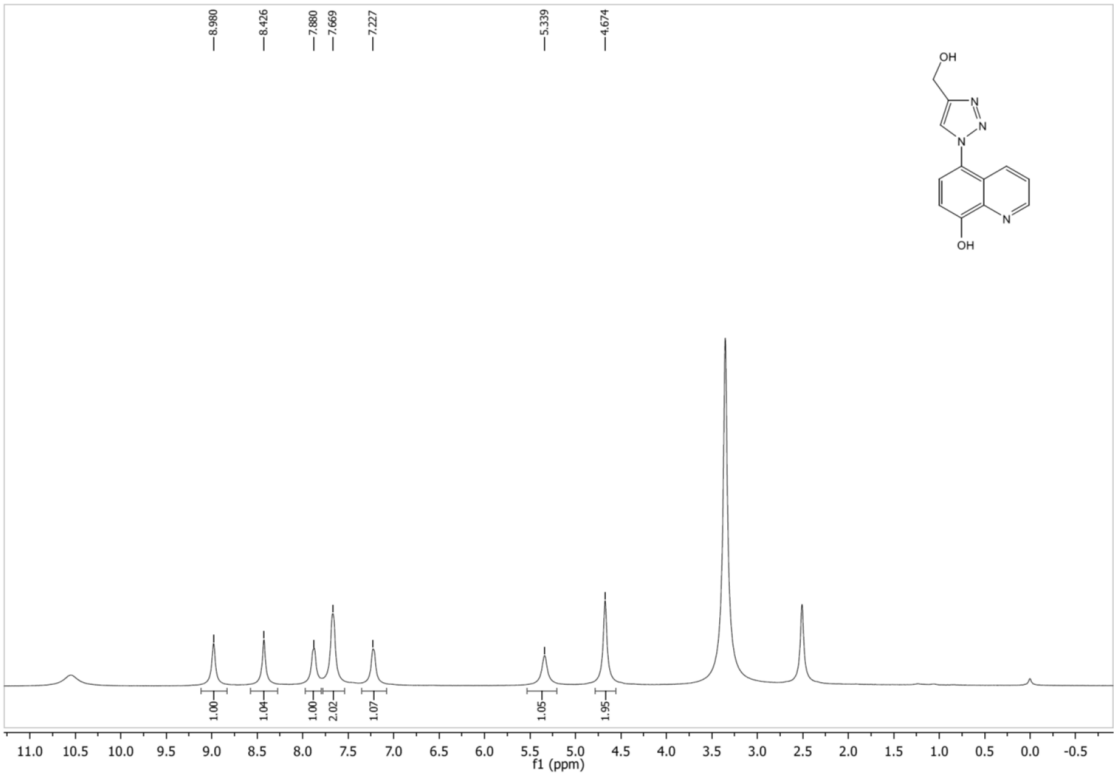


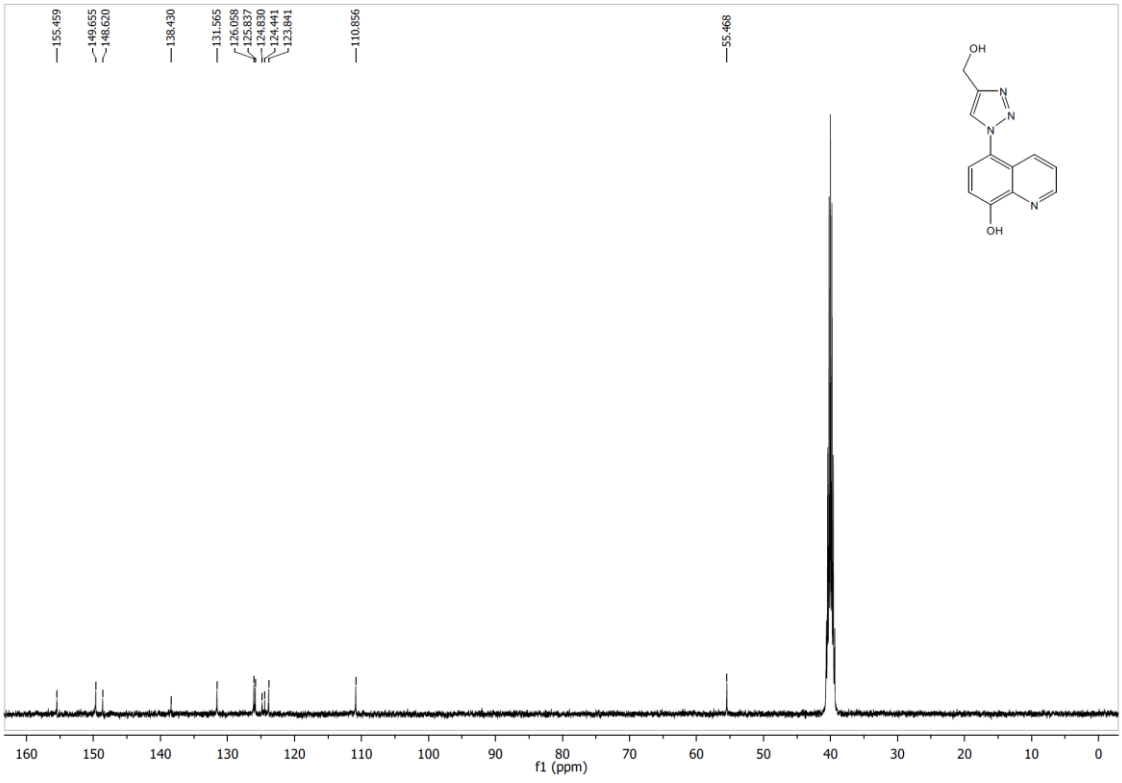
9.1.6 Acetato de 5-(4-(hidroximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinil



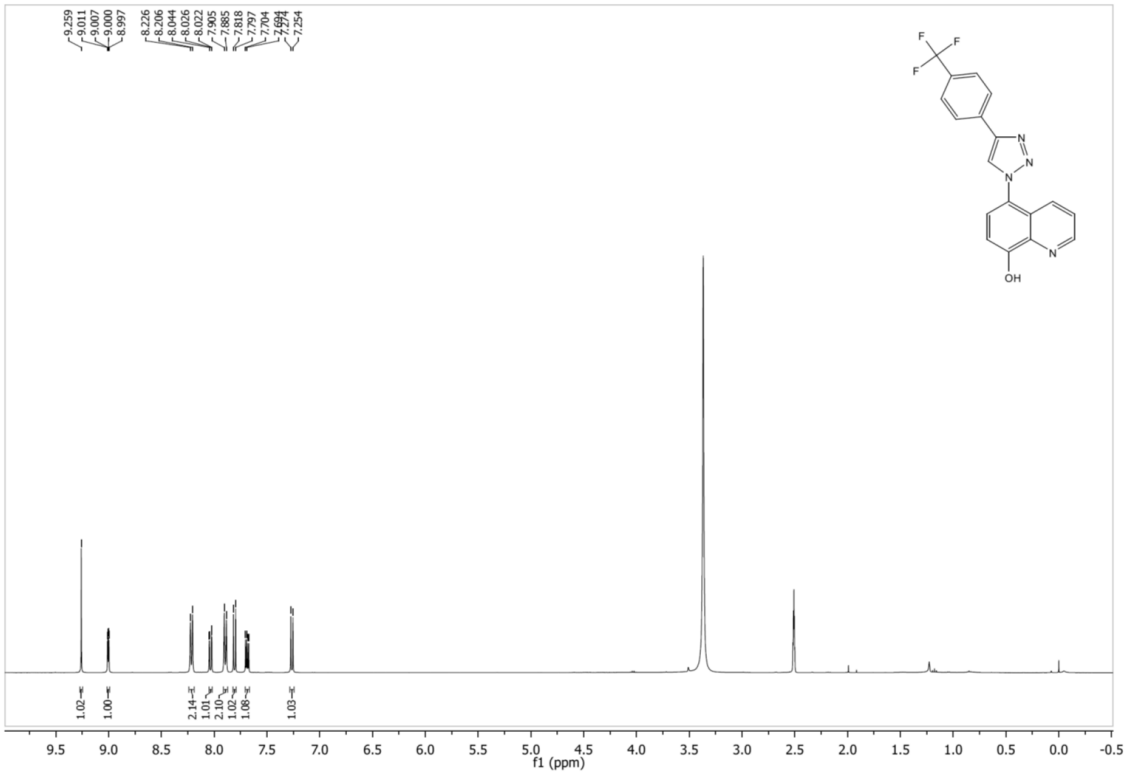


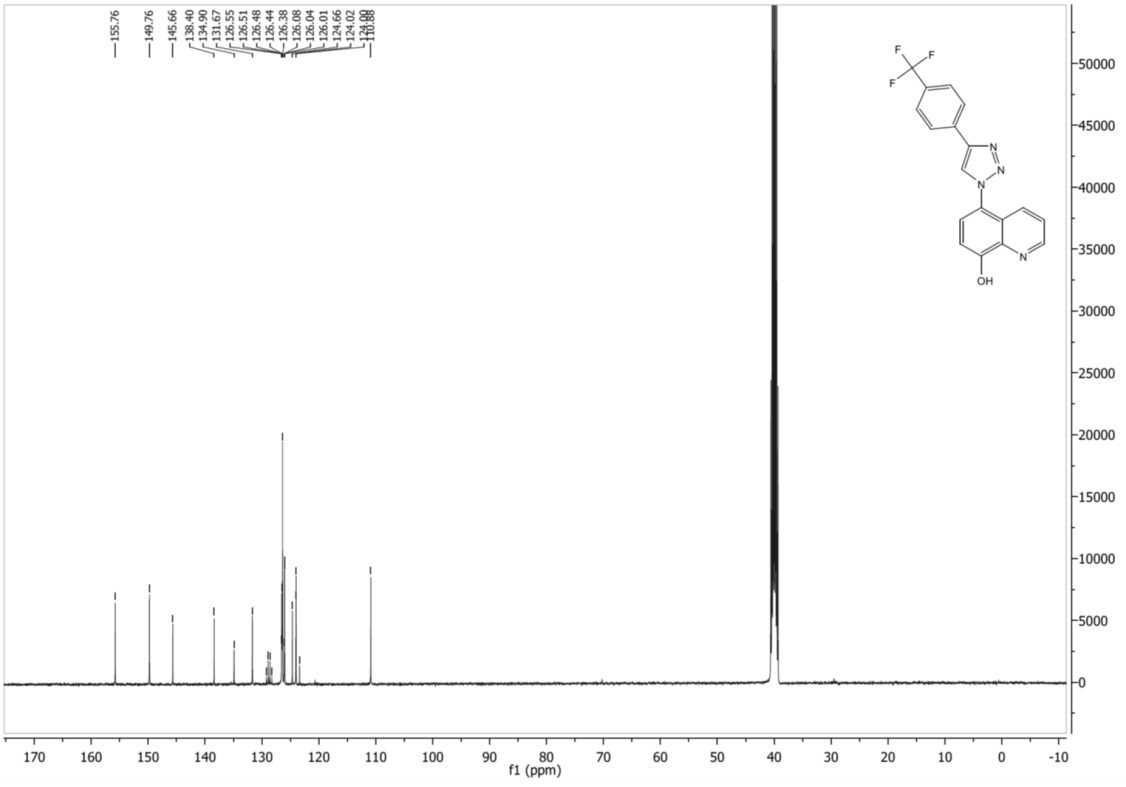
