



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

LUIZ NASCIMENTO DE ARAÚJO NETO

**Síntese, Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Investigação do Mecanismo de Ação
de Novos Derivados 5-nitrotiofeno Tiossemicarbazonas**

**Recife
2018**

LUIZ NASCIMENTO DE ARAÚJO NETO

**Síntese, Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Investigação do Mecanismo de Ação
de Novos Derivados 5-nitrotiofeno Tiossemicarbazonas**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica na área de Desenho, Modelagem Molecular e Preparação de Produtos Bioativos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça junior
Co-orientadora: Prof. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima e Prof. Dra. Rejane Pereira Neves.

**Recife
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Araújo Neto, Luiz Nascimento de

Síntese, avaliação da atividade antimicrobiana e investigação do mecanismo de Ação de novos derivados 5-nitrotiofeno tiossemicarbazona / Luiz Nascimento de Araújo Neto. - 2018

85 f. : il.

Orientador: Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior.

Coorientadoras: Maria do Carmo Alves de Lima, Rejane Pereira Neves.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Farmacologia 2. Agentes anti-infecciosos I. Mendonça Júnior, Francisco Jaime Bezerra (orient.) II. Lima, Maria do Carmo Alves de (ccorient.) III. Neves, Rejane Pereira (coorient.) IV. Título.

615

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 218

LUIZ NASCIMENTO DE ARAÚJO NETO

SÍNTESE, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DE NOVOS DERIVADOS 5-NITROTIOFENO TIOSSEMICARBAZONAS.

Tese de apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 13/04/2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior – UEPB (Orientador)

Dr. Ricardo Olímpio de Moura - UEPB

Dra. Ana Maria Rabelo de Carvalho - UFPE

Dr. Henrique John Pereira Neves - UFPE

Dr. Alexandre Gomes da Silva - UFPE

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Maria Clara Silva de Araújo, por esta sempre comigo em todos os momentos da minha vida; dedico todo meu amor e minha gratidão.

A minha irmã, Adriana Maria Campos de Araújo, minhas sobrinhas, Natalia Gabrielle Campo Soares e Adrielly Campos Soares pelos seus jeitos únicos de me deixarem feliz, obrigado.

Aos meus eternos companheiros, Edson Rubhens de Souza, Micheline Julia do Nascimento e Michaela Pereira Neves Ferreira por estar sempre presente compartilhando todos os momentos da minha vida; a Mayara Nunes Vitor Anjos por estar sempre perto pra ajudar.

Ao Professor Francisco Jaime Bezerra Mendonça Junior, meu orientador, por sua atenção, paciência na construção desse doutorado.

As Professoras Maria do Carmo Alves de Lima e Rejane Pereira Neves, minhas coorientadoras, pelos ensinamentos, pela oportunidade, e principalmente pela paciência durante toda a jornada. Meus sinceros agradecimentos, respeito e minha eterna dívida.

Aos integrantes do Laboratório de Química e Inovação Terapêutica pelos momentos de produtividade, especialmente, Allana Lemos Andrade Gouveia, Suellen Emilliany Feitosa Machado, Paula Roberta da Silva e Cezar Augusto da Cruz Amorim.

A CAPES pelo financiamento da minha bolsa de doutorado, ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, ao LQIT-UFPE, Fiocruz-PE, Lab. Micologia Médica-UFPE pelas instalações do laboratório, em especial a Maria Daniela da Silva Buonafina pela parceria e amizade e a Universidade Federal de Pernambuco.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram e ajudam a concluir esta etapa da minha vida.

RESUMO

Atualmente a evolução de infecções bacterianas e fúngicas resistentes a drogas é um grande desafio mundial. O desenvolvimento de resistência associada ao uso excessivo de medicamentos antimicrobianos disponíveis tem limitado sua eficiência. A resistência antimicrobiana é prejudicial à humanidade, porque a maioria dos microrganismos infecciosos reconhece o mecanismo da ação da droga e desenvolve tolerância a mesma. As drogas utilizadas contra essas infecções são por vezes tóxicas, e por isso, o presente trabalho buscou a síntese de doze derivados 2-(5-nitro-tiofeno)-tiossemicarbazônicos substituídos (série **LNN**) como potenciais agentes antimicrobianos, bem como avaliar os possíveis mecanismos de ação desses compostos através do teste com ergosterol exógeno, sorbitol, proteção antioxidante, interação com a glutatona reduzida (GSH) e análise ultraestrutural. A síntese foi realizada em duas etapas reagindo-se hidrazina com isotiocianatos formando semicarbazidas que foram reagidas com 5-nitro-tiofeno-2-carboxaldeído para originar os compostos finais. Os compostos foram obtidos em rendimentos satisfatórios (50-94%), e tiveram suas estruturas elucidadas por ressonância magnética nuclear, infravermelho e espectrometria de massas. Os testes de sensibilidade antimicrobianos, ergosterol, sorbitol, proteção antioxidante e interação com GSH foram realizados pelo método de microdiluição em caldo segundo as diretrizes do CLSI/2002 norma M27-A2, CLSI, 2016/M100-S26 e CLSI, 2015/M07-A10. Os resultados mostraram que as cepas foram mais sensíveis para o composto **LNN-10** em *Candida parapsilosis* URM 7048 (2,0 µg/mL) e *Cryptococcus neoformans* URM 6898 (0,06 µg/mL) respectivamente, com valores de atividade inferiores às concentrações tóxicas. Já a molécula **LNN-09** apresentou CBM < 3.9 para *Bacillus cereus*. O teste do sorbitol e do ergosterol foram negativos indicando que os compostos não interferem diretamente nessas vias metabólicas. No entanto, o teste voltado para a avaliação de indução de estresse oxidativo (Teste de Proteção com Ácido Ascórbico) foi positivo e o de interação com a glutatona reduzida (GSH) também indicando um mecanismo de ação voltado a produção de ROS pelo bloqueio de GSH. Esses resultados indicam que derivados 2-(5-nitro-tiofeno)-tiossemicarbazônicos são potenciais agentes antifúngicos, podendo no futuro ser utilizados como alternativas terapêuticas para controle de doenças fúngicas.

Palavras-chave: Tiossemicarbazonas. Tiofeno. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Currently the evolution of bacterial and fungal infections resistant to drugs is a great challenge worldwide. The development of resistance associated with the overuse of available antimicrobial drugs has limited its efficiency. Antimicrobial resistance is harmful to mankind, because most infectious microorganisms understand the mechanism of action of the drug and develops tolerance to it. The drugs used against these infections are sometimes toxic, and therefore the present work sought the synthesis of twelve substituted 2-(5-nitro-thiophene)thiosemicarbazonic derivatives (series **LNN**) as potential antimicrobial agentes, as well as evaluate the possible mechanisms of action of these compounds through exogenous ergosterol, sorbitol, antioxidant protection, interaction with reduced glutathione (GSH) and ultrastructural analysis. Synthesis was performed in two steps by reaction between hydrazine with isothiocyanates forming semicarbazides which were reacted with 5-nitro-thiophene-2-carboxaldehyde affording the target compounds. The compounds were obtained in satisfactory yields (50-94%), and had their structures confirmed by nuclear magnetic resonance, infrared and mass espectrometry. Antimicrobial susceptibility tests, ergosterol, sorbitol, antioxidant protection and interaction with GSH were carried out using the broth microdilution method according to the CLSI/2002 standard M27-A2, CLSI, 2016/M100-S26 and CLSI, 2015/M07- A10. The results showed that the strains were more sensitive to the **LNN-10** compounds in *Candida parapsilosis* URM 7048 (2.0 µg/mL) and *Cryptococcus neoformans* URM 6898 (0.06 µg/mL) respectively, with activity values smaller than the toxic concentrations. The **LNN-09** molecule presented CBM < 3.9 for *Bacillus cereus*. The sorbitol and ergosterol test were negative indicating that the compounds do not directly interfere in these metabolic pathways. However, the test aimed at the evaluation of oxidative stress induction (Ascorbic Acid Protection Test) was positive and that of interaction with reduced glutathione (GSH) also indicating a mechanism of action aimed at the production of ROS by the blockade of GSH. These results sugest that 2-(5-nitro-thiopheno)-thiossemicarbazonic derivatives are potential antifungal agents, and can be used in the future as alternative for the threatment of micoses.

Keywords: Thiosemicarbazone. Thiophene. Antimicrobial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura geral das carbazonas e tiossemicarbazonas.....	23
Figura 2 -	Variação Tautomérica das Tiossemicarbazonas.....	24
Figura 3 -	Sínteses de Tiossemicarbazonas.....	25
Figura 4 -	Fármacos que Possuem Heterocíclos que Podem Ser Sintetizados a Partir de Tiossemicarbazonas.....	26
Figura 5 -	Tiacetazona e Triapine.....	26
Figura 6 -	Tiosseicarbazonas substituídas com naftaleno.....	27
Figura 7 -	Tiossemicarbazona Pididínica com Atividade Antifúngica.....	27
Figura 8 -	Derivado Tiossemicarbazônico Tiofênico com Ação Antifúngica.....	28
Figura 9 -	Compostos tiossemicarbazônicos esteriodais.....	28
Figura 10 -	8-Etil-2-hidroxitriciclo[7.3.1.0 ^{2,7}]tridecano-13-ona-tiossemicarbazona (HL).....	29
Figura 11 -	Tiossemicarbazonas <i>N</i> ¹ substituídas com 5-morfolinossulfonil (4 e 6)...	29
Figura 12 -	Isatina-tiossemicarbazona.....	30
Figura 13 -	Tiofeno e Furano.....	30
Figura 14 -	Sínteses do Tiofeno.....	31
Figura 15 -	Suprofen e Raltitrexed.....	32
Figura 16 -	Composto Tiofênicos com Atividade Contra <i>Cryptococcus neoformans</i>	33
Figura 17 -	Derivados 2-(benzilideno-amino)-5,6-dihidro-4 <i>H</i> -ciclopenta[<i>b</i>]tiofeno-3-carbonitrila substituídos.....	33
Figura 18 -	Compostos tiofênicos com atividade antimicrobiana.....	34
Figura 19 -	Ciclo-alkil tiofenos com atividade antimicrobiana.....	34
Figura 20 -	Derivados tieno[3,2- <i>d</i>] pirimidínicos com atividade antibacteriana.....	35
Figura 21 -	Estrutura do composto 3-metiltiofeno-2-carboxamida.....	36
Figura 22 -	Procedimento Geral de Síntese das Tiossemicarbazonas.....	39
Figura 23 -	Teste de sensibilidade com ergosterol exógeno.....	43
Figura 24 -	Mecanismo Reacional da Rota Sintética Utilizada.....	48
Figura 25 -	Espectro de RMN ¹ H do composto LNN-09	50
Figura 26 -	Espectro de COSY do Composto LNN-01	51
Figura 27 -	Espectro de Absorção de Infravermelho do Composto LNN-09	52
Figura 28 -	Espectro de ¹³ C e DEPT do Composto LNN-05	53

Figura 29 - Microscopia Eletrônica de Varredura de *C. albicans* ATCC 14053..... 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados Físico-Químicos dos Derivados 2-(5-nitro-tiofeno)-tiossemicarbazônicos (LNN01-12).....	49
Tabela 2 -	Sensibilidade Antifúngica, Teste do Ergosterol e Citotoxicidade.....	60
Tabela 3 -	Sensibilidade antifúngica (MIC ₅₀) contra espécies de <i>Candida</i> . Os valores estão apresentados em µg/mL.....	63
Tabela 4 -	Sensibilidade Antibacteriana.....	68
Tabela 5 -	Avaliação da Atividade Antioxidante das Tiossemicarbazonas.....	70
Tabela 6 -	Sensibilidade anti- <i>Candida</i> , Teste da Glutathione e Proteção antioxidante com ácido ascórbico. Resultados representados em µg/mL.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	- Organização Mundial de Saúde
AIDS	- <i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
HIV	- Vírus da Imunodeficiência Humana
TSC	- Tiosemicarbazonas
EROS	- Espécies Reativas de Oxigênio
SNC	- Sistema Nervoso Central
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
CBM	- Concentração Bactericida Mínima
ZI	- Zona de Inibição
MRSA	- <i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina
VRE	- <i>Enterococcus</i> Resistentes a Vancomicina
AINE	- Antiinflamatórios Não esteroidais
GSH	- Glutathione Reduzida
DMSO	- Dimetilsulfóxido
MOPS	- 3-[<i>N</i> -morfolino]propano-ácido sulfônico
CLSI	- <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CBM	- Concentração Bactericida Mínima
CFM	- Concentração Fungicida Mínima
DPPH	- 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
CFM	- Concentrações Fungicidas Mínimas
GSSG	- Glutathione Oxidada
UFC	- Unidades Formadoras de Colônias
ELISA	- <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
COSY	- <i>homonuclear COrrrelation SpectroscopY</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	OBJETIVOS.....	15
1.1.1	Objetivo Geral.....	15
1.1.2	Objetivos Específicos.....	15
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1	INFECÇÕES MICROBIANAS.....	17
2.1.1	Infecções bacterianas.....	17
2.2	LEVEDUROSES.....	18
2.3	TIOSSEMICARBAZONAS.....	23
2.3.1	Síntese e Aplicações.....	24
2.3.2	Importância Biológica.....	25
2.3.2.1	Atividade Antimicrobiana.....	27
2.4	NÚCLEO TIOFENO.....	30
2.4.1	Importância Biológica.....	32
2.4.1.1	Atividade Antimicrobiana.....	32
2.5	ESTRESSE OXIDATIVO COMO ALVO BIOLÓGICO.....	36
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1	MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	38
3.2	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	39
3.2.1	Síntese dos Compostos da Série 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazonas N² Substituídos.....	39
3.2.1.1	Etapa 1 – Procedimento Geral para Obtenção das Tiossemicarbazidas.....	39
3.2.1.2	Etapa 2 – Procedimento Geral para Obtenção das Tiossemicarbazonas.....	40
3.2.2	Obtenção dos inóculos fungicos e bacterianos.....	40
3.2.3	Teste de Sensibilidade Antimicrobiana.....	41
3.2.4	Teste do Ergosterol.....	42
3.2.5	Teste do Sorbitol.....	43
3.2.6	Microscopia Elettronica de Varredura.....	43
3.2.7	Teste de Citotoxicidade.....	44
3.2.8	Avaliação da Atividade Antioxidante por DPPH.....	44
3.2.9	Avaliação da Proteção Antioxidante com Ácido Ascórbico.....	45

3.9.10	Ensaio de Interação com a Glutathione Reduzida.....	45
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1	SÍNTESE E MECANISMOS REACIONAIS.....	47
4.2	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL.....	49
4.2.1	Dados Espectroscópicos e Espectrométricos dos Derivados 2-(5-nitro-tiofeno)-tiosemicarbazônicos.....	53
4.3	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	58
4.3.1	Teste de Sensibilidade Antifúngica.....	58
4.3.2	Teste de Sensibilidade Antibacteriana.....	67
4.3.3	Estudo do Mecanismo de Ação.....	69
4.3.3.1	Teste do Ergosterol Exógeno.....	69
4.3.3.2	Ensaio do Sorbitol.....	69
4.3.3.3	Avaliação da Atividade Antioxidante por DPPH.....	70
4.3.3.4	Teste da Glutathione e Avaliação da Proteção Antioxidante com Ácido Ascórbico (aa).....	71
5	CONCLUSÕES.....	73
	REFERÊNCIAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o mundo enfrenta um grande desafio devido à evolução das infecções bacterianas e fúngicas resistentes a terapia antimicrobiana. O desenvolvimento de resistência esta frequentemente associada ao uso excessivo de medicamentos antimicrobianos disponíveis o que tem limitado a eficiência e eficácia desses. A resistência antimicrobiana é prejudicial à humanidade, porque a maioria dos microrganismos infecciosos reconhece o mecanismo da ação da droga e desenvolve tolerância a ela (Dionisi *et al.*, 2012). Portanto, a descoberta de novos medicamentos que sejam úteis contra essas infecções, seja de fontes sintéticas ou naturais, é altamente desejada (Bhat *et al.*, 2018).

Em todos os países há relatos de resistência a antibióticos. Infecções hospitalares por *Klebsiella pneumoniae* já estão sendo tratadas com carbapenem devido a falhas nos tratamentos usuais. Resistência a fluoroquinolona por *Escherichia coli* para tratamento de infecções no trato urinário já é difundida, e em outros países, esse tratamento não é mais eficaz. Na Austrália, Áustria, Canadá, França, Japão, Noruega, Eslovênia, África do Sul, Suécia e Reino Unido da Grã-Bretanha e Irlanda do Norte a falha no tratamento de gonorreia com cefalosporina de terceira geração já foi confirmada. Tal fato teve como resultado as novas diretrizes no tratamento de gonorreia pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Devido a efeitos neurológicos e nefrotóxicos, a colistina é utilizada como ultimo recurso para infecções fatais causadas por Enterobacteriaceae que são resistentes aos carbapenem. A resistência à colistina recentemente foi detectada em vários países e regiões, tornando as infecções causadas por tais bactérias intratáveis (WHO, 2016).

As infecções fúngicas apresentam-se como uma das maiores causas de morbimortalidade em todo o mundo, sendo mais frequentes em pacientes imunocomprometidos submetidos ao tratamento de neoplasias, transplantados e pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (Caston-Osorio *et al.*, 2008). As espécies do gênero *Candida* são comensais do homem, mas são isoladas também de frutos e fezes de animais e poucas vezes do solo (Wenzel; Geings, 2005).

A candidíase é uma infecção de origem endógena, já que o paciente é portador de seu agente causal e para que a levedura ultrapasse a condição saprofítica, torna-se necessário que o organismo sofra certas alterações variáveis de acordo com a região em que se desenvolverá a ação patogênica (Pfaller e Diekema, 2010).

A *C. albicans* é de longe o mais prevalente, responsável por cerca de 90% de infecções das mucosas superficiais e 40-70% de infecções disseminadas (Pappas *et al.*, 2009).

Por outro lado, a criptococose pode apresentar-se primitivamente na forma pulmonar possibilitando ao fungo produzir desde formas totalmente assintomáticas até formas pneumônicas graves. A doença é estimada em 1 milhão de casos com 700.000 mortes anualmente e tem como principal agente etiológico a levedura encapsulada *Cryptococcus neoformans* no qual possui uma distribuição mundial (Park *et al.*, 2009). A grande maioria dos pacientes acometidos pela forma disseminada da doença apresenta uma condição de imunossupressão de base (Perfect, 2010; Sorrell *et al.*, 2011) no qual a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é a predisposição mais comum (Park *et al.*, 2011).

Diante disso, as tiossemicarbazonas (TSC) têm recebido destaque no âmbito da química medicinal visto suas grandes versatilidades químicas e devido às suas promissoras aplicações biológicas, associadas ao seu importante potencial farmacológico (Bharti *et al.*, 2010), dentre os quais já se é relatada: atividade antiproliferativa (Almeida *et al.*, 2015), antiparasitária (Britta *et al.*, 2014), antioxidante (Nguyen, 2013) e também antimicrobiana (El-Sharief *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015). Já existem fármacos tiossemicarbazônicos empregados na terapêutica ou em estudos clínicos avançados, a exemplo da Tiacetazona®, usado na terapêutica da tuberculose (Domagk *et al.*, 1946; Mayer; Laing, 1953), Triapine®, usado na terapia do câncer (Finch *et al.*, 2000; Attia *et al.*, 2008; Kunos *et al.*, 2013). Além disso, sua síntese é relativamente simples, barata e bem relatada na literatura podendo ainda ser usada como intermediário na síntese de outros grupos farmacofóricos importantes como a tiazolidina e o tiazol (Tenório *et al.*, 2005). As tiossemicarbazonas ainda são apontadas como ligantes orgânicos por serem constituídas basicamente de heteroátomos, essa característica confere versatilidade em reações químicas e interações biológicas (Lobana *et al.*, 2009; Beraldo, 2004).

Compostos nitro-aromáticos também constituem importantes farmacóforos relatados na literatura como agentes com grande potencial antiparasitário (Bellanger, 1997; Caston-Osorio *et al.*, 2008), antibacteriano (Agarwal *et al.*, 2006; Asadipour *et al.*, 2013; Oliveira, 2012) antituberculose (Hartkoorn *et al.*, 2014; Kamal *et al.*, 2013), antiviral (Shivarama *et al.*, 2001), antitumoral (Tseng *et al.*, 2015), antiagregante plaquetário (Jagadish *et al.*, 2013) e antifúngico (Frost *et al.*, 1995).

Um dos mecanismos de ação farmacológicos a ser explorado quando se realiza ensaios de novas drogas com atividade antifúngica é relacionado à biossíntese do ergosterol, sendo a lanosterol 14 α -demetilase, a enzima chave para síntese desse esterol (Zhu *et al.*, 2014). Esse componente celular tem importante papel no crescimento fúngico e no funcionamento da membrana, estando relacionado à fluidez e na sua integridade (Sheng *et al.*, 2010).

Outro mecanismo é o que está associado ao sistema redox no qual contribui para o bom funcionamento intracelular dos fungos. Nele estão envolvidos os compostos chamados espécies reativas de oxigênio (EROs), que incluem radicais livres ou substâncias oxigenadas de alto potencial reativo como o peróxidos, hidróxido, carbonato, hidroperóxido, óxido nítrico, nitrito, entre outros. As EROs estão presentes em inúmeras reações biológicas fundamentais como a respiração celular e sinalização apoptótica (Graves, 2012). Já se sabe que este estresse também é um efeito secundário que contribui na ação fungicida de medicamentos comerciais como anfotericina B (Mesa-Arango *et al.*, 2014), fluconazol (Mahl *et al.*, 2015) e caspofungina (Yu *et al.*, 2016). Entretanto os estudos consultados mostram o potencial do sistema redox como mecanismo primário para o desempenho de novos fármacos (Thangamani *et al.*, 2017).

Por isso, o presente trabalho busca sintetizar e avaliar a atividade antimicrobiana de novos derivados 5-nitrotiofeno tiosemicarbazonas bem como realizar um estudo do mecanismo de ação com objetivo para seu uso como agentes antimicrobianos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Contribuir com o desenvolvimento de novos compostos terapêuticos com potencial atividade antibiótica através da utilização de estratégias do planejamento de fármacos utilizando como compostos protótipos nitro-heterociclos e tiosemicarbazonas.

1.1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Promover a síntese química de novos derivados 5-nitro-tiofênicos-tiosemicarbazônicos;

- ✓ Verificar as características físico-químicas dos novos compostos sintetizados;
- ✓ Caracterizar estruturalmente os novos compostos obtidos através de diferentes técnicas espectroscópicas e espectrométricas;
- ✓ Avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* dos novos derivados;
- ✓ Determinar a citotoxicidade dos novos compostos
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante os compostos sintetizados;
- ✓ Verificar modificações ultraestruturais através de Microscopia Eletrônica de Varredura;
- ✓ Verificar o mecanismo de ação antimicrobiana dos novos derivados através de ensaios de ergosterol, sorbitol e de proteção antioxidante com ácido ascórbico e glutathione reduzida ;

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 INFECÇÕES MICROBIANAS

Desde a descoberta da penicilina em 1928, os antibióticos tornaram-se um componente essencial dos cuidados de saúde modernos. Tornaram prontamente tratáveis as infecções potencialmente fatais, prolongaram muito a vida dos indivíduos imunocomprometidos e possibilitaram a realização rotineira de procedimentos cirúrgicos invasivos. Atualmente, no entanto, enfrenta-se uma crise crescente, à medida que a resistência aos antibióticos continua a se espalhar, enquanto a descoberta de novos antibióticos estagnou (Radlinski and Conlon, 2018).

2.1.1 Infecções bacterianas

O *Staphylococcus aureus* é uma das principais causas de infecção bacteriana em humanos em todo o mundo e representa um grande problema de saúde tanto no ambiente hospitalar como no comunitário (Magill *et al.*, 2017). A infecção por *S. aureus* tem se tornado cada vez mais difícil de tratar devido ao surgimento e disseminação rápida de cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), aumentando a resistência e os efeitos adversos limitantes da dose com antibióticos atuais, como a vancomicina (Hazlewood *et al.*, 2010).

A vancomicina é o tratamento mais prescrito para infecções por MRSA em geral e é atualmente o segundo antibiótico mais comumente usado em hospitais (Cardona and Wilson, 2015). Os esforços contínuos para desenvolver alternativas seguras e eficazes à vancomicina levaram ao desenvolvimento de glicopéptidos semissintéticos mais potentes - telavancina, dalbavancina e oritavancina (Klinker and Borgert, 2015). Destes, a dalbavancina e a oritavancina têm meia-vida longa e extensa distribuição tecidual, permitindo assim o benefício de intervalos de dosagem prolongados (Klinker and Borgert, 2015; Zhanel *et al.*, 2012).

As calpaínas têm sido associadas à invasão da infecção por *S. aureus*, pois esta bactéria induz a piroptose, uma forma de morte celular acompanhada pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-18, de queratinócitos infectados. Esses eventos moleculares levam à morte de queratinócitos e a uma infecção invasiva, que pode levar ao desenvolvimento de bacteremia/sepsis (Soong *et al.*, 2012).

A persistência intracelular dentro das células do hospedeiro permite que as bactérias *S. aureus* escapem dos antibióticos. De fato, concentrações muito mais altas de antibióticos, muitas vezes acima das concentrações atingíveis no soro, são necessárias para matar o *S. aureus* intracelular do que inibir o crescimento de bactérias planctônicas (Lehar *et al.*, 2015; Barcia-Macay *et al.*, 2006). Ao sobreviver dentro das células hospedeiras circulantes, como os neutrófilos e as células dendríticas, o *S. aureus* não apenas subverte os mecanismos imunológicos antibacterianos, mas também explora essas células para disseminar a infecção através da corrente sanguínea (Mariathasan and Tan, 2017). Consequentemente, a mortalidade após bacteremia estafilocócica é alta, com uma taxa de mortalidade por 30 dias em todas as causas de 20% e uma taxa estimada de mortalidade relacionada à infecção de aproximadamente 13%. (van Hal *et al.*, 2012).

