



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

**SÍNTESE E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE DERIVADOS FTALIMÍDICOS
LIGADOS A TRIAZÓIS**

Albérico Real do Espírito Santo Filho

Recife – 2015

ALBÉRICO REAL DO ESPÍRITO SANTO FILHO

**SÍNTESE E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE DERIVADOS
FTALIMÍDICOS LIGADOS A TRIAZÓIS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica e Fisiologia
como parte dos requisitos para
obtenção do título de mestre em
Bioquímica e Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima

Co-orientadora: Mônica Cristina Barroso Martins

RECIFE - 2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Espírito Santo Filho, Albérico Real do

Síntese e atividade antifúngica de derivados ftalimídicos ligados a triazóis/ Albérico Real do Espírito Santo Filho – Recife: O Autor, 2015.

59 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Vera Lúcia de Menezes Lima

Coorientadora: Mônica Cristina Barroso Martins

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas, Bioquímica e Fisiologia, 2015.

Inclui bibliografia

- 1. Farmacologia 2. Triazóis 3. Fungos filamentosos I. Lima, Vera Lúcia de Menezes (orientadora) II. Martins, Mônica Cristina Barroso (coorientadora) III. Título**

615.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015- 73

ALBÉRICO REAL DO ESPÍRITO SANTO FILHO

Síntese e atividade antifúngica de derivados ftalimídicos ligados a triazóis

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco

Aprovado por:

Profª. Dra. Vera Lúcia de Menezes Lima - Presidente

Profª. Dra. Mônica Cristina Barroso Martins

Prof. Dra. Janete Magali de Araujo

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual

Data: 10 / 02 / 2015

“Senhor, Jesus a tua luz seguirá meus caminhos onde quer que vá. Teus ensinamentos permanecerão gravados na minha mente e no meu espírito”.

Espírito da Verdade

Dedico este trabalho a minha família, e aos grandes
amigos de convivência.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por esta oportunidade, por não me ter deixado fraquejar nos momentos de maior dificuldade, e enfim, agora, pelo sonho concretizado.

A todos os amigos do Departamento de Antibióticos e Bioquímica da UFPE, em especial a Professora Dra. Bianka Santana dos Santos. A todos amigos de trabalho Tiago Ferreira da Silva Araújo, Caique Silveira Martins da Fonseca, Weber Melo Nascimento, Irailton Prazeres dos Santos, Thaise Gabrielle da Silva Brito pelo incentivo e apoio nas horas necessárias.

À minha mãe Adélia Cavalcanti do Espírito Santo e meu pai Albérico Real do Espírito Santo, a meus velhos queridos, e filhos Bruna Carvalho do Espírito Santo, Albérico Carvalho do Espírito Santo, Laiza Shirley Moreira da Silva Rocha e Gessik Filgueira do Espírito Santo, à minha esposa, Shirley Carvalho do Espírito Santo, a todos pelo grande carinho e amor, que mim proporcionaram nas horas difíceis que passei.

Em especial aos professores Doutores Luiz Carvalho de Bezerra Junior, Vera lúcia de Menezes Lima, minha orientadora, Mônica Cristina Barroso Martins e Márcia Vanusa da Silva Chefe do Departamento de Bioquímica, graças a seus exaustivos esforços tudo se edificou, pois sem elas nada disso seria possível. Meus sinceros respeito e admiração.

Aos professores Maria do Socorro Santos Ferreira, Armando Marsden de Lacerda Filho, José Luiz de Lima Filho, Nicácio Henrique da Silva, Patrícia Maria Guedes Paiva, Vera Cristina Oliveira de Carvalho, Janete Magali de Araujo, Glaucia Manuella de Sousa Lima, Raphael Carlos Ferrer de Santana e aos funcionários Djalma Gomes da Silva, José Miron de Oliveira, João Antônio Virgínio, Fátima Regina de Souza Medeiros Correia, Eliane Barbosa da Silva Nogueira, Luis Carlos da Silva, Marcela de Araújo Sobral, pela valorosa colaboração no processo de ensino e aprendizagem, com que fui presenteado; a todos, meu sincero muito obrigado.

RESUMO

Os antibióticos e antifúngicos estão incluídos entre os fármacos mais indiscriminadamente utilizados, contribuindo para o crescimento de resistência bacteriana e fúngica, o que provoca uma diminuição da ação antimicrobiana. Esta resistência estimula a pesquisa de novos compostos que apresentem efeitos antimicrobianos, sejam eles compostos naturais obtidos de plantas, de outros organismos ou compostos sintéticos obtidos através de modificações específicas de moléculas quimicamente conhecidas, tornando-as biologicamente mais ativas, como, por exemplo, as imidas cíclicas. Por esta razão, o objetivo deste estudo foi sintetizar e avaliar a atividade antimicrobiana de novos derivados de ftalimidas ligadas a 1,2,3-triazóis. Os compostos foram sintetizados através da reação entre *N*-2-(azidaetil) ftalimida com cadeia alifática $n=2$ e alcino aromático. Essa reação foi processada na presença de iodeto de cobre (CuI), trietilamina, dimetilformamida (DMF) à temperatura de 25°C, sob energia de ultrassom, baseada na *click chemistry*. O *screening* antimicrobiano foi realizado através do teste de difusão em Agar, utilizando bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella enteritidis*) da Coleção de Culturas de Microrganismos do Departamento de Antibióticos/UFPE, os fungos leveduriformes foram do gênero *Candida* (*C. krusei*, *C. albicans*, *C. pelliculosa*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*) os filamentosos (*Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Fusarium lateritium*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *Metarhizium anisopliae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Microsporium gypseum*, *M. canis*, *Trichophyton rubrum*, *T. tonsurans*) da Micoteca do Departamento de Micologia/UFPE. Aos discos de papel foram adicionados 50 µL da nova ftalimida (0,6 mg/disco), e em seguida foram colocados em placas de Petri previamente inoculadas com cada microrganismo teste, em meio Agar Nutriente para bactérias a 37°C e Agar Sabouraud para fungos a 30°C. O experimento foi realizado em duplicata. Os resultados foram avaliados através do diâmetro do halo (mm) de inibição e estão representados como média aritmética. A análise quantitativa foi determinada através da CMI em meio Sabouraud, a anfotericina B foi utilizada como droga padrão. A CMF foi determinada após o 6º dia, As microplacas foram submetidas ao leitor de Elisa com comprimento de onda entre 492 nm e 630 nm, em seguida coradas com Resazurina. Os compostos não foram ativos para as bactérias, bem como para as espécies de *C. glabrata*, *A. niger*, *F. oxysporum*, *F. solani*. Os maiores halos de inibição foram obtidos nos fungos filamentosos tratados com as novas ftalimidas **1a** e **2a**, com destaque para ftalimida **2a** que mostrou os halos mais expressivos (33–65 mm), inibindo 14 dos 18 fungos testados. A CMI da nova ftalimida **2a** variou entre 5 – 20 µg/mL. A nova ftalimida **2a** demonstrou ter potente atividade antifúngica podendo servir como protótipo para novas drogas.

Palavras-chave: Atividade antifúngica, Compostos sintéticos, Fungos filamentosos, Ftalimidas.

ABSTRACT

Antibiotics and antifungals are included among the most used drugs indiscriminately. This fact contributing to the growth of bacterial or fungal resistance, which causes a decrease in antimicrobial action. This resistance encourages the search for new compounds having antimicrobial effects, like that natural compounds obtained from plants, other organisms or synthetic compounds obtained by chemical modifications of known specific molecules, making them more biologically active, for example, cyclic imides. For this reason, the aim of this study was to synthesize and evaluate the antimicrobial activity of new derivatives of phthalimides connected to 1,2,3- triazoles. Compounds were synthesized by the reaction of N-2- (azidaetil) phthalimide with n=2 aliphatic chain and aromatic alkyne. This reaction was worked in the presence of copper iodide (CuI), triethylamine, dimethylformamide (DMF) the temperature of 25 °C, under ultrasonic energy, based on click chemistry. The antimicrobial screening was performed using the agar diffusion test using bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella enteritidis*) of Microorganisms Culture Collection of the Department of Antibiotics / UFPE, the yeasts were *Candida* genus (*C. krusei*, *C. albicans*, *C. pelliculosa*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis*) and filamentous (*Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Fusarium lateritium*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *Metarhizium anisopliae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Microsporum gypseum*, *M. canis*, *Trichophyton rubrum*, *T. tonsurans*) the mycology department/UFPE. The paper discs were added 50 µL of the new phthalimide (0.6 mg/disc), then were placed on inoculated Petri dishes each test microorganism in Nutrient Agar for bacteria to 37 °C and Sabouraud agar medium for fungi 30 °C. The experiment was performed in duplicate. The results were evaluated through the inhibition zone diameter and are represented as the arithmetic mean. Quantitative analysis was determined through the MIC in Sabouraud broth, amphotericin B was used as the standard drug. The CMF was determined after the 6^o day. The microplates were subjected to ELISA reader at a wavelength between 492 nm and 630 nm then stained with Resazurin. The compounds were not active for bacterias, as well as *C. glabrata*, *A. niger*, *F. oxysporum*, *F. solani*. More was observed inhibition zones in three of the five selected yeasts. However the best inhibition zones were obtained in filamentous fungi with the phthalimides **1a** e **2a**. Where the new phthalimide **2a** showed the most significant halos (33 – 65 mm), inhibiting 14 of the 18 tested fungi. MIC The new phthalimide **2a** ranged from 5-20 µg/mL. The new phthalimide **2a** shown to have potent antifungal activity may serve as a prototype for new drugs.

Key-words: Antifungal activity, Filamentous fungi, Phthalimides, Synthetic compounds.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1-** Obtenção dos nutrientes pelos fungos através de diferentes estratégias nutricionais. 13
- Figura 2-** Doenças fúngicas comuns. A- Podridão cinzenta causada por *Botrytis cinerea* em plantas; B- dermatomicose causada pelo *Mycrosporum canis* em cachorro; C- Lesão verrucosa descamativa causada por *trichophyton tonsurans* no homem. 15
- Figura 3-** Diagnóstico laboratorial das micoses sistêmicas e oportunistas no Estado de Goiás no período de 2009 a fevereiro de 2012. 16
- Figura 4-** Principais gêneros de fungos que causam problemas respiratórios. A- *Paracoccidioides*, B- *Coccidioides*, C- *Criptococose*. 16
- Figura 5 -** Gêneros de fungos de importância médica. A- *Penicillium*, B- *Aspergillus*, C- *Cladosporium*. 17
- Figura 6-** Estrutura básica da hidrazina. 20
- Figura 7-** Estrutura básica de uma imida cíclica – ftalimida. 22
- Figura 8 -** Estrutura química da molécula pirrol. 22
- Figura 9 -** Estrutura química de 1,2,3-triazol. 23

ARTIGO

- Figura 1:** Estrutura molecular das novas ftalimidas derivadas de compostos triazólicos. A: 4-(benzotiazol-2-ilsulfanil)-metil-1-(N-ftalimidometil)-1,2,3-triazol (**1a**); B: 4-(fenil)-1-(N-ftalimidometil)-1,2,3-triazol (**2a**); C: 4-(fenil)-1-(N-ftalimidometil)-1,2,3-triazol (**1b**); D: 4-(fenil)-1-(2-ftalimidoetil) - 1,2,3-triazol (**2b**). 37
- Figura 2:** Gráfico da Concentração Mínima Inibitória da nova ftalimida **2a** sobre fungos filamentosos onde (*) $P < 0,05$ e (***) $P < 0,0001$ 41

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1: Diâmetro dos Halos de inibição (mm) das novas ftamidas. 39

Tabela 2: Concentração Mínima Inibitória da nova ftalimida 2a e anfotericina B sobre fungos filamentosos. 40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Características Gerais dos fungos e Prevalência das Doenças Fúngicas	13
2.2 Compostos Sintéticos e Atividade Antifúngica	19
3. REFERENCIAS	24
4. OBJETIVOS	29
4.1 Geral	29
4.2 Específico	29
5. Resultados e Discussão	
Artigo	30
Potencial antimicrobiano das novas ftalimidas ligadas a triazóis	
6. CONCLUSÕES	47
7. Guide of Authors	48

1. INTRODUÇÃO

Uma das descobertas terapêuticas mais importantes do século XX foi a dos agentes antimicrobianos, que modificou drasticamente o curso de muitas doenças, com redução da mortalidade e morbidade. Porém, os antibióticos estão entre os agentes mais indiscriminadamente utilizados, sendo um fator de contribuição para o crescimento do problema mundial de resistência bacteriana e fúngica. Este problema estimula novas fontes de pesquisas com plantas, outros organismos ou ainda com compostos sintéticos, cujas modificações, algumas específicas, quimicamente conhecidas, tornando-as biologicamente mais ativas (PAGE et al., 1999).

A síntese de compostos químicos com atividade antimicrobiana tem sido bastante utilizada na tecnologia moderna, particularmente na medicina e na agricultura. Neste contexto, destacam-se as imidas cíclicas denominadas ftalimidas que se mostraram como compostos com diferentes atividades biológicas, tais como, hipolipidêmica, antiviral, antimicrobiana, entre outras, que mostram o potencial dessas substâncias como protótipo para síntese de novos fármacos (AKGUN et al, 2012).

