



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**VALIDAÇÃO, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E AVALIAÇÃO
SINÉRGICA DE NITROESTIRENOS *in vitro***

JULIANA PANTOJA OLIVEIRA

BELÉM-PA

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**VALIDAÇÃO, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E AVALIAÇÃO
SINÉRGICA DE NITROESTIRENOS *in vitro***

Autor: Juliana Pantoja Oliveira.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marta Chagas Monteiro.

Co-Orientador: Prof^o. Dr^o. Rosivaldo dos Santos Borges.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Belém-PA

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Oliveira, Juliana Pantoja, 1980-
Validação, atividade antifúngica e avaliação
sinérgica de nitroestirenos in vitro / Juliana Pantoja
Oliveira. - 2014.

Orientadora: Marta Chagas Monteiro;
Coorientador: Rosivaldo dos Santos Borges.
Dissertação (Mestrado) - Universidade
Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Belém, 2014.

1. Nitrocompostos. 2. Anticorpos
antifúngicos- Uso terapêutico. 3. Sinergismo
farmacológico. 4. *Aspergillus fumigatus*. 5.
Trichophyton. I. Título.

CDD 22. ed. 547.041

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Pantoja Oliveira.

Validação, atividade antifúngica e avaliação sinérgica de nitroestirenos *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador

Profª. Drª. Marta Chagas Monteiro (UFPA)

Co-orientador

Profº Drº Rosivaldo dos Santos Borges (UFPA)

Banca Examinadora:

Profº Drº: José Maria dos Santos Vieira (UFPA)

Profº Drº Agnaldo da Silva Carneiro (UFPA)

Aprovado em: 29/ 09/ 2014.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que ao longo de minha vida me ajudaram a seguir o melhor caminho para conquistar meus objetivos. Ao meu esposo e aos meus filhos, que me fazem ter cada vez mais forças para continuar trilhando o caminho do saber.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua luz e seu olhar sobre minha vida.

Aos meus pais Alzira e Manoel, que com todo amor e carinho me ensinaram a cultivar valores importantes como os da amizade, caráter, respeito e amor. Além do incentivo e apoio nessa caminhada.

Ao meu esposo José Aires e meus filhos João Victor e Ana Júlia, que tantas vezes tiveram que lidar com minha ausência para que eu pudesse executar este trabalho.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Marta Chagas Monteiro, pela oportunidade concedida, confiança depositada, orientação, companheirismo, conselhos sábios, coragem, incentivo e amizade que muito contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

À Universidade Federal do Pará e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

Aos professores do PPGCF (ICS) e BAIP (ICB), pela paciência e dedicação.

Ao Prof^o Dr^o Andrey Marinho (ICEN) que sempre abriu as portas de seu laboratório nos momentos em que mais precisei, somando seu conhecimento para realização deste trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia, que me ajudaram direta e indiretamente na realização desse projeto (Carla Mendonça, Thaís Boulhosa, Roseane Ferreira e Mariely Pessoa) e em especial ao Fábio Oliveira, pela convivência, incentivo, dedicação, apoio e amizade durante esse período.

A CAPES, pelo financiamento da bolsa de estudos durante o período de dois anos.

A todos aqueles, que mesmo não mencionados, estiveram ao meu lado, contribuindo para minha formação e para realização deste estudo, o meu mais sincero agradecimento.

“Só fazemos o melhor aquilo que
repetidamente insistimos em melhorar.
A busca da excelência não deve ser um
objetivo. E sim um hábito.”

Aristóteles (384-322 a.C.)

RESUMO

OLIVEIRA, J. P. VALIDAÇÃO, ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E AVALIAÇÃO SINÉRGICA DE NITROESTIRENOS *in vitro*.

Os nitrocompostos foram empregados na terapêutica a partir da década de 40, quando foram amplamente sintetizados e testados frente a diversas doenças assim como a descoberta de seus efeitos citotóxicos. Deste modo foram estudados diversos grupos, derivados e análogos que pudessem se mostrar mais seguros e eficazes. Alguns estudos mostraram que os nitroestirenos, a exemplo do nitrofeniletano possuem diversas atividades biológicas como: antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatória, antinoceptiva, etc. Associado a isto, atualmente, há um crescente interesse em novos agentes antifúngicos. Dentre os fungos do gênero *Aspergillus* o mais comuns é o *Aspergillus fumigatus* o qual é transmitido através do ar causando infecções denominadas de aspergiloses. Outros fungos com relevância na clínica são os dermatófitos que causam diversas doenças de pele e seus anexos, sendo o *Trichophyton mentagrophytes* bastante prevalente. O objetivo deste trabalho foi validar a estrutura química de nitroestirenos sintetizados em nível de bancada e testá-los como antifúngicos em duas espécies de fungos, entre eles um filamentoso oportunista e um dermatófito, assim como testar os efeitos sinérgicos entre os nitroestirenos obtidos com anfotericina B. Os resultados mostraram que espectros de Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear ^1H dos análogos nitroestirenos correspondem com a estrutura proposta. O teste *in vitro* de microdiluição demonstrou atividade antifúngica dos nitroestirenos, pois foi obtida a CIM do composto 4'-metil-1-nitro-2-feniletano (7B) na concentração de 0,05 mg/mL frente ao *A. fumigatus*. Já para a espécie *T. mentagrophytes* o composto com melhor atividade foi 4'-metoxi-1-nitro-2-feniletano (7C) com a CIM de 0,22 mg/mL. Com relação à análise da combinação entre AB e os nitroestirenos, *in vitro*, pelo teste do *checkerboard* se mostrou antagonista para o composto 7A e 7C e indiferente para o composto 7B frente à cepa padrão de *A. fumigatus*.

Palavras chaves: Nitroestirenos; antifúngico; *Aspergillus fumigatus*; *Trichophyton mentagrophytes*.

ABSTRACT

VALIDATION, ANTIFUNGAL ACTIVITY AND EVALUATION OF SYNERGISTIC NITROESTIRENOS *in vitro*.

Nitro compounds have been used in therapy from the 40s, when they were widely synthesized and tested against various diseases as well as the discovery of their cytotoxic effects. Thus different groups, derivatives and analogs which could prove safer and more effective were studied. Some studies have shown that nitrostyrenes, like the nitrofeniletene possess diverse biological activities such as antifungal, antibacterial, anti-inflammatory, antinociceptive, etc. Additionally, there is currently a growing interest in new antifungal agents. Among the fungi of the genus *Aspergillus* is the most common *Aspergillus fumigatus* which is transmitted through the air causing aspergillosis. Dermatophytes are clinically relevant and cause various skin diseases, *Trichophyton mentagrophytes* being quite prevalent. The objective of this study was to validate the chemical structure of synthesized nitrostyrenes and evaluate its antifungal activity in two species of fungi, including a filamentous dermatophytes and opportunistic as well as evaluation of the synergistic effects among nitrostyrenes and amphotericin B (AB). The results confirm the infrared spectral and nuclear magnetic resonance of ^1H nitrostyrenes analogues as correspond with the proposed structure. Test microdilution demonstrated *in vitro* antifungal activity of nitrostyrenes with MIC values for 4'-methyl-1-nitro-2-phenylethene (7B) of 0,05 mg/ml against *A. fumigatus*. For *T. mentagrophytes* the most active compound was 4'-methoxy-1-nitro-2-phenylethene (7C) with MIC of 0,22 mg/mL. Regarding the analysis of the combination of AB and nitrostyrenes *in vitro* by the checkerboard test showed antagonist compound 7A and 7C. The 7B compound was indifferent against the standard strain of *A. fumigatus*.

