



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

WENDELL WONS NEVES

DERIVADOS TIOFÊNICOS COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS

Recife
2019

WENDELL WONS NEVES

DERIVADOS TIOFÊNICOS COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS

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

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Jaime B. Mendonça Junior.

Recife

2019

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Neves, Wendell Wons

Derivados tiofênicos como agentes antifúngicos / Wendell Wons Neves. - 2019.

150 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Jaime B. Mendonça Junior.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2019.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Micologia médica. 2. Fungos patogênicos. 3. Drogas – Toxicologia. I. Mendonça Júnior, Francisco Jaime B. (orientador). II. Título.

6116.969

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020 -164

WENDELL WONS NEVES

DERIVADOS TIOFÊNICOS COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Aprovado em: 14/10/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Francisco Jaime B. Mendonça Junior (Orientador/Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto (Examinador externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Daniele Patrícia Cerqueira Macêdo (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Armando Marsden Lacerda Filho (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Rodrigo Santos Aquino de Araújo (Examinador Externo)
Universidade Estadual da Paraíba

Primeiramente a Deus, que sem ele não seria nada. A meus familiares Luiz Firmino Neves, Beatriz Cleni Wons Neves, Maxwell Wons Neves, Enya Wons Neves e esposa Nuara Furtado e família, que sempre me apoiaram e me incentivaram a lutar pelos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus familiares, Beatriz Cleni Wons e Luiz Firmino Neves, Enya C. Wons Neves, Maxwell Wons Neves e Vagner Borges pelo amor, carinho, paciência, e por estarem sempre ao meu lado nas escolhas mais importantes e difíceis da minha vida. Por todos os momentos difíceis que passei, ao querer desistir, sempre lembrei da força de todos vocês, a qual me espelhei e me encorajei. Minha eterna admiração e gratidão.

A minha querida esposa Nuara pela paciência e companheirismo nos desafios enfrentados, sempre me dando força e confiança em meu trabalho, acreditando sempre em meus ideais. Meu muito obrigado!

Em especial, ao meu orientador Prof. Dr. Francisco Jaime Bezerra Mendonça Júnior, pela amizade, paciência, disponibilidade e confiança em meu trabalho. Minha eterna admiração e gratidão por tudo.

Ao meu amigo e mentor Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto pelos ensinamentos que me fornece desde a época da graduação, dando-me coragem e incentivo nessa longa jornada. Agradeço imensamente por tudo aprendido durante essa caminhada, que ainda irá render bons frutos. Perdão por alguma falha, mas aprendemos mais com os erros do que com os acertos. Minha eterna admiração e gratidão!

Ao Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica pela confiança no projeto proposto por mim, pelo auxílio financeiro e científico durante esses quatro anos de Doutorado.

Ao técnico administrativo do Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Paulo Germano Brito, por seu excelente trabalho na condução desta Pós-Graduação. Minha enorme admiração a você!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)

Ao Laboratório de Micologia Médica por me receber de braços abertos desde o período da graduação.

A todos professores, técnicos e alunos que fazem parte do Laboratório de Micologia Médica da UFPE, por terem me recebido e ensinado muitas coisas durante o período vivido com todos vocês. Meu muito obrigado!

Aos professores Dr. Armando Marsden Lacerda Filho, Dra. Rejane Pereira Neves e Dra. Oliane Magalhães pela paciência e dedicação em repassar seus valiosos ensinamentos. Minha enorme admiração e gratidão a vocês!

A todos do Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas da Universidade Estadual da Paraíba (LSVM-UEPB), em especial a Isadora Luna, pela parceria, disponibilidade e contribuição durante os quatro anos.

Ao Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), em especial a Dra. Amanda Albuquerque, Dra. Maira Pitta e Dr. Moacyr Barreto, pela parceria, disponibilidade e contribuição para os resultados desta Tese.

A todos os grandes amigos que cativei em Recife-PE durante esses anos.

Seja a mudança que você quer ver no mundo.

Mahatma Gandhi

RESUMO

A frequência de infecções por fungos patogênicos tem aumentado substancialmente nas últimas décadas, acarretando altos níveis de morbimortalidade. O número restrito de antifúngicos disponíveis na terapêutica, associado a seus efeitos adversos, o desenvolvimento dos mecanismos de resistência por parte dos microrganismos e a situação clínica dos pacientes tem colaborado com falhas nos tratamentos, e tem contribuindo ainda mais para a problemática dessas infecções. Diante desse cenário, o presente trabalho objetivou a avaliação do potencial antifúngico de derivados tiofênicos livres obtidos a partir do 1,4-ditiano-2,5-diol (DTD), e o composto 6CN10 nanoformulado (nanoesferas e nanocápsulas) e complexado com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) frente a fungos dermatófitos, e leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus*. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com os protocolos M27-A3 e M38-A2 do Clinical and Laboratory Standard Institute. No estudo realizado com os derivados tiofênicos livres obtidos a partir do DTD foram determinadas as CIM de 19 moléculas frente a 15 isolados. As moléculas com menores valores de CIM frente aos dermatófitos seguiram para avaliação citotóxica por atividade hemolítica e MTT. O composto 6CN10 e suas nanoformulações foram avaliados frente a cepas de *Candida* e *Cryptococcus* e tiveram sua atividade antibiofilme verificada frente ao *C. neoformans*. Os derivados tiofênicos mais ativos, obtidos a partir do DTD, frente às leveduras e dermatófitos foram: CN07 (CIM = 8 $\mu\text{g/mL}$, frente a *C. neoformans*), CN23 (CIM = 16 $\mu\text{g/mL}$), CN02, CN10 e CN11 (CIM = 32 $\mu\text{g/mL}$), e CN08, CN20 e CN21 (CIM = 32 $\mu\text{g/mL}$) frente às leveduras. E CN19 (CIM = 16 $\mu\text{g/mL}$), CN05, CN06 e CN21 (CIM = 32 $\mu\text{g/mL}$), e CN07, CN10, CN13 e CN17 (CIM = 64 $\mu\text{g/mL}$), frente aos dermatófitos. No que se refere à atividade hemolítica, as moléculas CN13 e CN17 apresentaram as menores taxas de hemólise (2,5 %). A análise da toxicidade frente às células Vero, MRC-05 e 3T3 não revelou diferenças na viabilidade celular em nenhuma das concentrações avaliadas após 72h de incubação. Para o composto 6CN10 e suas nanoformulações, todos os isolados de *Candida* sp. demonstraram sensibilidade ao fármaco livre (CIM = 41,66 - 333,33 $\mu\text{g/mL}$) e conseguiram se desenvolver mesmo na maior concentração testada para todas as nanoformulações. Já as cepas de *C. neoformans* avaliadas apresentaram valores de CIM de 0,32–83,33 $\mu\text{g/mL}$ para nanoformulações contendo 6CN10 e

valores de CIM de 0,1 - 0,2 µg/mL para as nanoformulações contendo 6CN10:HP-β-CD, sendo até 3.333 vezes mais ativos do que os valores observados com o 6CN10 livre (valores de CIM de 166,66 - 333,33 µg/mL), apresentando atividade superior ao medicamento de referência anfotericina B (CIM = 0,5 - 0,125 µg/mL). Além disso, a nanoesfera contendo 6CN10:HP-β-CD apresentou alto potencial antibiofilme. Diante desses resultados, concluímos que os derivados 2-amino tiofênicos e suas nanoformulações demonstram-se como compostos promissores na terapia antifúngica. Estudos in vivo são essenciais visando uma futura aplicação médica.

Palavras-chave: Susceptibilidade Antifúngica. Fungos Patogênicos. 2-aminotiofenos. Biofilme. Citotoxicidade.

ABSTRACT

The frequency of pathogenic fungal infections has increased substantially in recent decades, leading to high levels of morbidity and mortality. The limited number of antifungals available in therapy, associated with their considerable toxicities, the development of resistance mechanisms by microorganisms and the clinical situation of patients have contributed to some of these treatment failures, and have further contributed to the problem of these infections. Given this scenario, the present work aimed to evaluate the antifungal potential of free thiophenic derivatives obtained from 1,4-dithiane-2,5-diol (DTD), and the nanoformulated 6CN10 compound (nanospheres and nanocapsules) and complexed with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) against dermatophyte fungi, and yeasts of the genus *Candida* and *Cryptococcus*. Minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined by the broth microdilution method according to protocols M27-A3 and M38-A2 of the Clinical and Laboratory Standard Institute. In the study with free thiophenic derivatives obtained from DTD, MICs of 19 molecules against 15 isolates were determined. The molecules with lower MIC values compared to dermatophytes followed for cytotoxic evaluation by hemolytic activity and MTT. Compound 6CN10 and its nanoformulations were evaluated against *Candida* and *Cryptococcus* strains and their antibiofilm activity was verified against *C. neoformans*. The most active thiophenic derivatives obtained from DTD against yeast and dermatophytes were: CN07 (MIC = 8 μ g / mL against *C. neoformans*), CN23 (MIC = 16 μ g / mL), CN02, CN10 and CN11 (MIC = 32 μ g / mL), and CN08, CN20 and CN21 (MIC = 32 μ g / mL) against yeast. And CN19 (MIC = 16 μ g / mL), CN05, CN06 and CN21 (MIC = 32 μ g / mL), and CN07, CN10, CN13 and CN17 (MIC = 64 μ g / mL) against dermatophytes. Regarding hemolytic activity, molecules CN13 and CN17 had the lowest hemolysis rates (2.5%). Vero, MRC-05 and 3T3 toxicity analysis revealed no differences in cell viability at any of the concentrations evaluated after 72h of incubation. For the 6CN10 compound and its nanoformulations, all *Candida* isolates showed free drug sensitivity (MIC = 41.66 - 333.33 μ g / mL) and were able to develop even at the highest concentration tested for all nanoformulations. The evaluated *C. neoformans* strains presented MIC values of 0.32–83.33 μ g / mL for nanoformulations containing 6CN10 and MIC values of 0.1 - 0.2 μ g / mL for nanoformulations containing 6CN10: HP- β -CD, being up to 3,333 times more active than the values observed with free 6CN10 (MIC values of 166.66 - 333.33 μ g / mL),

showing higher activity than the reference drug amphotericin B (MIC = 0.5 - 0.125 μ g / mL). In addition, the 6CN10: HP- β -CD nanosphere had high anti-biofilm potential. Given these results, we conclude that 2-amino thiophenic derivatives and their nanoformulations are shown to be promising compounds in antifungal therapy. In vivo studies are essential for future medical application.

Keywords: Antifungal Susceptibility. Pathogenic fungi. 2-aminothiophenes. Biofilm. Cytotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química do derivado tiofênico 6CN10	20
Figura 2 – Representação da pele humana	25
Figura 3 – Macromorfologia, micromorfologia e lesão por <i>T. rubrum</i>	28
Figura 4 – Macromorfologia, micromorfologia e lesão por <i>M. canis</i>	29
Figura 5 – Sinonímia do <i>M. gypseum</i>	30
Figura 6 – Macromorfologia, micromorfologia e lesão por <i>E. floccosum</i>	31
Figura 7 – Estrutura química de antifúngicos utilizados para tratamento das dermatomicoses	33
Figura 8 – Macromorfologia, micromorfologia e lesão por <i>Candida</i> spp.....	36
Figura 9 – Estrutura química da Anidulafungina, Micafungina e Caspofungina	38
Figura 10 – Estrutura química da anfotericina B	41
Figura 11 – Hierarquia para o desenvolvimento de novos fármacos segundo a abordagem fisiológica	45
Figura 12 – Representação molecular do anel tiofênico	45
Figura 13 – Fármacos de uso comercial contendo o anel tiofênico	46
Figura 14 – Molécula do Sertaconazol	47
Figura 15 – Derivados tiofênicos com potencial antifúngico	47
Figura 16 – Estrutura química dos derivados tiofênicos complexado com metais....	48
Figura 17 – Estrutura química do 1,4-ditiano-2,5-diol	49
Figura 18 – Estrutura química da molécula 5CN05	50
Figura 19 – Fluxograma de metodologia utilizada	51
Figura 20 – Rota reacional utilizada para obtenção dos derivados 2- amino Tiofênicos.....	58
Figura 21 – Micrografia eletrônica de varredura após 48 h de formação de biofilme de <i>Cryptococcus neoformans</i> em discos de silicone	68
Figura 22 – Porcentagem da atividade hemolítica de sete derivados 2-amino- tiofênicos.	75
Figura 23 – Curva de viabilidade celular de células epiteliais de rim de macaco (VERO) frente aos derivados 2-aminotiofênicos.....	76
Figura 24 – Curva de viabilidade celular de fibroblastos murinos (3T3) frente aos derivados 2-aminotiofênicos	77

Figura 25 – Curva de viabilidade celular de fibroblastos humanos (MRC-05) frente aos derivados 2-aminotiofênicos.	77
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Agentes antifúngicos comumente utilizados contra <i>Candida</i> spp.....	38
Tabela 2 –	Isolados clínicos testados frente ao composto 6CN10.....	52
Tabela 3 –	Isolados testados frente aos derivados tiofênicos obtidos a partir do 1,4-ditiano-2,5-diol.....	53
Tabela 4 –	Códigos, nomes químicos, forma molecular e características físico-químicas dos compostos utilizados para testes com aos derivados tiofênicos obtidos a partir do 1,4-ditiano-2,5-diol	58
Tabela 5 –	Resultados da avaliação da atividade antifúngica das nanoformulações contendo 6CN10 e complexo 6CN10:HP- β -CD.....	64
Tabela 6 –	Número de UFC do biofilme de <i>Cryptococcus neoformans</i> em discos de silicone após o tratamento com nanoformulações de 6CN10.....	66
Tabela 7 –	Resultados da avaliação da atividade antifúngica observados de compostos selecionados frente a fungos leveduriformes.....	71
Tabela 8 –	Resultados da avaliação da atividade antifúngica observados de compostos selecionados frente a fungos dermatófitos.....	74
Tabela 9 –	Citotoxicidade celular demonstrada pela concentração do IC ₅₀ frente as linhagens não-tumorais Vero, MRC-05 e 3T3.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

etc.	Outras coisas mais
pH.	Potencial hidrogeniônico
et al.	E outro
S-S	Pontes dissulfeto
a.C	Antes de cristo
HIV	Virus da himunodeficiência humana
SNC	Sistema nervoso central
CADD	Computer-aided Drug Designe
CIM	Concentração inibitória mínima
PC	Parede celular
MC	Membrana celular
KOH	Hidróxido de potássio
RNA	Ácido ribonucléico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EUA	Estados Unidos da América
UTI	Unidade de terapia intensiva
MALDI-TOF MS	Matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight mass spectrometry
PNA-FISH	Hibridização <i>in situ</i> de fluorescência de ácido nucleico peptídico
FDA	Food and drug administration
PCR	Reação em cadeia polimerase
I.V	Intra-venoso
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
LCR	Líquido cefalorraquidiano
ERO	Espécies reativas de oxigênio
LSVM	Laboratório de síntese e vetorização de moléculas
UFPE	Universidade federal de Pernambuco
CLSI	Clinical and laboratory standards institute

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	OBJETIVOS	21
1.1.1	Geral	21
1.1.2	Específicos	21
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	22
2.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS FUNGOS	22
2.2	FUNGOS PATOGÊNICOS.....	23
2.3	FUNGOS DERMATÓFITOS.....	24
2.3.1	Gênero <i>Trichophyton</i>	27
2.3.2	Gênero <i>Microsporum</i>	28
2.3.3	Gênero <i>Epidermophyton</i>	30
2.3.4	Tratamento das dermatofitoses	31
2.4	CANDIDÍASE	34
2.4.1	Tratamento das Candidíases.....	37
2.5	CRÍPTOCOCOSE	39
2.5.1	Tratamento da Criptococose.....	40
2.6	ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS	42
2.7	PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS	43
2.8	DERIVADOS TIOFÊNICOS COMO ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS	45
2.8.1	Derivados Tiofênicos incorporados em Preparações Farmacêuticas com Ação Antifúngica.....	49
3	METODOLOGIA	51
3.1	DESENHO DO ESTUDO	51
3.2	OBTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....	52
3.3	DESCRIÇÃO METODOLÓGICA PARA O COMPSOTO 6CN10	53
3.3.1	Obtenção do Composto 6CN10.....	53
3.3.2	Preparação das Nanoformulações.....	53
3.3.3	Identificação Fenotípica Clássica	54
3.3.4	Identificação por MALDI-TOF MS.....	54
3.3.5	Teste de Sensibilidade a Antifúngicos	55
3.3.6	Formação de Biofilme	56
3.3.7	Aspectos Éticos	57

3.4	DESCRIÇÃO METODOLÓGICA PARA OS DERIVADOS TIOFÊNICOS OBTIDOS A PARTIR DO 1,4-DITIANO-2,5-DIOL	57
3.4.1	Derivados 2-Amino-Tiofênicos.....	57
3.4.2	Teste de Sensibilidade a Antifúngicos	59
3.4.3	Atividade Hemolítica	59
3.4.4	Análise Citotóxica dos Derivados tiofênicos	60
3.4.4.1	Fluxograma dos ensaios <i>in vitro</i>	60
3.4.4.2	Derivados tiofênicos utilizados	60
3.4.4.3	Cultivo celular	61
3.4.4.4	Citotoxicidade em células não transformadas	61
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1	RESULTADOS OBTIDO COM O COMPOSTO 6CN10	63
4.1.1	Identificação das Cepas.....	63
4.1.2	Sensibilidade Antifúngica <i>in vitro</i>	63
4.1.3	Tratamento de Biofilme de <i>Cryptococcus</i>	66
4.2	RESULTADOS OBTIDOS COM OS DERIVADOS TIOFÊNICOS OBTIDOS A PARTIR DO 1,4-DITIANO-2,5-DIOL	69
4.2.1	Sensibilidade Antifúngica <i>in vitro</i>	69
4.2.2	Atividade Hemolítica dos Derivados 2-Aminotiofênicos	75
4.2.3	Avaliação da Toxicidade dos Derivados 2-Aminotiofênicos em Células Vero, MRC-05 e 3T3	75
5	CONCLUSÃO.....	78
	REFERÊNCIAS.....	79
	APÊNDICE A – ARTIGO 1 – INCORPORATION OF 2-AMINOTHIOPHENE DERIVATIVE IN NANOFORMULATIONS: AN ENHANCEMENT OF THE ANTIFUNGAL ACTIVITY	101
	APÊNDICE B – PATENTE 1 – DERIVADOS 2 AMINOTIOFÊNICOS COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS	122
	ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 1	150

1 INTRODUÇÃO

Diversos fungos são comumente presentes na superfície da pele, mucosas, trato gastrointestinal e geniturinário de indivíduos saudáveis. No entanto, sob determinadas condições, esses microrganismos são capazes de causar diversos quadros clínicos onde se incluem infecções sistêmicas, subcutâneas e superficiais, sendo esta última, responsável por mais de 95 % de todos os processos infecciosos de etiologia fúngica. O desequilíbrio entre os fungos da microbiota pode conduzir a quadros clínicos superficiais com eritema, descamação, prurido e até processo inflamatório. Desta forma, torna-se indispensável o diagnóstico associado a uma terapêutica eficaz (NUCCI et al., 2013).

As leveduras causam processos patológicos locais após fatores como alteração do potencial hidrogeniônico (pH), diabetes, vírus da imunodeficiência humana (HIV), câncer etc. As leveduroses, se não tratada adequadamente, evoluem para danos em órgãos sistêmicos como pulmões, rins e cérebro, causando alguns casos de abscessos, endocardite, meningite e processos pulmonares em pacientes críticos. As leveduroses vêm se tornando cada vez mais frequentes na rotina médica, especialmente pelo uso de cateteres e sondas contaminadas com leveduras como *Candida albicans* e outras espécies desse gênero, podem principalmente em pacientes imunocomprometidos, desenvolver complicações, dificultar o tratamento ou até conduzir o óbito (BERGER, 2013).

As espécies de leveduras do gênero *Cryptococcus*, causadores da criptococose, também podem ser potencialmente fatais, pois são leveduras invasivas que acometem diversos órgãos e sistemas, principalmente o sistema nervoso central (SNC) ocasionando quadros polimórficos e inespecíficos (ASHTON et al., 2019).

Os dermatófitos constituem um grupo de fungos que possuem afinidade por tecidos ricos em queratina como unhas, pêlo e pele, sendo denominadas dermatofitoses. Na prática dermatológica as dermatofitoses refletem a maioria dos casos de etiologia fúngica, principalmente no verão, cujos agentes etiológicos pertencentes aos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*, apresentam maior contato com a população. A maioria desses agentes são encontrados em regiões de clima tropical, caracterizando um problema de saúde pública (CHIMELLI et al., 2003).

Diversos microrganismos como os fungos, que causam processos patológicos no homem, vêm substancialmente apresentando altas taxas de morbimortalidade, devido ao surgimento de cepas multirresistentes (PERFECT et al., 2008).

Embora medicamentos utilizados na terapia antifúngica como anfotericina B, fluocitosina, equinocandinas e os azóis tais como cetoconazol, itraconazol ou fluconazol, tenham sido considerados eficazes para o tratamento de micoses, a maioria desses medicamentos apresenta falhas terapêuticas devido à elevada toxicidade a nível hepático e renal, apresentam reincidências devido ao fato de serem fungistáticos e não fungicidas, ou levam ao desenvolvimento de resistências devido ao uso profilático indiscriminado, ou aos longos períodos de administração de doses efetivas desses medicamentos, além de apresentarem um limitado espectro de atividade, baixa distribuição tecidual, custo elevado e terapêutica em longo prazo (CAPPELLETTY et al., 2007; QUINDÓS et al., 2007).

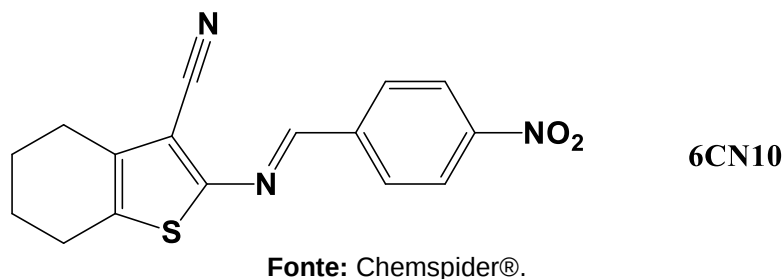
A química orgânica vem desempenhando um papel fundamental na produção de compostos sintéticos, que, em relação aos produtos naturais, ganham destaque por sua diversidade e competitividade, mostrando resultados satisfatórios nos diversos segmentos, principalmente na indústria farmacêutica, na produção de diversos fármacos. Uma das técnicas mais comumente utilizadas pela química orgânica medicinal, é a modificação molecular de compostos protótipos. Nessa abordagem são realizadas pequenas alterações estruturais em um composto protótipo conhecido, com reconhecida atividade biológica, permitindo a obtenção de novos compostos análogos ou homólogos que a priori mantem em parte o potencial biológico de sua molécula idealizadora, porém apresenta diferente perfil farmacocinético e de solubilidade (FERREIRA et al., 1997; MONTANARI, 1995).

Os derivados tiofênicos, em especial os 2-amino-tiofênicos têm se mostrado importantes intermediários sintéticos para química medicinal, permitindo a obtenção de um grande número de compostos bioativos com diversas aplicações na área médica e biológica, onde se incluem atividades como: antitumorais, ansiolíticas, antiinflamatórias, antiparasitárias, antidiabéticas, antioxidantes, antiplaquetária, antibacterianas e especialmente antifúngicas (AGUIAR et al., 2016).

Estudos anteriores de nosso grupo demonstraram que uma série de derivados cicloalquílicos tiofênicos apresentaram atividade fungicida contra isolados clínicos de *Candida* spp. E *Cryptococcus* spp., e em um desses trabalhos Mendonça Junior e colaboradores (2011) observaram que os compostos com atividade mais promissora

foram os derivados que possuíam em sua estrutura uma porção nitro-aromática, a exemplo do composto 6CN10 (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura química do derivado tiofênico 6CN10.



Um ano mais tarde, estudos de planejamento de fármacos auxiliado por computador (CADD), também realizados pelo mesmo grupo com derivados 2-amino-tiofênicos permitiram a obtenção de informações estruturais e eletrônicas essenciais à atividade antifúngica desses derivados, onde se pôde observar que a presença de grupos polares, ou seja, que aumentam a solubilidade em água (a exemplo do grupo NO₂) são fatores determinantes para a potencialização da atividade antifúngica (SOUZA et al., 2012). Em anos subsequentes, esses derivados 2-aminotiofênicos mais promissores foram incorporados em preparações farmacêuticas, que se fazem saber, microemulsões (GUIMARÃES et al., 2014) e complexos com hidroxipropil-β-ciclodextrinas (HP-β-CD) (ELEAMEN et al., 2017) e tiveram suas atividades antifúngicas significativamente melhoradas, resultando em preparações com valores de concentração inibitória mínima (CIM) equivalentes às drogas comerciais. Devido ao constante aumento da importância clínica de infecções fúngicas, ao número reduzido de antifúngicos disponíveis, existe uma necessidade evidente de desenvolvimento de novos agentes antifúngicos eficazes e menos tóxicos, que possam constituir alternativas terapêuticas para o controle destas infecções.

Diante do exposto e de acordo com os resultados prévios já obtidos pelo nosso grupo sob forma de artigos e patentes (LIMA-NETO et al. (2012); MENDONÇA JUNIOR et al. (2011); SCOTTI et al. (2012); GUIMARÃES et al. (2014) e ELEAMEN et al. (2017) e patente BR1020140290273), que comprovam o grande potencial antifúngico de derivados tiofênicos. O presente estudo propôs a avaliação do potencial antifúngico *in vitro* de novos derivados 2-amino-tiofênicos obtidos a partir do 1,4-ditiano-2,5-diol e de nanoformulações contendo o composto 6CN10 e o complexo

6CN10:HP- β -CD pela determinação das concentrações inibitórias mínimas (MICs) contra espécies de leveduras patogênicas (*Candida* e *Cryptococcus*) e espécies de dermatófitos (*Trichophyton* e *Epidermophyton*), além da capacidade de inibir o crescimento de biofilme de *Cryptococcus neoformans*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar *in vitro* a eficácia dos derivados 2-amino-tiofenos frente a fungos patogênicos, associado a testes de citotoxicidade e inibição na formação de biofilme.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Determinar a CIM dos derivados 2-aminotiofênicos obtidos a partir do 1,4-ditiano-2,5-diol;
- Determinar a citotoxicidade e atividade hemolítica dos compostos mais ativos nos resultados da CIM para os derivados supracitados;
- Determinar a CIM de nanoformulações contendo 6CN10 e complexo 6CN10:HP- β -CD;
- Avaliar a atividade antibiofilme do 6CN10 e complexo 6CN10:HP- β -CD.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS FUNGOS

De existência ubíqua, os fungos também são considerados cosmopolitas, pois sua presença é encontrada no solo, na água e no ar em todas as partes do planeta. No entanto, para obtenção de energia e carbono, esses microrganismos necessitam de matéria orgânica, por isso, estão sempre associados ao material orgânico como sapróbios ou decompositores, simbiontes, comensais e parasitas e os efeitos decorrentes de quaisquer uma destas manifestações são considerados muitas vezes como úteis ou prejudiciais (BARON et al., 1994; BLEVINS, 1999; KONEMAN et al., 2001).

Fungos são organismos eucarióticos altamente eficientes na degradação de uma gama de substratos que podem se apresentar sob forma unicelular, como as leveduras, ou pluricelular, como os fungos filamentosos. São organismos heterotróficos, ou quimiorganotróficos, incapazes de assimilar o carbono inorgânico, exigindo carbono orgânico. São aeróbios obrigatórios, no entanto, certas leveduras fermentadoras são anaeróbias facultativas podendo se desenvolver em ambientes com restrição ou ausência de oxigênio. A parede celular, superfície de contato da célula fúngica com o meio externo, é rígida, e seus componentes principais são hexoses e hexoaminas que formam mananas, glucanas e galactanas. Alguns fungos têm parede de quitina (N-acetil glicosamina), enquanto outros possuem complexos polissacarídios e proteínas com predominância de cisteína (LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Em geral, os nutrientes que são absorvidos compõem a solução que rodeia a célula, e deve possuir um tamanho adequado para que possa atravessar a parede celular (PC) e membrana celular (MC) da célula fúngica. Em relação a PC, esta é porosa, o que favorece que pequenas moléculas sejam absorvidas. Já a MC, possui uma permeabilidade seletiva, por isso, são mantidas uma concentração diferencial de solutos dentro e fora da célula (mais alta no meio intracelular) (BURNET, 1976; GARRILL, 1995).

Os fungos, em especial os filamentosos, compreendem uma grande diversidade de gêneros que colonizam diferentes ambientes e substratos, onde desenvolvem estruturas reprodutivas, como esporangiosporos, esporos e conídios, os

quais são veiculados por correntes de ar, que possui um alto potencial de contaminação dispersão pelo ar (RICHARDSON; WARNOCK, 1993; SIDRIM; MOREIRA, 1999).

Em uma análise macroscópica, os fungos são divididos em filamentosos (bolors ou fungos multicelulares) e leveduriformes (leveduras, levedos ou fungos unicelulares). Na análise macroscópica, as características das colônias como a pigmentação, bordas (regulares ou irregulares), aspecto, consistência (algodonosa, aveludada, pulverulenta, glabra, cêrea etc.), topografia e velocidade de crescimento são informações importantes para sua identificação e classificação (LACAZ et al., 2002; JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1998).

Os fungos podem ser hialinos ou demáceos sendo, os últimos, aqueles que apresentam grande concentração de melanina na sua parede celular produzindo um pigmento acastanhado que lhes confere resistência aos raios ultravioletas e enzimas produzidas por outros organismos. Por diferentes processos os fungos, através de seu metabolismo secundário, podem elaborar metabólitos como antibióticos, dos quais a penicilina é o mais conhecido, e micotoxinas como aflatoxinas e gliotoxina, que lhes conferem vantagens seletivas e virulência (LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Fungos são ubíquos, possuem ampla distribuição na natureza, podendo ser encontrados em vários habitats, como: ar, água, terra, animais e alimentos. Suas espécies sofrem em sua incidência variações conforme a localidade, estação do ano, grau higroscópico do ar, entre outras. O vento age como importante veículo de dispersão de seus propágulos e fragmentos de hifa. Os seres humanos são expostos continuamente a vários gêneros de fungos, o que permite a possibilidade de colonização. Dependendo da interação entre os mecanismos de defesa do hospedeiro e fatores de virulência de fungos, a colonização pode ser transitória ou persistente com risco para o desenvolvimento de doença (LACAZ et al., 1991; SIDRIM; MOREIRA, 1999; MENEZES et al., 2006; FLORES; ONOFRE, 2010; BOECHAT; RIOS, 2011).

2.2 FUNGOS PATOGÊNICOS

Reino Fungi, é um dos três maiores ramos evolutivos dos organismos. Diferentes dos demais Reinos, que ou integram seres pluricelulares ou unicelulares,

o Reino Fungi integra organismos unicelulares (leveduras) e pluricelulares (os fungos). Não possuem clorofila, por isso não fazem fotossíntese, dependendo de fontes externa de carbono orgânico para obter energia. São organismos eucariotos e possuem parede celular composta por polímeros de glucose e manose, lipídios, polifosfatos, íons orgânicos e proteínas (GOMPERTZ et al., 2015).

De acordo com Kirk et al. (2008), estima-se que o reino Fungi compreenda por volta de 1,5 milhão de espécies, mas, em relação ao total proposto, poucos foram catalogados, sendo que destes, alguns milhares estão associados com humanos, vivendo muitas vezes de forma comensal e sapróbia. Alguns fungos com capacidade de causar patogenicidade (micoses) ao homem como, diversas espécies de *Candida*, *Cryptococcus* e dermatófitos do gênero *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*, são agentes comumente causadores de micoses em hospedeiro imunocompetente ou imunocomprometido. Os agentes patogênicos podem ser de acometimento cutâneo, subcutâneo ou sistêmico, sendo este último o mais grave.

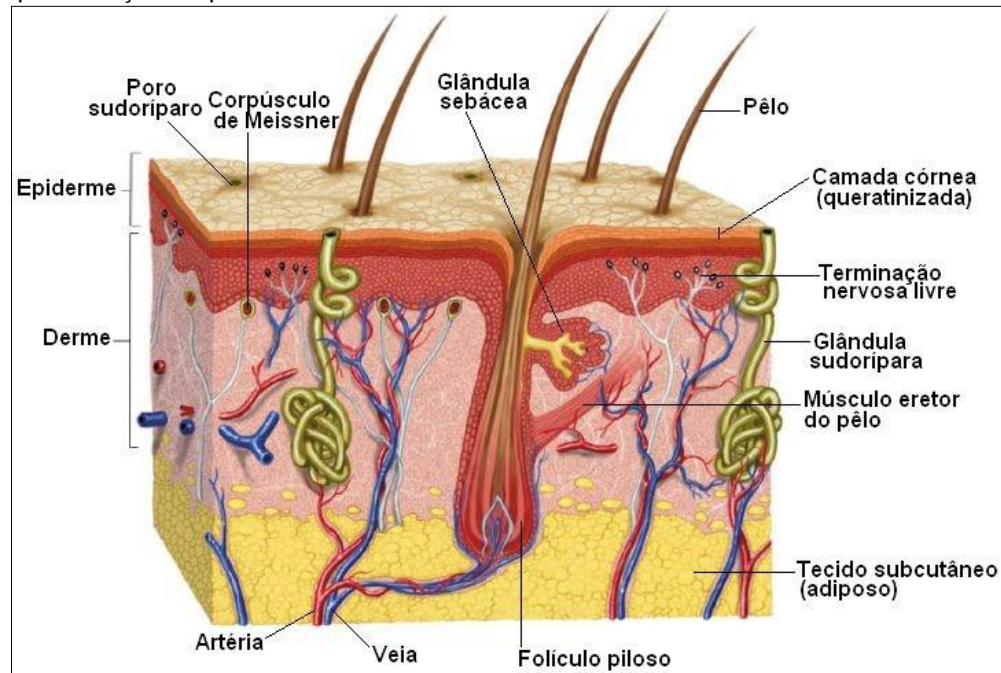
As infecções fúngicas ou micoses têm ampla distribuição geográfica, ou seja, sua distribuição estende-se por países desenvolvidos, nações em desenvolvimento e países subdesenvolvidos. Estima-se que mais de 40 milhões de pessoas apresentem quadros de infecções por fungos (GUNGOR; ERDAL & AKSU, 2013). No Brasil, um estudo de 5 anos examinou dermatofitoses em 137 crianças com menos de 12 anos de idade, que apresentavam sintomas característicos de *tinea*. Crianças do sexo masculino com idade entre 2-12 anos foram afetadas mais frequentemente. A *tinea capitis* (78 casos, 56,9 %), causada principalmente pelo fungo *Microsporum canis* (46 casos), foi a forma clínica mais comum, seguida de *tinea corporis* (43 casos, 31,3 %) causada principalmente por *T. rubrum* (17 casos) e *tinea cruris* (10 casos, 7,2 %) causada por *T. rubrum* (5 casos) (HAVLICKOVA; FRIEDRICH, 2008).

2.3 FUNGOS DERMATÓFITOS

Os dermatófitos são um grupo de fungos filamentosos que, através de longos processos evolutivos, se adaptaram para invadir, colonizar e nutrir-se nos tecidos ricos em queratina, isto é, pele, pêlos e unhas do homem e de uma grande variedade de animais. Esta característica os leva a designação de fungos queratinolíticos. Geralmente os dermatófitos restringem-se na camada epidérmica do hospedeiro onde há prevalência de queratina, onde, tal proteína, é utilizada como fonte de nutrição

pelos fungos dermatófitos. Os fungos que possuem capacidade de invadir e utilizar-se de tecidos queratinizados são do gênero *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* (SOBERA; ELEWSKI, 2008). A Figura 2 demonstra as camadas da pele, sendo elas epiderme, derme e hipoderme, sendo esta última a camada mais profunda.

Figura 2 - Representação da pele humana.



Fonte: maisquepele.wordpress.com.

A queratina é uma proteína produzida por humanos e animais, constituindo o revestimento de pele, pelos e unhas. Possui aspecto fibroso, de alto peso molecular, contendo grande quantidade de resíduos de cisteína, um aminoácido sulfurado, formando pontes dissulfeto (S-S) e ligações acetamídicas que conferem características especiais como alta estabilidade à sua estrutura tridimensional, elasticidade, impermeabilidade e resistência, evitando assim a perda de nutrientes e água (PERES et al., 2010).

A camada mais superficial, a epiderme, é a camada que possui como principal função proteger a pele contra ação de fatores do ambiente externo seja eles produtos químicos, radiações ou microrganismos. Apresenta o extrato córneo em sua superfície epitelial externa, sendo este uma camada de células mortas e queratinosas, funcionando como uma barreira física e eficaz contra micro-organismos capazes de causar patogenicidade, além de agir no controle da permeação de componentes pela

pele, sendo também considerada a principal barreira à permeação dos fármacos através dessa via (CHORILLI et al., 2007; GILL et al., 2009).

Vários autores demonstraram que estes fungos possuem enzimas como as queratinases, que lhes permitem digerir queratinas (WEARY; CANBT, 1986), uma classe de proteínas elaboradas por células epiteliais. Essas células formam o extrato córneo da epiderme e os anexos epidérmicos.

De acordo com Verma e Heffernan (2008), os dermatófitos podem ser classificados em três grandes grupos, sendo de acordo com o seu habitat em “geofílicos”, que são dermatófitos encontrados no solo, principalmente solos ricos em resíduos de queratina humana ou animal (pêlo, unhas, penas, escamas etc.) e apenas esporadicamente infectam o homem através do contato com os esporos do fungo, ocasionando lesões com sinais inflamatórios locais; “zoofílicos”, que são encontrados em animais, como cães, gatos, equinos e inclusive os domésticos, nos quais costumam produzir infecções subclínicas, podendo ser transmitidos ao homem esporadicamente, por contato com os pêlos infectados, ocasionando lesões com sinais inflamatórios, este, sendo necessário, ter passado por um ciclo evolutivo tendo abandonado o solo e de uma forma ou de outra, ter se adaptado a um tipo de parasitismo em espécies animais, que possuem um contato direto com o solo; ou “antropofílicos”, que são transmitidos de pessoa para pessoa por contato direto ou por fômites, e de acordo com a virulência do fungo e a susceptibilidade do indivíduo, podem produzir desde infecções assintomáticas até infecções com sinais inflamatórios locais intensos e duradouros.

Os autores Sobera e Elewski (2008) citam como fungos dermatófitos que apresentam maior associação à doença no homem o *Trichophyton mentagrophytes* (variante *mentagrophytes*), *Trichophyton mentagrophytes* (variante *interdigitale*), *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton violaceum*, *Microsporum canis*, *Microsporum ferrugineum*, *Microsporum gypseum* e *Epidermophyton floccosum*.

Embora os dermatófitos existam indiscutivelmente desde tempos pré-históricos e infectem animais inferiores por milhões de anos, a primeira referência registrada de uma infecção dermatofítica é atribuída a Aulus Cornelius Celsus, um enciclopedista romano versado em dietas, farmácia, cirurgia e campos correlatos, que em seu "De Re Medica" escrito por volta de 30 a.C, descreveu uma infecção supurativa do couro

cabeludo que veio a ser conhecida como o Kerion de Celsus (ROSENTHAL, 1961). Ao longo da Idade Média as várias dermatofitoses foram descritas como *tineas*.

O termo *Tinea* foi usado pela primeira vez para a fase larval da mariposa *Tineola bisselliella* (traça da roupa) e, de fato, o nome genérico das várias espécies de traças destruidoras de queratina é *Tinea*. Como os buracos feitos pelas traças em roupas de lã são circulares e as lesões dermatófitas são sinuosas na pele lisa, os ancestrais anglo-saxões cunharam a palavra "*Tinea*" para essas infecções pelo menos desde o século XVI (FEULARD, 1886).