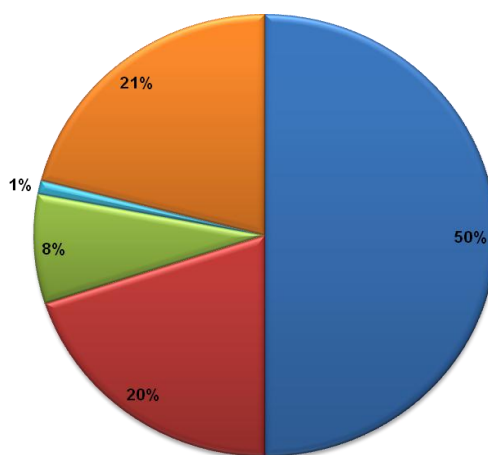
Portanto, este estudo demonstra o potencial antimicrobiano, determinando os valores da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de microrganismos patógenos testados, em substâncias sintéticas, denominadas de novas ftalimidas ligadas a 1,2,3-triazóis, no intuito de se obter moléculas biologicamente mais potentes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Características gerais dos fungos e prevalência das doenças fúngicas

Os fungos são organismos que não possuem clorofila, portanto, não são capazes de fazer fotossíntese e por esta razão, são conhecidos como seres heterotróficos, obtendo seus nutrientes por absorção, ou seja, lançam enzimas aos substratos onde colonizam e absorvem os elementos essenciais através da parede e da membrana celular (SILVA, COELHO, 2006). Estes organismos desenvolveram várias estratégias nutricionais para adquirir o carbono necessário para sua manutenção e sobrevivência, como por exemplo: a) através da degradação da matéria orgânica, os fungos sapróbios obtêm cerca de 45-50% de seus nutrientes; b) quando em simbiose parasítica com outros organismos, tais como cianobactérias, algas, plantas, animais, e humanos obtêm 20%; c) com organizações mutualistas em líquens obtêm 21%, em micorrizas obtêm 8% e 1% em mixomicetos (Figura 1) (HAWKSWORTH; HILL, 1984).

Figura 1- Obtenção dos nutrientes pelos fungos através de diferentes estratégias nutricionais.



Legenda: 50% fungos sapróbios; 20% quando em simbiose parasítica com cianobactérias, plantas, animais e humanos; 8% quando em organizações mutualísticas com micorrizas; 1% mixomicetos e 21% quando liquenizados ou líquens.

Fonte: MARTINS (2013).

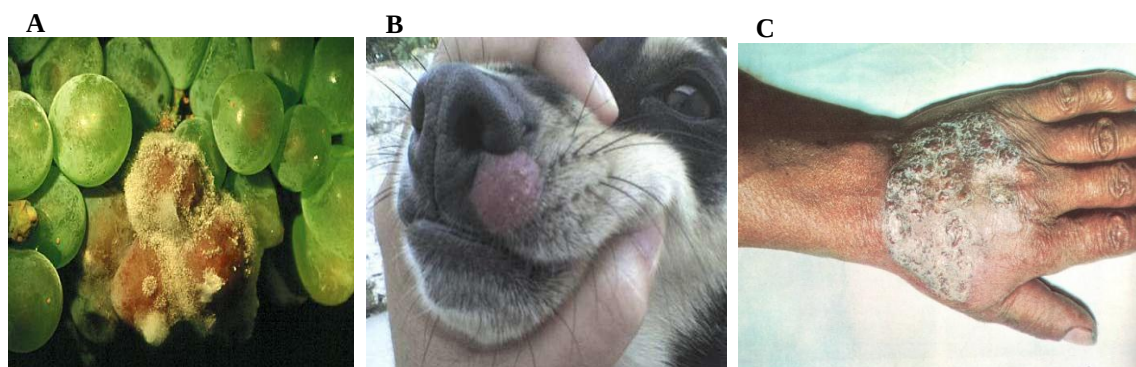
Na natureza os fungos degradam principalmente a biomassa de plantas, participando ativamente do ciclo do carbono e dos processos ecológicos em geral. As

enzimas secretadas pelos fungos são amplamente utilizadas em vários setores industriais para produção de alimentos, papéis, detergentes, têxteis, vinho e biocombustíveis (MÄKELÄ; DONOFRIO; VRIES, 2014). Algumas enzimas produzidas em grande escala na maioria são provenientes de ascomicetos do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus* utilizados em processos de fermentação e despolimerização de lignina. Os basidiomicetos são bastante eficientes na degradação de polímeros aromáticos (DE VRIES et al., 2010).

Quanto ao habitat, estão presente em todas as regiões, inclusive aquelas com condições climáticas extremas, como, por exemplo, no polo Norte, porém seu crescimento e desenvolvimento, ocorre preferencialmente em condições adequadas de umidade, níveis pluviométricos, temperatura, inversões térmicas, disponibilidade de substratos, concentração de CO₂ e pH do meio, vivendo nos mais diferentes substratos. Fazem parte da reciclagem dos materiais na natureza onde dispersam seus esporos para outros vegetais, animais, água, e para o homem. Desta maneira podem ocasionar diversas doenças, conhecidas de modo geral como micoses, que podem trazer no homem desde sintomas brandos a moderados e até lesões graves, que pode levar os indivíduos a óbito (DUNCAN et al., 2010; LIMACO et al., 2010).

O reino fungi é bastante diversificado, são conhecidas 1,5 milhões de espécies, apresentando uma coleção espetacular de decompositores, simbióticos, patógenos e parasitas, contribuindo de forma indispensável na manutenção do planeta, através da degradação da matéria orgânica, característica que os habilita a serem utilizados em processos industriais de alimentos e antibióticos, contribuindo para pesquisa como um dos melhores modelos da classe dos eucarióticos (HAWKSWORTH, 2001). Entretanto, com toda essa diversidade apenas 300 espécies causam doença em mamíferos, plantas e poucos são patogênicos humanos (Figura 2 A, B, C) (GARCIA-SOLACHE; CASADEVALL, 2010).

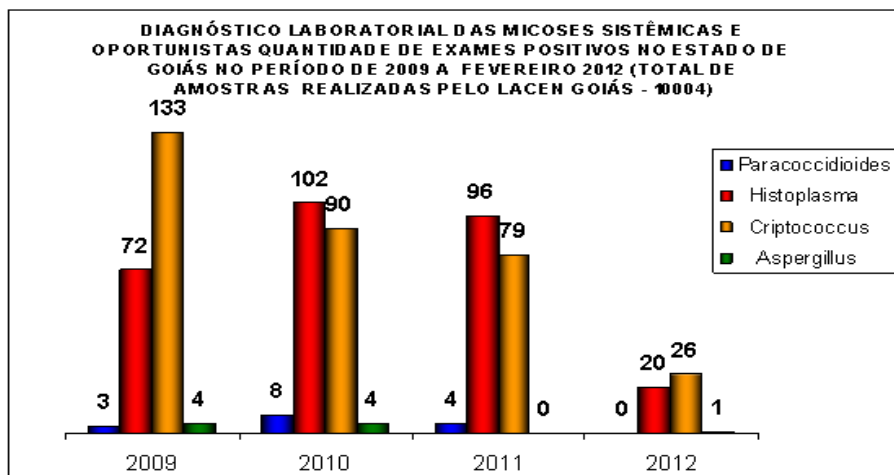
Figura 2- Doenças fúngicas comuns. A- Podridão cinzenta causada por *Botrytis cinerea* em plantas; B- dermatomicose causada pelo *Mycrosporium canis* em cachorro; C- Lesão verrucosa descamativa causada por *trichophyton tonsurans* no homem.



Fonte: A- Ministry of Agriculture of Canada, (2010); B- Synararillo.com.br. (2008); C- Lacerda (2013).

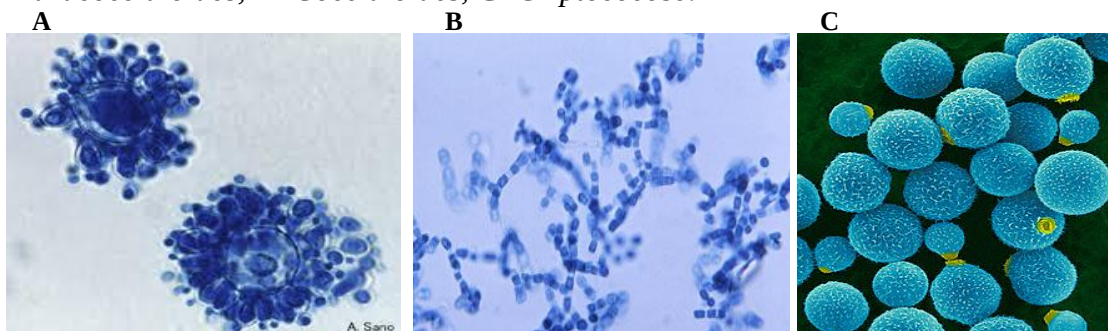
Embora sendo poucas as espécies patógenas ao homem, elas podem ser bem agressivas. As micoses sistêmicas, por exemplo, causadas por fungos patógenos primários que são capazes de iniciar uma infecção em um hospedeiro imunocompetente, têm como porta de entrada o trato respiratório, podendo se disseminar para todo o organismo, o que tem se tornado um problema de saúde pública, como o registrado pela Vigilância Sanitária do Estado Goiás que listou as principais micoses ocorrentes no Estado (Figura 3), o que corrobora com as principais micoses sistêmicas endêmicas no Brasil que são: Paracoccidioidomicose, Coccidioidomicose e Criptococose (Figura 4 A, B, C) (<http://www.visa.goias.gov.br/post/ver/133934/micoses-sis>, 2014) e aquelas causadas pelas leveduras do gênero *Candida*, que possuem a capacidade de degradar a queratina da pele, servindo como principal fonte nutricional, conhecidos como fungos queratinofílicos (RODRIGUES et al., 2010).

Figura 3- Diagnóstico laboratorial das micoses sistêmicas e oportunistas no Estado de Goiás no período de 2009 a fevereiro de 2012.



Fonte: <http://www.visa.goias.gov.br/post/ver/133934/micoses-sis>. Acesso em: 10/11/2014.

Figura 4- Principais gêneros de fungos que causam problemas respiratórios. A- *Paracoccidioides*, B- *Coccidioides*, C- *Criptococose*.

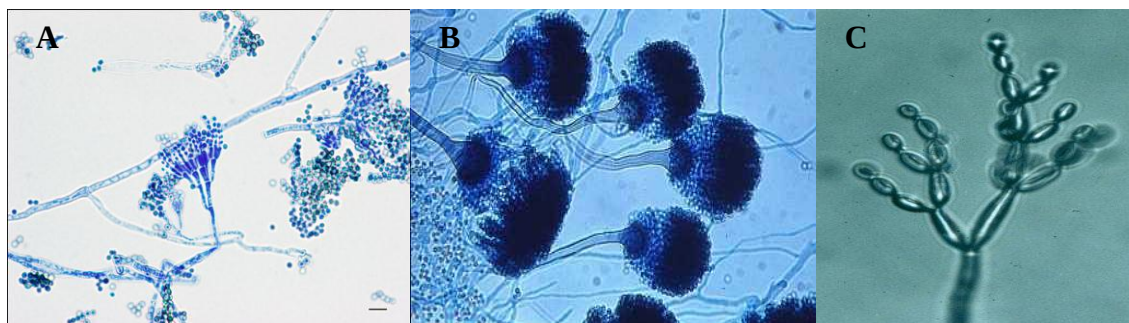


Fonte: <http://www.cdc.gov/fungal/diseases/coccidioidomycosis/definition.html>, <http://www.pharmagistral.com.br>, <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Cryptococcus>. Acesso em: 10/11/ 2014.

Outros gêneros de fungos como *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium* (Figura 5) também são de importância médica e sua dispersão através do ar pode causar uma série de doenças respiratórias, inclusive fibrose cística, pneumonias, bronquite, sinusites e bronco-pneumonias alérgicas (ALTUNATMAZ; ISSA; AYDIN, 2012). O *A. fumigatus* e a *C. albicans* são espécies mais comumente associadas a estas enfermidades e acometem pacientes com sistema imunológico debilitado (AMIN, 2009; CHORTMALL; McELVANEY, 2014) e, estas enfermidades também estão associadas a pacientes, trabalhadores rurais de fazendas produtoras de cogumelos na China, cujos problemas respiratórios foram provenientes das micotoxinas e açúcares da parede

celular do fungo que induzem a reações tóxicas ou imunológicas favorecidos pelo clima, umidade e temperatura adequados ao seu desenvolvimento (LEE; LIAO, 2014).

Figura 5 - Gêneros de fungos de importância médica. A- *Penicillium*, B- *Aspergillus*, C- *Cladosporium*.



Fonte: <http://www.inspq.qc.ca/english/mould-compendium/penicillium-spp>,
http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2008/miller_melo/, <http://website.nbm-mnb.ca/mycologywebpages/Moulds/Cladosporium.html>. Acesso em: 10/11/2014.

Estudos epidemiológicos indicam que as micoses superficiais estão entre as doenças humanas mais comuns. Variando de 20% a 25% da população mundial, sendo o 3º distúrbio cutâneo mais encontrado em crianças abaixo de 12 anos de idade, variando de acordo com o sexo, idade, grupo étnico, hábitos culturais, sociais e região geográfica (SOMENZI et al, 2006; POLO; GRAZZIOTIN, 2011). O vírus da imunodeficiência humana (HIV) colabora na elevação do número de infecções fúngicas oportunistas, causada por candidíase, criptococose, histoplasmose e penicilose (PARK et al., 2011; SALONEN et al., 2014).