Key words: Nitrostyrenes; antifungal; *Aspergillus fumigatus*; *Trichophyton mentagrophytes*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura química do 1-nitro-2-feniletano e 1-nitro-2-fenileteno.....	17
Figura 2	Biorredução do grupo nitro.....	20
Figura 3	Redução enzimática do grupo nitro	20
Figura 4	Vias de metabolização aeróbica e anaeróbica de nitrocompostos e ações deletérias	21
Figura 5	Ciclo de oxido-redução de nitrocompostos e ações deletérias em componentes intracelulares	23
Figura 6	Esquema de formação de peróxido de hidrogênio a partir da redução de grupamento nitro	24
Figura 7	Estrutura química do nitrofeniletano.....	24
Figura 8	Estruturas morfológicas de <i>Aspergillus fumigatus</i>	27
Figura 9	Estruturas microscópicas da espécie <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ...	32
Figura 10	Quadro com dermatomicoses causados por <i>T. mentagrophytes</i>	33
Figura 11	Representação esquemática da estrutura química da molécula.....	35
Figura 12	Nitrofeniletano (1) e os análogos 1-nitro-2-feniletano (7A), 4'-metil-1-nitro-2-feniletano (7B) e 4'- metoxi-1-nitro-feniletano (7C)	41
Figura 13	<i>A. fumigatus</i> isolado clínico e <i>A. fumigatus</i> ATCC 40152 e cultivados em ASD	45
Figura 14	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 40004 cultivado em ASD. Frente e verso da placa	46
Figura 15	Microdiluição em caldo e da CIM (Norma M38-A, Vol 22 N° 16)	47
Figura 16	Esquema da placa de microdiluição usada no experimento	48
Figura 17	Infravermelho do composto 1-nitro-2-feniletano	50
Figura 18	Infravermelho do composto 4'-metil-1-nitro-2-feniletano	51
Figura 19	Infravermelho do composto 4'metoxi-1-nitro-2-feniletano	52
Figura 20	Espectro de RMN ¹ H relativo ao 1-nitro-2-feniletano	53

Figura 21	Espectro de RMN ¹ H relativo ao 4'-metil-1-nitro-2-feniletano	54
Figura 22	Espectro de RMN ¹ H relativo ao 4'-metoxi-1-nitro-2-feniletano	55
Figura 23	Inoculo, (B) Controle negativo (DMSO), (C) controle positivo (Anfotericina B) e (D) placa de microdiluição com a presença de resazurina	57
Figura 24	(A) CIM e CFM do isolado clínico de <i>A. fumigatus</i> frente ao nitroestireno 7A (B) CIM e CFM da cepa ATCC 40152 de <i>A. fumigatus</i> frente ao nitroestireno 7A	58
Figura 25	(A) CIM e CFM do isolado clínico de <i>A. fumigatus</i> frente ao nitroestireno 7B (B) CIM e CFM da cepa ATCC 40152 de <i>A. fumigatus</i> frente ao nitroestireno 7B.....	59
Figura 26	(A) CIM e CFM do isolado clínico de <i>A. fumigatus</i> frente ao nitroestireno 7C (B) CIM e CFM da cepa ATCC 40152 de <i>A. fumigatus</i> frente ao nitroestireno 7C.....	60
Figura 27	(A) CIM e CFM do isolado clínico de <i>T. mentagrophytes</i> frente ao nitroestireno 7A (B) CIM e CFM da cepa ATCC 40004 de <i>T. mentagrophytes</i> frente ao nitroestireno 7A	61
Figura 28	(A) CIM e CFM do isolado clínico de <i>T. mentagrophytes</i> frente ao nitroestireno 7B (B) CIM e CFM da cepa ATCC 40004 de <i>T. mentagrophytes</i> frente ao nitroestireno 7B	62
Figura 29	(A) CIM e CFM do isolado clínico de <i>T. mentagrophytes</i> frente ao nitroestireno 7C (B) CIM e CFM da cepa ATCC 40004 de <i>T. mentagrophytes</i> frente ao nitroestireno 7C	63
Figura 30	(A) Microdiluição seriada pela resazurina da Anfotericina B frente à cepa ATCC 40152 de <i>A. fumigatus</i> ; (B) Placas para demonstrar a CIM e CFM da Anfotericina B frente à cepa ATCC 40152 de <i>A. fumigatus</i>	65
Figura 31	Microdiluição seriada pela resazurina da combinação do composto 7A e Anfotericina B frente à cepa ATCC 40152 de <i>A. fumigatus</i> , para determinação da CIM. (B) Técnica do <i>pour plate</i> para determinação da CFM	66
Figura 32	Microdiluição seriada pela resazurina da combinação do composto 7B e Anfotericina B frente à cepa ATCC 40152 de <i>A. fumigatus</i> para determinação da CIM. (B) Técnica do <i>pour plate</i> para determinação da CFM	67
Figura 33	Microdiluição seriada pela resazurina da combinação do composto 7C e Anfotericina B frente à cepa ATCC 40152 de <i>A. fumigatus</i> para determinação da CIM. (B) Técnica do <i>pour plate</i> para determinação da CFM	68
Figura 34	Estrutura dos nitroestirenos com melhor atividade antifúngica	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Ponto de fusão e massa molar dos nitroestirenos: 1-nitro-2-feniletano; 4'-metil-1-nitro-2-feniletano e 4'-metoxi-1-nitro-2-feniletano56

Tabela 2 Valores de CIM e CFM de cada nitroestireno frente ao isolado clínico e da cepa padrão de *A. fumigatus* e *T. mentagrophytes*64

Tabela 3 Relação das combinações entre os nitroestirenos e anfotericina B frente à cepa ATCC de *Aspergillus fumigatus*68

LISTA DE SIGLAS

AB	Anfotericina B
ABPA	Aspergilose brocopulmonar alérgica
AI	Aspergilose Invasiva
ASD	Agar Sabouraud Dextrose
ATCC	American Type Culture Collection
CFM	Concentração fungicida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxinucleico
FDA	Food and Drug Administration
FIC	Factionary Inhibitory Concentration
FICI	Fractional Inhibitory Concentration Índice
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IEC	Instituto Evandro Chagas
IFIs	Infecções Fúngicas Invasivas
IV	Infravermelho
KBr	Brometo de potássio
MTT	(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NTC	Nitrocomposto
PPGCF	Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear do Hidrogênio 1
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
SOD	Superóxido Dismutase
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPA	Universidade Federal do Pará