2.3.1 Gênero *Trichophyton*

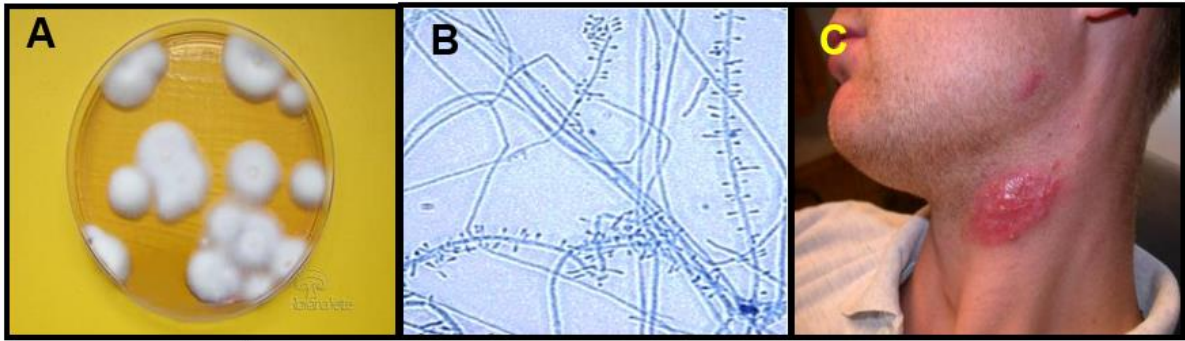
Devido a sua patogenicidade ao hospedeiro humano, os dermatófitos do gênero *Trichophyton* estão entre os grupos de fungos mais estudados no ramo da micologia médica, causando *tinea*, favus ou onicomicose.

O gênero *Trichophyton* é o mais prevalente em amostras clínicas, acometendo a pele glabra, cabelos e unha. Na análise microscópica, é possível observar numerosos microconídios (estrutura unicelular), que apresentam, de um modo geral, paredes finas e hialinas, piriformes, ovalada ou redonda e claviformes, podendo agrupar-se em cachos. Os macroconídios (estrutura pluricelular), quando presentes, são de aspecto claviforme alongado e apresenta septos. Em algumas espécies, os macronídios estão ausentes, como no *T. schoenleinii*. Quanto a sua ornamentação, algumas estruturas como hifa em raquete, hifa em espiral, órgãos pectinados e candelabros fávicos também são observados. No entanto, nem sempre a conjunção destas características é suficiente para a identificação destes grupos de dermatófitos, sendo necessário recorrer a outros métodos (NEUFELD, 1999; NEUFELD, 2010; SIDRIM; ROCHA, 2004; SCHOLZ; MEINHOLF, 1991).

Os representantes isolados com mais frequência são o *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *T. tonsurans* (SCHOLZ; MEINHOLF, 1991).

A espécie antropofílica cosmopolita *T. rubrum* é a mais prevalente em diversos estudos epidemiológicos de dermatofitoses humana. Clinicamente é responsável por quase todos os tipos de infecção dermatofítica humana, sendo muitas vezes correlacionado com o fato de ser refratário ao tratamento. (FURTADO et al., 1987; BRILHANTE et al., 2000; COSTA et al., 2002; REZENDE et al., 2009). A Figura 3 demonstra os aspectos macroscópicos, microscópicos e a lesão por *T. rubrum*.

Figura 3 - Macromorfologia, micromorfologia e lesão por *T. rubrum*.



Fonte: Acervo pessoal do Prof. Dr. Armando Marsden, laboratório de Micologia Médica-UFPE.

A) Colônia em ágar Sabouraud evidenciando o dermatófito *Trichophyton rubrum*. (B) Microscopia evidenciando microconídios regulares e piriformes de *T. rubrum*. (C) *Tinea barbae* por *T. rubrum*.

Em torno da espécie *Trichophyton mentagrophytes*, existe um complexo onde alguns autores demonstram que a mesma possui entre duas a quatro variedades. Com isso, é demonstrado que o *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes* é zoofílica, enquanto *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* é antropofílica por excelência (SIDRIM; MOREIRA, 1999; LACAZ et al, 2002).

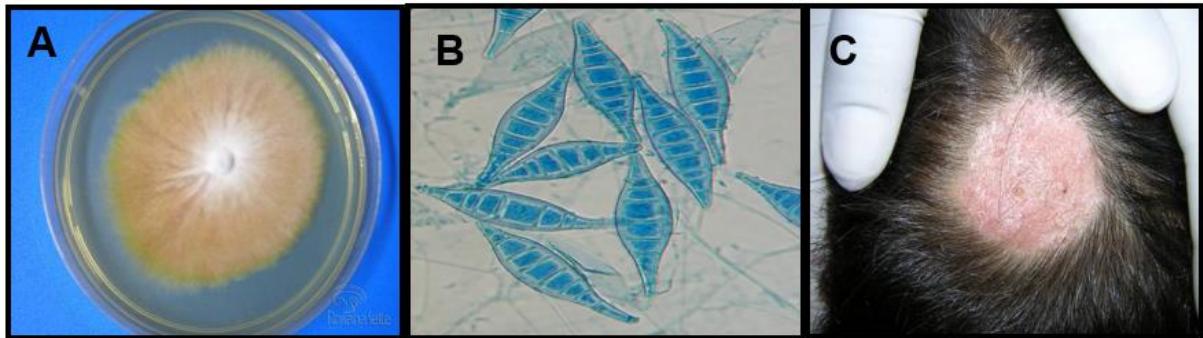
2.3.2 Gênero *Microsporum*

O gênero *Microsporum* envolve muitas espécies em processos infecciosos em humanos e animais, sendo as espécies mais comumente isoladas o *M. audouinii*, *M. ferrugineum*, *M. manum*, *M. canis* e *M. gypseum*, sendo estes dois últimos os mais isolados em micoses humanas. As colônias apresentam aspecto algodinoso e pulverulento, com coloração que varia de branca a amarela, podendo apresentar ainda cor castanho. Em análise microscópica é evidenciado hifas hialinas, ramificadas e septadas, com macroconídios multicelulares multisseptados fusiformes de parede espessa. Já os microconídios são estruturas claviformes produzidas ao longo do micélio, podendo proliferar diretamente da hifa ou do conidióforo (NEUFELD, 1999; SIDRIM; ROCHA, 2004).

A espécie *Microsporum canis* é um fungo zoofílico transmitido ao homem por diversos animais domésticos, sendo o principal reservatório os felinos jovens assintomáticos. Clinicamente é responsável por causar lesões de couro cabeludo, chamadas *tinea capitis*, atingindo com frequência crianças com faixa de idade escolar causando placas de alopecia fluorescentes pela lâmpada de Wood. As colônias apresentam aspecto algodinoso de coloração amarelo-limão no reverso e branca no

verso, com período de maturação entre 6 a 10 dias. Na microscopia, apresentam macroconídios fusiformes de parede espessa com numerosas septações que podem variar de 5 a 7 (LACAZ et al, 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004). A Figura 4 demonstra os aspectos macroscópicos, microscópicos e a lesão por *M. canis*.

Figura 4 - Macromorfologia, micromorfologia e lesão por *M. canis*.



Fonte: Acervo pessoal do Prof. Dr. Armando Marsden, laboratório de Micologia Médica-UFPE.

(A) Colônia em ágar Sabouraud evidenciando o dermatófito *Microsporum canis*. (B) Microscopia evidenciando macroconídios fusiformes de parede espessa com numerosas septações. (C) *Tinea capitis* por *M. canis*.

O *Microsporum gypseum* é uma espécie geofílica que infecta o homem e animais que tiverem contato com solo contaminado, e por esta razão é frequentemente relatado seu isolamento a partir do solo (GUGNANI; SHARMA; WRIGHT, 2014; LEAL, 2010).

O *M. gypseum* foi descoberto pela primeira vez por Sabouraud em 1894, mas na época era simplesmente chamado de "*Trichophyton du chien*" (*Trichophyton* do cachorro). Foi primeiramente estudado e descrito por Bodin em 1907, que, seguindo um sistema de classificação baseado principalmente em critérios clínicos, colocou-o gênero *Achorion* como *A. gypseum*. Nos anos subsequentes, este parasita foi reisolado por outros autores, que, não conseguindo relacionar os seus isolados com os de Bodin, deram-lhe novos nomes. A sinonímia foi ainda mais prolongada por aqueles que fizeram improvisações taxonômicas insustentáveis. Somente em 1928 o fungo de Bodin foi corretamente colocado no gênero *Microsporum* por Guiart e Grigorakis (SABOURAUD, 1894; BODIN, 1907; GUIART; GRIGORARTS, 1928). A Figura 5 representa a sinonímia utilizada no decorrer dos anos para o *M. gypseum*.

Figura 5 - Sinonímia do *M. gypseum*.

Microsporum gypseum (Bodin) Guiart and Grigorakis 1928.
Trichophyton du chien Sabouraud 1894.
Achorion gypseum Bodin 1907.
M. fulvum Sabouraud (Uriburu) 1909.
M. flavescens Horta 1912.
A. serisei Cazalbou 1903.
M. scorteum Priestly 1914.
M. marginatum Cazalbou 1914.
M. xanthodes Fischer 1918.
Sabouraudites gypseum Ota and Langeron 1923.
S. fluvus Ota and Langeron 1923.
S. flavescens Ota and Langeron 1923.
S. xanthodes Ota and Langeron 1923.
Closterospora gypsea Grigorakis 1923.
C. fulva Grigorakis 1925.
Gymnoascus gypseus Nannizzi 1927.
Microsporum sp. Nakamura 1931.
Ectotrichophyton nakamurae Dodge 1935.

Fonte: Ajello, 1953.

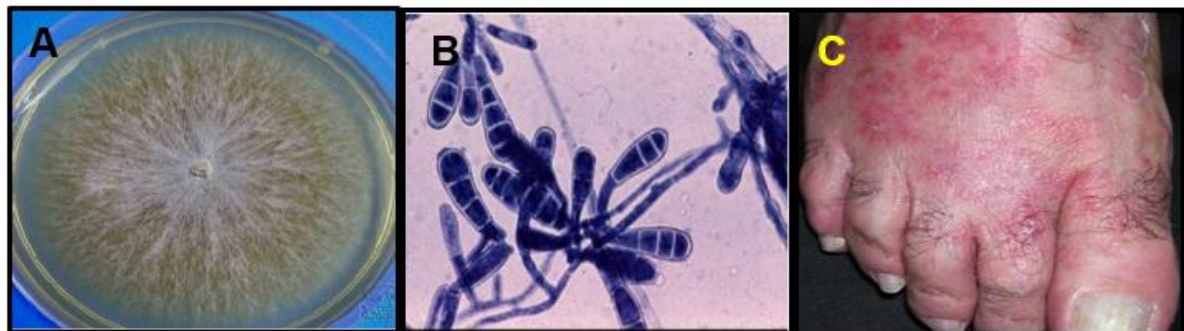
Geralmente, este dermatófito atinge partes descobertas do corpo, podendo, em raras ocasiões, parasitar o couro cabeludo, sendo esta espécie não observável fluorescência na análise com lâmpada de Wood. As colônias apresentam superfície plana de bordas irregulares e de aspecto pulverulento, que se assemelha a areia de praia. A coloração da colônia pode variar do alaranjado ao amarelo acastanhado. Na microscopia é possível a visualização de macroconídios simétricos que apresentam de 3 a 7 septos de parede fina com as extremidades arredondadas (LACAZ et al, 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

2.3.3 Gênero *Epidermophyton*

O gênero *Epidermophyton* é composto por duas espécies, *E. stockdaleae* e o *E. floccosum*, entretanto, apenas esta última espécie é patogênica ao homem. O *E. floccosum* é antropofílico por excelência e patógeno exclusivo da pele glabra. Em raras ocasiões acomete regiões interdigitoplantares e as unhas, mas nunca atinge o cabelo (AJELLO, 1974).

O gênero *Epidermophyton* apresenta colônias com crescimento de sete a dez dias, com aspecto pulverulento que inicialmente possui a coloração branca modificando para cor amarelo esverdeado ou amarronzado apresentando reverso de coloração que varia do acastanhado para o alaranjado. Na análise microscópica, é observado hifas septadas com a presença de abundantes macroconídios multicelulares de parede fina, com dois a cinco septos e agrupados em cacho. Colônias mais velhas podem apresentar clamidioconídios intercalares, distais e em cadeias (LACAZ et al, 2002; SIDRIM; MOREIRA, 1999; PEPIN; AUSTWICK, 1968). Seu aspecto micromorfológico não deixa dúvidas para a sua diferenciação de outros dermatófitos, no entanto, a pigmentação produzida por algumas cepas podem, macroscopicamente, ser confundida com *T. rubrum*. A Figura 6 demonstra os aspectos macroscópicos, microscópicos e a lesão por *E. floccosum*.

Figura 6 - Macromorfologia, micromorfologia e lesão por *E. floccosum*.



Fonte: Acervo pessoal do Prof. Dr. Armando Marsden, laboratório de Micologia Médica-UFPE.

(A) Colônia em ágar Sabouraud evidenciando o dermatófito *Epidermophyton floccosum*. (B) Microscopia evidenciando macroconídios septados com parede fina e agrupados em cacho. (C) *Tinea pedis* por *E. floccosum*.

2.3.4 Tratamento das dermatofitoses

A escolha do tratamento indicado é determinado pelo sítio anatômico acometido, extensão da infecção e pela espécie dermatofítica envolvida. A medicação pode ser de uso sistêmico ou tópico. Antifúngicos de uso tópico podem ser utilizados como apoio à terapêutica oral ou a profilaxia. As medicações de uso tópico mais utilizadas são o cetoconazol, miconazol, isoconazol, clotrimazol, tioconazol, butenafina, e ciclopirox olamina. O ciclopirox olamina é popular na prática clínica para o tratamento tópico de onicomicoses. Já a terapia sistêmica é indicada para lesões de grandes extensões ou generalizadas, de caráter crônico, recorrentes ou quando não há resposta apenas com a terapia tópica. O tratamento sistêmico oral é realizado

principalmente com uso de terbinafina, griseofulvina e derivados azólicos como cetoconazol e fluconazol (Figura 8) (PIRES et al., 2014).

Ciclopirox olamina: mostrou-se eficiente em estudos realizados para tratamento de dermatofitoses com cremes e géis. Possui ação quelante de íons divalentes e trivalentes necessários para as atividades enzimáticas e da cadeia respiratória das células fúngicas. Inibe a síntese da parede celular (deficiência na captação de aminoácidos e nutrientes) biossíntese de proteínas, RNA e DNA. Possui ação fungicida de amplo espectro, de uso tópico, com alto poder de penetração, mostrando-se eficiente em estudos realizados para tratamento de onicomicoses por dermatófitos e leveduras (TAUBER; MULLER, 2014).

Terbinafina: apresenta eficácia contra espécies do gênero *Trichophyton*, sendo recomendado para lesões que não apresentem uma grande extensão (MCCLELLAN; WISEMAN; MARKHAM, 1999). O tempo de tratamento com terbinafina é reduzido, se comparado a outros antifúngicos comercialmente disponíveis (GUPTA; DRUMMOND, 2013). Seu mecanismo de ação age como inibidor da esqualeno epoxidase, impedindo a formação do lanosterol (precursor do ergosterol). Dependendo da micose, o tratamento pode durar cerca de 12 semanas com doses de 250 mg/dia.

Butenafina: possui atividade fungicida primária contra dermatófitos, tais como *T. mentagrophytes*, *M. canis* e *T. rubrum*. Relata-se que é eficaz mais especificamente no tratamento de *tinea pedis*, *tinea cruris* e *tinea corporis* (MITRA et al., 2016; GUPTA; CHAUDHRY; ELEWSKI, 2003).

Griseofulvina: possui ação fungistática inibindo a mitose dos fungos através de sua ligação a tubulina (proteína que compõe os microtúbulos celulares) rompendo o fuso mitótico. Distribui-se largamente por tecidos que possuem queratina. Caracteriza-se como um dos primeiros antifúngicos de escolha para a terapêutica das *tineas* e apresenta uma maior aplicabilidade para o tratamento das dermatofitoses ocasionadas por espécies do gênero *Microsporum*, especialmente *M. canis*. A posologia do tratamento pode variar de acordo com a micose, podendo ser utilizado doses de 500 mg/dia de griseofulvina ou 250 mg de 12/12 h (CHADEGANIPOUR; NILIPOUR; HAVAEI, 2007).

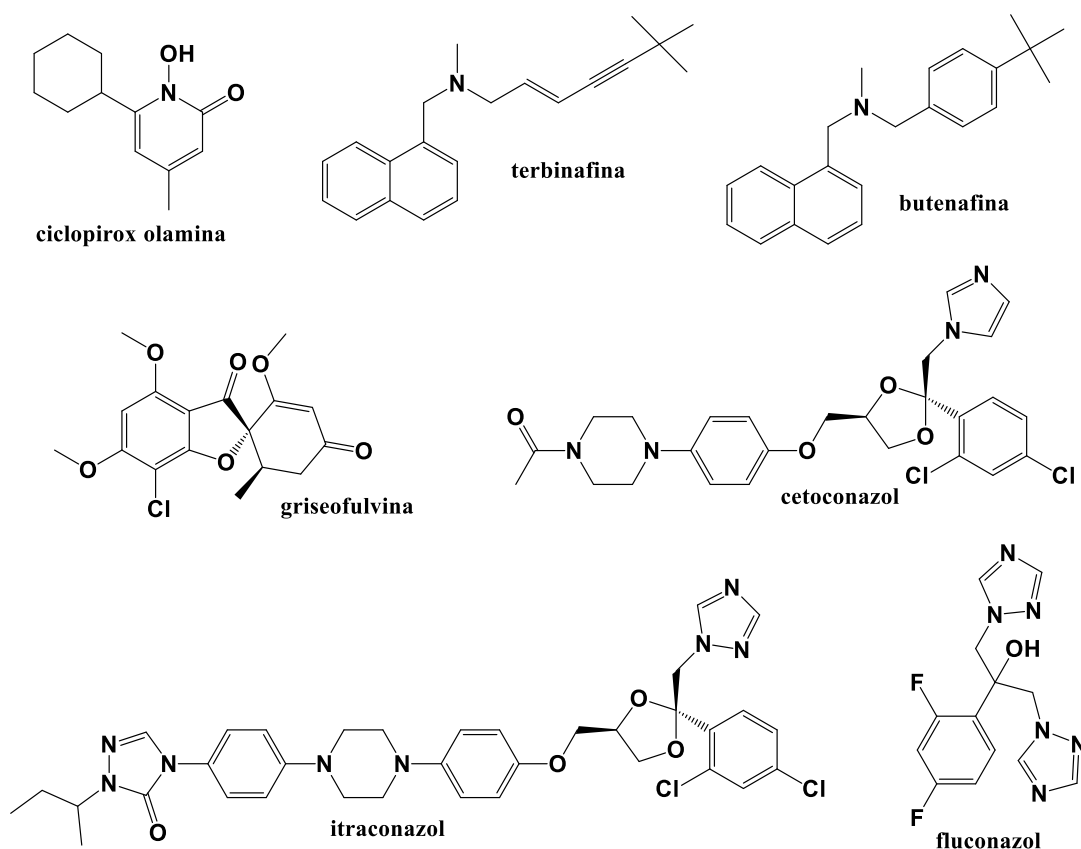
Cetoconazol: age inibindo a síntese de ergosterol da parede celular fúngica, alterando sua permeabilidade, ocasionando a perda de elementos intracelulares. É eficaz no tratamento da histoplasmose, blastomicose, coccidioidomicose, paracoccidioidomicose, pitíriase versicolor, candidíase mucocutânea crônica, oral e

esofagiana, vulvovaginite por leveduras do gênero *Candida* e infecções dermatofíticas cutânea. Estudos demonstram que o creme de cetoconazol a 2 % tem sido eficaz no tratamento de *tinea pedis*, *tinea cruris* e *tinea corporis*, atuando em infecções pelas espécies dos três gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* (SHAO; HUANG; HSUEH, 2007).

Fluconazol: possui ação semelhante ao cetoconazol. É uma opção na terapêutica da *tinea capitis* em crianças. Constitui-se como o menos eficaz na prática clínica, apesar de ser um dos antifúngicos mais utilizados para tratamento sistêmico das dermatofitoses (PIRES et al., 2014).

Itraconazol: possui atividade fungicida de amplo espectro para fungos do gênero *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Sporothrix* e fungos dermatófitos. Sua ação se dá através da inibição da síntese de ergosterol celular. Para lesões de pele, o tratamento costuma durar em torno de 4 semana e nas onicomicoses 3 meses (PIRES et al., 2014).

Figura 7 - Estruturas químicas de antifúngicos utilizados para tratamento das dermatomicoses.



Fonte: autor.

2.4 CANDIDÍASE

Algumas espécies do gênero *Candida* estão taxonomicamente inseridas no Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe *Saccharomycetes*, Ordem *Saccharomycetales* e Família *Saccharomycetaceae*. São microrganismos eucariontes, possui forma ovóide ou esférica, de reprodução assexuada por brotamento ou gemulação, dando origem a células denominadas blastoconídios ou blastosporos, ou de forma sexuada com produção de ascosporos (GIOLO et al., 2010). É um fungo polimórfico e diploide que está presente em humanos como micro-organismo comensal, em situações de homeostase, mas pode promover o desenvolvimento de várias doenças a nível superficial e sistêmico (DE ROSSI et al., 2011).

O gênero *Candida* têm habilidade de modificar sua forma de levedura para filamentosa (hifa ou pseudohifa) e pode crescer à temperatura de 37°C. Tem como característica a visualização microscópica a pseudohifa ou pseudomicélio, que é uma célula alongada, possuindo constrições entre os sítios septais assemelhando-se à levedura, pois, após o brotamento as células não se separam. Já a hifa verdadeira é uma célula longa sem constrições, possuindo um citoplasma cercado por uma parede celular rígida.

Esse gênero é composto por aproximadamente duzentas espécies diferentes, mas apenas cerca de vinte estão associadas a micoses oportunistas em humanos. As espécies de interesse clínico são: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. lusitaniae* (ALVARES et al., 2007; COLOMBO et al., 2012; COLOMBO et al., 2013). No entanto, foram relatados casos de infecções invasivas por outras espécies de *Candida* não-*albicans*. Dentre estas *C. dubliniensis*, *C. kefyr*, *C. rugosa*, *C. famata*, *C. utilis*, *C. lipolytica*, *C. norvegensis* e *C. 34nconspícua* (COLEMAN et al., 1998; COLOMBO et al., 2013).

As infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* são denominadas candidíase ou candidose. As micoses causadas por esses fungos mostram um amplo espectro de apresentações clínicas, podendo ser classificadas desde superficiais, com acometimento cutâneo e mucoso, até infecções profundas, disseminadas, de alta gravidade, como é o caso da candidemia. Apresenta inicialmente como infecção fúngica superficial, e em sítios anatômicos específicos como orofaringe, vagina, vulva, glânde e mucosa oral, podendo ser aguda ou crônica, localizada ou disseminada, assintomática ou com sintomas graves (LIMA et al., 2006).

O gênero *Candida*, entre os fungos de interesse médico, é o que possui maior importância, devido à sua alta ocorrência em infectar o hospedeiro humano. Em relação aos pacientes imunocomprometidos, esse valor chega aos 60 % (STOOPLER; SOLLECITO, 2014). Considerados comensais, esses microrganismos se tornam patogênicos quando ocorrem mudanças na homeostase do indivíduo, seja por procedimentos médicos invasivos, uso de medicações ou doenças adjacentes (CATE et al., 2009; COLOMBO et al., 2013).

De acordo com Lacaz et al. (2002), candidíase ou candidoses são infecções provocadas por leveduras pertencentes ao gênero *Candida*. As manifestações clínicas das candidíases são extremamente variadas podendo atingir desde a superfície cutânea ou até mesmo acometimento sistêmico, causando endocardite, meningite e septicemia (LACAZ et al, 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Numerosos são os fatores que contribuem para as infecções por *Candida* spp., dentre os quais podemos citar: o rompimento das barreiras cutânea e mucosa, disfunção dos neutrófilos, desordem metabólica, disfunção na imunidade mediada por células, exposição direta aos fungos, idade (recém-nascidos e idosos), desnutrição, utilização de antibióticos por longos períodos, quimioterapia, transplantes, resistência a antifúngicos, dentre outros (PFALLER; DIEKEMA, 2007). Ao término do século XX, devido a prevalência das infecções oportunistas em pacientes portadores do vírus HIV e outros estados de imunocomprometimento, as candidíases emergiram como um problema médico importante. (GROLL, 1998; SIDRIM; ROCHA, 2004).

A candidíase oral foi descrita como doença oportunista no primeiro caso de SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida) publicado, e até o momento constitui a infecção fúngica mais frequente em pacientes portadores do vírus HIV (LUPETTI et al., 1995). Estima-se que até 90 % dos indivíduos acometidos pelo vírus HIV sofrerão pelo menos um episódio de candidíase orofaríngea (SÁNCHEZ-VARGAS et al, 2002; URIZAR, 2002).

Infecções de pele e mucosas por *Candida* spp. podem ser demonstradas em pacientes saudáveis, sem apresentar nenhum quadro clínico desfavorável, entretanto, podem manifestar pequenas alterações locais de resposta do hospedeiro no sítio da infecção (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003). A Figura 9 demonstra os aspectos macroscópicos, microscópicos e a lesão por *Candida* spp.

Figura 8 - Macromorfologia, micromorfologia e lesão por *Candida* spp.



Fonte: Acervo pessoal do Prof. Dr. Armando Marsden laboratório de Micologia Médica-UFPE.

(A) Colônia em ágar Sabouraud evidenciando a levedura *Candida* spp. (B) Microscopia evidenciando células isoladas e pseudomicélio característicos de *Candida* spp. (C) Lesão característica de candidíase intertriginosa.

A candidemia é observada especialmente em pacientes hospitalizados submetidos a terapias antimicrobianas por longos períodos, terapias imunossupressivas, nutrição parenteral e procedimentos invasivos (SIDRIM; ROCHA, 2004). A fungemia por *Candida* spp. constitui-se um grande problema de saúde pública, pois geralmente seu diagnóstico é difícil, além do alto custo de tratamento, refletindo em altas taxas de mortalidade (COLOMBO et al., 2006).

As leveduras do gênero *Candida* são as causas mais comuns de infecções fúngicas e a sua incidência vem aumentando substancialmente nas últimas duas décadas. São responsáveis por até 17 % de todas as infecções adquiridas em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e estão associadas a uma tendência crescente e alarmante de aumento na taxa de mortalidade. Esse aumento é explicado parcialmente devido a exposição de pacientes internados em UTI, principalmente aqueles que fizeram procedimentos como cirurgia abdominal, hemodiálise, nutrição parenteral e cateter urinário (LORTHOLARY et al., 2014).

Como resultado de tratamentos utilizados para doenças como câncer, HIV/SIDA e transplantes de órgãos, algumas doenças não são mais uma ameaça a se considerar e a expectativa de vida foi prolongada nesses pacientes. No entanto, isso refletiu em um aumento de algumas infecções oportunistas, como as de etiologia fúngica. Nos EUA (Estados Unidos da América), está entre os cinco principais patógenos que causam infecções nosocomiais da corrente sanguínea. Estudos de vigilância populacional relatam a incidência anual de infecções nosocomiais por *Candida* spp. em 8/100.000 habitantes (PFALLER; DIEKEMA, 2007).

Em estudos mundiais, a espécie que se destaca como frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas em diferentes sítios anatômicos é a *Candida albicans*. Essa levedura exibe patogenicidade e fatores de virulência, incluindo a capacidade de aderência a epitélios e mucosas. A incidência de candidemia em hospitais públicos de alta complexidade no Brasil é de aproximadamente 2,5 casos por mil admissões hospitalares, índice considerado duas a dez vezes maior que os registrados em hospitais europeus e americanos. Um estudo realizado na Inglaterra, País de Gales e Irlanda do Norte demonstrou que as taxas de candidemia foram maiores em homens do que mulheres na maioria das faixas etárias, particularmente em idosos com mais de 75 anos. Apesar de infecções bacterianas constituírem a causa mais comum de doença infecciosa em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), as infecções fúngicas, principalmente candidemias, representam um problema preocupante de infecção hospitalar. Neste sentido, a incidência de candidemia, que varia de 2 a 6,7 por 1.000 admissões hospitalares, é de 5 a 10 vezes maior na UTI do que em enfermarias de clínica médica ou cirúrgica (HILLER et al., 2011).

2.4.1 Tratamento das Candidíases

Em 2010, o Ministério da Saúde indicava para tratamento de candidíase os seguintes antifúngicos para infecções de pele e mucosa: isoconazol (nitrato) como primeira escolha e tioconazol como segunda escolha. Outros antifúngicos também são eficazes: clotrimazol, miconazol, terconazol, itraconazol, fluconazol e nistatina. (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

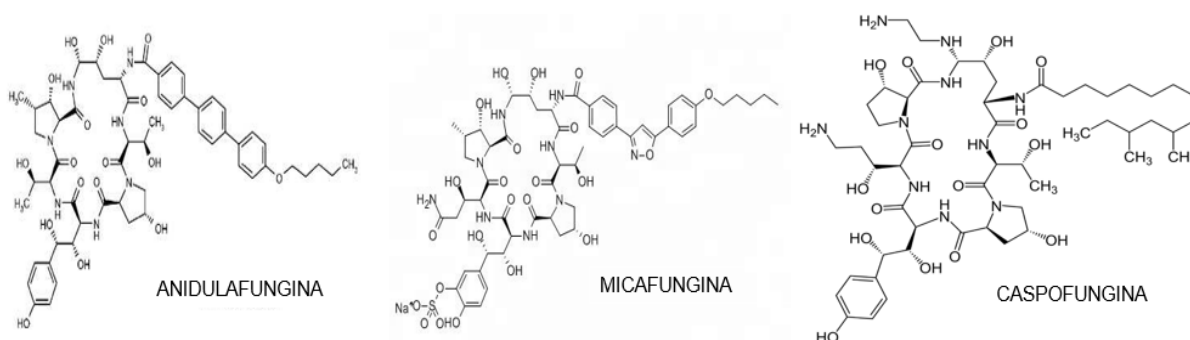
No que se refere ao tratamento das candidemias, alguns fatores devem ser levados em conta como a necessidade da administração de antifúngicos de caráter imediato e adequado, pois apenas a retirada do fator predisponente como um cateter, não é suficiente para remissão da complicação, tornando-se uma terapêutica insuficiente (PAPPAS et al., 2016). Estudos tem demonstrado que a demora na terapêutica eficiente favorece a mortalidade de paciente com candidemia (NUCCI et al., 1998; SILVA, 2017).

Dentre os antifúngicos comercialmente disponíveis, os mais utilizados para o tratamento das candidemias são as da classe das equinocandinas (caspofungina, anidulafungina e micafungina) e da classe dos triazólicos o fluconazol. A anfotericina

B pode ser utilizada, mas sua indicação é mais restrita devido à sua toxicidade (GAFTER-GVILI et al., 2008; SILVA, 2017).

Em pacientes não neutropênicos, mas com candidemia, a terapêutica inicial sugerida é o uso de equinocandinas. Quando o paciente apresentar sinais clínicos estáveis, que não tenha tido previamente exposição ao azol e que não esteja infectado com espécies resistentes como *C. krusei* ou *C. glabrata*, o fluconazol poderá ser utilizado para terapêutica com antifúngico alternativo. A anfotericina B em formulação lipídica pode ser utilizada em casos de resistência ou intolerância aos antifúngicos supracitados, porém, apresenta maior toxicidade, o que reflete em um espectro reduzido de utilização em pacientes, como por exemplo aqueles que possuem problemas renais (PAPPAS et al., 2016; SILVA, 2017). A Figura 10 demonstra a estrutura química das equinocandinas anidulafungina, caspofungina e micafungina.

Figura 9 - Estrutura química da Anidulafungina, Micafungina e Caspofungina.



Fonte: ChemSpider®.

A Tabela 1 demonstra os principais antifúngicos existentes no mercado com suas respectivas informações como dosagens, distribuição e reações adversas mais comumente observadas (LIMA-NETO et al., 2014; SILVA, 2017).

Tabela 1 - Agentes antifúngicos comumente utilizados frente a *Candida* spp.

ANTIFÚNGICO	DOSAGEM	DISTRIBUIÇÃO	REAÇÕES ADVERSAS
Anfotericina B Lipossomal	IV: 3-5 mg/kg/dia	Metabolismo renal. Ampla biodisponibilidade. Concentrações elevadas em pulmões, fígado e baço. Baixa concentração em SNC.	Transtornos cardiovasculares, hepáticos e respiratórios.
Desoxicolato	IV: 0,5 a 0,7 mg/kg/dia		Nefrotoxicidade, febre e calafrios
Cetoconazol	Oral: 200-400 mg / dia Tópico: a cada 12h por 2-4 semanas.	Metabolismo hepático. Ampla biodisponibilidade	Hepatotoxicidade, prejuízo gastrointestinal e irritação tópica.

Fluconazol	<i>Superficial</i> Oral: 50-150mg / dia <i>Invasivo</i> Oral: 400-800 mg / dia <i>Profilaxia</i> 100-200mg em dose única um dia antes de procedimentos cirúrgicos.	Depuração urinária. Ampla biodisponibilidade. Concentrações elevadas no SNC e humor aquoso.	Náuseas, vômitos e aumento transitório de transaminases.
Itraconazol	Oral: 100-400mg / dia IV: 200mg a cada 12h	Metabolismo hepático. Ampla biodisponibilidade. Baixas concentrações na saliva e urina.	Náuseas, vômitos e aumento de transaminases.
Voriconazol	Oral: 200mg a cada 12h IV: 3-6mg / kg a cada 12h	Metabolismo hepático. Ampla biodisponibilidade. Concentrações elevadas no SNC e no fígado.	Perturbações visuais transitórias, aumento transitório de transaminases e fotossensibilidade.
Caspofungina	IV: 35-70 mg / dia	Ampla biodisponibilidade. Baixas concentrações no SNC e urina.	Febre, calafrios, erupção cutânea, cefaleias, anemia, hipocalemia, tromboflebite, hipotensão, aumento de transaminases e prejuízo gastrointestinal.
Anidulafungina	Esofágico IV: 100 mg para o primeiro Dia, depois 50 mg / dia Invasivo IV: 200 mg para a primeira Dia, depois 100 mg / dia	Ampla Biodisponibilidade. Baixas concentrações No SNC e urina.	Sem reações adversas.
Micafungina	<i>Esofágico</i> IV: 150 mg / dia <i>Invasivo</i> IV: 100 mg / dia <i>Profilaxia</i> IV: 50 mg / dia	Ampla biodisponibilidade. Baixas concentrações no SNC e urina.	Febre, dor de cabeça, hipocalemia, hipomagnesemia, Neutropenia e prejuízo gastrointestinal.

Fonte: Lima-Neto et al., 2014; SILVA, 2017.

2.5 CRIPTOCOCOSE

Criptococose é uma doença fúngica causada por espécies do gênero *Cryptococcus*. São um grupo de leveduras encapsuladas pertencentes a classe *Basidiomycetes*, família *Filobasidiaceae*, gênero *Filobasidiella*. Distribuídos mundialmente, existem mais de 50 espécies pertencentes ao gênero *Cryptococcus*. No entanto, apenas *Cryptococcus neoformans* (que inclui *C. neoformans* var. *grubii* e var. *neoformans*) e *Cryptococcus gattii* (anteriormente conhecido como *C. neoformans* var. *gattii*) são patógenos humanos bem conhecidos. Em relação a outras espécies, houve poucos relatos de doença humana, como *Cryptococcus albidus* e *Cryptococcus laurentii*, especialmente em hospedeiros imunocomprometidos (HARRIS;

LOCKHART; DEBESS, 2011; BANERJEE; HAIDER; TREHAN, 2013; ZHAO et al., 2019).

A infecção por *Cryptococcus neoformans* é geralmente adquirida pela inalação de basidiosporos encontrados na madeira em decomposição e no solo contaminado com excretas de aves. A infecção pulmonar primária é a mais forma comum de criptococose. Disseminação secundária mais frequentemente resulta em infecção do sistema nervoso central (BADDLEY; FORREST, 2013).

As espécies de *Cryptococcus* causam infecções em indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos. A maioria das infecções graves, no entanto, ocorre em indivíduos com imunidade comprometida, como na AIDS e pacientes que passaram por transplante de órgãos. O *C. neoformans* causa a maioria das infecções em hospedeiros imunocomprometidos, enquanto a maioria das infecções por *C. gattii* foi relatada em hospedeiros imunocompetentes (BRIZENDINE; BADDLEY; PAPPAS, 2013; ZHAO et al., 2019).

A transmissão de *Cryptococcus* sp. ocorre por inalação dos blastoconídios da fase filamentosa do fungo presentes em uma fonte ambiental, como excrementos de aves ou solo. Após a inalação, o fungo pode permanecer alojado nos pulmões ou SNC por via hematogênica. A transmissão entre humanos ainda não foi relatada, no entanto, casos de infecção por tecidos transplantados já foram descritos na literatura (BEYT; WALTMAN, 1978; TARAI et al., 2010; ISLAM; DAS; ISLAM, 2010; ALSPAUGH, 2015).

2.5.1 Tratamento da Criptococose

O crescente número de casos de criptococose está associado não só à alta exposição de indivíduos imunodeprimidos às fontes de contaminação, mas também pela precariedade do diagnóstico e prognóstico da doença. Em muitos países a criptococose ainda não se insere entre as doenças de notificação obrigatória e não apresenta diagnóstico adequado, visto que, muitas vezes a sintomatologia é confundida com outras infecções, como por exemplo, meningite bacteriana e outras infecções pulmonares. A ausência de tratamento gera mortalidade de 100 % em pacientes com meningite criptocócica em um curto período (TSENG et al., 2015).

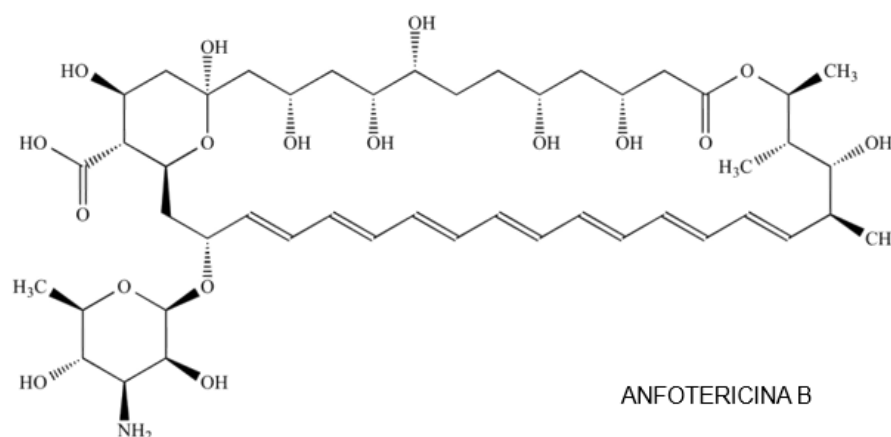
O tratamento da criptococose é iniciado com uma terapia de ataque, por um período de duas a quatro semanas, sendo composta por anfotericina B (0,7 - 1,0

mg/Kg/dia) e 5-fluocitosina (100 mg/Kg/dia). Contudo, no Brasil, não há comercialização da fluocitosina (PERFECT et al., 2010; GULLO et al., 2013; LOYSE et al., 2013; TSENG et al., 2015).

O tratamento com este antifúngico quase sempre resulta em algum grau de disfunção renal, dependendo quadro clínico do paciente. Mora-Duarte et al. (2002) demonstrou em seu estudo que 24 % dos pacientes tratados com anfotericina B (0,6-1,0 mg/Kg/dia) apresentaram nefrotoxicidade comprovada por exames laboratoriais.

Um estudo utilizando células renais de ratos conduzido por Varlam et al. (2001), sugeriu que a anfotericina B induzia apoptose das células tubulares renais e células intersticiais em taxas diretamente proporcionais a sua concentração. Observou-se 90 % de apoptose e necrose com a concentração máxima utilizada de 5,0 mg/mL, reduzindo-se as lesões à medida que esta era proporcionalmente diminuída. Estudos subsequentes demonstraram que o efeito tóxico foi máximo nos túbulos renais com hipocalemia, hipostenúria e diminuição da capacidade de excretar ácidos, adicionalmente foram comprometidos devido a diminuição da depuração da creatinina (MORA-DUARTE et al., 2002; FILIPPIN; SOUZA, 2006). A Figura 12 demonstra a estrutura química do antifúngico anfotericina B.

Figura 10 - Estrutura química da Anfotericina B.



Fonte: ChemSpider®.

Após o período do tratamento de ataque, é utilizado antifúngicos da classe dos azóis, o fluconazol (400-800 mg/dia) por um período de oito semanas. Posteriormente, é inicializado terapia com fluconazol em doses menores (200 – 400 mg/dia) por um período de seis a doze meses. Caso a infecção seja pulmonar, é comum substituir o fluconazol por itraconazol, pois ele não é indicado para tratamento de infecções no

SNC, pois devido a sua polaridade não ultrapassa a barreira hematoencefálica (BHE). No que se refere a alternativa para o fluconazol em casos de meningite, a escolha é o voriconazol (PERFECT et al., 2010; GULLO et al., 2013; LOYSE et al., 2013; TSENG et al., 2015).