No Brasil, no município de Novo Hamburgo/RS, foi registrado no período de novembro de 2010 a agosto de 2011 a ocorrência de 42% de indivíduos com algum tipo de infecção fúngica nas unhas ou pele, onde 22,9% eram mulheres adultas, 8,1% homens adultos, 6% idosos masculinos, 3,4% idosos feminina, negativo para adolescentes e 1,4% em crianças, onde foi demonstrado maior incidência do gênero *Trichophyton* (38,7%); *Candida* (22,6%) e *Microsporum* (10%) (ROCHA; VIERA, 2014). Em 2009 na cidade de Araraquara/SP, 43% das amostras coletadas foram observadas a mesma incidência dos gêneros, em pessoas de ambos os sexos, com faixa etária entre 41 e 50 anos (WILLE, ARANTES, SILVA, 2009). Em adição, ao gênero

Trichophyton também foi isolado em 6,6% dos felinos mantidos em centros de triagem (ALBANO et al., 2013).

No que diz respeito à *Candida*, quase todos os estudos anteriores no Brasil foram realizados durante curtos períodos de tempo, dificultando conclusões adequadas a respeito das taxas de incidência, tendências de distribuição e características epidemiológicas (NUCCI et al., 2010). Porém, um estudo retrospectivo foi realizado para avaliar as tendências históricas das taxas de incidência e as características epidemiológicas de todos os casos de candidemia documentados em um grande hospital terciário (3ª idade) de São Paulo no Brasil, durante um período de 11 anos (1994-2004), as avaliações epidemiológicas demonstram que o gênero *Candida* é o causador de um grande número de infecções na corrente sanguínea (ICS) com prevalência de 42,4%, onde 2,47% das cepas mostraram-se resistentes ao fluconazol e, a incidência de mortalidade entre os idosos foi de 55,4% (WILLE et al., 2013).

Pesquisas demonstram que em hospitais terciários brasileiros, aqueles que atendem a idosos, a taxa de incidência continua elevada, variando de 1,27–2,49 para cada 1.000 internações (MOTTA et al., 2010; PEREIRA et al., 2010). Porém, estudos realizados em hospitais dos Estados Unidos e vários países europeus têm mostrado uma taxa de incidência bem mais baixa, variando de 0,28–0,96 e 0,02–1,08 para cada 1.000 internamentos, respectivamente (POIKONEN et al., 2010; ARENDRUP et al., 2011; DAS et al., 2011). Mais de 90% das infecções invasivas por *Candidas* são atribuídas a cinco espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (PFALLER; DIEKEMA, 2010).

Trabalho realizado recentemente para medir a concentração de esporos fúngicos do ar em ambientes escolares de clima subtropical, demonstrou que na maioria dos edifícios escolares a concentração média total dos fungos filamentosos do gênero *Penicillium spp*, *Cladosporium spp* e *Aspergillus spp* no interior das salas de aulas e na parte externa foi de 680, 480 e 90 UFC/m³ respectivamente, baseado no modelo Bayesiano o aumento tanto da temperatura como da umidade resultou em níveis mais elevados na concentração fúngica (SALONEN et al., 2014).

Contudo, embora dados demonstrem a gravidade das doenças fúngicas, de maneira geral, os fungos não são capazes de causar doenças graves em pessoas com sistema imunológico saudável, entretanto, vários fatores de risco podem ser descritos para o desenvolvimento das doenças fúngicas, particularmente em pacientes com o sistema imunológico comprometido, entre eles, cita-se: diferentes terapias que suprimem os sistema immune, tratamento com drogas antineoplásicas (quimioterapias), uso de corticóides, doenças imunossupressoras (AIDS, insuficiência renal, diabetes, doença pulmonar, câncer), linfomas e queimaduras extensas. Onde o tratamento deverá ser direcionado com drogas antifúngicas e em alguns casos fototerapias (HUMME et al., 2014).

Os tratamentos com fototerapias devem ser direcionadas em áreas localizadas, nas dose de 30–36 Gy entre 6-10 semanas, podem ser eficientes em pacientes com linfomas (MORAES et al., 2014). Porém, terapias combinadas, para tratamento contra fungos, nem sempre têm sido superior a monoterapia, especialmente em pacientes em estado avançado. A combinação do bexaroteno com gentamicina resultou em efeitos colaterais em pacientes, agravando seu estado geral, o que torna o tratamento inadequado e não recomendado (HUMME et al., 2014). Terapias baseadas em produtos naturais, como óleos essenciais, são eficientes contra fungos filamentosos, porem sua aplicação está limitado à agricultura ou na indústria de alimento (ZABKA; PAVELA, 2013).

Deste modo, fica evidente a necessidade de pesquisas e desenvolvimento de novos tratamentos antifúngicos alternativos à base de substâncias antifúngicas naturais ou sintética, uma vez que o desenvolvimento da resistência contra os fungicidas comumente usados se tornaram um problema crítico em algumas áreas, tais como a agricultura, o armazenamento e produção de alimentos e até mesmo em medicamentos de uso humano.

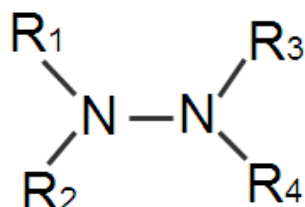
2.2 Compostos Sintéticos e Atividade Antifúngica

As pesquisas de compostos sintéticos com atividade antifúngica têm sido amplamente desenvolvidas em todo mundo. Sua aplicabilidade abrange grandes áreas como bioquímica, agricultura e farmacologia. Atualmente, tem-se aumentado a procura

por fármacos mais eficazes e seguros, que causem menos efeitos colaterais possíveis, proporcionando aos seus usuários menor rejeição e maior sucesso nos tratamentos. Nesse contexto, a química orgânica medicinal através de planejamentos e modificações moleculares, tem contribuído para um crescimento considerável no número de novos compostos sintéticos, para serem empregados no combate a diversas doenças incluindo as microbiológicas (PAGE et al., 1999).

As hidrazinas (Figura 6) com seus derivados, por exemplo, representam uma importante classe de compostos utilizados em síntese orgânica, com boa atividade antifúngica em leveduras (LONCLE et al., 2004). A estrutura química da dupla ligação entre o carbono e nitrogênio, facilita a reação de condensação na fusão entre e N-heterocíclico na formação de estruturas com atividade antimicrobiana (RASHED et al., 1990). Como exemplo, as hidrazonas variadas demonstraram atividade antifúngica, contra *Candida albicans* com efeito comparável aos antifúngicos padrões (KHIDRE; HASHEM; SHAZLY, 2011).

Figura 6- Estrutura básica da hidrazina.



Fonte: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hidrazina-hydrazine.png>. Acesso em: 09/12/2014.

Outros compostos, como a fenotiazina têm sido relacionadas por possuir diversas propriedades com atividade biológica dentre elas a antimicrobiana (ARULMURUGAN; KAVITHA; VENKATRAMAN, 2010). Um método simples foi desenvolvido na síntese dos derivados de N-acil substituídos de fenotiazinas e, todos os compostos testados apresentaram atividade antifúngica contra *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus* e *Candida albicans*, variando de moderada a boa em comparação com a droga padrão, com concentrações de 10 a 30 µg/mL (BANSODE; SHELKE; DONGRE, 2009).

As dicarboximidas são uma classe de fungicidas utilizadas há muito tempo em forma de sprays, nas folhagens, frutas, legumes e plantas ornamentais, com pouca toxicidade, em plantas e animais, em excesso há possibilidade de serem cancerígenos. Novos compostos como dicarboximidas-Iprodione e vinclozolina são correlacionados com os antifúngicos Captan, Folpet e Captafol, porém eles não apresentam uma ação tão ampla, e são mais propensos a resistência fúngica (GUIBERTEAU et al., 2001).

As ftalimidas nome adotado pelo Chemical Abstract (CAS Nº85-41-6), pertencente a família química das imidas cíclicas que apresentam os grupamentos –CO-N(R)-CO-, sendo R um átomo de hidrogênio grupo alquila ou grupo arila. Podem ser preparadas a partir da reação de condensação do ácido ou anidrido ftálico e amônia (aminas apropriadas) com eliminação de água (Figura, 7). Tais compostos podem ser divididos em subclasses: maleimidas, succinimidas, glutarimidas, ftalimidas, naftalimidas, entre outras, e seus respectivos derivados (BARBOSA; OLIVEIRA, 2011).

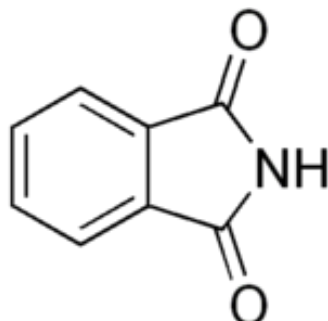
Os derivados ftalimidicos são uma classe importante de compostos heteroaromáticos amplamente estudados dentro da medicina química, pois apresentam diferentes atividades biológicas, tais como, hipolipidêmica (ABDEL-AZIZ et al., 2011; EL-ZAHABI et al., 2012), anti-inflamatória (FALCÃO et al., 2006), antitumoral (HORVAT et al., 2012), antiviral (VAN DERPOORTEN et al., 1997), analgésica (ANDRICOPULO et al., 2000), antimicrobiana (SHURONG; WENBIN; ZHEN, 2011), anticonvulsivante (KAMINSKI et al., 2011; YADAV et al., 2012).

As imidas cíclicas, por exemplo, são raramente encontradas na natureza, porém o isolamento e identificação do alcalóide filantimida de origem vegetal propiciou descoberta de muitos análogos sintéticos com potencial terapêutico (CECHINEL FILHO; CAMPOS; CORRÊA, 2003).

Novas ftalimidas ligadas N-heterociclos foram sintetizadas e testadas quanto a sua atividade antifúngica contra sete fungos fitopatogênicos: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium.sp.*, *Cucumerinum Owen.*, *Botrytis cinerea*, *Fulvia fulva*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora capsici*, *Botryosphaeria berengeriana*. Os resultados mostraram que os compostos de estrutura 6-metilpiridin-2-il exibiram boa

atividade contra dois fungos *Phytophthora capsici* e *Botrytis cinérea* dos nove testados (SHURONG; WENBIN; ZHEN, 2011).

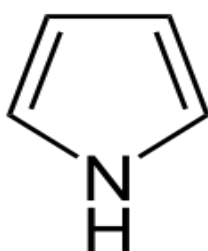
Figura 7- Estrutura básica de uma imida cíclica – ftalimida.



Fonte: <http://es.wikipedia.org/wiki/Imida>. Acesso em: 03/01/2015.

Os triazóis são compostos sintéticos, que não são encontrados na natureza, apresentam anéis aromáticos heterocíclicos nitrogenados com cinco membros contendo um ou mais átomos de nitrogênio, podendo ainda apresentar átomos enxofre ou oxigênio. Os triazóis pertencem a classe de substâncias denominadas genericamente de azol, onde a molécula mais simples é conhecida como pirrol (Figura, 8) (DE SOUZA et al., 2005). Estes compostos encontram-se entre os mais estudados dos sistemas heterococlicos, uma vez que, apresentam um vasto campo de aplicações biotecnológicas, como por exemplo, na produção de explosivos, nas indústrias farmaceutica e agroquímica (AGALAVE; MAUJAN; PORE, 2011).

Figura 8 – Estrutura química da molécula pirrol.



Fonte: universoquimico.blogspot.com. Acesso em: 13/01/2015.

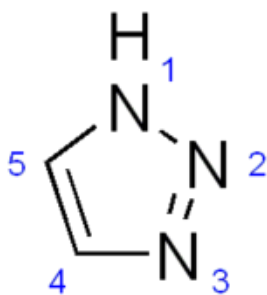
Recentemente foram sintetizados compostos antifúngicos de triazol por substituição bioisotérica de heterociclo – benzeno onde ocorreu uma melhora no perfil farmacocinético, na atividade antifúngica do tiazol em três leveduras patogênicas:

Cândida albicans, *C. tropicalis* e *Cryptococcus neoformans* com o valor do MIC de um dos compostos testados, nomeado como 8f, de 0,016 µg/mL, 0,004 µg/ml e 0,016 µg/mL respectivamente, para os fungos testados (JIANG et al., 2013).

A necessidade do desenvolvimento de novos fármacos, que sejam efetivos contra algumas patologias ainda sem tratamento adequado, e possam substituir os existentes, a custos menores e dotados de menores efeitos adversos, tem impulsionado a comunidade científica a novas e incessantes pesquisas nesta área. A síntese orgânica tem contribuído significativamente neste aspecto, sendo responsável por cerca de 75% dos fármacos existentes no mercado farmacêutico (CECHINEL FILHO; CAMPOS; CORRÊA, 2003).

O heterociclo 1,2,3-triazol (Figura 9) pode ser sintetizado por várias rotas, a pioneira foi a preparação de 2-aryl-1,2,3-2H-triazóis a partir do tratamento da bis-fenil-hidrazona derivadas de compostos 1,2-dicarboxílicos com ácido nítrico, na reação de cicloadição 1,3-dipolar que ocorre entre azidas e substâncias que contém ligações duplas ou triplas, tem sido estudadas desde 1893 (MELO et al., 2006).

Figura 9- Estrutura química de 1,2,3-triazol.



Fonte: en.wikipedia.org. Acesso em: 13/01/2015.