LISTA DE SIMBOLOS

°C	graus Celsius
cm⁻¹	centímetros recíprocos
<i>d</i>	duplete
<i>J</i>	Constante de acoplamento
Kg	kilograma
mg	mili grama
mL	mili Litro
mM	mili Molar
µg	micro grama
µm	micro molar
MHz	Mega Hertz
ppm	parte por milhão
%	percentual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Nitrocompostos como agentes terapêuticos	19
2.1.1 Metabolismo dos nitrocompostos	19
2.1.2 Nitrofeniletano	24
2.2 Fungos na clínica médica	25
2.2.1 Fungos filamentosos	26
2.2.2 Aspergiloses	28
2.2.3 Fungos dermatófitos	30
2.2.3.1 <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	31
2.2.4 Antifúngicos usados na terapêutica	34
2.2.4.1 Anfotericina B	34
2.2.5 Terapêutica antifúngica combinada	38
2.2.6 Avaliação da interação entre antifúngicos <i>in vitro</i>	38
3 OBJETIVO	40
3.1 Geral	40
3.2 Específicos	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Obtenção dos nitrocompostos	41
4.2 Purificação dos nitroestirenos	41
4.3 Análise de identificação estrutural e pureza	42
4.3.1 Ponto de fusão	42
4.3.2 Infravermelho	43
4.3.3 Ressonância Magnética Nuclear do ¹ H	43

4.4 Avaliação da atividade antifúngica dos nitroestirenos	44
4.4.1 Preparação das amostras para avaliação antifúngica	44
4.5 Obtenção e manutenção do isolado clínico fúngico e ATCC das espécies	44
4.5.1 Preparação dos inoculos	45
4.5.2 Método de microdiluição em caldo e da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	46
4.5.3 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)	48
4.5.4 Método de checkerboard para avaliação de associação entre antifúngicos	48
5 RESULTADOS	50
5.1 Dados espectrais e parâmetros físico-químicos dos nitroestirenos	50
5.1.1 Infravermelho dos nitroestirenos	50
5.1.2 Espectros de Ressonância Magnética Nuclear ¹ Hidrgênio dos nitroestirenos..	53
5.1.3 Ponto de fusão e massa molar dos nitroestirenos	56
5.2 Atividade antifúngica dos nitroestirenos	56
5.2.1 Testes com a espécie <i>Aspergillus fumigatus</i>	56
5.2.2 Testes com a espécie <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	60
5.3 Testes de sinergismo com Anfotericina B	65
6 DISCUSSÃO	69
7 CONCLUSÃO	76
8 REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

A introdução de fármacos inéditos no arsenal terapêutico, além de ser onerosa possui pouca perspectiva de sucesso. Com isso, a busca de fármacos por meio de técnicas de modificação molecular racionalmente dirigida se tornou uma tendência mundial, que toma como base compostos de reconhecida atividade farmacológica, visando à identificação de análogos mais ativos, menos tóxicos ou mais seletivos do que o composto de partida (TAVARES, 1993).

Os Nitrocompostos têm sido objeto de estudo como agentes antimicrobianos, em particular os derivados nitro-heterocíclicos, desde a década de 1940, onde se observou a elevada atividade antibacteriana em derivados 5-nitro-furânicos substituídos (DODD et al, 1944). Com isso, nos últimos anos o grupo de Química Farmacêutica e Microbiologia Clínica da Universidade Federal do Pará – Faculdade de Farmácia vem investigando nitroestirenos, pois foi inserida uma dupla ligação na cadeia lateral do 1-nitro-2-feniletano que é o princípio odorífero do óleo essencial da *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez., o qual pertence à família das *Lauraceae*, uma planta aromática comumente encontrada na floresta amazônica (SIQUEIRA et al, 2010). A partir do nitrofeniletano, com a inserção de uma dupla ligação na cadeia lateral, originou-se o derivado nitrofeniletano, que está contido em uma classe de compostos chamados nitroestirenos, Figura 01 (VALE, 2011). O mecanismo de ação antimicrobiano desta classe de compostos envolve enzimas que reduzem o grupo nitro formando intermediários altamente reativos, responsáveis por danos ao material genético microbiano (SPIELBERG, 1981).

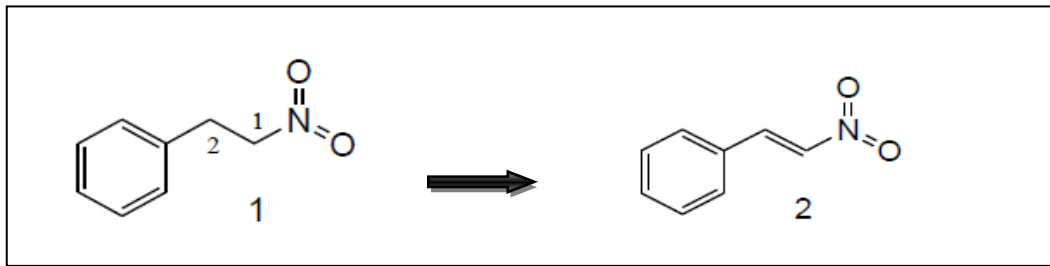


Figura 01: Estrutura química do: (1) 1-nitro-2-feniletano; (2) 1-nitro-2-fenileteno.
Fonte: Vale, 2011.

Os nitrocompostos podem ser encontrados em plantas superiores, sendo que o nitrofeniletano foi o primeiro composto orgânico isolado de plantas que possui um grupo nitro como única função heteroatômica (CASTILLO et al, 1993; LOPES, 2001). Alguns estudos mostraram que a classe dos nitroestirenos, a exemplo do nitrofeniletano possui importantes atividades biológicas, tais como: antifúngica, anti-inflamatória, anti-nociceptiva, hipotensora, antimicrobiana, entre outras (LIMA, 2008; VALE, 2011).

O atual interesse no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos pode ser parcialmente explicado pelo aumento acentuado do número de casos de infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e a subsequente supressão do sistema imune de pacientes transplantados (SARTORI, 2005).

Existem diversos tipos de infecções fúngicas, dentre elas podemos citar as dermatofitoses, que são consideradas o segundo tipo de doenças de pele mais frequente na população adulta, causadas por espécies de *Trichophyton* e *Microsporum* (MAGAGNIN et al, 2011) e as aspergiloses que são causadas por fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente pela espécie *Aspergillus fumigatus*, responsável pela maioria dos casos de aspergilose invasiva (AI), de aspergilose bronco pulmonar alérgica e de pneumonite por hipersensibilidade, comuns em pacientes imunodeprimidos. No entanto, as espécies não-fumigatus agora estão emergindo como causa de AI por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*, sendo que a maioria das espécies é suscetível a anfotericina B (AB) e aos azóis (LEÃO, 2006; ASANO et al, 2011).