2.6 ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS

A utilização indiscriminada de antifúngicos, principalmente em países subdesenvolvidos e que não possuem políticas de controle de liberação e distribuição de medicamentos, ocasiona a ocorrência de cepas resistentes às drogas comercialmente disponíveis. Estudos tem demonstrado uma elevada incidência de infecções por leveduras do gênero *Candida* que adquiriram resistência aos fármacos comercialmente disponíveis, principalmente os derivados azólicos (SAHU et al., 2013; SRINIVASAN et al., 2014; VIEIRA, 2017).

As infecções por espécies de *Candida* têm ocasionado inúmeras complicações nas duas últimas décadas, não somente pelo aumento da incidência de infecções invasivas, mas também pelo limitado número de fármacos antifúngicos comercialmente disponíveis para tratamentos contínuos e com baixa toxicidade (ANTINORI et al., 2016).

Um estudo desenvolvido por Fuentefria et al. (2016), utilizando 114 cepas de leveduras do gênero *Candida* mostrou que um total de 22 % dos isolados possuem resistência ao Fluconazol, 47 % apresentaram resistência ao itraconazol, 16 % ao miconazol e 11 % ao cetoconazol. A maior parte da resistência foi observada nos isolados de *C. tropicalis*, seguido de *C. glabrata* e *C. albicans*. Embora seja raro a ocorrência de resistência de *Cryptococcus* sp. e dermatófitos, tem sido descrito na literatura, nos últimos anos, mutações no gene ERG11, ocasionando alterações estruturais na enzima lanosterol 14- α desmetilase e alteração na síntese de ergosterol, levando a resistência à anfotericina B (MAY et al., 2016).

Antifúngicos como terbinafina e itraconazol são frequentemente utilizados no tratamento das dermatofitoses (ZANG et al., 2007). No entanto, o nível de toxicidade, o tratamento em longo prazo e a baixa eficácia tem limitado sua utilização clínica. Diante disto, nas últimas décadas antifúngicos com melhor absorção e eficácia como voriconazol, caspofungina e formulações lipídicas de anfotericina B tem sido desenvolvidos e, com isso, a indústria farmacêutica tem dedicado seus esforços para

o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas com elevada atividade antifúngica (ZHANG et al., 2007).

Compostos com potencial atividade biológica estão presentes em diversas plantas, trabalhando em sinergismo, resultando em uma ampla variedade de bioatividades. Entre estas bioatividades, a propriedade antifúngica de algumas plantas medicinais tem sido descrita contra espécies de *Candida* clinicamente importante, apresentando resultados tanto *in vitro* como *in vivo* (MARTINS et al., 2015).

Estudos *in vitro* com óleos essenciais e com extratos de *Allium tuberosum* (Cebola Nirá), *Coriandrum sativum* (Coentro), *Cymbopogon martini* (Capim Limão), *Cymbopogon winterianus* (Citronela) e *Santolina chamaecyparissus* (Santolina) indicam atividade antifúngica frente isolados de *Candida* spp. da cavidade oral de pacientes com doenças periodontais (FURLETTI et al., 2011). Da mesma forma, óleo essencial de *Mentha suaveolens* (Menta) mostra atividade *in vitro* fungicida e fungistática contra cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com candidíase vulvo-vaginal e AIDS, em estudo *in vivo*, utilizando o mesmo óleo contra infecção vulvo-vaginal em modelo murino, foi observada uma redução dessa levedura neste processo micótico (PIETRELLA et al., 2011).

Atividade antifúngica da curcumina já foi descrita contra espécies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* e *Sporothrix* (MARTINS et al. 2009; MARTINS et al., 2015). O mecanismo de ação do composto natural curcumina ainda não está bem elucidado, acredita-se que várias vias de ação incluindo alterações na atividade ATPase da membrana celular fúngica, na biossíntese de ergosterol e secreção de proteases (KUMAR et al. 2014; CHEN et al. 2016).

2.7 PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS

No que diz respeito à busca pelo desenvolvimento de novas drogas, a modificação molecular de agentes antimicrobianos preexistentes, tem sido há muitos anos uma das principais estratégias adotadas. A modificação molecular consiste na realização de pequenas modificações químicas em um composto protótipo matriz, possuidor de estrutura química e atividades biológicas bem conhecidas (mantendo constante seu grupo farmacofórico), obtendo-se novos compostos análogos ou homólogos, sem prejuízo das principais propriedades do composto (MONDELLO et al., 2003).

Embora se consiga incluir as modificações químicas e manter o protótipo matriz, a solubilidade de novos compostos deve ser considerada e, por isso, durante seu planejamento, em especial durante a rota sintética, a seleção dos grupos radicais e dos grupos farmacofórico deve priorizar aqueles com menor coeficiente de lipofilia (LogP), possibilitando uma maior solubilidade aos novos compostos em água, uma vez que sua pouca solubilidade em água pode reduzir o efeito terapêutico devido a sua baixa biodisponibilidade (MONTANARI, 2011; LIMA et al., 2008).

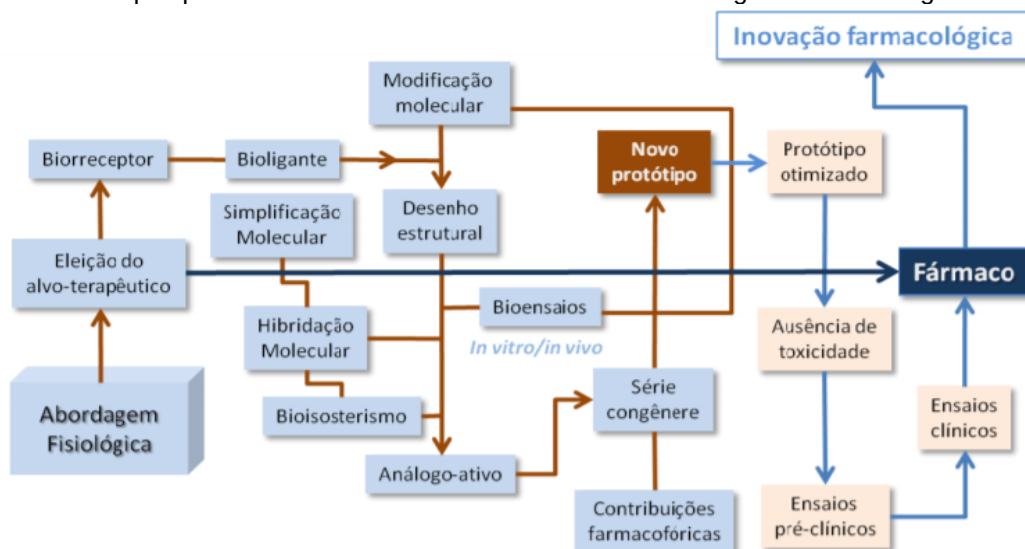
Em nenhuma outra área da Química, o conhecimento completo da estrutura molecular é tão essencial como na Química Medicinal. Esta disciplina das Ciências Farmacêuticas estuda as origens moleculares da atividade biológica dos fármacos, determinando os parâmetros que relacionam estrutura e atividade e aplicando estes fundamentos no planejamento racional dos fármacos (COHEN et al., 1990).

O estudo da Química Medicinal envolve diversas estratégias a serem empregadas no planejamento racional de compostos bioativos. As estratégias modernas no desenvolvimento de um novo composto-protótipo levam em consideração a abordagem fisiopatológica, pois tal estratégia fundamenta-se no alvo terapêutico escolhido, representando uma etapa fundamental no processo de descoberta de um novo fármaco. A química medicinal possui métodos eficientes para otimizar a potência e o perfil farmacológico de substâncias, levando ao planejamento e síntese de substâncias cada vez mais ativas, com biodisponibilidade satisfatória, desprovido de toxicidade e metabolismo adequado ao seu emprego terapêutico. (BARREIRO; FRAGA, 2008; MONTANARI, 2011).

O processo de desenvolvimento de novos medicamentos divide-se em algumas etapas, sendo elas: estudos *in vitro*, *in vivo*, testes clínicos e comercialização (KATZUNG, 2012).

Estudos modernos de planejamento molecular tem como base a identificação de uma biomolécula alvo, com ou sem estrutura tridimensional conhecida. Programas computacionais como ferramentas tecnológicas facilitam o planejamento em um processo conhecido como *Computer-aided Drug Design* (CADD), tornando possível a visualização da interação tridimensional do fármaco com o alvo, além de possibilitar estudos mais complexos de interação fármaco-receptor e *docking* (GUIDO et al., 2010). De acordo com Barreiro, (2009), uma etapa crucial no desenvolvimento de um fármaco é a eleição do alvo farmacológico (Figura 13).

Figura 11 - Hierarquia para o desenvolvimento de novos fármacos segundo a abordagem fisiológica.

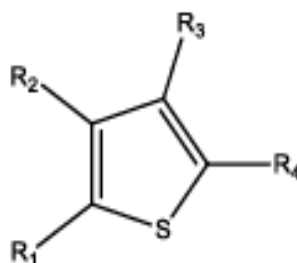


Fonte: Barreiro, 2009.

2.8 DERIVADOS TIOFÊNICOS COMO ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS

Os derivados tiofênicos são uma classe importante de anéis heterocíclicos encontrados em vários compostos biologicamente ativos. O anel tiofênico, uma estrutura insaturada de cinco membros, sendo quatro carbonos e um átomo de enxofre, é um composto fracamente aromático que sofre principalmente reações de substituição no carbono 2 do anel aromático. Possui em sua estrutura quatro possíveis posições passíveis de substituições: R_1 , R_2 , R_3 e R_4 , como demonstra a Figura 14 (SAKER; NAHAR, 2009; MITTAL et al., 2004).

Figura 12 - Representação molecular do anel tiofênico.



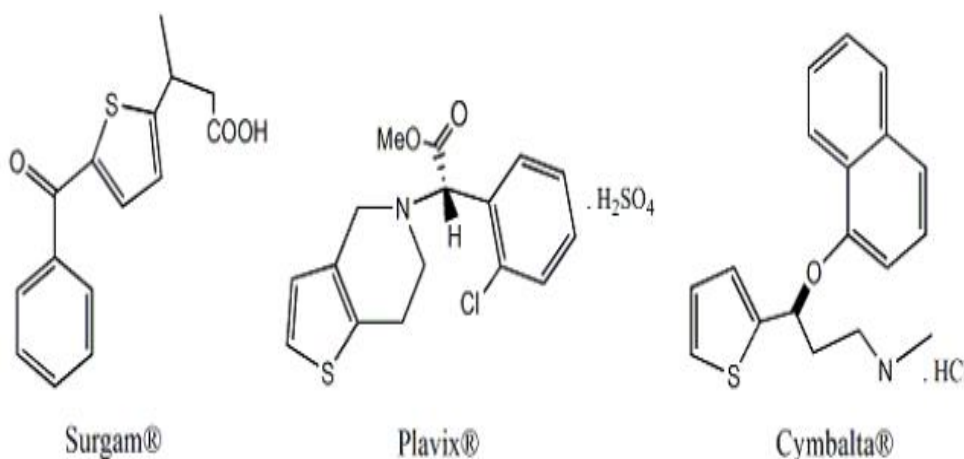
Fonte: ChemDraw®.

Atualmente, diversos fármacos comercialmente disponíveis possuem em sua estrutura química o anel tiofênico, sendo alguns destes: O bissulfato de clopidogrel (Plavix®) (Figura 15), que é um inibidor do difosfato de adenosina (ADP), onde a agregação plaquetária induzida tem sido um importante avanço para pacientes com

doença aterosclerótica cardiovascular (RODGERS; STEINHUBL, 2003), o ácido tiaprofênico (Surgam®) (Figura 20), é um fármaco anti-inflamatório não esteroidal (AINE), da classe do ácido arilpropiónico (profeno), usado para tratar a dor, especialmente a dor artrítica, tendo como mecanismo de ação o bloqueio da produção de um produto químico (prostaglandina), que o corpo produz em resposta a ferimentos ou certas doenças (SORKIN; BROGDEN, 1985).

O cloridrato de duloxetina (Cymbalta®) (Figura 15), possui como mecanismo de ação a inibição seletiva da recaptação de serotonina e noradrenalina (SSNRI), sendo eficaz para o tratamento de depressão profunda, tratamento da incontinência urinária, dor neuropática periférica diabética, fibromialgia, doença articular degenerativa e dentre outros (BYMASTER et al., 2003).

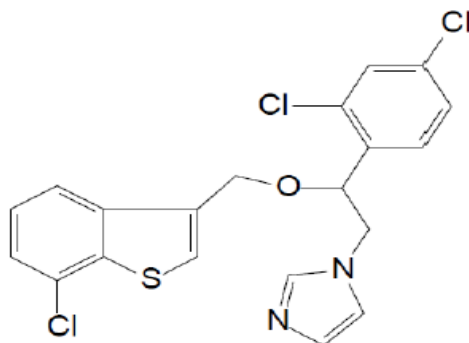
Figura 13 - Fármacos de uso comercial contendo o anel tiofênico.



Fonte: Bymaster et al., 2003.

O sertaconazol (Figura 16) é um medicamento comercialmente disponível da classe dos imidazóis que possui atividade antifúngica frente a micoses superficiais como candidíases e dermatofitoses. Possui em sua estrutura o sistema benzo[*b*]tiofênico, que é frequentemente presente em compostos biologicamente ativos. O Sertaconazol interage com desmetilase 14- α , uma enzima citocromo P-450 necessária para converter a lanosterol ergosterol. Pode também inibir a respiração endógena, interagir com os fosfolípidios de membrana, inibir a transformação de leveduras para formas de micélio, inibir a absorção de purina, e prejudicar triglicérides e/ou biossíntese de fosfolípidios. (PINTO et al., 2008).

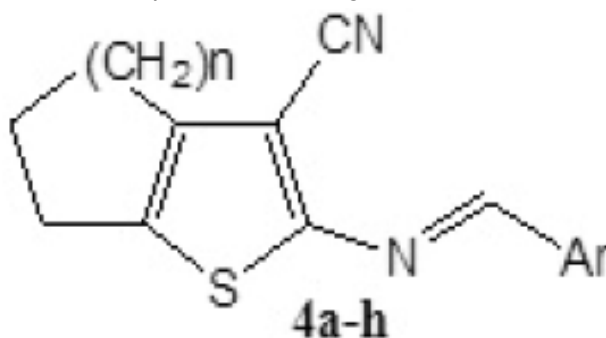
Figura 14 - Molécula do Sertaconazol.



Fonte: ChemSpider®.

Mendonça Junior e colaboradores em 2011 e em 2012, observaram pela primeira vez a atividade antifúngica de derivados 2-amino-cicloalquil[b]tiofenos. Foi constatado que os compostos com atividade antifúngica mais pronunciada foram os que possuíam grupo nitro-aromático ligado à sua porção 2-amino (Figura 17), com resultados satisfatórios frente ao fungo *Cryptococcus neoformans*, apresentando um CIM de 100 µg/mL e atividade fraca ou moderada para leveduras patogênicas do gênero *Candida*, tendo seus melhores valores de CIM = 200 µg/mL (SOUZA et al., 2012; MENDONÇA-JÚNIOR et al., 2011).

Figura 15 - Derivados tiofênicos com potencial antifúngico.

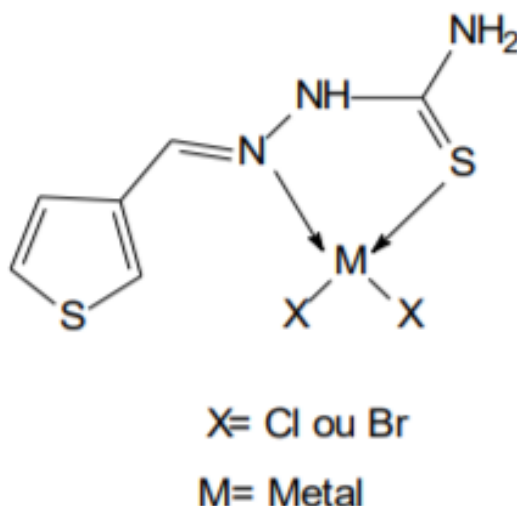


Fonte: Mendonça-Júnior et al., 2011.

Em 2012, o mesmo grupo publicou estudos de CADD (*computer aided drug design* - planejamento de fármacos auxiliado por computador) que permitiram a obtenção de informações estruturais e eletrônicas essenciais à atividade antifúngica desses derivados, onde foi constatado que a presença de grupos polares, ou seja, que aumentam a solubilidade em água (a exemplo do grupo NO₂) são fatores determinantes para a potencialização da ação antifúngica da molécula (SCOTTI et al., 2012).

Derivados tiofênicos complexados com metais como cádmio e zinco também são descritos na literatura com boa atividade antifúngica (Figura 18) (ALOMAR et al., 2010).

Figura 16 - Estrutura química dos derivados tiofênicos complexado com metais.



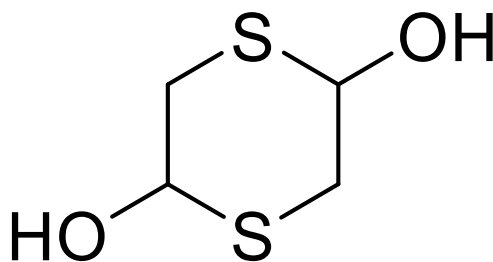
Fonte: Alomar et al., 2010.

PINTO et al. (2008) sintetizaram derivados 5-amilamino-4,7-dioxobenzo[b]tiofeno, tendo posteriormente seu perfil antifúngico testado frente espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis*), *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. niger*, e *A. flavus*) e dermatófitos (*Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* e *Epidermophyton floccosum*). Foi demonstrado que o espectro de atividade nos derivados de piridina foi ampliado pela ausência do grupo éster na posição 2 do benzo[b]tiofeno, demonstrando atividade contra todos os fungos testados (CIM <100 µg/mL) para *Candida* e (CIM 3.13-12.5 µg/mL) para dermatófitos.

Em procedimentos de síntese de heterocíclicos, a utilização do 1,4-ditiano-2,5-diol, a forma dimérica estável do α- mercaptoacetaldeído (Figura 19), é um sínton eficiente usado em procedimentos de síntese de 2 amino-tiofenos não substituídos nas posições 4 e 5 (GOSWAMI et al., 2017; LUNA et al., 2019).

O 1,4-ditiano-2,5-diol, é um reagente comumente disponível no mercado e que apresenta baixo custo, tem sido amplamente utilizado na síntese orgânica de vários compostos, incluindo os derivados tiofênicos (FANG et al., 2013).

Figura 17 - Estrutura química do 1,4-ditiano-2,5-diol.



Fonte: ChemDraw®.

Devido a baixa solubilidade de derivados tiofênicos sintéticos, o uso do 1,4-ditiano-2,5-diol torna-se um reagente promissor visando a obtenção de derivados com melhor perfil de solubilidade. Isso se dá pelo fato dele permitir gerar compostos sem cadeia alquílica ou cicloalquílica nas posições 4 e 5 do anel tiofênico, contribuindo assim para um menor LogP, e consequentemente para um incremento na solubilidade.

2.8.1 Derivados Tiofênicos incorporados em Preparações Farmacêuticas com Ação Antifúngica

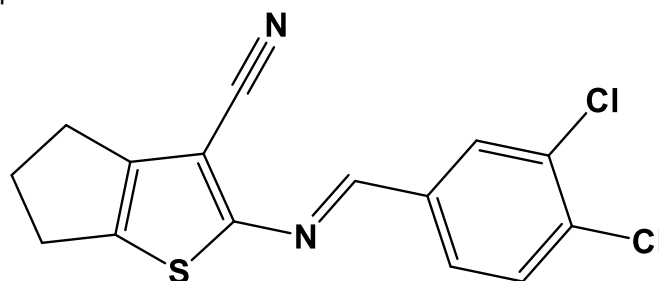
Atualmente as ciclodextrinas (CD) são amplamente utilizadas como agentes complexantes para melhorar a solubilidade e a estabilidade de uma variedade de fármacos pouco solúveis e instáveis (HU et al., 2012). Hoje em dia, mais de 35 medicamentos diferentes são comercializados a base CD sólido ou baseado em formulações complexas como, alprostadil (utilizado para disfunção erétil), meloxicam (ação antiinflamatória), omeprazol (inibidor de bomba de próton), itraconazol (antifúngico) e aripiprazol (antipsicótico) (HWANG et al., 2012).

Eleamen et al. 2017, em seu estudo, demonstraram que moléculas de derivados tiofênicos complexados com 2-hidroxi-propyl-β-ciclodextrina apresentam elevada atividade antifúngica (CIM = 46,66 µg/mL) frente a *Cryptococcus neoformans*, quando comparado a droga livre não complexada (CIM = 166.66 - 333.33 µg/mL). A complexação da molécula com ciclodextrina foi capaz de aumentar a solubilidade da molécula, gerando assim melhores resultados no perfil antifúngico.

De maneira semelhante, Guimarães et al. (2014) publicaram os resultados de seu estudo de incorporação de um derivado 2-amino-tiofênico (5CN05) em microemulsão (ME) para uso tópico em tratamento de infecções fúngicas.

Todos as cepas avaliadas mostraram-se sensíveis ao 5CN05 puro (Figura 20), que mostrou atividade moderada contra as espécies de *Candida* (CIM = 270 - 540 µg/mL) e uma atividade superior contra *Cryptococcus neoformans* (CIM = 17 µg/mL), enquanto o valor de para o controle positivo (anfotericina B) foi apenas 0,5 µg/mL. A microemulsão contendo esse derivado tiofênico também resultou num incremento significativo do potencial antifúngico da droga, resultando em formulação com CIM = 70 µg/mL, frente espécies de *Candida*, (*C. albicans* e *C. parapsilosis*) e excelente atividade contra *C. neoformans* (CIM = 2,2 µg/mL), sendo esse valor apenas ¼ da atividade da anfotericina B.

Figura 18 - Estrutura química da molécula 5CN05.



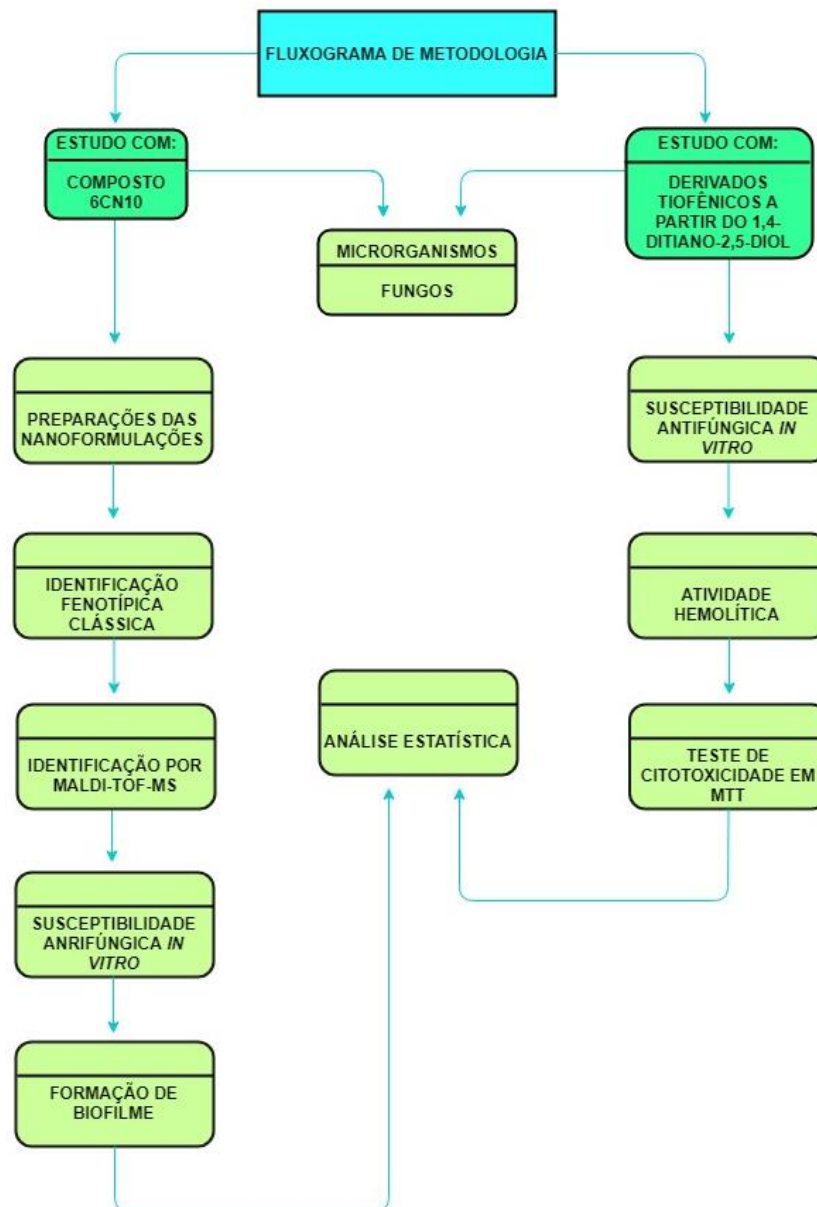
Fonte: ChemDraw®.

3 METODOLOGIA

3.1 DESENHO DO ESTUDO

A metodologia da presente tese englobou dois estudos: um utilizando o derivado tiofênico cicloexilado e suas nanoformulações e outro utilizando derivados tiofênicos sintetizados a partir do 1,4-ditiano-2,5-diol. Ambos os estudos foram realizados com análises diferentes, como demonstra o fluxograma de metodologia (Figura 19).

Figura 19 - Fluxograma de metodologia utilizada.



3.2 OBTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Para os testes com o composto 6CN10, quinze isolados de *Candida* foram obtidos de amostras clínicas de pacientes com candidemia atendidos em um hospital público de Recife-PE. As quatro espécies de *Cryptococcus* foram disponibilizadas pela Coleção de Culturas URM, na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As espécies de *Candida* e *Cryptococcus* são descritos na Tabela 2.

Para os testes com os derivados tiofênicos obtidos a partir do 1,4-ditiano-2,5-diol, as espécies de *Candida*, *Cryptococcus* e dermatófitos foram disponibilizados pela Coleção de Culturas URM, na UFPE (Tabela 3). Todos os fungos foram mantidos em Sabouraud Dextrose Ágar (SDA), e estocados em temperatura ambiente ($24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizado como cepa padrão.

Tabela 2 - Isolados clínicos testados frente ao composto 6CN10.

Nº do isolado	MICROORGANISMO	SUBSTRATO
99	<i>Candida albicans</i>	Sangue
122	<i>Candida albicans</i>	Sangue
4451	<i>Candida albicans</i>	Sangue
8299	<i>Candida albicans</i>	Sangue
9925	<i>Candida albicans</i>	Sangue
5623	<i>Candida famata</i>	Sangue
8340	<i>Candida glabrata</i>	Sangue
632	<i>Candida guilliermondii</i>	Sangue
14206	<i>Candida krusei</i>	Sangue
7866	<i>Candida tropicalis</i>	Sangue
290	<i>Candida parapsilosis</i>	Sangue
7736	<i>Candida parapsilosis</i>	Sangue
9968	<i>Candida parapsilosis</i>	Sangue
13531	<i>Candida parapsilosis</i>	Sangue
451	<i>Candida parapsilosis</i>	Sangue
ATCC 22019	<i>Candida parapsilosis</i>	-
URM 6895	<i>Cryptococcus neoformans</i>	LCR (paciente HIV+)
URM 6901	<i>Cryptococcus neoformans</i>	LCR (paciente HIV+)
URM 6907	<i>Cryptococcus neoformans</i>	LCR (paciente HIV+)
URM 6909	<i>Cryptococcus neoformans</i>	LCR (paciente HIV+)

Tabela 3 - Isolados testados frente aos derivados tiofênicos obtidos a partir do 1,4-ditiano-2,5-diol.

Nº URM	MICROORGANISMO	SUBSTRATO
4990	<i>Candida albicans</i>	Secreção vaginal
4987	<i>Candida albicans</i>	Secreção vaginal
4986	<i>Candida albicans</i>	Secreção vaginal
4984	<i>Candida parapsilosis</i>	Secreção vaginal
4970	<i>Candida parapsilosis</i>	Secreção vaginal
ATCC 22019	<i>Candida parapsilosis</i>	-
5811	<i>Cryptococcus neoformans</i>	LCR (paciente HIV+)
5980	<i>Cryptococcus neoformans</i>	LCR (paciente HIV+)
6999	<i>Epidermophyton floccosum</i>	-
6754	<i>Epidermophyton floccosum</i>	Rim transplantado
5431	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Escamas epidérmicas (paciente HIV+)
5432	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Escamas epidérmicas (paciente HIV+)
6753	<i>Trichophyton rubrum</i>	Rim transplantado
700	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Couro cabeludo
2822	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Couro cabeludo

3.3 DESCRIÇÃO METODOLÓGICA PARA O COMPOSTO 6CN10

3.3.1 Obtenção do Composto 6CN10

O composto 6CN10 foi sintetizado no Laboratório de Síntese e Vetorização de Molécula-UEPB (LSVM-UEPB) de acordo com procedimentos previamente descritos (Mendonça-Junior et al., 2011) e sua estrutura química foi confirmada pela comparação do espectro RMN¹H. O complexo 6CN10:HP-β-CD foi preparado de acordo com o procedimento descrito por Eleamen et al. (2017). Anfotericina B, poli-ε-caprolactona, 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina, Tween 80, Mygliol 812, cloranfenicol e dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil). A Figura 1 demonstra a estrutura química do 6CN10.

3.3.2 Preparação das Nanoformulações

Quatro formulações diferentes (Tabela 5) foram preparadas no Laboratório de Síntese e Vetorização de Molécula-UEPB (LSVM-UEPB) usando o método de nanoprecipitação descrito por Fessi et al. (1989). Para a produção das nanoesferas,

6CN10 puro ou complexo 6CN10:HP- β -CD foi vertido em acetona contendo o polímero poli- ϵ -caprolactona. Em seguida, essa fase orgânica foi adicionada gota a gota em uma fase aquosa contendo o surfactante (Tween 80) sob agitação magnética moderada a 25 °C. O solvente orgânico foi eliminado por rotaevaporação e o volume final das suspensões foi ajustado para 10 mL. Para produzir as nanocápsulas, o Mygliol 812 foi adicionado à fase orgânica. A quantidade final do 6CN10 nas formulações foi analisada espectrofotometricamente (Genesys 10S, Thermo Scientific, EUA) a 280 nm. As nanoformulações foram armazenadas a 4 °C até o uso.

3.3.3 Identificação Fenotípica Clássica

Os isolados foram identificados no Laboratório de Micologia Médica-UFPE pela macro e micromorfologia. A cor, a forma, a topologia de cada colônia e a morfologia celular foram consideradas utilizando o meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) com 2,5 % de extrato de levedura (Difco, EUA). Foi realizada a indução da estrutura de reprodução sexual com ágar Gorodkova (Difco, EUA). Os clamidósporos foram induzidos em ágar biliar (Difco, EUA) e pontuados como presentes ou ausentes após 3 dias a 25 °C. Os isolados foram testados bioquimicamente por ensaios de assimilação de carboidratos e fermentação. A produção de urease e ácido acético também foi avaliada usando meios com ureia e carbonato de cálcio (Difco, EUA), respectivamente. A temperatura máxima de crescimento para cada isolado foi determinada. Todos os parâmetros fenotípicos clássicos foram analisados de acordo com Barnett et al. (2000) e Hoog et al. (2000). Esta etapa foi desenvolvida no Laboratório de Micologia Médica do Centro de Biociências na Universidade Federal de Pernambuco (LMM/CB/UFPE).

3.3.4 Identificação por MALDI-TOF MS

Inóculos homogêneos de células leveduriformes foram cultivados e mantidos em meio Extrato de Levedura Peptona Dextrose Ágar (YPD). As incubações foram padronizadas às 20 h e as cepas foram cultivadas aerobicamente a 37 °C. De modo a evitar alterações no padrão de expressão da proteína, as condições de cultura e o tempo de crescimento foram padronizados como descrito acima. Todas as culturas foram verificadas quanto à pureza antes da análise por MALDI-TOF MS.

Uma única colônia foi depositada diretamente em uma placa alvo de 196 posições (Bruker Daltonik GmbH), e dois desses depósitos foram feitos para cada isolado. Alíquotas de 1 µl de ácido fórmico a 70 % foram adicionadas e misturadas suavemente com as leveduras. Quando o meio líquido foi quase evaporado, a preparação foi recoberta com 1 µl de solução de matriz saturada {75 mg/ml de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em etanol/água/acetonitrila [1:1:1] com 0,03 % de ácido trifluoroacético (TFA)}. Um total de 20 isolados (2 x 20 pontos) foram depositados por placa, e a amostra da matriz foi cristalizada por secagem ao ar a temperatura ambiente por 5 minutos (LIMA-NETO et al., 2014).

O equipamento utilizado foi o espectrômetro de massa MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics Inc., EUA / Alemanha) equipado com um laser de Nd:YAG (granada de alumínio com ítrio dopada com neodímio; Nd:Y3Al5O12) de 1064 nm ajustado com uma potência de 66 %. A faixa de massa de 2.000 a 20.000 Da foi registrada usando um modo linear com um atraso de 104 ns (nanosegundo) e uma voltagem de aceleração de +20 kV (quilovolt). As listas de picos resultantes foram exportadas para o software MALDI Biotyper™ 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) onde as identificações finais foram alcançadas. Esta etapa foi realizada no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

3.3.5 Teste de Sensibilidade a Antifúngicos

Os ensaios de microdiluição em caldo seriada contendo diluições do fármaco ou nanoformulações foram preparados seguindo as diretrizes CLSI M27-A3. Dispersão de nanoesferas e nanocápsulas de 6CN10 (contendo 250 µg/mL de 6CN10) e complexo 6CN10:HP- β -CD (contendo 100 µg/mL de 6CN10) foram utilizados. 6CN10 puro (10,0 mg) e complexo 6CN10:HP- β -CD contendo 14 % de 6CN10 (10,0 mg) foram dissolvidos em 1,0 mL de DMSO e depois diluídos em 9,0 mL de meio RPMI 1640 padrão (Sigma Chemical Co., St., Louis, MO) tamponado a pH 7,0 com 0,165 M de ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS; Sigma, Brasil) resultando, respectivamente, em soluções com concentrações de 1,0 mg/mL e 140 µg/mL. As concentrações testadas variaram de 0,32 a 333,33 µg/mL para 6CN10 puro, de 0,045 a 46,66 µg/mL para o complexo 6CN10:HP- β CD, de 0,08 a 83,33 µg/mL para nanoesferas e nanocápsulas de 6CN10, de 0,003 a 3,33 µg/mL para nanoesferas e

nanocápsulas do complexo 6CN10:HP- β -CD. A anfotericina B foi usada como medicamento de referência em concentrações de 0,015 a 8,0 $\mu\text{g/mL}$.

De modo a obter um inóculo de levedura contendo $1,0$ a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL⁻¹, cada cepa foi cultivada em tubo de ensaio contendo 20 mL de Sabouraud Dextrose Ágar mais extrato de levedura (SDA; Difco) a 35 °C durante dois dias. Em seguida, as suspensões da levedura foram preparadas em solução fisiológica estéril (0,85 %) e mantidas a 28 ± 2 °C, e então ajustadas para 90 % de transmitância a 530 nm. Foram feitas duas diluições seriadas, de 1:100 e 1:20 para obter um inóculo final contendo $1,0$ a $5,0 \times 10^3$ UFC/mL.

Para os testes de susceptibilidade, 100 μL de cada solução testada (6CN10 e complexos 6CN10:HP- β -CD, nanoformulações contendo 6CN10 e complexo 6CN10:HP- β -CD, nanoformulações livres de fármaco e medicamento de referência) e 10 diluições foram adicionadas em poços de microdiluição contendo 100 μL de meio RPMI 1640 padrão tamponado a pH 7,0 com 0,165 M de MOPS, então os poços foram inoculados com 100 μL do inóculo previamente obtido. As microplacas foram incubadas a 35 °C em incubadora sem CO₂ e avaliadas visualmente após 48 h para isolados de *Candida* e 72 h após a incubação para isolados de *Cryptococcus*. As CIMs corresponderam à menor diluição do fármaco que mostrou 100 % de inibição do crescimento em comparação com as leveduras não tratadas. Todos os testes foram realizados em duplicata. Esta etapa foi desenvolvida no LMM/CB/UFPE.

3.3.6 Formação de Biofilme

A formação de biofilme realizada foi modificada por Vandebosch et al. (2010). Os biofilmes de *Cryptococcus neoformans* foram formados em discos de silicone estéreis em uma placa de microtitulação de 24 poços (TPP, Trasadingen, Suíça). Os discos foram lavados com água MilliQ (Millipore, Billerica, MA, EUA) e autoclavados. Células de levedura foram cultivadas em ASD por 48 h a 37 °C, em seguida, 3 a 5 colônias foram suspensas em solução salina 0,9 % (p/v) e centrifugadas por 5 min a 1.000 rpm.

Subsequentemente, o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas e ressuspensas três vezes em 1 mL de solução salina a 0,9 % (p/v). O inóculo foi ainda diluído em base azotada de levedura 0,1 X (YNB, BD, Franklin Lakes, EUA) suplementada com glucose 5 mM (milimorlar) (Sigma-Aldrich) para produzir uma

densidade óptica de 0,07 a um comprimento de onda de 600 nm. Em seguida, 1 mL de uma diluição 1:100 do inóculo em YNB 0,1 foi adicionado a cada poço contendo um disco de silicone com três formulações 6CN10 (6CN10-nanoesfera, 6CN10:HP- β -CD-nanoesfera e 6CN10:HP- β -CD-nanocápsula na concentração final de 83,33 μ g/mL, 3,33 μ g/mL e 3,33 μ g/mL, respectivamente). Controles apropriados também foram incluídos. As placas de microtitulação de 24 poços foram incubadas durante 48 h a 37 °C.

3.3.7 Aspectos Éticos

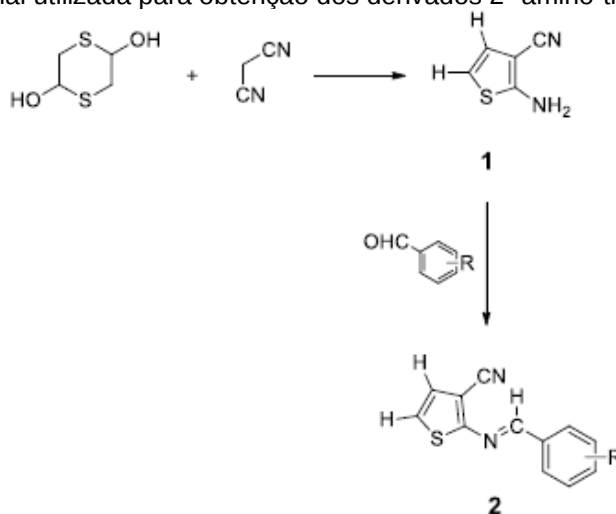
A coleta das amostras clínicas dos pacientes (estudo feito com o composto 6CN10) foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco sob o protocolo 01847812.0.0000.5208.

3.4 DESCRIÇÃO METODOLÓGICA PARA OS DERIVADOS TIOFÊNICOS OBTIDOS A PARTIR DO 1,4-DITIANO-2,5-DIOL

3.4.1 Derivados 2-Amino-Tiofênicos

Os derivados 2-amino-tiofênicos **(2)** obtidos a partir do 1,4-ditiano-2,5-diol (Tabela 4) utilizados nesse trabalho foram fornecidos pelo Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM), na Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). As moléculas foram obtidas por meio de uma rota sintética linear de acordo com o esquema reacional a seguir (Figura 22), tendo seus rendimentos e características físico-químicas determinadas (LogP, *R_f*, ponto de fusão, aparência física e cor). As estruturas dos compostos foram confirmadas através de ressonância magnética nuclear, de hidrogênio e de carbono, técnicas bidimensionais de ressonância magnética nuclear, infravermelho e espectrometria de massas.

Figura 20 - Rota reacional utilizada para obtenção dos derivados 2- amino-tiofênicos.



Fonte: ChemDraw®.

Em suma, o intermediário 2-amino-tiofeno-3-carbonitrila (**1**) foi obtido através da quarta versão da reação de Gewald (PUTEROVÁ; KRUTOSÍKIVÁ; VÉGH, 2010) e em seguida foi reagido com diferentes aldeídos aromáticos substituídos gerando os compostos finais desejados (**2**). A Tabela 4 demonstra informações sobre os derivados tiofênicos utilizados nesta tese.