Considerando-se a importância químico-medicinal das imidas cíclicas e de seus derivados, bem como os excelentes resultados encontrados e publicados até o presente momento (PIERWOCHA; WALCZAK, 2008), pretende-se sintetizar compostos inéditos derivados da ftalimida ligadas a triazóis através da introdução de novos substituintes no anel imídico, no intuito de se obter compostos mais potentes, e que possam ser visados como moléculas-protótipo para a síntese de novos e eficientes fármacos.

3. REFERENCIAS

AKGÜN, H et al. Synthesis and antimycobacterial activity of some phthalimide derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 4149–4154, 2012.

ABDEL-AZIZ, A. et al. Synthesis and biological evaluation of some novel cyclic-imides as hypoglycaemic, anti-hyperlipidemic agentes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 4324-4329, 2011.

AGALAVE, S. G.; MAUJAN, S. R.; PORE, V. S. Click chemistry: 1,2,3-triazoles aspharmacophores. **Chemistry an Asian Journal**, v. 06, p. 2696-2718, 2011.

ALBANO, N. et al. Isolation of dermatophytes in wild felids from screening centers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 171-174, 2013.

ALTUNATMAZ, S. S; ISSA, G.; AYDIN, A. Detection of airborne psychtrophic bacteria and fungi in food storage refrigerators. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1436-1443, 2012.

AMIN R, et al. The Effect of Chronic Infection With *Aspergillus fumigatus* on Lung Function and Hospitalization in Cystic Fibrosis Patients. **Epub ahead of print**, Chest. 30 Jun 2009.

ANDRICOPULO, A. et al. Analgesic activity of cyclic imides: 1,8-naphthalimide and 1,4,5,8-naphthalenediimide derivatives. **Il Farmaco**, v. 55, p. 319-321, 2000.

ARENDRUP M. et al. National surveillance of fungemia in Denmark (2004 to 2009). **Journal Clinic Microbiology**, v. 49, p. 325-334, 2011.

ARULMURUGAN. S; KAVITHA, H. P; VENKATRAMAN, B. R. Synthesis, characterization and study of antibacterial activity of some novel tetrazole derivatives. **Orbital Electronic Journal Chemical**, v. 2, p. 271-276, 2010.

BANSODE T.N.; SHELKE J.V.; DONGRE V.G.. Synthesis and antimicrobial activity of some new N-acyl substituted phenothiazines. **Eur J M Chem** v. 44, p. 5094-5098, 2009.

BARBOSA F. C. G; OLIVEIRA R. N. Synthesis of a New Class of Triazole-linked Benzoheterocycles via 1,3-Dipolar Cycloaddition. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 592-597, 2011.

CECHINEL FILHO; CAMPOS, F; CORRÊA R. Aspectos químicos e potencial terapêutico de imidas cíclicas: uma revisão da literatura. **Quimica Nova**, v. 26, p. 230-241, 2003.

CHORTMALL, S; McELVANEY, N. G. Fungi in the cystic fibrosis lung: bystanders or pathogens. **The international Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 52, p. 161-173, 2014.

DAS I. et al. Epidemiology, clinical characteristics and outcome of candidemia: experience in a tertiary referral centre in the UK. **International Journal Infectious Disease**, v. 15, p. 759-763, 2011.

DE VRIES, R. P et al. Hemi-celulose degrading enzymes and their encoding genes from *Aspergillus* and *Trocoderma*. In: Hofrichter, M. (Ed.). **The Mycota X Industrial Applications**, pp. 341-355, 2010.

DUNCAN, S. M. et al. Monitoring and identification of airborne fungi at historic locations on Ross Island, Antarctica. **Polar Science**, v. 4, p. 275-283, 2010.

DE SOUZA, M. V. N. et al. Métodos de obtenção e aplicações sintéticas de tiazóis, uma importante classe de compostos heterocíclicos. **Química Nova**, v. 28, p. 77-84, 2005.

EL-ZAHABI, M. et al. Synthesis of new cyclic imides derivarives with potential hypolipidemic activity. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, p. 75-84, 2012.

FALCÃO, E. P. et al. Synthesis and antiinflammatory activity of 4-amino-2-aryl-5-cyano-6-{3- and 4-(N-phthalimidophenyl)} pyrimidines. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 41, p. 276-282, 2006.

GARCIA-SOLACHE MA, CASADEVALL A. Global warming will bring new fungal diseases for mammals. **mBio** 2010.

GUIBERTEAU, A. et al. Resolution by polarographic techniques of the ternary mixture of captan, captafol and folpet by using PLS calibration and artificial neuronal networks. **Computers & Chemistry**, v. 25, p. 459-473, 2001.

HAWKSWORTH, D. L.; HILL, D. J. **The lichen-forming fungi**. Blackie, Glasgow and London. 1984.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycology Research**, v. 105, p.1422–1432, 2001.

HORVAT, M. et al. Evaluation of antiproliferative effect of N-(alkyladamantyl) phthalimides in vitro. **Chemical Biology & Drug Desing**, v.79, p. 497-506, 2012.

<http://www.pharmagistral.com.br>,
<http://www.cdc.gov/fungal/diseases/coccidioidomycosis/definition.html>,
<https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Cryptococcus>. Acesso em: 10/11/ 2014.

<http://www.inspq.qc.ca/english/mould-compendium/penicillium-spp>,
http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2008/miller_melo/, <http://website.nbm-mnb.ca/mycologywebpages/Moulds/Cladosporium.html>. Acesso em: 10/11/2014.

<http://www.visa.goias.gov.br/post/ver/133934/micoses-sis>, Acesso em: 10/11/2014.

<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hidrazina-hydrazine.png>. Acesso em: 09/12/2014.

<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAepSIAL/doencas-fungicas>. Acesso em 08/01/2015

<http://es.wikipedia.org/wiki/Imida>. Acesso em: 03/01/2015.

<http://en.wikipedia.org/wiki/User:Beetstra/listing1> Acesso em: 13/01/2015.

<http://universoquimico.blogspot.com.br/2012/02/compostos-heterociclicos.html> Acesso em: 13/01/2015.

<http://synararillo.com.br/?p=281> Acesso em 10/11/2014.

HUMME, D et al. Systematic review of combination therapies for mycosis fungoides. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, p. 927–933, 2014.

JIANG, Z. et al. Discovery of highly potent triazole antifungal derivatives by heterocycle-benzene bioisosteric replacement. **European journal of medicinal chemistry**, v. 64, p. 16-22, 2013.

KAMINSKI, K. et al. Synthesis and anticonvulsant properties of new acetamide derivatives of phthalimide, and its saturated cyclohexane and norbornene analogs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 4634-4641, 2011.

KHIDRE, R. E; ABU-HASHEM. A; EL-SHAZLY, M. A. Synthesis and anti-microbial activity of some 1- substituted amino-4, 6-dimethyl-2-oxo-pyridine-3-carbonitrile derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 5057-5064, 2011.

LEE, S; LIAO, C. Size-selective assessment of agricultural workers' personal exposure to airborne fungi and fungal fragments. **Science of the Total Environment**, v. 466–467, p. 725–732, 2014.

LONCLE, C. et al. Synthesis and antifungal activity of cholesterol-hydrazone derivatives. **European Journal Medical Chemical**, v. 39, p. 1067-1071. 2004.

MÄKELÄ, M. R; DONOFRIO, N; VRIES, R. P. Plant biomass degradation by fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v. 72, p. 2-9, 2014.

MARTINS, M. C. B. **Aplicações biotecnológicas de compostos obtidos dos liquens**. 2012. 300 f. Tese (Doutorado em Bioquímica em Fisiologia) - Universidade Federal de Pernambuco/UFPE, Recife, 2012.

MELO, J. O. F. et al. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. **Química Nova**. V. 29, 2006.

MINISTRY OF AGRICULTURE OF CANADA. Grape diseases: Botrytis Bunch Rot (*Botrytis cinerea*). Net, 2010. Disponível em: <<http://www.agf.gov.bc.ca/cropprot/grapeipm/bunchrot.htm>> Acesso em: 20 Nov 2010.

MORAES, F. et al. Literature review of clinical results of total skin electron irradiation (TSEBT) of mycosis fungoides in adults. **Reports of Practical Oncology and Radiotherapy**, v. 19, p. 92-98, 2014.

MOTTA A. L. et al. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. **Brazilian Journal Infectious Disease**, v. 14, p. 441-448, 2010.

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

PAGE, C. et al. Farmacologia integrada. Ed. Manole Ltda: São Paulo. 606 p. 1999

PARK, J. et al. Epidemiology of systemic fungal diseases: an overview. In: **Essentials of Clinical Mycology**. Springer New York, p. 27-37, 2011.

PFALLER, M. A.; D. J. DIEKEMA. Epidemiology of invasive mycoses in North America. **Critical Review Microbiology**, v. 36, p. 1-53. 2010.

PEREIRA G. et al. Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-albicans *Candida* species. **Medical Mycology**, v. 48, p. 839-842, 2010.

POLO A; GRAZZIOTIN N. A. Micoses superficiais em idosos residentes em entidade beneficente na Região Norte do estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 43, p. 29-33. 2011.

PIERWOCHA A.W, WALCZAK K. The use of tri-O-acetyl-D-glucal and -D-galactal in the synthesis of omega-aminoalkyl 2-deoxy- and 2,3-dideoxy-d-hexopyranosides. **Carbohydr Research**, v. 13, p. 2680-2686, 2008.

POIKONEN E. et al. Secular trend in candidemia and the use of fluconazole in Finland, 2004-2007. **BMC Infectious Disease** v. 28, p. 312, 2010.

RASHED, N. et al. A facile synthesis of novel triazoloquinoxalinones and triazinoquinoxalinones. **Journal Heterocyclic Chemistry**, v. 27, p. 691-694, 1990.

ROCHA, D.; VIEIRA, F. A. S. Levantamento Epidemiológico de Infecções Fúngicas de Pacientes Atendidos em um laboratório da Região do Vale dos Sinos, RS. **News Lab**, v. 121, p. 100-108, 2014.

RODRIGUES, D. et al. **Atlas de dermatologia em povos indígenas [on line]**. São Paulo: Editora, Unifesp, 2010.

SALONEN, H. et al. Airborne culturable fungi in naturally ventilated primary school environments in a subtropical climate. **Atmospheric Environment**, v. 30, p. 1-7, 2014.

SHURONG, S; WENBIN, C; ZHEN, X. Synthesis and *in vitro* Fungicidal Activity of a Series of Novel *N*-(Heterocycly) phthalimides. **Chinese Journal Chemical**, v. 29, p. 515-520, 2011.

SILVA, R. R.; COELHO, G. D. Fungos. Principais grupos e aplicações biotecnológicas. **Instituto de Botânica (IBt)**. Jardim Botânico, São Paulo. P. 20, 2006.

SOMENZI, C. C, RIBEIRO, T. S, MENEZES A. Características Particulares da Micologia Clínica e o Diagnóstico Laboratorial de Micoses Superficiais. Universidade Santa Cecília e Fundação Lusíada/UNILUS. Santos. SP. **NewsLab**, v. 77, p. 106-108, 2006.

VAN DERPOORTEN, K. et al. Anti-HIV activity of N-1-adamantyl-4-aminophthalimide. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 51, p. 464-468, 1997.

WILLE M. P.; ARANTES, T. D.; SILVA J. L. M. "Epidemiologia das dermatomicoses em população da periferia de Araraquara-SP. **Revista Brasileira Clinica Medica**, v. 7, p. 295-298, 2009.

WILLE, M. et al. Historical trends in the epidemiology of candidaemia: analysis of an 11-year period in a tertiary care hospital in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, p. 288-292, 2013.

YADAV, N. et al. Synthesis, characterization, and pharmacological evaluation of new GABA analogs as potent anticonvulsant agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, p. 2208-2216, 2012.

ZABKA, R; PAVELA, R. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. **Chemosphere**, v. 93, p. 1051-1056, 2013.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

Sintetizar e avaliar a atividade antimicrobiana de novas ftalimidas ligadas a 1,2,3-triazóis.

4.2 Específicos

Preparar *N*-[*n*(azidas) alquil] ftalimidas com cadeia alifática $-(CH_2)_n$ ($n= 1,2,3$) e 1,4-di substituído 1,2,3-triazóis.

Realizar a síntese de ftalimidas com 1,2,3-triazóis:

1a=4-(benzothiazol-2-ylsulfanyl)-methyl-1-(*N*-phtalimidomethyl)-1,2,3-triazole.

2a=4-(benzothiazol-2-ylsulfanyl)-methyl-1-(2-phtalimidoethyl)-1,2,3-triazole.

1b=4-(phenyl)-1-(*N*-phtalimidomethyl)-1,2,3-triazole.

2b=4-(phenyl)-1-(2-phtalimidoethyl)-1,2,3-triazole.

Caracterizar as estruturas dos novos compostos sintetizados por meios espectroscópicos (^{13}C RMN, IR) e físicos (rotação óptica, ponto de fusão e análise elementar) e cromatografia em camada delgada (CCD).

Verificar a atividade antibactericida e antifúngica dos compostos sintetizados.

Calcular a concentração inibitória mínima dos compostos com atividade bactericida e antifúngica.

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

ARTIGO

Potencial antimicrobiano das novas ftalimidas ligadas a 1,2,3-triazóis



Qualis A2 - BII

Fator de impacto – 3.811

Potencial antimicrobiano das novas ftalimidas ligadas a 1,2,3-triazóis

¹Espirito Santo Filho, A.R., ¹Assis, S.P.O., ²Lacerda Filho, A. M., ³Araujo, J.M.,
¹Martins, M.C.B., ¹Lima, V.L.M.