2.2 LEVEDUROSES

As espécies de *Candida* pertencem à microbiota normal da cavidade da mucosa oral, trato gastrointestinal e vagina, raramente é encontrada no solo, sugerindo um estilo de vida parasitária (Hube, 2004), no qual são responsáveis por várias manifestações clínicas de supercrescimento mucocutâneo para infecções da corrente sanguínea (Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012).

Estes microrganismos comensais tornam-se patogênicos caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou o comprometimento de barreiras anatômicas secundariamente a queimadura ou procedimentos médicos invasivos. Alterações dos mecanismos de defesa do hospedeiro podem ser decorrentes de mudanças fisiológicas características da infância (prematuridade) e envelhecimento ou mais frequentemente, associadas a doenças degenerativas, neoplásicas, imunodeficiências congênitas ou adquiridas e imunodepressão induzida por atos médicos (Dignani *et al.*, 2003).

O gênero possui mais de 17 espécies conhecidas como agente etiológico de infecções humanas. No entanto, apenas algumas são conhecidas por provocar doenças nos seres humanos. Mais de 90% de todas as infecções por *Candida* são causados por cinco espécies: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, e *C. krusei*.

Entre estas espécies, *C. albicans* é de longe o mais prevalente, responsável por 90-100% de infecções das mucosas superficiais e 40-70% de infecções disseminadas (Pfaller; Diekema, 2010; Pappas *et al.*, 2009). Além disso, um estudo realizado no Brasil e no México verificou que cerca de 4% dessas infecções nosocomiais são causadas por espécies do gênero *Candida* (Tsai *et al.*, 2013). Nas infecções associadas à infecção por *Candida* sp. a mortalidade varia de 14,5 a 49% (Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012). Ainda no Brasil, Colombo e colaboradores em um estudo epidemiológico apresentaram espécies de *Candida* como sendo 4,3% dos casos de infecções da corrente sanguínea em quatro hospitais na cidade São Paulo durante o período de maio de 2002 a fevereiro de 2003.

Nos Estados Unidos da América a incidência de infecções na corrente sanguínea por espécies de *Candida* passou do sétimo patógeno mais presente para o quinto dos anos 80 para 90. A partir dos anos 90 passou a ser o quarto patógeno mais encontrado em hemoculturas isso foi relatado nos trabalhos de Pfaller e colaboradores (2010) no qual *Candida* respondeu por 8% dos 4.725 episódios de infecção de corrente sanguínea em 50 hospitais terciários americanos. Já na Holanda, Voss e colaboradores (1996) fizeram um estudo das infecções documentadas de 5 hospitais durante o período de 1987 a 1995 e verificaram uma ocorrência de 53 para 95 episódios/ano.

O trato gastrointestinal possui cerca de 70% da sua microbiota normal constituída por espécies de *Candida* e por isso provavelmente os casos de candidemia sejam adquiridos por via endógena pela translocação do patógeno durante um desequilíbrio da microbiota ou lesão da mucosa gastrointestinal até os capilares mesentéricos. Além disso, métodos de genotipagem mostram similaridade entre cepas colonizantes e infectantes (Pfaller; Diekema, 2010; Nucci; Anaisse, 2001; Cole *et al.*, 1996).

Inflamações do trato genito-urinário são manifestações clínicas comuns de infecções por *Candida*, que incluem candidíase vulvovaginal em mulheres, balanite e balanopostite, em homens e em ambos os sexos candidúria (Achkar; Fries, 2010). A candidíase vulvovaginal, comumente referida como candidíase ou infecção por fungos, tipicamente se apresenta como ocorrências isoladas de leve a moderada infecção em mulheres saudáveis, e geralmente são facilmente controladas com uma terapia de dose única (Pappas *et al.*, 2009).

Essas infecções podem ocorrer de forma esporádica devido a fatores de risco como gravidez, utilização de antibióticos, diabetes, e imunossupressão como também

podem ocorrer de forma grave e recorrente em que a terapia antifúngica deve ser mais rigorosa e em longo prazo. Além disso, estima-se que a maioria das mulheres desenvolve pelo menos um episódio de candidíase vulvovaginal no seu tempo de vida (Pappas *et al.*, 2009; Sobel, 2007; Leon, 2002). Já a candidíase masculina (balanite) ocorre com menos frequência embora a incidência não seja ainda totalmente esclarecida devido à falta de estudos populacionais (Achkar; Fries, 2010).

Infecções na boca ou na garganta (candidíase orofaríngea) também podem ocorrer e apresentar manifestações clínicas como lesões brancas ou avermelhadas na superfície da língua e orofaringe que causam dor, sensação de queimor, alterações no paladar e dano tecidual (Coronado-Castellote; Jimenez-Soriano, 2013).

Quando a levedura quebra a barreira mucosa penetrando em tecidos profundos e ganhando acesso a circulação sanguínea ocasiona a candidíase invasiva (Eggimann *et al.*, 2003) no qual permite que o fungo dissemine comprometendo vários órgãos e possivelmente levando o paciente a óbito por uma doença letal sistêmica (Pappas *et al.*, 2009).

O tratamento da candidíase vai depender do tipo de infecção, por exemplo, na candidíase oral a nistatina em suspensão ou comprimidos, 500.000 a 1 milhão UI, 3 a 5 vezes ao dia, durante 14 dias de uso tópico é a melhor escolha. Em crianças, recomenda-se o uso durante 5 a 7 dias. Como tratamento de segunda escolha ou em pacientes imunocomprometidos, pode ser utilizado o fluconazol 200 mg, via oral, uma vez ao dia, para adultos com duração de tratamento de 7 a 14 dias, devendo ser evitado seu uso em crianças.

Na candidíase esofágica em pacientes imunodeprimidos a primeira escolha de tratamento com fluconazol, 200 a 400 mg/dia, via oral ou endovenosa, durante 14 dias, ou anfotericina B, em baixas doses (0,5 mg/kg/dia), intravenosa, durante 5 a 7 dias. A dose diária não deve ultrapassar 50 mg/dia. Para a candidíase vulvovaginal o guia do Ministério da Saúde recomenda isoconazol (nitrato), uso tópico, sob a forma de creme vaginal, durante 7 dias em dose única como a primeira escolha de tratamento, no entanto, como alternativa o tioconazol em pomada ou óvulo em dose única pode ser utilizado.

Outras substâncias também são eficazes como clotrimazol, miconazol, terconazol, ou nistatina, em aplicação tópica. A candidíase mucocutânea crônica o fluconazol pode ser administrado, mas a anfotericina B deve ser usada para casos mais graves. Nas infecções sistêmicas a anfotericina B é a droga de escolha. Se necessário,

associada ao fluconazol na dose de 400 mg/dia. A dose deve ser diminuída em casos de insuficiência renal.

Outro esquema de eleição para formas sistêmicas graves é a associação da anfotericina B com a flucitosina, porém esta última não é mais comercializada no Brasil, motivo pelo qual sua disponibilidade depende de importação (Ministério da Saúde, 2005).

Por outro lado, a criptococose é estimada em 1 milhão de casos com 700.000 mortes anualmente. O seu principal agente etiológico é a levedura encapsulada *Cryptococcus neoformans* a qual possui uma distribuição mundial (Park *et al.*, 2009).

A grande maioria dos pacientes acometidos pela forma disseminada da doença apresenta uma condição de imunossupressão de base (Perfect, 2010; Sorrell *et al.*, 2011). A infecção pelo vírus da imunodeficiência (HIV) é a predisposição mais comum da meningo encefalite criptocócica revelando a propagação da doença juntamente com a pandemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (Park *et al.*, 2011). No entanto, outras condições subjacentes como o tratamento prolongado com corticosteroides, transplante de órgãos, neoplasia avançada e diabetes podem também ocasionar quadros de depressão do sistema imunológico (Casadevall e Perfect, 1998; Perfect, 2010).

A criptococose pela espécie *Cryptococcus gattii* ocorre mais frequentemente em pacientes imunocompetentes com ou sem quaisquer condições subjacentes conhecidas (Sorrell *et al.*, 2011), mas a frequência de casos em escala mundial é cerca de 20% quando comparado com a espécie *C. neoformans*. Além disso, ainda não esta esclarecida os principais fatores de risco para essa espécie (Meyer *et al.*, 2011).

No Brasil, o agente *Cryptococcus neoformans* ocorre em todas as regiões do país. Contudo, a criptococose pelo agente *Cryptococcus gattii* atua, predominantemente, como patógeno primário, acometendo indivíduos sadios, no Norte e Nordeste, sendo esporádicos os casos nas regiões Sul e Sudeste (Severo *et al.*, 2009; Mora *et al.*, 2010; Pinto Junior *et al.*, 2010).

A doença tem início com a inalação de células de leveduras ressecadas no ar ou por basidiósporos para dentro dos pulmões. Ao entrarem em contato com macrófagos alveolares ativados, estes recrutam células do sistema imunológico através de citocinas e quimiocinas induzindo uma resposta Th1 e inflamação granulomatosa.

A eliminação do *Cryptococcus* ocorre normalmente em pacientes saudáveis, no entanto, em imunocomprometidos as células se proliferam, e disseminam pelo sangue

podendo envolver outros órgãos, entretanto, quando atravessam a barreira hematoencefálica causa meningoencefalite (Chang *et al.*, 2007; ChUNET *et al.*, 2007) que é a manifestação clínica mais comum assim como causa mais comum de morte (Casadevall e Perfect 1998; Perfect, 2010). Admite-se que a criptococose seja primitivamente pulmonar e, com isto, a levedura pode produzir desde formas totalmente assintomáticas até formas pneumônicas gravíssimas, ou o organismo controla a doença nessa fase, ou então haverá disseminação da doença, atingindo quase sempre o sistema nervoso central (SNC), no qual também pode ficar inaparente durante muito tempo. Todo o território orgânico, como: pele, mucosas, ossos e víscera, podem ser comprometidos (Sidrimet *et al.*, 2004).

A terapia antifúngica é limitada, geralmente agressiva, tóxica, e pode ser ineficiente (Spinello, 2013). Além disso, a terapia é principalmente limitada a três antifúngicos no qual podem ser usados isoladamente ou em combinações: anfotericina B (e suas formas lipossomais), 5-fluorocitosina e fluconazol.

O fluconazol utilizado em combinação com o fluorocitosina em dosagens superiores a 800-1200 mg/dia tem mostrado bons resultados na terapia antifúngica possibilitando um tratamento de indução todo oral quando a aplicação intravenosa de anfotericina B não puder ser administrada. Mesmo quando o tratamento com anfotericina B e fluorocitosina é disponível, a mortalidade está entre 15-30%, e essa porcentagem é ainda maior em países de baixa renda, onde esses antifúngicos não são acessíveis (Lortholary, 2007; Sabiiti; May, 2012).

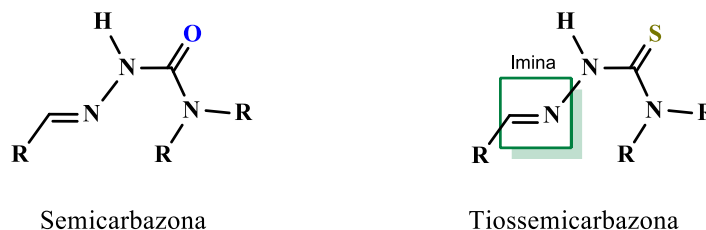
A introdução de outros agentes, como os triazóis (posaconazol e voriconazol) e as equinocandinas (anidulafungina, caspofungina, e micafungina) que afetam a síntese da parede celular do fungo por inibição da β -1,3 D-glucano sintase aumentou as opções de tratamento das infecções fúngicas invasivas. Embora a detecção da resistência fúngica a esses agentes seja difícil, o aumento de infecções fúngicas por isolados resistentes têm sido relatados em pacientes com exposição a terapias de longo prazo (Fera *et al.*, 2009; Wilke, 2011).

São utilizados também os azóis cetoconazol e itraconazol que afetam a síntese de ergosterol, inibindo a enzima lanosterol 14 α desmetilase codificada pelo gene *ERG11* (White *et al.*, 1998; Morschhäuser, 2010). As equinocandinas são utilizadas contra infecções por *Candida* sp. E *Aspergillus* sp., mas não são eficientes contra *Cryptococcus* sp. (Perlin, 2007).

2.3 TIOSSEMICARBAZONAS

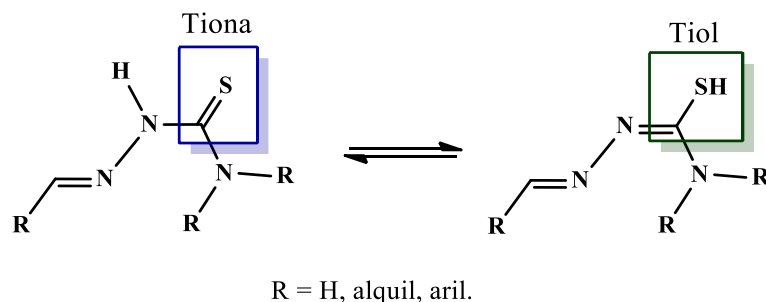
As tiossemicarbazonas (TSC) são compostos orgânicos constituídos por átomos de carbono, enxofre e nitrogênio com estrutura básica $N-CS-N-N=C-R_2$ (Panico *et al.*, 1993). A função orgânica imina (insaturação heteropolar caracterizada pela dupla ligação entre N e C) também chamada de base de Schiff ou grupo azometino ($R_2C=N-$) está presente na estrutura. As TSC são bioisósteros das semicarbazonas (Figura 01), onde o átomo de oxigênio da carbonila é substituído pelo átomo de enxofre, tornando-a tiocarbonila (Panico *et al.*, 1993; Singh *et al.*, 2016).

Figura 01 – Estrutura geral das carbazonas e tiossemicarbazonas



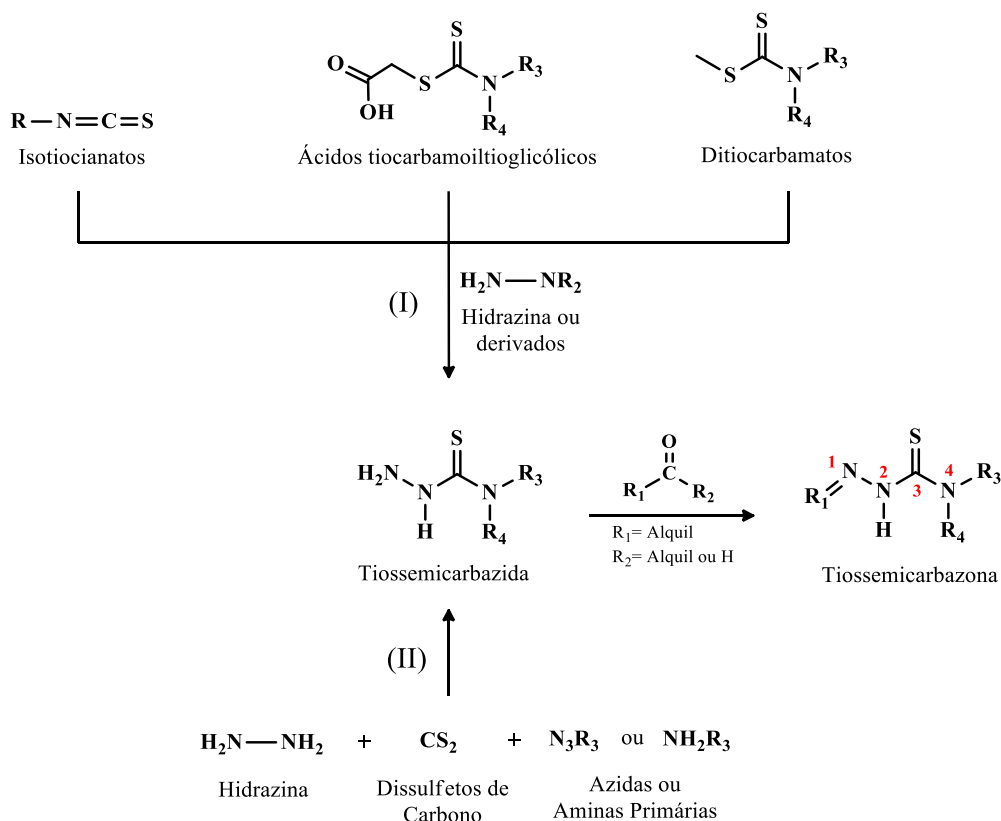
R = H, alquil, aril.

Um equilíbrio tautomérico entre as formas tiona e tiol (Figura 02), quando em solução, é observado devido à deslocalização da densidade eletrônica ao longo da cadeia principal. Bittencourt e colaboradores (2015), como também Pederzoli e colaboradores (2011) observaram que o comprimento da ligação entre o carbono α e o nitrogênio ligado a ele (N-N-C) é intermediário a ligação simples da forma tiona e a ligação dupla da forma tiol. Tanto em solução quando no estado sólido, quando não há variação tautomérica, existe a predominância da forma tiona, porém a prevalência da forma tiol já foi relatada em alguns casos (Matesanz, 2013).

Figura 02: Variação Tautomérica das Tiossemicarbazonas

2.3.1 Síntese e Aplicações

A síntese de tiossemicarbazonas é relativamente simples, barata e bem relatada na literatura. Primeiramente, obtém-se uma tiossemicarbazida a qual é submetida a uma reação de condensação com aldeídos ou cetonas resultando na tiossemicarbazona. A síntese da tiossemicarbazona é executada através de reações que envolvem hidrazina, ou derivados de hidrazina (hidrazinas substituídas e hidrazidas), e um segundo reagente tiocarbonilado nitrogenado que pode ser um isotiocianato (Papastaikoudi *et al.*, 1995; Li *et al.*, 2006), um ácido tiocarbamoil tioglicólico (Bharti *et al.*, 2002) ou um ditiocarbamato (Ashton *et al.* 1993). Nestas reações (I) uma ligação entre o nitrogênio e o carbono da tiocarbonila é formada (N^2-C^3). Outra reação (II) entre hidrazina, dissulfetos de carbono (composto tiocarbonilado não nitrogenado) e azidas ou aminas primárias geram duas ligações entre nitrogênios e o carbono tionado (N^2-C^3 , N^4-C^3), essa reação pode ser realizada em etapas distintas ou simultaneamente (Ashton *et al.* 1993). Na figura 03 estão representadas as reações de síntese das tiossemicarbazonas.

Figura 03 – Sínteses de Tiossemicarbazonas

Devido à presença de seus heteroátomos as tiossemicarbazonas são muito utilizadas como reagentes para formação dos heterocíclis tiazóis, 1,3,4-tiaditiazol, 1,2,4-triazina, pirazol, tiazolidina e 1,2,4-ditiazolidinas, heterocíclis esses dotados de diversas atividades biológicas associadas (Tenório *et al.*, 2005) inclusive fazendo parte da estrutura de diversos fármacos utilizados na clínica (Figura 04).

2.3.2 Importância Biológica

Quanto à atuação em sistemas biológicos, as tiossemicarbazonas são moléculas de importância singular e muitos grupos de pesquisas atribuem a elas várias atividades biológicas, tais como: potencial antiviral (Glisoni *et al.*, 2012), antibacteriano (Singh *et al.*, 2016), antiprotozoário (Bharti *et al.*, 2002), anti-helminto (Santiago *et al.*, 2014), antifúngico (Parrilha *et al.*, 2011) e antitumoral (Oliveira *et al.*, 2015), que já estão relatados na literatura. Já existem fármacos tiossemicarbazônicos empregados na terapêutica ou em estudos clínicos avançados, a exemplo da Tiacetazona®, usado na

terapiada tuberculose (Domagk *et al.*, 1946; Mayer; Laing, 1953), Triapine®, usado na terapia do câncer (Finch *et al.*, 2000; Attia *et al.*, 2008; Kunos *et al.*, 2013) (Figura 05).

Figura 04 – Fármacos que Possuem Heterocícl os que Podem Ser Sintetizados a Partir de Tiossemicarbazonas

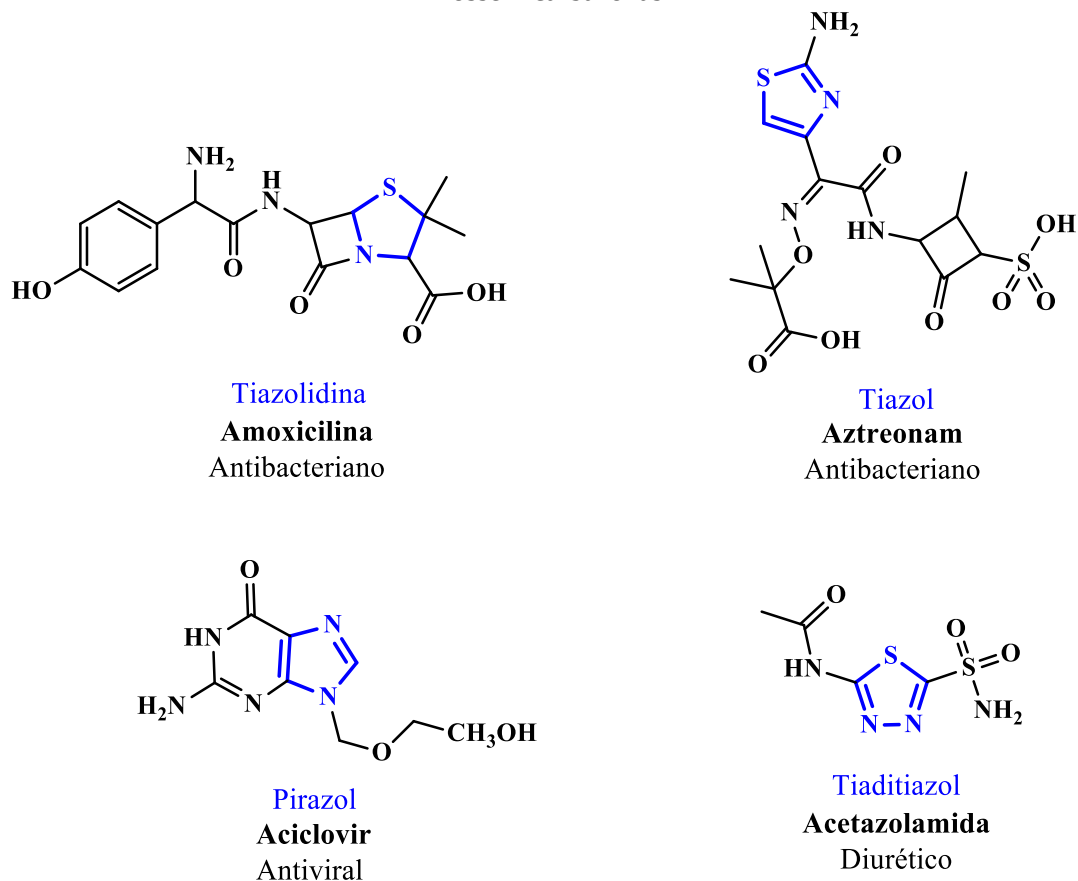
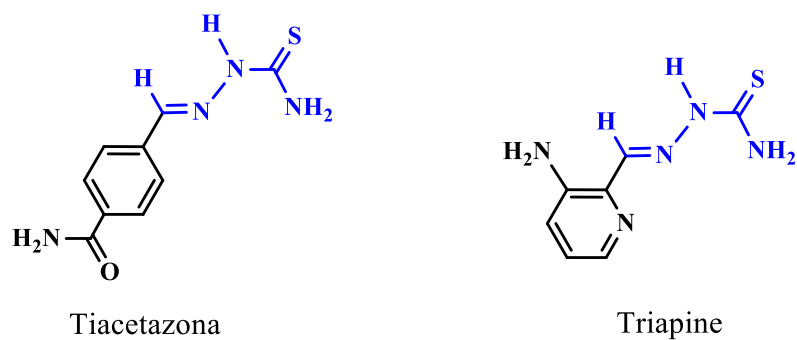


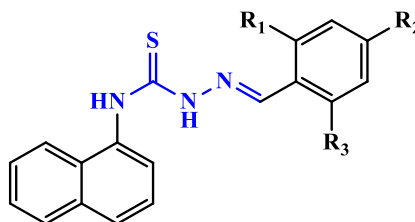
Figura 05 – Tiacetazona e Triapine



2.3.2.1 Atividade Antimicrobiana

A atividade contra fungos associada a compostos tiossemicarbazônicos está sendo bastante explorada e demonstra bons resultados. Altıntope colaboradores (2016) obtiveram sucesso na síntese e avaliação antifúngica de dois derivados 2-benzilideno-*N*-(naftalen-1-il)tiossemicarbazonas substituídos, ambos apresentando concentração inibitória mínima (CIM) de 125 µg/mL contra *Candida glabrata* e 250 µg/ml contra outras espécies de *Candida*, *Aspergillus* e *Fusarium*. As estruturas dos compostos estão expostas na figura 06.

Figura 06 – Tiossemicarbazonas substituídas com naftaleno

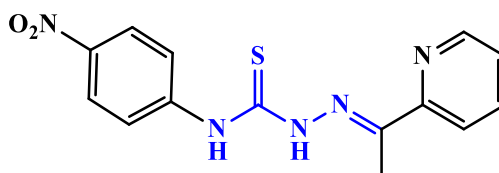


Composto 1: R₁=F; R₂=F; R₃=H

Composto 2: R₁=F; R₂=H; R₃=F

Em outro estudo, Parrilha e colaboradores (2011) avaliaram a atividade de tiossemicarbazonas piridínicas contra as espécies de *Candida*: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. O melhor resultado observado foi ao composto *N*-(4-nitrofenil)-2-(1-(piridin-2-il)etilideno)tiossemicarbazona, que também é substituído com o radical *p*-nitro-fenila (Figura 07), com CIM de 6,34 µM para todas as espécies.