Tabela 4 - Códigos, nomes químicos, forma molecular e características físico-químicas dos compostos utilizados para os testes.

Composto	Nomenclatura IUPAC	Fórmula Molecular	Aparência e cor	LogP
CN01	2-[(4-metoxibenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ OS	Cristal verde	3,92
CN02	2-[(4-clorobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₂ H ₇ ClN ₂ S	Cristal verde	4,61
CN03	2-[(4-fluorobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₂ H ₇ FN ₂ S	Cristal verde	4,21
CN04	2-[(2,4-diclorobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₂ H ₆ Cl ₂ N ₂ S	Cristal amarelo	5,17
CN05	2-[(2,6-diclorobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₂ H ₆ Cl ₂ N ₂ S	Cristal amarelo	5,17
CN06	2-[(2-nitrobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₂ H ₇ N ₃ O ₂ S	Cristal verde	3,34
CN07	2-[(3-nitrobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₂ H ₇ N ₃ O ₂ S	Cristal verde	3,34
CN08	2-[(3-hidroxibenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₂ H ₈ N ₂ OS	Cristal verde	3,36
CN09	2-[(4-metilbenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₂ H ₈ N ₂ OS	Cristal verde	4,54
CN10	2-[[[(4-nitro-1H-indol-3-il)metileno]amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₄ H ₈ N ₄ O ₂ S	Pó amorfo amarelo	2,88
CN11	2-[[[(5-metoxi-1H-indol-3-il)-metileno]amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₅ H ₁₁ N ₃ OS	Cristal azul	3,46
CN12	2-[(4dimetilaminobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₄ H ₁₃ N ₃ S	Pó amorfo laranja	4,33
CN13	2-[(4nitrobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₂ H ₇ N ₃ O ₂ S	Pó amorfo marrom	3,34
CN15	2-[[[(1H-indol-3-il)metileno]amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₄ H ₉ N ₃ S	Pó amorfo amarelo	3,59
CN17	2-[(3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₃ S	Pó amorfo amarelo	3,67
CN19	2-(benzilideno-amino)-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₂ H ₈ N ₂ S	Cristal verde	4,05
CN20	2-[(2,3-diclorobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₂ H ₆ Cl ₂ N ₂ S	Pó amorfo verde	5,17
CN21	2-[(4-bromobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₂ H ₇ BrN ₂ S	Pó amorfo verde	4,88
CN23	2-[[[(1,1'-bifenil)4-il-metileno]amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₈ H ₁₂ N ₂ S	Cristal verde	5,72

3.4.2 Teste de Sensibilidade a Antifúngicos

Placas de microdiluição de 96 poços contendo fluconazol e anfotericina B para leveduras e fluconazol e cetoconazol para dermatófitos como drogas referência e soluções dos derivados tiofênicos foram preparadas seguindo as orientações CLSI M38-A2 e CLSI M27-A3 (CLSI, 2008). Foram utilizadas soluções dos derivados tiofênicos puros. Os derivados tiofênicos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO), e diluídos em meio de cultura padrão RPMI 1640, tamponado a pH 7,0 com 0,1 M de ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) numa concentração inicial de $1.024 \mu\text{g/mL}^{-1}$. A linhagem *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizada como controle do teste.

A fim de se obter um inóculo de levedura, foi utilizada a metodologia descrita no item 4.3.5. Para os dermatófitos uma diluição de 1:50 foi feita para se obter um inóculo final de 10^4 UFC.mL^{-1} .

Para os testes de sensibilidade, foram adicionados 100 μL das soluções de cada droga teste (derivados tiofênicos) aos poços da primeira coluna da Placa de Microdiluição Referência, e em seguida, foram realizadas 10 diluições seriadas em poços de microdiluição contendo 100 μL de meio padrão RPMI 1640 tamponado a pH 7,0 com MOPS (obtendo-se concentrações de 1.024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 e $1 \mu\text{g/mL}^{-1}$ para os derivados tiofênicos, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,006 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ para fluconazol, 16 – 0,3 $\mu\text{g/mL}$ para cetoconazol e anfotericina B. Em seguida, os poços foram inoculados com 100 μL do inóculo previamente obtido.

As microplacas foram incubadas a 35°C em uma incubadora de livre de CO_2 e tendo sua avaliação visual após 48 h de incubação para isolados de *Candida* e 96 h após a incubação para isolados de dermatófitos. Os CIMs corresponderam as menores concentrações dos tiofenos que mostraram inibição de crescimento em comparação com fungos não tratados. Esta etapa foi realizada no LMM/CB/UFPE.

3.4.3 Atividade Hemolítica

As moléculas utilizadas nesta etapa foram as que apresentaram melhor perfil antifúngico frente aos dermatófitos (Figura 24).

Hemácias humanas do tipo O^+ foram suspensas em solução salina (NaCl 0,85 % + CaCl_2 10 mM) a 2 % e incubadas em placas de 96 poços de fundo

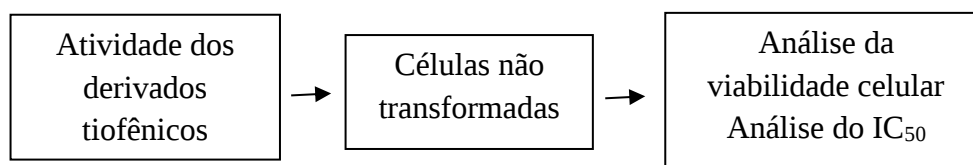
arredondado com diferentes concentrações dos derivados 2-amino tiofênicos. As placas foram incubadas por um período de 3 horas a 37 °C sob constante agitação e, posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 4 min a 4 °C e a absorbância do sobrenadante medida em 540 nm (Benchmark Plus, BIO- RAD, Software Microplate Manager – versão 5.2) para estabelecer o percentual de hemólise. Como controle positivo de lise celular foi utilizado Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) a 1 % e solução salina (NaCl 0,85 % + CaCl₂ 10 mM) como controle negativo. Os experimentos foram realizados em quadruplicata, com repetição em intervalos de tempo distintos (ODDO et al., 2017).

Os resultados foram expressos como porcentagem de hemólise determinada através da equação descrita abaixo, onde a absorbância é (Abs), controle positivo (CP) e controle negativo (CN).

$$\text{Atividade hemolítica (\%)} = \frac{(\text{Abs. do tratado} - \text{Abs. do CN}) \times 100}{(\text{Abs do CP} - \text{Abs do CN})}$$

3.4.4 Análise da Atividade Citotóxica dos Derivados Tiofênicos

3.4.4.1 Fluxograma dos ensaios in vitro



3.4.4.2 Derivados tiofênicos utilizados

As moléculas utilizadas nesta etapa foram as que apresentaram melhor perfil antifúngico frente aos dermatófitos. São elas:

- a) CN05 (2-[(2,6-diclorobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila);
- b) CN06 (2-[(2-nitrobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila);
- c) CN07 (2-[(3-nitrobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila);
- d) CN13 (2-[(4nitrobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila);
- e) CN17 (2-[(3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila);

- f) CN19 (2-(benzilideno-amino)-tiofeno-3-carbonitrila);
- g) CN21 (2-[(4-bromobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila).

3.4.4.3 Cultivo celular

Para avaliação da citotoxicidade dos derivados 2-amino-tiofênicos foram utilizadas as linhagens celulares não tumorais imortalizadas de fibroblastos humanos (MRC-05), células epiteliais de rim de macaco (Vero) e fibroblastos murinos (3T3) provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro e acondicionadas no Banco de células Tumorais do LINAT/UFPE. As células Vero e MRC-05 foram cultivadas em meio DMEM Low Glicose e as células 3T3 em meio RPMI 1640 ambos suplementados com 10 % de Soro Fetal Bovino, 10 mM de HEPES e 1 % U/mL de Penicilina/Estreptomicina. O meio das células MRC-05 foi suplementado com 20 % de Soro Fetal Bovino, 10 % de Insulina e 10 % de Fator de Crescimento de Fibroblasto. As linhagens foram mantidas em estufa contendo 5 % CO₂ a 37 °C e rotineiramente avaliadas quanto a contaminação por micoplasma.

3.4.4.4 Citotoxicidade em células não transformadas

As células foram plaqueadas (1×10^4 células/poço) e incubadas em estufa de atmosfera úmida contendo 5 % CO₂ a 37 °C durante 24 h. Em seguida, os derivados CN05, CN06, CN07, CN13, CN17, CN19 e CN21 foram adicionados nas concentrações de 1, 10, 50 e 100 µM e as placas foram incubadas por 72 h. O controle do veículo (DMSO) foi adicionado na mesma concentração presente nas soluções finais. Em seguida, 20 µL da solução de MTT foi adicionada a cada poço e após 3 h de incubação 130 µL de SDS 20 % foram adicionados para a dissolução dos cristais de formazan, guardando a reação ao abrigo da luz por 24 h. Após esse período, a leitura da densidade ótica foi realizada em espectrofotômetro no leitor de microplacas (EL808 - Biotek®) em absorbância de 570 nm. A média da densidade ótica das condições teste foi comparada com a média do veículo 0,5 % para a determinação da viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o composto 6CN10, a análise estatística entre os diferentes tratamentos com antibiofilme foi realizada por análise de variância (ANOVA) com nível de significância definido como $p < 0,05$. O teste de comparações múltiplas (Tukey) foi utilizado após ANOVA, para comparar as médias encontradas, uma a uma.

Para os derivados tiofênicos obtidos a partir do 1,4-ditiano-2,5-diol, a análise da média, desvio padrão e viabilidade foram realizadas no software Excel®. Em todos os ensaios foram realizados três experimentos independentes e cada condição foi avaliada em replicatas técnicas. Todas as análises estatísticas foram desenvolvidas no Graphpad Prism versão 5.01.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RESULTADOS OBTIDOS COM O COMPOSTO 6CN10

4.1.1 Identificação das Cepas

As leveduras (cinco *Candida albicans*, uma *C. famata*, uma *C. glabrata*, uma *C. guilliermondii*, uma *C. krusei*, cinco *C. parapsilosis*, uma *C. tropicalis* e quatro *Cryptococcus neoformans*) foram identificadas por abordagem fenotípica. O MALDI-TOF identificou os isolados do complexo *C. parapsilosis* como *C. parapsilosis* sensu stricto e *Cryptococcus neoformans* como *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, todos com score acima de 2,0.

4.1.2 Sensibilidade Antifúngica *in vitro*

Para cada experimento de susceptibilidade antifúngica, os controles de inóculo mostraram um crescimento claramente detectável após o período de incubação, indicando que todos os isolados eram viáveis e que as concentrações utilizadas eram adequadas ao crescimento fúngico. A CIM da cepa padrão foi de 0,5 µg/mL para anfotericina B, confirmando a reprodutibilidade do teste. Nanoformulações sem adição de drogas (branco) também foram usadas como controle e não mostraram atividade frente à nenhuma levedura testada.

A Tabela 5 demonstra os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIMs) de 6CN10 (fármaco livre), 6CN10 complexado com 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina (6CN10:HP-β-CD) e as quatro nanoformulações (6CN10-nanocápsula, 6CN10:HP-β-CD-nanocápsula, nanoesfera 6CN10 e 6CN10:HP-β-CD-nanoesfera) em comparação com a anfotericina B contra isolados de *C. neoformans*, *C. albicans*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* (incluindo a cepa referência *C. parapsilosis* ATCC 22019).

Tabela 5 - Resultados da avaliação da atividade antifúngica das nanoformulações contendo 6CN10 e complexo 6CN10:HP-β-CD.

Microrganismo	Cepa ou número do paciente	Compostos e Nanoformulações – CIM† valores em µg/mL.						
		6CN10-nanocápsula	6CN10:HP-β-CD-nanocápsula	6CN10-nanosefera	6CN10:HP-β-CD-nanoesfera	Complexo -6CN10:HP-β-CD	6CN10-fármaco livre	Anf.B‡
<i>C. albicans</i>	99	C††	C	C	C	C	41.66	0.25
<i>C. albicans</i>	122	C	C	C	C	C	41.66	0.25
<i>C. albicans</i>	4451	C	C	C	C	C	41.66	1
<i>C. albicans</i>	8299	C	C	C	C	C	166.66	2
<i>C. albicans</i>	9925	C	C	C	C	C	166.66	2
<i>C. famata</i>	5623	C	C	C	C	C	333.33	2
<i>C. glabrata</i>	8340	C	C	C	C	C	166.66	0.5
<i>C. guilliermondii</i>	632	C	C	C	C	C	83.33	0.5
<i>C. krusei</i>	14206	C	C	C	C	C	333.33	1
<i>C. tropicalis</i>	7866	C	C	C	C	C	83.33	1
<i>C. parapsilosis</i>	290	C	C	C	C	C	83.33	1
<i>C. parapsilosis</i>	7736	C	C	C	C	C	83.33	1
<i>C. parapsilosis</i>	9968	C	C	C	C	C	333.33	2
<i>C. parapsilosis</i>	13531	C	C	C	C	C	83.33	0.25
<i>C. parapsilosis</i>	451	C	C	C	C	C	83.33	1
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	C	C	C	C	C	83.33	0.5
<i>C. neoformans</i>	URM 6895	83.33	0.2	0.65	0.1	46.66	333.33	0.5
<i>C. neoformans</i>	URM 6901	83.33	0.1	0.32	0.1	46.66	333.33	0.25
<i>C. neoformans</i>	URM 6907	83.33	0.1	41.66	0.2	46.66	166.66	0.125
<i>C. neoformans</i>	URM 6909	83.33	0.1	41.66	0.2	46.66	166.66	0.125

†CIM -Concentração Inibitória Mínima.

‡AnfB – Anfotericina B.

††C – Crescimento até a Concentração mais alta testada.

URM – URM Coleção de Culturas/UFPE/Brazil.

Como pode ser observado na Tabela 5, o 6CN10 (fármaco livre) foi capaz de inibir o crescimento de todas as cepas em diferentes concentrações. As espécies de *Candida* foram levemente mais suscetíveis apresentando valores de CIM de 41,66 a 333,33 µg/mL, enquanto as cepas de *Cryptococcus* apresentaram valores de CIM entre 166,66 e 333,33 µg/mL. De acordo com Abreu et al. (2004), Mohareb et al. (2005) e Ram et al. (1997), compostos contendo o anel tiofeno apresentam atividade antifúngica contra *C. albicans* e *C. neoformans*. Experimentos realizados por Ryu et al. (2005) evidenciaram que os tiofenos sintéticos possuem boa atividade contra *A. niger*, *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, discordando em parte de nossos achados que mostraram moderado a fraco efeito antifúngico contra cepas de *Candida*.

O complexo 6CN10:HP-β-CD foi completamente ineficaz para todas as espécies de *Candida* (todas as cepas cresceram na maior concentração testada de 46,66 µg/mL (G)), porém, este complexo apresentou valores de CIM de 46,66 µg/mL contra todas as cepas *Cryptococcus*, sendo quatro vezes mais ativo do que o fármaco livre 6CN10.

Esta diferença de sensibilidade entre os dois gêneros (*Candida* e *Cryptococcus*) também foi observada em todas as nanoformulações avaliadas, onde todos os isolados de *Candida* cresceram (nas concentrações mais altas testadas), enquanto as cepas de *Cryptococcus* apresentaram valores de CIM variando de 0,1 a 83,33 µg/mL, portanto, mais ativo que o fármaco livre 6CN10, com valores de CIM comparáveis ou melhores do que o medicamento de referência anfotericina B.

As nanocápsulas de 6CN10 e complexo 6CN10:HP-β-CD foram capazes de inibir o crescimento de cepas de *Cryptococcus* com valores de CIM de 83,33 µg/mL e 0,1 – 0,2 µg/mL, respectivamente. As nanocápsulas 6CN10 são de 2 a 4 vezes mais eficazes que o fármaco livre 6CN10. As nanocápsulas 6CN10:HP-β-CD são 233 a 466 vezes mais ativas do que o complexo 6CN10:HP-β-CD, e até 3.333 vezes mais ativo que o fármaco livre 6CN10, sendo mais eficiente que o medicamento de referência supracitado para todos os isolados *Cryptococcus*.

Os melhores resultados de inibição obtidos foram observados para as nanoesferas. As nanoesferas 6CN10 apresentaram valores de CIM de 41,66 a 0,32 µg/mL, sendo 4 a 1,040 vezes mais ativo que o fármaco livre 6CN10. As nanoesferas 6CN10:HP-β-CD apresentaram valores de CIM de 0,2 a 0,1 mg/mL, sendo 233 a 466 vezes mais ativas que o complexo 6CN10:HP-β-CD e até 3.333 vezes mais ativo que o fármaco livre 6CN10, e de 2,5 a 5 vezes mais ativo que a anfotericina B para *C. neoformans* URM 6895 e URM 6901.

Em estudos anteriores, nosso grupo já havia constatado que a incorporação de derivados de tiofeno em preparações farmacêuticas provoca um aumento na atividade antifúngica dos compostos, como observado nos estudos de Guimarães et al. (2014) realizados com o derivado 2-aminotiofeno denominado 5CN05. Após a incorporação em um sistema de microemulsão, resultou em um aumento de 7,7 vezes na atividade frente ao *C. neoformans* (reduzindo CIM de 17,0 para 2,2 µg/mL), e no trabalho de Eleamen et al. (2017) onde foi observado um aumento na atividade anticriptococose de cerca de 3,5 a 7 vezes, quando comparado ao composto 6CN10 complexado com HP-β-CD.

Esses resultados ajudam a validar o estudo publicado por Scotti et al. (2012) e comprovam que os procedimentos farmacotécnicos, que auxiliam na camuflagem da baixa solubilidade aquosa intrínseca dos derivados 2-aminotiofeno contribuem para o aumento do potencial antifúngico.

4.1.3 Tratamento de Biofilme de *Cryptococcus*

As três formulações mais bioativas de 6CN10 foram testadas frente à biofilmes de quatro isolados de *Cryptococcus* em discos de silicone (Tabela 4). A Tabela 4 demonstra que as contagens de placas correspondem à média $\pm$ erro padrão referente a média de três experimentos independentes em três discos de silicone.

Como pode ser observado na Tabela 6, os grupos Branco e Controle não apresentaram diferença estatisticamente significativa para nenhuma das linhagens avaliadas, indicando que os componentes da nanoformulação não apresentam atividade fungicida contra os biofilmes. A nanoformulação mais eficiente foi a 6CN10:HP- β -CD-nanoesfera, que reduziu o número de UFCs recuperadas dos discos para todos os isolados investigados, com porcentagens de redução variando de 90,9 a 100 % ($p < 0,05$) comparado ao controle. Sendo, a maior redução observada para *C. neoformans* URM 6907 (100 %, $p < 0,05$).

Tabela 6 - Número de UFC do biofilme de *Cryptococcus neoformans* em discos de silicone após o tratamento com nanoformulações de 6CN10.

Cepas <i>Cryptococcus</i>	6CN10- nanoesfera	6CN10:HP- β - CD- nanoesfera	6CN10:HP- β - CD nanocápsula	Branco [†]	Controle [‡]
URM ^{††} 6895	12.33 $\pm$ 4.16	3.00 $\pm$ 1.00	17.66 $\pm$ 2.08	43.00 $\pm$ 6.08	47.00 $\pm$ 4.00
URM 6906	30.66 $\pm$ 4.72	3.33 $\pm$ 1.52	18.33 $\pm$ 2.08	36.00 $\pm$ 4.58	36.66 $\pm$ 3.51
URM 6907	8.66 $\pm$ 1.52	0.66 $\pm$ 0.57	7.66 $\pm$ 1.52	9.66 $\pm$ 2.51	9.33 $\pm$ 3.78
URM 6909	2.33 $\pm$ 1.52	1.66 $\pm$ 0.57	26.00 $\pm$ 3.00	6.66 $\pm$ 2.51	15.00 $\pm$ 6.08

[†] Branco - leveduras e discos de silicone em compostos das nanoformulações sem 6CN10

[‡] Controle - leveduras e discos de silicone apenas em meios de cultura (YNB suplementado com 5 mM de glicose).

^{††} URM - URM Coleção de Culturas/UFPE/Brasil.

Os valores são expressos como média $\pm$ erro padrão referente a média de três experimentos independentes em três discos de silicone.

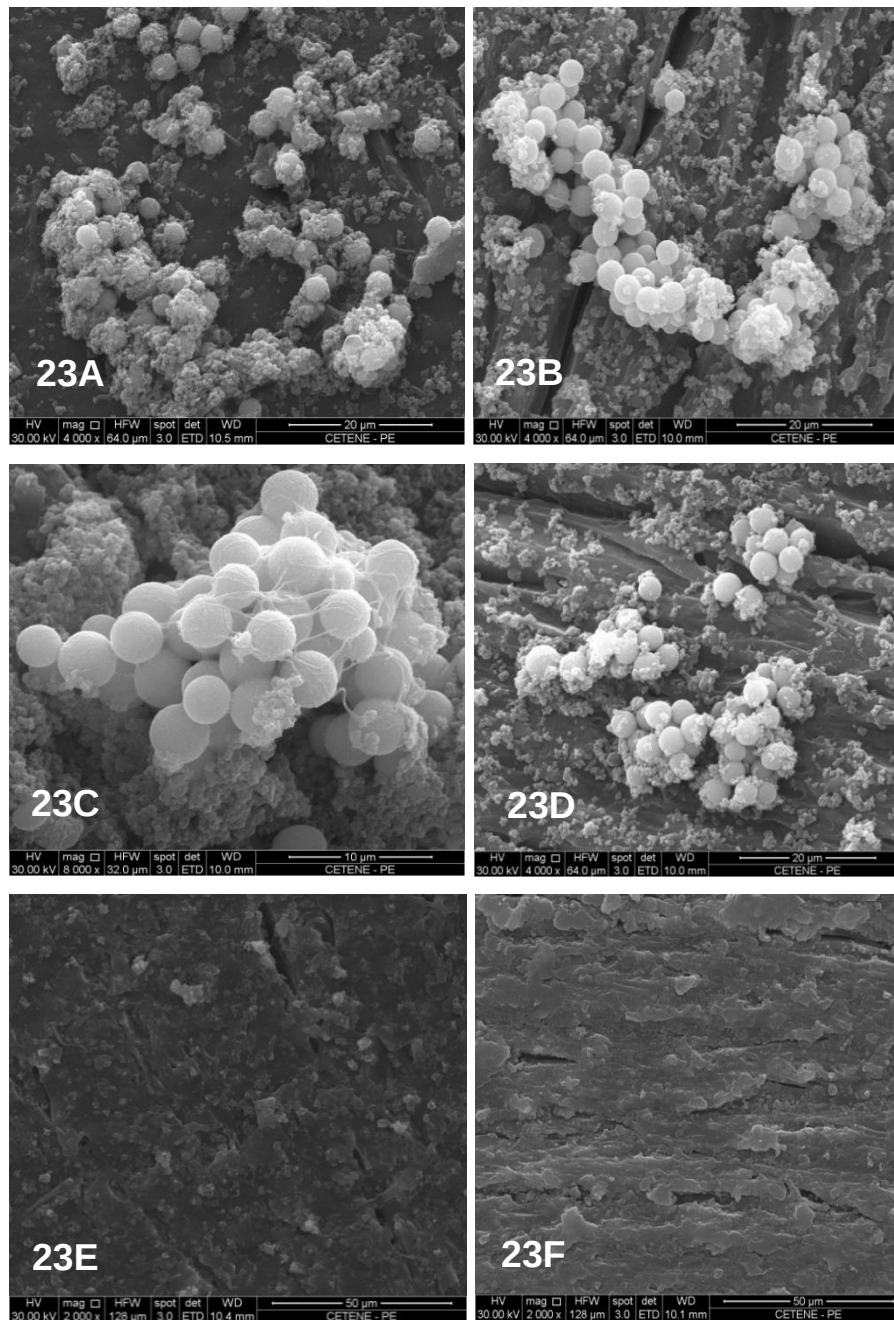
6CN10-nanoesfera foi a segunda melhor nanoformulação, promovendo uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na UFC para 50 % das cepas (URM 6895 e URM 6909) quando comparada ao grupo Controle. Para a linhagem URM 6909, os valores de redução dos grupos tratados com 6CN10-nanoesfera e 6CN10:HP- β -CD-nanoesfera não apresentaram diferença estatística.

Finalmente, o tratamento com 6CN10:HP- β -CD-nanocápsula promoveu uma pequena redução na UFC para as cepas URM 6895 e URM 6906 (em torno de 50 %; $p < 0,05$).

Nossos resultados mostraram apenas um efeito fungistático para os compostos 6CN10-nanoesfera e 6CN10:HP- β -CD-nanocápsula, enquanto 6CN10:HP- β -CD-nanoesfera mostrou atividade fungicida contra o biofilme de *Cryptococcus*.

No presente estudo, os discos de cateter foram utilizados para a formação de biofilme de acordo com Vandenko et al. (2010). A Figura 23 demonstra os discos em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com formação de biofilme. As Figuras 23A e 23B representam os controles positivos que evidenciam o crescimento de *C. neoformans* URM 6906 e *C. neoformans* URM 6907. Nenhuma droga foi usada como controle (apenas o meio YNB), que mostra o crescimento esperado. As Figuras 23C e 23D mostram crescimento de *C. neoformans* URM 6906 e *C. neoformans* URM 6907 com o uso de branco (nanoformulação sem 6CN10). As Figuras 23E e 23F representam o uso de 6CN10:HP- β -CD-nanoesfera contra *C. neoformans* URM 6907 e *C. neoformans* URM 6909 respectivamente, onde não há crescimento das cepas de *Cryptococcus* no biofilme.

Figura 21 - Micrografia eletrônica de varredura após 48 h de formação de biofilme de *Cryptococcus neoformans* em discos de silicone.



URM 6906 (23A) e URM 6907 (23B) apenas em meio YNB (Controle); URM 6906 (23C) e URM 6907 (23D) tratadas com Branco (nanoformulações sem 6CN10); URM 6907 (23E) e URM 6909 (23F) tratados com 6CN10:HP- β -CD-nanoesfera.

4.2 RESULTADOS OBTIDOS COM OS DERIVADOS TIOFÊNICOS OBTIDOS A PARTIR DO 1,4-DITIANO-2,5-DIOL

4.2.1 Sensibilidade Antifúngica *in vitro*

Durante a determinação da concentração inibitória mínima do fármaco, evidenciou-se que as condições para crescimento das leveduras e dermatófitos utilizados foram adequadas, uma vez que o controle positivo realizado em poços contendo apenas o meio de cultura e o inóculo demonstrou crescimento dos fungos após o período de incubação escolhido, enquanto no controle negativo, foi utilizado apenas meio de cultura, evidenciando ausência de crescimento fúngico, como esperado.

Dentre as leveduras testadas (Tabela 7), a *C. parapsilosis* 4970 apresentou o perfil de sensibilidade mais desfavorável, demonstrando crescimento na maior concentração utilizada para os 15 compostos, apresentando atividade moderada apenas para o composto CN05 e CN20 com 128 µg/mL, sendo seguida pela *C. albicans* 4990, tendo seu crescimento na maior concentração testada frente a 13 compostos. A levedura de referência ATCC 22019, mostrou um perfil de sensibilidade moderado para as moléculas CN06, CN11, CN21 e CN23, ambos com CIM de 128 µg/mL.

No que se refere as leveduras do gênero *Cryptococcus*, os dois isolados avaliados apresentaram um ótimo perfil de sensibilidade quando comparados aos isolados das espécies de *Candida*. A cepa 5811 apresentou sensibilidade moderada (CIM 128 µg/mL) frente aos compostos CN03, CN04, CN05 e boa sensibilidade frente aos compostos CN02 (32 µg/mL), CN06 (64 µg/mL), CN07 (8 µg/mL), CN08 (64 µg/mL), CN10 (32 µg/mL), CN11 (32 µg/mL), CN20 (64 µg/mL), CN21 (16 µg/mL). Compostos que possuem grupos indólicos em sua estrutura, como o CN10 e CN11 já apresentaram na literatura atividade antiparasitária (antileishmania), demonstrando que a presença desse grupo é fator potencial para atividade antimicrobiana (RODRIGUES et al. 2015).

As moléculas CN07 e CN10 possuem em sua estrutura química um grupo nitro, sendo este, presente em outros estudos que demonstraram atividade antifúngica, de acordo com Mendonça Júnior et al. (2011), em seu trabalho publicado neste mesmo ano, observaram que os derivados 2-amino-tiofênicos com atividade antifúngica mais

pronunciada foram os cicloalquilo[b]tiofenos que possuíam grupo nitro-aromático ligado a sua porção 2-amino, mostrando resultados satisfatórios frente à *C. neoformans* (CIM 100 – 200 µg/mL), e atividade fraca ou moderada para *Candida* sp. Isso demonstra que a inclusão de um grupo nitro-aromático potencializa uma ação antifúngica.

O *C. neoformans* 5980 apresentou sensibilidade moderada (CIM 128 µg/mL) frente aos compostos CN03, CN05, CN06 e CN11 e boa sensibilidade frente aos compostos CN02 (32 µg/mL), CN07 (64 µg/mL), CN20 (64 µg/mL), CN21 (32 µg/mL) e CN16 (16 µg/mL). No trabalho de Scotti et al. (2012) diferentes cicloalquil[b]tiofeno testados apresentaram boa inibição, com valores de CIM que variam de 78 µg/mL (benzo[b]tiofeno) a 312 µg/mL (ciclohepta[l]tiofeno) frente a cepa de *C. neoformans*.

Tabela 7 - Resultados da avaliação da atividade antifúngica observados de compostos selecionados frente a leveduras.

Cepas testadas nº URM	CN01	CN02	CN03	CN04	CN05	CN06	CN07	CN08	CN09	CN10	CN11	CN12	CN13	CN15	CN17	CN19	CN20	CN21	CN23	Flu ^a	Anf.B
ATCC 22019	1.024	1.024	512	C	C	128	C	1.024	C	C	128	1.024	1.024	1.024	C	C	512	128	128	0.5	0.5
<i>C. albicans</i> 4990	C*	256	256	C	512	C	512	C	C	C	C	C	C	C	1.024	C	512	C	C	0.5	0.25
<i>C. albicans</i> 4987	C	C	C	C	512	C	128	C	C	512	512	C	C	1.024	512	C	C	256	C	2	1
<i>C. albicans</i> 4986	C	C	512	C	C	C	C	C	1.024	C	512	C	C	1.024	512	C	128	C	C	2	0.5
<i>C. parapsilosis</i> 4984	C	C	C	C	256	512	C	512	C	C	C	C	C	512	C	C	128	C	512	0,25	1
<i>C. parapsilosis</i> 4970	C	C	C	C	128	C	C	C	512	C	C	C	C	C	C	1.024	128	C	C	1	1
<i>C. neoformans</i> 5811	512	C	128	128	128	64	8	64	1.024	32	32	1024	512	512	512	C	64	16	512	>64	0.25
<i>C. neoformans</i> 5980	512	32	128	512	128	128	64	512	1.024	C	128	C	C	512	512	C	64	32	16	>64	0.25

Atividade antifúngica dos derivados tiofênicos, fluconazol e anfotericina B frente a isolados de leveduras. Os resultados estão expressos em µg/mL.

C* = Crescimento até a Concentração mais alta testada. Valores de CIM acima de 1.024 µg/mL.

URM = Coleção de culturas Universidade Recife Micologia.

ATCC = American Type Culture Collection.

Dentre os dermatófitos testados, (Tabela 8) o *E. floccosum* 6754 apresentou no perfil de sensibilidade redizido, demonstrando crescimento na maior concentração utilizada para 13 compostos, tendo atividade moderada apenas para o composto CN19 (256 µg/mL). Seguindo a cepa supracitada, o *T. mentagrophytes* 5431 apresentou crescimento na maior concentração testada frente a 11 compostos, tendo seu CIM variável nas demais moléculas (128 – 1.024 µg/mL).

O *E. floccosum* 6999 apresentou o melhor perfil de sensibilidade dentre os dermatófitos, demonstrando resultados que variaram de 1.024 – 16 µg/mL. As moléculas CN06 (128 µg/mL), CN06 (32 µg/mL), CN07 (64 µg/mL), CN12 (128 µg/mL), CN15 (256 µg/mL), CN17 (256 µg/mL) CN19 (16 µg/mL) e CN20 (256 µg/mL).

O isolado *T. rubrum* 6753 apresentou ótimo perfil de sensibilidade, demonstrando resultados de CIM que variaram de 1.024 a 32 µg/mL. As moléculas CN05 (64 µg/mL), CN10 (64 µg/mL) e CN13 (64 µg/mL), CN17 (64 µg/mL) e CN21 (32 µg/mL) apresentaram a melhor atividade frente a esse dermatófito.

Já o *T. tonsurans* 700 apresentou um perfil de sensibilidade aproximado para algumas moléculas testadas igualmente para o *T. rubrum* 6753 como: CN05 (64 µg/mL), CN10 (128 µg/mL), CN21 (64 µg/mL). O composto mais promissor frente ao *T. tonsurans* 700 foi o CN19, que apresentou um CIM de 32 µg/mL.

Para o *T. tonsurans* 2822, a maioria dos compostos demonstraram atividades que variaram de 1.024 a 256 µg/mL, excetuando-se o composto CN19, que apresentou CIM de 32 µg/mL.

O *E. floccosum* 6754 e o *T. mentagrophytes* 5431 apresentaram o perfil de sensibilidade mais desfavorável, demonstrando perfil de sensibilidade variável de 128 – 1.024 µg/mL.

Pôde-se observar que os compostos CN05 (2,6-diclorobenzaldeído), CN06 (2-nitrobenzalaldeído), CN07 (3-nitrobenzalaldeído), CN10 (4-nitroindol-3-carboxaldeído) CN13 (4-nitrobenzalaldeído), CN17 (3,4,5-trimetoxibenzaldeído), CN19 (hidrogênio/composto não substituído), CN21 (4-bromobenzaldeído) apresentaram os melhores resultados para dermatófitos, com valores de CIM variando entre 16 – 64 µg/mL, sendo alguns até melhores que o fluconazol,

utilizado com referência. Dentre eles, o grupo nitro está presente nos compostos CN06 e CN07, demonstrando que sua presença é um fator importante para atividade antifúngica, como supracitado.

A molécula CN05 que apresenta em sua estrutura halogênios como cloro (Cl), apresentou ótima atividade frente ao *T. tonsuran* 700 e *T. rubrum* 6753. De acordo com Mendonça Júnior et al. (2011), a presença de halogênios (Cloro e Flúor) é intimamente relacionada às estruturas químicas da maioria dos derivados azólicos, tais como miconazol, clotrimazol, econazol e cetoconazol. Outros grupos halogênicos como o Flúor (F), estão presentes no fluconazol, voriconazol, posaconazol, ruvaconazol e albaconazol, sendo importantes grupos relacionados à atividade antifúngica desses derivados. Outros halogênios como Bromo (Br) estão presentes nos compostos CN21 que apresentou ótima atividade frente aos dermatófitos.

Tabela 8 - Resultados da avaliação da atividade antifúngica observados de compostos selecionados frente a fungos dermatófitos.

Cepas testadas nº URM	CNO1	CNO2	CNO3	CNO4	CNO5	CNO6	CNO7	CNO8	CNO9	CNO10	CNO11	CNO12	CNO13	CNO15	CNO17	CNO19	CNO20	CNO21	CNO23	Flu ^c	Cet
ATCC 22019	1.024	1.024	512	C	C	128	C	1.024	C	C	128	1.024	1.024	1.024	C	C	512	128	128	0,5	0,06
<i>E. floccosum</i> 6999	256	128	256	128	C	32	64	C	C	1.024	C	128	1.024	256	256	16	256	512	C	16	0,1
<i>E. floccosum</i> 6754	1.024	C*	C	C	C	C	C	1.024	512	C	C	C	512	C	C	256	C	512	C	2	0,1
<i>T. tonsurans</i> 700	1.024	C	256	C	64	C	C	1.024	C	128	C	256	512	C	128	32	C	64	C	>64	0,06
<i>T. mentagrophytes</i> 5431	1.024	1.024	256	C	C	C	C	C	128	C	C	1.024	C	C	256	C	C	128	1.024	32	0,1
<i>T. rubrum</i> 6753	1.024	1.024	C	C	32	C	128	C	C	64	C	1.024	64	C	64	C	C	32	1.024	64	0,06
<i>T. mentagrophytes</i> 5432	1.024	1.024	512	C	C	C	C	1.024	512	512	C	512	C	C	128	256	C	1.024	C	64	0,03
<i>T. tonsurans</i> 2822	1.024	1.024	C	C	256	C	C	1.024	C	512	C	1.024	C	C	C	32	C	1.024	C	32	0,06

Atividade antifúngica dos derivados tiofênicos, fluconazol e cetoconazol frente a isolados de dermatófitos. Os resultados estão expressos em µg/mL.

C* = Crescimento até a Concentração mais alta testada. Valores de CIM acima de 1.024 µg/mL.

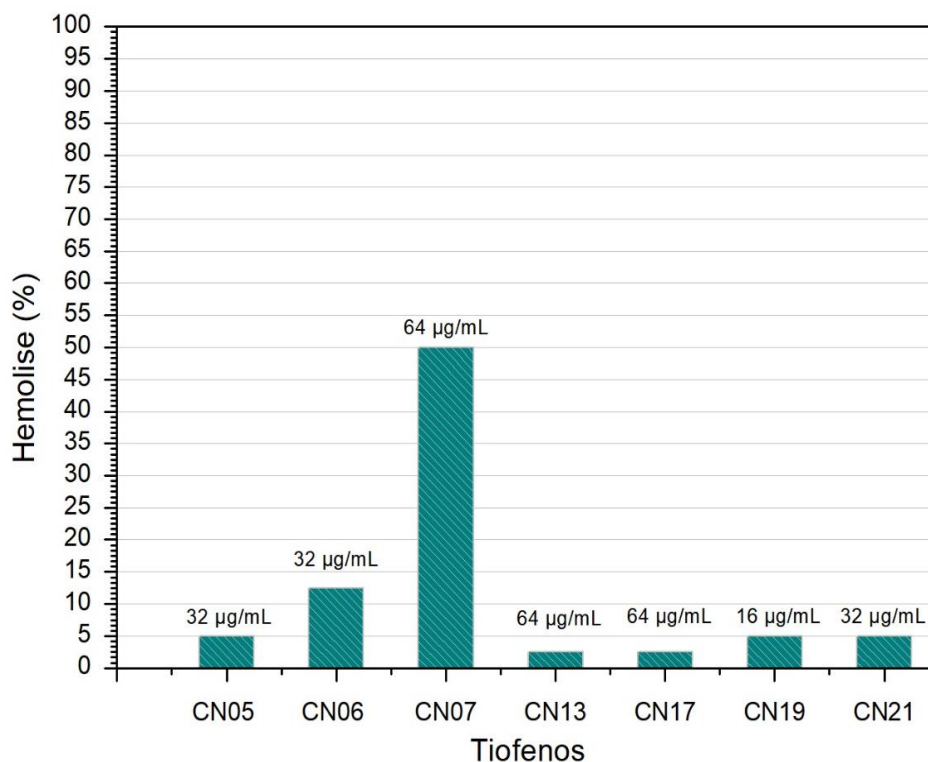
URM = Coleção de culturas Universidade Recife Micologia.

ATCC = American Type Culture Collection.

4.2.2 Atividade Hemolítica dos Derivados 2-Aminotiofênicos

Os valores da atividade hemolítica derivados 2-aminotiofênicos com atividade antifúngica estão descritos na Figura 24 por meio de valores em porcentagem de hemólise. As moléculas CN05, CN19 e CN21 na concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram uma taxa de hemólise de 5 %. A molécula CN06 (32 $\mu\text{g/mL}$) apresentou uma taxa moderada de hemólise (12,5 %) e a CN07 (64 $\mu\text{g/mL}$) apresentou a maior taxa de atividade hemolítica (50 %). As moléculas CN13 e CN17 (64 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram as menores taxas de hemólise, sendo 2,5 %.

Figura 22 - Porcentagem da atividade hemolítica de sete derivados 2-aminotiofênicos.



4.2.3 Avaliação da Toxicidade dos Derivados 2-Aminotiofênicos em Células Vero, MRC-05 e 3T3

A análise da toxicidade frente as células Vero, MRC-05 e 3T3 não revelou diferenças na viabilidade celular em nenhuma das concentrações avaliadas após 72h de incubação (Tabela 9). A Figura 25, 26 e 27 demonstram a viabilidade celular de diferentes células frente aos derivados 2-amino-tiofênicos. Todas as amostras apresentaram um perfil semelhante de resultados.