9.1.7 5-(4-(hidroximetil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinol



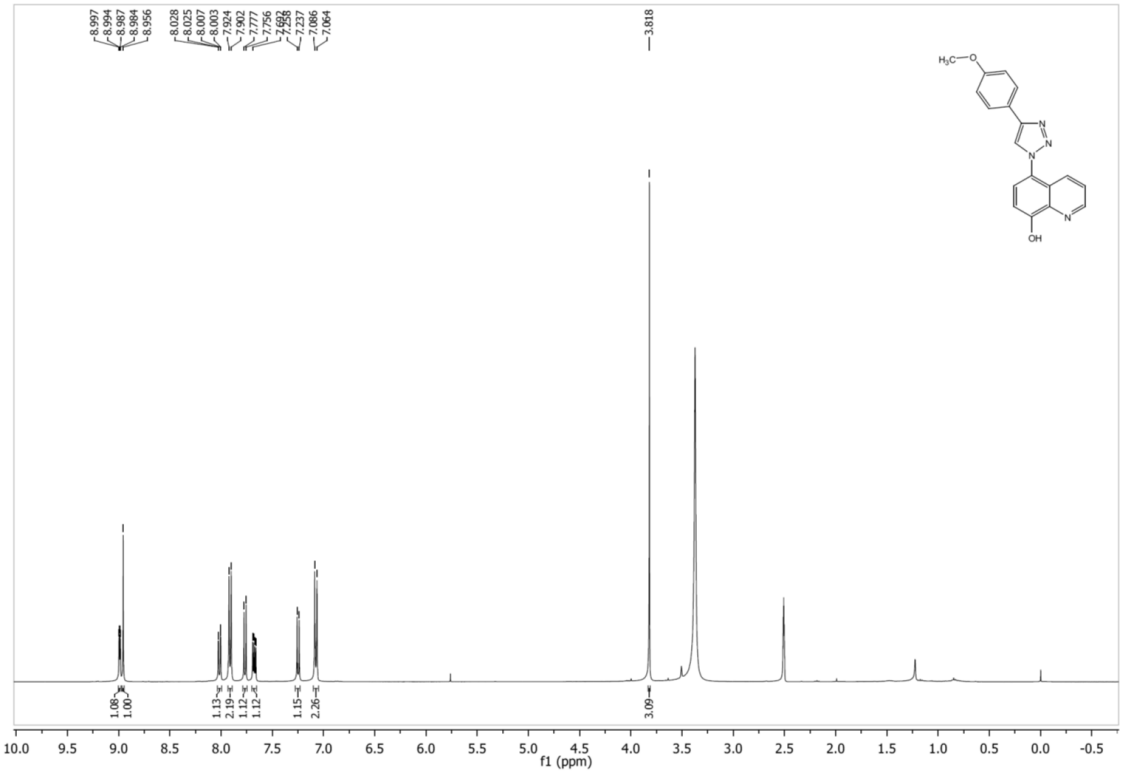