O tratamento das infecções fúngicas é marcadamente limitado por problemas de toxicidade dos medicamentos, da resistência e dos perfis de eficácia. Além disso, as drogas antifúngicas disponíveis no mercado são restritas a um pequeno número quando comparadas as antibacterianas (PINA-VAZ et al, 2005; TOBUDIC et al, 2012). Diante desse fato, unido ao aumento da frequência de resistência cruzada faz-se necessário o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, como por exemplo, o uso de combinação de fármacos com atividade antifúngica juntamente com substâncias com potencial para atividade antimicrobiana.

Muitas abordagens têm sido utilizadas para melhorar o efeito de terapia antimicrobiana para isolados resistentes, e um dos deles é combinação de drogas (GAO et al, 2013). A associação de antifúngicos com diferentes mecanismos de ação tem sido utilizada como terapêutica de emergência, mesmo sem a existência de suporte científico. Os estudos para avaliação destas associações são escassos, as metodologias propostas são trabalhosas e morosas e os resultados são por vezes contraditórios.

Considerando-se que nas últimas décadas as infecções causadas por fungos e bactérias se tornaram um importante problema de saúde pública, as terapias de longo prazo para pacientes imunocomprometidos e o aumento a casos de resistência aos fármacos disponíveis na clínica, novos agentes antifúngicos que sejam efetivos e apresentem um amplo espectro de ação têm sido alvo de pesquisas a exemplo dos nitrocompostos aromáticos que são bem conhecidos por serem ativados *in situ* tornando-se espécies radicalares, as quais induzem a formação de espécies reativas de oxigênio que agem frente a estes microrganismos (NASCENTE et al, 2007).

Neste sentido, foi realizada a análise estrutural de nitroestirenos, planejados a partir do nitrofeniletano bem como a avaliação da atividade biológica frente a um fungo filamentoso e a um fungo dermatófito e investigar efeitos sinérgicos com a combinação entre os análogos e anfotericina B.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nitrocompostos como agentes terapêuticos

A partir da década de 1940, os nitrocompostos começaram a ser sintetizados e avaliados para diversas patologias (ROZENSKI et al, 1995), e o emprego como agentes quimioterápicos, em especial com atividade antimicrobiana, permanecem atualmente, como é o caso do metronidazol (GODMMAN et al, 2000). Embora alguns metabólitos de nitro aromáticos como a hidroxilamina, interfiram na rota metabólica de alguns agentes antifúngicos (BARREIRO et al, 2001), nitrocompostos de diferentes classes terapêutica tem sido utilizado como antianginosos (nitroglicerina, tetranitrato de eritritila, dinidrato de isossorbida), anti-hipertensivos (nifedipina, nitredipina e niguldipina); imunossupressores (azatioprina); anticoagulantes (acenocumarol); antiparasitários (metronidazol; tinidazol, benzinidazol, nifurtimox, dimetridazol, 4-nitromegazol, nitrofurazona e furazolidona); sedativos hipnóticos (clonazepam, flunitazepam, nitrazepam); anti-inflamatórios (nimesulida); anti-histamínicos H-2 (granitidina, nizatidina); antibacterianos (clorafenicol, azidanfenicol, nirofural, nifuroxazida); e antineoplásicos (nitacrina e nitroacridina) (VIODÉ, 1998; KATZUNG, 2001; HORROCKS, 2007).

A maioria dos nitrocompostos com ação antineoplásica, antiparasitária e antibacteriana, apresenta o processo de biorredução enzimática do grupo nitro como provável mecanismo de ação, o que coloca este requisito como sendo imprescindível para o desempenho da atividade biológica destes compostos (TOCHER, 1997; VIODÉ et al, 1998; MAYA et al, 2007).

2.1.1 Metabolismo dos Nitrocompostos

Estudos relatam que o mecanismo de ação dos nitrocompostos em nível molecular ainda não está totalmente elucidado, pois para cada estrutura do composto o mecanismo pode variar (PAULA et al, 2009), sendo assim pode-se descrever que a ação dos nitrocompostos *in vivo* é decorrente da redução do grupo

nitro que envolve diferentes intermediários e derivados reativos, como por exemplo, o ânion-radical nitro, nitroso, hidroxilamina e cátion-radical amino, para essa classe de compostos. A redução completa do grupo nitro até o grupo amino envolve seis elétrons até o derivado amino, embora a hidroxilamina, seja o produto final da biorredução (MORENO et al, 1985; ROZENSKI et al, 1995), como mostra a Figura 02.

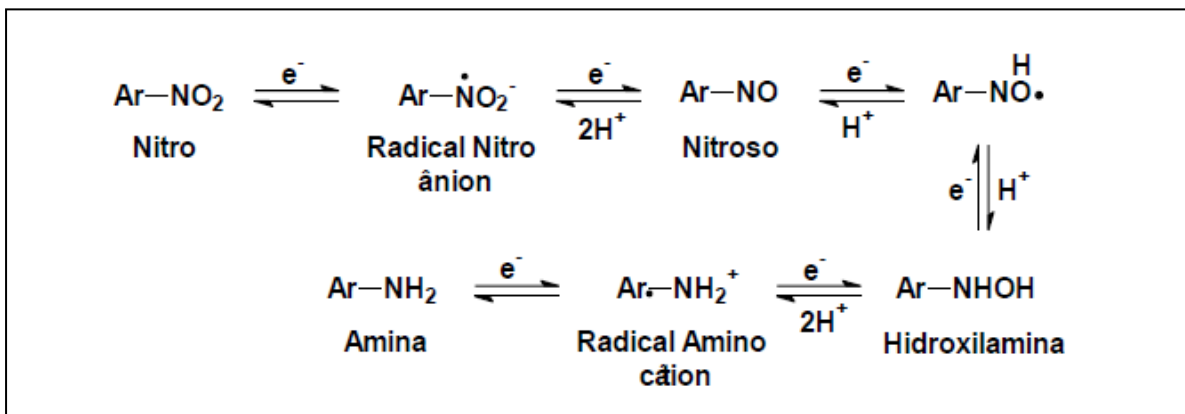


Figura 02: Biorredução do grupo nitro.
Fonte: Nascente, 2009.

Em meio anaeróbico, o radical ânion-radical nitro e a hidroxilamina, formados na redução, são os principais intermediários formados ou metabolitos do processo de redução enzimática. No entanto, em meio aeróbico, o ânion-radical nitro gerado no processo de redução enzimática, interage com o oxigênio molecular presente no meio, em uma etapa metabólica denominada ciclo fútil, formando o ânion-radical ($O_2^{\cdot-}$). Este por sua vez, forma peróxido de hidrogênio (H_2O_2), após receber um elétron e dois prótons, que podem reagir com enzimas ferredoxinas, liberando espécies reativas como radicais hidroxilas (OH^{\cdot}) (Figura 03), que são tóxicos para células bacterianas, parasitárias ou cancerígenas (VIODÈ et al, 1998).