Tabela 9 - Citotoxicidade celular demonstrada pela concentração do IC₅₀ frente as linhagens não-tumorais Vero, MRC-05 e 3T3.

Derivados Tiofênicos	Vero	MRC-05	3T3
CN05	>100±0	>100±0	>100±0
CN06	>100±0	>100±0	>100±0
CN07	>100±0	>100±0	>100±0
CN13	>100±0	>100±0	>100±0
CN17	>100±0	>100±0	>100±0
CN19	>100±0	>100±0	>100±0
CN21	>100±0	>100±0	>100±0

Figura 23 - Curva de viabilidade celular de células epiteliais de rim de macaco (VERO) frente aos derivados 2-aminotiofênicos.

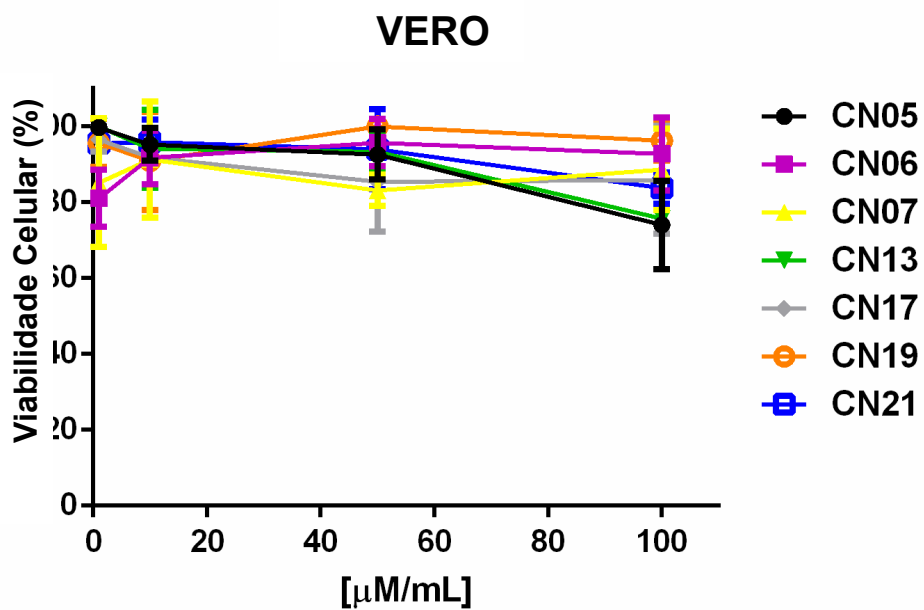


Figura 24 - Curva de viabilidade celular de fibroblastos murinos (3T3) frente aos derivados 2-aminotiofênicos.

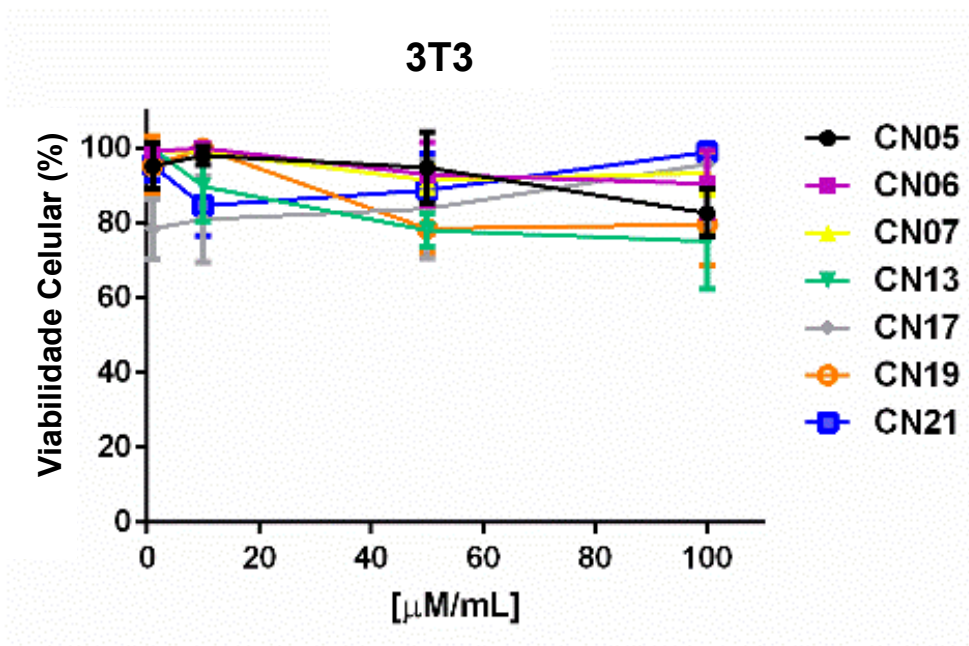
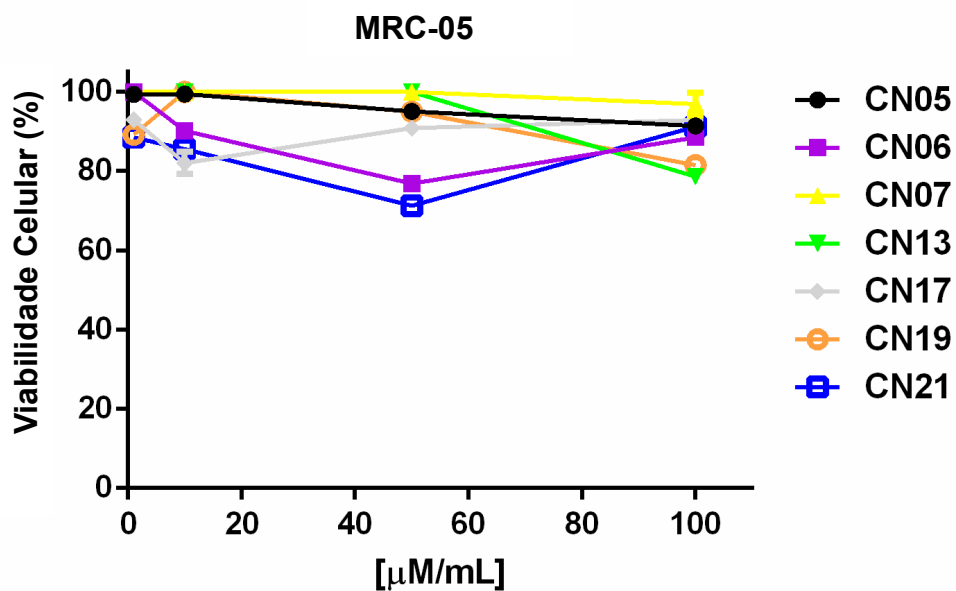


Figura 25 - Curva de viabilidade celular de fibroblastos humanos (MRC-05) frente aos derivados 2-aminotiofênicos.



5 CONCLUSÕES

A incorporação de 6CN10 e mais evidencialmente 6CN10 complexado com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (6CN10: HP- β -CD) em nanossistemas como nanoesferas e nanopartículas provou ser uma excelente maneira de minimizar propriedades físico-químicas indesejadas inerentes às drogas, em particular sua baixíssima solubilidade, o que tornou menos atraente a ideia de realizar estudos *in vivo*.

A complexação do fármaco com HP- β -CD promoveu um incremento da “solubilidade em água” sem alterar sua estrutura química, neste contexto foi possível uma menor quantidade de droga para manter a mesma atividade antifúngica, o que certamente contribuirá para minimizar a possibilidade de ocorrência de efeitos colaterais ao realizar estudos *in vivo*.

No que se refere aos derivados 2-amino-tiofênicos obtidos a partir do 1,4-ditiano-2,5-diol, a maioria dos compostos utilizados tiveram fraca ou moderada atividade antifúngica frente a leveduras do gênero *Candida*, demonstrando baixo potencial antifúngico para utilização dos compostos como droga livre. Para o *Cryptococcus* sp., as moléculas CN02, CN06, CN07, CN08, CN10, CN11, CN20, CN21 e CN23 apresentaram resultados bastante satisfatório, uma vez que foi obtido valor de CIM de 8 μ g/mL para a molécula CN07, sendo esta, a menor concentração inibitória encontrada.

Os resultados apresentados nesta pesquisa sugerem que os derivados 2-amino-tiofenos obtidos a partir do 1,4-ditiano-2,5-diol podem ser utilizado como potencial agente antifúngico contra *Cryptococcus neoformans* e dermatófitos, e o composto 6CN10 complexado com 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (6CN10:HP- β -CD) em nanossistemas com potencial para leveduras do gênero *Candida* e *Cryptococcus*, ambos podendo ser considerados favoráveis para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos e promissores para a indústria farmacêutica.

Em relação aos testes de citotoxicidade me células não transformadas, as moléculas testadas apresentaram valores de IC₅₀ não tóxicos frente as células VERO, 3T3 e MRC-5.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. S.; FERREIRA, P. M. T.; MONTEIRO, L. S. et al. Synthesis of pure stereoisomers of benzo[b]thienyl dehydrophenylalanines by Suzuki cross-coupling. Preliminary studies of antimicrobial activity. **Tetrahedron**. v. 60, p. 821-828, 2004.
- ADHIKARY, R.; JOSHI, S. Species distribution and anti-fungal susceptibility of Candidaemia at a multi super-specialty center in Southern India. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 29, n 3, p. 309-311, 2011.
- ADIBKIA, K. et al. Physicochemical characterization of naprox solid dispersions prepared via spray dry technology. **Power Technology**, v. 246, p. 448-455, 2013.
- AGUIAR. M. M. G. B. et al. Oral sustained release nystatin tablets for the treatment of oral candidiasis: formulation development and validation of UV spectrophotometric analytical methodology for content determination. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 36, n. 5, p. 594-600, 2010.
- AGUIARA, A. C. V.; MOURAB, R. O.; JUNIOR, C. J. F. B. M.; ROCHAD, H. A. O.; CÂMARAD, R. B. G.; SCHIAVONA, M. S. C. Evaluation of the antiproliferative activity of 2-amino thiophene derivatives against human cancer cells lines. **Biomedicine & Pharmacotherapy** v. 84 p. 403–414, 2016.
- AHMADI, A. et al. Invasive candidiasis in intensive care unit; consensus statement from an Iranian panel of experts, July 2013. **JRSM open**, v. 5, n. 3, p. 1-10, 2014.
- AINSWORTH, G. C. Introduction to the history of medical and veterinary mycology. **Cambridge: University Press**, 1986.
- AJELLO, L. Natural history of the dermatophytes and related fungi. **Mycopathol Mycol Appl**. v. 53, p. 93–110, 1974.
- AJELLO, L. The Dermatophyte, *Microsporum Gypseum*, As a Saprophyte and Parasite Fungus. **The Journal of Investigative Dermatology**. April 13, 1953.
- ALMEIDA, R. S. et al. The hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 11, p. 1–17, 2008.
- ALMIRANTE, B.; RODRIGUES, D.; PARK, B. J. Epidemiology and predictor of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1829-35, 2005.
- ALOMAR, K. et al. Synthesis, crystal structure, characterization of zinc(II), cadmium(II) complexes with 3-thiophene aldehyde thiosemicarbazone (3TTSCH). Biological activities of 3TTSCH and its complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 104, p. 397–404, 2010.

ALONSO-VALLE, H.; et al. Candidemia in tertiary care hospital: epidemiology and factors influencing mortality. **European Clinical Microbiology Infectious Disease**, v. 22, p. 254-7, 2003.

ALSPAUGH, J. A. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Fungal Genetics and Biology**. v. 78, p. 55-58, 2015.

AL THAQAFI, A. H. O. et al. Predictors and outcomes of *Candida* bloodstream infection: Eight-year surveillance, Western Saudi Arabia. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 5–9, 2014.

ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 319–327, 2007.

ALVES, L. D. S. et al. Avanços, propriedades e aplicações de dispersões sólidas no desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.33, n. 1, p. 17-25, 2012.

AMIDON, G. L. et al. A theoretical basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n.3, p. 413-429, 1995.

ANTINORI, S.; MILAZZO, L.; SOLLIMA, S. et al. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. **European Journal of Internal Medicine**. v. 34, p. 21-28, 2016.

ANTUNES, A. G. et al. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Revista do Instituto de Medicina Tropical** , São Paulo, v. 46, n. 5, p. 239-41, 2004.

AQUINO, V. R. et al. Prevalence, susceptibility profile for fluconazole and risk factors for candidemia in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 5, p. 411-8, 2005.

ASHTON, P. M. et al. Three phylogenetic groups have driven the recent population expansion of *Cryptococcus neoformans*. **Nature Communications**; v. 10:2035, p. 1-9, 2019.

BADDLEY, J. W. Forrest GN. Cryptococcosis in solid organ transplantation. **American Journal of Transplantation**. V. 242, p. 9-11, 2013.

BANERJEE, P.; HAIDER, M.; TREHAN, V. et al. *Cryptococcus laurentii* fungemia. **Indian Journal of Medical Microbiology**. v. 31(1): p. 75–79, 2013.

BARBERINO, M. G. et al. Evaluation of blood stream infections by *Candida* in three tertiary hospitals in Salvador, Brazil: a case-control study. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 36-40, 2006.

BARNETT, J. A.; PAIRE, R. W.; YARROW, D. *Yeasts: Characteristics and Identification*. 3rd ed. **Cambridge University Press**: Cambridge, USA. 2000.

BARON, E. J.; PETERSON, L. R.; FINEGOLD, S. M. **Diagnostic Microbiology**. 9. ed. St Louis: Mosby, 1994.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos**. 2ª Ed; Artmed, Porto Alegre, 2008.

BASSETTI, M.; ANSALDI, F.; NICOLINI, L. et al. Incidence of candidaemia and relationship with fluconazole use in an intensive care unit. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. 625-629, 2009.

BASSETTI, M.; MERELLI, M.; RIGHI, E.; et al. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in Italy and Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, p. 4167-4172, 2013.

BASSETTI, M.; RIGHI, E.; ANSALDI, F. et al. A multicenter study of septic shock due to candidemia: outcomes and predictors of mortality. **Intensive Care Medicine**, v. 40, p. 839-845, 2014.

BERGER, T. G. Distúrbios dermatológicos. In: Organizadores. MCPHEE. S. J.; PAPADAKIS, M. A.; RABOW. M. W. Tradução: FONSECA. A. V., et.al. **CURRENT medicina: diagnóstico e tratamento**. 51. ed. Porto Alegre: AMGH. 6:89–155, 2013.

BEYT, B. E.; WALTMAN, S. R. Cryptococcal endophthalmitis after corneal transplantation. **The New England Journal of Medicine**, v. 298, p. 825-826, 1978.

BLEVINS, K. S. **Micologia Médica: Texto e Atlas**. 2. ed. São Paulo: Premier, 1999.
BODIN, E. : Su Run nouveau champignon du favus (Achorion gypseum). **Ann. de dermat.** et syph., v. 8, p. 585—602, 1907.

BOECHAT J. L.; RIOS J.L. Poluição de Ambientes Internos. **Revista Brasileira de Alergia**. v. 34, p. 83-89, 2011.

BRILHANTE, R. S. et al. Epidemiologia e ecologia das dermatofitoses na cidade de Fortaleza: o Trichophyton tonsurans como importante patógeno emergente da *Tinea capitis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 5, p. 417–425, 2000.

BRIZENDINE, K. D.; BADDLEY, J.W.; PAPPAS, P.G. Predictors of mortality and differences in clinical features among patients with Cryptococcosis according to immune status. **PLoS One**. v. 8, 2013.

BROOKS, G. S. et al. **Microbiologia médica**. 20.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 524, 1998.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. AMGH editora Ltda. 12 ed, 2012.

BURNETT, J. H. **Fundamentals of mycology**. 2.ed. Edward Arnold, London. p. 673, 1976.

CABRITA J. Micoses. In: ESTEVES, J.A. et al. **Dermatologia**. 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1992. p. 1063-1096.

CAMERON R. et al Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature**, v. 398, p. 701–704, 2009.

CAPPELLETTY, D.; EISELSTEIN-MCKITRICK, K. The echocandins. **Pharmacotherapy**, v. 27, p. 369-388, 2007.

CATE, J.M. et al. Molecular and cellular mechanism that lead to *Candida* biofilm formation. **Journal of Dental Research**, v. 88, n.2, p. 105-115, 2009.

CHADEGANIPOUR, M.; NILIPOUR S.; HAVAEI, A. In vitro evaluation of griseofulvin against clinical isolates of dermatophytes from Isfahan. **Mycoses**. v. 47, p.503-7, 2004.

CHEN, C. Y. et al. Clinical characteristics of candidaemia in adults with haematological malignancy, and antimicrobial susceptibilities of the isolates at a medical centre in Taiwan, 2001-2010. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 6, p. 533–538, 2012.

CHIMELLI, P. A. V.; SOFIATTI, A. A.; NUNES, R. S.; MARTINS J. Dermatophyte Agents in the Cite of São Paulo, from 1992 to 2002. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45: p. 259-263, 2003.

CHORILLI, M.; BRIZANTE, A. C.; RODRIGUES, C. A.; SALGADO, H. R. N. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, p. 7-13, 2007.

CLANCY, C. J.; NGUYEN, M. H. Finding the "missing 50%" of invasive candidiasis: how nonculture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. **Clinical Infectious Disease**, v. 56, p. 1284, 2013.

CLEVELAND, K. O.; GELFAND, M. S.; RAO, V. Posaconazole as successful treatment for fungemia due to *Cryptococcus albidus* in a liver transplant recipient. **International Journal of Medicine**, v. 106, p. 361–2, 2013.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved standard-3rd edition M27-A3**; Wayne, PA, USA, 2008.

COLEMAN, D. C. et al. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. **Medicine Mycology**. v.36, n.1, p.156-65, 1998.

COLOMBO, A. L. Brazilian guidelines for the management of candidiasis – a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia,

Sociedade Paulista de Infectologia e Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283-312, 2013.

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

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, A. S.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44: p. 2816-2823, 2006.

CORNELY, O. A. et al. Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. **The New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 4, p. 348–359, 2007.

COSTA, I. C.; FELIPE, I.; GAZIRI, L. C. J. Resposta imune a *Candida albicans*. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 1, p. 27-40, 2008.

COSTA, M. et al. Epidemiologia e etiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 1, p. 19–22, 2002.

DÂNGELO, J. G.; FATTINI, C. A. **Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar**. 2 ed. São Paulo: Editora Atheneu, p. 121, 1998.

DE CASTRO, N. et al. Hepatosplenic candidiasis in the era of new antifungal drugs: A study in Paris 2000-2007. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 6, p. E185–E187, 2012.

DE LA SERNA, J. et al. Treatment of invasive fungal infections in high risk hematological patients. The outcome with liposomal amphotericin B is not negatively affected by prior administration of mold-active azoles. **Revista Española de Quimioterapia** v.26, n.1, p.64–9, 2013.

DE ROSSI, T. et al. Interações entre *Candida albicans* e hospedeiro. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 1, p. 15-28, 2011.

DEMITTO, F. D. O.; AMARAL, R. DO. Suscetibilidade a antifúngicos in vitro de *Candida* spp. em pacientes do Hospital Universitário Regional de Maringá-PR. **Jornal Brasileiro Patologia e Medicina**, v. 48, p. 315–321, 2012.

DEVIRIM, İ. et al. A 7-year study of the distribution of nosocomial candidemia in children with cancer. **The Turkish Journal of Pediatrics**, v 57, n. 3 p. 225–229, 2015.

DHIRENDRA, K. et al. Solid dispersion: a review. **Pakistan Journal Pharmaceutical Sciences**, v.22, n. 2, p. 234-246, 2009.

DÍEZ-SALES, O. *In Vitro* percutaneous penetration of acyclovir from solvent systems and Carbopol® 971-P hydrogels: influence of propylene glycol. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, n. 5, p. 1039-1047, 2005.

DIOMEDI P. A. et al. Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas. **Revista Chilena de Infectología**, v. 21, n. 2, p. 89–101, 2004.

DIOMEDI, P. A. et al. Nuevos antifúngicos: Las equinocandinas. **Revista Chilena de Infectología**, v. 21, n. 2, p. 89–101, 2004.

DISMUKES, W. E. Introduction to antifungal drugs. **Clinical Infectious Diseases**, v.30, p 653-657, 2000.

DOI, A. M. et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **Plos one**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2016.

DJEKIC, L. et al. Characterization of gelation process and drug release profile of thermosensitive liquid lecithin/poloxamer 407 based gels as carriers for percutaneous delivery of ibuprofen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 490, n. 1-2, 180-189, 2015.

DOI, A. M. et al. Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **Plos one**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2016.

DU, J. D. et al. A novel approach to enhance the mucoadhesion of lipid drug carries for improved drug delivery to the buccal mucosa. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 471, n.1-2, p. 358-365, 2014.

ELEAMEN, GIOVANNA R. A. et al. Improvement of Solubility and Antifungal Activity of a New Aminothiophene Derivative by Complexation with 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 1, p. 1-10, 2017.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2008
FALAGAS, M. E.; ROUSSOS, N.; VARDAKAS, K. Z. Relative frequency of *albicans* and the various non-*albicans* *Candida* spp among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: A systematic review. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 11, p. e954–e966, 2010.

FANG, X.; LI, J.; TAO, H. Y.; WANG, C. J. Highly diastereoselective DABCO-catalyzed [3+3]-cycloaddition of 1,4-dithiane-2,5-diol with azomethine imines. **Organic. Letters**, v. 15, p. 5554-7, 2013.

FARAH, C.; ASHMAN, R.; CHALLACOMBE, S. J. Oral Candidosis. **Clinics in Dermatology**, v. 18, p. 553-562, 2000.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5. ed. Brasília: **Agência de Vigilância Sanitária/Fundação Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 267, 268, 2010.

FARMAKIOTIS, D. et al. Early initiation of appropriate treatment is associated with increased survival in cancer patients with *Candida glabrata* fungaemia: A potential benefit from infectious disease consultation. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 1, p. 79–86, 2015.

FERGUSON, A. C.; ADLINGTON, R. M.; MARTYRES, D. H.; RUTLEDGE, P. J.; COWLEY, A.; BALDWIN, J. E. Total synthesis of a novel 2-thiabicyclo[3.2.0]heptan-6-one analogue of penicillin N. **Tetrahedron**, v. 59, p. 8233–8243, 2003.

FERREIRA, V. F.; BARRETO, E. J.; COSTA, P. R. R. Substâncias Enantiomericamente Puras (SEP): A Questão dos Fármacos Quirais. **Química Nova**, V. 20, p. 647-656. 1997.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P. et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. 25-28, 1989.

FEULARD, H. **Teignes et Teignaux**. Paris, Georges Steinheil, Editeur, 1886.
FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L.C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 167–194, 2006.

FILIÚ, W. F. O.; et al. Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na Cida de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, p 591-595, 2002.

FLORES L. H.; ONOFRE S.B. Determinação da presença de fungos anemófilos e leveduras em unidade de saúde da cidade de Francisco Beltrão. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 5, p. 22-26, 2010.

FILIÚ, W. F. O.; et al. Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na Cida de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, p 591-595, 2002.

FREDRICKS, D. N.; FIEDLER, T. L.; MARRAZZO, J. M. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 18, p. 1899-1911, 2005.

FREIRE, F. C. O.; et al. Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal. **Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza, 2007.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; SCHETINI, D. A.; ROCHA, O. G. F. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, v.28, p 511-518, 2005.

FRIES, B. C.; COX, G. M. Cryptococcosis in AIDS. In: *Cryptococcus: From Human Pathogen to Model Yeast*. Heitman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A (Eds). **American Society for Microbiology**, Washington, DC, USA, p 515–526, 2011.

FUENTEFRIA, A. M.; ANDRADE, S.F.; SILVEIRA, G.P.; KULKAMP, I.; PIPPI, B.; MACHADO, M.M.; OLIVEIRA, L.F.S.; CRUZ, L. CLARISSA, A.F.M. Caracterização do perfil de susceptibilidade a antifúngicos azólicos de uma micoteca como

embasamento para estratégias de combate à candidemia, **Journal of Infection Control**, v. 5, p. 1-14, 2016.

FURLETTI, V. F. Action of *Coriandrum sativum* L. essential oil upon oral *Candida albicans* biofilm formation. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1-9, 2011.

FURTADO, M. S. S. et al. Dermatofitoses na Cidades de Manaus – AM. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 62, n. 4, p. 195-196, 1987.

GABIZON, A.; GOREN, D.; HOROWITZ, A. T.; TZEMACH, D.; LOSSOS, A.; SIEGAL, T. Long-circulating liposomes for drug delivery in cancer therapy: a review of biodistribution studies in tumor-bearing animals. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.24, p 337-344, 1997.

GAFTER-GVILI, A.; VIDAL, L.; GOLDBERG, E.; et al. Treatment of invasive *Candida* infections: systematic review and meta-analysis. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 83, p. 1011, 2008.

GAMALETSOU, M. N. et al. A prospective, cohort, multicentre study of candidaemia in hospitalized adult patients with haematological malignancies. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 1, p. 50–7, 2014.

GARRILL, A. Transport, In: N.A.R. Gow&G.M. Gadd(Eds). **The Growing Fungus**, Chapman & Hall. UK, p. 473, 1995.

GHANNOUM, M. A.; et al. Interlaboratory study of quality control isolates for a broth microdilution method (modified CLSI M38-A) for testing susceptibilities of dermatophytes to antifungals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 4353-4356, 2006.

GHERNA, M.; MERZ, W. G. Identification of *Candida albicans* and *Candida glabrata* within 1.5 hours directly from positive blood culture bottles with a shortened peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization protocol. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 247, 2009.

GILL, H. S.; ANDREWS, S. N.; SAKTHIVEL, S. K. et al. Selective removal of stratum corneum by microdermabrasion to increase skin permeability. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38(2), p. 95-103, 2009.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

GOMPERTZ, O. F.; GAMBALE, V.; CORRÊA, B.; PAULA, C. R. Características gerais dos fungos. In: **Microbiologia**, p. 888 , 2015.

GONÇALVES, S.S. et al. Prevalence rates and antifungal susceptibility profiles of the *Candida parapsilosis* species complex: Results from a nationwide surveillance of

candidaemia in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 7, p. 885–887, 2010.

GOSWAMI, L.; NEOG, K.; SHARMA, K.; GOGOI, P. A. Metal-free cascade reaction of β -halo- α,β -unsaturated aldehydes and 1,4-dithiane-2,5-diols: synthesis of polycyclic 2-formylthiophenes. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 15, p. 6470–6473, 2017.

GRAVESEN S. Microfungal contamination of damp buildings: biological aspects. In: **Bioaerosols, Fungi and Mycotoxins**. Ed Johanning E. New York: Eastern New York Occupational and Environmental Health Center; p. 505-11, 1999.

GREEN B. J, SERCOMBE J. K, TOVEY E. R. Fungal fragments and undocumented conidia function as new aeroallergen sources. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 115, p.1043-8, 2015.

Gruby D. Sur les mycodermes qui constituent la teigne faveuse. **C R Hebd Se'anc Acad Sci Paris**, v. 13, p. 309–312, 1841.

GUIART, J. AND GRIGORARTS, Z.: La classification botaniques des teignes. **Lyon Med**, v. 141: p. 369-378, 1928.

GUIDO, R. et al. Planejamento De fármacos, Biotecnologia E Química Medicinal: Aplicações Em Doenças Infecciosas. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 14, n. 70, p. 81-98, 2010.

GUIMARÃES, G. P.; REIS, M. Y. F. A.; SILVA, D. T. C. et al. Antifungal activity of topical microemulsion containing a thiophene derivative Brazilian. **Journal of Microbiology** v. 45, 2, p. 545-550, 2014.

GULLO, F. P.; ROSSI, S. A.; SARDI, J. C.; TEODORO, V. L.; MENDES-GIANNINI, M. J.; FUSCO-ALMEIDA, A. M. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 32, n. 11, p. 1377-91, 2013.

GUNGOR, S.; ERDAL, M. S.; AKSU, B. New Formulation Strategies in Topical Natifungal Therapy. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciencesnad Applications**, v. 3, n. 1, p. 56-65, 2013.

GUPTA, A. K, DRUMMOND-MAIN C. Meta-analysis of randomized, controlled trials comparing particular doses of griseofulvin and terbinafine for the treatment of tinea capitis. **Pediatric Dermatology**, v. 30(1), p. 1-6, 2013.

GUPTA, A. K.; CHAUDHRY, M.; ELEWSKI, B. Tinea corporis, tinea cruris, tinea nigra, and piedra. **Dermatologic Clinics**, v. 21(3) p. 395-400, 2013.

HACHEM, et al. "Posaconazole as salvage treatment of invasive fungal infections in patients with underlying renal impairment." **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 62, no. 6, p. 1386–91, 2008.

HARRIS, J. R.; LOCKHART, S. R.; DEBESS, E. et al. *Cryptococcus gattii* in the United States: clinical aspects of infection with an emerging pathogen. **Clinical Infectious Disease**, v. 53(12), p. 1188–95, 2011.

HAVLICKOVA, B.; FRIEDRICH, M. “Epidemiological Trends in Skin Mycoses Worldwide,” *Mycoses*, Vol. 51, **Suppl.** v. 4, p. 2-15, 2008.

HILL, J.O. CD4+ T cells cause multinucleated giant cells to form around *Cryptococcus neoformans* and confine the yeast within the primary site of infection in the respiratory tract. **Journal of Experimental Medicine**, v. 175, p. 1685-1695, 1992.

HILLER, E.; ZAVREL, M.; HAUSER, N. Adaptation, adhesion and invasion during interaction of *Candida albicans* with the host-focus on the function of cell wall proteins. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, p. 384-380, 2011.

HINRICHSEN, S. L.; et al. *Candida* isolates in tertiary hospitals in northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 325-8, 2009.

HINRICHSEN, S. L.; et al. Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 394-398, 2008.

HOOG, G. S.; GUARO, J.; GENE, J.; FIGUERAS, M. J. *Atlas of Clinical Fungi*; Utrecht/Reus, Netherland: **Centraal bureau voor Schimmelcultures/Universit at Rovira i Virgili**, 2000.

HORN, D. L. et al. Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 2019 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance Registry. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, n. 12, p. 1695–1703, 2009.

HU, L.; ZHANG, H.; SONG, W.; GU, D.; HU, Q.; Carbohydr. **Polym.** 2012, v.90, 1719.

HUFFNAGLE, G. B.; STRIETER, R.M.; MCNEIL, L. K. Macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-alpha) is required for the efferent phase of pulmonary cell-mediated immunity to a *Cryptococcus neoformans* infection. *Journal of Immunology*, v. 159, p. 318- 327, 1997.

HUFFNAGLE, G. B.; TRAYNOR, T. R.; MCDONALD, R. A. Leukocyte recruitment during pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *Immunopharmacology*, v. 48, p. 231-236, 2000.

HUGHES, W. T. et al. Guidelines for the Use of Antimicrobial Agents in Neutropenic Patients With Cancer. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 34, n. 6, p. 730–751, 2002.

HULL, C.M.; HEITMAN, J. Genetics of *Cryptococcus neoformans*. **Annual Review of Genetics**, v. 36, p. 557-615, 2002.

HWANG, Y. Y.; SHIN, D. C.; NAM, Y. S.; CHO, B. K.;
Journal of Industrial and Engineering Chemistry, v. 18, p. 1412, 2012.

IKEDA, R.; SHINODA, T.; FUKAZAWA, Y.; KAUFMAN, L. Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, p. 22-29, 1982.

ISLAM, S.; DAS, A.; ISLAM, N. Cryptococcosis in organ transplantation.
Mymensingh Medical Journal, v. 19, n. 1, p. 142-3, 2010.

JAWETZ, E. ; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. **Microbiologia médica**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 524, 1998.

JIN, H.; SIDDIQUI, M. A.; EVANS, C. A.; TSE, H. L. A.; MANSOUR, T. S.;
 GOODYEAR, M. D.; RAVENSCROFT, P.; BEELS, C. D. Diastereoselective synthesis of the potent antiviral agente (-)-2'-deoxy-3'-thiacytidine and its enantiomer.
Journal of Organic Chemistry, v. 60, p. 2621–2623, 1995.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 8.ed., Rio de Janeiro :Guanabara Koogan, 2005 .

KAHN, J. N. et al. Acquired echinocandin resistance in a *Candida krusei* isolate due to modification of glucan synthase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 5, p. 1876–1878, 2007.

KALANTAR, E. et al. *Candida non albicans* with a High Amphotericin B Resistance Pattern Causing Candidemia among Cancer Patients **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention** v. 15, n. 24, p. 10933-10935, 2014.

KATZUNG, B. et al. **Farmacologia Básica e Clínica**. Ed. 12. California. Editora: Artmed, 2012.

KAUFFMAN, C. A. **Clinical manifestations and diagnosis of candidemia and invasive candidíases in adultos**. *UpToDate*. 2017. Disponível em: <<http://www.uptodate.com/online>>. Acesso em: 30/03/2019.

KAUFFMAN, C. A. **Epidemiology and pathogenesis of candidemia in adults**. *UpToDate*. 2017. Disponível em: <<http://www.uptodate.com/online>>. Acesso em: 30/03/2019.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS, J. A. **Dictionary of the fungi**. CAB International, Wallingford, 10.ed, 2008.

KONEMAM. E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR., W. M. **Diagnóstico Microbiológico**. 5. ed. Rio de Janeiro: Ed. Medsi., 2001.

KOURKOUMPETIS, T. K.; et al. Polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of invasive fungal infections. **Clinical Infectious Disease**, v. 54, p. 1322, 2012.

KOURKOUMPETIS, T. K. et al. Polymerase chain reaction-based assays for the diagnosis of invasive fungal infections. **Clinical Infectious Disease**, v. 54, p. 1322, 2012.

KULLBERG, B. J.; ARENDRUP, M. C. Invasive Candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 373, p. 1445, 2015.

KUMAR, A.; DHAMGAYE, S.; MAURYA, I. K.; SINGH, A.; SHARMA, M.; PRASAD, R. Curcumin targets cell wall integrity via calcineurin-mediated signaling in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58(1), p. 167-75, 2014.

LACAZ C. S., PORTO E., HEINS-VACCARI E. M., MELO N. T. Fungos e Actinomicetos Oportunistas, Anemófilos ou não. In: **Guia para identificação de interesse médico – Fungos, Actinomicetos e Algas**. São Paulo: Sarvier, p. 355-359, 1998.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; VASCCARI-HEINS, E. M.; MELO, N. T **Tratado de Micologia Médica**, São Paulo, 9ª ed. SARVIER. p. 1104, 2002.

LAU, A.; HALLIDAY, C.; CHEN, S. C.; et al. Comparison of whole blood, serum, and plasma for early detection of candidemia by multiplex-tandem PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 811, 2010.

LAZÉRA, M. S.; IGREJA, R. P.; WANKE, B. Criptococose. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

LEROY, O.; et al. Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). **Critical Care Medicine**, v. 37, p. 1612, 2009.

LIM, C. S. et al. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 1, p. 21–31, 2012.

LIMA, A. A. N.; SOARES SOBRINHO, J. L.; CORREA JUNIOR, R. A. C.; ROLIM NETO, P. J. Technologies alternatives to improve solubility of poorly water soluble drugs. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 27, p. 789-797, 2008.

LIMA, B.; AGÜERO, M. B.; ZYGADLO, J. et al. Antimicrobial activity of extracts, essential oil and metabolites obtained from *Tagetes mendocina*. *J Chilean Chem Soc.* 2009; 54:68-72.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16(2), p. 197-201, 2006.

Lima-Neto, R. G. ; Cavalcante, N. N. M.; Srivastava, R. M. ; Mendonça Junior, F. J.B. ; Wanderley, A.G. ; Neves, R.P. ; dos Anjos, J.V. . Synthesis of 1,2,3-Triazole

Derivatives and *in Vitro* Antifungal Evaluation on Candida Strains. **Molecules** (Basel. Online), v. 17, p. 5882-5892, 2012.

LIMA-NETO, R. G.; MACEDO, D. P. C.; NEVES, R. P. Symptomatology and Therapy in Candidiasis. In: Dietrich, L. A.; Friedmann, T.S. (Ed). *Candida albicans: Symptoms, Causes and Treatment Options*. **Nova Science Pub Inc**, v. 01, p. 113-124. 2013.

LORTHOLARY, O.; RENAUDAT, C.; SITBON K, MADEC. Y.; DENOEU-NDAM, L.; Wolff, M. et al. Worrisome trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002e2010). **Intensive Care Medicine**, v. 40(9), p. 1303-12, 2014.

LOYSE, A.; THANGARAJ, H.; EASTERBROOK, P.; FORD, N.; ROY, M.; CHILLER, T.; GOVENDER, N.; HARRINSON, T. S.; BICANIC, T. Cryptococcal meningitis: improving access to essential antifungal medicines in resource-poor countries. **Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 7, p. 629-37, 2013.

LUISI, S. B.; et al. Use of amphotericin B as antifungal agent in a culture medium for human dental pulp cells. **Revista Odonto Ciência**, v.23, p 58-62, 2008.

LUNA, I. S.; DA CRUZ, R. M. D.; DA CRUZ, R. D.; DE ARAUJO, R. S. A.; MENDONCA-JUNIOR, F. J. B. Synthetic Applications and Biological Properties of 1,4-Dithiane-2,5-diol and its Aducts: A Review. **CURRENT ORGANIC SYNTHESIS**, v. 15, p. 1026-1042, 2018.

LUPETTI, A.; GUZZI, G.; PALADINE, A.; SWART, K.; CAMPA, M.; SENESI, S. Molecular typing of *Candida albicans* in oral candidiasis: karyotype epidemiology with human immunodeficiency virus-seropositive patients in comparison with that with healthy carriers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1238-1242, 1995.

MARCHETTI, O.; BILLE, J.; FLUCKIGER, U.; et al. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. **Clinical Infectious Disease**, v. 38, p. 311-20, 2004.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J.; ESCRIBANO, P.; BOUZA, E.; GUINEA, J. Use of molecular typing tools for the study of hospital outbreaks of candidemia. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 31, p. 97-103, 2014.

MARTINS, C. V.; DA SILVA, D. L.; NERES, A. T.; MAGALHÃES, T. F.; WATANABE, G. A.; MODOLO, L. V.; SABINO, A. A.; DE FÁTIMA, A.; DE RESENDE, M. A.; Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. **Journal Antimicrobial Chemotherapy** v. 63(2), p. 337-339, 2009.

MARTINS, N. B. L., HENRIQUES, M, SILVA, S. Activity of phenolic compounds from plant origin against Candida. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 648-670, 2015.

MAY, R. C.; STONE, N. R.; WIESNER, D. L.; BICANIC, T.; NIELSEN, K. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14(2), p. 106-17, 2016.

MCCLELLAN, K. J.; WISEMAN, L. R.; MARKHAM, A. Terbinafine. An update of its use in superficial mycoses. **Drugs**, v. 58(1), p. 179-202, 1999.

MEDRANO, D. J.; et al. Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of *Candida parapsilosis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, Sao Paulo, v. 48, n. 1, p. 17-20, Jan-Feb 2006.

MENDONÇA JÚNIOR, F. J. B.; LIMA-NETO, R. G.; OLIVEIRA, T. B.; DE LIMA, C. A.; PITTA, I. R.; GALDINO, S. L.; CRUZ, R. M. D.; ARAÚJO, R. S. A.; NEVES, R. P. Synthesis and Evaluation of the Antifungal Activity of 2-(Substituted-Amino)-4,5-Dialkyl-Thiophene-3-Carbonitrile Derivatives. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30 (8), p. 1492-1499, 2011.

MENEZES, E. A.; ALCANFOR, A. C.; CUNHA, F. A. Fungos anemófilos na sala de periódicos da biblioteca de ciências da saúde da Universidade Federal do Ceará. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38;3, p. 155-158, 2006.

MESA-ARANGO, A. C.; TREVIJANO-CONTADOR, N.; ROMÁN, E.; SÁNCHEZ-FRESNEDA, R.; CASAS, C.; HERRERO, E.; ARGÜELLES, J. C.; PLA, J.; CUENCAESTRELLA, M.; ZARAGOZZA, 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. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 58, n. 11, p. 6627-6638, 2014.

MITRA, A.; KIM, N.; SPARK, D.; TONER, F.; CRAIG, S.; ROPER, C. et al. Use of an *in vitro* human skin permeation assay to assess bioequivalence of two topical cream formulations containing butenafine hydrochloride (1%, w/w). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 82, p. 14-9, 2016.

MITTAL, S. K. et al. Potentiometric performance of 2-aminothiophenol based dipodal ionophore as a silver sensing material. **Sens. Actuators B-Chemical**, v. 121, p. 386-395, 2007.