¹ Departamento de Bioquímica, UFPE, Recife/PE. ² Departamento de Micologia, UFPE, Recife/PE. ³ Departamento de Antibióticos, UFPE, Recife/PE.

Resumo

Modificações químicas em moléculas conhecidas podem torná-las biologicamente mais ativas, por isso este trabalho teve como objetivo sintetizar e avaliar a atividade antifimicrobiana de novos derivados ftalimídicos ligados a 1,2,3-triazóis. Os compostos foram sintetizados através da reação entre *N*-2- (azidaetil) ftalimida com cadeia alifática *n*=2 e alcino aromático, na presença de iodeto de cobre (CuI), trietilamina e dimetilformamida (DMF). O *screening* antimicrobiano foi realizado através do teste de difusão em Agar. Discos de papel foram impregnados com 50 µL das novas ftalimidas (**1a**, **2a**, **1b**, **2b** - 0,6 mg/disco) previamente inoculados. A análise quantitativa foi realizada através da CMI, onde placas de 90 poços receberam 10 µL da suspensão de esporos, 40 µL da ftalimida **2a** (20 mg/mL) e 160 µL de meio Sabouraud, sendo utilizada a anfotericina B como droga padrão. As microplacas foram avaliadas em leitor de Elisa (490 nm e 605 nm), e coradas com resazurina. Os resultados demonstraram atividade em 60% dos microrganismos testados, os compostos não foram ativos para seis tipos de bactérias. Os melhores diâmetro da zona de inibição foram obtidos nos fungos filamentosos com as ftalimidas **1a** e **2a**. A nova ftalimida **2a** mostrou os diâmetros mais expressivos (33 – 65 mm), inibindo 14 dos 18 fungos testados. A CMI da nova ftalimida **2a** variou entre 5-20 µg/mL. A nova ftalimida **2a** demonstrou ter potente atividade antifúngica principalmente para fungos filamentosos e poderá servir como protótipo para novas drogas com ação antifúngica.

Palavras-chave: Atividade antifúngica, Compostos sintéticos, Fungos filamentosos.

Introdução

O Reino fungi é bastante diversificado e sua presença na natureza é fundamental para ciclagem dos nutrientes, entretanto algumas espécies são patógenas para plantas, animais e homem. Embora sendo poucas as espécies patógenas ao homem, elas podem ser bem agressivas, como por exemplo, as micoses sistêmicas causadas por fungos patógenos primários (capazes de iniciar uma infecção em hospedeiro saudável), têm como porta de entrada o trato respiratório, podem se disseminar para todo o organismo, o que tem se tornado um problema de saúde pública (Rodrigues et al., 2010). Estudos epidemiológicos indicam que as micoses superficiais estão entre as doenças humanas mais comuns sendo encontradas entre 20-25% da população mundial, sendo o terceiro distúrbio cutâneo mais encontrado em crianças abaixo de 12 anos de idade, variando de acordo com o sexo, idade, grupo étnico, hábitos culturais, sociais e região geográfica (Somenzi et al, 2006; Polo; Grazziotin, 2011).

Embora existam medicamentos muito eficientes os antibióticos estão entre os mais indiscriminadamente utilizados, sendo um fator de contribuição para o crescimento do problema mundial de resistência bacteriana e fúngica. Por esta razão fica claro o porquê da procura por fármacos antifúngicos, mais eficazes e seguros, que causem menos efeitos colaterais, sejam específicos, o que proporcionaria aos seus usuários menor rejeição, menor desenvolvimento da resistência dos fungos e como consequência maior sucesso nos tratamentos. Nesse contexto, a química orgânica medicinal através dos planejamentos e modificações moleculares tem contribuído para a maior parte das novas descobertas, observando-se um crescimento considerável de compostos sintéticos para uso medicinal, os quais têm sido empregados no combate não só das doenças antimicrobianas, mas em diversas outras doenças (Page et al., 1999).

Algumas classes de compostos orgânicos, apresentam grande variedade estrutural, com atividade biológica de interesse médico e algumas modificações nestas estruturas, podem torná-las biologicamente mais ativas (Costas, 2002), a exemplo das imidas cíclicas e seus derivados, que podem ser obtidos através da introdução de novos anéis imídico, no intuito de se obter compostos mais potentes, e que possam ser visados como moléculas-protótipo para a síntese de novos e eficientes fármacos (Jales Filha, 2006).

As ftalimidas são imidas cíclicas que apresentam os grupamentos $-\text{CO}-\text{N}(\text{R})-\text{CO}-$, sendo R um átomo de hidrogênio grupo alquila ou grupo arila. Podem ser preparadas a partir da condensação de anidrido ftálico com aminas apropriadas. Tais compostos podem ser divididos em subclasses: maleimidas, succinimidas, glutarimidas, ftalimidas, naftalimidas, entre outras, e seus respectivos derivados. Em geral apresentam atividade analgésica, hipolipidêmicas e anticonvulsivante (Barbosa; Oliveira, 2011).

Portanto, considerando-se a importância químico-medicinal das imidas cíclicas e de seus derivados, bem como os excelentes resultados encontrados e publicados até o presente momento (Pierwocha; Walczak, 2008). Este trabalho descreve a síntese de compostos inéditos derivados da ftalimida ligado a 1,2,3-triazóis através da introdução de novos substituintes no anel imídico, no intuito de se obter compostos mais potentes, e que possam ser visados como moléculas-protótipo para a síntese de novos e eficientes fármacos.

Materiais e métodos

Síntese das novas ftalimidas

As novas ftalimidas 4-(benzotiazol-2-ilsulfanil)-metil-1-(N-ftalimidometil)-1,2,3-triazol (**1a**); 4-(benzotiazol-2-ilsulfanil)-metil-1-(2-ftalimidoetil)-1,2,3-triazol (**2a**); 4-(fenil)-1-(N-ftalimidometil)-1,2,3-triazol (**1b**); 4-(fenil)-1-(2-ftalimidoetil)-1,2,3-triazol (**2b**) foram sintetizadas através da reação entre o composto *N*-[n(azidas)alquil]ftalimidas com cadeia alifática $-(\text{CH}_2)_n$ ($n=1,2,3$), do terminal alcane e do 1,4-disubstituído 1,2,3-triazóis na presença de iodeto de cobre (CuI), trietilamida e dimetilformamida (DMF) a 25 ± 2 °C sob energia de ultrassom. A reação foi baseada na *click chemistry*.

A confirmação estrutural das novas ftalimidas (**1a**, **1b**, **2a**, **2b**) foi realizada através do ponto de fusão, análise elementar, infravermelho, ressonância magnética nuclear de prótons (RMN ^1H) e carbono (^{13}C) de acordo com Barbosa, Oliveira (2011).

O ponto de fusão de cada uma das novas ftalimidas (**1a**, **1b**, **2a**, **2b**) foi determinado em tubo capilar aberto no aparelho PFMII BioSan. A análise elementar foi realizada através do equipamento EA1110 CHNS-O para determinar o percentual de C,

H, N, S e O da molécula. A análise de infravermelho foi registrada em espectrofotômetro IFS66 Bruker utilizando pastilhas KBr. Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrofotômetro varian Unity Plus-300, 400 MHz usando clorofórmio (CDCl_3) ou dimetil sulfoxido ($\text{DMSO}-d_6$). As substâncias foram monitoradas através de cromatografia em camada delgada (CCD).

Atividade antimicrobiana

Obtenção dos micro-organismos

As novas ftalimidas (**1a**, **1b**, **2a**, **2b**) foram testadas contra as bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus* (UFPEDA-02), *Bacillus subtilis* (UFPEDA-86) e Gram negativas *Escherichia coli* (UFPEDA-224), *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA-396), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA-416), *Salmonella enteritidis* (UFPEDA-414), provenientes do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) assim como, os fungos leveduriformes *Candida krusei* (URM-5840), *C. albicans* (URM-5901), *C. pelliculosa* (URM-6345), *C. glabrata* (URM-6393), *C. parapsilosis* (URM-6951), e os fungos filamentosos *Aspergillus fumigatus* (URM-6641), *A. flavus* (URM-6887), *A. niger* (URM-6474), *Fusarium lateritium* (URM-6835), *F. solani* (URM-6749), *F. oxysporum* (URM-6859), *F. verticillioides* (URM-6057), *Metarhizium anisopliae* (URM-6652), *Colletotrichum gloeosporioides* (URM-6852) e os filamentosos dermatófitos, *Microsporum gypseum* (URM-6921), *M. canis* (URM – 6273), *Trichophyton rubrum* (URM-6753), *T. tonsurans* (URM-6752) obtidos da micoteca do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Teste de difusão com disco

Os testes qualitativos foram realizados através da difusão em disco no meio sólido. Placas de Petri (90 mm) contendo 10 mL de meio Agar Nutriente (AN), para bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas) e Agar Sabouraud para os fungos.

As suspensões dos micro-organismos teste foram obtidas de 2 ml de solução salina (NaCl 0,9%) para bactérias e leveduras. E para os fungos filamentosos foi utilizado 250 μL de 2 ml do tampão fosfato salino (PBS) contendo 0,4 ml de óleo mineral na concentração de 10^5 UFC. ml^{-1} , segundo Bauer *et al.* (1966). Discos de papel de filtro 6,0 mm Whatman no. 1 (100) cortados e esterilizados em autoclave (Soc.

FABBE LTDA. mod. 108) a 120° /30 min. Os discos foram impregnados com 50 µL das novas ftalimidas (**1a**, **2a**, **1b**, **2b**) dissolvidas em dimetil sulfóxido (DMSO) na concentração de 12 mg/mL. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h para bactérias, 30 °C por 48 h para leveduras e 30 °C por 5 dias para os fungos filamentosos. A atividade antimicrobiana foi obtida através da mensuração das zonas de inibição formadas ao redor dos discos, expressos em milímetros (mm). Os testes foram feitos em duplicata, sendo expressos pela média ± DP.

Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima fungicida (CMF)

Para determinação da CMI e CMF foi selecionada a nova ftalimida **2a** que apresentou os maiores diâmetros dos halos de inibição variando entre 33 a 65 mm sobre 10 dos 13 fungos filamentosos testados: *Aspergillus flavus* (URM-6480), *A. fumigatus* (URM-6641), *Fusarium lateritium* (URM-6835), *F. verticillioides* (URM-6057), *Metarhizium anisopliae* (URM-6652), *Colletotrichum gloeosporioides* (URM-6852), *Microsporum gypseum* (URM-6921), *M. canis* (URM – 6273), *Trichophyton rubrum* (URM-6753), *T. tonsurans* (URM-6752). De 11 a 15 mm sobre 4 das 5 leveduras testadas *Candida krusei* (URM-5840), *C. parapsilosis* (URM-6951), *C. albicans* (URM –5901), *C. pelliculosa* (URM-6345).

O crescimento fúngico ocorreu em meio Sabouraud: Peptona (1 g), D-glucose (4 g) dissolvido em água destilada (100 ml), pH 5,6. Para cada cepa, duas alças de esporos foi depositada em 2 mL de tampão PBS pH 7,2 suplementado com 0,4 mL de óleo mineral. A CMI foi determinada pelo método de diluição em placas de 90 poços (NCCLS, 2002), onde cada poço recebeu 10 µL da suspensão de esporos, 40 µL da Ftalimida **2a** (20mg/mL) dissolvida em DMSO (90%) e 160 µL de meio Sabouraud, sendo os grupos controle formados por: controle positivo (CP) meio Sabouraud com 10 µL da suspensão de esporos em DMSO (90%); controle negativo (CN) só meio Sabouraud. A Anfotericina B (20mg/mL) foi usada como droga padrão. A incubação ocorreu a 30 °C por 5 dias de crescimento com avaliação diária. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A determinação da CMF ocorreu no 6º dia, foram retirados 10 µL das concentrações onde foi observada a inibição do crescimento fúngico e, novamente inoculados em placa de Petri contendo 10 mL de Agar Sabouraud. As microplacas

foram submetidas ao leitor de Elisa com comprimento de onda de 492 e 630 nm, em seguida coradas com Resazurina, onde foi determinada a ausência ou presença do crescimento do fungo.

Análise estatística

A análise estatística e o desvio padrão (DP) foram realizados através do GraphPad Prism 5.0 para Windows (GraphPad Software San Diego, CA, USA) e os dados foram expressos como replicatas significativas $\pm$ SD, utilizado a análise de variância one-way (ANOVA).

Resultados

Análise química das novas ftalimidas

Ftalimida (1a): 4-(benzotiazol-2-ilsulfanil)-metil-1-(N-ftalimidometil)-1,2,3-triazol (Figura 1A). R_f 0.45 (Hexane-EtOAc, 4:6); IR ν_{max} / cm^{-1} : 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.07 (s, 1H, H_{triaz}), 8.01 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H_{arom}), 7.91-7.88 (m, 2H, Phth), 7.78-7.75 (m, 3H, $2H_{Phth}$ and H_{arom}), 7.47 (t, 1H, $J = 7.6$ Hz, H_{arom}), 7.35 (t, 1H, $J = 7.6$ Hz, H_{arom}), 6.15 (s, 2H, NCH_2), 4.74 (s, 2H, SCH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 166.4, 165.5, 152.9, 144.4, 135.3, 134.8, 131.3, 126.0, 124.3, 124.2, 124.1, 124.0, 121.5, 121.0, 49.6, 27.5. Anal. Calcd. $C_{19}H_{13}N_5O_3S_2$: C, 56.00; H, 3.22. Achado: C, 55.70; H, 3.61.