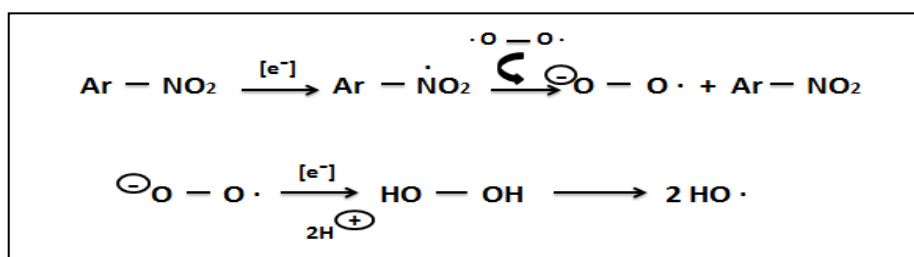


Figura 03: Redução enzimática do grupo nitro.
Fonte: Nascente, 2009, com adaptações.

A Figura 04 mostra a rota de metabolismo com e sem a presença de oxigênio de compostos nitro-heterocíclicos, das quais se formam diversas espécies reativas tais como o nitro-radical ânion, nitro radical ânion protonado, radical aromático, superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, radical hidroxilamina e radical azoxi (EDWARDS, 1993).

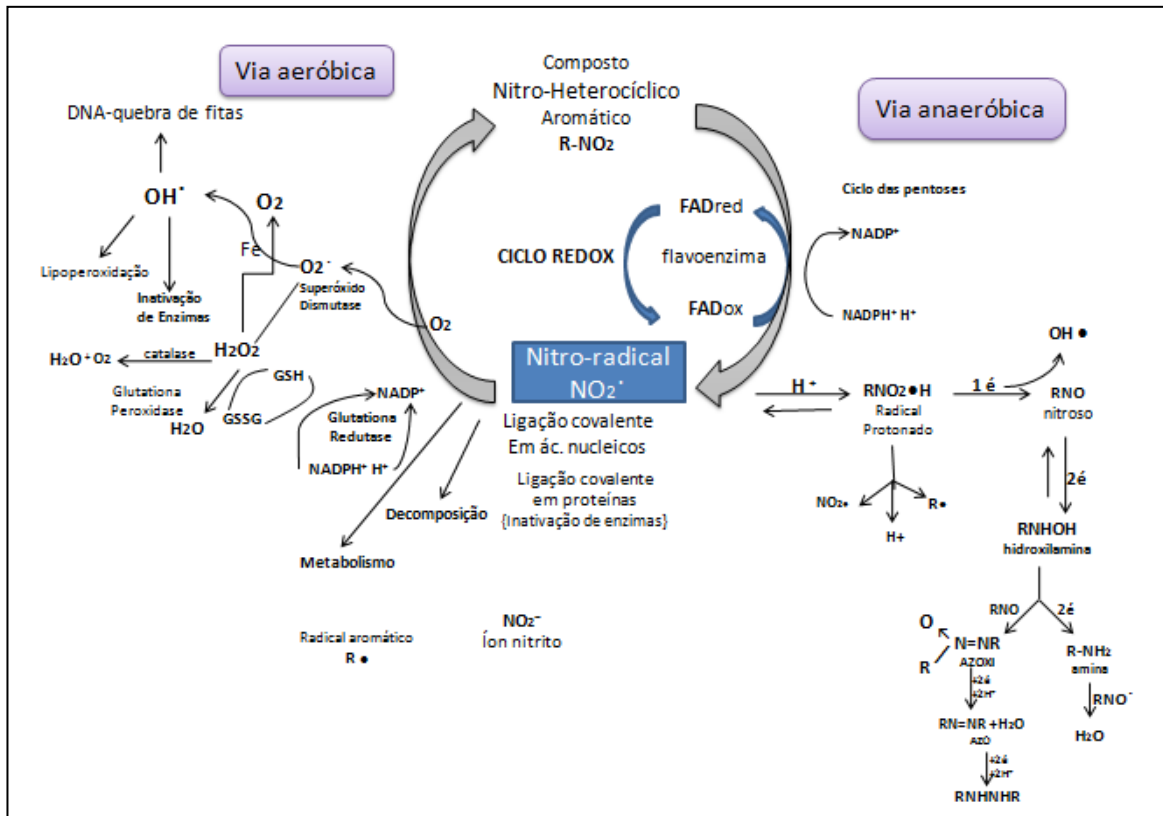


Figura 04: Vias de metabolização aeróbica e anaeróbica de nitrocompostos e ações deletérias. Fonte: Almeida, 2009, com adaptações.

Em meio anaeróbico, o nitro radical aniônico e a hidroxilamina formados são os principais intermediários ou metabólitos do processo de redução enzimática do grupo nitro até amina. O radical nitro ânion ($Ar-NO_2^{\bullet-}$) e o derivado hidroxilamina ($Ar-NHOH$) podem interagir com o DNA celular, entretanto, existem evidências de que outros intermediários também apresentem atividade biológica, entre as quais, a toxicidade ao DNA supostamente causada pelo radical $Ar-NO_2H^{\bullet+}$ e a inativação enzimática desempenhada pelo derivado nitroso ($Ar-NO$), agindo como receptor de grupos tióis de enzimas detoxificantes. Em meio aeróbio, o nitro radical aniônico gerado no processo de redução enzimática interage com o oxigênio presente no

meio, em uma etapa metabólica denominada ciclo fútil, formando o radical $O_2^{\bullet-}$. Este radical, por sua vez, sofre ação de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), formando peróxido de hidrogênio H_2O_2 que pode desestruturar membranas biológicas e também reagir com enzimas ferredoxinas, liberando espécies reativas (OH^{\bullet}) que são tóxicas para células bacterianas e parasitárias (KAPPUS, 1986; TOCHER, 1997; VIODE et al, 1998; MAYA et al, 2007).

Em outros estudos foi observado que danos iniciais ao DNA são causados, possivelmente por intermediários reativos de vida curta, gerados a partir da redução do grupo nitro por aproximadamente quatro elétrons (TOCHER, 1997). Portanto, compostos nitro-heterocíclicos foram utilizados contra carcinomas por atuarem sensibilizando células neoplásicas rádio-resistentes em condições de hipóxia, tornando-as sensíveis à radiação, com baixo efeito sensibilizante em células aeróbicas normais (ADAMS, 1986; WHITMORE, 1986). Com isso, seguida da ativação redutiva, compostos nitro aromáticos também interagem com ácidos nucleicos, possivelmente com resíduos de timina, guanina e adenina (DECLERCK, 1986; TOCHER, 1997).