MOHAN, V.; BALLAL, M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, p. 208-210, 2008.

MOHAREB, R. M.; HO, J. Z.; ALFAROUK, F. O. Synthesis of thiophenes, azoles and azines with potential biological activity by employing the versatile heterocyclic precursor N- benzoycyanoacetylhydrazine. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 54, p. 1053-1066, 2005.

MOHR, J. F.; SIMS, C.; PAETZNICK, V. et al. Prospective survey of (1→3)-beta-D-glucan and its relationship to invasive candidiasis in the surgical intensive care unit setting. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 58, 2011.

MONDELLO, F. et al. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole-susceptible and resistant human pathogenic yeasts. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, n.5, p.1223-9, 2003.

MONTANARI, C. A. Química Medicinal: Contribuição e Perspectiva no desenvolvimento da Farmacoterapia. **Química Nova**, v. 18, n. 1, p. 56-64, 1995.

MONTANARI, C. A. Química medicinal: métodos e fundamentos em planejamento de fármacos. **Editora Edusp**, 2011.

MORA-DUARTE, J.; BETTS, R.; ROTSTEIN, C.; COLOMBO, A. L.; THOMPSON-MOYA, L.; SMIETANA; LUPINACC, R. SABLE, C.; KARTSONIS, N.; PERFECT, J.; Comparison of Caspoungin and amphotericin B for invasive candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v.347, p 2020-2029, 2002.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J immunol methods**.;v. 65(1-2): p. 55-63, 1983.

NEUFELD, P. M. **Manual de micologia médica: técnicas básicas de diagnóstico**. 1. ed. Rio de janeiro: Programa Nacional de Controle de Qualidade, p. 240, 1999.

NEUFELD, P. M. **Atlas para identificação de fungos de importância médica**. Rio de janeiro: Programa Nacional de Controle de Qualidade, 1. Ed, 2010.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Risk factors for breakthrough candidemia. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 21, n. 3, p. 209-11, 2002.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; ALVARADO-MATUTE, T.; CORTEZ, L., et al. **Epidemiology of Candidemia in LatinAmerica: A Laboratory-BasedSurvey**, 2013.

NUCCI, M.; SILVEIRA, M. I.; SPECTOR, N.; et al. Risk factors for death among cancer patients with fungemia. **Clinical Infectious Disease**, v. 27, p. 107-11, 1998.

OBAYASHI, T.; NEGISHI, K.; et al. Reappraisal of the serum (1-->3)-beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections--a study based on autopsy cases from 6 years. **Clinical Infectious Disease**, v. 46, p. 1864, 2008.

ODDO, A.; HANSEN, P. R. Hemolytic Activity of Antimicrobial Peptides [published correction appears in Methods Mol Biol. 2017;1548:E1]. **Methods Mol Biol**. 2017;1548:427-435.

PAPPAS, P. G.; KAUFFMAN, C. A.; ANDES, D. R.; et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Disease**, v. 62:e1, 2016.

PEPIN, G. A. & AUSTWICK, P. K. C.Skin diseases of domestic animals. II. Skin diseases of Mycological origin. **Veterinary Record**, v. 82, p. 208-214, 1968.

PERES, N. T. A.; MARANHÃO F. C. A.; ROSSI A.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. Dermatofitos: Interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.85, n. 5, p. 657-67, 2010.

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. In: MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. Philadelphia: Elsevier, cap. 263, p. 3287-3303, 2010.

PFALLER, M. A., DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, p. 133, 2007.

PIETRELLA, D. et al. Beneficial effect of *Mentha suaveolens* essential oil in the treatment of vaginal candidiasis assessed by real-time monitoring of infection. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, 2011.

PINTO, E.; QUEIROZ, M. J. R. P.; VALE-SILVA, L. A.; João F. OLIVEIRA, J. F.; BEGOUIN, A.; BEGOUIN, J. M.; KIRSCH, G. Antifungal activity of synthetic di(hetero)arylamines based on the benzo[b]thiophene moiety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.16, p. 8172–8177, 2008.

PIRES, C. A. et al. Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 89(2), p. 259- 64, 2014.

PLAYFORD, E. G.; et al. Increasing incidence of candidaemia: long-term epidemiological trends, Queensland, Australia, 1999-2008. **Journal of Hospital Infection**; v. 76, p. 46, 2010.

PLAYFORD, E. G.; MARRIOTT, D.; NGUYEN, Q.; et al. Candidemia in nonneutropenic critically ill patients: risk factors for non-*albicans* *Candida* spp. **Critical Care Medicine**, v. 36, p. 2034, 2008.

POSTERATO, B. et al. Antifungal Susceptibility Testing: Current Role from the Clinical Laboratory Perspective. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 6, n. 1, 2014.

PUTEROVÁ, Z.; KRUTOSÍKIVÁ, A.; VÉGH, D. Gewald Reaction: Synthesis, Properties and Applications of Substituted 2-Aminothiophenes. **Arkivoc**, [S.l.], v. 1, p. 209-46, 2010.

QUEIROZ, J. P. A. F. et al. Criptococose- uma revisão bibliográfica. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 2(2), p. 32-38, 2008.

QUINDÓS, G. et al. Actividad antifúngica in vitro de Voriconazol: Nuevos datos después de los primeiros años de experiência clínica. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, p. 198-209, 2007.

RAM, V. J.; GOEL, A.; SHUKLA, P. K.; KAPIL, A. Synthesis of thiophenes and thieno[3,2-c]pyran-4-ones as antileishmanial and antifungal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.7, p. 3101-3106, 1997.

- RAMAGE, G. et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 18, p. 163-70, 2001.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Rang & Dale's Farmacology**. V. 7Ed., Elsevier, 2012.
- REISS, E.; OBAYASHI, T.; ORLE, K. et al. Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. **Medical Mycology**, v.38, n.1, p. 147, 2000.
- REZENDE, C. et al. Incidência de dermatófitos em lesões sugestivas de dermatofitose na população de Votuporanga – São Paulo. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 4, n. 2, 2009.
- RICHARDSON, M. D.; WARNOCK, D. W. Fungal infection: diagnosis and management. **Blackwell Scientific Publications**, v.1-2, p. 192- 195, 1993.
- ROBERTS, D. T. et al. Guidelines for treatment of onychomycosis. **British Journal of Dermatology**, London, v. 148, n. 3, p. 402-410, 2003.
- RODRIGUES, K. A. F. et al. 2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation *in vitro*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 106, p. 1-14, 2015.
- ROSENTHAL, T. Aulus Cornelius Celsus. **Archives of Dermatology**, v. 84: p. 613-618, 1961.
- RYU, C.; LEE, S.; HAN, J. et al. Synthesis and antifungal activity of 5-arylamino-4,7-dioxobenzo[*b*]thiophenes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 2617-2620, 2005.
- SABOURAUD, R.: **Les trichophyties humaines**. Rueff et Cie. Paris, 1894.
- SAFDAR, A.; PERLIN, D. S.; ARMSTRONG, D. Hematogeneous infections due to *C. parapsilosis*: changing trends in fungemic patients at a comprehensive cancer center during the last four decades. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 44, p.11-16, 2002.
- SAHU, J. K.; GANGULY, S.; KAUSHIK, A. Triazoles: A valuable insight into recent developments and biological activities. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, p. 456 – 465, 2013.
- SAKER, S. D.; NAHAR, L. Compostos heterocíclicos e seus derivados. In: Química para Estudantes de Farmácia: química geral, orgânica e de produtos naturais, Rio de Janeiro: **Ed. Guanabara Koogan**, p.121-129, 2009.
- SÁNCHEZ-VARGAS, L. O.; PÉREZ-RIOS, P.; ROMO-GARCÍA, J.; CORONAIZQUIERDO, F. P.; HIDALGO-LOPERENA, H.; FRANCO-MARTÍNEZ, F. Determinación de pH salival y cultivo en pacientes con candidosis bucal VIH positivos y VIH negativos. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 19, p. 155-160, 2002.

SANGALLI-LEITE, F. et al. Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 5, p. 457-67, 2011.

SCHOELER, A. P. et al. Prevalência de dermatófitos na rotina de micologia em hospital particular de médio porte na cidade de Chapecó, estado de Santa Catarina, Brasil. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 31, n. 1, p. 103–106, 2010.

SCHOLZ, R.; MEINHOLF, W. Susceptibility of *Trichophyton rubrum* to griseofulvin. **Mycoses**, v. 34, n. 9-10, p. 411-414, 1991.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; LIMA, E. O. et al. Experimental methodologies and evaluations of computer-aided drug design methodologies applied to a series of 2-aminothiophene derivatives with antifungal activities. **Molecules** (Basel. Online), v. 17, p. 2298-2315, 2012.

SEEBACHER, C.; BOUCHARA, J. P.; MIGNON, B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5–6, p. 335–352, 2008.

SHAO, P. L.; HUANG, L. M.; HSUEH, P. R. Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30(6), p. 487-95, 2007.

SHEPARD, J. R.; ADDISON, R. M.; ALEXANDER, B. D. et al. Multicenter evaluation of the *Candida albicans*/*Candida glabrata* peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization method for simultaneous dual-color identification of *C. albicans* and *C. glabrata* directly from blood culture bottles. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p. 50, 2008.

SHERLOCK, O.; O'CONNELL, N.; CREAMER, E.; HUMPHREYS, H. Is it really clean? An evaluation of the efficacy of four methods for determining hospital cleanliness. **Journal of Hospital Infection**, p. 1-7, 2009.

SIDRIM J. J.; ROCHA M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. 1ed., Rio de Janeiro. Guanabara Koogan S.A. P41-49; 89 - 101. 2010.

SIDRIM, J. J. C.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G. **Aspectos clínicos laboratoriais das dermatofitoses** In: Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 135-161.

SIDRIM, J. J. C; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínico-laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 171-190. 1999.

SILVA, B. C. M. et al. Dermatophytosis and immunovirological status of HIV-infected and AIDS patients from Sao Paulo city, Brazil. **Mycoses**, v. 57, p. 371–37, 2014.

SOBERA, J. O.; ELEWSKI, B. E. Fungal diseases. In: BOLOGNIA, J. L.; JORIZZO, L; RAPINI, R. P. (Org.). **Dermatology**. 2. ed. Spain: Elsevier, p. 1138-1146, 2008.

SOLL, D. R. *Candida* biofilms: is adhesion sexy? **Current Biology**, v. 18, p. 153-5, 2008.

SOUZA, B. C. C.; OLIVEIRA, T. B.; AQUINO, T. M.; LIMA, M. C. A.; PITTA, I, R.; GALDINO, S. L.; LIMA, E. O.; GONÇALVES-SILVA, T.; MILITÃO, G. C. G.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B. Preliminary antifungal and cytotoxic evaluation of synthetic cycloalkyl[b]thiophene derivatives with PLS-DA analysis. **Actapharmaceutica**, v.62, n.2, p.221-36, 2012.

SPANU, T.; POSTERARO, B.; FIORI, B. et al. Direct maldi-tof mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of *Candida* species causing bloodstream infections: an observational study in two large microbiology laboratories. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, p. 176, 2012.

SPULBER, M. et al. Nystatin–polyethylene oxide conjugates with enhanced solubility in water. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 71, p. 87-93, 2011.

SRINIVASAN, A.; OPEZ-RIBOT, J. L.; RAMASUBRAMANIAN, A. K. Overcoming antifungal resistance. Drug Discovery Today: **Technologies | Drug resistance**, v. 11, 2014.

STEPHENS, C. E.; FELDER, T. M.; SOWELL, J. W. S. R.; ANDREI, G.; BALZARINI, J.; SNOECK, R.; DE CLERCQ, E. Synthesis and Antiviral/Antitumor Evaluation of 2-Amino- and 2-Carboxamido-3-(arylsulfonyl)thiophenes and Related Compounds as a New Class of Diarylsulfones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 1123–1132, 2001.

STOOPLER, E. T.; SOLLECITO, T. P. Oral mucosal diseases. Evaluation and management. **Medical Clinics of North American**, v. 898, p. 1323-1352, 2014.

SUDHAKAR, Y. KUOTSU, K.; BANDYOPADHYAY, A. K. Buccal bioadhesive drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 114, p. 15-40, 2006.

SUGIMOTO R.; KATOH T.; NISHIOKA K. Isolation of dermatophytes from house dust on a medium containing gentamicin and flucytosine. **Mycoses**, v.38(9–10), p. 405–10, 1995.

SUN, D. D.; LEE, P. I. Crosslinked hydrogels – a promising class of insoluble solid molecular dispersion carriers for enhancing the delivery of poorly soluble drugs. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 1, p. 26-36, 2014.

TALARMIN, J. P. et al. Epidemiology of candidemia: a one-year prospective observational study in the west of France. **Med Mal Infect**, v. 39, p. 877-85, 2009.

TALLURY, P. et al. Effects of solubilizing surfactants and loading of antiviral, antimicrobial and antifungal on their release rates from ethylene vinyl acetate copolymer. **Dental Material**, v. 23, p. 977-982, 2007.

TAMURA, N. K. et al. Fatores de virulência de *Candida* spp. isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 91-3, 2007.

TARAI, B.; KHER, V.; KOTRU, P.; SABHIKHI, A.; BARMAN, P.; RATTAN, A. Early onset primary pulmonary cryptococcosis in a renal transplant patient. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 250-2, 2010.

TAUBER A.; MULLER-GOYMANN C.C. Comparison of the antifungal efficacy of terbinafine hydrochloride and ciclopirox olamine containing formulations against the dermatophyte *Trichophyton rubrum* in an infected nail plate model. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11(7), p. 1991-1996, 2014.

TOMAZ, D. Será fungo? **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, v. 27 (1), p. 96–108, 2011.

TSENG, H. K.; HUANG, T. Y.; WU, A. Y.; CHEN, H. H.; LIU, C. P.; JONG, A. How *Cryptococcus* interacts with the blood-brain barrier. **Future Microbiology**, v. 10, p. 1669-82, 2015.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, 34 th. Rockville: **The United States Pharmacopeial Forum**, 2011, v. 1, p. 967-968.

U.S Food and Drug Administration. FDA news release. FDA allows marketing of the first test to identify five yeast pathogens directly from a blood sample. www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm415728.html(Acesso em 24 de julho de 2019).

URIZAR, J. M. A. Candidiasis orales. Clinical pharmacology of systemic antifungal agents: a comprehensive review of agents in clinical use, current investigation compounds, and putative targets for antifungal drug development. **Advanced Pharmaceutical**, v. 44, p. 343-500, 1998.

VANDENBOSCH D, BRAECKMANS K, NELIS HJ, COENYE T. Fungicidal activity of miconazole against *Candida* spp. Biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 694-700, 2010.

VANDEPUTTE, J.; WACHTEL, J. L.; STILLER, E. T. Amphotericin A and B antifungal antibiotics produced by a *Streptomyces*. II The isolation and properties of the crystalline amphotericins. **Antibiot Annu**, v.1955-1956, p 587-591, 1956.

VANSCONCELOS, T.; SARMENTO, B.; COSTA, P. Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 23/24, p. 1068-1075, 2007.

VARUM, F. O. Estudos de mucoadesão no trato gastrointestinal para o aumento da biodisponibilidade oral de fármacos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 4, p. 535-548, 2008.

VELASCO, E.; BIGNI, R. A prospective cohort study evaluating the prognostic impact of clinical characteristics and comorbid conditions of hospitalized adult and pediatric cancer patients with candidemia. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, p. 1071, 2008.

VERMA, S.; HEFFERNAN, M. P. Superficial fungal infection: dermatophytosis, onychomycosis, tinea nigra, piedra. In: WOLFF, K.; GOLDSMITH, L. A.; KATZ, S. I.

et. al. (Org.). **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine**. 7. ed. The McGraw-Hill Companies, 2008. p. 1807-1821.

VIEIRA, F.; NASCIMENTO, T. Resistência a Fármacos Antifúngicos por *Candida* e Abordagem Terapêutica *Candida* Antifungal Resistance and Therapeutic Approach. **Revista Portuguesa de Farmacoterapia**, v. 9, p. 161-168, 2017.

VISHNU, S. et al. Dermatophytes: Diagnosis of dermatophytosis and its treatment. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 19, p. 1286–1293, 2015.

VIUDES, A. et al. Candidemia at a tertiary-care hospital: epidemiology, treatment, clinical outcome and risk factors for death. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 21, n. 11, p. 767-74, 2002.

VO, C. L. N.; PARK, C.; LEE, B. J. Current trends and future perspectives of solid dispersions containing poorly water-soluble drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, n. 3, p. 799-813, 2013.

WAGNER, D. K.; SOHNLE, P. G. Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts. **Clinical Microbiology Review**, v. 8, n. 3, p. 317-335, 1995.

WANKE, B.; LAZÉRA, M. S.; NUCCI, M. 2000. Fungal infections in the immunocompromised host. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, p.153-158.

WEARY, P. E. & Canby, C. M. Further observations on the keratinolytic activity of *Trichophyton schoenleinii* and *Trichophyton rubrum*. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 53, p. 58-63, 1969.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews**, v.8(2), p. 240-259; 1995.

WELSH, O.; VERA-CABRERA, L.; WELSH, E. Onychomycosis. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 28, n. 2, p. 151-159, 2010.

WILLE, M. P.; GUIMARÃES, T.; FURTADO, G. H.; COLOMBO, A. L. Historical trends in the epidemiology of candidaemia: analysis of an 11-year period in a tertiary care hospital in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, 2013.

WILSON, P. et al. Liquid chromatographic determination of nystatin in pharmaceutical preparations. **Journal of AOAC International**, v. 84, n. 4, p. 1050-1056, 2001.

WINTER, J. C. F. Using the Student's t-test with extremely small sample sizes. **Practical Assessment Research & Evaluation**, v. 18, n. 10, p. 1-12, 2013.

WU, J. X. et al. Influence of solvent evaporation rate and formulation factors on solid dispersion physical stability. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 5, p. 610-620, 2011.

YU, R. J.S.R. Hair digestion by a keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 53, p. 166-171, 1969.

ZEICHNNER, L. O.; PAPPAS, P. G. Invasive candidiasis in the intensive care unit. **Journal Critical Care Medicine**, v. 34, p.857-3, 2006.

ZHANG, A. Y.; CAMP, W. L.; ELEWSKI, B. E. Advances in tropical and Systemic Antifungals. **Dermatologyc Clinics**, v. 25, p. 165-183, 2007.

ZHAO, Y.; LIN, J.; FAN, Y.; & LIN, X. Life Cycle of *Cryptococcus neoformans*. **Annual Review of Microbiology**, v. 73(1), 2019.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ARTIGO 1 – SUBMETIDO A REVISTA BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY



(Fator de Impacto 2018 – 2,857)

Incorporation of 2-aminothiophene derivative in nanoformulations: an enhancement of the antifungal activity.

Running head: Antifungal activity of thiophene.

Wendell Wons Neves¹, Rejane Pereira Neves², Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo³, Giovanna Rodrigues de Araújo Eleamen⁴, Elquio Eleamen Oliveira⁴, Francisco Jaime Bezerra Mendonça-Junior^{1,4} and Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto^{2,5*}

¹ *Federal University of Pernambuco (UFPE), Department of Therapeutic Innovation, Recife, Pernambuco, Brazil.*

² *Federal University of Pernambuco (UFPE), Department of Mycology, Recife, Pernambuco, Brazil.*

³ *Federal University of Pernambuco (UFPE), Department of Pharmaceutics Sciences, Recife, Pernambuco, Brazil.*

⁴ *State University of Paraíba, Laboratory of Synthesis and Vectoring Molecules, João Pessoa, Paraíba, Brazil.*

⁵ *Federal University of Pernambuco (UFPE), Department of Tropical Medicine, Recife, Pernambuco, Brazil.*

* Correspondence: Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto, Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rêgo s/n, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil, CEP: 50670-901. Email: goncalves_reginaldo@hotmail.com;

reginaldo.limaneto@pq.cnpq.br

Tel.: +55-81-2126-8525; Fax: +55-81-2126-8481.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the *in vitro* susceptibility of nanoformulations (nanospheres and nanocapsules) of a promising antifungal 2-amino-thiophene (6CN10) and 6CN10 complexed with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin (6CN10:HP- β -CD) compared with the free-drug against *Candida* and *Cryptococcus*, using the microdilution method. The *Candida* and *Cryptococcus* clinical strains were identified by phenotypic methods and MALDI-TOF MS. For *in vitro* antifungal susceptibility it was used reference microdilution trials. Serial drug or nanoformulations dilutions were prepared by following the CLSI M27-A3 guidelines. Furthermore, anti-biofilm formation was verified for *Cryptococcus neoformans*. All *Candida* isolates were sensitive to the free drug (MIC = 41.66–333.33 $\mu\text{g/mL}$) and were able to grow even in the higher concentration tested to all 6CN10-nanoformulations. However, the *Cryptococcus neoformans* strains evaluated presented MIC values of 0.32–83.33 $\mu\text{g/mL}$ for 6CN10-nanoformulations, and MIC values of 0.1 – 0.2 $\mu\text{g/mL}$ for 6CN10:HP- β -CD-nanoformulations, being up to 3,333 times more active than the free drug (MIC values of 166.66–333.33 $\mu\text{g/mL}$), and presenting superior activity to the reference drug Amphotericin B (MIC = 0.5–0.125 $\mu\text{g/mL}$). Moreover, 6CN10:HP- β -CD-nanosphere showed high anti-biofilm potential. The *in vitro* study showed that the nanoformulations provide enhancement of drug efficiency against *Cryptococcus* compared to the free-drug. These results allow us to expand the possibility of 6CN10-loaded nanoformulations become a near future alternative for cryptococcosis and candidiasis therapy. *In vivo* experiments are essential for clinical use.

Keywords: Antifungal Susceptibility, 2-Amino-thiophene, *Cryptococcus neoformans*, Nanospheres, Nanocapsule, Biofilm.

Introduction

The incidence of fungal infections has been increasing since 1970, mainly by yeasts due to the use of medical devices as catheters, and others. In immunosuppressed patients, fungal infections remain a significant cause of morbi-mortality, mainly by *Candida* e *Cryptococcus* species.¹⁻³

Cryptococcosis is a systemic and opportunistic mycosis that occurs globally with 223,100 cases estimated annually and a mortality rate of about 81 % predominantly in immunocompromised patients and the main organ affected is the central nervous system (CNS).^{4,5}

Candidiasis is an important fungal infection related intrinsically to health, being caused by *Candida* spp. The prevalence of these organisms varies with geographic location and specific anatomical site, with *C. albicans* being the most prevalent, with an associated mortality of over 70 % in cases of candidemia.⁶

The initial treatment recommended by the American Infectious Diseases Society in the cases of disseminated candidiasis and cryptococcosis includes azole derivatives, caspofungin, amphotericin B (AmpB) or a combination of fluconazole and AmpB in the relapse. However due to the increasing appearance of resistance to all commercially available antifungal^{7,8} and to lack of more effective and less toxic alternative therapies, several researchers around the world have been seeking new therapeutic alternatives for the treatment of fungal infections. For example. We have suggested the use of ciclopirox olamine for systemic cryptococcosis therapy,⁹ and Magalhães et al.¹⁰ reported the effectiveness of hydroxyaldimines for inhibition of growth of *Cryptococcus* spp.

In recent years our research group have demonstrated the potential of 2-amino-thiophene derivatives to inhibit fungal growth.¹¹⁻¹⁵ In 2011¹¹, the analysis of 44 derivatives against strains of clinical isolates of *Candida* and *Cryptococcus* showed that: i) 2-amino-

thiophenes present fungicidal activity; ii) *C. neoformans* strains present greater sensitivity to the compounds, being the most promising compound the 2-[(4-nitrobenzylidene)-amino]-4,5,6,7-tetrahydro-4*H*-benzo[*b*]thiophene-3-carbonitrile, called 6CN10 (Figure 1) with MIC values at 100 µg/mL. In 2012¹², computer-Aided Drug Design (CADD) studies were performed with more than 50 2-amino-thiophene derivatives, including 6CN10, and it has been observed that the main factor limiting the antifungal activity of these compounds is their low aqueous solubility. In order to overcome this undesirable characteristic, in 2017¹⁵ we obtained complexes of 6CN10 with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD) and we could observe an increase in the anti-*Cryptococcus* activity from about 3.5 to 7 times, proving that improvements in water solubility, has the capacity to promote an increase in the antifungal potential of 2-amino-thiophene derivatives.

Thus, the present study aims to evaluate the *in vitro* antifungal activity of nanoformulations containing 6CN10 and 6CN10:HP-β-CD complex in order to compare its efficacy to the free-drug and amphotericin B, by the determination of the minimal inhibitory concentrations (MICs) against species of pathogenic yeasts (*Candida* and *Cryptococcus*), besides the ability to eradicate *Cryptococcus* in biofilms.

Experimental

Reagents

Compound 6CN10 was synthesized according to previously procedures (Mendonça-Junior et al.)¹¹ and its chemical structure was confirmed by comparing its ¹H NMR spectrum. 6CN10:HP-β-CD complex was prepared according to procedure describe in Eleamen et al..¹⁵ Amphotericin B, poly-ε-caprolactone, 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin, Tween 80, Mygliol 812, chloramphenicol and dimethylsulfoxide (DMSO) were purchase from Sigma-Aldrich (Brazil).

Nanoformulations preparation

Four different formulations (Table 1) were prepared using the method of nanoprecipitation described by Fessi et al.¹⁶ For production of the nanospheres, 6CN10 pure or 6CN10:HP- β -CD complex was poured into acetone containing the polymer poly- ϵ -caprolactone. Then, this organic phase was drop-wise added in an aqueous phase containing the surfactant (Tween 80) under moderate magnetic stirring at 25 °C. The organic solvent was eliminated by rotaevaporation, and the final volume of the suspensions was adjusted to 10 mL. To produce the nanocapsules, Mygliol 812 was added to the organic phase. The final amount of the 6CN10 in the formulations was assayed spectrophotometrically (Genesys 10S, Thermo Scientific, USA) at 280nm. The nanoformulations were stored at 4 °C until use.

Strains and growth cultures

Fifteen isolates of *Candida* obtained from patients with candidemia, four isolates of *Cryptococcus* obtained from cerebrospinal fluid (CSF) of immunocompromised patients and the reference strain *Candida parapsilosis* ATCC 22019 were evaluated against antifungal potential of pure 6CN10, 6CN10:HP- β -CD complex and nanoformulations containing 6CN10. The clinical isolates were obtained from two Tertiary Public Hospitals at Recife, Brazil. All *Cryptococcus* isolates evaluated in this work were stocked under mineral oil¹⁷ in the URM Culture Collection – UFPE. This Collection is registered in the WDCM of the WFCC as “604” under the acronym URM (University Recife Mycology).

Blood samples from patients with candidemia and CSF from immunocompromised patients were processed for mycological diagnosis using standard methods (direct examination and isolation in culture) at the Medical Mycology Laboratory, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil. Direct examination was performed without to add staining or clarification for blood samples and with India ink staining to CSF. Cultures were prepared using Sabouraud dextrose agar (SDA) (Difco) with chloramphenicol (50 mg/mL) and incubated at 30

and 35 °C in an aerobic atmosphere for 5 days. Pure cultures were transferred onto the surface of SDA for species identification.

The collection of the clinical samples from patients was approved by the Ethics Committee of the Centre of Health Sciences of the Federal University of Pernambuco under protocol 01847812.0.0000.5208.

Classical phenotypic identification

The isolates were identified by macro- and micromorphology. The colour, shape, topology of each colony and the cell morphology were considered using Sabouraud Dextrose Agar (SDA) medium with 2.5 % yeast extract (Difco, USA). The induction of sexual reproduction structure using Gorodkova agar (Difco, USA) was performed. Chlamydospores were induced on bile agar (Difco, USA) and scored as present or absent after 3 days at 25 °C. The isolates were tested biochemically by carbohydrate assimilation and fermentation assays. The production of urease and acetic acid were also assessed using urea and calcium carbonate media (Difco, USA), respectively. The maximum temperature of growth for each isolate was determined. All classical phenotypic parameters were analyzed according to Barnett et al.¹⁸ and Hoog et al..¹⁹

MALDI-TOF MS identification

Homogeneous inocula of yeast cells were grown and maintained on Yeast Extract Peptone Dextrose Agar medium (YEPD). Incubations were standardized at 20 h and strains were grown aerobically at 37 °C. In order to avoid changes in the protein expression pattern, the culture conditions and growth time were standardized as described above. All cultures were checked for purity prior to MALDI-TOF MS analysis.

One single colony was directly deposited onto a 196 position target plate (Bruker Daltonik GmbH), and two such deposits were made for each isolate. Aliquots of 1 µL of 70 % formic acid were added and mixed gently with the yeasts. When the liquid medium was almost

evaporated, the preparation was overlaid with 1 μ L of saturated matrix solution {75 mg/ml of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) in ethanol/water/acetonitrile [1:1:1] with 0.03 % trifluoroacetic acid (TFA)}. A total of 20 isolates (2 x 20 spots) were deposited per plate, and the matrix-sample was crystallized by air-drying at room temperature for 5 minutes.⁹

The equipment used was MALDI TOF Autoflex III Mass Spectrometer (Bruker Daltonics Inc., USA/Germany) equipped with a Nd:YAG (*neodymium-doped yttrium aluminium garnet*; Nd:Y₃Al₅O₁₂) laser of 1064nm, set to a 66 % power. The mass range from 2,000 to 20,000Da was recorded using a linear mode with a delay of 104 ns and an acceleration voltage of +20 kV. The resulting peak lists were exported to the software MALDI Biotyper™ 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) where the final identifications were achieved.

In vitro antifungal susceptibility

Reference microdilution trials containing serial drug or nanoformulations dilutions were prepared by following the CLSI M27-A3 guidelines.²⁰ Dispersion of nanospheres and nanocapsules of 6CN10 (containing 250 μ g/mL of 6CN10) and 6CN10:HP- β -CD complex (containing 100 μ g/mL of 6CN10) were used.

Pure 6CN10 (10.0 mg) and 6CN10:HP- β -CD complex containing 14 % of 6CN10 (10.0 mg) were dissolved in 1.0 mL of DMSO, and then diluted in 9.0 mL of standard RPMI 1640 medium (Sigma Chemical Co., St., Louis, MO) buffered to pH 7.0 with 0.165 M of morpholinopropanesulphonic acid (MOPS; Sigma, Brazil) resulting, respectively, in solutions having concentrations of 1.0 mg/mL and 140 μ g/mL. The concentrations tested ranged from 0.32 to 333.33 μ g/mL for pure 6CN10; from 0.045 to 46.66 μ g/mL for 6CN10:HP- β -CD complex; from 0.08 to 83.33 μ g/mL for nanosphere and nanocapsule of 6CN10; from 0.003 to 3.33 μ g/mL for nanosphere and nanocapsule of 6CN10:HP- β -CD complex. AmpB was used as reference drug at concentrations from 0.015 to 8.0 μ g/mL.

In order to obtain a yeast inoculum containing 1.0 to 5.0×10^6 CFU/mL, each strain was cultured on a tube containing 20 mL of 4 % Sabouraud Dextrose Agar (SDA; Difco) plus yeast extract at 35 °C for two days. After that, yeast suspensions were prepared in sterile physiological solution (0.85 %) and maintained at 28 ± 2 °C, and then adjusted to 90 % transmittance at 530 nm. Two serial dilutions from 1:100 and 1:20 were made to obtain a final inoculum containing 1.0 to 5.0×10^3 CFU/mL.

For the susceptibility tests, 100 µL of each tested-solution (6CN10 and 6CN10:HP-β-CD complex solutions, nanoformulations containing 6CN10 and 6CN10:HP-β-CD complex, nanoformulations drug-free and reference drug) and of 10 serial dilutions were added in microdilution wells containing 100µL of standard RPMI 1640 medium buffered to pH 7.0 with 0.165 M of MOPS, then wells were inoculated with 100 µL of the previously obtained inoculum. The microplates were incubated at 35 °C in a non-CO₂ incubator and were visually evaluated 48 h after the incubation to *Candida* isolates and 72 h after incubation to *Cryptococcus* isolates. MICs corresponded to the lowest drug dilution that showed 100 % growth inhibition compared to untreated yeasts. All tests were performed in duplicate.

Formation and treatment of the biofilm on silicone discs

Biofilm formation was carried out modified of Vandenbosch et al..²¹ *Cryptococcus* biofilms were obtained on sterile silicone discs in a 24-well microtitre plate (TPP, Trasadingen, Switzerland). The discs were washed in MilliQ water (Millipore, Billerica, MA, USA) and autoclaved. Yeast cells were cultured onto SDA for 48h at 37 °C, then 3-5 colonies were suspended in saline solution 0.9 % (w/v) and centrifuged for 5 min at 1.000 g. Subsequently, the supernatant was removed and the cells were washed and resuspended three times in 1 mL of saline solution 0.9 % (w/v). This inoculum was further diluted in yeast nitrogen base 0.1X (YNB, BD, Franklin Lakes, USA) supplemented with 5 mM glucose (Sigma-Aldrich) to yield an optical density of 0.07 at a wavelength of 600 nm. Then, 1 mL of a 1:100 dilution of the

inoculum in YNB 0.1 was added to each well containing a silicone disc with three 6CN10 formulations (6CN10-nanosphere, 6CN10:HP- β -CD-nanosphere and 6CN10:HP- β -CD-nanocapsule at final concentration of 83.33 $\mu\text{g/mL}$, 3.33 $\mu\text{g/mL}$ and 3.33 $\mu\text{g/mL}$, respectively). Appropriate controls were also included. The 24-well microtiter plates were incubated for 48 h at 37 °C.

The number of CFU on each silicone disc was determined by pour plating. To this end, the silicone discs with biofilms were transferred to 10 mL of SDB and biofilm cells were removed from the silicone by three cycles of 30 s of sonication and 30 s of vortex mixing. With this procedure, all sessile cells were removed from the silicone discs and clumps of cells were broken apart. Serial 10-fold dilutions of the resulting cell suspension were made, and 1 mL of each dilution was plated and SDA was added. Plates were incubated for 48 h at 37 °C, after the number of CFU per disc was counted. For each strain and treatment, biofilms formed on at least three silicone discs in at least three independent experiments were included, and the results were expressed as arithmetic mean.

Statistics

Statistical analysis among different anti-biofilm treatments were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) with a significance level defined as $p < 0.05$. The multiple comparisons test (Tukey) was used, after ANOVA, to compare the means found, one by one. All statistical analyses were created with Graphpad Prism version 5.01.

Results

Strain identifications

The yeasts were identified by phenotypic approach as five *Candida albicans*, one *C. famata*, one *C. glabrata*, one *C. guilliermondii*, one *C. krusei*, five *C. parapsilosis*, one *C. tropicalis* and four *Cryptococcus neoformans*. The MALDI-TOF identified the *C. parapsilosis*

complex isolates as *C. parapsilosis sensu stricto* and *Cryptococcus neoformans* as *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, all with score above 2.0.

In vitro antifungal susceptibility

For each antifungal susceptibility experiment, the inoculum controls showed clearly detectable growth after the incubation period, indicating that all isolates were viable and that the conditions used were suitable for fungal growth. The MIC of the reference strain was 0.5 µg/mL to AmpB confirming the reproducibility of the test. Nanoformulations drug-free (blank) were also used as control and showed no activity against all fungal pathogens.

Table 1 shows the Minimal Inhibitory Concentration (MICs) values of 6CN10 (free-drug), 6CN10 complexed with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (6CN10:HP-β-CD), and the four nanoformulations (6CN10-nanocapsule, 6CN10:HP-β-CD-nanocapsule, 6CN10-nanosphere and 6CN10:HP-β-CD-nanosphere) compared with Amphotericin B (AmpB) against isolates of *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. tropicalis* and *C. parapsilosis* (including the reference strain *C. parapsilosis* ATCC 22019).

As can be seen in Table 1, the 6CN10 free-drug was able to inhibit the growth of all strains in different concentrations. The *Candida* strains were slightly more susceptible showing MIC values ranging between 41.66 to 333.33 µg/mL, while the *Cryptococcus* strains presented MIC values of 166.66 and 333.33 µg/mL.

6CN10:HP-β-CD complex was completely ineffective for all *Candida* strains (all strains grew (G) at the highest concentration tested of 46.66 µg/mL), however showed MIC values of 46.66 µg/mL against all *Cryptococcus* strains, being four times more active than the 6CN10 free-drug.

This difference in sensitivity between the two species (*Candida* and *Cryptococcus*) was also observed in all nanoformulations evaluated, where all isolates of *Candida* grew (at the

highest concentrations tested), while *Cryptococcus* strains showed MIC values ranging from 0.1 to 83.33 µg/mL, therefore more active than the 6CN10 free-drug, and with MIC values comparable or better than the reference drug AmpB.

The nanocapsules of 6CN10 and 6CN10:HP-β-CD complex were able to inhibit the growth of *Cryptococcus* strains with MIC values of 83.33 µg/mL and 0.1 - 0.2 µg/mL, respectively. 6CN10-nanocapsules are 2 to 4 times more effective than the 6CN10 free-drug. 6CN10:HP-β-CD-nanocapsules are 233 to 466 times more active than the 6CN10:HP-β-CD complex, and even 3,333 times more active than the 6CN10 free-drug, being more efficient than the reference drug (AmpB) for all *Cryptococcus* strains.

The best results of inhibition were observed for the nanospheres. 6CN10-nanospheres presented MIC values of 41.66 to 0.32 µg/mL being 4 to 1,040 times more active than the 6CN10 free-drug. 6CN10:HP-β-CD-nanospheres showed MIC values of 0.2 to 0.1 mg/mL, being 233 to 466 times more active than the 6CN10:HP-β-CD complex, and up to 3,333 times more active than the 6CN10 free-drug, being still 2.5 to 5 times more active than the AmpB for *C. neoformans* URM 6895 and URM 6901.

Treatment of the biofilm

The effect of the three most bioactive 6CN10 formulations was determined on *Cryptococcus* biofilms formed on silicone discs by four different strains (Table 2). Table 2 shows plate counts correspond to the mean ± standard error of mean of three independent experiments on three silicone discs.

As can be observed in Table 2, Blank and Control groups did not present statistically significant difference for any of the evaluated strains indicating that the nanoformulation components do not present fungicidal activity against the biofilms. The most efficient nanoformulation was 6CN10:HP-β-CD-nanosphere, which was able to reduce the CFU's number recovered from the discs for all strains investigated, with reduction percentages ranging

from 90.9 % to 100 % ($p < 0.05$) compared to Control. Being, the highest reduction observed for *C. neoformans* URM 6907 (100%, $p < 0.05$).

6CN10-nanosphere was the second best nanoformulation, promoting a statistically significant reduction ($p < 0.05$) in CFU for 50 % of the strains (URM 6895 and URM 6909) when compared to Control group. For the strain URM 6909 the reduction values of the groups treated with 6CN10-nanosphere and 6CN10: HP- β -CD-nanosphere do not present statistical difference.

At least, treatment with 6CN10:HP- β -CD-nanocapsule promoted a small reduction in CFU for strains URM 6895 and URM 6906 (around 50 %; $p < 0.05$).

Our results showed only a fungistatic effect for 6CN10-nanosphere and 6CN10:HP- β -CD-nanocapsule, whereas 6CN10:HP- β -CD-nanosphere showed fungicidal activity against *Cryptococcus* biofilms.

In the present study, catheter discs were used for biofilm formation in accordance with Vandenboch et al.²¹ Figure 2 shows a Scanning Electron Microscopy discs with biofilm formation. Figures 2A and 2B represents the positive controls evidencing the growth of *C. neoformans* URM 6906 and *C. neoformans* URM 6907. No drugs were used to control (YNB media only), which shows the expected growth. Figures 2C and 2D shows growth of *C. neoformans* URM 6906 and *C. neoformans* URM 6907 with the use of blank (nanoformulation without 6CN10). Figures 2E and 2F represents the use of 6CN10:HP- β -CD-nanosphere against *C. neoformans* URM 6907 and *C. neoformans* URM 6909 respectively, where there is no growth of the *Cryptococcus* strains in the biofilm.

Discussion

According to Abreu et al.²² and Mohareb et al.²³ compounds containing thiophene ring possess selective and significant antifungal activity against *C. albicans*, and in accordance with Ram et al.²⁴ strains of *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*,

Trichophyton mentagrophytes and *Sporothrix schenckii* were sensitive to the analogous thiophene evaluated in this work. Experiments carried out by Ryu et al.,²⁵ evidenced that synthetic thiophenes possess good activity against *A. niger*, *C. albicans*, *C. krusei* and *C. tropicalis*, dissenting in part of our findings that showed moderate to weak antifungal effect against *Candida* strains. However, Lima et al.²⁶ found growth reduction of dermatophytes, including *Trichophyton rubrum* corroborating our results.