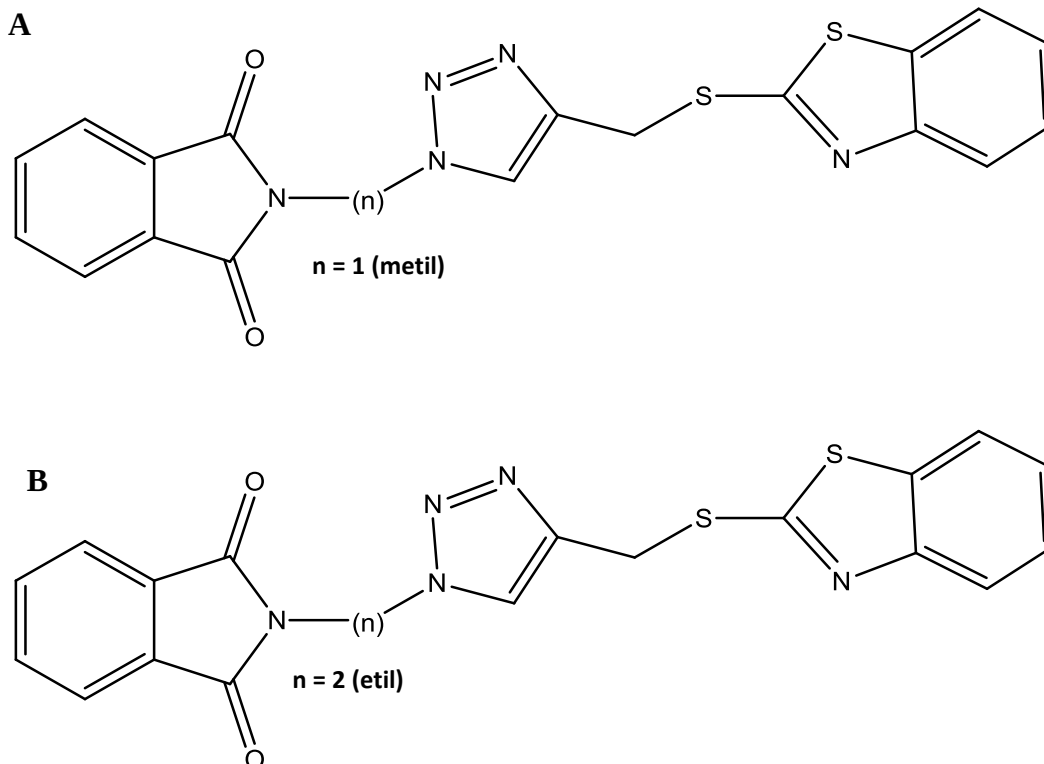
Ftalimida (2a): 4-(benzotiazol-2-ilsulfanil)-metil-1-(2-ftalimidoetil)-1,2,3-triazol (Figura 1B). R_f 0.44 (Hexane-EtOAc, 1:1); IR ν_{max} / cm^{-1} : 3140, 2959, 1781, 1721, 1460, 1430, 1400, 1313, 1012, 942, 760, 720. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.87 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz, H_{arom}), 7.75-7.72 (m, 4H, $2H_{Phth}$, H_{arom} and H_{triaz}), 7.66-7.64 (m, 2H, Phth), 7.42 (t, 1H, $J = 7.2$ Hz, H_{arom}), 7.31 (t, 1H, $J = 7.2$ Hz, H_{arom}), 4.67 (s, 2H, SCH_2), 4.64 (t, 2H, $j = 5.6$ Hz, NCH_2), 4.12 (t, 2H, $j = 5.6$ Hz, NCH_2). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 167.5, 166.3, 152.4, 144.2, 135.2, 134.2, 131.5, 126.2, 124.5, 123.4, 123.3, 121.3, 121.1, 48.0, 37.6, 27.7. Anal. Calcd. $C_{20}H_{15}N_5O_2S_2$: C, 56.99; H, 3.59. Achado: C, 57.35; H, 3.96.

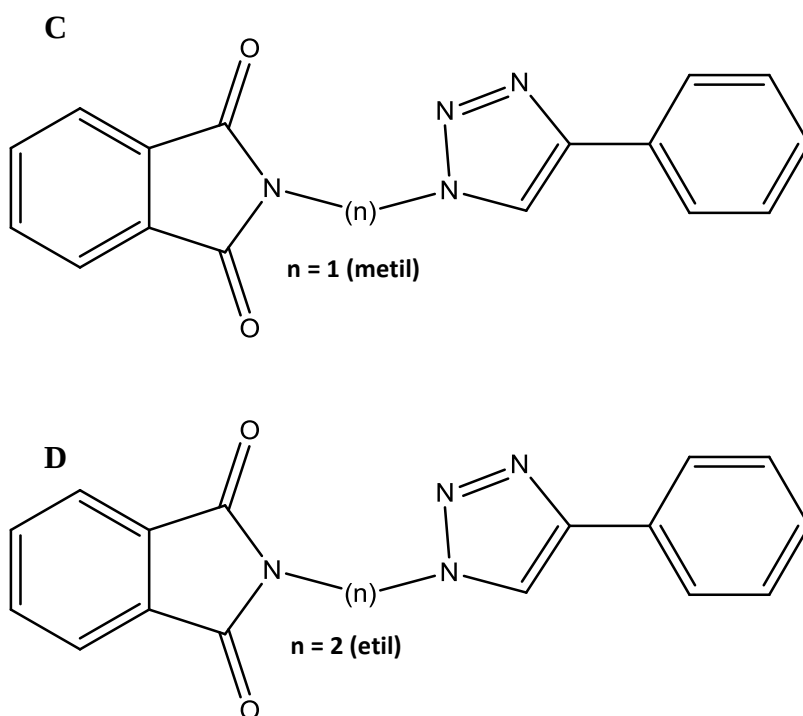
Ftalimida (1b): 4-(fenil)-1-(N-ftalimidometil)-1,2,3-triazol (Figura 1C). R_f 0.46 (EtOAc-Hexane, 8:2); IR ν_{max} / cm^{-1} : 3130, 3046, 2940, 1780, 1721, 1543, 1401, 1358,

1211, 1041, 761, 717. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.03 (s, 1H, H_{triaz}), 7.85-7.83 (m, 2H, Phth), 7.75-7.71 (m, 4H, 2H_{Phth} and H_{arom}), 7.32 (dd, 1H, $J = 7.6$ and 7.2 Hz, H_{arom}), 7.24-7.19 (m, 2H, 2H_{Phth}), 6.17 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3): δ 166.5, 148.5, 134.9, 131.4, 130.1, 128.9, 128.5, 128.3, 125.8, 124.1, 123.9, 120.5, 49.7. Anal. Calcd. $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2$: C, 67.10; H, 3.97. achado: C, H.

Ftalimida (**2b**): 4-(fenil)-1-(2-ftalimidoetil) - 1,2,3-triazol (Figura 1D). ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8.64 (s, 1H, H_{triaz}), 7.87-7.82 (m, 4H, Phth), 7.77 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, H_{arom}), 7.43 (dd, 2H, $J = 7.6$, 7.6 Hz, H_{arom}), 7.32 (dd, 1H, $J = 7.6$, 7.6 Hz, H_{arom}), 4.69 (t, 2H, $j = 6.0$ Hz, NCH_2), 4.06 (t, 2H, $j = 5.6$ Hz, NCH_2).

Figura 1: Estrutura molecular das novas ftalimidas derivadas de compostos triazólicos. A: 4-(benzotiazol-2-ilsulfanil)-metil-1-(N-ftalimidometil)-1,2,3-triazol (**1a**); B: 4-(fenil)-1-(N-ftalimidometil)-1,2,3-triazol (**2a**); C: 4-(fenil)-1-(N-ftalimidometil)-1,2,3-triazol (**1b**); D: 4-(fenil)-1-(2-ftalimidoetil) - 1,2,3-triazol (**2b**).





Atividade antifúngica

O teste de difusão em disco das novas ftalimidas (**1a**, **2a**, **1b** e **2b**) não demonstrou nenhum efeito sobre as bactérias testadas. Entretanto, foi observada a presença de halos de inibição entre 11 e 17 mm para 80% das *Candidas* e grandes diâmetro de halos inibitório entre 33 e 65 mm em 10 dos 13 fungos filamentosos testados aproximadamente 80% (tabela 1).

Para nova ftalimida **2a** e **2b** foi observado halo de 12 mm em *C. krusei*. Para a **1a** e **2a** formaram-se halo de 11 mm em *C. parapsilosis*. Porém, todas as novas ftalimidas foram ativas para *Candida albicans* e *C. pelliculosa*, demonstrando halos de inibição variando entre 12 e 17 mm. A nova ftalimida **1a** mostrou halos de inibição entre 14 e 58 mm para 6 fungos filamentosos, enquanto que a nova ftalimida **2a** mostrou os halos, entre 33 e 65 mm sobre 10 fungos filamentosos (Tabela 1).

Embora, todas as ftalimidas tenham mostrado halos de inibição, a nova ftalimida **2a** mostrou os halos mais expressivos e com maior abrangência, por esta razão, foi selecionada para avaliação da concentração inibitória mínima e a concentração mínima fungicida.

Os resultados da CMI se mostraram de acordo com dados do *screnning* de disco para nova ftalimida **2a** e esses valores variaram entre 5 µg/mL⁻¹ e 10 µg/mL⁻¹ (Tabela 2). Os resultados da concentração mínima fungicida (CMF) variaram entre as espécies de fungos, porém, de acordo com a análise de variância os resultados foram bastante significativos ($P < 0.001$), para as espécies *A. fumigatus* (>10 µg/mL⁻¹), *Fusarium lateritium* (>20 µg/mL⁻¹), *Trichophyton tonsurans* (>5 µg/mL⁻¹), *T. rubrum* (>10 µg/mL⁻¹) e *Colletotrichum gloeosporioides* (>20 µg/mL⁻¹) (Figura 2 B, C, E, F, H) e $P < 0.05$ para as outras especies quando comparado ao controle positivo, exceto para o *Microsporum gypseum* que não foi significativo. Estes resultados, inferiores ao do antifúngico padrão, a anfotericina B (MIC >40), mostraram a eficiencia da nova ftalimida **2a** sobre fungos patógenos de importância médica.

Tabela 1: Diâmetro dos Halos de inibição (mm) das novas ftamidas.

Fungos	Novas ftalimidas			
	1a	2a	1b	2b
<i>Candida krusei</i>	-	12	-	12
<i>Candida parapsilosis</i>	11	11	-	-
<i>Candida albicans</i>	12	15	12	17
<i>Candida pelliculosa</i>	14	14	13	15
<i>Candida glabrata</i>	-	-	-	-
<i>Aspergillus flavus</i>	-	47	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	52	-	-
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	-	55	-	-
<i>Fusarium lateritium</i>	-	59	-	-
<i>Fusarium verticillioides</i>	21	40	-	-
<i>Metarhizium anisopliae</i>	21	33	-	-
<i>Microsporum gypseum</i>	33	40	-	-
<i>Microsporum canis</i>	51	65	-	-
<i>Trichophyton tonsurans</i>	36	46	-	-
<i>Trichophyton rubrum</i>	43	61	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-
<i>Fusarium solani</i>	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	-	-	-