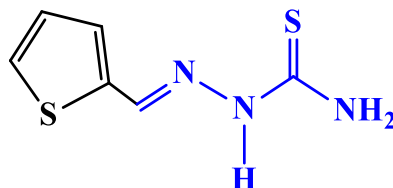
Figura 07 – Tiossemicarbazona Piridínica com Atividade Antifúngica



Paiva e colaboradores (2014) sintetizaram um composto tiossemicarbazônico substituído com o heterociclo tiofeno na posição *N*¹-2-(tiofen-2-il-

metileno)tiossemicarbazona (Figura 08), e avaliaram sua ação contra espécies de *Aspergillus*. Para as espécies *A. nomius*, *A. ochraceus*, e *A. parasiticus* foram observadas CIM de 125 µg/mL, já contra *A. flavus* e *A. verticillioides* o composto apresentou CIMs de 250 µg/mL e 500 µg/ml respectivamente.

Figura 08 – Derivado Tiossemicarbazônico Tiofênico com Ação Antifúngica



Khan e Asiri (2017) em seu trabalho com tiossemicarbazonas esteroidais investigaram a ação antibacteriana contra *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *S. typhimurium* utilizando três compostos N^4 substituídos com ciclos aromáticos ligados a átomos de flúor ou cloro. Notaram-se CIM entre 64-256 µg/ml e destas a molécula que possuía um átomo de cloro foi responsável pelo melhor resultado, com CIM entre 64-128 µg/ml, dessa forma os autores concluíram que este átomo foi importante para que se obtivessem os valores de CIM relatados (Figura 09).

Atividade bacteriostática de tiossemicarbazonas também já foi observada no estudo de Pahonțu e colaboradores (2016) em que testou contra cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* com limites de CIM de 0,5–10 mg/mL (Figura 10).

Figura 09. Compostos tiossemicarbazonicos esteroidais

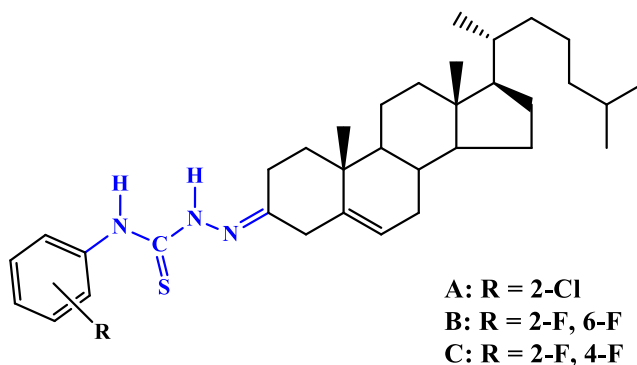
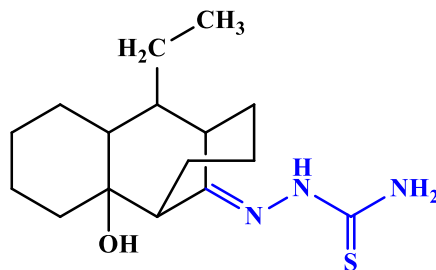
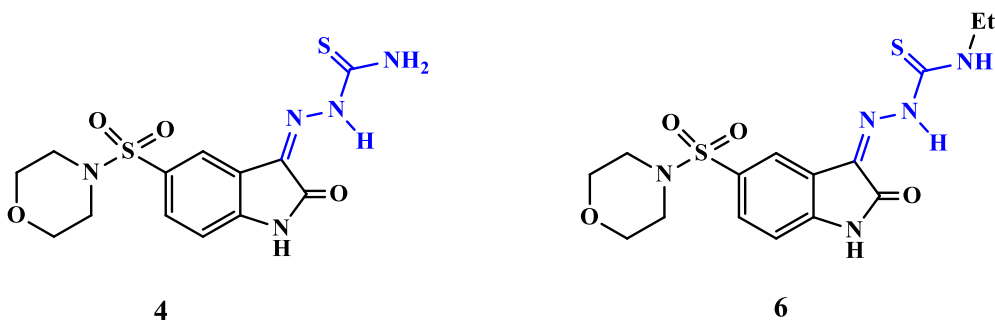


Figura 10. 2-(10-etil-4a-hidroxidodecahidro-5,9-metanobenzo[8]anulen-11-ilideno)hidrazinocarbotioamida (**HL**)



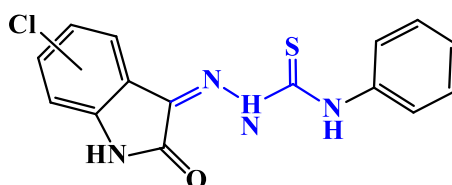
Em contrapartida, Farag (2014) analisou algumas tiossemicarbazonas N^1 substituídas com 5-morfolinossulfonil (Figura 11) e relatou que a ação antimicrobiana não foi tão expressiva contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *B. subtilis*, *P. vulgaris*, *K. pneumonia*, *S. flexneri* e *P. aeruginosa*. Os compostos 4 e 6 demonstraram zona de inibição (ZI) bacteriana de até 18,6 mm e 13,2 mm de diâmetro, respectivamente, já em relação à inibição fúngica, apenas o composto 4 obteve ação positiva com ZI de até 17,9 mm, sendo este resultado para *C. albicans*. A distinção estrutural está na substituição N^4 onde é adicionado um etil na molécula 6, fato determinante para inferiorizar ainda mais a atividade observada.

Figura 11. Tiossemicarbazonas N^1 substituídas com 5-morfolinossulfonil (4 e 6)



Zhang e colaboradores (2015) em seu trabalho com tiossemicarbazonas condensadas com isatina avaliou seu espectro antibacteriano frente a cepas resistentes a meticilina de *Staphylococcus aureus* (MRSA) e cepas resistentes à vancomicina de *Enterococcus* (VRE). Os resultados mostraram que o composto contendo o átomo de cloro (**3-2**) foi mais eficiente contra a cepa de *S. aureus* com MIC de 0,78 mg/L. Além disso, o mesmo composto apresentou MIC de 3,12 mg/L contra a cepa resistente a vancomicina de *Enterococcus* VRE-309. Esses dados mostram a importância de halogênios na estrutura para baixos valores de MIC quando comparados aos fármacos controle que foram de > 8,0 mg/L e 1,0 mg/L para vancomicina frente a VRE-309 e MRSA respectivamente (Figura 12).

Figura 12. Isatina-tiossemicarbazona



2.4 NÚCLEO TIOFENO

O tiofeno é uma estrutura orgânica cíclica constituída por cinco átomos, sendo quatro átomos de carbono e um átomo de enxofre. Duas insaturações nas posições 2 e 4 são observadas, e junto a um dos pares de elétrons do enxofre formam um sistema aromático segundo a regra Hückel (Hückel *et al.*, 1937). O tiofeno é um bioisóstero do heterocíclo furano (Figura 13), que possui um átomo de oxigênio em substituição ao enxofre.

Figura 13 – Tiofeno e Furano



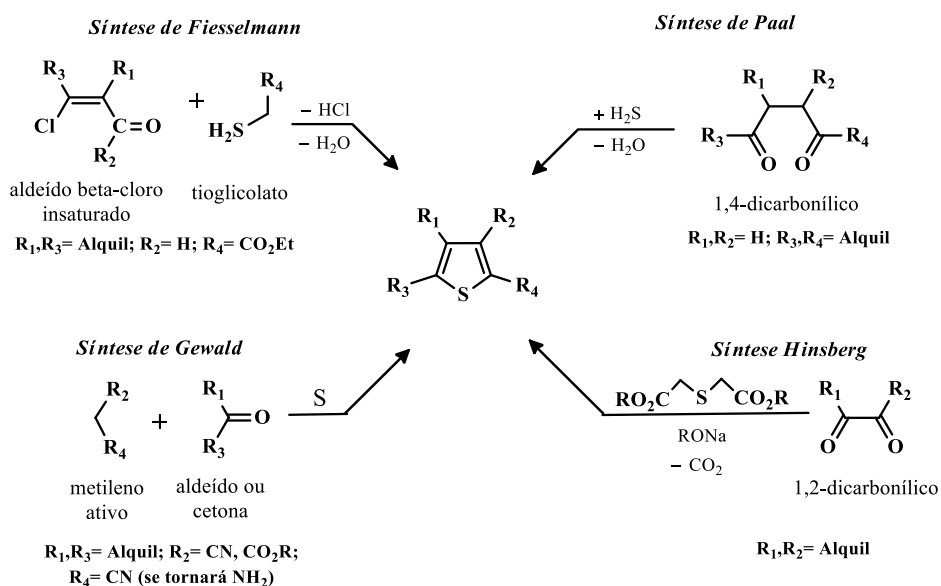
Furano



Tiofeno

Para a síntese do tiofeno existem algumas reações descritas, a exemplo da síntese Gewald, a síntese de Paal, a síntese de Fielsselman e a síntese de Hinsberg. A síntese Gewald consiste na formação do tiofeno reagindo um composto carbonilado e um composto metileno ativo em presença de enxofre elementar e uma base, formando 2-amino-tiofeno com substituições diversas (Gewald *et al.*, 1966; Rodrigues *et al.*, 2015). Na síntese de Paal ocorre uma sulfurilação de compostos 1,4-dicarbonilados por pentassulfeto de fósforo (P_4S_{10}) ou sulfeto de hidrogênio (H_2S), seguida de desidratação (Minetto *et al.*, 2005). Na síntese de Fielsselman um composto 1,3-dicarbonilado, ou um aldeído β -cloro-insaturado, reage com um tioglicolato em presença de piridina formando tiofeno-2-carboxil ésteres (Sainsbury, 2001). Já a síntese de Hinsberg é a ciclização entre um composto 1,2-dicarbonilado com ésteres do ácido tioglicólico, catalizados por uma base (Katritzky; Pozharski, 2000). Todos esses procedimentos sintéticos estão descritas na Figura 14.

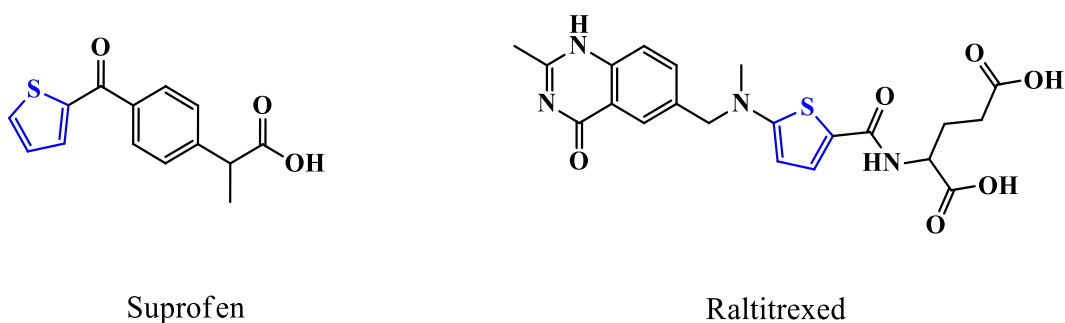
Figura 14 – Sínteses do Tiofeno



2.4.1 Importância Biológica

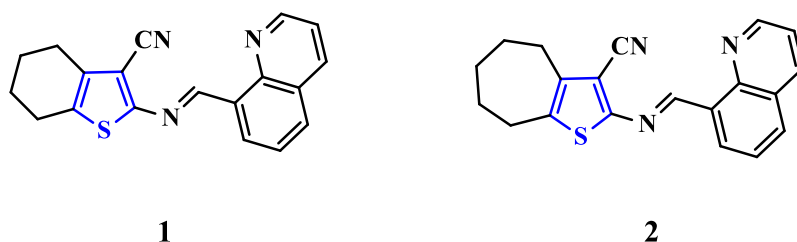
O tiofeno apresenta muitas atividades biológicas que despertam o interesse de seu uso em estudos farmacológicos e consequentemente na terapêutica. O suprofen é um fármaco antiinflamatório não esteroide (AINE) que possui em sua estrutura o tiofeno (Capetola *et al.*, 1980), da mesma forma o raltitrexed, medicamento utilizado na terapia do câncer (Cunningham *et al.*, 1998) (Figura 15).

Figura 15 – Suprofen e Raltitrexed

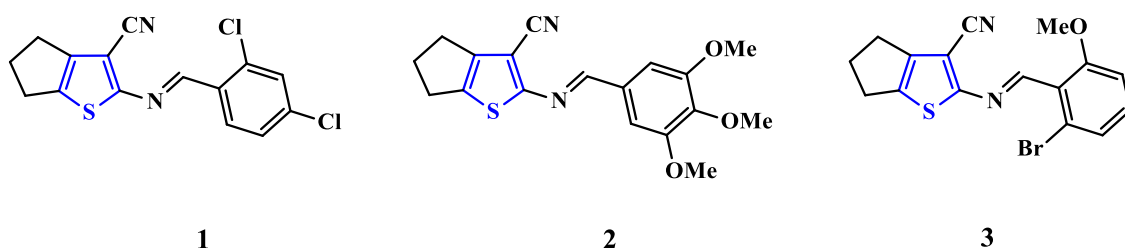


2.4.1.1 Atividade Antimicrobiana

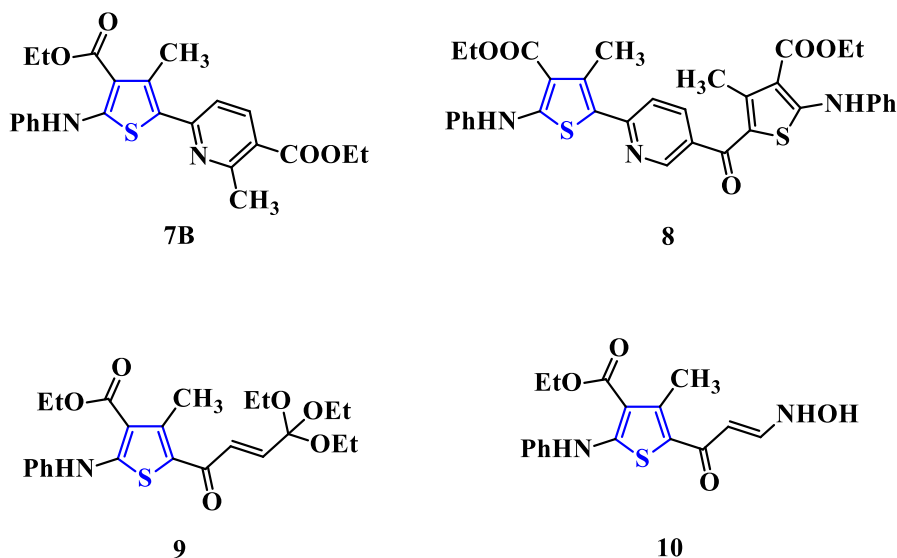
O espectro de atividades biológicas e farmacológicas do tiofeno não se resume a antitumoral e antiinflamatória, outras atividades biológicas estão bem relatadas na literatura, inclusive a atividade fungicida. Souza e colaboradores (2012) apresentaram a avaliação antifúngica de uma série de compostos tiofênicos com resultados de CIMs que variaram entre 64 µg/ml a 512 µg/ml para *Cryptococcus neoformans* e 512 µg/ml a 1024 µg/ml para *Candida krusei*. Os dois melhores resultados foram observados contra *C. neoformans* quando tratado com 2-[(quinolin-8-ilmetileno)amino]-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (1) e 2-[(quinolin-8-ilmetileno)amino]-5,6,7,8-tetraidro-4*H*-cicloheptano[*b*]tiofeno-3-carbonitrila (2) (Figura 16), ambos apresentaram CIMs de 64 µg/ml.

Figura 16 – Compostos Tiofênicos com Atividade Contra *Cryptococcus neoformans*

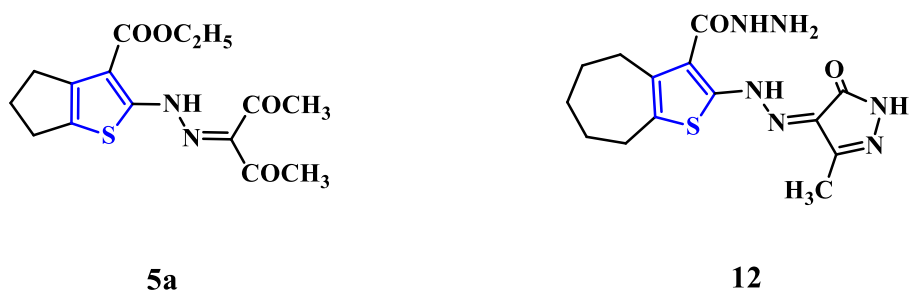
Em outro estudo, ainda contra *Cryptococcus neoformans* e *Candida krusei*, Scotti e colaboradores (2012) avaliaram a atividade antifúngica de 50 compostos tiofênicos com diversas substituições e muitos deles apresentaram concentrações de CIMs significativas. A menor CIM contra *C. krusei*, 78 µg/ml, foi observada em três derivados 2-(benzilideno-amino)-5,6-dihidro-4*H*-ciclopenta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila substituídos (Figura 17), e o composto 1 apresentou este mesmo valor de CIM contra *C. neoformans*, já os compostos 2 e 3 apresentaram CIM de 156 µg/ml contra este fungo.

Figura 17: Derivados 2-(benzilideno-amino)-5,6-dihidro-4*H*-ciclopenta[*b*]tiofeno-3-carbonitrila substituídos

Mabkhot e colaboradores (2017) prepararam núcleos tiofeno a partir de enaminonas para estudar o perfil antimicrobiano. No estudo foram utilizadas bactérias gram-positivas (*Streptococcus pneumoniae* e *Bacillus subtilis*) e gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*), além de fungos como *Aspergillus fumigatus*, *Syncephalastrum racemosum*, *Geotrichum candidum*, *Candida albicans*. Os compostos 7B e 8 (Figura 18) exibiram os melhores resultados para todas as bactérias testadas com zonas de inibição de 100% quanto comparados com o fármacos padrão (ampicilina e gentamicina). Entre os compostos de teste, os derivados **9** e **10** foram os mais potentes contra todas as espécies de fungos testadas com uma zona de inibição de 100% que é semelhante à anfotericina B.

Figura 18. Compostos tiofênicos com atividade antimicrobiana

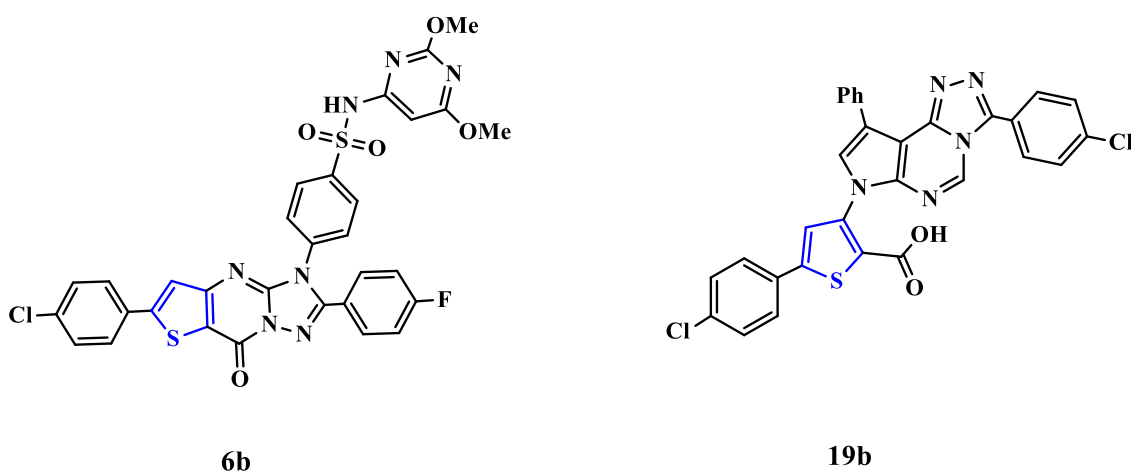
Um estudo com ciclo-alquil tiofenos realizado em 2017 por Abdel-Rahman e colaboradores avaliaram sua eficácia contra microrganismos como *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *C. albicans* e *A. fumigatus*. Os compostos **5a** e **12** (Figura 19) mostram-se eficientes contra todos os fungos e bactérias testados no estudo. As CIM variaram entre 78, 125 μM a 156,25 μM . As moléculas foram mais promissoras frente às bactérias gram-positivas *S. aureus* e *B. cereus*, ente ultimo com valores de CIM superiores ao fármaco padrão usado no estudo, a ampicilina.

Figura 19. Ciclo-alquil tiofenos com atividade antimicrobiana

Hafez e colaboradores (2017) sintetizaram tiofenos e derivados tieno[3,2-*d*] pirimidínicos *N*-substituídos e avaliou a atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC-1096, *Streptococcus bovis* ATCC-1030, *Chlamydia pneumoniae* ATCC-

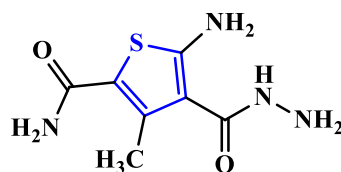
1416 e *Salmonella typhi* ATCC 2453. O antibiótico ciprofloxacino foi usado como a droga referência. Os dados mostraram uma alta atividade dos compostos **6b** e **19b** (Figura 20) no qual foi obtido valores de MIC de 1-3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ comparável ao fármaco padrão ciprofloxacino ($\text{CIM} = 0,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Tal atividade elevada foi atribuída à presença de triazolopirimidina fundida com o anel de tiofeno, além da presença de 4-fluorofenil em **6b** e 4-clorofenil em **19b** ligado à triazolopirimidina.

Figura 20. Derivados tieno[3,2-*d*] pirimidínicos *N*-substituídos com atividade antibacteriana



Um estudo para avaliar a atividade antimicrobiana de uma serie de compostos tendo como base estrutural a molécula 3-metiltiofeno-2-carboxamida (Figura 21) mostraram atividades promissoras após substituições e ciclizações. Os compostos foram testados frente às cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* (DSM 1104), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) e a levedura *Candida albicans* (DSM 70014). Dentre as estirpes usadas nos experimentos *in vitro*, *P. aeruginosa* foi a mais sensível quando submetida aos compostos **3b**, **5**, **7b**, **10b** e **11a** e **11b** com valores de CIM de 25 $\mu\text{g/mL}$ no qual correspondeu ao dobro da atividade da ampicilina (50 $\mu\text{g/mL}$), usada como droga referencia. Contudo, tais compostos apresentaram atividade bacteriostática sendo apenas os derivados **10d**, **11a** e **12a** bactericidas contra *P. aeruginosa*. Por outro lado, apenas três compostos **3b**, **4** e **10b** produziram inibição de crescimento ($\text{CIM} = 25 \mu\text{g/mL}$) contra *C. albicans* mas com perfil fugistático (Rizk *et al.*, 2017).

Figura 21. Estrutura do composto 3-metiltiofeno-2-carboxamida



2.5 ESTRESSE OXIDATIVO COMO ALVO BIOLÓGICO

As estruturas abordadas em estudos como potenciais alvos de agentes antifúngicos constituem especificidades de vários sistemas bioquímicos dos fungos, e assim, proporcionam aos agentes diferentes níveis de ação, resposta e seletividade. Os estudos englobam a síntese, regulação, metabolismo e fluxo de substâncias, interação com o material genético e proteínas, como também a perturbação de organelas. O poder inibitório está intimamente relacionado com a importância da estrutura para a homeostasia da célula, bem como o poder de adaptação do fungo (Almshawit *et al.*, 2017).

Uma pesquisa analisou o potencial inibitório do organoselênio, “ebselen”, contra 20 cepas de *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*) e 17 cepas de *Cryptococcus* spp. (*C. neoformans* e *C. gatti*), bem como o mecanismo de ação exercido por ele. Observou-se resultados de potente ação fungicida entre 0,5 a 2 µg/ml para espécies *Candida* spp. e 0,5 a 1 µg/ml para as *Cryptococcus* spp., como também foi percebido um mecanismo associado ao sistema redox com aumento dos níveis de ERO. Utilizando o perfil quimiogenômico por haploisuficiência induzida pelo ebselen, notou-se a sensibilidade de várias cepas, sendo que duas delas com deleção heterozigóticas (*gsh1Δ* e *gsh2Δ*), que codificam genes envolvidos na síntese de glutathiona (GSH) foram as mais sensíveis (Thangamani, *et al.*, 2017).

Posterior a este resultado, analisou-se o organoselênio como inibidor das proteínas *gsh1* e *gsh2* utilizando cepas mutantes com deleção haplóide de *gsh1Δ* e *gsh2Δ*, hipótese negada visto que não foi notado resistência. Assim, este dado sugere que a ação não é diretamente sobre as proteínas que sintetizam a GSH, mas possivelmente no seu metabolismo. Sendo a GSH molécula antioxidante importante no

equilíbrio redox, foi dosado os seus níveis em células tratadas, como também os níveis de ERO. A GSH apresentou expressão diminuída enquanto ERO esteve em doses elevadas. Por fim, um teste de suplementação de GSH mostrou a reversão da inibição do crescimento e confirmou que a diminuição de GSH pelo ebselen, e consequente elevação de ERO, foi responsável pela ação antifúngica do composto (Thangamani, *et al.*, 2017).