Analogous or homologous structural variations can be performed to give new physical properties and to modify the reactivity of the molecules, which leads to changes in the distribution in cells and tissues. In addition, increase the access to the active sites of enzymes and receptors. Heterocyclic compounds, such as thiophene derivatives, possess broad biological activity however have not been extensively studied on antifungal context. Our group (Mendonça-Junior et al.,¹¹ Scotti et al.,¹² and Souza et al.¹³) have tested the *in vitro* antifungal activity of various thiophene derivatives against pathogenic fungi and we have already noticed that fungi of the *Cryptococcus neoformans* species are more sensitive to 2-amino-thiophene derivatives than species of the genus *Candida*.

There are several factors involved in the *C. neoformans* virulence as the ability to grow at 37 °C, the secretion of extracellular proteases and phospholipases, the production of mannitol, urease, lactase and melanin that protects against oxidizing agents, immune system and damage caused by heat, cold and ultraviolet radiation. Furthermore, the presence of glucoroxilomanana-polysaccharide capsule has been implicated in modulating the *Cryptococcus* blood-brain barrier interaction.²⁷ The capsule is a major virulence factor but its role in the central nervous system invasion remains unclear. Capsule associated structural changes such as phenotypic switching, has been reported to enhance crossing of the blood-brain barrier.^{28,29} We believe that the capsule can interacts *in vitro* with the nanoparticles structure, improving the access of the 6CN10 to the yeast, which results in lower MIC values. This

interaction may be mediated by oxylipins, 3-OH fatty acids that are released in the capsule surface as founded by Sebolai et al.³⁰ However, complementary *ex vivo* and *in vivo* studies are necessary to investigate the mechanisms of the antifungal activity of these nanoformulations containing thiophene.

In previous studies, our group had already found that the incorporation of thiophene derivatives in pharmaceutical preparations causes an increase in the antifungal activity of the compounds, as observed in the studies of Guimarães et al.¹⁴ performed with the 2-amino-thiophene derivative called 5CN05 embedded in a microemulsion system, resulting in a 7.7-fold increase in activity against *C. neoformans* (reducing MIC to 17.0 for 2.2 µg/mL), and in the work of Eleamen et al.¹⁵ where it was observed an increase in the anti-Cryptococcus activity from about 3.5 to 7 times, when compound 6CN10 was complexed with HP-β-CD. These results help to validate the study published by Scotti et al.¹² and, prove that pharmacotechnical procedures, that help to mask the intrinsic low aqueous solubility of 2-amino-thiophene derivatives, contribute to the increase of its antifungal potentials.

This study confirms the promising potential of 2-amino-thiophene derivatives to become a new class of antifungal agents, especially useful for infections caused by *Cryptococcus*. Incorporating 6CN10 and more clearly 6CN10 complexed with 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (6CN10:HP-β-CD) in nanosystems such as nanospheres and nanoparticles proved to be an excellent way to minimize inherent unwanted drug physicochemical properties, in particular its very low water solubility, which made less attractive the idea of performing *in vivo* studies, due to this large pharmacokinetics barrier. Thus, allowing us to perform *in vivo* studies. The complexation of the drug with HP-β-CD improve the “water solubility” and the incorporation in nanoformulations confer “high bioavailability” to the drug (6CN10) without changing the drug’s chemical structure, in this context it is necessary a smaller amount of drug to ensure the antifungal activity, which certainly

will minimize the possibility of the occurrence of side effects when performing *in vivo* studies. These facts associated to the significant increase in the anti-cryptococcal activity (more than 3,000 times compared to the free drug), with MIC values lower than the reference drug AmpB (up to 5 times more active), leads us to believe that after conducting more studies to ensure the efficacy, the mode of action at molecular level and the safety, some of these nanosystems containing 6CN10 may be used in the clinical medicine as an alternative treatment against systemic cryptococcosis infections.

Acknowledgments

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) (grant number 308590/2017-1) and State University of Paraíba through the Research and Post-Graduation Program (PROPESQ/PRPGP). The authors wish to thank the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE, Pernambuco, Brazil) for the scholarship of Giovanna R. A. Eleamen and the Diretoria de Inovação e Empreendedorismo (DINE/UFPE) for support funding by Edital de Apoio a Inovação 2014. We also would like to thank the Center for Strategic Technologies Northeastern (CETENE, Brazil) for MALDI-TOF MS and SEM analyses and URM Culture Collection (UFPE, Brazil) for providing the isolates. This work was conducted during a scholarship Financed by CAPES – Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education within the Ministry of Education of Brazil.

Conflict of interest: All the authors declare they have no conflict of interests for this work.

References

1. Denham ST, Wambaugh MA, Brown JCS. How environmental fungi cause a range of clinical outcomes in susceptible hosts. *J Mol Biol*. 2019; doi: 10.1016/j.jmb.2019.05.003. *IN PRESS*.
2. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases Estimate Precision. *J Fungi (Basel)*. 2017; 3(4):1-29.
3. Enoch DA, Yang H, Aliyu SH, Micallef C. The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. *Methods Mol Biol*, 2017; 1508:17-65.
4. Chastain DB, Henao-Martínez AF, Franco-Paredes C. Opportunistic invasive mycoses in AIDS: cryptococcosis, histoplasmosis, coccidioidomycosis, and talaromycosis. *Curr Infect Dis Rep*. 2017; 19(36):1-9.
5. Rajasingham R, Smith RM, Park BJ, et al. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. *Lancet Infect Dis*. 2017; 17(8):873–881.
6. Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, et al. Invasive candidiasis. *Nature Rev Dis Primers*. 2018; 4:Article number:18026.
7. Perfect JR, Cox GM. Drug resistance in *Cryptococcus neoformans*. *Drug Resist Updat*. 1999; 2:259-269.
8. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis. Persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2012; 20:133-163.
9. Lima-Neto RG, Santos C, Lima N, et al. Application of MALDI-TOF MS for requalification of *Candida* clinical isolates culture collection. *Braz J Microbiol*. 2014; 45(2):515-522.
10. Magalhães TFF, Silva CM, Fátima A, et al. Hydroxyaldimines as potent *in vitro* anticryptococcal agents. *Lett Appl Microbiol*. 2013; 57:137-143.
11. Mendonça-Junior FJB, Lima-Neto RG, de Oliveira TB, et al. Synthesis and evaluation of the antifungal activity of 2-(substituted-amino)-4,5-dialkyl-thiophene-3-carbonitrile derivatives. *Lat Am J Pharm*. 2011; 30:1492-1499.
12. Scotti L, Scotti MT, Lima EO, et al. 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.
13. Souza BCC, De Oliveira TB, Aquino TM, et al. Preliminary antifungal and cytotoxic evaluation of synthetic cycloalkyl[b]thiophene derivatives with PLS-DA analysis. *Acta Pharm*. 2012; 62:221-236.
14. Guimarães GP, Reis MYFA, da Silva DTC, et al. Antifungal activity of topical microemulsion containing a thiophene derivative. *Braz J Microb*. 2014; 45(2):545-550.

15. Eleamen GRA, da Costa SC, Lima-Neto RG, et al. Improvement of Solubility and Antifungal Activity of a New Aminothiophene Derivative by Complexation with 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *J Braz Chem Soc.* 2017; 28(1):116-125.
16. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, et al. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm.* 1989; 55:25-28.
17. Sherf AF. A method for maintaining *Phytophthora septentrionalis* for long periods without transference. *Phytopathology.* 1943; 3:30-32.
18. Barnett JA, Paire RW, Yarrow D. *Yeasts: Characteristics and Identification*. 3rd ed. Cambridge University Press: Cambridge, USA. 2000. <https://trove.nla.gov.au/version/45684471>.
19. Hoog GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ. *Atlas of Clinical Fungi*; Utrecht/Reus, Netherland: Centraal bureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, 2000.
20. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008) *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Approved standard-3rd edition M27-A3*; Wayne, PA, USA: Clinical Laboratory Standards Institute
21. Vandenbosch D, Braeckmans K, Nelis HJ, Coenye T. Fungicidal activity of miconazole against *Candida* spp. *Biofilms J Antimicrob Chemother.* 2010; 65:694-700.
22. Abreu AS, Ferreira PMT, Monteiro LS, et al. Synthesis of pure stereoisomers of benzo[b]thienyl dehydrophenylalanines by Suzuki cross-coupling. Preliminary studies of antimicrobial activity. *Tetrahedron.* 2004; 60:11821-11828.
23. Mohareb RM, Ho JZ, Alfarouk FO. Synthesis of thiophenes, azoles and azines with potential biological activity by employing the versatile heterocyclic precursor N-benzoylcianoacetylhydrazine. *J Chin Chem Soc.* 2005; 54:1053-1066.
24. Ram VJ, Goel A, Shukla PK, Kapil A. Synthesis of thiophenes and thieno[3,2-c]pyran-4-ones as antileishmanial and antifungal agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 1997; 7:3101-3106.
25. Ryu C, Lee S, Han J, et al. Synthesis and antifungal activity of 5-arylamino-4,7-dioxobenzo[b]thiophenes. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005; 15:2617-2620.
26. Lima B, Agüero MB, Zygodlo J, et al. Antimicrobial activity of extracts, essential oil and metabolites obtained from *Tagetes mendocina*. *J Chilean Chem Soc.* 2009; 54:68-72.
27. Eisenman HC, Casadevall A, McClelland EE. New insights on the pathogenesis of invasive *Cryptococcus neoformans* infection. *Curr Infect Dis Rep.* 2007; 9:457-464.
28. Guerrero A, Jain N, Goldman DL, Fries BC. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology.* 2006; 152:3-9.
29. Jain N, Guerrero A, Fries BC. Phenotypic switching and its implications for the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Research.* 2006; 6:480-488.
30. Sebolai OM, Pohl CH, Botes PJ, et al. 3-Hydroxy fatty acids found in capsules of *Cryptococcus neoformans*. *Can J Microbiol.* 2007; 53:809-812.

Table 1. Antifungal activity of free-drug (6CN10), 6CN10:HP- β -CD complex, 6CN10 nanoformulations and Amphotericin B against *Candida* and *Cryptococcus* clinical isolates, obtained from patients with candidemia and neurocryptococcosis respectively, in two Tertiary Public Hospitals at Recife, Brazil, from July 2012 to June 2013.

Microorganism	Strain or patient number	Compounds and Nanoformulation – MIC [†] values in $\mu\text{g/mL}$						AmpB [‡]
		6CN10-nanocapsule	6CN10:HP- β -CD nanocapsule	6CN10-nanosphere	6CN10:HP- β -CD nanosphere	6CN10:HP- β -CD complex	6CN10 free-drug	
<i>C. albicans</i>	99	G ^{††}	G	G	G	G	41.66	0.25
<i>C. albicans</i>	122	G	G	G	G	G	41.66	0.25
<i>C. albicans</i>	4451	G	G	G	G	G	41.66	1
<i>C. albicans</i>	8299	G	G	G	G	G	166.66	2
<i>C. albicans</i>	9925	G	G	G	G	G	166.66	2
<i>C. famata</i>	5623	G	G	G	G	G	333.33	2
<i>C. glabrata</i>	8340	G	G	G	G	G	166.66	0.5
<i>C. guilliermondii</i>	632	G	G	G	G	G	83.33	0.5
<i>C. krusei</i>	14206	G	G	G	G	G	333.33	1
<i>C. tropicalis</i>	7866	G	G	G	G	G	83.33	1
<i>C. parapsilosis</i>	290	G	G	G	G	G	83.33	1
<i>C. parapsilosis</i>	7736	G	G	G	G	G	83.33	1
<i>C. parapsilosis</i>	9968	G	G	G	G	G	333.33	2
<i>C. parapsilosis</i>	13531	G	G	G	G	G	83.33	0.25
<i>C. parapsilosis</i>	451	G	G	G	G	G	83.33	1
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	G	G	G	G	G	83.33	0.5
<i>C. neoformans</i>	URM 6895	83.33	0.2	0.65	0.1	46.66	333.33	0.5
<i>C. neoformans</i>	URM 6901	83.33	0.1	0.32	0.1	46.66	333.33	0.25
<i>C. neoformans</i>	URM 6907	83.33	0.1	41.66	0.2	46.66	166.66	0.125
<i>C. neoformans</i>	URM 6909	83.33	0.1	41.66	0.2	46.66	166.66	0.125

[†]MIC - Minimal Inhibitory Concentration.

[‡]AmpB - Amphotericin B.

^{††}G - Growth at the highest concentration tested.

URM - URM Culture Collection/UFPE/Brazil.

Table 2. Number of CFU of *Cryptococcus neoformans* biofilms on silicone discs after 6CN10 nanoformulations treatment.

<i>Cryptococcus</i> strain	6CN10- nanosphere	6CN10:HP- β -CD nanosphere	6CN10:HP- β -CD nanocapsule	Blank [†]	Control [‡]
URM ^{††} 6895	12.33 $\pm$ 4.16	3.00 $\pm$ 1.00	17,66 $\pm$ 2.08	43.00 $\pm$ 6.08	47.00 $\pm$ 4.00
URM 6906	30.66 $\pm$ 4.72	3.33 $\pm$ 1.52	18.33 $\pm$ 2.08	36.00 $\pm$ 4.58	36.66 $\pm$ 3.51
URM 6907	8.66 $\pm$ 1.52	0.66 $\pm$ 0.57	7.66 $\pm$ 1.52	9.66 $\pm$ 2.51	9.33 $\pm$ 3.78
URM 6909	2.33 $\pm$ 1.52	1.66 $\pm$ 0.57	26.00 $\pm$ 3.00	6.66 $\pm$ 2.51	15.00 $\pm$ 6.08

[†] Blank - yeasts and silicone discs in compounds of the nanoformulations without 6CN10.

[‡] Control - yeasts and silicone discs in culture media only (YNB supplemented with 5 mM glucose).

^{††} URM - URM Culture Collection/UFPE/Brazil.

Values are expressed as Mean $\pm$ SEM of three independent experiments.

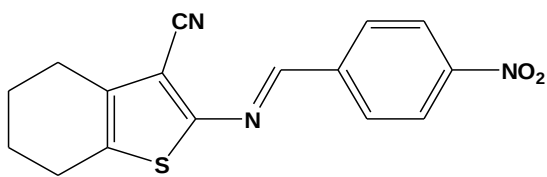


Figure 1. Chemical structure of 6CN10.

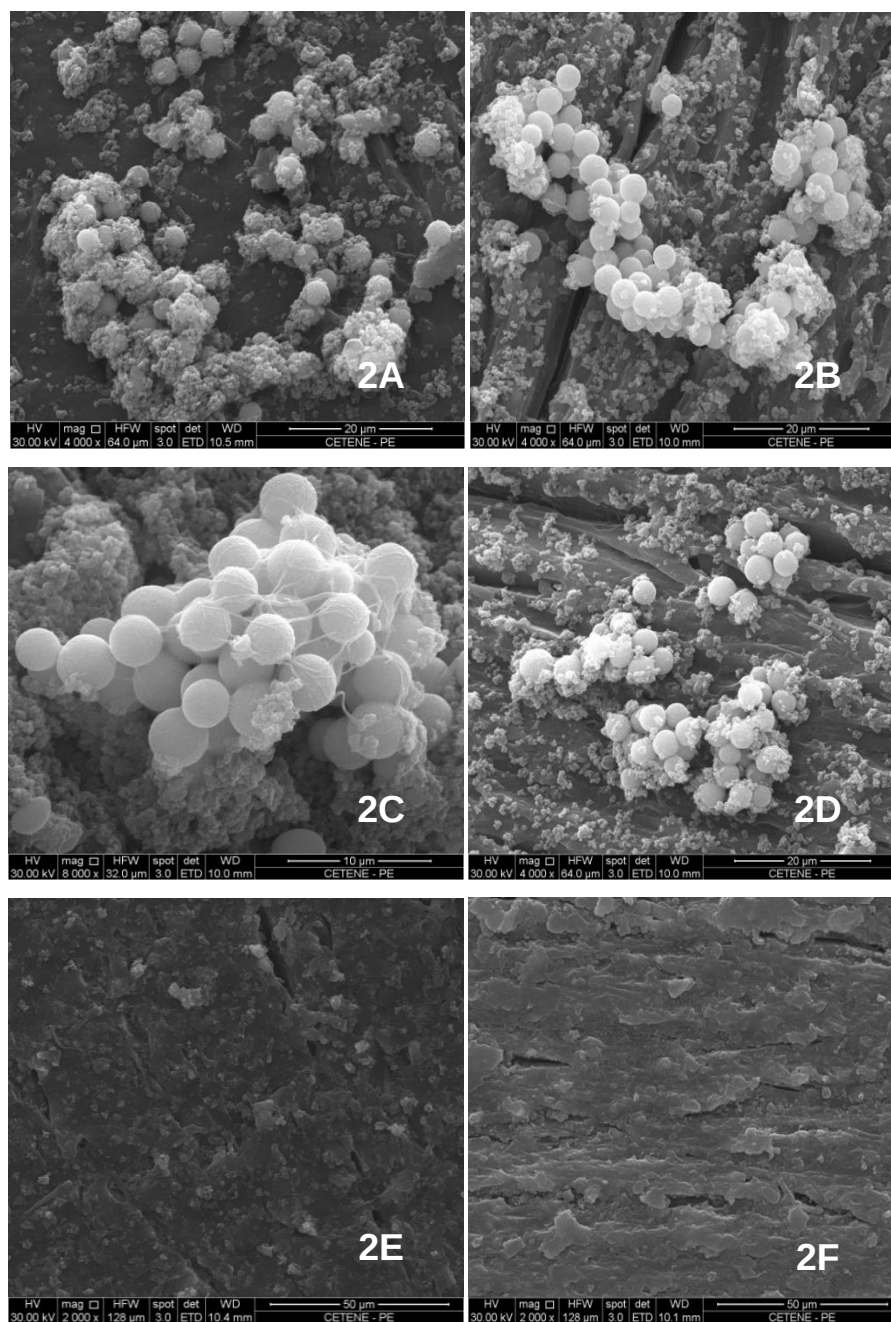


Figure 2. Scanning electron micrograph after 48 h biofilm formation of *Cryptococcus neoformans* on silicone discs. URM 6906 (2A) and URM 6907 (2B) in YNB media only (Control); URM 6906 (2C) and URM 6907 (2D) treated with Blank (nanoformulations without 6CN10); URM 6907 (2E) and URM 6909 (2F) treated with 6CN10:HP-β-CD-nanosphere.

APÊNDICE B – PATENTE 1 – DERIVADOS 2 AMINOTIOFÊNICOS COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 019689 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24134488000108

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 50670-901

País: Brasil

Telefone: (81)2126 8959

Fax: (81)2126 8959

Email: patentes_dine.propesq@ufpe.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 20/09/2019 às 15:58, Petição 870190094454

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): DERIVADOS 2-AMINO-TIOFÊNICOS COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS

Resumo: A presente patente de invenção aborda novos compostos sintéticos derivados de 2-amino-tiofênicos, que apresentam ação antifúngica. Os precursores 2-amino-tiofênicos apresentados nessa patente foram sintetizados através da quarta versão da reação de Gewald. A avaliação in vitro da sensibilidade de espécies dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*, além dos fungos filamentosos dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton* contra 19 derivados 2-amino-tiofênicos foi realizada pelo método de microdiluição em caldo. Os compostos mais bioativos in vitro seguiram avaliação da toxicidade pela atividade hemolítica. Os compostos mais ativos para as leveduras (CIM 8 – 16 µg.mL) foram o CNO2, CN06, CN07, CN08, CN10, CN11, CN21 e CN23, sendo o CN07 o que apresentou excelente resultado frente a *C.neoformans*, com um CIM de 8 µg.mL e para dermatófitos (CIM 32 - 1.024 µg.mL) CN05, CN06, CN07, CN17, CN19 com CIM de até 32 µg/mL para as moléculas CN05, CN19 e CN06. No que se refere a atividade hemolítica, as moléculas CN13 e CN17 apresentaram as menores taxas de hemólise, sendo 2,5 %. Diante do exposto, os derivados de tiofeno 2-amino-substituídos demonstram-se moléculas promissoras no desenvolvimento de compostos antifúngicos. Estudo in vivo são essenciais para futuras aplicações médicas.

Figura a publicar: 1

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 20/09/2019 às 15:58, Petição 870190094454

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 5**Nome:** WENDELL WONS NEVES**CPF:** 06433115489**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Estudante de Pós Graduação**Endereço:** Rua Cassilândia, N° 190, APT 202, Várzea**Cidade:** Recife**Estado:** PE**CEP:** 50740-370**País:** BRASIL**Telefone:** (81) 997 741723**Fax:****Email:** wendellbiomedicina@gmail.com**Inventor 2 de 5****Nome:** REGINALDO GONÇALVES DE LIMA NETO**CPF:** 03547189403**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Rua Amália Bernadino de Souza, 670, apt. 1601, Boa Viagem**Cidade:** Recife**Estado:** PE**CEP:** 51021-150**País:** BRASIL**Telefone:** (81) 991 479644**Fax:****Email:** goncalves_reginaldo@hotmail.com**Inventor 3 de 5**

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 20/09/2019 às 15:58, Petição 870190094454

Nome: FRANCISCO JAIME BEZERRA MENDONÇA JUNIOR

CPF: 03225537411

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Golfo da Califórnia Nº 90, Apto. 701A, Intermare

Cidade: Cabedelo

Estado: PB

CEP: 58102-100

País: BRASIL

Telefone: (81) 998 741484

Fax:

Email: franciscojbmendonca@yahoo.com.br

Inventor 4 de 5

Nome: REJANE PEREIRA NEVES

CPF: 21401365434

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua José Paraíso Nº 135, apt. 01, Boa Viagem

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 51030-390

País: BRASIL

Telefone: (81) 999 589247

Fax:

Email: rejadel@yahoo.com.br

Inventor 5 de 5

Nome: ISADORA SILVA LUNA

CPF: 07116060480

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua Joana Batista Cardoso, Nº 60, Jardim São Paulo

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58053-170

País: BRASIL

Telefone: (83) 998 311002

Fax:

Email: isadoralunas@gmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	GRU e comp - COA 302.pdf
Relatório Descritivo	Relatório Descritivo - COA 302.pdf
Reivindicação	Reivindicações - COA 302.pdf
Desenho	Figuras - COA 302.pdf
Resumo	Resumo - COA 302.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

☒ **Declaração Positiva de Acesso:** Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, realizado a partir de 30 de junho de 2000, e que foram cumpridas as determinações da Lei 13.123 de 20 de maio de 2015, informando ainda:

Número da Autortização de Acesso: A7B6A3E

Data da Autortização de Acesso: 15/04/2019

Origem do material genético e do conhecimento tradicional associado, quando for o caso

Fungo
Candida albicans 4990
Procedência da amostra: Ex situ
Nome do estabelecimento Comercial de Aquisição: URM-UFPE
UF: PE
Município: Recife

Fungo
Candida albicans 4987
Procedência da amostra: Ex situ
Nome do estabelecimento Comercial de Aquisição: URM-UFPE
UF: PE
Município: Recife

Fungo
Candida albicans 4986
Procedência da amostra: Ex situ
Nome do estabelecimento Comercial de Aquisição: URM-UFPE
UF: PE
Município: Recife

Fungo
Candida parapsilosis 4984
Procedência da amostra: Ex situ
Nome do estabelecimento Comercial de Aquisição: URM-UFPE
UF: PE
Município: Recife

Fungo
Candida parapsilosis 4970
Procedência da amostra: Ex situ
Nome do estabelecimento Comercial de Aquisição: URM-UFPE
UF: PE
Município: Recife

Fungo
Cryptococcus neoformans 5811
Procedência da amostra: Ex situ
Nome do estabelecimento Comercial de Aquisição: URM-UFPE
UF: PE
Município: Recife

Fungo
Cryptococcus neoformans 5980
Procedência da amostra: Ex situ
Nome do estabelecimento Comercial de Aquisição: URM-UFPE
UF: PE

PETICIONAMENTO ELETRÔNICO

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 20/09/2019 às 15:58, Petição 870190094454

Município: Recife

Fungo

Epidermophyton floccosum 6999

Procedência da amostra: Ex situ

Nome do estabelecimento Comercial de Aquisição: URM-UFPE

UF: PE

Município: Recife

Fungo

Epidermophyton floccosum 6754

Procedência da amostra: Ex situ

Nome do estabelecimento Comercial de Aquisição: URM-UFPE

UF: PE

Município: Recife

Fungo

Trichophyton mentagrophytes 5431

Procedência da amostra: Ex situ

Nome do estabelecimento Comercial de Aquisição: URM-UFPE

UF: PE

Município: Recife

Fungo

Trichophyton mentagrophytes 5432

Procedência da amostra: Ex situ

Nome do estabelecimento Comercial de Aquisição: URM-UFPE

UF: PE

Município: Recife

Fungo

Trichophyton rubrum 6753

Procedência da amostra: Ex situ

Nome do estabelecimento Comercial de Aquisição: URM-UFPE

UF: PE

Município: Recife

Fungo

Trichophyton tonsurans 700

Procedência da amostra: Ex situ

Nome do estabelecimento Comercial de Aquisição: URM-UFPE

UF: PE

Município: Recife

Fungo

Trichophyton tonsurans 2822

Procedência da amostra: Ex situ

Nome do estabelecimento Comercial de Aquisição: URM-UFPE

UF: PE

Município: Recife

Declaração de veracidade

☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

RELATÓRIO DESCRITIVO

DERIVADOS 2-AMINO-TIOFÊNICOS COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS

01. A presente patente de invenção refere-se a novos compostos sintéticos derivados de 2-amino-tiofênicos, e seus sais, ésteres, amidas ou pró-drogas, farmacologicamente aceitáveis, que apresentam elevada ação antifúngica, que possam ser utilizados como fármacos ou em associação a outros fármacos para fins de tratamento ou profilaxia de infecções causadas por fungos em animais e em seres humanos.

02. Os compostos da presente invenção apresentam elevada ação inibitória sobre fungos dermatófitos e leveduriformes causadores de patologias em humanos e animais incluindo, mas não se limitando a espécies de *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*.

03. Ensaios *in vitro* revelaram que os derivados tiofênicos apresentam capacidade de inibir o crescimento de diversas espécies de fungos dermatófitos e leveduriformes, sem causar consideráveis efeitos tóxicos podendo, portanto, ser utilizados como alternativas aos antifúngicos convencionais, em casos de reincidência ou resistência, ou até mesmo como uma nova alternativa de tratamento.

04. Embora os fungos sejam essenciais para a vida na Terra por causa seu papel na ciclagem de nutrientes, e seu presente e potencial usos na biotecnologia, eles também causam sérios problemas em muitos aspectos da vida, principalmente relacionadas diretamente ao ser humano. As doenças fúngicas são comuns, com morbidade variável, variando desde uma infecção de unha, causando preocupação estética até doença invasiva, com uma taxa de mortalidade relativamente alta entre as doenças infecciosas. A alta incidência de infecções fúngicas causadas por essas leveduras apresenta um desafio para os médicos de diferentes especialidades dificuldades no diagnóstico e tratamento dessas infecções.

05. Em relação as leveduras, a *Candida* sp. está associada a elevada morbidade e mortalidade, apresentando uma alta taxa de incidência nas diversas distribuições geográficas. Em paralelo, a criptococose, causada pelo *Cryptococcus* sp., é responsável por mais de 600.000

caso de mortes por ano, sendo considerada a doença fúngica fatal mais prevalente no mundo.

06. Os dermatófitos, grupo de fungos filamentosos propensos a infectar tecidos ricos em queratina como pele, unha e cabelo, possuindo distribuição geográfica ampla é a micose mais comum no mundo, afetando 20 a 25% da população mundial, tendo como principais agentes etiológicos fungos do gênero *Microsporum*, *Epidermophyton* e *Trichophyton*.

07. A taxa global de infecções fúngicas está crescendo, acredita-se que mais de 300 milhões de pessoas sofram de uma infecção fúngica grave resultando em mais de 1.350.000 mortes no mundo. Infelizmente, as opções de tratamento são muito limitadas, pois existem poucas classes químicas que representam os antifúngicos existentes. As classes de drogas antifúngicas incluem: polienos, azóis, alilaminas, flucitosina e equinocandinas. Os azóis (por exemplo, fluconazol, voriconazol e posaconazol) e alilaminas (por exemplo, terbinafina) inibem a biossíntese do ergosterol, enquanto os polienos (por exemplo, anfotericina B) se ligam ao ergosterol na membrana plasmática, onde formam poros grandes que destroem a função celular. A resistência clínica refere-se a falha terapêutica em que um paciente não responde a um fármaco antifúngico após administração numa dose padrão.

08. O desenvolvimento de resistência antifúngica é complexo e depende de múltiplos fatores. O estado imunológico do hospedeiro é um fator crítico, pois os medicamentos fungistáticos devem funcionar sinergicamente para controlar e eliminar uma infecção. Pacientes com disfunção imune severa são mais propensos a falha de terapia, como o medicamento antifúngico deve combater a infecção sem o benefício de uma resposta imune. Outro fator crítico é a elevada toxicidade dos antifúngicos a nível renal e hepático, o que dificulta a escolha do tratamento, principalmente em pacientes imunodeprimidos.

09. A falha no tratamento eficaz, devido a diagnósticos inadequados ou retardados, pode resultar em doença crônica grave ou pode ser fatal. O reconhecimento da importância das infecções fúngicas levou a um aumento dramático no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos para o tratamento e prevenção de infecção. Devido às limitações apresentadas pelos medicamentos atualmente disponíveis, existe uma grande necessidade por agentes terapêuticos mais baratos, efetivos e menos tóxicos que possam substituir as drogas convencionais no tratamento das infecções fúngicas.

10. Atualmente, diversas patentes têm reivindicado novas entidades químicas com propriedades terapêuticas para o tratamento das micoses, a exemplo de: US20070191395A1, US5888941A, US5807854A, WO/2019/045581, WO/2019/012412, AR244224A1, IT1070993B; porém nenhuma dessas invenções têm logrado êxito e resultado num novo medicamento.

11. Os derivados tiofênicos, em especial os 2-amino-tiofênicos têm se mostrado importantes intermediários sintéticos para química medicinal, permitindo a obtenção de um grande número de compostos bioativos com diversas aplicações na área médica e biológica, onde se incluem atividades como: antitumorais, ansiolíticas, antiinflamatórias, antiparasitárias, antidiabéticas, antioxidantes, antiplaquetária, antibacterianas e antifúngicas.

12. Em trabalhos anteriores do nosso grupo foi identificado o grande potencial antifúngico de derivados cicloalquil[*b*]tiofenos frente a diversas espécies de fungos, especialmente *Cryptococcus neoformans* e *Candida* sp. O Laboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas (LSVM) conjuntamente com o Laboratório de Micologia Médica da UFPE e Laboratório de Micologia da UFPB têm nos últimos anos obtidos diversos resultados comprovando o grande potencial antifúngico de cicloalquil[*b*]tiofenos, e em um desses trabalhos Mendonça Júnior e colaboradores (2011) observaram que os compostos com atividade mais promissora foram os derivados que possuíam em sua estrutura uma porção nitroaromática.

13. Posteriormente, esses derivados 2-animotiofênicos mais promissores foram incorporados em preparações farmacêuticas como emulsões e complexos com ciclodextrinas, onde tiveram sua atividade antifúngica melhorada. Dessa forma, uma série de resultados obtidos pelo nosso grupo sob forma de patentes e artigos (Lima-Neto et al. (2011); Mendonça Júnior et al. (2011); Scotti et al. (2012); Guimarães et al., (2014); Eleaman et al. (2016); e patentes BR1020140290273 e BR1020170108309) comprovam o grande potencial antifúngico de derivados tiofênicos.

14. Embora, como descrito anteriormente, existam diversos relatos de derivados 2-amino-tiofênicos com propriedades farmacológicas comprovadas, ou alvos de proteção intelectual, os compostos aqui descritos não apresentam, qualquer relato na literatura ou patente relacionado às suas obtenções (síntese) e/ou aos seus potenciais antifúngicos, o que comprova o caráter exclusivo e inovador desta invenção.

15. Além disso, as estruturas químicas dos compostos ora reivindicados e sintetizados apresentam características estruturais únicas, que foram pensadas de forma a otimizar as características farmacocinéticas de derivados 2-amino tiofênicos anteriores, que se mostraram possuidores de promissora atividade farmacológica, mas que devido a muito pouca solubilidade em água, inviabilizaram o prosseguimento das pesquisas. Essa modificação fundamental foi a exclusão de quaisquer radicais alquílicos, ou cicloalquílicos nas posições 4 e 5 do anel tiofênico. Essa pontual modificação estrutural, permitiu obter compostos inéticos, com melhor perfil farmacocinético, melhor solubilidade em água, sem perda da atividade antifúngica.

16. Os novos derivados 2-amino-tiofênicos, descritos na presente invenção, apresentam a Fórmula Geral representada na Figura 1.

17. Para a Fórmula Geral (Figura 1) o radical aril, pode representar qualquer radical benzênico, naftalênico, ou heteroaromáticos, como quinolina, isoquinolina, benzo[d][1,3]dioxol, pirrol, pirrolidina, tiofeno, furano ou indol, podendo ainda esses grupos arila serem monosubstituído, disubstituídos ou trisubstituído com quaisquer um dos seguintes substituintes, que podem ser iguais ou diferentes entre si: H, quaisquer grupos alquílicos contendo de 1 a 15 carbonos de cadeia linear ou ramificada, grupos alquênil contendo de 1 a 15 carbonos de cadeia linear ou ramificada, grupos alquínil contendo de 1 a 15 carbonos de cadeia linear ou ramificada, -CN, -NO₂, -NH₂, -NHR, -NRR, -OCH₃, -OEt, -OiPr, OR, -F, -Cl, -Br, -I, -COOH, -COOR, -CONH₂, -CONHR, -CONHRR, -OH, trifluorometil ou difluormetil.

18. Os compostos dessa invenção dizem respeito a um grupo de derivados 2-amino-tiofênicos condensados a uma porção aromática ou heteroaromática não substituídas, mono- ou polisubstituídas, que podem ser sintetizados por procedimentos amplamente descritos na literatura (MENDONÇA-JUNIOR et al., 2011; PUTEROVÁ; KRUTOSÍKIVÁ; VÉGH, 2010), de acordo com os exemplos e esquemas a seguir (Figura 2 e Figura 3).

19. Os precursores 2-amino-tiofênicos apresentados nessa patente foram sintetizados através da quarta versão da reação de Gewald (PUTEROVÁ; KRUTOSÍKIVÁ; VÉGH, 2010) e em seguida foram reagidos em procedimento *one pot* em quantidades equimolares de diferentes aldeídos aromáticos substituídos através de dois métodos, sendo eles um convencional e por micro-ondas, gerando os compostos finais desejados que possuem atividade antifúngica.

Exemplo 01: Síntese do 2-[(4-metoxibenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila (CN01) por método convencional.

20. Uma mistura de 1,4-ditiano-2,5-diol (0,5 eq.; 0,250g; 0,0016 mmol) e malononitrila (1 eq.; 0,0032 mmol) em 5 mL de metanol (MeOH) com trietilamina (1 eq.; 0,223mL) foi agitada a 60 °C. Após 4 h foi adicionado ao meio reacional 4-metóxi-benzaldeído (1 eq.; 0,0032 g) e ácido acético (1,2 eq.; 0,12 mL), sendo arrefecido até à temperatura ambiente e continuando sob agitação *overnight*. Após constatado término da reação, o produto final foi filtrado e lavado sucessivas vezes com MeOH, obtendo-se um resíduo sólido cromatograficamente puro do composto CN01.

Exemplo 02: Síntese do 2-[(4-metoxibenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila (CN01) por reação no microondas.

21. Em um tubo de microondas foram adicionados 1,4-ditiano-2,5-diol (0,5 eq.; 0,100 g; 0,00065 mmol), malononitrila (1 eq.; 0,0013 mmol), bicarbonato de sódio (0,8 eq.; 0,001 mmol) em 2 mL de etilenoglicol. O tubo foi introduzido na cavidade do reator de microondas e irradiado a 80 °C por 8 min (tempo de rampa: 5 min). Em seguida, foi adicionado 4-metóxi-benzaldeído (1 eq.; 0,0013 mmol) e mais 0,5mL de etilenoglicol sob irradiação a 50°C por 2 min (tempo de rampa: 2 minutos e 30 segundos). Após confirmação de término da reação, o resíduo sólido reacional foi filtrado e lavado com uma solução 1:1 de metanol/água destilada gelada, até se apresentar cromatograficamente puro.

22. Esses dois procedimentos permitem obter todos compostos, ora reivindicados, através de metodologia similar.

23. Exemplos representativos de derivados 2-amino tiofênicos com ação antifúngica, acompanhado de dados físico-químicos e de ressonância magnética nuclear de hidrogênio que comprovam suas estruturas químicas, são descritos nas Tabelas 1 e 2 a seguir.

Tabela 1. Códigos, nomes químicos e características físico-químicas de compostos selecionados da presente invenção.

Composto	Nomenclatura IUPAC	Fórmula Molecular	Aparência e cor	Faixa de Fusão	R _f	PM (g/mol)
CN01	2-[(4-metoxibenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₃ H ₉ N ₂ O ₂ S	Cristal verde	133 - 135 °C	0,51	242,3
CN02	2-[(4-clorobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₂ H ₇ ClN ₂ S	Cristal verde	104 - 105 °C	0,65	246,72
CN03	2-[(4-fluorobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₂ H ₇ FN ₂ S	Cristal verde	109 - 110 °C	0,63	230,26
CN04	2-[(2,4-diclorobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₂ H ₆ Cl ₂ N ₂ S	Cristal amarelo	152 - 153 °C	0,78	281,16
CN05	2-[(2,6-diclorobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₂ H ₆ Cl ₂ N ₂ S	Cristal amarelo	150 - 151 °C	0,72	281,16
CN06	2-[(2-nitrobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₂ H ₇ N ₃ O ₂ S	Cristal verde	179 - 180 °C	0,32	257,27
CN07	2-[(3-nitrobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₂ H ₇ N ₃ O ₂ S	Cristal verde	196 - 197 °C	0,29	257,27
CN08	2-[(3-hidroxibenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₂ H ₉ N ₂ O ₂ S	Cristal verde	131 - 133 °C	0,43	228,27
CN09	2-[(4-metilbenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₃ H ₉ N ₂ O ₂ S	Cristal verde	116 - 117 °C	0,7	226,3
CN10	2-[(4-nitro-1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno]amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₄ H ₈ N ₄ O ₂ S	Pó amorfo amarelo	172 - 174 °C	0,22	486,46
CN11	2-[(5-metoxi-1 <i>H</i> -indol-3-il)-metileno]amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₅ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	Cristal azul	278 - 281 °C	0,34	281,33
CN12	2-[(4-dimetilaminobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₄ H ₁₂ N ₂ S	Pó amorfo laranja	143 - 144 °C	0,45	255,34
CN13	2-[(4-nitrobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₂ H ₇ N ₃ O ₂ S	Pó amorfo marrom	153 - 155 °C	0,33	257,27
CN15	2-[(1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno]amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₄ H ₉ N ₂ S	Pó amorfo amarelo	182 - 184 °C	0,27	251,31
CN17	2-[(3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₅ S	Pó amorfo amarelo	160 - 161 °C	0,5	302,35
CN19	2-(benzilideno-amino)-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₂ H ₈ N ₂ S	Cristal verde	113 - 114 °C	0,71	212,27
CN20	2-[(2,3-diclorobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₂ H ₆ Cl ₂ N ₂ S	Pó amorfo verde	175 - 176 °C	0,84	281,16
CN21	2-[(4-bromobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₂ H ₇ BrN ₂ S	Pó amorfo verde	95 - 98 °C	0,71	291,17
CN22	2-[(2-clorobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₂ H ₇ ClN ₂ S	Pó amorfo amarelo	145 - 147 °C	0,71	246,72
CN23	2-[(1,1'-bifenil)-4-il-metileno]amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₉ H ₁₂ N ₂ S	Cristal verde	180 - 181 °C	0,74	288,37
CN24	2-[(quinolin-2-il-metileno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₅ H ₈ N ₂ S	Pó amorfo preto	175 - 179 °C	0,53	263,32
CN25	2-[(piridin-2-il-metileno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₁ H ₇ N ₃ S	Cristal marrom	179 - 181 °C	0,14	213,26
CN26	2-[(3-etoxi-4-hidroxibenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₄ H ₁₂ N ₂ O ₃ S	Pó amorfo preto	109 - 112 °C	0,56	272,32
CN27	2-[(5-bromo-1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno]amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₄ H ₈ BrN ₂ S	Cristal marrom	132 - 136 °C	0,59	330,2
CN28	2-[(7-metil-1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno]amino]-tiofeno-3-carbonitrila	C ₁₅ H ₁₁ N ₂ S	Pó amorfo amarelo	178 - 182 °C	0,36	265,33

Tabela 2. Dados de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) de compostos selecionados, que comprovam as estruturas químicas dos compostos da presente invenção.