Já o processo de ação antimicrobiana acontece em quatro fases, sendo a primeira a difusão do composto pela célula alvo, seguida da ativação redutiva, em terceiro a reação de espécies reativas de nitrogênio ou oxigênio com componentes intracelulares, e por fim, a inativação a espécies reativas e quebra dos componentes intracelulares causando o efeito citotóxico (MÜLLER, 1986).

Neste contexto, a etapa de ativação redutiva é a mais importante deste processo, sendo que os mecanismos metabólicos atuam diretamente nesta ativação, influenciando a especificidade e seletividade de ação de compostos nitro-heterocíclicos (MÜLLER, 1986). Evidências demonstram que o primeiro nitro-radical formado resulta da redução por um elétron proveniente de componentes intracelulares, de modo que: $R - NO_2 + e \rightarrow R - NO_2^{\bullet-}$, o que pela desmutação do nitro-ânion radical, origina espécies reativas de oxigênio: $R - NO_2^{\bullet-} + O_2 \rightarrow R - NO_2 + O_2^{\bullet-}$ (ALMEIDA, 2009).

Vários estudos correlacionam o potencial de redução de nitrocompostos com atividade citotóxica e mutagênica em células procarionotas e eucariotas, concluindo

que para microrganismos anaeróbicos facultativos e aeróbicos, a atividade antimicrobiana aumenta com a facilidade de redução do composto, ou seja, a diminuição do potencial de redução. Os ciclos de oxi-redução naturais do metabolismo de células participam da redução do grupo nitro, primeiramente, doando um único elétron, o que envolve diversas enzimas, muitas das quais essenciais para a depuração de radicais livres (KAPPUS, 1986; MÜLLER, 1986), como mostra a Figura 05.

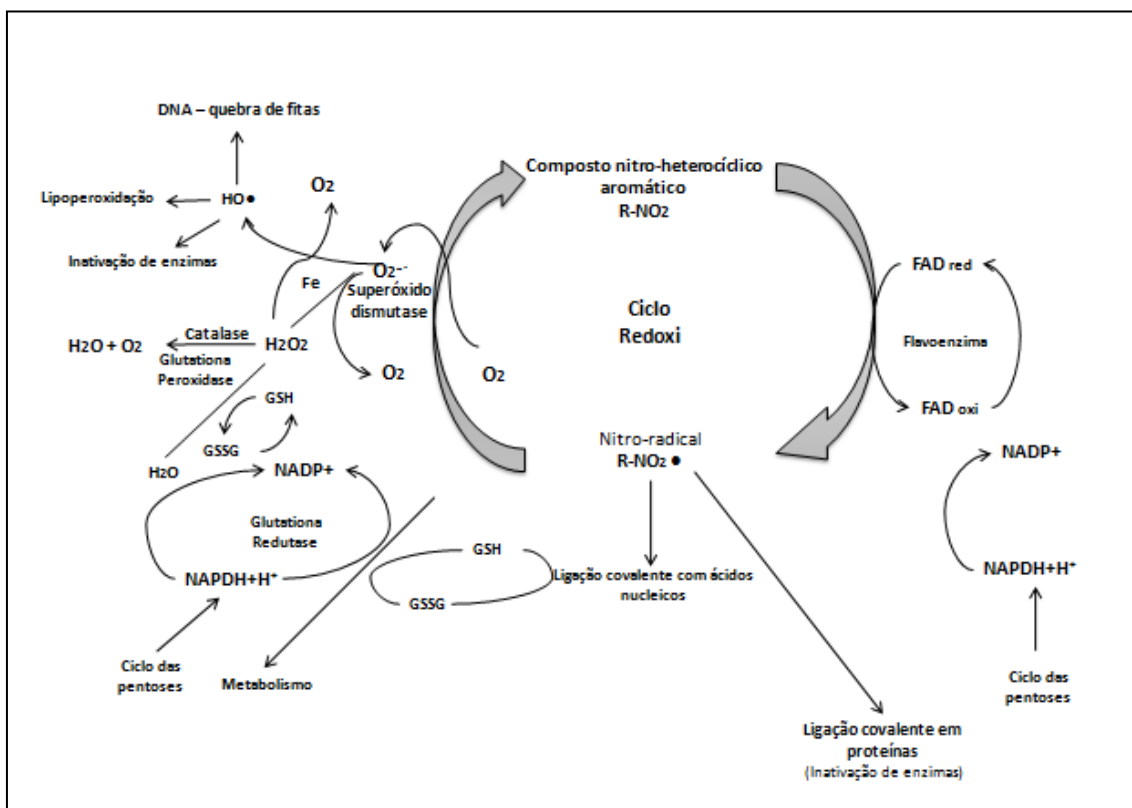


Figura 05: Ciclo de oxido-redução de nitrocompostos e ações deletérias em componentes intracelulares.

Fonte: Almeida, 2009, com adaptações.

A redução do grupo nitro, dependendo do meio celular, continua além do ponto de formação do nitro-radical ânion, NO_2^\bullet , e resulta até o grupo hidroxilamina, e por fim, amina, sendo esta inativada (ALMEIDA, 2009). Em presença de oxigênio, o radical nitro-ânion pode voltar ao grupo nitro, formando o radical superóxido. A produção dos radicais livres oriundos do processo de biorredução do grupo nitro pode ocasionar peroxidação de membranas biológicas e proteínas, inibição de

enzimas e danos ao DNA, como é caso do peróxido de hidrogênio, mostrado na Figura 06 (THOCHER, 1997).

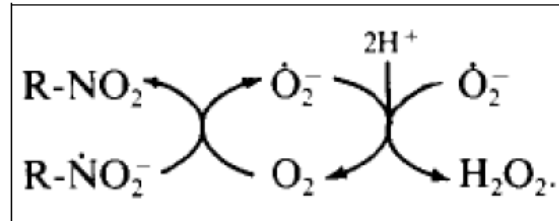


Figura 06: Esquema de formação de peróxido de hidrogênio a partir da redução de grupamento nitro (MORENO et al, 1988).

2.1.2 Nitrofeniletano

O nitrofeniletano foi sintetizado a partir da inserção de uma dupla ligação na cadeia alifática do nitrofeniletano, que é um composto oriundo do óleo essencial de uma espécie típica da região amazônica *Aniba canelilla*, conhecida popularmente como “casca preciosa”, na medicina popular a casca desta espécie é utilizada como anti-espasmódico, estimulante digestivo e carminativo (LIMA et al, 2008).

O nitrofeniletano faz parte da classe de nitrocompostos denominada nitroestirenos, estes compostos possuem um grupo NO₂ elétron-retirador, sendo que em seu estado fundamental mostrou-se predominante para a configuração *E (trans)*, do grupo nitro e fenil em relação à ligação dupla da cadeia de carbono (CALHEIROS et al, 2004), (Figura 07).