Outra pesquisa evidenciou o potencial da timoquinona em perturbar o sistema redox, esta interferência foi dita como causadora da morte de leveduras e não a consequência dela. Células de *C. albicans* apresentaram baixo potencial eletrônico em sua membrana mitocondrial e despolarização significativa resultante do aumento de ERO intracelular. Também foi notado e estimado a diminuição da concentração de GSH, que foi consumido na tentativa eliminar radicais livres e ERO nocivos. Não houve estabilização do estresse oxidativo, o que levou a morte das células. Não foi possível indicar como se deu o aumento dos níveis de ERO, mas este estudo reforça a relevância do sistema oxi-redução para o fungo, sendo assim um possível alvo para futuros antifúngicos clínicos (Almshawit *et al.*, 2017).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Para a obtenção e elucidação das estruturas químicas dos compostos foram utilizados os seguintes materiais: hidrazina 50%, 5-nitro-tiofeno-2-carboxaldeído, 4-metóxi-fenil-isotiocianato, 4-bromo-fenil-isotiocianato, 1-naftil-isotiocianato, alil-isotiocianato, fenil-isotiocianato, 4-cloro-fenil-isotiocianato, 2-fenil-etil-isotiocianato, 4-metil-fenil-isotiocianato, 4-etil-fenil-isotiocianato, diclorometano, etanol absoluto, acetato de etila, *n*-hexano e ácido acético e dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆), placas de sílica gel 60 F₂₅₄ de 0,25 mm de espessura e pastilhas de KBr de 1 % e 2 %. Todos fornecidos pela Sigma, Aldrich, Fluka e Merck.

Todas as placas cromatográficas foram reveladas em câmara UV VILBER CN-15LC; os pontos de fusão foram medidos com o fusiometro Fisatom modelo 431D. Para análise estrutural foi utilizado espectrômetro MHz-VarianUnity plus-300, espectrofotômetro FTIR Bruker IFS66 e MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA).

Para avaliação da atividade antifúngica foi utilizado: meio de cultura RPMI 1640; Ágar Dextrose Sabouraud; tampão MOPS (ácido 3-(*N*-morfolino) propanosulfônico); dimetilsulfoxido (DMSO); placas de 96 poços de fundo chato; itraconazol, cetoconazol, fluconazol, anfotericina B, ergosterol e Tween 80. Todos fornecidos pela Sigma, Aldrich e Merck. Para o ajuste do inóculo foi usado um Espectrofotômetro Genesys 10S UV-VIS da Thermo Scientific.

As leveduras utilizadas nos testes encontram-se depositadas na Micoteca URM do departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco no qual foram selecionadas: *Candida albicans* URM 5901; *Candida albicans* ATCC 14053, *Candida parapsilosis* URM 7048, *Candida parapsilosis* URM 4970, *Candida parapsilosis* ATCC 22019; *Candida tropicalis* URM 6551; *Candida krusei* ATCC 6258 e *Cryptococcus neoformans* URM 6898. Para o estudo de mecanismo foram selecionadas as cepas: *Candida albicans* URM 5900, URM 5597, URM 5974, URM 5901, URM 90028, URM 4387, URM 4990, URM 4127. Já as bactérias, estão depositadas na Coleção de Culturas Bacterianas do Departamento de Antibióticos também da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA), as quais foram: *Bacillus cereus* UFPEDA 213, *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *Enterococcus faecalis* UFPEDA

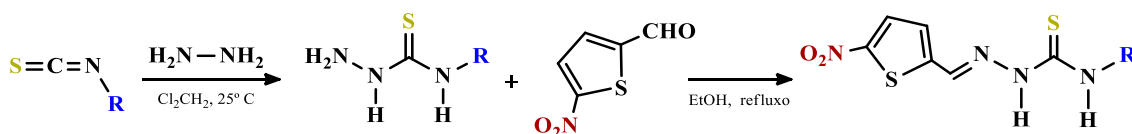
69, *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA 396, *Escherichia coli* UFPEDA 224, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416, *Proteus mirabilis* UFPEDA 767.

3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1 Síntese dos Compostos da Série 2-(5-nitro-tiofeno)tiossemicarbazonas-*N*²-substituídos

Para obtenção dos compostos foi utilizada uma rota sintética constituída por duas etapas (Figura 22). Tiossemicarbazidas foram preparadas na primeira etapa através de uma reação entre 9 isotiocianatos substituídos e hidrazina. Na segunda etapa cada tiossemicarbazida foi posta a reagir com 5-nitro-tiofeno-2-carboxaldeído formando, assim, 5-nitrotiofeno-tiossemicarbazonas.

Figura 22 – Procedimento Geral de Síntese das Tiossemicarbazonas



3.2.1.1 Etapa 1 – Procedimento Geral para Obtenção das Tiossemicarbazidas

O isotiocianato foi adicionado a um balão de fundo redondo, juntamente com 10 ml de diclorometano, em seguida a hidrazina 50% foi adicionada gota a gota na proporção 1:2 molar. A reação foi mantida sob agitação magnética e temperatura ambiente por aproximadamente 4 horas e acompanhada por cromatografia em camada delgada utilizando sistemas *n*-hexano:acetato de etila em diferentes proporções. Ao término, a reação foi filtrada e lavada com diclorometano. *n*-hexano foi utilizado para forçar a precipitação quando necessário.

3.2.1.2 Etapa 2 - Procedimento Geral para Obtenção das Tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas foram preparadas através de uma reação equimolar entre 5-nitrotiofeno-2-carboxaldeído e as tiossemicarbazidas previamente sintetizadas, em etanol e ácido acético glacial (meio reacional com pH próximo a 5). Em um balão de fundo redondo foi adicionado o aldeído tiofênico, 10 ml de etanol e o ácido acético, após homogeneização foi adicionado a tiossemicarbazida. A reação foi mantida sob agitação magnética e temperatura ambiente por aproximadamente 8 horas e acompanhada por cromatografia em camada delgada utilizando sistemas de *n*-hexano:acetato de etila em diferentes proporções. Ao término, a reação foi filtrada e lavada com etanol gelado.

3.2.2 Obtenção dos inóculos fungicos e bacterianos

As leveduras foram crescidas em meio de cultura Ágar Dextrose Sabouraud a 35 °C durante 24 hs para as espécies de *Candida* e 48h para *Cryptococcus neoformans*. Foi retirado um inóculo das culturas e suspensos em 5,0 ml de solução salina estéril a 0,085% e colocadas em Vortex por 15 segundos. A densidade celular foi ajustada por espectrofotômetro acrescentando-se solução salina suficiente para obter a transmitância (80-90) equivalente de uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5 em comprimento de onda de 530 nm. Esse procedimento fornece uma suspensão-padrão de levedura contendo 1×10^6 a 5×10^2 células por ml. A suspensão para os testes foi obtida fazendo-se uma diluição 1/100 em salina seguida de uma diluição de 1/20 em meio de cultura RPMI 1640 tamponado com MOPS.

O inóculo bacteriano foi obtido por culturas prévias das cepas em ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubadas a 37°C por 24h. As suspensões foram padronizadas de acordo com as recomendações propostas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016/M100-S26; CLSI, 2015/M07-A10). As colônias isoladas foram suspensas em solução salina a 0,9%, de modo a obter suspensões diluídas com concentração final próxima a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Para tanto, as densidades ópticas das suspensões foram conferidas em um espectrofotômetro. A absorbância em 625 deveria estar compreendida na faixa de 0,08 a 0,13.

3.2.3 Testes de Sensibilidade Antimicrobiana

Os testes de sensibilidade antifúngica foram realizados segundo a CLSI (2002) de acordo com a norma M27-A2 no qual é um método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica. Foram pesados 6,4 mg das nove moléculas sintetizadas e solubilizadas em 1,0 ml de DMSO. Em seguida, as soluções foram filtradas em filtros de 22 µm de diâmetro para que 10 µl fossem retirados e diluídos em 0,99 ml do meio RPMI 1640 com MOPS obtendo-se ao final uma diluição de 1/100 a uma concentração de 64 µg/mL e DMSO a 1%.

Placas de 96 poços de fundo chato foram previamente preenchidas com 100 µl de meio RPMI 1640 com MOPS. Após isso, 100µl da droga foi adicionado no 1° poço e então homogeneizado e retirado 100 µl para ser colocado no 2° poço de forma que uma diluição seriada de 1/2 fosse feita até o 10° poço e este ultimo retirado e colocado no 11° poço para servir como controle. Assim as concentrações das drogas do 1° ao 10° poço foram: 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,062 µg/ml. Depois das diluições seriadas, 100 µl da suspensão de células de leveduras foi adicionado a todos os poços. O 12° poço foi usado como controle positivo do teste. Ao final as concentrações das drogas foram reduzidas novamente pela metade de modo que o 1° poço tenha uma concentração de 16 µg/ml. As placas foram incubadas a 35 °C.

A leitura visual dos resultados foi realizada em 24 hs para as espécies de *Candida* e 48h para *Cryptococcus neoformans*. Os testes foram realizados em duplicata com três repetições independentes.

A CIM para as cepas bacterianas também foi determinada através da técnica de microdiluição em placa de 96 poços, seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016/M100-S26; CLSI, 2015/M07-A10). Volumes de caldo Mueller-Hinton foram distribuídos nas microplacas, conforme recomendado pelo protocolo. Em cada poço da coluna 1, foram adicionados 20 µL dos produtos diluídos em DMSO a 10% (concentração inicial = 10.000 µg/mL). Em seguida, realizou-se a diluição seriada na ordem de 1000 a 3,9 µg/mL. Após diluição, cada poço foi inoculado com 10 µL do inóculo microbiano padronizado, de forma que em cada poço houvesse numa concentração de $1,5 \times 10^5$ UFC/mL. As colunas 10, 11 e 12 foram utilizadas para os controles: controle positivo, controle do diluente da molécula (DMSO a 10%) e controle negativo (Gentamicina a 60 µg/mL) respectivamente. O

ensaio foi realizado em triplicata com três repetições independentes para cada microrganismo teste e as microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

Decorrido o tempo de incubação, procedeu-se a revelação das microplacas utilizando 20 µL de resazurina a 0,01% (corante indicador de cor azul) em cada poço. As microplacas foram incubadas por 4 horas a 37 °C. A manutenção da cor azul é interpretada como inibição do crescimento microbiano, enquanto que os poços cor de rosa indicam que houve crescimento. Considera-se a CIM como a concentração do último poço da diluição que apresentou a cor azul.

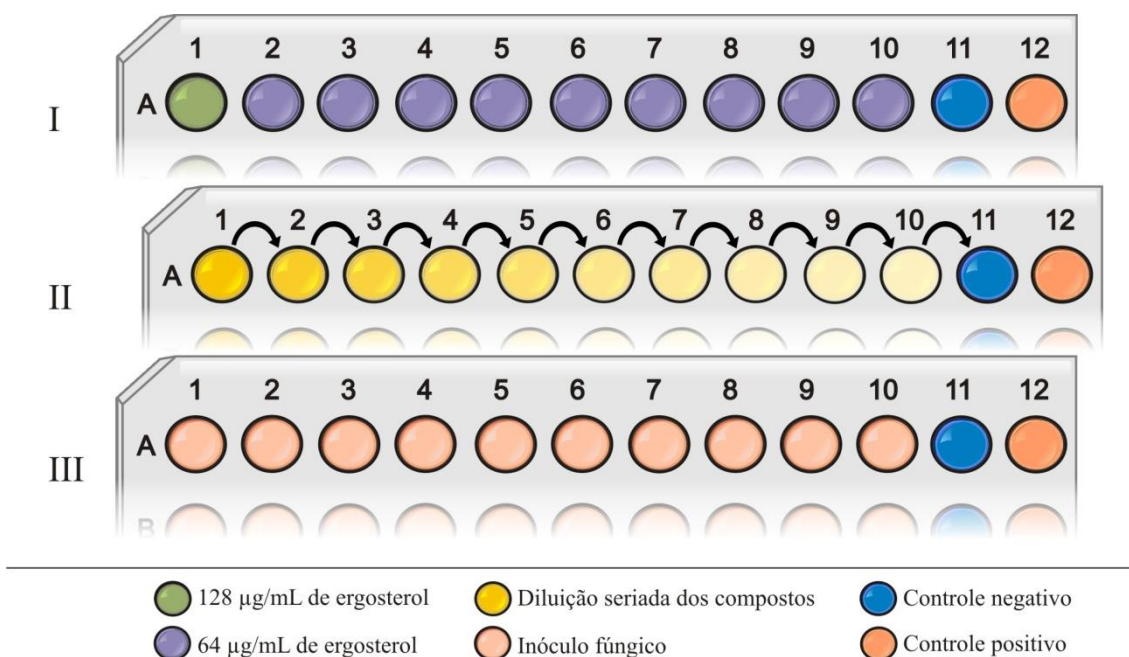
A Concentração Mínima Bactericida (CBM) foi determinada pelo retrocultivo dos poços que apresentaram turbidez, em placas de Petri contendo o meio Ágar Müeller Hinton, as quais foram incubadas a 37 °C, por 24 horas. A CBM foi considerada como a última diluição que não apresentou crescimento microbiano em placa.

3.2.4 Teste do Ergosterol

O ergosterol foi preparado no momento da execução do teste de acordo com Leite e colaboradores (2014) com modificações, sendo primeiramente triturado, com gral e pistilo de porcelana esterilizado, dissolveu-se em DMSO e Tween 80 a 1%, de acordo com a concentração e volume desejado. Para verificar se houve ligação entre os compostos e o esterol de membrana ergosterol, o experimento foi realizado de acordo com o método descrito por Escalante e colaboradores (2008), com algumas modificações (Figura 23). Foram misturados 12,8 mg de ergosterol em 0,99 ml de DMSO e 0,01 ml de Tween 80 em seguida foi feita uma diluição de 1/100 em meio RPMI 1640 tamponado com MOPS obtendo ao final uma concentração de 128 µg/ml no qual foi adicionado 100 µl no 1° poço. Outra diluição 1/100 em RPMI 1640 com ergosterol foi preparada da mesma forma que a primeira, entretanto, com metade da concentração (64 µg/ml) e desta foi retirada 100 µl e colocado nos demais poços (I), permitindo ao final do procedimento uma concentração de 32 µg/ml em todos os poços.

Os compostos e os inóculos fúngicos usados para o teste foram preparados segundo a CLSI assim como os procedimentos para a obtenção da CIM (II, III). O mesmo procedimento foi realizado para a Anfotericina B, cuja interação com o ergosterol de membrana já é conhecido, que serviu como controle. As placas foram seladas e incubadas a 35 °C.

Figura 23 – Teste de sensibilidade com ergosterol exógeno: (I) etapa de adição do ergosterol em RPMI 1640 tamponado com MOPS; (II) etapa de diluição seriada de acordo com CLSI; (III) etapa de adição do inóculo.



3.2.5 Teste do Sorbitol

O ensaio foi realizado utilizando um meio com e sem sorbitol (controle) pelo método de microdiluição em caldo segundo a CLSI. Foram pesados 3,2 mg das moléculas a serem testadas e solubilizadas em 250 µL de DMSO e pesado 2,9147 g do sorbitol e solubilizado em 20 ml de meio RPMI 1640 tamponado com MOPS obtendo-se uma solução a 0,8 M. O meio RPMI contendo sorbitol foi filtrado e então utilizado para fazer as diluições de 1/100 das moléculas e 1/20 do inóculo fúngico como descrito na norma M27-A2 da CLSI/2002. As placas de 96 poços foram incubadas a 35 °C e a leitura dos resultados feitas em 2-7 dias.

3.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

As amostras foram preparadas após os resultados das CIM dos testes de sensibilidade antifúngica. Concentrações sub-inibitórias foram coletadas e centrifugadas para a retirada do meio de cultura, seguido de lavagens sucessivas com tampão cacodilato a 0,1M e pH 6,8 e posteriormente submetidas à fixação em glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato a 0,1 M. Após 24 hs as amostras foram centrifugadas e

submetidas a lavagens com tampão cacodilato a 0,1 M e submetidas a pós-fixação em tetróxido de ósmio (OsO_4) a 2% em tampão cacodilato 0,1 M com pH 6,8 durante 1h na ausência de luz e temperatura ambiente. As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de Etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) por 10 minutos para cada troca e 15 minutos para a última com 3 repetições para então serem secadas no ponto-crítico utilizando CO_2 líquido. Após a secagem, o material foi colocado em suporte, metalizados com ouro coloidal e analisados em Microscópio JEOL-5600LV da Fiocruz-PE.

3.2.7 Teste de Citotoxicidade

Células esplênicas (6×10^5 células/poço) de camundongos BALB/c foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo plano, contendo meio de cultura RPMI 1640. Para o ensaio de citotoxicidade, as células foram incubadas com os compostos em diferentes concentrações (100 até 1,56 $\mu\text{g/ml}$) e com timidina tritiada (1 $\mu\text{Ci/poço}$) durante 24 hs em estufa de CO_2 a 37°C. Para o controle foram utilizadas células tratadas com saponina (0,05%) e sem tratamento, todos com timidina tritiada (1 $\mu\text{Ci/poço}$) associada em paralelo. Cada droga foi testada em triplicata. Após 24 hs de incubação, as células foram coletadas em papel de fibra de vidro e, posteriormente, a captação de timidina tritiada determinada através do contador beta de cintilação. O percentual de citotoxicidade foi determinado comparando-se a percentagem de incorporação de timidina tritiada nos poços com as drogas em relação aos poços não tratados. As concentrações atóxicas foram definidas como aquelas que causaram uma redução na incorporação com timidina tritiada abaixo de 30% em relação ao controle sem tratamento (células esplênicas sem as substâncias testadas) (Santiago *et al.*, 2014).

3.2.8 Avaliação da Atividade Antioxidante por DPPH

A atividade de eliminação de radicais livres dos compostos a serem testados foi avaliada pelo método do DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) segundo Blois (1958). Foi dissolvido 0,008 g do reagente DPPH em metanol e feita a leitura em espectrofotômetro a 517 nm para se obter uma absorbância entre 0.600 e 0.700. Em seguida, foram feitas diluições dos compostos a serem testados, utilizando metanol, para se obter concentrações de 50, 100, 250 e 500 $\mu\text{g/ml}$. Em placas de 96 poços de fundo plano foi

adicionado 40 µl dos compostos e 250 µl da solução do DPPH, a reação durou 30 minutos na ausência de luz. A leitura dos resultados foi realizada em leitor de ELISA uQuant (BioTek Instruments) a 517 nm. A Percentagem de Sequestro de Radicais Livres foi determinada utilizando a seguinte equação:

$$(\%) = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

Onde, Abs controle é a absorbância da solução do DPPH em metanol, Abs amostra é a absorbância dos compostos testados. Foi utilizado o ácido ascórbico (aa) como padrão nas mesmas concentrações testadas. Além disso, o teste foi realizado em triplicata com duas repetições independentes.

O cálculo do EC₅₀ (concentração necessária para obtenção de um efeito oxidante de 50%) foi determinado pelo software GraphPad Prism 7 utilizando o modelo de dose-resposta farmacológica para ajuste de curva com um intervalo de confiança de 95% (Estimativa EC₅₀).

3.2.9 Avaliação da Proteção Antioxidante com Ácido Ascórbico (aa)

A avaliação da proteção antioxidante com ácido ascórbico foi realizada após os resultados da avaliação antioxidante de **LNN-10** pelo método DPPH. A metodologia empregada visa um equilíbrio redox em casos que a molécula teste possa causar um estresse oxidativo uma vez que o ácido ascórbico tem propriedades antioxidantes amplamente conhecidas. Dessa forma, a suplementação de meio RPMI 1640 tamponado com MOPS com ácido ascórbico a 4.0 mM possibilita o crescimento fúngico mesmo na presença da molécula induzindo um desequilíbrio redox. Os resultados podem ser observados pelo deslocamento das concentrações de CFM para valores maiores aos determinados no teste de sensibilidade.

3.2.10 Ensaio de Interação com a Glutathione Reduzida (GSH)

O ensaio da interação com a glutathione reduzida foi realizado com o intuito de proteger a levedura do ataque da molécula teste. O ensaio tem como princípio a interação com a molécula antes de esta entrar em contato com o fungo através da

glutathione exógena no qual quando esta interação é positiva os valores da CFM são deslocados para uma concentração maior daqueles observados no teste de sensibilidade antifúngica. Esta avaliação foi feita de acordo com a CLSI (2002) na norma M27 A2 com modificação apenas na suplementação do meio RPMI 1640 tamponado com MOPS de 4 mM de GSH.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

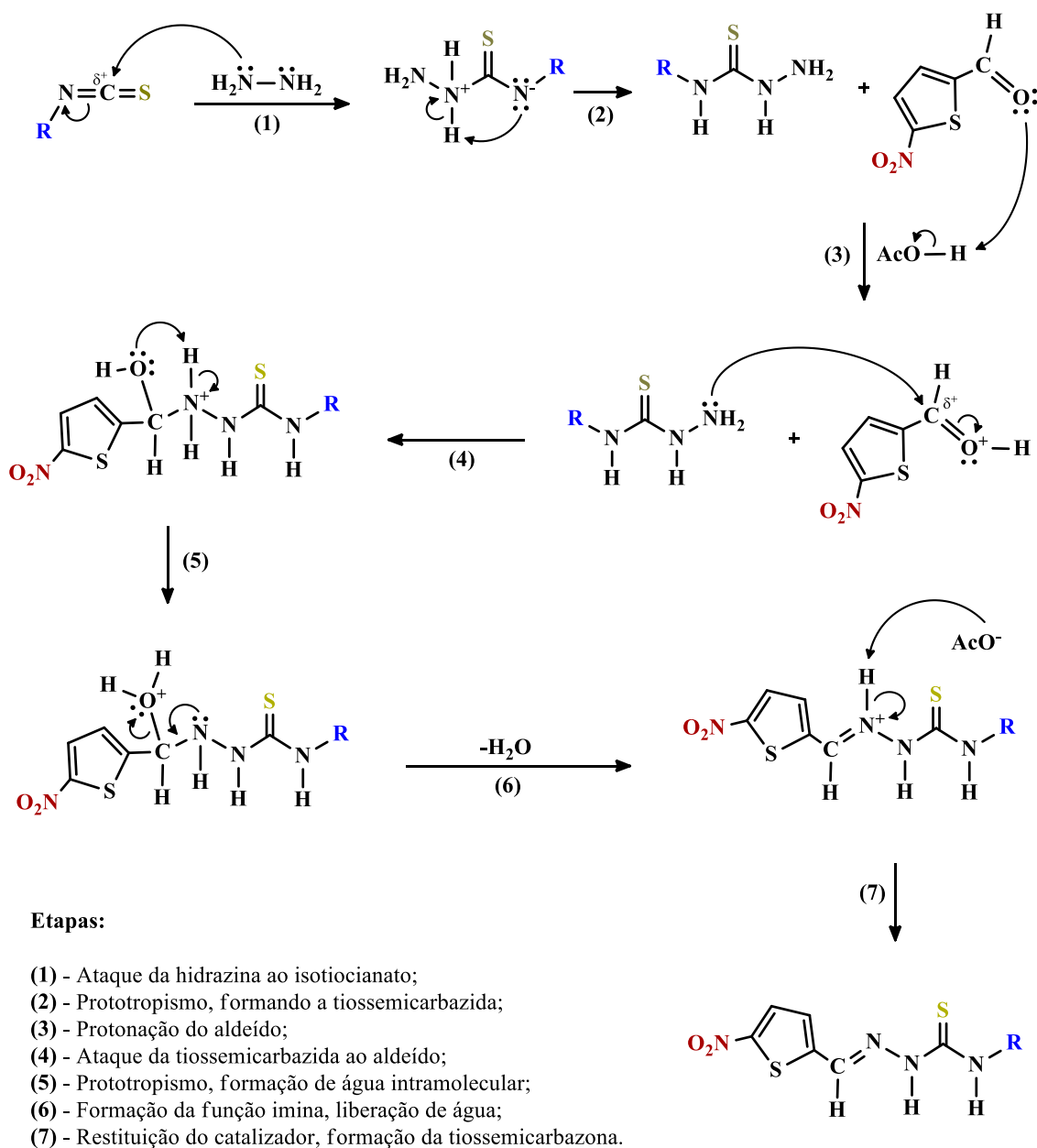
4.1 SÍNTESE E MECANISMOS REACIONAIS

A série sintetizada foi obtida através de duas reações consecutivas no qual a semicarbazida gerada como produto da reação entre a hidrazina e isotiocianatos foi usada como intermediário para reagir com 5-nitrotiofeno-2-carboxaldeído e gerar como produto a tiossemicarbazonas, de acordo com a figura 24.

A hidrazina reage com o isotiocianato devido ao ataque nucleofílico que pode fazer ao carbono parcialmente positivo do isotiocianato (1). Durante este ataque a ligação π entre o C e o N do isotiocianato é rompida deixando o N com carga formal negativa, além disso, o N da hidrazina adquire carga formal positiva após se ligar ao C do isotiocianato. A molécula é estabilizada quando ocorre um prototropismo entre os nitrogênios instáveis formando a tiossemicarbazida (2).

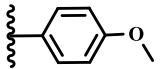
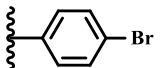
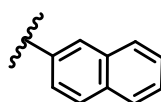
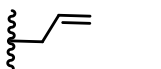
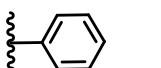
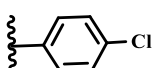
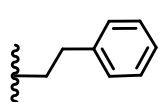
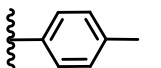
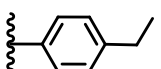
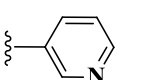
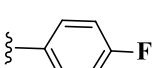
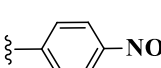
Para a formação das tiossemicarbazonas a reação começa com a protonação do oxigênio da carbonila pelo ácido (catalizador) para formar o intermediário íon axônico (3), seguida do ataque nucleofílico do nitrogênio N^1 da tiossemicarbazida ao carbono da função aldeído para formar o intermediário hemiaminal protonado (4). Novamente há um prototropismo, dessa vez entre a função álcool e o nitrogênio protonado, formando água intramolecular (5). Uma condensação ocorre gerando uma dupla ligação, a função imina (6), liberando água e atribuindo carga positiva ao nitrogênio, que é posteriormente estabilizado com a reestruturação do catalizador e a formação da tiossemicarbazona (7) (Tenório *et al.*, 2005).