Composto	RMN ¹ H
----------	--------------------

7/13

CN01	δ 3.61 (s, 3H, H-13), 6.87 (d, 2H, $J = 8.89$ Hz, H-9, H-11), 7.11 (d, 1H, $J = 5.75$ Hz, H-1), 7.25 (d, 1H, $J = 5.69$ Hz, H-2), 7.71 (d, 2H, $J = 8.87$ Hz, H-8, H-12), 8.43 (s, 1H, H-6).
CN02	δ 7.39 (d, 1H, $J = 5.68$ Hz, H-1), 7.58 (d, 1H, $J = 5.68$ Hz, H-2), 7.61 (d, 2H, $J = 1.44$ Hz, H-8, H-12), 7.99 (d, 2H, $J = 1.00$ Hz, H-9, H-11), 8.77 (s, 1H, H-6).
CN03	δ 7.43 (d, 1H, $J = 5.64$ Hz, H-1), 7.65 (d, 1H, $J = 5.68$ Hz, H-2), 7.85 (t, 1H, $J = 8.24$ Hz, H-8 ou 12), 8.39-8.42 (m, 2H, H-9, H-11), 8.78 (t, 1H, $J = 1.88$ Hz, H-9 ou 11), 8.95 (s, 1H, H-6).
CN04	δ 7.43 (s, 1H, $J = 5.56$ Hz, H-1), 7.61 (dd, 1H, $J = 8.56$ Hz, $J = 2.04$ Hz, H-8), 7.65 (d, 1H, $J = 5.66$ Hz, H-2), 7.80 (d, 1H, $J = 1.98$ Hz, H-11), 8.15 (d, 1H, $J = 8.54$ Hz, H-9), 8.83 (s, 1H, H-6).
CN05	δ 7.22 (d, 1H, $J = 5.6$ Hz, H-1 ou H-2), 7.30 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 7.31 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 7.39 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 7.45 (d, 1H, $J = 5.6$ Hz, H-2 ou H-1), 8.66 (s, 1H, H-6).
CN06	δ 7.46 (d, 1H, $J = 5.6$ Hz, H-1 ou H-2), 7.66 (d, 1H, $J = 5.6$ Hz, H-2 ou H-1), 7.83 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz, H-9 ou 10), 7.92 (t, 1H, $J = 7.4$ Hz, H-9 ou 10), 7.16 (d, 1H, $J = 8.04$ Hz, H-8), 8.21 (d, 1H, $J = 7.56$ Hz, H-11), 9.04 (s, 1H, H-6).
CN07	δ 7.44 (d, 1H, $J = 5.64$ Hz, H-1 ou H-2), 7.65 (d, 1H, $J = 5.68$ Hz, H-2 ou H-1), 7.85 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-9), 8.43-8.39 (m, 2H, H-8, H-10), 8.79 (t, 1H, $J = 1.8$ Hz, H-12), 8.96 (s, 1H, H-6).
CN09	δ 6.98-7.02 (m, 2H, H-), 7.40 (d, 1H, $J = 5.64$ Hz, H-1), 7.47 (dt, 1H, $J = 7.2$ Hz, $J = 1.72$ Hz, H-), 7.58 (d, 1H, $J = 5.68$ Hz, H-2), 7.82 (dd, 1H, $J = 8.0$ Hz, $J = 1.8$ Hz, H-), 8.97 (s, 1H, H-), 11.49 (s, 1H, H-).
CN10	δ 7.31 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz, H-1 ou 2), 7.4 (d, 1H, H-1 ou 2), 7.44 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-13), 7.97 (dd, 1H, $J = 8.2$ Hz, $J = 0.86$ Hz, H-12 ou 14), 8.00 (dd, 1H, $J = 7.92$ Hz, $J = 0.84$ Hz, H-12 ou 14), 8.59 (d, 1H, $J = 2.84$ Hz, H-8), 9.01 (s, 1H, H-6), 12.94 (sl, 1H, H-15).
CN11	δ 3.82 (s, 1H, H-15), 6.91 (dd, 1H, $J = 8.76$ Hz, $J = 2.56$ Hz, H-13), 7.30 (d, 1H, $J = 5.76$ Hz, H-1 ou 2), 7.36 (d, 1H, $J = 5.76$ Hz, H-1 ou 2), 7.42 (d, 1H, $J = 8.76$ Hz, H-12), 8.06 (d, 1H, $J = 2.48$ Hz, H-11), 8.15 (d, 1H, $J = 3.12$ Hz, H-8), 8.82 (s, 1H, H-6), 12.02 (sl, 1H, H-16).
CN12	δ 3.05 (s, 6H, H-12, H-13), 6.81 (d, 2H, $J = 9.0$ Hz, H-), 7.28 (d, 1H, $J = 5.72$ Hz, H-1 ou 2), 7.37 (d, 1H, $J = 5.72$ Hz, H-1 ou 2), 7.81 (d, 2H, $J = 8.96$ Hz, H-), 8.49 (s, 1H, H-6).
CN17	δ 3.77 (s, 3H, H-14), 3.86 (s, 6H, H-13, H-15), 7.36 (s, 2H, H-8, H-12), 7.39 (d, 1H, $J = 5.68$ Hz, H-1 ou 2), 7.55 (d, 1H, $J = 5.68$ Hz, H-1 ou H-2), 8.69 (s, 1H, H-6).
CN21	δ 7.41 (d, 1H, $J = 5.72$ Hz, H-1), 7.60 (d, 1H, $J = 5.72$ Hz, H-2), 7.77 (d, 2H, $J = 8.48$ Hz, H-8, H-12), 7.94 (d, 2H, $J = 8.52$ Hz, H-9, H-11), 8.78 (d, 1H, $J = 5.68$ Hz, H-6).
CN23	δ 7.41 (d, 1H, $J = 5.72$ Hz, H-1 ou H-2), 7.60 (d, 1H, $J = 5.72$ Hz, H-1 ou H-2), 7.77 (d, 2H, $J = 8.48$ Hz, H-8 ou H-12), 7.94 (d, 2H, $J = 8.52$ Hz, H-9 ou H-11), 8.78 (d, 1H, $J = 5.68$ Hz, H-6).

24. Os compostos dessa invenção incluem também todos os sais, ésteres e amidas farmacologicamente aceitáveis, assim como as pró-drogas dos compostos descritos na Figura 1. O termo “sais” refere-se aos relativamente atóxicos sais obtidos através da adição de ácidos orgânicos ou inorgânicos aos compostos da presente invenção.

25. Esses sais podem ser preparados *in situ* durante o isolamento final e purificação dos compostos, ou separadamente, reagindo o composto purificado na sua forma de base livre juntamente com um ácido orgânico ou inorgânico, com o posterior isolamento do sal formado. Entende-se por sais farmaceuticamente aceitáveis, todos os: brometos, bromatos, cloretos, cloridratos, sulfatos, bissulfatos, nitratos, carbonatos, hidrogeno-carbonatos, acetatos, oxalacetatos, oxalatos, valeratos, oleatos, palmitatos, estearatos, laureatos, boratos, benzoatos, lactatos, fosfatos, tosilatos, citratos, maleatos, fumaratos, succinatos, tartaratos, mesilatos, glicoeptonatos, lactobionatos e laurilsulfonatos. São incluídos também os cátions presentes em bases e os metais alcalinos, como sódio, lítio, potássio, cálcio, sais de amônio quaternário, os cátions amônio, tais como amônio, tetrametilamônio, tetraetilamônio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina e trietilamina.

26. A presente invenção também diz respeito a todas preparações farmacêuticas que contenham como princípio ativo, ou um dos princípios ativos, um derivado 2-amino-tiofênico, juntamente com um ou mais adjuvantes e/ou veículos. Como preparação farmacêutica entendem-se todos os: pós, grânulos, comprimidos, comprimidos revestidos, cápsulas, soluções orais e/ou injetáveis, pomadas, cremes, elixires, xarope, emulsões, suspensões, loções, emplastos, géis, sistemas de liberação controlada, assim como micro e nanocápsulas, micro e nanopartículas, complexos de inclusão, micro e nanoemulsões, lipossomas e hidrogéis.

27. Esses compostos 2-amino-tiofênico podem ser administrados individualmente ou em associação com outros agentes terapêuticos como: antibióticos, agentes quimioterápicos, antibacterianos, antifúngicos e antivirais, imunomoduladores e outros fármacos utilizados no tratamento das infecções fúngicas.

28. A presente invenção também diz respeito às possíveis vias de administração dos derivados 2-amino-tiofênico, assim como das preparações farmacêuticas contendo algum desses derivados, que incluem as vias: oral, intravenosa, intra-arterial, intracraniano, intratorácica, intraperitoneal, parenteral, ocular, retal, cutânea, subcutânea, intradérmica, dérmica, inalatória ou intramuscular.

Comprovação do potencial antifúngico dos compostos ora reivindicados

29. Para comprovação do potencial antifúngico dos derivados 2-amino-tiofênicos da presente invenção, testes de sensibilidade antifúngica foram conduzidos, segundo as orientações do protocolo M27-A3 para fungos leveduriformes e o CLSI M38-A2 para fungos dermatófitos (CLSI, 2008).

30. Foram usados oito isolados de leveduras (três *Candida albicans*, três *Candida parapsilosis* e dois *Cryptococcus neoformans*) e sete isolados de fungos dermatófitos (dois *Epidermophyton floccosum*, dois *Trichophyton tonsurans*, dois *Trichophyton mentagrophytes* e um *Trichophyton rubrum*) obtidos na Coleção de Cultura Micoteca URM-UFPE, e todos foram avaliados contra o potencial antifúngico de 23 moléculas. Como padrão de referência foi utilizado a levedura *Candida parapsilosis* ATCC 22019. O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, pH $7,0 \pm 0,1$, com ácido morfolino propano sulfônico (MOPS; $0,165 \text{ mol.L}^{-1}$; Sigma-Aldrich). O meio de cultura foi esterilizado em membranas de $0,22 \mu\text{m}$ (Millipore, Darmstadt, Alemanha). O agente antifúngico comercial utilizado para comparação foi da classe dos triazólicos, o fluconazol (Pfizer, Nova York, EUA), preparado em água deionizada. Concentrações do fluconazol foram preparadas e usadas nos intervalos de $0,125$ a $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os derivados 2-amino tiofênicos foram testados nos intervalos de 2 a $1.024 \mu\text{g.mL}^{-1}$, dissolvidas em DMSO (Dimetilsulfóxido). Os isolados de leveduras e dermatófitos foram obtidos na Micoteca URM-UFPE a partir de isolados clínicos, e foram mantidos em meio Agar Sabouraud Dextrose (SDA) com adição de extrato de levedura a 5% para as leveduras e sem adição de extrato de leveduras para os dermatófitos, e incubados a 35°C . As suspensões dos isolados foram preparadas em solução salina, e sua densidade ajustada de acordo com a escala 0,5 de MacFarland em 90% da transmitância, utilizando um espectrofotômetro a 530nm . O volume do inóculo foi ajustado para $5,0 \text{ mL}$ de solução salina esterilizada e, posteriormente, diluído em RPMI 1640 para uma

concentração de 2.5×10^3 céls.mL⁻¹. Nos testes de sensibilidade foram utilizadas placas de microtitulação planas de 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). O inóculo foi adicionado aos poços com os derivados 2-amino tiofênicos e um antifúngico comercial a serem testados, e as placas foram incubadas a 35 °C durante 24 h para leveduras e de 4 a 7 dias para os dermatófitos a fim de determinar as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM). As CIM para os derivados 2-amino tiofênicos e o fluconazol foram determinados para 50 % de inibição em relação aos poços controles. As CIM para as drogas e o fluconazol foram determinados para 50 % de inibição em relação aos poços controles. Todos os testes foram realizados e valores de CIM foram expressos como média aritmética.

31. As Tabelas 3 e 4 apresentam alguns resultados que comprovam a atividade antifúngica observados dos compostos para fungos dermatófitos (Tabela 3) e fungos leveduriformes (Tabela 4).

32. Conforme pode ser observado na Tabela 3, vários derivados tiofênicos mostraram-se ativos frente aos dermatófitos testados, apresentando valores de MIC variando de 512 a 16. Alguns compostos ainda se mostraram tão ou mais eficazes que a droga referência utilizada como controle (fluconazol). As espécies fúngicas que se mostraram-se mais sensíveis foram *E. floccosum* e *T. rubrum*.

33. De forma equivalente ao observado nos ensaios frente aos dermatófitos, os ensaios frente às leveduras (Tabela 4), também demonstram a habilidade de vários derivados em inibir o crescimento fúngico, em especial do micro-organismos *C. neoformans*, onde foram identificados compostos com valores de MIC até 8 vezes inferiores à droga referência Fluconazol (a exemplo do derivado CN07, com MIC = 8 µg.mL⁻¹). Esses resultados, em especial, mostram-se muito relevantes, visto que as cepas de *C. neoformans* testadas mostraram resistentes ao fluconazol e sensíveis à vários derivados 2-amino tiofênicos, evidenciando que os mesmos podem se tornar alternativas viáveis para o combate de infecções fúngicas, a exemplo da criptococose.

Tabela 3. Resultados da avaliação da atividade antifúngica observados de compostos selecionados frente a fungos dermatófitos.

Cepas testadas nº URM	CN01	CN02	CN03	CN04	CN05	CN06	CN07	CN08	CN09	CN10	CN11	CN12	CN13	CN15	CN17	CN19	CN20	CN21	CN23	Fluor
ATCC 22019	1.024	1.024	512	R	R	128	R	1.024	R	R	128	1.024	1.024	1.024	R	R	512	128	128	0.5
<i>E. floccosum</i> 6999	256	128	256	128	R	32	64	R	R	1.024	R	128	1.024	256	256	16	256	512	R	16
<i>E. floccosum</i> 6754	1.024	R	R	R	R	R	R	1.024	512	R	R	R	512	R	R	256	R	512	R	2
<i>T. tonsurans</i> 700	1.024	R	256	R	64	R	R	1.024	R	128	R	256	512	R	128	32	R	64	R	>64
<i>T. mentagrophytes</i> 5431	1.024	1.024	256	R	R	R	R	R	128	R	R	1.024	R	R	256	R	R	128	1.024	32
<i>T. rubrum</i> 6753	1.024	1.024	R	R	32	R	128	R	R	64	R	1.024	64	R	64	R	R	32	1.024	64
<i>T. mentagrophytes</i> 5432	1.024	1.024	512	R	R	R	R	1.024	512	512	R	512	R	R	128	256	R	1.024	R	64
<i>T. tonsurans</i> 2822	1.024	1.024	R	R	256	R	R	1.024	R	512	R	1.024	R	R	R	32	R	1.024	R	32

Atividade antifúngica dos derivados tiofênicos e fluconazol frente a isolados de dermatófitos. Os resultados estão expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

R = Resistente. Valores de CIM acima de 1.024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. URM = Coleção de culturas URM. ATCC = American Type Culture Collection.

Tabela 4. Resultados da avaliação da atividade antifúngica observados de compostos selecionados frente a fungos leveduriformes.

Cepas testadas nº URM	CN01	CN02	CN03	CN04	CN05	CN06	CN07	CN08	CN09	CN10	CN11	CN12	CN13	CN15	CN17	CN19	CN20	CN21	CN23	Fluor
ATCC 22019	1.024	1.024	512	R	R	128	R	1.024	R	R	128	1.024	1.024	1.024	R	R	512	128	128	0.5
<i>C. albicans</i> 4990	R	256	256	R	512	R	512	R	R	R	R	R	R	R	1.024	R	512	R	R	0.5
<i>C. albicans</i> 4987	R	R	R	R	512	R	128	R	R	512	512	R	R	1.024	512	R	R	256	R	2
<i>C. albicans</i> 4986	R	R	512	R	R	R	R	R	1.024	R	512	R	R	1.024	512	R	128	R	R	2
<i>C. parapsilosis</i> 4984	R	R	R	R	256	512	R	512	R	R	R	R	R	512	R	R	128	R	512	0.25
<i>C. parapsilosis</i> 4970	R	R	R	R	128	R	R	R	512	R	R	R	R	R	R	1.024	128	R	R	1
<i>C. neoformans</i> 5911	512	R	128	128	128	64	8	64	1.024	32	32	1.024	512	512	512	R	64	16	512	>64
<i>C. neoformans</i> 5980	512	32	128	512	128	128	64	512	1.024	R	128	R	R	512	512	R	64	32	16	>64

Atividade antifúngica dos derivados tiofênicos e fluconazol frente a isolados de leveduras. Os resultados estão expressos em $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

R = Resistente. Valores de CIM acima de 1.024 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. URM = Coleção de culturas URM. ATCC = American Type Culture Collection.

34. Pôde-se observar que os compostos CN05 (2,6-diclorobenzaldeído), CN06 (2-nitrobenzaldeído), CN07 (3-nitrobenzaldeído), CN10 (4-nitroindol-3-carboxaldeído) CN13 (4-nitrobenzaldeído), CN17 (3,4,5-trimetoxibenzaldeído), CN19 (hidrogênio/composto não substituído) CN21 (4-bromobenzaldeído) apresentaram os melhores resultados para dermatófitos, com valores de CIM variando entre 16 – 64 µg/mL, sendo alguns até melhores que o fluconazol, utilizado com referência. Dentre eles, o grupo nitro está presente nos compostos CN06 e CN07, demonstrando que sua presença é um fator importante para atividade antifúngica, como supracitado.

35. Esses resultados demonstram que os derivados 2-amino reivindicados nessa invenção têm o potencial de inibir o crescimento de diversas espécies fúngicas, que incluem, mas não se limitam a *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* podendo, portanto ser novas alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por fungos.

Avaliação da toxicidade dos compostos ora reivindicados

36. Para a avaliação da toxicidade dos compostos, foi realizado o teste de atividade hemolítica. Hemácias humanas do tipo O⁺ foram suspensas em solução salina (NaCl 0,85 % + CaCl₂ 10 mM) a 2 % e incubadas em placas de 96 poços de fundo arredondado com diferentes concentrações dos derivados 2-amino tiofênicos. As placas foram incubadas por um período de 3 horas a 37 °C sob constante agitação e, posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 4 min a 4 °C e a absorbância do sobrenadante medida em 540nm (Benchmark Plus, BIO- RAD, Software Microplate Manager – versão 5.2) para estabelecer o percentual de hemólise. Como controle positivo de lise celular foi utilizado Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) a 1% e solução salina (NaCl 0,85% + CaCl₂ 10mM) como controle negativo. Os experimentos foram realizados em quadruplicada, com repetição em intervalos de

tempo distintos. Os resultados foram expressos como porcentagem de hemólise determinada através da equação descrita abaixo, onde a absorbância é (Abs), controle positivo (CP) e controle negativo (CN).

$$\text{Atividade hemolítica (\%)} = \frac{(\text{Abs. do tratado} - \text{Abs. do CN}) \times 100}{(\text{Abs do CP} - \text{Abs do CN})}$$

37. Na figura 4 é apresentada o resultado da atividade hemolítica para sete derivados 2-amino-tiofênicos com promissora atividade antifúngica frente aos dermatófitos utilizados nessa pesquisa.

38. Sete moléculas de derivados 2-amino-tiofênicos foram selecionadas no presente estudo. As sete moléculas apresentaram o melhor perfil de atividade antifúngica frente aos dermatófitos. As características físico-químicas bem como os dados de ressonância magnética nuclear de Hidrogênio dos compostos estão descritos na Tabela 1 e 2. Os valores da atividade hemolítica derivados 2-amino tiofênicos com atividade antifúngica estão descritos na figura 4 por meio de valores em porcentagem de hemólise. De um total de sete moléculas, as moléculas CN05, CN19 e CN21 que apresentam em sua estrutura halogênios como cloro (CN05) e grupo nitro (CN06) apresentaram uma taxa de hemólise de 5 %. A molécula CN06 que apresenta em sua estrutura um grupo nitro, apresentou uma taxa moderada de hemólise (12,5 %) e a CN07 que apresenta em sua estrutura um grupo nitro, apresentou a maior taxa de atividade hemolítica (50 %). As moléculas CN13 e CN17 que apresentam em sua estrutura um grupo nitro e trime-toxibenzilideno respectivamente apresentaram as menores taxas de hemólise, sendo encontrado resultado de 2,5 %.

39. Esses dados demonstram claramente que os compostos da presente invenção podem ser utilizados como agentes antifúngicos frente a uma grande variedade de micro-organismos como espécies de leveduras e dermatófitos, que são potenciais agentes causadores de diversas patologias ao homem e uma grande variedade de animais.

REIVINDICAÇÕES

1. Derivado 2-amino-tiofênico com ação antifúngica, caracterizado pelo composto 2-[(4-metoxibenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila (CN01) para uso humano e veterinário.
2. Derivado 2-amino-tiofênico com ação antifúngica, caracterizado pelo composto 2-[(4-clorobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila (CN02) para uso humano e veterinário.
3. Derivado 2-amino-tiofênico com ação antifúngica, caracterizado pelo composto 2-[(4-fluorobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila (CN03) para uso humano e veterinário.
4. Derivado 2-amino-tiofênico com ação antifúngica, caracterizado pelo composto 2-[(2,4-diclorobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila (CN04) para uso humano e veterinário.
5. Derivado 2-amino-tiofênico com ação antifúngica, caracterizado pelo composto 2-[(2,6-diclorobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila (CN05) para uso humano e veterinário.
6. Derivado 2-amino-tiofênico com ação antifúngica, caracterizado pelo composto 2-[(2-nitrobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila (CN06) para uso humano e veterinário.
7. Derivado 2-amino-tiofênico com ação antifúngica, caracterizado pelo composto 2-[(3-nitrobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila (CN07) para uso humano e veterinário.
8. Derivado 2-amino-tiofênico com ação antifúngica, caracterizado pelo composto 2-[(3-hidroxibenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila (CN08) para uso humano e veterinário.
9. Derivado 2-amino-tiofênico com ação antifúngica, caracterizado pelo composto 2-[(4-metilbenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila (CN09) para uso humano e veterinário.
10. Derivado 2-amino-tiofênico com ação antifúngica, caracterizado pelo composto 2-[(4-nitro-1*H*-indol-3-il)metileno]amino}-tiofeno-3-carbonitrila (CN10) para uso humano e veterinário.
11. Derivado 2-amino-tiofênico com ação antifúngica, caracterizado pelo composto 2-[(5-metoxi-1*H*-indol-3-il)-metileno]amino}-tiofeno-3-carbonitrila (CN11) para uso humano e veterinário.

12. Derivado 2-amino-tiofênico com ação antifúngica, caracterizado pelo composto 2-[(4dimetilaminobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila (CN12) para uso humano e veterinário.
13. Derivado 2-amino-tiofênico com ação antifúngica, caracterizado pelo composto 2-[(4nitrobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila (CN13) para uso humano e veterinário.
14. Derivado 2-amino-tiofênico com ação antifúngica, caracterizado pelo composto 2-{[(1*H*-indol-3-il)metileno]amino}-tiofeno-3-carbonitrila (CN15) para uso humano e veterinário.
15. Derivado 2-amino-tiofênico com ação antifúngica, caracterizado pelo composto 2-[(3,4,5-trimetoxibenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila (CN17) para uso humano e veterinário.
16. Derivado 2-amino-tiofênico com ação antifúngica, caracterizado pelo composto 2-(benzilideno-amino)-tiofeno-3-carbonitrila (CN19) para uso humano e veterinário.
17. Derivado 2-amino-tiofênico com ação antifúngica, caracterizado pelo composto 2-[(2,3-diclorobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila (CN20) para uso humano e veterinário.
18. Derivado 2-amino-tiofênico com ação antifúngica, caracterizado pelo composto 2-[(4-bromobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila (CN21) para uso humano e veterinário.
19. Derivado 2-amino-tiofênico com ação antifúngica, caracterizado pelo composto 2-[(2-clorobenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila (CN22) para uso humano e veterinário.
20. Derivado 2-amino-tiofênico com ação antifúngica, caracterizado pelo composto 2-{[(1,1'-bifenil)4-il-metileno]amino}-tiofeno-3-carbonitrila (CN23) para uso humano e veterinário.
21. Derivado 2-amino-tiofênico com ação antifúngica, caracterizado pelo composto 2-[(quinolin-2-il-metileno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila (CN24) para uso humano e veterinário.
22. Derivado 2-amino-tiofênico com ação antifúngica, caracterizado pelo composto 2-[(piridin-2-il-metileno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila (CN25) para uso humano e veterinário.
23. Derivado 2-amino-tiofênico com ação antifúngica, caracterizado pelo composto 2-[(3-etoxi-4-hidroxibenzilideno)amino]-tiofeno-3-carbonitrila (CN26) para uso humano e veterinário.

24. Derivado 2-amino-tiofênico com ação antifúngica, caracterizado pelo composto 2-[(5-bromo-1*H*-indol-3-il)metilenamino]-tiofeno-3-carbonitrila (CN27) para uso humano e veterinário.
25. Derivado 2-amino-tiofênico com ação antifúngica, caracterizado pelo composto 2-[(7-metil-1*H*-indol-3-il)metilenamino]-tiofeno-3-carbonitrila (CN28) para uso humano e veterinário.
26. Composto 2-amino-tiofênico com ação antifúngica para uso humano e/ou veterinário, de acordo com qualquer das reivindicações de 1 a 25, caracterizado por ter a fórmula estrutural geral I, conforme Figura 1, compreendendo o radical aril, podendo representar qualquer radical benzênico, naftalênico, ou heteroaromáticos, como quinolina, isoquinolina, benzo[*d*][1,3]dioxol, pirrol, pirrolidina, tiofeno e furano, e preferencialmente indol, podendo ainda esses grupos arila serem monosubstituído, disubstituídos ou trisubstituído com quaisquer um dos seguintes substituintes, que podem ser iguais ou diferentes entre si: H, quaisquer grupos alquílicos contendo de 1 a 15 carbonos de cadeia linear ou ramificada, grupos alquênico contendo de 1 a 15 carbonos de cadeia linear ou ramificada, grupos alquínicos contendo de 1 a 15 carbonos de cadeia linear ou ramificada, -CN, -NO₂, -NH₂, -NHR, -NRR, -OCH₃, -OEt, -OiPr, OR, -F, -Cl, -Br, -I, -COOH, -COOR, -CONH₂, -CONHR, -CONHRR, -OH, trifluorometil ou difluorometil.
27. Uso de quaisquer sais, ésteres e amidas farmacologicamente aceitáveis, assim como suas pró-drogas, dos compostos contidos nas reivindicações de 1 a 26 incluindo brometos, bromatos, cloretos, cloridratos, sulfatos, bissulfatos, nitratos, carbonatos, hidrogeno-carbonatos, acetatos, oxalacetatos, oxalatos, valeratos, oleatos, palmitatos, estearatos, laureatos, boratos, benzoatos, lactatos, fosfatos, tosilatos, citratos, maleatos, fumaratos, succinatos, tartaratos, mesilatos, glicoheptonatos, lactobionatos e laurilsulfonatos, sendo incluídos também os cátions presentes em bases e os metais alcalinos, como sódio, lítio, potássio, cálcio, sais de amônio quaternário, os cátions amônio, tais como amônio, tetrametilamônio, tetraetilamônio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina e trietilamina, caracterizado para aplicação na saúde humana e/ou animal com fins de tratar infecções fúngicas.

28. Uso dos compostos tiofênicos descritos nas reivindicações de 1 a 26, e/ou seus sais, ésteres, amidas ou pró-drogas farmacologicamente aceitáveis descritos e caracterizados para as aplicações de acordo com a reivindicação 27, causadas por quaisquer agentes fúngicos, especialmente, porém sem se limitar a espécies de *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*.
29. Uso dos compostos tiofênicos descritos nas reivindicações de 1 a 26, e/ou seus sais, ésteres, amidas ou pró-drogas farmacologicamente aceitáveis descritos na reivindicação 27, caracterizado por serem administrados de forma isolada, individual como único princípio ativo, ou administrados em associação com outros fármacos antimicrobianos, antibióticos, antifúngicos, agentes citotóxicos, imunomoduladores e antivirais frente microrganismos descritos na reivindicação 28.
30. Uso dos compostos tiofênicos descritos nas reivindicações de 1 a 26, e/ou seus sais, ésteres, amidas ou pró-drogas farmacologicamente aceitáveis descritos na reivindicação 27, caracterizado por ser utilizado como princípio ativo, ou um dos princípios ativos, para produção de preparações farmacêuticas e/ou veterinárias sob a forma de pós, grânulos, comprimidos, comprimidos revestidos, cápsulas, soluções orais e/ou injetáveis, pomadas, cremes, elixires, xarope, emulsões, suspensões, loções, emplastos, géis, sistemas de liberação controlada como micro e nanocápsulas, micro e nanopartículas, complexos de inclusão, micro e nanoemulsões, lipossomas e hidrogéis, conforme reivindicação 29, juntamente com um ou mais adjuvantes e/ou veículos, frente microrganismos descritos na reivindicação 28.
31. Uso dos compostos tiofênicos descritos nas reivindicações de 1 a 26, e/ou seus sais, ésteres, amidas ou pró-drogas farmacologicamente aceitáveis descritos e caracterizados para as aplicações de acordo com reivindicação 27, frente microrganismos descritos na reivindicação 28, administrados sob quaisquer formas de administração descritos na reivindicação 29, incorporados em alguma das preparações farmacêuticas e/ou veterinárias descritas na reivindicação 30, caracterizado por ser administrado através de uma via de administração que inclua:

5/5

via oral, intravenosa, intra-arterial, intracraniano, intratorácica, intraperitoneal, parenteral, ocular, retal, cutânea, subcutânea, intradérmica, dérmica, inalatória ou intramuscular.

32. Uso dos compostos tiofênicos descritos nas reivindicações de 1 a 26, e/ou seus sais, ésteres, amidas ou pró-drogas farmacologicamente aceitáveis descritos de acordo com reivindicação 27, frente microrganismos descritos na reivindicação 28, caracterizados por poderem ser utilizados como princípio ativo, ou um dos princípios ativos, para produção de saneantes e/ou desinfetantes de estabelecimentos de assistência à saúde sob a forma de pós, grânulos, comprimidos ou cápsulas dispersíveis, soluções, emulsões, suspensões passíveis de serem aplicadas sobre superfícies fixas e artigos médicos críticos, semicríticos e não críticos.

1/2

DESENHOS

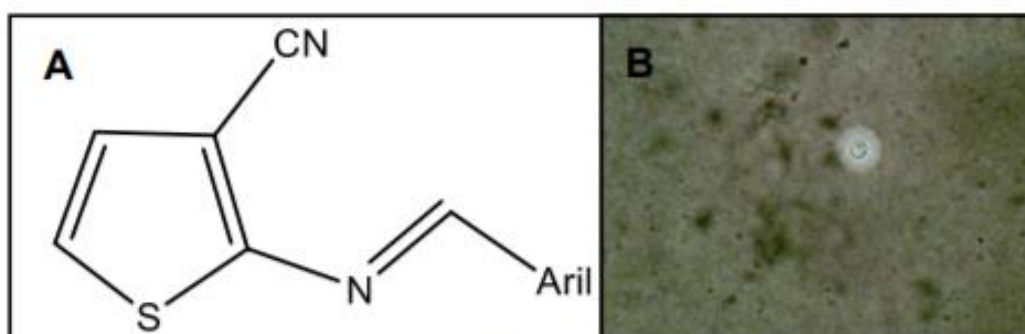


Figura 1

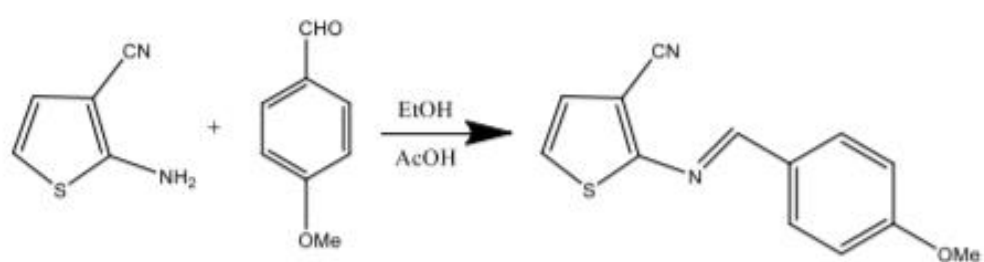


Figura 2

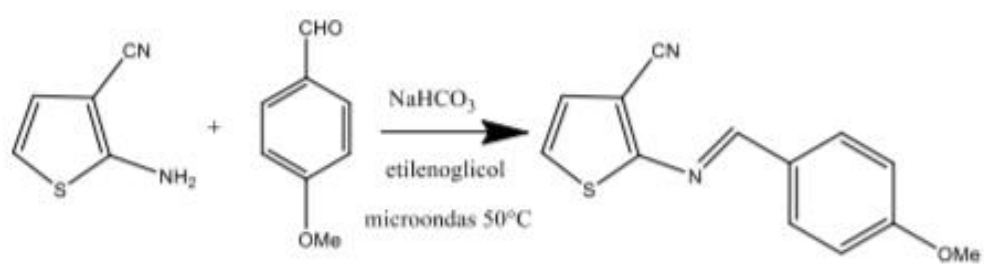
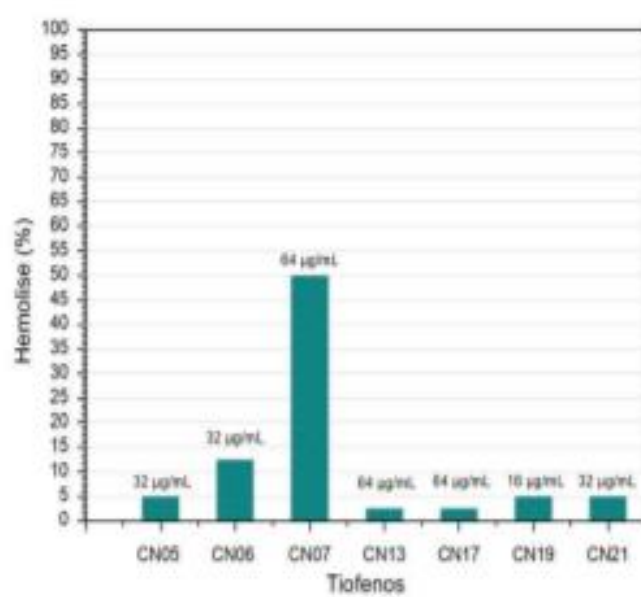


Figura 3

2/2

**Figura 4**

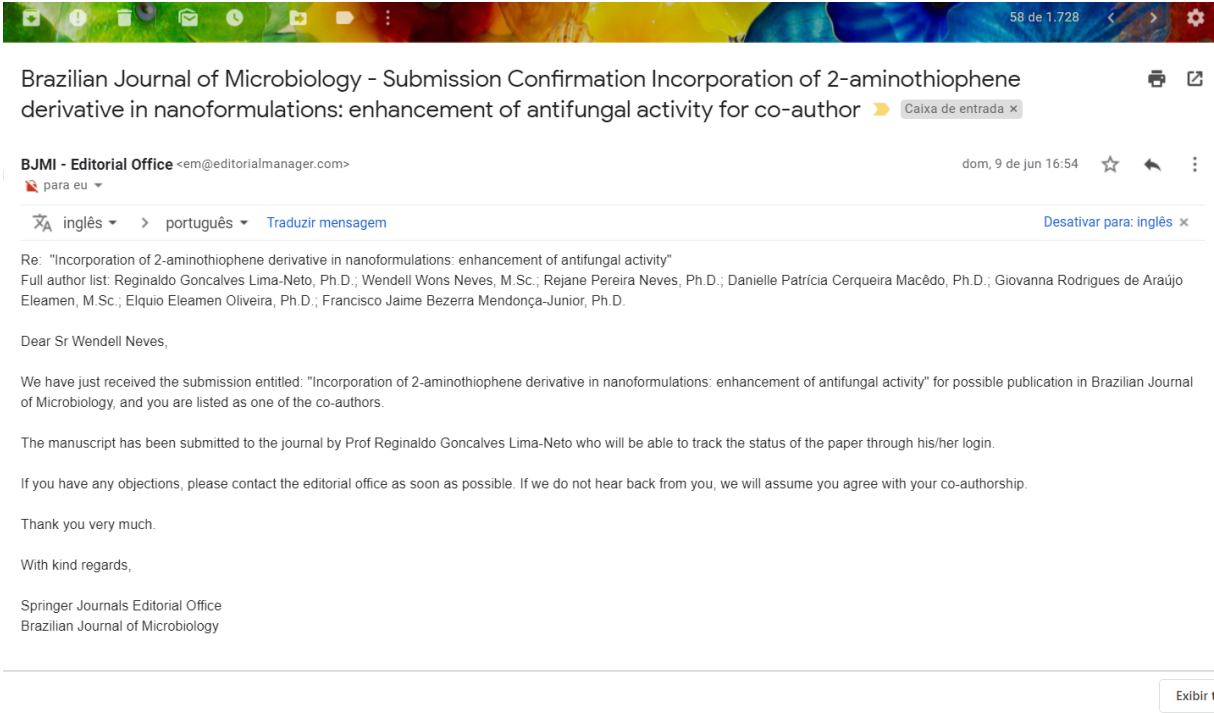
RESUMO

DERIVADOS 2-AMINO-TIOFÊNICOS COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS

A presente patente de invenção aborda novos compostos sintéticos derivados de 2-amino-tiofênicos, que apresentam ação antifúngica. Os precursores 2-amino-tiofênicos apresentados nessa patente foram sintetizados através da quarta versão da reação de Gewald. A avaliação *in vitro* da sensibilidade de espécies dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*, além dos fungos filamentosos dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton* contra 19 derivados 2-amino-tiofênicos foi realizada pelo método de microdiluição em caldo. Os compostos mais bioativos *in vitro* seguiram avaliação da toxicidade pela atividade hemolítica. Os compostos mais ativos para as leveduras (CIM 8 – 16 µg.mL) foram o CNO2, CN06, CN07, CN08, CN10, CN11, CN21 e CN23, sendo o CN07 o que apresentou excelente resultado frente a *C. neoformans*, com um CIM de 8 µg.mL e para dermatófitos (CIM 32 - 1.024 µg.mL) CN05, CN06, CN07, CN17, CN19 com CIM de até 32 µg/mL para as moléculas CN05, CN19 e CN06. No que se refere a atividade hemolítica, as moléculas CN13 e CN17 apresentaram as menores taxas de hemólise, sendo 2,5 %. Diante do exposto, os derivados de tiofeno 2-amino-substituídos demonstram-se moléculas promissoras no desenvolvimento de compostos antifúngicos. Estudo *in vivo* são essenciais para futuras aplicações médicas.

ANEXOS

ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO 1



Brazilian Journal of Microbiology - Submission Confirmation Incorporation of 2-aminothiophene derivative in nanoformulations: enhancement of antifungal activity for co-author   Caixa de entrada x

BJMI - Editorial Office <em@editorialmanager.com> dom, 9 de jun 16:54 ☆ ↶ ⋮
 para eu ▾

 inglês ▾ > português ▾ Traduzir mensagem Desativar para: inglês x

Re: "Incorporation of 2-aminothiophene derivative in nanoformulations: enhancement of antifungal activity"
 Full author list: Reginaldo Goncalves Lima-Neto, Ph.D.; Wendell Wons Neves, M.Sc.; Rejane Pereira Neves, Ph.D.; Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo, Ph.D.; Giovanna Rodrigues de Araújo Eleamen, M.Sc.; Elquio Eleamen Oliveira, Ph.D.; Francisco Jaime Bezerra Mendonça-Junior, Ph.D.

Dear Sr Wendell Neves,

We have just received the submission entitled: "Incorporation of 2-aminothiophene derivative in nanoformulations: enhancement of antifungal activity" for possible publication in Brazilian Journal of Microbiology, and you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Prof Reginaldo Goncalves Lima-Neto who will be able to track the status of the paper through his/her login.

If you have any objections, please contact the editorial office as soon as possible. If we do not hear back from you, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
 Brazilian Journal of Microbiology

Exibir 1