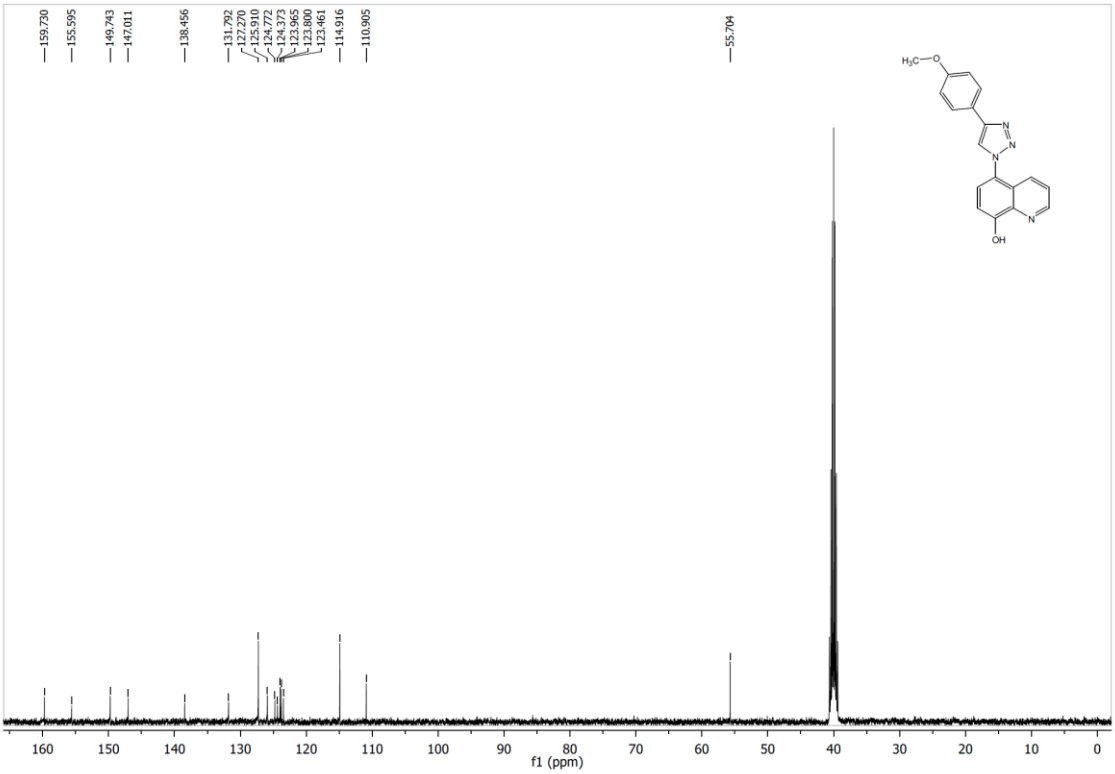
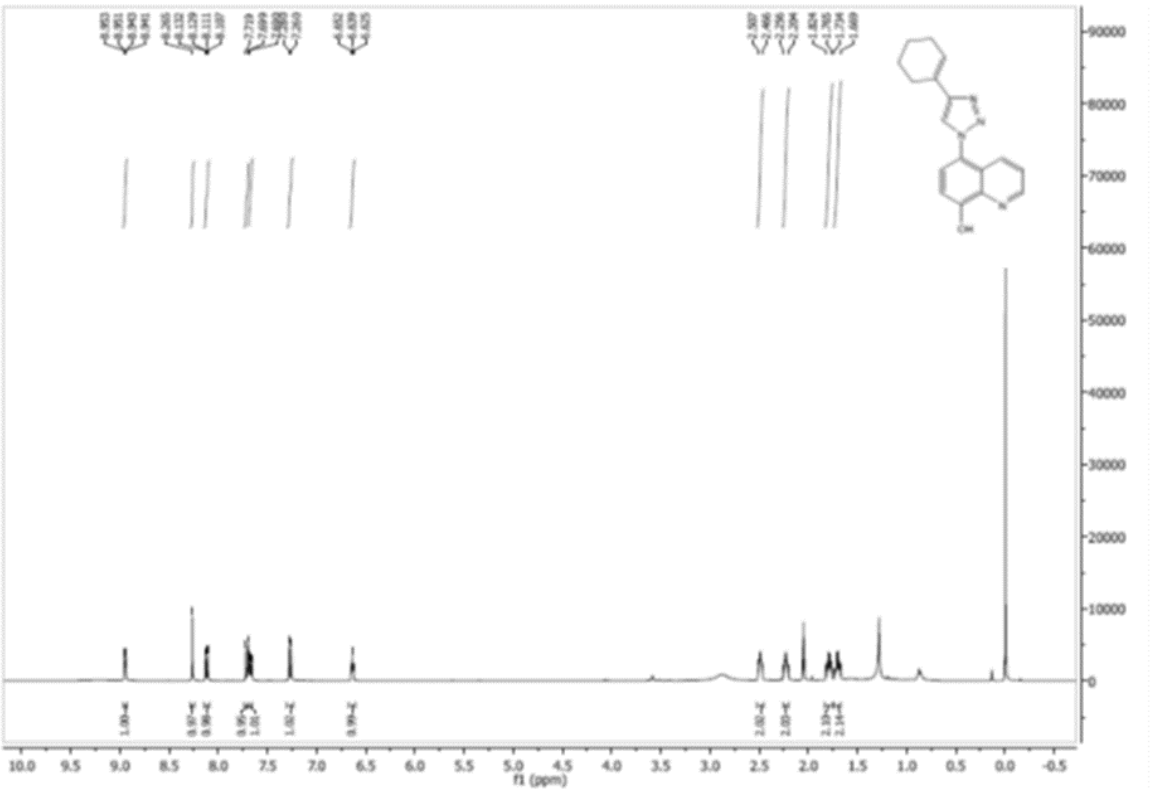
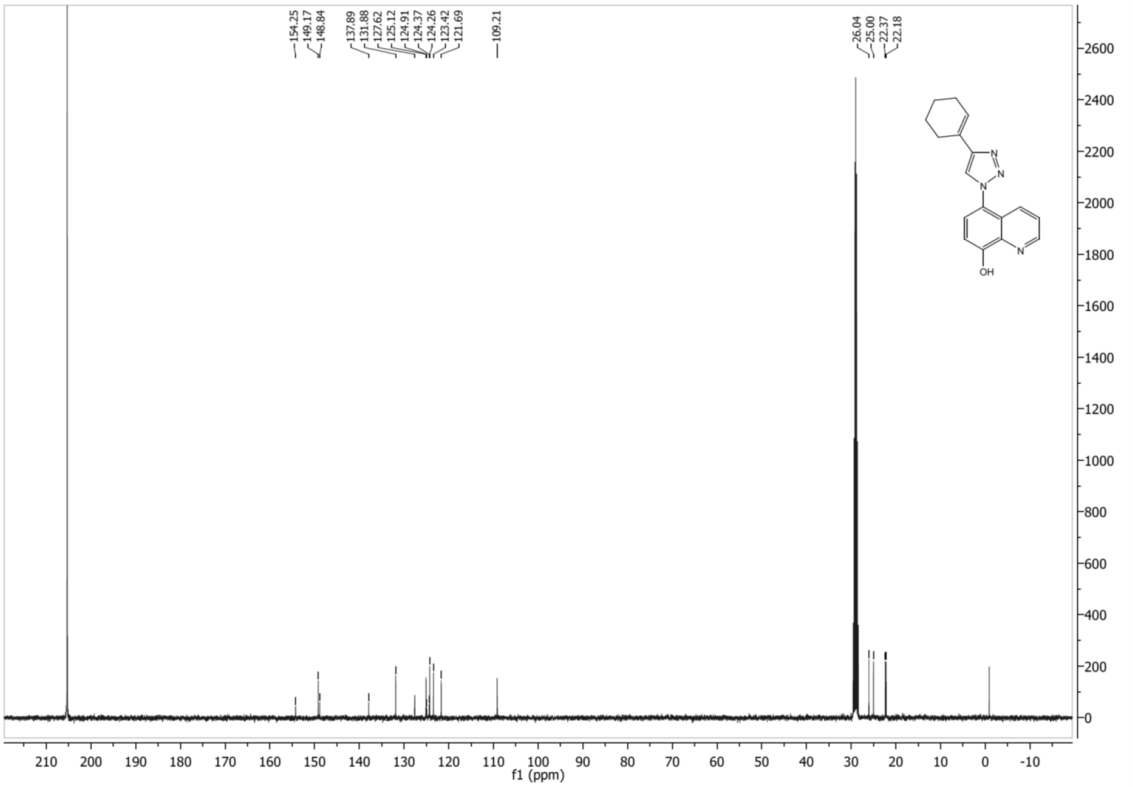
9.1.8 5-(4-(4(trifluormetil)fenil)1H-1,2,3-triazol-1-il-8-quinolinol





9.1.9 5-(4-metoxifenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinol





9.1.10 5-(4-(ciclohex-1en-1-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-8-quinolinol