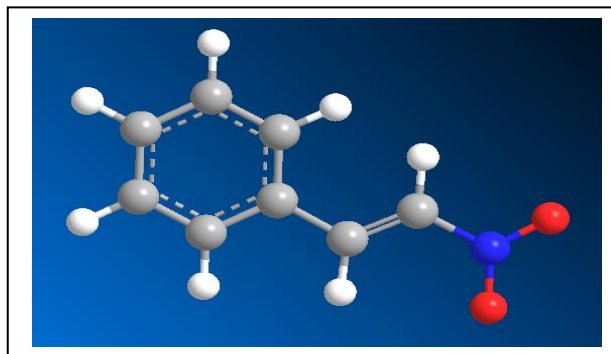


Figura 07: Estrutura química do nitrofeniletano.
Fonte: Autora, 2013

Os nitrocompostos têm sido objeto de estudo como agentes antimicrobianos, em particular os derivados nitro-heterocíclicos desde a década de 1940, onde se observou a elevada atividade antibacteriana em derivados 5-nitro-furânicos substituídos (DODD et al, 1944). Nesse sentido, foi avaliada recentemente a citotoxicidade do nitrofeniletano e seus análogos frente a macrófagos peritoneais de camundongos, observando-se que o nitroderivado 4'-metoxi-1-nitro-2-feniletano (7C) não induziu citotoxicidade frente a essas células nas concentrações testadas, porém, o composto 4'-Metil-1-nitro-2-feniletano (7B) se mostrou citotóxico somente nas menores concentrações e o composto 1-nitro-2-feniletano (7A) foi citotóxico somente nas maiores concentrações (SANTOS, 2012).

2.2 Fungos na clínica médica

Os avanços diagnósticos e terapêuticos surgidos nas últimas décadas favoreceram o tempo de sobrevivência de pacientes transplantados, onco-hematológicos e portadores de HIV, daqueles que padecem de doenças crônicas, dos recém-nascidos prematuros, imunodeprimidos, queimados e cirúrgicos. Tais avanços, nos últimos 30 anos acabaram condicionando o aparecimento e o incremento de uma população com alto risco de sofrer infecções fúngicas secundárias (MELLADO et al, 2002; VENKATESAN et al, 2005; GALVAN e MARISCAL, 2006).

Em contrapartida, microrganismos de escassa patogenicidade se converteram em patógenos capazes de causar quadros infecciosos de elevada gravidade (CUENCA et al, 2002; MELADO et al, 2002). Nesse contexto, as infecções fúngicas oportunistas surgiram como importantes complicações iatrogênicas (BOW, 1998; WINGARD, 1999), onde uso difundido de antimicrobianos de amplo espectro, agentes imunossupressores, medicamentos corticosteroides e o uso profilático de terapias antifúngicas são fatores de risco para a elevada resistência de microrganismo a essas drogas (PERFECT e CASADEVALL, 2006; D'ENFERT e HUBE, 2007).

As infecções fúngicas ou micoses abrangem algumas das doenças humanas mais comuns como as dermatomicoses, até infecções sistêmicas mais graves e

debilitantes. Geralmente, tais infecções são divididas em três grupos principais: infecções superficiais, subcutâneas e sistêmicas (HAY, 2006).

As infecções sistêmicas podem ser divididas em infecções oportunistas, que são infecções debilitantes e potencialmente fatais, que afetam pessoas com sistema imunológico comprometido, por exemplo, paciente com neutropenia, HIV positivo ou em uso de implante subcutâneo. Sua incidência pode variar de acordo com a prevalência de doenças subjacentes e infecções endêmicas, também conhecidas como micoses respiratórias, sendo mais prevalentes nos trópicos, podendo apresentar manifestações clínicas de disseminação hematogênica (HAY, 2006).

2.2.1 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos são microrganismos eucarióticos, que podem atuar como patógenos de plantas, animais e humanos, são constituídos por emaranhados de hifas, que em conjunto constituem os micélios e estruturas de reprodução denominadas esporos (NAGHETINI, 2006), também chamadas de conídios que são capazes de resistir a condições adversas, tanto ambientais quanto químicas, e podem variar morfológicamente de acordo com a espécie sendo que alguns fungos podem apresentar mais de um tipo de conídio (LACAZ et al, 1998).

Os conídios de *Aspergillus* são ubíquos, com facilidade de dispersão e de pequeno tamanho (2,5 a 3 μm de diâmetro), o que facilita a sua disseminação, como mostra a Figura 08. Além disso, podem permanecer em suspensão no ar e no meio ambiente durante longos períodos de tempo, e aguardam condições ideais para a germinação e desenvolvimento de micélio, contaminando qualquer superfície em contato com o ar (LATGE, 1999).



Figura 08: Estruturas de *A. fumigatus* visualizadas através de microscopia de luz.
Fonte: <http://www.aspergillus.org.uk>

Assim, espécies de *Aspergillus* possuem grande importância clínica, visto que algumas podem causar infecções em seres humanos, particularmente o *A. fumigatus* (85% dos casos), seguido por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* (DENNING, 2000).

Aspergillus fumigatus é um fungo oportunista presente na atmosfera, sendo considerado de risco para pessoas imunossuprimidas, pois podem causar doenças invasivas, e é associado como causa da asma severa e sinusite. Esta espécie possui um ciclo sexual heterotálico reprodutivo completo, o que leva à formação de ascósporos e cleistotécio, assim como seu teleomorfo *Neosartorya fumigata*, que são estados sexuais de espécies de *Aspergillus* (O'GORMAN et al, 2009).

Vários estudos têm sugerido que as proteases fúngicas podem desempenhar um papel na patogenicidade de fungos. Uma vez que as vias aéreas são a via mais comum para a entrada de *A. fumigatus*, e essas proteases induzem a liberação de citocinas pró-inflamatórias e podem causar deslocamento de células epiteliais pulmonares humanas (TOMEE, 1997).

A capacidade de crescer em temperaturas elevadas e utilizar variadas fontes de carbono e nitrogênio, que ajudam no seu crescimento, fez com que o *A. fumigatus* se tornasse um importante patógeno oportunista de seres humanos, bem como imprescindível para desempenhar um papel essencial na natureza, fazendo parte da reciclagem dessas moléculas no ecossistema (LATGÈ, 2001; RHODES, 2006). Além da versatilidade nutricional, outras características também são citadas como fatores de virulência que facilitam a disseminação e colonização do fungo, tais

como a tolerância ao calor, adesinas, produção de pigmentos, metabólitos tóxicos e enzimas extracelulares, sendo que a maioria deles evoluiu como mecanismo de proteção aos ambientes adversos (RHODES, 2006; ALP e ARIKAN, 2008).

Dentre as toxinas produzidas pelo fungo, estão as hemolisinas que são responsáveis pela lise de eritrócitos; as ribonucleases que levam a destruição de células; a fumagilina e principalmente a gliotoxina, responsáveis pela imunossupressão do hospedeiro, através da redução funcional de macrófagos e neutrófilos, da indução de apoptose de células do sistema imunitário, do bloqueio da ativação de linfócitos e da inativação do sistema mucociliar (LATGÈ, 1999; LEWIS et al, 2005; SHOHAM, 2005).