Figura 24 – Mecanismo Reacional da Rota Sintética Utilizada



Todos os compostos 2-(5-nitro-tiofeno)-tiossemicarbazônicos (LNN-01 a 12) sintetizados foram devidamente caracterizados e tiveram suas estruturas químicas comprovadas, ou tiveram seus dados físico-químicos comparados com os dados da literatura. A tabela 01 apresenta as estruturas químicas e os dados físico-químicos de todos os compostos.

Tabela 01 – Dados Físico-Químicos dos Derivados 2-(5-nitro-tiofeno)-tiossemicarbazônicos (**LNN-01 a 12**).

R	Composto	FM	MM (g/mol)	PF (°C)	Rend. (%)
	LNN-01	C ₁₃ H ₁₂ N ₄ O ₃ S ₂	336,39	181-183	76,80
	LNN-02	C ₁₂ H ₉ BrN ₄ O ₂ S ₂	385,26	205-207	58,58
	LNN-03	C ₁₆ H ₁₂ N ₄ O ₂ S ₂	356,42	213-215	69,68
	LNN-04	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₂ S ₂	270,33	210-212	83,86
	LNN-05	C ₁₂ H ₁₀ N ₄ O ₂ S ₂	306,36	165-167	50,29
	LNN-06	C ₁₂ H ₉ ClN ₄ O ₂ S ₂	340,81	193-195	94,16
	LNN-07	C ₁₄ H ₁₄ N ₄ O ₂ S ₂	334,42	194-196	91,85
	LNN-08	C ₁₃ H ₁₂ N ₄ O ₂ S ₂	320,39	202-204	82,89
	LNN-09	C ₁₄ H ₁₄ N ₄ O ₂ S ₂	334,42	165-167	84,44
	LNN-10	C ₁₂ H ₉ N ₅ O ₂ S ₂	307,01	213-215	87,33
	LNN-11	C ₁₂ H ₉ FN ₄ O ₂ S ₂	324,01	198-199	87,76
	LNN-12	C ₁₂ H ₉ N ₅ O ₄ S ₂	351,36	200-201	93,54

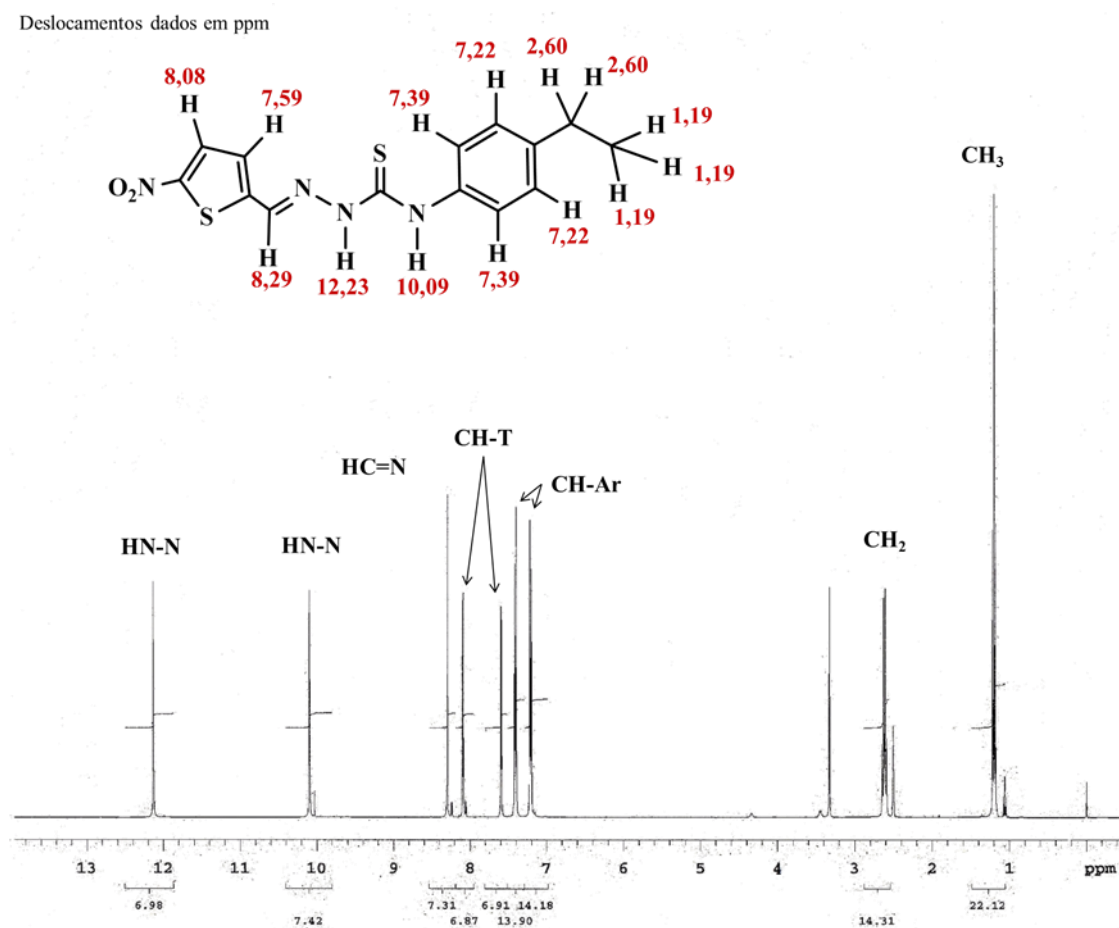
FM = Fórmula molecular; MM = Massa molar; PF = Ponto de fusão; Rend. = Rendimento.

4.2 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

A elucidação estrutural foi feita através de análises de RMN ¹H, RMN¹³C, infravermelho, DEPT e espectrometria de massas de alta resolução. O RMN ¹H do composto **LNN-09** mostrado na figura 25 apresentou um sinal em 1,19 ppm na forma de

triplete correspondente a metila e outro sinal em 2,60 ppm na forma de quarteto no qual representa o metileno. Os sinais que representam os prótons da fenila tiveram deslocamentos químicos sob a forma de dubletos em 7.39 e 7.22 ppm. Já os prótons do anel tiofeno obtiveram sinais também na forma de dubletos, mas com integração para um próton cada em 7,59 e 8,08 ppm. Além disso, três singletos em 8,29, 10,09 e 12,13 ppm representando os prótons de HC=N, HN-C e HN-N respectivamente mostram que o produto da reação entre a tiossemicarbazida e o 5-nitro-tiofeno-2-carboxaldeído foi obtido com sucesso já que a formação da imina caracteriza esta reação (Oliveira *et al.*, 2015; Parrilha *et al.*, 2011).

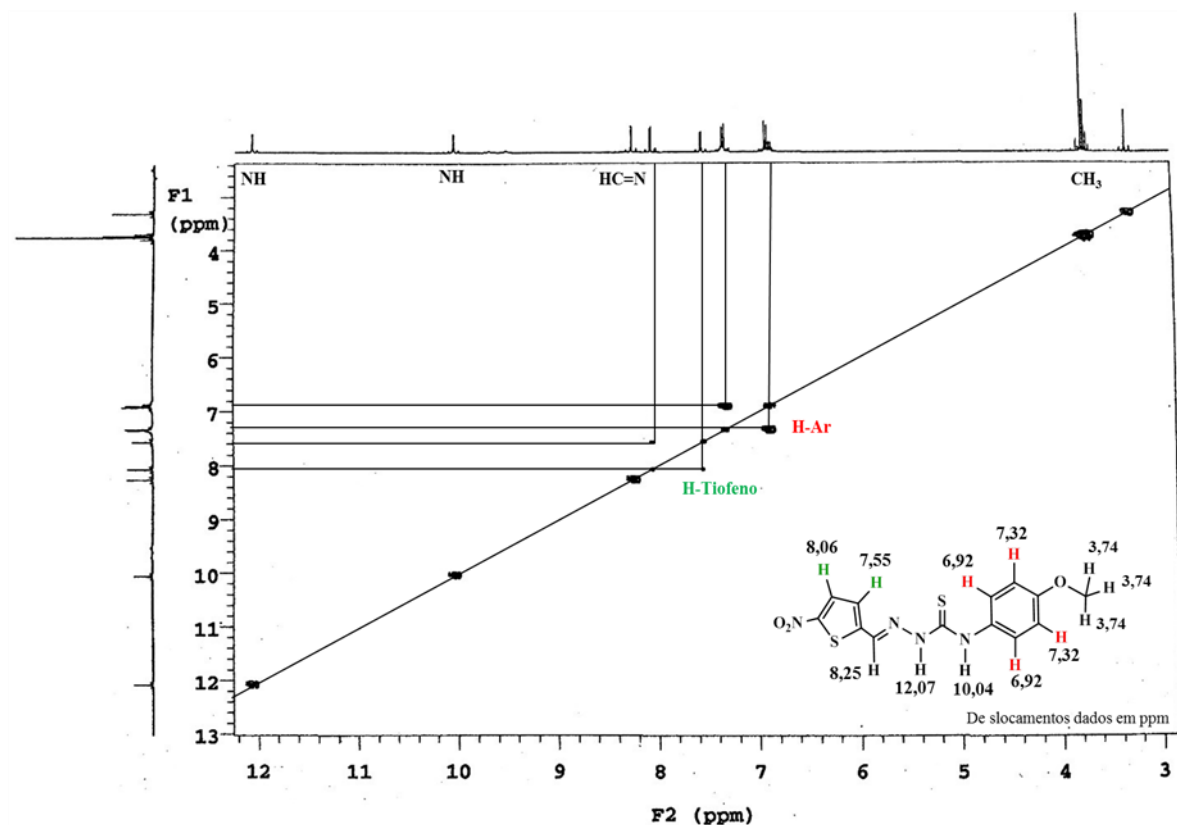
Figura 25 – Espectro de RMN ^1H do composto **LNN-09**



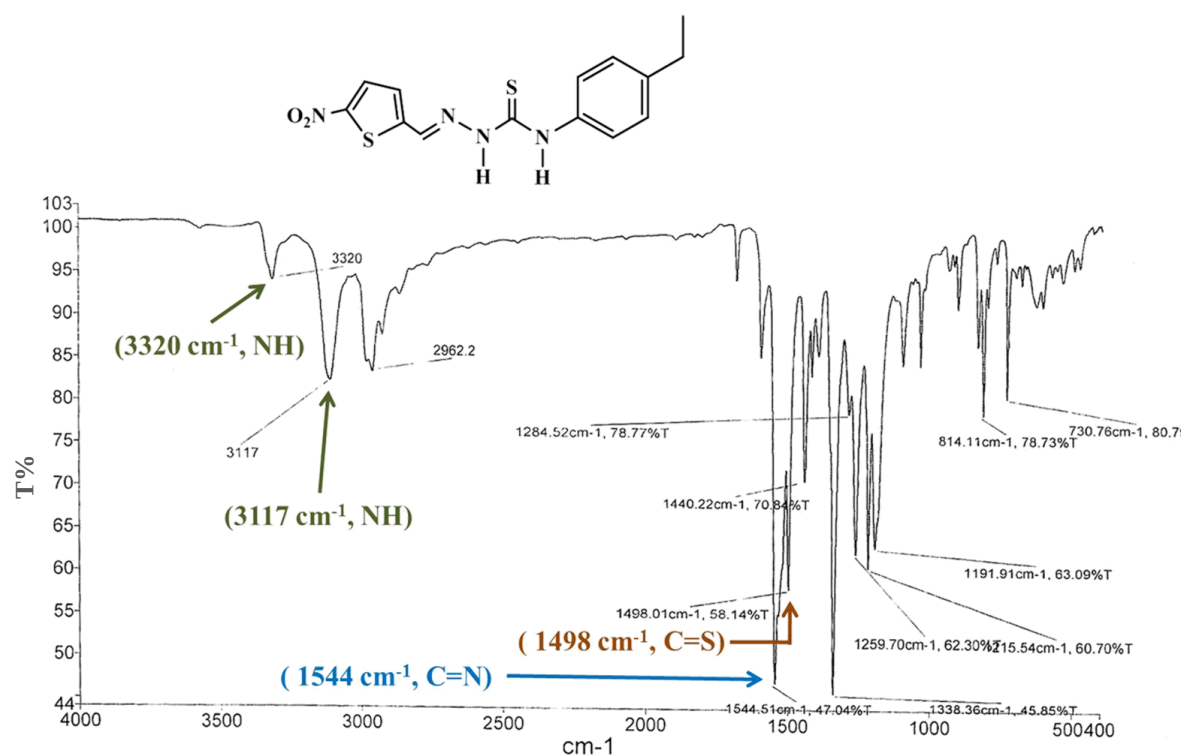
As correlações entre os hidrogênios acoplados por $^2\text{-}^3J_{\text{H,H}}$ foi verificada utilizando a técnica de COSY (*homonuclear CORrelation Spectroscopy*) na molécula **LNN-01** no qual esta representado na figura 26. O sinal em 8,06 ppm está acoplando com o H correspondente ao sinal em 7,55 ppm e este também acopla com o primeiro

caracterizando os sinais dos hidrogênios do anel tiofeno. Outra correlação entre dois sinais ainda pode ser observada em 7,32 e 6,92 ppm no qual mostra os acoplamentos para o anel benzeno. Esses resultados estão de acordo com Oliveira e colaboradores (2015) no qual obtiveram acoplamentos para o benzeno entre os hidrogênios com sinais em 7,42 e 7,15 ppm.

Figura 26 – Espectro de COSY do Composto LNN-01

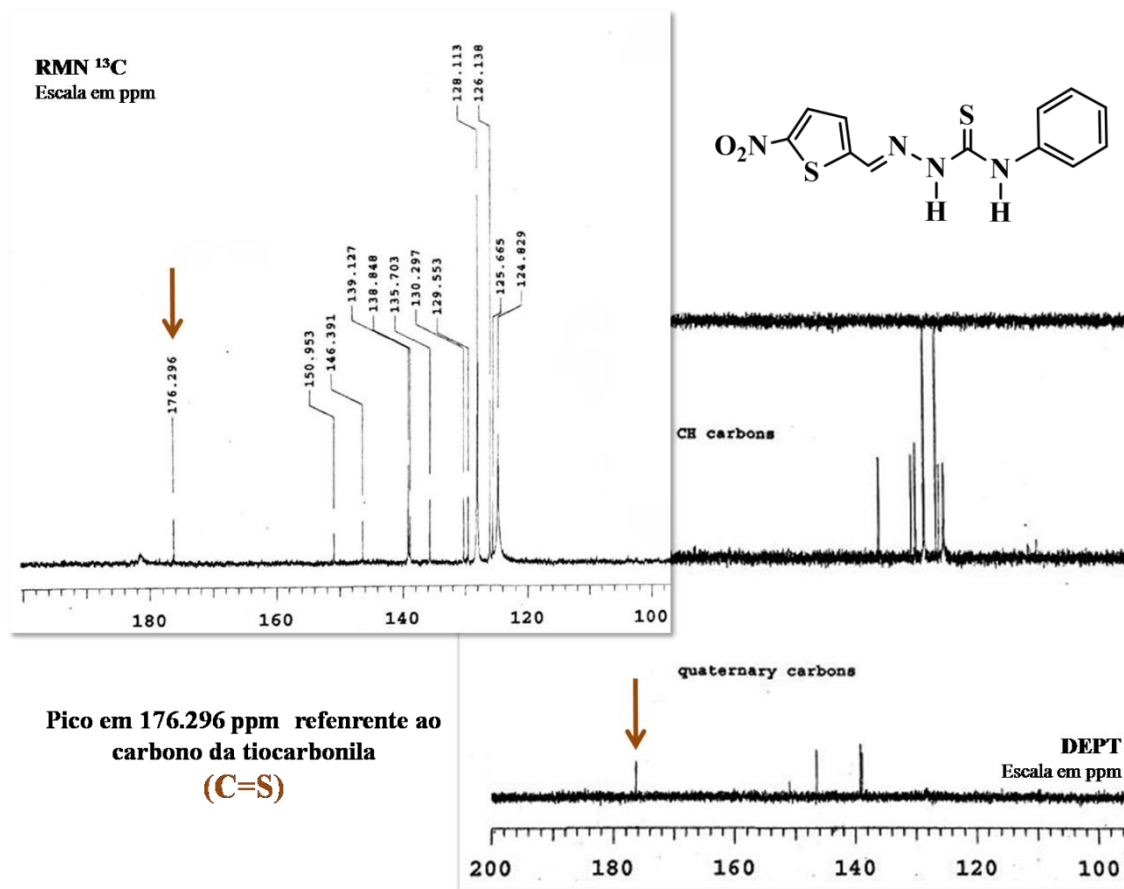


A possibilidade de tautomerismo tiona-tiol ($\text{H}-\text{N}-\text{C}=\text{S}/\text{N}=\text{C}-\text{SH}$) nestes compostos foi descartada, pois não foram observados sinais entre as faixas $2500\text{--}2650\text{ cm}^{-1}$ no espectro de absorção do infravermelho que são característicos do grupo tiol. No entanto, o estiramento observado em 1498 cm^{-1} no qual representa a tiocarbonila ($\text{C}=\text{S}$) mostra a preferencia da forma tiona (Figura 27) (Agarwal *et al.*, 2006; Sadler, 1961). Além disso, foi observada uma banda de absorção em 3320 cm^{-1} e 3117 cm^{-1} atribuída aos grupos NH presentes na molécula, e um estiramento em 1544 cm^{-1} foi evidenciado e atribuído a função imina.

Figura 27 – Espectro de Absorção de Infravermelho do Composto **LNN-09**

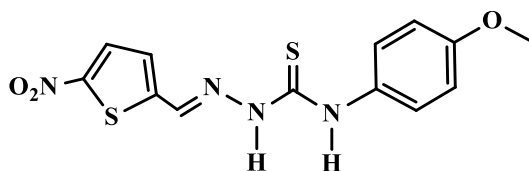
Os espectros de RMN ¹³C e DEPT de **LNN-05** evidenciam 8 carbonos sp² hidrogenados (2 do anel tiofeno, 5 do anel fenila e 1 da imina) e 5 carbonos sp² que não se ligam a hidrogênios no qual o sinal mais desblindado que aparece em 176,29 ppm representa o carbono da tiocarbonila (Figura 28).

Figura 28 – Espectro de ^{13}C e DEPT do Composto LNN-05



4.2.1 Dados Espectroscópicos e Espectrométricos dos Derivados 2-(5-nitro-tiofeno)-tiossemicarbazônicos.

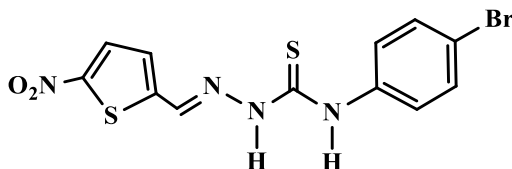
LNN-01 - *N*-(4-metoxifenil)-2-((5-nitro-tiofeno-2-il)metileno)-hidrazina-carbotioamida



RMN ^1H : (400 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ 12.07 (s, 1H, NH-N), 10.04 (s, 1H, NH-C), 8.25 (s, 1H, CH=N), 8.06 (d, 1H, J = 4.4 Hz, H-Tiofeno), 7.55 (d, 1H, J = 4,4 Hz, H-Tiofeno), 7.32 (d, 2H, J = 9.2 Hz, Ar-H), 6.92 (d, 2H, J = 9.2 Hz, Ar-H), 3.74 (s, 3H, CH₃). RMN ^{13}C : (100 MHz, DMSO- d_6) 55.184; 55.223; 113.304; 127.726; 129.399; 130.289; 131.707; 135.448; 146.531; 150.884; 157.142; 176.582. IV: (ν cm $^{-1}$ KBr) 3319

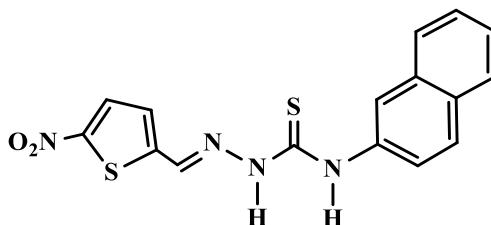
e 3127 (NH); 1546 (C=N); 1511 (C=S). EM: m/z $[M+H]^+$ calculado para $C_{13}H_{12}N_4O_3S_2$: 337.03; encontrado: 337.05.

LNN-02– *N*-(4-bromofenil)-2-((5-nitro-tiofeno-2-il)metileno)-hidrazina-carbotioamida

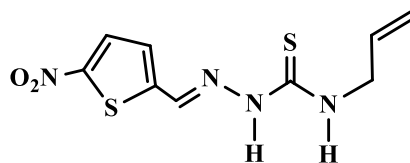


RMN 1H : (400 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ 12.25 (s, 1H, NH-N), 10.18 (s, 1H, NH-C), 8.30 (s, 1H, CH=N), 8.09 (d, 1H, J = 3.6 Hz, H-Tiofeno), 7.61 (d, 1H, J = 4.4 Hz, H-Tiofeno), 7.55 (q, 4H, J = 8.8 Hz, Ar-H). RMN ^{13}C : (100 MHz, DMSO- d_6) 18.526; 55.997; 117.936; 128.082; 129.716; 130.266; 130.924; 136.059; 138.267; 146.206; 151.039; 176.218. IV: (ν cm^{-1} KBr) 3300 e 3180 (NH); 1547 (C=N); 1527 (C=S). EM: m/z $[M+H]^+$ calculado para $C_{12}H_9BrN_4O_2S_2$: 384.93; encontrado: 384.84.

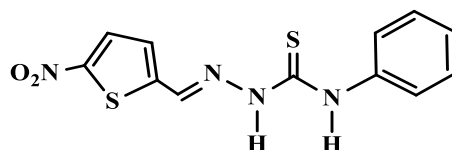
LNN-03– *N*-(naftaleno-2-il)-2-((5-nitro-tiofeno-2-il)metileno)-hidrazina-carbotioamida



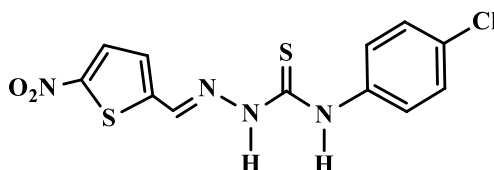
RMN 1H : (400 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ 12.29 (s, 1H, NH-N), 10.50 (s, 1H, NH-C), 8.36 (s, 1H, CH=N), 8.11 (d, 1H, J = 0.8 Hz, H-Tiofeno), 8.10 (d, 1H, J = 0.8 Hz, H-Tiofeno), 7.36 (t, 3H, J = 4.4 Hz, Ar-H), 7.59 (m, 4H, Hz, Ar-H). RMN ^{13}C : (100 MHz, DMSO- d_6) 123.257; 125.402; 126.029; 126.122; 126.355; 127.075; 127.997; 129.445; 130.297; 130.390; 133.666; 135.494; 135.602; 146.663; 150.946; 178.007. IV: (ν cm^{-1} KBr) 3251 e 3084 (NH); 1535 (C=N); 1523 (C=S). EM: m/z $[M+H]^+$ calculado para $C_{16}H_{12}N_4O_2S_2$: 357.04; encontrado: 357.08.

LNN-04 – *N*-alil-2-((5-nitro-tiofeno-2-il)metileno)-hidrazina-carbotioamida

RMN ^1H : (400 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ 11.89 (s, 1H, NH-N), 8.72 (t, 1H, J = 6.0 Hz, NH-C), 8.20 (s, 1H, CH=N), 8.07 (d, 1H, J = 4.4 Hz, H-Tiofeno), 7.52 (d, 1H, J = 4.4 Hz, H-Tiofeno), 5.94 (m, 1H, CH=C), 5.17 (m, 2H, CH₂-N), 4.15 (t, 2H, J = 6.0 CH₂=C). RMN ^{13}C : (100 MHz, DMSO- d_6) 45.898; 115.628; 129.120; 130.343; 134.689; 135.006; 146.709; 150.620; 177.163. IV: (ν cm $^{-1}$ KBr) 3374 e 3127 (NH); 1538 (C=N); 1523 (C=S). EM: m/z [M+H] $^{+}$ calculado para C₉H₁₀N₄O₂S₂: 270,02; encontrado:270,33.

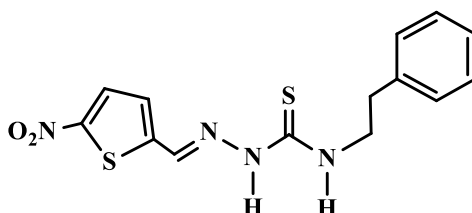
LNN-05–2-((5-nitro-tiofeno-2-il)metileno)-*N*-fenil-hidrazina-carbotioamida

RMN ^1H : (400 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ 12.18 (s, 1H, NH-N), 10.17 (s, 1H, NH-C), 8.31 (s, 1H, CH=N), 8.10 (d, 1H, J = 4.4 Hz, H-Tiofeno), 7.60 (d, 1H, J = 4.4 Hz, H-Tiofeno), 7.56 (d, 2H, J = 8.0 Hz, Ar-H), 7.35 (t, 2H, J = 8.0 Hz, Ar-H), 7.17 (t, 1H, Ar-H). RMN ^{13}C : (100 MHz, DMSO- d_6) 124.829; 125.665; 126.138; 128.113; 129.553; 130.297; 135.703; 138.848; 139.127; 146.391; 150.953; 176.296. IV: (ν cm $^{-1}$ KBr) 3211 e 3112 (NH); 1546 (C=N); 1500 (C=S).EM: m/z [M+H] $^{+}$ calculado para C₁₂H₁₀N₄O₂S₂: 307.02; encontrado: 307.14.