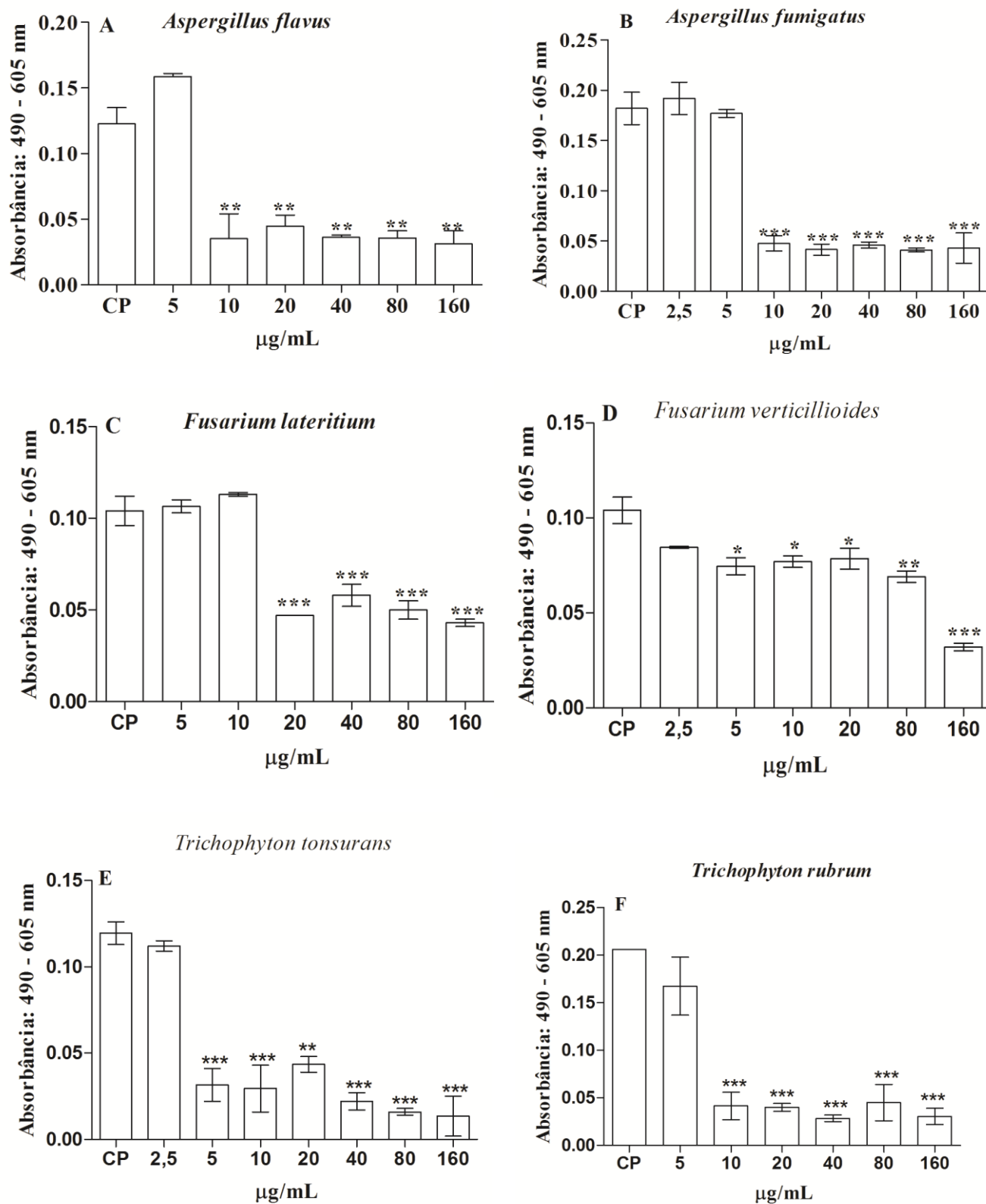
halos de inibição em mm

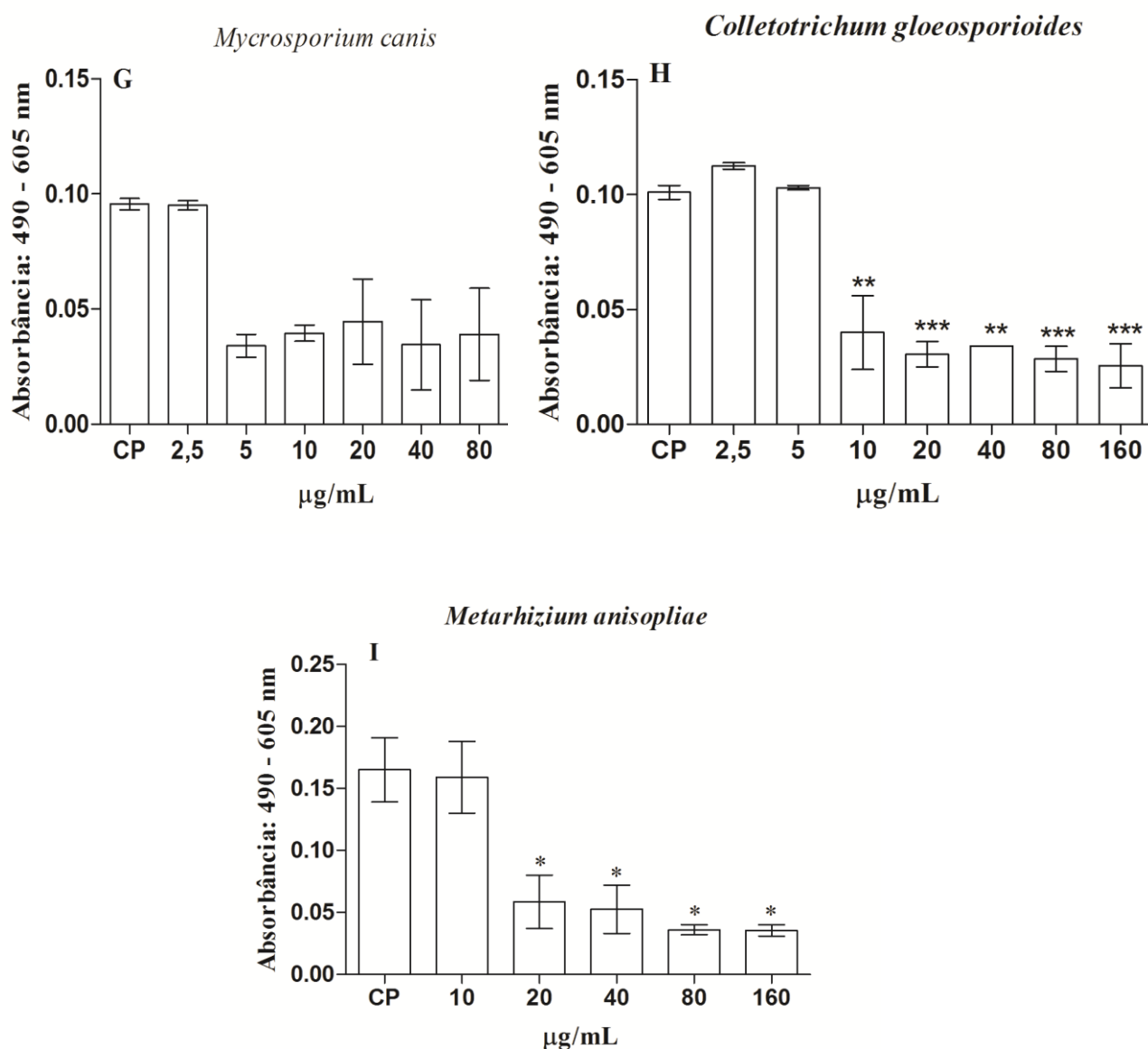
- ausência de halos de inibição

Tabela 2: Concentração Mínima Inibitória da nova ftalimida 2a e anfotericina B sobre fungos filamentosos.

Fungos	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	2a	Anfotericina B
<i>Microsporum canis</i>	5	40
<i>Trichophyton tonsurans</i>	5	>40
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	5	>40
<i>Aspergillus fumigatus</i>	10	>40
<i>Trichophyton rubrum</i>	10	40
<i>Aspergillus flavus</i>	20	>20
<i>Fusarium lateritium</i>	20	>40
<i>Fusarium verticillioides</i>	20	40
<i>Metarhizium anisopliae</i>	20	40
<i>Microsporum gypseum</i>	20	>40

Figura 2: Concentração Mínima Inibitória da nova ftalimida **2a** sobre fungos filamentosos, onde (*) $P < 0.05$ e (***) $P < 0.0001$.





Discussão

Entre os fungos, tem sido proposto que o aumento da virulência das espécies, pode estar associado à pressão de seleção imposta pelos predadores naturais encontrados no meio ambiente, incluindo amebas, vermes, e que a patogenicidade depende dos nichos e do tipo de hospedeiro. Entre os humanos, a *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus* são considerados de importância médica e o problema de resistência aos fármacos utilizados nos tratamentos tem gerado algumas preocupações

na comunidade científica e, tem estimulado novas pesquisas para o desenvolvimento de fármacos com atividade microbiológica (Shapiro et al., 2011).

As doenças fungicas tem se desenvolvido principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Os dados epidemiológicos indicam que as infecções causadas por fungos estão presentes entre 20-25% da população mundial (Polo, 2011). Entretanto, o numero de drogas desenvolvidas com alvos específicos tem sido limitada, particularmente aquelas que tratam *Candidas* e *Aspergillus*, como a classe das equinocandinas envolvidas na síntese da parede celular dos fungos (Shapiro et al., 2011). Porém, compostos químicos como os imidazóis e triazóis apresentam uma grande variedade estrutural e com algumas modificações através da introdução de novos radicais podem torna-las biologicamente mais ativas (Jales Filha, 2006). Foi com base nessas modificações moleculares que realizamos esse estudo, sintetizando novas ftalimidas ligadas a 1,2,3-trizóis e verificando seu potencial antimicrobiano.

O grupamento etila, inseridos na molécula obtida na presença de iodeto de cobre (CuI) trietilamida dimetilformamida (DMF), demonstraram aumentar a atividade da nova ftalimida 2a. Embora não tenha mostrado atividade antibactericida, como aquela encontrada para o *Mycobacterium tuberculosis*, com MIC inferior a 0,02 µg ml (Akgun et al., 2012) para sulfonamidas, ou ainda para novas ftalimidas naturais encontradas em esponjas (Almeida et al., 2012), a nova ftalimida 2a parece ser fungicida, principalmente para os dermatófitos filamentosos de interesse médico como demonstrado neste estudo.

A atividade antifúngica foi observada para todas as novas ftalimidas (1a, 2a, 1b e 2b) sintetizadas, ao contrário do achado de Khire et al. (2011) que embora tenham conseguido boa produção de novas hidrazinas, nem todas mostraram halos de inibição. Para o *A. fumigatus*, os autores encontram halos de 22,5 mm, enquanto que para nova ftalimida 2a, o halo de foi de 52 mm. Em adição, quando verificado por Shurong et al., (2011) a atividade antifúngica de novas ftalimidas heterocíclicas, foi observada uma inibição inferior a 20% sobre os fungos testados. Quando comparado com o antifúngico Nistatina que apresentou halos com diâmetro de 25 mm, a nova ftalimida 2a mostrou halos com diâmetros bem superiores, variando de 33 a 65 mm, com inibição de

aproximadamente 80% dos fungos filamentosos testados e 80% para as leveduras do gênero *Candidas*.

Neste estudo apenas 4 fungos dos 18 testados foram resistentes a nova ftalimida 2a. Foi possível determinar, a concentração mínima inibitória para todos os filamentosos testados com a nova ftalimida 2a como demonstrado nos resultados encontrados. E estes dados estão de acordo com Jiang et al. (2013) que encontrou atividade relevante (0,125 mg/mL) de derivados triazólicos sobre os fungos *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Thichophyton rubrum* e *Aspergillus fumigatus*. Diferente, das fenotiazinas N-acil substituídas, testadas por Bansode et al., (2009), cujas MIC variaram entre 10 – 26 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e mostram que em uma concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, os fungos desenvolveram resistência e este resultado parece ser promissor para o desenvolvimento de novas drogas específicas.

A importância química-medicinal de compostos sintéticos como banzofuranos (Wang et al., 2014), de derivados N-glicosilados (Zhao et al., 2014) e derivados triazólicos (Zoumpoulakis et al., 2012) demonstram o por que de se modificar moléculas a fim de torna-las mais eficientes. As novas ftalimidas **1a**, **2a**, **1b** e **2b** mostraram ser eficientes tanto para fungos leveduriformes como principalmente para os filamentosos com destaque para nova fatlimida **2a**, sendo considerada, portanto, excelente protótipo para o desenvolvimento de drogas antifúngicas.

Referencias

- Almeida C, Hemberger Y, Schmitt SM, Bouhired S, Natesan L, Kehraus S, Dimas K, Gostchow B, Kçnig M (2012). Marilines A–C: Novel Phthalimidines from the Sponge-Derived Fungus *Stachylidium* sp. *Chem Eur J* 18: 8827-8834.
- Akgun H, Karamelekoglu I, Berk B, Kurnaz I, Sarıbiyık G, Oktem S, Kocagoz T (2012). Synthesis and antimycobacterial activity of some phthalimide derivatives. *Bioorg Medicinal Chemistry* 20: 4149–4154.
- Bansode TN, Shelke JV, Dongre VG (2009). Synthesis and antimicrobial activity of some new N-acyl substituted phenothiazines. *Eur J M Chem* 44: 5094-5098.
- Barbosa F. C. G.; Oliveira R. N (2011). Synthesis of a New Class of Triazole-linked Benzoheterocycles via 1,3-Dipolar Cycloaddition. *J Braz Chem Soc* 22: 592-597.
- Bauer A.; Kirby W. M. M.; Sheris J. C.; Truck M. (1966) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Phatology*, v. 45, p.497-6.
- Costas MCCD. Aspectos Farmacológicos de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae: atividade antimicrobiana, citotóxica e antitumoral). 2002. 124p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Departamento de Ciências Biológicas. UFPE.
- Jales Filha MPA. Síntese, caracterização e avaliação biológica de novos compostos meiso-iônicos de núcleo 1,3,4-tiadizólio-5-tiolato e seus derivados ftalimídicos. 2006.101p. Dissertação (Mestrado em Química. UFPB).
- Jiang, Z. Gu J, Wang C, Wang S, Liu S, Jiang Y, Dong G, Wang Y, Liu Y, Yao J, Miao Z, Zhang W, Sheng C (2013). Discovery of highly potent triazole antifungal derivatives by heterocycle-benzene bioisosteric replacement. *Eur J M Chem* 64: 16-22.
- Khidre R, Abu-Hashem A A, El-Shazly M (2011). Synthesis and anti-microbial activity of some 1- substituted amino-4, 6-dimethyl-2-oxo-pyridine-3-carbonitrile derivatives. *Eur J Med Chem* 46: 5057-5064
- Page CP, Curtis MJ, Sutter MC, Walker MJA, Hoffman BB. *Farmacologia integrada*. Ed. Manole Ltda: São Paulo. 1999. 606 p.
- Polo A, Grazziotin NA (2011). Micoses superficiais em idosos residentes em entidade beneficente na Região Norte do estado do Rio Grande do Sul. *Rev Bras Anal Clín* 43: 29-33.
- Pierwocha AW, Walczak K (2008). The use of tri-O-acetyl-D-glucal and -D-galactal in the synthesis of omega-aminoalkyl 2-deoxy- and 2,3-dideoxy-d-hexopyranosides. *Carbohydr Res* 13: 343.
- National Committe for Clinical Laboratory Standards (2000). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi.

Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

Rodrigues D, Tomimori J, Floriano M, Mendonça S (2010). Atlas de dermatologia em povos indígenas. UNIFESP.

Shapiro RS, Robbins N, Cowen, LE (2011). Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiol Mol Biol Rev* 75: 213-267.

Shurong S Wenbin C, Zhen X (2011). Synthesis and *in vitro* Fungicidal Activity of a Series of Novel N-(Heterocycly) phthalimides. *Chin J Chem* 29: 515-520.

Somenzi CC, Ribeiro TS, Menezes A (2006). Características Particulares da Micologia Clínica e o Diagnóstico Laboratorial de Micoses Superficiais. Universidade Santa Cecília e Fundação Lusíada/UNILUS. Santos. SP. NewsLab, 77: 106-108.

Wang L, Zhang YY, Wang L, Liu F, Cao LL, Yang J, Qiao, C, Ye, Y (2014). Benzofurazan derivatives as antifungal agents against phytopathogenic fungi. *Eur J Med Chem* 80: 535-542.

Zhao Q, Zou Y, Guo J, Yu S. Chai, XY, Hu H, Wu Q (2014). Synthesis and antifungal activities of N-glycosylated derivatives of Tunicyclin D, an antifungal octacyclopeptide. *Tetrahedron* 70: 7780-7787.

Zoumpoulakis P, Camoutsis CH, Pairas G, Sokovic M, Glamoclija J, Potamitis C, Pitsas A (2012). Synthesis of novel sulfonamide-1,2,4-triazoles, 1,3,4-thiadiazoles and 1,3,4-oxadiazoles, as potential antibacterial and antifungal agents. Biological evaluation and conformational analysis studies. *Bioorg Med Chem* 20: 1569–1583.

6. CONCLUSÕES

- Através da *click chemistry* os quatro novos compostos de ftalimida ligados a 1,2,3-triazóis, que foram sintetizados e caracterizados.
- Os quatro novos derivados de ftalimida com 1,2,3-triazóis apresentaram potente atividade antifúngica.
- As novas ftalimidas **1a**, **2a**, **1b** e **2b** demonstraram ação sobre leveduras e fungos filamentosos.
- A nova ftalimida **2a** demonstrou ser a mais potente sobre os fungos testados.
- Os valores da CMI da nova ftalimida **2a** foram menores do que aqueles encontrados para a Anfotericina B.
- As novas ftalimidas sintetizadas não apresentaram atividade antibacteriana.
- A potente atividade antifúngica da nova ftalimida **2a** demonstra que este composto é um promissor candidato a fármaco com atividade antifúngica.

GUIDE OF AUTHORS

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

- Please select a concise and informative title (composed of no more than 130 characters).
- Preferred length of Original Papers is 6-8 printed pages. The indicated length includes figures, tables and references: one printed page corresponds to approximately 6,500 characters (9,000 characters in the sections "Materials and methods" and "References").
- Manuscripts must be written in English and the complete text should be formatted in 1,5 line spacing.
- Mini-Reviews on biotechnological products and processes or an apparatus and reactors used for biotechnological processes are welcome. They should provide a short historical outline of the development, extensively review the current state and conclude with an outline of trends and prospects for the future. For biotechnological products the competitiveness of the biotechnological process as compared to chemical processes or to processes, which rely on the isolation of the product from natural sources, should be provided. Applications and cost figures should be provided. Mini-reviews should contain a structural formula or a photograph of the biotechnological product, an outline of the biosynthetic pathway, a scheme of the apparatus, plant or reactor or a flow scheme of the process. Authors are asked to contact the Editor-in-Chief before submitting a mini-review.

Please arrange your manuscript for Original Papers as follows:

- **Abstract**
Each paper must be preceded by an abstract presenting the most important results and conclusions in no more than 250 words.
- **Footnotes**
Essential footnotes to the text should be numbered consecutively and placed at the bottom of the page to which they refer.
Footnotes on the title page are not given reference symbols. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).
- **Introduction**

The Introduction should state the purpose of the investigation and give a short review of the pertinent literature (max. one printed page).

- **Materials and methods**

The Materials and methods section should follow the Introduction and should provide enough information to permit repetition of the experimental work.

The microorganisms used in the study and in particular new isolates must be deposited in a publicly accessible culture collection belonging to the WDCM (e.g. DSM, ATCC, NCIMB; see the below Link for a complete list of the WDCM culture collections which are all suitable). The authors must refer to the collection and the strain number in the text to ensure that the strains are available to other scientists. If nucleic acid or amino acid sequences are presented (this includes also optimized sequences of known genes), a GenBank/EMBL accession number for primary nucleotide and/or amino acid sequence data must be included in a separate paragraph at the end of the Materials and methods section. Huge sequencing datasets or raw data must also be deposited, e.g. as a NCBI BioProject (via the Link below).

For studies in proteomics, the minimum information about a proteomics experiment (MIAPE) of the HUPO proteomics standard initiative (see the Link below) and publication guidelines for the analysis and documentation of peptide and protein identifications by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology (at the below Link) must be followed up. One biological replicate will not be acceptable.

For X-ray crystallographic analyses of proteins (enzymes), the authors should obtain each PDB ID to one structure of protein from PDB (The Worldwide Protein Data Bank (wwPDB)) and add it to the manuscript just like as nucleotide accession numbers.

For commercial sources of used materials, the name of the company, town and country should be indicated.

- **Results**

The Results section should describe the outcome of the study. Data should be presented as concisely as possible, if appropriate in the form of tables or figures, although very large tables should be avoided.

- **Discussion**

The Discussion should be an interpretation of the results and their significance with reference to publications of other laboratories.

- [WDCM culture collections](#)
- [NCBI Bio Project](#)
- [HUPO proteomics standard initiative](#)
- [American Society for Biochemistry and Molecular Biology guidelines](#)

Scientific Style

All taxa names (species names, genus names, and names of higher categories) **should be in italics.**

References

Citation

Cite references in the text by name and year in parentheses.

Multi-author papers must be cited in the text with "et al."; first author name is not sufficient; names of two-authors papers must both be given.

Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec 1993).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work.

- **Journal article**
Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8
- **Article by DOI**
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086
- **Book**
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London
- **Book chapter**
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- **Online document**
- Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- **Dissertation**
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- ISSN Website
For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.
- EndNote Style

Please note:

- All author names should be provided in the references of AMB-manuscripts!
- Please do not use an EndNote Style abbreviating long author lists with "et al."!

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

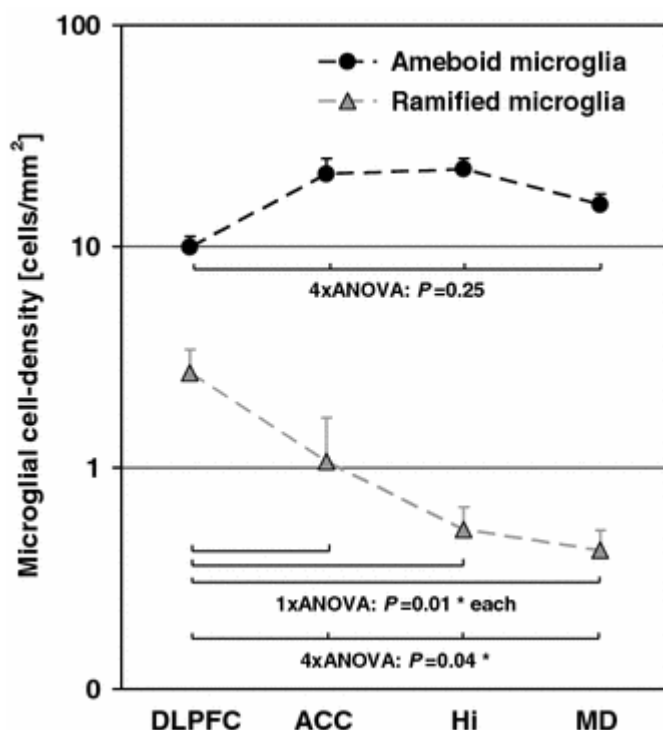
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

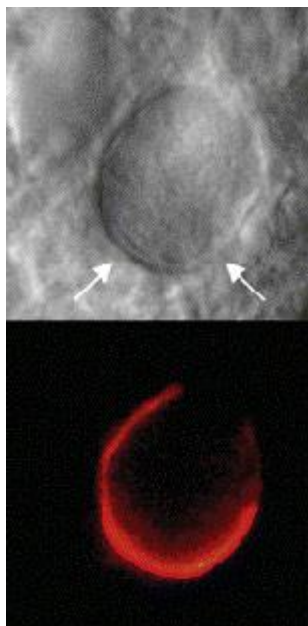
- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



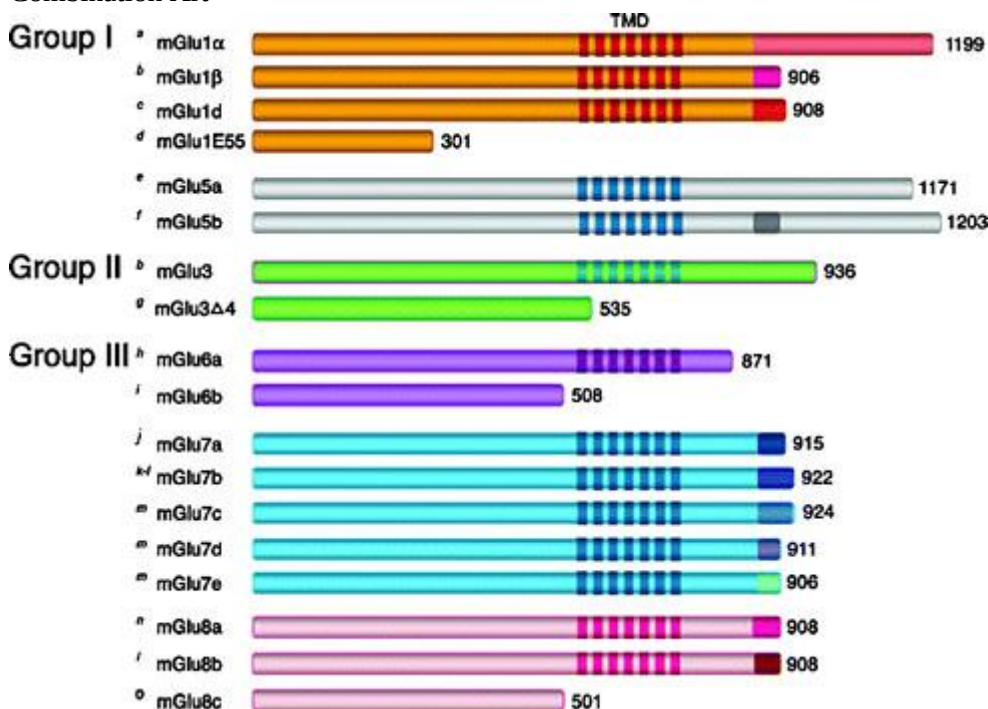
- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art



- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another

when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., “... as shown in the animation (Online Resource 3)”, “... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Does Springer provide English language support?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in:

- [Edanz English editing for scientists](#)
Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication. Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.
- [Edanz English editing for scientists](#)

For Authors from China

文章在投稿前进行专业的语言润色将对作者的投稿进程有所帮助。作者可自愿选择使用Springer推荐的编辑服务，使用与否并不作为判断文章是否被录用的依据。提高文章的语言质量将有助于审稿人理解文章的内容，通过对学术内容的判断来决定文章的取舍，而不会因为语言问题导致直接退稿。作者需自行联系Springer推荐的编辑服务公司，协商编辑事宜。

- [理文编辑](#)

For Authors from Japan

ジャーナルに論文を投稿する前に、ネイティブ・スピーカーによる英文校閲を希望されている方には、Edanz社をご紹介します。サービス内容、料金および申込方法など、日本語による詳しい説明はエダンズグループジャパン株式会社の下記サイトをご覧ください。

- [エダンズグループジャパン](#)

For Authors from Korea

영어 논문 투고에 앞서 원어민에게 영문 교정을 받고자 하시는 분들께 Edanz 회사를 소개해 드립니다. 서비스 내용, 가격 및

신청 방법 등에 대한 자세한 사항은 저희 Edanz Editing Global 웹사이트를 참조해 주시면 감사하겠습니다.

- [Edanz Editing Global](#)

Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

- The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.
- The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”)).
- A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).
- No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions
- No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

- Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.
- Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

In addition:

- Changes of authorship or in the order of authors are not accepted **after** acceptance of a manuscript.
- Requesting to add or delete authors at revision stage, proof stage, or after publication is a serious matter and may be considered when justifiably warranted. Justification for changes in authorship must be compelling and may be considered only after receipt of written approval from all authors and a convincing, detailed explanation about the role/deletion of the new/deleted author. In case of changes at revision stage, a letter must accompany the revised manuscript. In case of changes after acceptance or publication, the request and documentation must be sent via the Publisher to the Editor-in-Chief. In all cases, further documentation may be required to support your request. The decision on accepting the change rests with the Editor-in-Chief of the journal and may be turned down. Therefore authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission.

- Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc.
If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:
- If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.
- If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note.
- The author's institution may be informed.

compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" before the References when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the Instructions for Authors carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

Disclosure of potential conflicts of interest

after acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

- Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.