LNN-06– *N*-(4-clorofenil)-2-((5-nitro-tiofeno-2-il)metileno)-hidrazina-carbotioamida

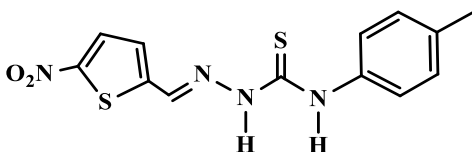
RMN ^1H : (400 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ 12.25 (s, 1H, NH-N), 10.20 (s, 1H, NH-C), 8.30 (s, 1H, CH=N), 8.11 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz, H-Tiofeno), 7.62 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz, H-Tiofeno), 7.57 (d, 2H, $J = 15.6$ Hz, Ar-H), 7.45 (d, 2H, $J = 15.6$ Hz, Ar-H). RMN ^{13}C : (100 MHz, DMSO- d_6) 28.986; 127.813; 128.012; 129.744; 130.311; 136.074; 137.852; 146.236; 151.033; 176.322. IV: (ν cm^{-1} KBr) 3255 e 32248 (NH); 1547 (C=N); 1528 (C=S). EM: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClN}_4\text{O}_2\text{S}_2$: 340.98; encontrado: 341.05.

LNN-07– 2-((5-nitro-tiofeno-2-il)metileno)-*N*-fenetil-hidrazina-carbotioamida



RMN ^1H : RMN ^1H (400 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ 11.91 (s, 1H, NH-N), 8.59 (s, 1H, NH-C), 8.20 (s, 1H, CH=N), 8.10 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz, H-Tiofeno), 7.52 (d, 1H, $J = 6.0$ Hz, H-Tiofeno), 7.35 (d, 2H, $J = 1.6$ Hz, Ar-H), 7.35 (d, 2H, $J = 1.6$ Hz, Ar-H), 7.29 (t, 1H, $J = 3.2$ Hz, Ar-H), 3.42 (t, 2H, $J = 2.6$ Hz, CH_2), 2.51 (q, 2H, $J = 2.4$ Hz, CH_2). RMN ^{13}C : (100 MHz, DMSO- d_6) 34.595; 45.248; 126.265; 128.518; 128.610; 129.223; 130.495; 135.001; 139.124; 146.772; 150.619; 176.889. IV: (ν cm^{-1} KBr) 3326 e 3149 (NH); 1552 (C=N); 1532 (C=S). EM: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2$: 335.05; encontrado: 335.14.

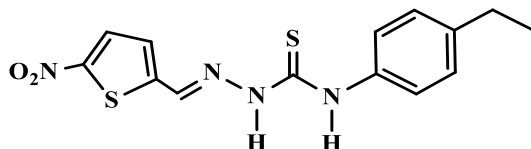
LNN-08– 2-((5-nitro-tiofeno-2-il)metileno)-*N*-(*p*-tolil)-hidrazina-carbotioamida



RMN ^1H : (400 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ 12.12 (s, 1H, NH-N), 10.09 (s, 1H, NH-C), 8.28 (s, 1H, CH=N), 8.08 (d, 1H, $J = 4.4$ Hz, H-Tiofeno), 7.59 (d, 1H, $J = 4.4$ Hz, H-Tiofeno), 7.36 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ar-H), 7.19 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ar-H), 2.31 (s, 3H, CH_3). RMN ^{13}C : (100 MHz, DMSO- d_6) 20.578; 126.022; 128.562; 129.453; 130.274;

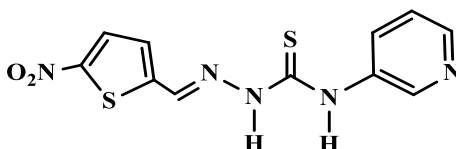
134.843; 135.525; 136.276; 146.453; 150.899; 176.303. IV: (ν cm^{-1} KBr) 3326 e 3133 (NH); 1541 (C=N); 1498 (C=S). EM: m/z $[M+H]^+$ calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2$: 321.04; encontrado: 321.14.

LNN-09– *N*-(4-etil-fenil)-2-((5-nitro-tiofeno-2-il)metileno)-hidrazina-carbotioamida

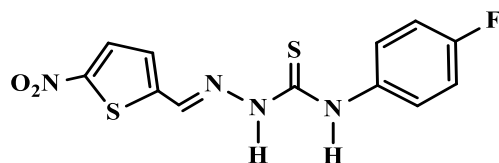


RMN ^1H : (400 MHz, ppm, $\text{DMSO}-d_6$): δ 12.13 (s, 1H, NH-N), 10.09 (s, 1H, NH-C), 8.29 (s, 1H, CH=N), 8.08 (d, 1H, $J = 4.4$ Hz, H-Tiofeno), 7.59 (d, 1H, $J = 4.0$ Hz, H-Tiofeno), 7.39 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ar-H), 7.22 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ar-H), 2.60 (q, 2H, $J = 7.2$ Hz, CH_2), 1.19 (t, 3H, $J = 7.6$ Hz, CH_3). RMN ^{13}C : (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 15.637; 27.712; 126.753; 127.369; 129.453; 130.281; 135.525; 136.462; 141.202; 146.461; 150.899; 176.257. IV: (ν cm^{-1} KBr) 3320 e 3117 (NH); 1544 (C=N); 1498 (C=S). EM: m/z $[M+H]^+$ calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2$: 335.05; encontrado: 335.14.

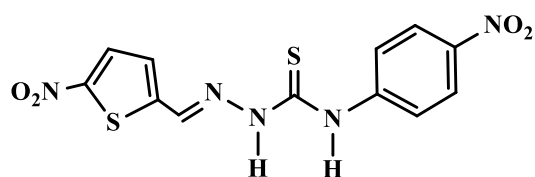
LNN-10 - 2-((5-nitro-tiofeno-2-il)metileno)-*N*-(piridin-3-il)-hidrazina-carbotioamida



RMN ^1H : (400 MHz, ppm, $\text{DMSO}-d_6$): δ 12.35 (s, 1H, NH-N), 10.28 (s, 1H, NH C), 8.64 (s, 1H, CH=N), 8.41 (d, 1H, $J = 4.4$ Hz, H-tiofeno), 8.32 (s, 1H, H-Ar), 8.10 (d, 1H, $J = 4.4$ Hz, H-tiofeno), 7.40 (t, 1H, $J = 4.0$ Hz, Ar-H), 7.61 (d, 1H, $J = 4.8$ Hz, Ar-H), 7.43 (d, 1H, $J = 4.8$ Hz, Ar-H). RMN ^{13}C : (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): 122,96 (CH Ar), 129,85 (CH Ar), 130,28 (CH Ar), 133,91 (CH Ar), 135,38 (CH Ar), 136,36 (CH Ar), 146.15 (Cq Ar), 146.43 (C=N), 147.59 (Cq Ar), 151.13 (Cq Ar), 176.95 (C=S); IV: (ν cm^{-1} KBr): 3284 (NH); 1582 (C=N); 1546 (C=S) cm^{-1} ; EM: m/z $[M+H]^+$ calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_5\text{O}_2\text{S}_2$: 307,01; encontrado: 308.14.

LNN-11 - N-(4-fluorofenil)-2-((5-nitro-tiofeno-2-il)metileno)-hidrazina carbotioamida

RMN ^1H : (400 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ 12.20 (s, 1H, NH-N), 10.17 (s, 1H, NH-C), 8.29 (s, 1H, CH=N), 7.60 (d, 1H, $J = 4.8$ Hz, H tiofeno), 7.51 (d, 1H, $J = 4.8$ Hz, H-tiofeno), 7.49 (d, 2H, $J = 5.2$ Hz, Ar-H), 7.21 (d, 2H, $J = 5.2$ Hz, Ar-H); RMN ^{13}C : (100 MHz, DMSO- d_6): 128.39 (CH Ar), 128.47 (CH Ar), 129.61 (CH Ar), 130.28 (CH Ar), 135.20 (CH Ar), 135.22 (CH Ar), 135.84 (Cq Ar), 146.35 (Cq Ar), 151.00 (C=N), 158.63 (Cq Ar), 161.05 (Cq Ar), 176.66 (C=S); IV: (ν cm^{-1} KBr): 3132 (NH); 1543 (C=N); 1529 (C=S) cm^{-1} ; EM: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{NF}_4\text{O}_2\text{S}_2$: 324.01; encontrado: 325.11.

LNN-12 - (4-nitrofenil)-2-((5-nitro-tiofeno-2-il)metileno)-hidrazina carbotioamida

RMN ^1H : (400 MHz, ppm, DMSO- d_6): δ 12.49 (s, 1H, NH-H), 8.33 (s, 1H, NH-C), 8.24, (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ar-H), 8.10 (d, 1H, $J = 4.0$ Hz, H tiofeno), 7.97 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz, Ar-H), 7.62 (d, 1H, $J = 4.0$ Hz, H tiofeno); RMN ^{13}C : (100 MHz, DMSO- d_6): 124.19 (CH Ar), 125.47 (CH Ar), 130.66 (CH Ar), 130.76 (CH Ar), 137.38 (CH Ar), 144.23 (Cq Ar), 145.58 (C=N), 146.27 (Cq Ar), 176.23 (C=S); EM: m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{N}_5\text{O}_4\text{S}_2$: 351.36; encontrado: 352.06.

4.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS**4.3.1 Teste de Sensibilidade Antifúngica**

Os resultados da sensibilidade antifúngica, teste de ergosterol e citotoxicidade dos compostos *in vitro* em células do baço do rato BALB/c estão apresentados na

Tabela 02. As concentrações fungicidas mínimas (CFM) são aquelas que são capazes de causar a morte de todas as células de leveduras comprovadas por retrocultivo.

Tabela 02. Sensibilidade Antifúngica, Teste do Ergosterol e Citotoxicidade

	Concentrações Fungicidas Mínimas – CFM e Citotoxicidade (µg/ml)								Citotoxicidade
	<i>C. parapsilosis</i>			<i>C. albicans</i>		<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	
	ATCC 22019	URM 4970	URM 7048	ATCC 14053	URM 5901	URM 6551	ATCC 6258	URM 6898	
LNN-01	-	-	-	-	-	-	-	8.0	25.0
LNN-02	-	-	16.0	-	-	-	-	8.0	12.5
LNN-03	-	-	16.0	-	-	-	-	16.0	25.0
LNN-04	-	-	-	-	-	-	-	16.0	3.13
LNN-05	-	16.0	8.0	-	-	-	-	2.0	12.5
LNN-06	-	-	16.0	-	-	-	-	8.0	12.5
LNN-07	-	-	-	-	-	-	-	16.0	25.0
LNN-08	-	16.0	8.0	-	16.0	-	16.0	2.0	50.0
LNN-09	-	8.0	4.0	8.0	8.0	-	16.0	4.0	12.5
LNN-10	8.0	4.0	2.0	4.0	8.0	-	8.0	0.06	12.5
LNN-11	-	16.0	2.0	16.0	16.0	-	8.0	0.5	12.5
LNN-12	-	16.0	16.0	1.0	16.0	-	16.0	0.125	6.25
CET	0,06	0.25	0.06	0.06	-	0.06	1.0	0.125	NT
FLC	NT	8.0	4.0	NT	-	1.0	NT	2.0	NT
ITC	NT	0.125	0.125	NT	-	8.0	NT	NT	NT
AMB	0.06	0.06	0.06	0.06	0.125	0.06	0.06	0.03	NT
AMB +ERG	0.5	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	0.5	0.25	NT

NT=Não Testado; (-) = Sem atividade; CET=Cetoconazol; FLC=Fluconazol; ITC=Intraconazol; AMB=Anfotericina B; AMB+ERG=Anfotericina B + Ergosterol Exógeno. Os valores das CFMs do teste do ergosterol foram iguais as CFMs da sensibilidade padrão.

As cepas de *Candida* testadas apresentaram alta sensibilidade às mudanças estruturais na substituição N^4 das tiossemicarbazonas testadas neste trabalho. Os compostos **LNN-09** e **LNN-08** possuindo porções *p*-etil-fenil e *p*-metil-fenil como substituintes, respectivamente, apresentaram excelentes atividades antifúngicas indicadas por valores de CFM de 4,0 µg/mL para **LNN-09** e 8,0 µg/mL para **LNN-08** contra a *Candida parapsilosis* URM 7048. Foi verificado que com o aumento do número de carbonos da cadeia linear presente no grupamento fenil há uma melhora da resposta antifúngica. Isso também foi verificado no isolado *Candida albicans* URM 5901 com valores de CFM de 8,0 µg/mL e 16,0 µg/mL para **LNN-09** e **LNN-08**, respectivamente. A importância do grupo alquil está relacionada ao aumento da lipofilicidade do composto, o que facilitaria o seu transporte através de membranas biológicas, aumentando assim o fornecimento do composto ao seu alvo biológico (Congiu e Onnis, 2013)

A presença de um forte doador de elétrons na cadeia linear como observado em **LNN-01** (*p*-metoxi-fenil) não contribui para o aumento da atividade fungicida contra isolados de *Candida* sp. nas concentrações testadas. Em contrapartida, a presença de um grupo elétron-retirador na molécula **LNN-12** (*p*-nitro-fenil) diminui a reatividade do anel aromático que pode ser observado por valores de CMF de 16,0 µg/mL para os isolados de *C. parapsilosis* URM 4970 e URM 7048, *C. krusei* ATCC 6258, *C. albicans* URM 5901 e de 1,0 µg/mL para *C. albicans* ATCC 14053. Os derivados **LNN-02**, **LNN-06** e **LNN-11** que apresentam os átomos eletronegativos bromo, cloro e flúor respectivamente na posição *p*-fenil, não exibiram atividade fungicida para todas as cepas, exceto para *Candida parapsilosis* URM 7048. Os resultados sugerem que o tamanho maior desses átomos ($F < Cl < Br$) influencia negativamente a atividade observada já que os valores de CFM para estes foram 16,0 µg/mL para Br e Cl e 2,0 µg/mL para flúor que possui o menor volume. Além disso, pode-se observar atividade fungicida de 16,0 µg/mL dos isolados de *Candida albicans* ATCC 14053 e URM 5901 e de 8,0 µg/mL para *Candida krusei* URM 6258 frente ao derivado **LNN-11**. É possível notar uma correlação entre a atividade antifúngica com grupos de retirada de elétrons, como flúor e nitro. A introdução destes grupos em moléculas de fármaco protótipo foi correlacionada com o aumento da potência e a seletividade farmacológica porque afeta pK_a , interações hidrofóbicas e também lipofilicidade (Gillis *et al.*, 2015; Olender *et al.*, 2009).

O composto **LNN-05** com anel aromático (fenil) como substituinte apresentou atividade somente contra as cepas de *Candida parapsilosis* URM 4970 (16,0 µg/mL) e URM 7048 (8,0 µg/mL). Por outro lado, o composto **LNN-04** (alil-substituído) não teve atividade nas concentrações testadas, sugerindo a importância do anel aromático ligado ao NH para atividade anti-*Candida*. A presença de dois anéis aromáticos fundidos na molécula **LNN-03** (naftil) reduziu a atividade fungicida contra *Candida parapsilosis* URM 7048 (16,0 µg/mL) em comparação com **LNN-05**. Além disso, o composto **LNN-03** não foi ativo contra nenhuma das outras espécies de *Candida* nas concentrações testadas. No entanto, a molécula **LNN-10** (3-piridil) foi a mais eficaz na atividade fungicida contra todos os isolados testados com valores de CFM variando de 2,0 µg/mL a 8,0 µg/mL, com exceção para *Candida tropicalis* URM 6551 que não foi observada nenhuma atividade fungicida para os compostos da série. O anel piridina foi usado como base para várias moléculas com atividade antifúngica (Chhillar *et al.*, 2006; Bha *et al.*, 2014). O nitrogênio da piridina melhora a interação entre o composto e seu alvo biológico (Vollhardt e Schore, 2013). O composto **LNN-10** é um excelente candidato para um composto protótipo, uma vez que os resultados antifúngicos foram melhores do que os observados para o fluconazol: 4,0 µg/mL vs 8,0 µg/mL frente a *C. parapsilosis* URM 4970; 2,0 µg/mL vs 4,0 µg/mL contra *C. parapsilosis* URM 7048 respectivamente.

O grupo espaçador (-CH₂CH₂-) apresentado pelo derivado **LNN-07** (2-fenil-etil) não conferiu resposta biológica a nenhuma estirpe de *Candidas* sp. nas concentrações testadas. Em contraste, o seu isômero **LNN-09** mostrou excelentes resultados, sugerindo a importância da ligação direta entre o anel aromático e a fração da tiossemicarbazona (Guo *et al.*, 2015).

Para uma melhor avaliação do poder antifúngico dos compostos da série de 5-nitrotiofeno-tiossemicarbazona, determinou-se a Concentração Inibidora Mínima 50% (MIC₅₀) por leitor de ELISA uQuant a uma absorbância de 592 nm. O MIC₅₀ é definido como a concentração que inibe 50% de crescimento fúngico quando comparado ao controle positivo. Os resultados são apresentados na tabela 03.

Tabela 03. Sensibilidade antifúngica (MIC₅₀) contra espécies de *Candida*. Os valores estão apresentados em µg/mL.

	<i>Candida parapsilosis</i>			<i>C. albicans</i>		<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>
	ATCC 22019	URM 4970	URM 7048	ATCC 14053	URM 5901	URM 6551	ATCC 6258
LNN-01	8.0	8.0	8.0	4.0	-	-	8.0
LNN-02	16.0	8.0	*	4.0	-	-	16.0
LNN-03	8.0	8.0	*	4.0	-	-	0.25
L NN-04	16.0	16.0	-	2.0	-	-	-
L NN-05	16.0	*	*	1.0	-	-	16.0
L NN-06	8.0	16.0	*	8.0	-	16.0	16.0
L NN-07	16.0	16.0	8.0	4.0	-	-	-
L NN-08	8.0	*	*	4.0	*	16.0	*
L NN-09	8.0	*	*	*	*	16.0	*
L NN-10	0.06	0.06	0.06	0.06	0.125	0.03	0.125
L NN-11	8.0	0.125	0.25	0.125	0.25	-	0.125
L NN-12	0.25	*	0.25	0.06	0.125	-	0.25
CET	0.06	0.25	0.06	0.06	-	0.06	1.0
FLC	NT	8.0	4.0	NT	-	1.0	NT
ITC	NT	0.125	0.125	NT	-	8.0	NT
AMB	0.06	0.06	0.06	0.06	0.125	0.06	0.06

*=sem MIC₅₀; NT=Não Testado; CET=Cetoconazol; FLC=Fluconazol; ITC=Itraconazol; AMB=Amfotericina B.

O composto **LNN-10** exibiu os melhores valores de MIC₅₀ contra todos os isolados de *Candida* sp. exceto *Cryptococcus neoformans* URM 6898 que não foi possível determinar o MIC₅₀ de toda a série de estudo. A resposta biológica de **LNN-10** contra todas as cepas de *Candida parapsilosis* e *Candida albicans* ATCC 14053 foi de 0,06 µg/mL, o que era equivalente aos valores de anfotericina B e superiores aos obtidos para itraconazol. Em comparação com o cetoconazol, os resultados foram semelhantes, diferindo apenas para *Candida parapsilosis* URM 4970, que foi quatro vezes mais eficaz do que o antifúngico.

Os dados comparativos entre o composto **LNN-10** e o fluconazol, que tem uma atividade fungistática, são ainda mais atrativos, uma vez que os resultados mostraram 8,0 µg/mL, 4,0 µg/mL e 1,0 µg/mL contra *C. parapsilosis* URM 4970 e URM 7048 e *Candida tropicalis* URM 6551, respectivamente. Esta última cepa é resistente ao itraconazol, pois extrapolou os ‘breakpoints’ estabelecidos pela CLSI/M27-A2 ao fármaco padrão. No entanto, era sensível ao composto **LNN-10** a uma concentração de 0,03 µg/mL. Este achado deve ser destacado, pois esta concentração foi melhor que todos os antifúngicos testados como controles positivos.

Em relação à atividade anti-criptocócica, o **LNN-10** foi mais eficiente com o valor CFM de 0,06 µg/mL, em comparação com todas as outras moléculas testadas que

também tiveram excelentes atividades biológicas. No entanto, a potência da atividade parece estar relacionada à presença de um anel aromático diretamente ligado à porção da tiossemicarbazona. Os resultados apresentados pelos derivados **LNN-04** e **LNN-07** (ausência de um anel aromático diretamente ligado a N^4) foram menores (16,0 µg/mL, para ambos) do que aqueles para **LNN-05** (2,0 µg/mL) com um anel aromático (fenil) como substituinte. O composto **LNN-08** que apresenta uma substituição *p*-metil-fenil exibiu o mesmo valor de CFM mostrado pelo composto **LNN-05**. Por outro lado, observou-se um valor de CFM de 4,0 µg/mL para **LNN-09** (*p*-etil-fenil). Em outras palavras, foi verificado um decaimento da potência da atividade antifúngica devido ao aumento da cadeia. Com exceção do composto **LNN-11** (CFM 0,5 µg/mL), o grupo alcoxi-metil e os halogêneos Br, Cl e F ligados ao anel como ocorre em **LNN-01**, **LNN-02**, **LNN-06** e **LNN-11**, respectivamente, não favorecem a atividade antifúngica (8,0 µg/mL). Adicionalmente, o composto **LNN-12** apresentou uma resposta de 0,125 µg/mL.

Nossos resultados mostram que a presença do 5-nitrotiofeno é extremamente importante para a obtenção de baixos valores de CIM (Morley *et al.*, 2006), uma vez que os resultados apresentados por Souza *et al.* (2012) e Scotti *et al.* (2012) também apresentaram valores baixos contra estirpes de *Cryptococcus neoformans* e *Candida krusei* após tratamento com derivados de cicloalquil-tiofenos substituídos com 4-F-Ph, 4-Cl-Ph, 4-Br-Ph, 4-OMe-Ph (Souza *et al.*, 2012; Scotti *et al.*, 2012).

A análise de dados mostra que os derivados **LNN-05** e **LNN-08** são extremamente eficazes contra estirpes de *Cryptococcus neoformans* URM 6898 com resultados semelhantes ao fluconazol (2,0 µg/mL), mas com efeito fungicida, que é de extrema importância para o tratamento da criptococose. Além disso, os resultados das moléculas **LNN-10** e **LNN-12** foram maiores do que fluconazol e cetoconazol (0,125 µg/mL) e **LNN-10** mostrou ser 2 vezes mais potente. A atividade antifúngica de **LNN-12** foi equivalente ao cetoconazol e pode servir no futuro como uma alternativa à resistência aos compostos de azólicos.

Por outro lado, os ensaios de citotoxicidade por incorporação de timidina tritiada (Tabela 2) mostraram uma citotoxicidade moderada de 50 µg/mL para **LNN-08** e 25 µg/mL para **LNN-01**, **LNN-03** e **LNN-07**. No entanto, o melhor composto com relação CIM/Citotoxicidade foi o **LNN-08** com a maior concentração não tóxica de 50 µg/mL. Este derivado pode ser considerado promissor porque estes dados se revelam mais

significativos quando relacionados com a citotoxicidade da anfotericina B utilizando o mesmo método relatado (Sokolsky-Papkov *et al.*, 2006).

Para realizar a análise ultraestrutural, a microscopia eletrônica de varredura foi realizada utilizando a cepa *Candida albicans* ATCC 14053 e **LNN-10** (que apresentou melhor perfil contra espécies de *Candida*). A escolha da MEV visou identificar quais modificações ultraestruturais ocorreram na superfície celular durante o tratamento com o composto **LNN-10**.

O tratamento de *Candida albicans* ATCC 14053 com molécula **LNN-10** mostrou alterações morfológicas significativas na forma, tamanho, biomassa e hifas quando comparadas com o controle não tratado. A figura 29 mostra que *C. albicans* sem tratamento (**a-e**) demonstrando uma grande predominância do estágio hifal (**a**). Além disso, observou-se a presença de tubos germinativos e septos (**b**), bem como formas esféricas e ovais com parede celular de superfície lisa, blastoconídio (**c-d**) e cicatrizes reprodutivas em regiões polares (**e**). Esses dados são consistentes com os dados dos estudos realizados por Nollie e Borgers com células de *C. albicans* tratadas com miconazol (Borges; Van De Vem, 1987; Nollin; Borgers, 1975).

Figura 29 – Microscopia Eletrônica de Varredura de *Candida albicans* ATCC 14053.

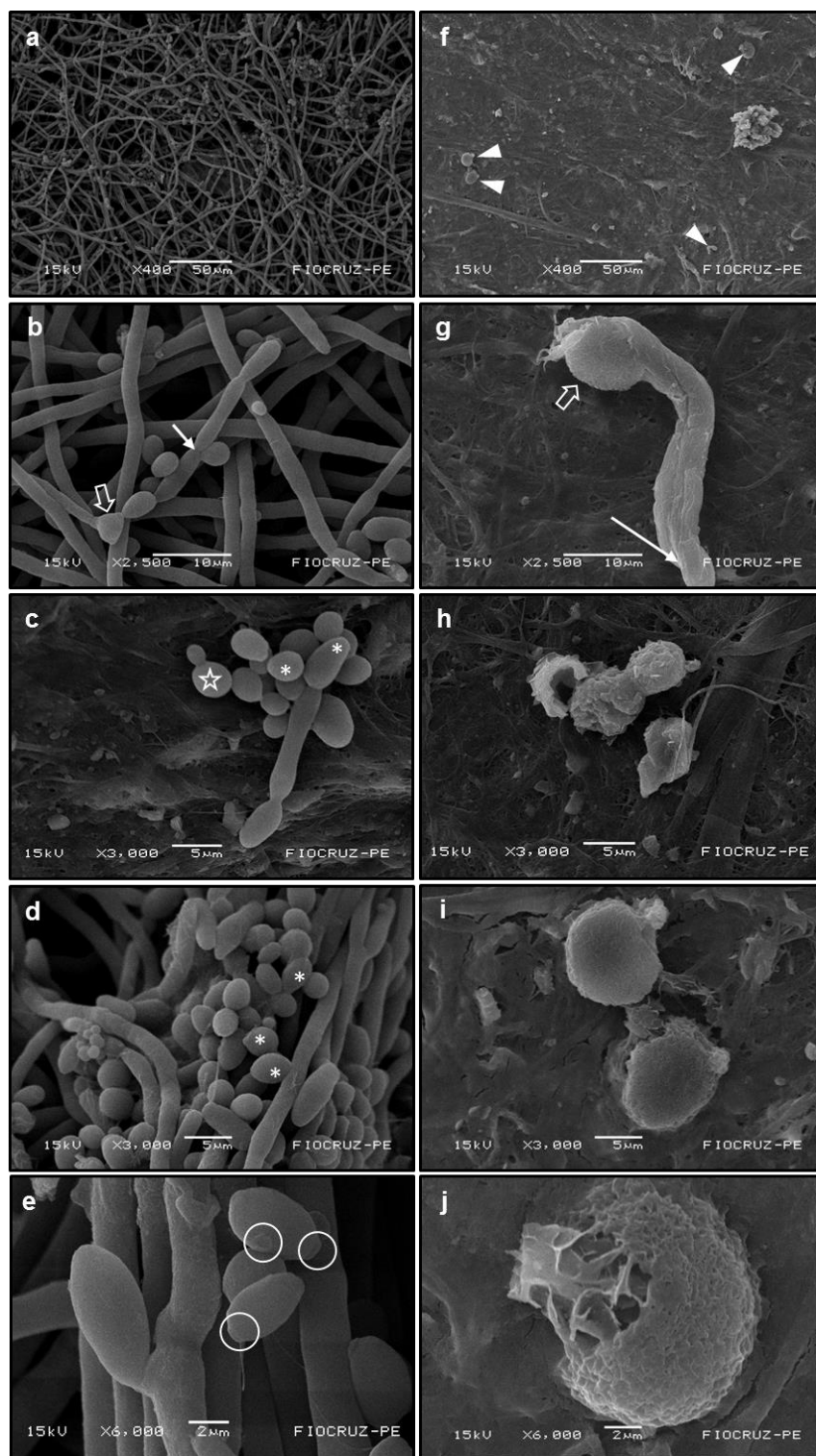


Figura. 29. Microscopia Eletrônica de Varredura de *Candida albicans* ATCC 14053, sem (a-e) e com tratamento (f-j). Grande número de células e hifas (a); tubo germinativo (seta aberta) e septa (seta curta) (b); blastoconidia (estrela) e células esféricas e lisas (asteriscos) (c-d); cicatrizes polares (círculos) (e); redução de biomassa (cabeças de seta) (f); bloqueio da filamentação (flecha longa) e do tubo germinativo (seta aberta) (g); perda de integridade da parede celular (h); parede celular áspera (i); vazamento de material citoplasmático (j).

As alterações observadas na superfície de *C. albicans* após o tratamento com **LNN-10** como redução da biomassa fúngica (**f**), bloqueio da filamentação (**g**), irregularidades e perda de integridade da parede celular (**h-i**) e extravasamento do material celular (**j**) corroboram com as mudanças observadas no trabalho de Ishida e colaboradores (2009), no qual usaram inibidores das enzimas: Δ^{24-25} esterol-metiltransferase e da Escaleno Sintase obtendo o mesmo padrão de modificações ultraestruturais do nosso estudo.

O trabalho citado demonstrou outras modificações a cerca do acúmulo de lipídeos, mas sem a complexação ao ergosterol como ocorre com a anfotericina B além de uma possível atividade na parede celular. Isso sugere que a atividade das tiossemicarbazonas sintetizadas pelo nosso grupo pode não estar envolvida diretamente a molécula do ergosterol, como foi comprovada pelo teste do ergosterol, como também não está envolvida no ataque a parede celular (ensaio do sorbitol), mas os dados são consistentes com estudos prévios após tratamento com diversos azóis (Kathiravan, *et al.*, 2012; Veen; Lang, 2005; Hazen *et al.*, 2000; Bellanger *et al.*, 1997; Koul *et al.*, 1999).

4.3.2 Teste de Sensibilidade Antibacteriana

Os resultados da sensibilidade antibacteriana estão apresentados na tabela 04. As concentrações bactericidas mínimas (CBM) são aquelas que são capazes de causar a morte de todas as células de leveduras comprovadas por retrocultivo.

Foram considerados os resultados das CIM abaixo de 250,0 µg/mL e por isso só foram observadas atividades bactericidas frente às cepas gram-positivas *Bacillus cereus* UFPEDA 213 e *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02. Os compostos **LNN-01**, **LNN-03**, **LNN-04**, **LNN-07** e **LNN-08** não foram efetivos contra as cepas testadas. As moléculas contendo átomos e grupos eletronegativos se mostraram mais eficientes quanto à atividade bactericida frente à *Bacillus cereus* UFPEDA 213 no qual **LNN-06** foi mais ativo com valor de CIM menor que as concentrações testadas (< 3,9 µg/mL). Esses resultados estão de acordo com os trabalhos de Khan e Asiri (2017) no qual destacaram a importância do átomo de cloro na estrutura de tiossemicarbazonas para valores baixos de CIM, no entanto a porção esteroidal da macromolécula do estudo pode ter contribuído para uma CIM inferior da qual foi observada em nosso estudo que foi < 3,9 µg/mL para 64 µg/mL.

Tabela 04. Sensibilidade Antibacteriana

	Concentrações Bactericidas Mínimas – CBM (µg/ml)						
	BC	SA	EF	KP	EC	PA	PM
LNN-01	-	-	-	-	-	-	-
LNN-02	15.6	250.0	-	-	-	-	-
LNN-03	1000.0	1000.0	-	-	-	-	-
LNN-04	1000.0	-	-	-	-	-	-
LNN-05	250.0	-	-	-	-	-	-
LNN-06	< 3.9	-	-	-	-	-	-
LNN-07	1000.0	-	-	-	-	-	-
LNN-08	500.0	1000.0	-	-	-	-	-
LNN-09	< 3.9	62.5	-	-	-	-	-
LNN-10	31.25	250.0	-	1000.0	500.0	-	-
LNN-11	31.25	15.6	500.0	-	-	-	-
LNN-12	62.5	-	-	-	-	-	-
Gentamicina		3.91	125.0				

BC=*Bacillus cereus* UFPEDA 213; AS=*Staphylococcus aureus* UFPEDA 02; EF=*Enterococcus faecalis* UFPEDA 69; KP=*Klebsiella pneumoniae* UFPEDA 396; EC=*Escherichia coli* UFPEDA 224; PA=*Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416; PM=*Proteus mirabilis* UFPEDA 767.

Alem disso, Zhang e colaboradores (2015) também destacaram a importância de halogênios e grupos eletrôn-retiradores para a atividade bactericida de tiossemicarbazonas contendo flúor, bromo, cloro e nitro. De fato, nossos dados mostram uma maior atividade dos compostos contendo tais átomos como ocorre em **LNN-02** e **LNN-11** frente à *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* e em **LNN-06** e **LNN-12** apenas em *Bacillus cereus*.

A presença de uma cadeia lateral carbônica como ocorre em **LNN-09** também contribuiu para a atividade bactericida contra *Bacillus cereus* UFPEDA 213 e *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02 com CIM de < 3,9 e 62,5 µg/mL respectivamente. Os dados para *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02 mostram que apenas os compostos **LNN-09** e **LNN-11** tiveram CIM significativas com valores de 62,5 e 15,6 µg/mL respectivamente. As moléculas **LNN-02** e **LNN-10** exibiram CIM de 250,0 µg/mL contra *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02.

Embora a literatura aponte para grupos eletrôn-retiradores para uma melhor atividade biológica frente a bactérias, estudos com modificações no núcleo tiofeno vem exibindo um perfil mais promissor quando comparado às modificações realizadas no nosso estudo na porção N^4 de tiossemicarbazonas (Mabkhot *et al.*, 2017; Abdel-Rahman *et al.*, 2017). Por isso, a ação dessas moléculas contra bactérias pode ser atribuída à porção 5-nitrotiofeno das tiossemicarbazonas sintetizadas e que tal ação foi modulada pelas substituições da serie estudada. Esses dados corroboram com achados de Rizk e

colaboradores (2017) onde obteve CIM variando de 25-50 µg/mL utilizando uma série de moléculas tendo como estrutura básica 3-metiltiofeno-2-carboxamida.

4.3.3 Estudo do Mecanismo de Ação

O estudo do mecanismo foi avaliado para cepas fúngicas já que estas apresentaram os melhores resultados nos testes de sensibilidade. A levedura escolhida para os testes posteriores foi *Candida albicans* ATCC 14053.

5.3.3.1 Teste do Ergosterol Exógeno

Para determinar se os compostos se ligam a esteróis da membrana fúngica, as CIM foram determinadas com e sem a adição do ergosterol de acordo com a metodologia utilizada para os testes de sensibilidade antifúngica. Se a atividade dos compostos foi provocada pela ligação ao ergosterol, o ergosterol exógeno deveria impedir a ligação ao ergosterol da membrana fúngica. Como consequência, o aumento nos valores das CIM na presença do ergosterol exógeno em relação ao ensaio controle deve ser observado (Lunde; Kubo, 2000).

Os resultados mostraram que as CIM dos compostos para todos os isolados testados no teste de sensibilidade antifúngica permaneceram inalterados na presença de uma alta concentração de ergosterol exógeno, sugerindo que estes compostos não agem ligando-se ao ergosterol da membrana. Em contraste, foi observado um aumento de 3 vezes nos valores das CIM para o controle positivo contendo anfotericina B, cuja interação com o ergosterol tem sido repetidamente demonstrado (Matsumori *et al.*, 2005).

4.3.3.1 Ensaio do Sorbitol

A parede celular fúngica serve como uma barreira protetora que evita a ruptura osmótica exercida pela pressão do turgor nos protoplastos. Além de conferir sua forma é essencial para o crescimento e a viabilidade dos fungos em um ambiente hipotônico. As enzimas associadas à parede celular realizam reticulação, ramificação e outras funções que permitem que a interação das macromoléculas possa servir como alvos importantes da ação da droga. A estabilidade osmótica tem sido utilizada em modelos como *C.*

albicans e outros fungos para estudar o modo de ação de vários antibióticos. O sorbitol é um escudo osmótico usado para estabilizar protoplastos fúngicos e permite o crescimento desses microrganismos mesmo na presença de inibidores específicos da parede celular (Frost *et al.*, 1995). Nossos resultados mostraram valores idênticos nos experimentos contendo ou não sorbitol. Isso sugere que as moléculas também não agem inibindo a síntese da parede celular dos fungos, mas provavelmente afetando outro alvo.

4.3.3.3 Avaliação da Atividade Antioxidante por DPPH

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método do DPPH no qual os compostos foram comparados com o controle positivo, o ácido ascórbico. Os resultados mostram uma fraca atividade antioxidante, uma vez que o controle positivo obteve um EC_{50} de 26,22 $\mu\text{g/ml}$ comparado aos compostos da série estudada. A tabela 05 apresenta os valores de EC_{50} de todos os compostos em comparação ao controle positivo. Estudos mostram que complexos de tiossemicarbazonas com metais (Al-Amiery *et al.*, 2012) possuem um potencial antioxidante quando comprado ao ácido ascórbico. No entanto, tiossemicarbazonas ligadas ao anel tiofeno não foi observado atividade significativa.

Tabela 05. Avaliação da Atividade Antioxidante das Tiossemicarbazonas

Atividade Antioxidante EC_{50} em $\mu\text{g/mL}$	
Compostos	EC_{50}
LNN-01	75,41
LNN-02	91,94
LNN-03	72,82
LNN-04	ND
LNN-05	193,80
LNN-06	70,21
LNN-07	*
LNN-08	293,70
LNN-09	*
LNN-10	229,10
LNN-11	ND
LNN-12	190,50
AA	26,22

Tabela 05. ND = Não Determinado; * = Sem atividade; AA = Ácido Ascórbico.

4.3.3.4 Teste da Glutathione e Avaliação da Proteção Antioxidante com Ácido Ascórbico (aa)

Para se determinar o mecanismo de ação antifúngico, varias cepas de *Candida albicans* foram utilizadas e tratadas com o composto **LNN-10**. A tabela 06 apresenta os resultados da sensibilidade dos isolados de *Candida* sp bem como os testes da glutathione e de proteção antioxidante utilizando ácido ascórbico. O tratamento com **LNN-10** de isolados de *Candida* om meio RPMI suplementado com ácido ascórbico (vitamina C) mostrou variações nos valores de CIM de 16,0 a 128,0 µg/mL caracterizando uma proteção antioxidante efetiva da vitamina C. Esses resultados indicam que o composto **LNN-10** pode ter seu mecanismo de ação na indução de estresse oxidativo.

A relação entre glutathione reduzida/oxidada (GSH/GSSG) tem sido usada como um marcador para a caracterização do estresse oxidativo, devido às suas altas concentrações e papéis diretos como antioxidantes e protetores celulares (García-Tojal *et al.*, 2018). A glutathione desempenha um papel central na manutenção da homeostase redox na levedura. Diminuições significativas nos níveis de GSH podem levar à desregulação da homeostase redox e, por sua vez, aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (Thangamani, *et al.*, 2017). Por isso, após os resultados dos testes de proteção com ácido ascórbico, investigamos a interação da glutathione reduzida (GSH) com a molécula teste. O resultado esperado eram maiores variações nos valores da CIM em relação ao teste de sensibilidade anti-*Candida*. De fato, os valores observados foram de até 64 vezes a concentração da CIM para o isolado de *C. albicans* URM 5974. Tais concentrações variaram de 64-2 vezes os valores da CIM do teste se sensibilidade. Esta ultima, mostrou-se menos eficaz quanto à proteção antioxidante frente a *C. albicans* URM 5900.

Tabela 06. Sensibilidade anti-*Candida*, Teste da Glutathione e Proteção antioxidante com ácido ascórbico. Valores apresentados em µg/mL.

	<i>Candida albicans</i>								
	ATCC 14053	URM 5900	URM 5597	URM 5974	URM 5901	URM 90028	URM 4387	URM 4990	URM 4127
LNN-10	4.0	128.0	16.0	2.0	8.0	64.0	4.0	8.0	4.0
CET	1.0	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0	1.0
AMB	0.06	0.125	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.125	0.06
L10+aa	64.0	128.0	32.0	32.0	64.0	128.0	64.0	128.0	16.0
L10+GSH	128.0	256.0	128.0	128.0	128.0	128.0	32.0	64.0	64.0

CET=Cetoconazol; AMB=Anfotericina B; aa=ácido ascórbico; GSH=Glutathione reduzida

Com base no resultado acima, pode-se inferir que a suplementação de GSH reverte o efeito inibitório na levedura causado por **LNN-10**, já que possui interação com a glutathiona exógena antes de causar estresse oxidativo e consequentemente formação de ROS.

5 CONCLUSÕES

A síntese da série 2-(5-nitro-tiofeno)-tiossemicarbazonas (**LNN-01-12**) ocorreu de maneira satisfatória, permitindo a obtenção dos produtos desejados em bons rendimentos, em alto grau de pureza e em apenas duas etapas reacionais.

As tiossemicarbazonas sintetizadas mostraram uma atividade antifúngica promissora, especialmente **LNN-10**, com resultados para a complexação ao ergosterol e o ensaio do sorbitol negativos, o que induz a uma possibilidade de mecanismos diferentes daqueles descritos para as classes dos polienos e equinocandinas. No entanto, o teste voltado para a avaliação de indução de estresse oxidativo (Teste de Proteção com Ácido Ascórbico) foi positivo e o de interação com a glutathione reduzida (GSH) também indicando um mecanismo de ação voltado a produção de espécies reativas de oxigênio pelo bloqueio de GSH. Além disso, os testes de avaliação da atividade antibacteriana se mostraram promissores contra cepas as gram-positivas para o composto **LNN-09**.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Rahman, S. M.; El-Gohary, N. S.; El-Bendary, E. R.; El-Ashry, S. M.; Shaaban, M. I. Synthesis, antimicrobial, antiquorum-sensing, antitumor and cytotoxic activities of new series of cyclopenta(hepta)[b]thiophene and fused cyclohepta[b]thiophene analogs. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2017, 140: 200-211.
- Achkar, J. M.; Fries, B. C. Candida infections of the genitourinary tract. *Clinical Microbiology Reviews*. 2010, 23: 253–273.
- Agarwal, R. K.; Singh, L.; Sharma, D. K. Synthesis, spectral, and biological properties of copper (II) complexes of thiosemicarbazones of Schiff bases derived from 4-aminoantipyrine and aromatic aldehydes. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 2006, 2006: 01-10.
- Al-Amiery, A. A.; Kadhum, A. A. H.; Mohamad, A. B. Antifungal and antioxidant activities of pyrrolidone thiosemicarbazone complexes. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 2012, (2012): 795812.
- Almeida, S. M.; Lafayette, E. A.; Silva, L. P.; Amorim, C. A.; Oliveira, T. B.; Ruiz, A. L.; Carvalho, J. E.; Moura, R. O.; Beltrão, E. I.; Lima, M. C.; Júnior, L. B. Synthesis, DNA Binding, and Antiproliferative Activity of Novel Acridine-Thiosemicarbazone Derivatives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015, 6: 13023-13042.
- Almshawit, H.; Macreadie, I.; Almshawit, H. Fungicidal effect of thymoquinone involves generation of oxidative stress in *Candida glabrata*. *Microbiol. Res*. 2017, 195: 81-88.
- Altıntop, M. D.; Atlı, Ö.; Ilgın, S.; Demirel, R.; Özdemir, A.; Kaplancıklı, Z. A. Synthesis and biological evaluation of new naphthalene substituted thiosemicarbazone derivatives as potent antifungal and anticancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, 108: 406-414.
- Asadipour, A.; Edraki, N.; Nakhjiri, M.; Yahya-Meymandi, A.; Alipour, E.; Saniee, P.; Foroumadi, A. Anti-*Helicobacter pylori* activity and Structure-Activity Relationship study of 2-Alkylthio-5-(nitroaryl)-1, 3, 4-thiadiazole Derivatives. *Iranian journal of pharmaceutical research*. 2013, 3: 281-287.
- Ashton, W. T.; Cantone, C. L.; Chang, L. L.; Hutchins, S. M.; Strelitz, R. A.; MacCoss, M.; Chang, R. C. L.; Lotti, V. J.; Faust, K. A. Nonpeptide angiotensin II antagonists derived from 4H-1, 2, 4-triazoles and 3H-imidazo [1, 2-b][1, 2, 4] triazoles. *Journal of medicinal chemistry*. 1993, 5: 591-609.
- Attia, S.; Kolesar, J.; Mahoney, M. R.; Pitot, H. C.; Laheru, D.; Heun, J.; Holen, K. D. A phase 2 consortium (P2C) trial of 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP) for advanced adenocarcinoma of the pancreas. *Investigational new drugs*. 2008, 4: 369-379.

- Barcia-Macay, M.; Seral, C.; Mingeot-Leclercq, M.; Tulkens, P. M.; Bambeke, F. V. Pharmacodynamic Evaluation of the Intracellular Activities of Antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a Model of THP-1 Macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, 50: 3, 841-851.
- Bellanger, P.; Nast, C. C.; Fratti, R.; Sanati, H.; Ghaoum, M. Voriconazole (UK-109,496) inhibits the growth and alters the morphology of fluconazole-susceptible and -resistant *Candida* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1997, 41: 1840-1842.
- Beraldo, H. Semicarbazonas e tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. *Química Nova*, 2004, 3: 461-471.
- Bharti, N.; Husain, K.; Garza, M. G.; Cruz-Vega, D. E.; Castro-Garza, J.; Mata-Cardenas, B. D.; Naqvi, F.; Azam, A. Synthesis and in vitro antiprotozoal activity of 5-nitrothiophene-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters.* 2002, 23: 3475-3478.
- Bharti, S. K.; Nath, G.; Tilak, R.; Singh, S. K. Synthesis, anti-bacterial and anti-fungal activities of some novel Schiff bases containing 2,4-disubstituted thiazole ring. *European Journal of Medicinal Chemistry.* 2010, 45: 651-660.
- Bhat, M. A.; Khan, A. A.; Khan, S.; Al-Omar, M. A.; Parvez, M. K.; Al-Dosari, M. S.; Al-Dhfyhan, A. Synthesis and anti-Candidal activity of N-(4-aryl/cyclohexyl)-2-(pyridine-4-yl carbonyl) hydrazinecarbothioamide. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2014, 24(5): 1299-1302.
- Bhat, M. A.; Malika, R. A.; Prakasha, P.; Loneb, A. M. Preparation and evaluation of antibacterial potential of *Pithecellobium dulce* root extract against Gram positive and Gram negative bacteria. *Microbial Pathogenesis.* 2018.
- Bittencourt, V. C.; Almeida, V. Y.; Back, D. F.; Gervini, V. C.; Oliveira, A. B. Crystal structure of (Z)-2-(5-fluoro-2-oxoindolin-3-ylidene) hydrazinecarbothioamide. *Acta Crystallographica Section E: Crystallographic Communications.* 2015, 6: 383-384.
- Blois, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 1958, 181: 1199-1200.
- Borges, M.; Van De Ven, M. A. Degenerative changes after itraconazole treatment. *Reviews of Infectious Diseases.* 1987, 9: 33-42.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, 6a ed. Ministério da Saúde: Brasília, 2005: 320 p.
- Britta, E. A.; Scariot, D. B.; Falzirolli, H.; Ueda-Nakamura, T.; Silva, C. C.; Filho, B. P.; Borsali, R.; Nakamura, C. V. Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S-limonene. *BMC Microbiology*, 2014, 14: 236-248.

Cardona, A. F.; Wilson, S. E. Skin and soft-tissue infections: a critical review and the role of telavancin in their treatment. *Clin Infect Dis*. 2015, 61: 2, 69-78.

Capetola, R. J.; Shriver, D. A.; Rosenthale, M. E. Suprofen, a new peripheral analgesic. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1980, 1: 16-23.

Casadevall, A.; Perfect, J. R. *Cryptococcus neoformans*. ASM press: Washington, DC, 1998: 596.

Caston-Osorio, J. J.; Rivero, A.; Torre-Cisneros, J. Epidemiology of invasive fungal infection, *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2008, 32: 103–109.

Chang, Y. C.; Bien, C. M.; Lee, H.; Espenshade, P.J.; Kwon-Chung, K. J. Sre1p, a regulator of oxygen sensing and sterol homeostasis, is required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology*. 2007, 64: 614–629.

Chhillar, A. K.; Arya, P.; Mukherjee, C.; Kumar, P.; Yadav, Y.; Sharma, A. K.; Yadav, V.; Gupta, J.; Dabur, R.; Jha, H. N.; Watterson, A. C. Microwave-assisted synthesis of antimicrobial dihydropyridines and tetrahydropyrimidin-2-ones: novel compounds against aspergillosis. *Bioorg. Med. Chem*. 2006, 14(4): 973-981.

Chun, C. D.; Liu, O. W.; Madhani, H. D. A link between virulence and homeostatic responses to hypoxia during infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathogens*. 2007, 3: 225-238.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—tenth edition*. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: CLSI; 2015.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement M100-S26*. Wayne, PA: CLSI; 2016.

Clinical and Laboratory Standards Institute, *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*, CLSI Document M27-A2, CLSI, Philadelphia, Pa, USA, 2nd edition, 2002.

Cole, G. T.; Halawa, A. A.; Anaisse, E. J. The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside. *Clinical Infectious Diseases*. 1996, 2: 73-88.

Congiu, C.; Onnis, V. Synthesis and biological evaluation of novel acylhydrazone derivatives as potential antitumor agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2013, 21: 6592–6599.

Coronado-Castellote, L.; Jimenez-Soriano, Y. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*. 2013, 5: 279–286.

Cunningham, D. Mature results from three large controlled studies with raltitrexed ('Tomudex'). *British journal of cancer*. 1998, 2: 15-21.

Dignani, M. C.; Solomkin, J. S.; Anaissie, E. *Candida*. In *Medical Mycology*; Anaissie, E.; McGinnis, M. R.; Pfaller, M. A., Eds, 1^a ed, Churchill Livingstone, Filadélfia, 2003, pp 195-239.

Dionisi, H. M.; Lozada, M.; Oliveira, N. L. Bioprospection of marine microorganisms: biotechnological applications and methods. *Revista Argentina de Microbiología*. 2012, 44: 49-60.

Domagk, G.; Behnisch, R.; Mietzsch, F.; Schmidt, H. S. Über eine neue, gegen Tuberkelbazillen in vitro wirksame Verbindungsklasse. *Naturwissenschaften*. 1946, 10: 315-315.

Eggimann, P.; Garbino, J.; Pittet, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *The Lancet Infectious Diseases*. 2003, 3: 685–702.

El-Sharief, M. A. M. S.; Abbas, S. Y.; El-Bayouki, K. A. M.; El-Gammal, E. W. Synthesis of thiosemicarbazones derived from N-(4-hippuric acid)thiosemicarbazide and different carbonyl compounds as antimicrobial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013, 67: 263-268.

Escalante, A.; Gattuso, M.; Pérez, P.; Zacchino, S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolaccatetramera Hauman*. *Journal of Natural Products*. 2008, 71: 1720–1725.

Farag, A. A. Synthesis and Antimicrobial Activity of 5-(morpholinosulfonyl) isatin Derivatives Incorporating a Thiazole Moiety. *Drug Res (Stuttg)*. 2014, 65(07): 373-379.

Fera, M. T.; La Camera, E.; De Sarro, A. New triazoles and echinocandins: mode of action, in vitro activity and mechanisms of resistance. *Expert review of anti-infective therapy*. 2009, 7: 981-998.

Finch, R. A.; Liu, M. C.; Grill, S. P.; Rose, W. C.; Loomis, R.; Vasquez, K. M.; Sartorelli, A. C. Triapine (3-aminopyridine-2-carboxaldehyde-thiosemicarbazone): a potent inhibitor of ribonucleotide reductase activity with broad spectrum antitumor activity. *Biochemical pharmacology*. 2000, 8: 983-991.

Frost, D. J.; Brandt, K. D.; Cugier, D.; Goldman, R. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. *Journal of Antibiotics*. 1995, 48: 306–310.

García-Tojala, J.; Gil-García, R.; Fouza, V. I.; Madariagab, G.; Lezamac, L.; Galleterod, M. S.; Borrás, J.; Nollmann, F. I.; García-Girón, C.; Alcaraz, R.; Cavia-Saiz, M.; Muñiz, P.; Palacios, O.; Samperi, K. G.; Rojoc, T. Revisiting the thiosemicarbazonecopper(II) reaction with glutathione. Activity against colorectal carcinoma cell lines. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2018, 180: 69–79.

- Gewald, K.; Schinke, E.; Böttcher, H. Heterocyclen aus CH-aciden Nitrilen, VIII. 2-Amino-thiophene aus methylenaktiven Nitrilen, Carbonylverbindungen und Schwefel. *Chemische Berichte*. 1996, 1: 94-100.
- Gillis, E. P.; Eastman, K. J.; Hill, M. D.; Donnelly, D. J.; Meanwell, N. A. Applications of Fluorine in Medicinal Chemistry. *J. Med. Chem.* 2015, 58(21): 8315–8359.
- Glisoni, R. J.; Chiappetta, D. A.; Moglioni, A. G.; Sosnik, A. Novel 1-indanone thiosemicarbazone antiviral candidates: aqueous solubilization and physical stabilization by means of cyclodextrins. *Pharmaceutical research*. 2012, 3: 739-755.
- Graves, D. B. The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology. *J Phys D Appl Phys*. 2012, 45(45): 263001-263042.
- Guo, N.; Jiang, D.; Wang, L.; You, X.; Teng, Y.; Yu, P. Synthesis and Biological Evaluation of Novel Water-Soluble Poly-(ethylene glycol)-10-hydroxycamptothecin Conjugates. *Molecules*. 2015, 20: 9393-9404.
- Hafez, H. N.; Alsalamah, S. A.; El-gazzar, A. B. A. Synthesis of thiophene and N substituted thieno[3,2-d]pyrimidine derivatives as potent antitumor and antibacterial agents. *Acta Pharm.* 2017, 67: 275–292.
- Hartkoorn, R. C.; Ryabova, O. B.; Chiarelli, L. R.; Riccardi, G.; Makarov, V.; Colea, S. T. Mechanism of Action of 5-Nitrothiophenes against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014, 58: 2944-2947.
- Hazen, K. C.; Mandell, G.; Coleman, E.; Wu, G. Influence of fluconazole at subinhibitory concentrations on cell surface hydrophobicity and phagocytosis of *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Letters*. 2000, 183: 89-94.
- Hazlewood, K. A.; Brouse, S., D.; Pitcher, W. D.; Hall, R. G. Vancomycin-Associated Nephrotoxicity: Grave Concern or Death by Character Assassination?. *American Journal of Medicine*. 2010, 123: 2, 182-182.
- Hube, B. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Current opinion in microbiology*. 2004, 7: 336–341.
- Hückel, E. Grundzüge der Theorie ungesättigter und aromatischer Verbindungen. *Zeitschrift für Elektrochemie und angewandte physikalische Chemie*. 1937, 9: 752-788.
- Ishida, K.; Rodrigues, J. C. F.; Ribeiro, M. D.; Vila, T. V. M.; Souza, W.; Julio, A.; Urbina, J. A.; Nakamura, C. V.; Rozental, S. Growth inhibition and ultrastructural alterations induced by $\Delta 24(25)$ -sterol methyltransferase inhibitors in *Candida* spp. isolates, including non-*albicans* organisms. *BMC Microbiology*. 2009, 9: 74-86.
- Jagadish, E. R.; Mohan, S.; Saravanan, J.; Satyendra, D.; Swetha Sree, P.; Apurba, T.; Rama Kanta, S. Synthesis and in-vitro Anti-platelet aggregation activity of some New substituted Thiophenes. *Hygeia: Journal for Drugs & Medicines*. 2013, 2: 87-96.

Kamal, A.; Hussaini, S. M. A.; Faazil, S.; Poornachandra, Y.; Reddy, G. N.; Kumar, C. G.; Babu, N. J. Anti-tubercular agents. Part 8: Synthesis, antibacterial and antitubercular activity of 5-nitrofurans based 1, 2, 3-triazoles. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2013, 24: 6842-6846.

Kathiravan, M. K.; Salake, A. B.; Chothe, A. S.; Dudhe, P. B.; Watode, R. P.; Mukta, M. S.; Gadhwe, S. The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2012, 20: 5678-5698.

Katritzky, A. R.; Pozharski, A. F. *Handbook of Heterocyclic Chemistry*. Pergamon: New York, 2000: 588.

Khana, S. A.; Asiria, A. M. Synthesis and spectroscopic studies of Ru(II) complexes of steroidal thiosemicarbazones by multi step reaction: As anti-bacterial agents. *Steroids*. 2017, 124: 23–28.

Klinker, K. P.; Borgert, S. J. Beyond Vancomycin: The Tail of the Lipoglycopeptides. *Clin Ther*. 2015, 37: 12, 2619-2636.

Koul, A.; Vitullo, J.; Reyes, G.; Ghaoum, M. Effects of voriconazole on *Candida glabrata* in vitro. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*. 1999, 44: 109-112.

Kunos, C. A.; Radivoyevitch, T.; Waggoner, S.; Debernardo, R.; Zanolli, K.; Resnick, K.; Dowlati, A. Radiochemotherapy plus 3-aminopyridine-2-carboxaldehyde thiosemicarbazone (3-AP, NSC[#] 663249) in advanced-stage cervical and vaginal cancers. *Gynecologic oncology*. 2013, 1: 75-80.

Lehar, S. M.; Pillow, T.; Xu, M.; Staben, L.; Kajihara, K. K.; Vandlen, R.; DePalatis, L.; Raab, H.; Hazenbos, W. L.; Hiroshi Morisaki, J.; Kim, J.; Park, S.; Darwish, M.; Lee, B.; Hernandez, H.; Loyet, K. M.; Lupardus, P.; Fong, R.; Yan, D.; Chalouni, C.; Luis, E.; Khalfin, Y.; Plise, E.; Cheong, J.; Lyssikatos, J. P.; Strandh, M.; Koefoed, K.; Andersen, P. S.; Flygare, J. A.; Wah Tan, M.; Brown, E. J.; Mariathasan, S. Novel antibody–antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*. *Nature*. 2015, 527: 323-328.

Leon, E. M.; Jacober, S. J.; Sobel, J. D.; Foxman, B. Prevalence and risk factors for vaginal *Candida* colonization in women with type 1 and type 2 diabetes. *BMC Infectious Diseases*. 2002, 2: 1.

Li, M.; Sun, Q.; Bai, Y.; Duan, C.; Zhang, B.; Meng, Q. Chiral aggregation and spontaneous resolution of thiosemicarbazone metal complexes. *Dalton Transactions*. 2006, 21: 2572-2578.

Lobana, T. S.; Sharma, R.; Bawa, G.; Khanna, S. Bonding and structure trends of thiosemicarbazone derivatives of metals—an overview. *Coordination Chemistry Reviews*. 2009, 7: 977-1055.

Lortholary, O. Management of cryptococcal meningitis in AIDS: the need for specific studies in developing countries. *Clinical Infectious Diseases*. 2007, 45: 81-83.

- Lunde, C. S.; Kubo, I. Effect of Polygodial on the Mitochondrial ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000, 7: 1943-1953.
- Mabkhot, Y. N.; Kaal, N. A.; Alterary, S.; Al-Showiman, S. S.; Farghaly, T. A.; Mubarak, M. S. Antimicrobial activity of thiophene derivatives derived from ethyl(E)-5-(3-(dimethylamino)acryloyl)-4-methyl-2-(phenylamino)thiophene-3-carboxylate. *Chemistry Central Journal*. 2017, 11: 75-86.
- Mahl, C. D.; Behling, C. S.; Hackenhaar, F. S.; Mélanie Natuane de Carvalho e Silva, M. N.; Putti, J.; Salomon, T. B.; Alves, S. H.; Fuentefria, A.; Benfato, M. S. Induction of ROS generation by fluconazole in *Candida glabrata*: Activation of antioxidant enzymes and oxidative DNA damage. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2015, 82(3): 203-208.
- Magill, S. S.; Edwards, J. R.; Bamberg, W.; Beldavs, Z. G.; Dumyati, G.; Kainer, M. A.; Lynfield, R.; Maloney, M.; McAllister-Hollod, L.; Nadle, J.; Ray, S. M.; Thompson, D. L.; Wilson, L. E.; Fridkin, S. K. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care-Associated Infections. *New England Journal of Medicine*. 2017, 370: 13, 1198-1208.
- Matesanz, A. I.; Souza, P. Unprecedented Pt (II) complex of an asymmetric 2, 6-diacetylpyridine bis (4 N-substituted thiosemicarbazone) ligand. *Inorganic Chemistry Communications*. 2013, 27: 5-8.
- Matsumori, N.; Sawada, Y.; Murata, M. J. Mycosamine Orientation of Amphotericin B Controlling Interaction with Ergosterol: Sterol-Dependent Activity of Conformation-Restricted Derivatives with an Amino-Carbonyl Bridge. *Journal of the American Chemical Society*. 2005, 127: 10667–10675.
- Mayer, J. H.; Laing, P. G. Clinical Trial of TB 3 in Surgical Tuberculosis. *British medical journal*. 1953, 4803: 189.
- Mariathasan, S.; Tan, M. Antibody–Antibiotic Conjugates: A Novel Therapeutic Platform against Bacterial Infections. *Trends in Molecular Medicine*. 2017, 23: 2, 135-149.
- Mesa-Arango, A. C.; Trevijano-Contador, N.; Román, E.; Sánchez-Fresnedad, R.; Casas, C.; Herrero, E.; Argüelles, J. C.; Pla, J.; Cuenca-Estrella, M.; Zaragoza, O. The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014, 58(11): 6627-6638.
- Meyer, W.; Gilgado, F.; Ngamskulrungraj, P.; Trilles, L. H.; Hagen, F.; Castaneda, E.; Boekhout, T. Molecular typing of the *Cryptococcus neoformans*/*Cryptococcus gattii* species complex. In *Cryptococcus: From human pathogen to model yeast*. ASM press: Washington, DC, 2011, 327–357.
- Minetto, G.; Raveglia, L. F.; Sega, A.; Taddei, M. Microwave-Assisted Paal–Knorr Reaction–Three-Step Regiocontrolled Synthesis of Polysubstituted Furans, Pyrroles and Thiophenes. *European journal of organic chemistry*. 2005, 24: 5277-5288.

Mora, D. J.; Pedrosa, A. L.; Rodrigues, V.; Leite-Maffei, C. M.; Trilles, L.; Santos, L. M.; Silva-Vergara, M. L. Genotype and mating type distribution within clinical *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from patients with cryptococcal meningitis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Medical mycology*. 2010, 48: 561-569.

Morley, J. O.; Matthews, T. P. Studies on the biological activity of some nitrothiophenes. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2006, 4: 359-366.

Morschhäuser, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 2010, 47: 94-106.

Nguyen, D. T.; Le, T. H.; Bui, T. T. T. Antioxidant activities of thiosemicarbazones from substituted benzaldehydes and N-(tetra-O-acetyl- β -D-galactopyranosyl) thiosemicarbazide. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013, 60: 199-207.

Nollin, S.; Borgers, M. Scanning Electron microscopy of *Candida albicans* after in vitro treatment with miconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1975, 7: 704-711.

Nucci, M.; Anaisse, E. Revisiting the source of candidemia: skin or gut? *Clinical Infectious Diseases*. 2001, 33: 1959-1967.

Olender, D.; Wawiak, J. Z.; Lukianchuk, V.; Lesyk, R.; Kropacz, A.; Fojutowski, A.; Zaprutko, L. Synthesis of some N-substituted nitroimidazole derivatives as potential antioxidant and antifungal agents, *Eur. J. Med. Chem.* 2009, 44(2): 645-652.

Oliveira, C. S.; Lira, B. F.; Santos Falcão-Silva, V.; Siqueira-Junior, J. P.; Barbosa-Filho, J. M.; Athayde-Filho, P. F. Synthesis, molecular properties prediction, and anti-staphylococcal activity of N-acylhydrazones and new 1, 3, 4-oxadiazole derivatives. *Molecules*. 2012, 5: 5095-5107.

Oliveira, J. F.; Silva, A. L.; Vendramini-Costa, D. B.; Cruz Amorim, C. A.; Campos, J. F.; Ribeiro, A. G.; Lima, M. D. C. A. Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015, 104: 148-156.

Pahontu, E.; Paraschivescu, C.; Ilies, D. C.; Poirier, D.; Oprean, C.; Paunescu, V.; Gulea, A.; Rosu, T.; Bratu, O. Synthesis and Characterization of Novel Cu(II), Pd(II) and Pt(II) Complexes with 8-Ethyl-2-hydroxytricyclo(7.3.1.0^{2,7})tridecan-13-onethiosemicarbazone: Antimicrobial and *in Vitro* Antiproliferative Activity. *Molecules*. 2016, 21: 674-681.

Paiva, R. D. O.; Kneipp, L. F.; Goular, C. M.; Albuquerque, M. A.; & Echevarria, A. Antifungal activities of thiosemicarbazones and semicarbazones against mycotoxigenic fungi. *Ciência e Agrotecnologia*. 2014, 6: 531-537.

Panico, R.; Powell, W. H.; Richer, J. C. IUPAC–Nomenclature of organic compounds. 1993.

Papastaikoudi, T. S.; Tsotinis, A.; Raptopoulou, C.; Sambani, C.; Thomou, H. Synthesis of new alkylaminoalkyl thiosemicarbazones of 3-acetylindole and their effect on DNA synthesis and cell proliferation. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 1995, 2: 107-114.

Pappas, P. G.; Kauffman, C. A.; Andes, D.; Benjamin, D. K.; Calandra, T. F.; Edwards, J. E.; Filler, S. G.; Fisher, J. F.; Kullberg, B. J.; Ostrosky-Zeichner, L.; Reboli, A. C.; Rex, J. H.; Walsh, T. J.; Sobel, J. D. Infectious Diseases Society of A Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the *Infectious Diseases Society of America*. *Clinical Infectious Diseases*. 2009, 48: 503–535.

Park, B. J.; Lockhart, S. R.; Brandt, M. E.; Chiller, T. M. Public health importance of cryptococcal disease: Epidemiology, burden, and control. In *Cryptococcus: From human pathogen to model yeast*. ASM press: Washington, DC, 2011, 585–593.

Park, B. J.; Wannemuehler, K. A.; Marston, B. J.; Govender, N.; Pappas, P. G.; Chiller, T. M. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*. 2009, 23: 525–530.

Parrilha, G. L.; Silva, J. G.; Gouveia, L. F.; Gasparoto, A. K.; Dias, R. P.; Rocha, W. R.; Santos, D. A.; Speziali, N. L.; Beraldo, H. Pyridine-derived thiosemicarbazones and their tin (IV) complexes with antifungal activity against *Candida* spp. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2011, 46: 1473-1482.

Pederzoli, F. R. S.; Bresolin, L.; Carratu, V. S.; Locatelli, A.; Oliveira, A. B. 1-(5-Bromo-2-oxoindolin-3-ylidene) thiosemicarbazide acetonitrile monosolvate. *Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online*. 2011, 7: 804-1804.

Perfect, J. R. *Cryptococcus neoformans* In *Principles and practice of infectious diseases*. Churchill Livingstone, Philadelphia, 2010, 3287–3303.

Perlin, D. S. Resistance to echinocandin-class antifungal drugs. *Drug Resistance Updates*. 2007, 10: 121-130.

Pfaller, M. A.; Diekema, D. J. Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Critical reviews in microbiology*. 2010, 36: 1–53.

Pinto Junior, V. L.; Pone, M. V.; Pone, S. M.; Campos, J. M.; Garrido, J. R.; Barros, A. C.; Trilles, L.; Barbosa, G. G.; Morales, B. P.; Bezerra, C. C.; Lazéra, M. S. *Cryptococcus gattii* molecular type VGII as agent of meningitis in a healthy child in Rio de Janeiro, Brazil: report of an autochthonous case. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2010, 43: 746-748.

Radlinski, L.; Conlon, B. P. Antibiotic efficacy in the complex infection environment. *Current Opinion in Microbiology*. 2018, 42: 19–24.

Rizk, O. H.; Shaaban, O. G.; Wahab, A. E. A. Synthesis of Oxadiazolyl, Pyrazolyl and Thiazolyl Derivatives of Thiophene-2-Carboxamide as Antimicrobial and Anti-HCV Agents. *The Open Medicinal Chemistry Journal*. 2017, 11: 38-53.

Rodrigues, K. A. F.; Dias, C. N. S.; N  ris, P. L. N.; Rocha, J. C.; Scotti, M. T.; Scotti, L.; Mascarenhas, S. R.; Veras R. C.; Medeirosa, I. A.; Keesena, T. S. L.; Oliveirae, T. B.; Lima, M. C. A.; Ballianof, T. L.; Aquino, T. M.; Mourag, R. O.; Mendonça Jr, F. J. B. 2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation in vitro. *European journal of medicinal chemistry*. 2015, 106: 1-14.

Sabiiti, W.; May, R. C. Mechanisms of infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Future microbiology*. 2012, 7: 1297-313.

Sadler, P. W. Hydrogen bonding in some thiosemicarbazones and thioamides. *Journal of the Chemical Society*. 1961, 197: 957-960.

Sainsbury, M. *Heterocyclic chemistry*. Royal society of chemistry. 2001, 8.

Santiago, E. F.; Oliveira, S. A.; Filho, G. B. O.; Moreira, D. R. M.; Gomes, P. A. T.; Silva, A. L.; Barros, A. F.; Silva, A. C.; Santos, T. A. R.; Pereira, V. R. A.; Gonçalves, G. G. A.; Brayner, F. A.; Alves, L. C.; Wanderley, A. G.; Leite, A. C. L. Evaluation of the anti-Schistosoma mansoni activity of thiosemicarbazones and thiazoles. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014, 58: 352-363.

Scotti, L.; Scotti, M. T.; Lima, E. O.; Silva, M. S.; Lima, M. C. A.; Pitta, I. R.; Moura, R. O.; Oliveira, J. G. B.; Cruz, R. M. D.; Mendonça-Junior, F. J. B. Experimental Methodologies and Evaluations of Computer-Aided Drug Design Methodologies Applied to a Series of 2-Aminothiophene Derivatives with Antifungal Activities. *Molecules*. 2012, 17: 2298-2315.

Severo, C. B.; Xavier, M. O.; Gazzoni, A. F.; Severo, L.C. Cryptococcosis in children. *Paediatric respiratory reviews*. 2009, 4: 166-171.

Sheng, C.; Wang, W.; Che, X.; Dong, G.; Wang, S.; Ji, H.; Miao, Z.; Yao, J.; Zhang, W. Improved Model of Lanosterol 14  -Desmethylase by Ligand-Supported Homology Modeling: Validation by Virtual Screening and Azole Optimization. *Chem Med Chem*. 2010, 5: 390-397.

Shivarama Holla, B.; Akberali, P. M.; Shivananda, M. K. Studies on nitrophenylfuran derivatives: Part XII. Synthesis, characterization, antibacterial and antiviral activities of some nitrophenylfurfurylidene-1,2,4-triazolo[3,4-b]-1,3,4-thiadiazines. *Il Farmaco*. 2001, 56: 919-927.

Sidrim, J. J. C.; Rocha, M. F. G. *Micologia m  dica    luz de autores contempor  neos*. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2004, 388.

Sifuentes-osornio, J.; Corzo-León, D. E.; Ponce-de-León, L. A. Epidemiology of invasive fungal infections in Latin America. *Current fungal infection reports*. 2012, 6: 23-34.

Singh, M.; Singh, S. K.; Gangwar, M.; Nath, G.; Singh, S. K. Design, synthesis and mode of action of novel 2-(4-aminophenyl) benzothiazole derivatives bearing

semicarbazone and thiosemicarbazone moiety as potent antimicrobial agents. *Medicinal Chemistry Research*. 2016, 2: 263-282.

Sobel, J. D. Vulvovaginal candidosis. *The Lancet*. 2007, 369: 1961–1971.

Soong, G.; Chun, J.; Parker, D.; Prince, Alice. Staphylococcus aureus Activation of Caspase 1/Calpain Signaling Mediates Invasion Through Human Keratinocytes. *The Journal of Infectious Diseases*. 2012. 205:10, 1571-1579.

Sokolsky-Papkov, M.; Domb, A. J.; Golenser, J. Impact of aldehyde content on amphotericin B-dextran imine conjugate toxicity. *Biomacromolecules*. 2006, 5: 1529-1535.

Sorrell, T. C.; Chen, S. C. A.; Phillips, P.; Marr, K. A.; Clinical perspectives on *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: Implications for diagnosis and management. In *Cryptococcus: From human pathogen to model yeast*. ASM press: Washington, DC, 2011, 595–606.

Souza, B. C. C.; Oliveira, T. B.; Aquino, T. M.; Lima, M. A., Pitta, I R., Galdino, S. L.; Lima E. O.; Silva, T. G.; Militão, G. C. G.; Scotti, L.; Scotti, M.; Mendonça Jr, F. J. B. Preliminary antifungal and cytotoxic evaluation of synthetic cycloalkyl [b] thiophene derivatives with PLS-DA analysis. *Acta Pharmaceutica*. 2012, 2: 221-236.

Spinello, A. New Insights into HIV/AIDS-Associated Cryptococcosis. *ISRN AIDS*. Hindawi Publishing Corporation. 2013, 2013: 22.

Tenório, R. P.; Góes, A. J.; de Lima, J. G.; Faria, A. R.; Alves, A. J.; Aquino, T. M. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. *Química Nova*. 2005, 6: 1030.

Thangamani. S.; Eldesouky, H. E.; Mohammad, H.; Pascuzzi, P. E.; Avramova, L.; Hazbun, T. R.; Seleem, M. N. Ebselen exerts antifungal activity by regulating glutathione (GSH) and reactive oxygen species (ROS) production in fungal cells. *Biochim. Biophys. Acta - Gen Subj*. 2017, 1861(1): 3002-3010.

Tsai, P. W.; Chen, Y. T.; Hsu, P. C.; Lan, C. Y. Study of *Candida albicans* and its interactions with the host: A mini review. *BioMedicine*. 2013, 3: 51-64.

Tseng, C. H.; Tzeng, C. C.; Chiu, C. C.; Hsu, C. Y.; Chou, C. K.; Chen, Y. L. Discovery of 2-[2-(5-nitrofuran-2-yl) vinyl] quinoline derivatives as a novel type of antimetastatic agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2015, 1: 141-148.

van Hal, S. J.; Jensen, S. O.; Vaska, V. L.; Espedido, B. A.; Paterson, D. L.; Gosbell, I. B. Predictors of Mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clin. Microbiol. Rev*. 2012, 25: 2, 362-378.

Veen, M.; Lang, C. Interactions of the ergosterol biosynthetic pathway with other lipid pathways. *Biochemical Society Transactions*, England. 2005, 33: 1178-1181.

Vollhardt, K. P.; Schore, N. E. Química Orgânica - Estrutura e Função, Bookman, Brazil, 2013.

Voss, A.; Kluytmans, J. A.; Koeleman, J. G.; Spanjaard, L.; Vandenbroucke-Grauls, C. M.; Verbrugh, H. A.; Vos, M. C.; Weersink, A. Y.; Hoogkamp-Korstanje, J. A.; Meis, J. F. Occurrence of yeast bloodstream infections between 1987 and 1995 in five Dutch university hospitals. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 1996, 15: 909-912.

Wenzel, R. P.; Geings, C. Bloodstream infections due to *Candida* species in the intensive care unit: identifying especially high-risk patients to determine prevention strategies. *Clinical Infectious Diseases*. 2005, 41: 389-393.

White, T. C.; Marr, K. A.; Bowden, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clinical microbiology reviews*. 1998, 11: 382-402.

Wilke, M. Treatment and prophylaxis of invasive candidiasis with anidulafungin, caspofungin and micafungin and its impact on use and costs: review of the literature. *European journal of medical research*. 2011, 16: 180-186.

World health organization [Internet]. Antimicrobial resistance; c2016 [cited 2016 Sep]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>.

Yu, Q.; Zhang, B.; Li, J.; Zhang, B.; Wang, H.; Li, M. Endoplasmic reticulum-derived reactive oxygen species (ROS) is involved in toxicity of cell wall stress to *Candida albicans*. *Free Radic. Biol. Med*. 2016, 99: 572-583.

Zhang, X. M.; Guo, H.; Li, Z. S.; Song, F. H.; Wang, W. M.; Dai, H. Q.; Zhang, L. X.; Wang, J. G. Synthesis and evaluation of isatin- β -thiosemicarbazones as novel agents against antibiotic-resistant Gram-positive bacterial species. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015, 101: 419-430.

Zhanel, G. G.; Schweizer, F.; Karlowsky, J. A. Oritavancin: mechanism of action. *Clin Infect Dis*. 2012, 54: 3, 214-219.

Zhu, S. P.; Wang, W. Y.; Fang, K. Design, synthesis and antifungal activity of carbazole derivatives. *Chinese Chemical Letters*, 2014, 25: 229–233.