Dentre as enzimas, as proteases elastinolíticas do *A. fumigatus*, têm sido consideradas de grande importância na virulência do agente, por degradar não somente a elastina, como também colágeno, laminina, fibrinogênio e outros componentes principais da matriz pulmonar (BLANCO et al, 1998). As peptidases produzidas pelo gênero *Aspergillus*, promovem degradação dos fatores humorais; as catalases e as dismutases agem como antioxidantes durante a fagocitose; e as fosfolipases que danificam o tecido epitelial (LATGÈ, 1999).

Com o uso crescente de vários procedimentos médicos invasivos, a incidência de infecção fúngica disseminada grave, particularmente as causadas por *Candida* e *Aspergillus* aumentaram em pacientes imunologicamente ou fisiologicamente comprometidos. No entanto, agentes antifúngicos aprovados por agências de controle utilizados no tratamento de infecções fúngicas invasivas são em número limitado, enquanto isolados de fungos resistentes aos medicamentos disponíveis tornaram-se mais prevalentes. Portanto, o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, com utilidade clínica aumentada em eficácia e segurança se faz necessário (KLINGSPOR e JALAL, 2006).

2.2.2 Aspergiloses

A patogenicidade de fungos do gênero *Aspergillus*, que determina a capacidade de causar danos à saúde dos indivíduos é multifatorial, oriunda desde fatores físico-estruturais à metabólicos. Muitos destes fatores ainda estão em estudo

e suas funções são apenas hipóteses, no entanto, outros já possuem papel comprovado no desenvolvimento da micose (LATGÈ, 1999, 2001).

A aspergilose pulmonar é um tipo de infecção fúngica causada por espécies de *Aspergillus*, usualmente o *A. fumigatus*, que tem como formas principais de apresentação a aspergilose bronco pulmonar alérgica (ABPA) e a pneumonite por hipersensibilidade, que são as formas mais comuns de reação de hipersensibilidade, o aspergiloma, a aspergilose semi-invasiva e a aspergilose invasiva. Todas as formas de aspergiloses são caracterizadas por um espectro de achados clínicos e radiológicos que estão diretamente relacionados ao estado imune do hospedeiro ou à presença de doença pulmonar estrutural (LEÃO et al, 2006).

Em pacientes com lesões cavitárias preexistentes, o crescimento saprofítico do fungo leva aos aspergilomas. Já em indivíduos imunocomprometidos, alguns conídios germinam no pulmão em forma de hifas, o que causa infecção angioinvasiva grave e frequentemente fatal chamada aspergilose pulmonar invasiva (MENDONÇA et al, 2011). A aspergilose invasiva (AI) é uma infecção grave entre os indivíduos imunocomprometidos e vários fatores de risco estão relacionados a suscetibilidade destes pacientes a essa infecção, tais como as condições clínicas do paciente como a neutropenia, transplante, uso de corticosteróides (ARAÚJO et al, 2006).

Aspergilose bronco pulmonar alérgica (ABPA) é uma doença complexa, provocada por uma reação de hipersensibilidade por alérgenos do *A. fumigatus*, pois a evolução clínica da doença consiste em períodos de remissão e exacerbação, e pode incluir o aparecimento de bronquiectasia e progresso para estágios terminais com a presença de fibrose pulmonar (OLIVEIRA et al, 2007).

Na investigação clínica, e na rotina laboratorial infecções fúngicas como aspergiloses e dermatofitoses, assumem caráter relevante quando correlacionados à saúde da população, como micoses superficiais, cutâneas, oportunistas e sistêmicas (HARVEY et al, 2008), estima-se que 10-15% da população humana poderão ser acometidos por esses microrganismos no decorrer de sua vida (MAGAGNIN et al, 2011).

2.2.3 Fungos dermatófitos

Os dermatófitos são fungos septados existente em todo o mundo, sendo mais de trinta espécies reconhecidamente patogênicas aos seres humanos (WHITE, 2008; FRIAS, 2009), estes microrganismos possuem biotropismo especial por tecidos de estrutura queratinizadas, como pêlos, unhas e pele, raramente parasitando células vivas (MEDEIROS et al, 2009). Segundo Siqueira et al. (2006), as dermatofitoses cujos agentes etiológicos pertencem aos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, de acordo com a formação e morfologia de seus conídios (estrutura de reprodução assexuada) constituem um dos grupos de infecções fúngicas mais frequentes na prática dermatológica. A epidemiologia da infecção por dermatófitos é provável com a mudança de padrões de migração, o crescimento do turismo, e mudanças nas condições socioeconômicas (AMENN, 2010).

Baseando-se no seu habitat, os dermatófitos podem ser classificados em três grupos principais: os geofílicos, os zoofílicos e os antropofílicos; os geófilos, mais importantes clinicamente, estão presentes no solo decompondo vários detritos queratínicos, podendo ser isolados como saprófitas em pelos de pequenos mamíferos silvestres ou domésticos (especialmente gatos), no terreno de tocas de animais silvestres, de aves ou ainda em ninhos de aves e um dos representantes principais é o *Trichophyton mentagrophytes* (SEEBACHER et al, 2008).

Poucos estudos têm investigado a etiologia das infecções fúngicas no mundo em desenvolvimento e conseqüentemente há menos conhecimento de quaisquer alterações à sua epidemiologia. É difícil determinar a confiabilidade, a incidência global e a prevalência de várias doenças de pele causadas por micoses superficiais em diferentes partes do mundo, em virtude dos estudos de uma região do país não ser uma verdadeira representação do padrão global da doença desse país (AMEEN 2010). Deste modo, as dermatofitoses vêm sendo estudadas e descritas em todo o mundo, pois a frequência com que os dermatófitos são isolados varia de acordo com a distribuição geográfica, fatores ambientais, idade, sexo e raça, bem como a existência de variação durante as diferentes estações climáticas (CABAÑES, 2000).

2.2.3.1 *Trichophyton mentagrophytes*

As espécies do complexo *mentagrophytes* são os agentes mais comuns de dermatofitose humana e animal. Em seres humanos, eles causam tinea pedis, tinea ungueal, e também as formas altamente inflamatórias como tinea corporis e tinea capitis. *Tinea pedis* e onicomicose estão se tornando mais comum, devido alterações no estilo de vida, como o aumento da urbanização, instalações de banho comum e uso de calçados oclusivos. O aumento da incidência de diabetes e infecção pelo HIV também são fatores importantes. Certas profissões (mineiros, soldados) e participantes atividades recreativas (maratonistas) estão em maior risco de desenvolver tinea pedis (AMENN, 2010; SYMOENS et al, 2011).

A transmissão do *T. mentagrophytes* ocorre pelo contato direto com animais e humanos infectados, ou indiretos por fômites contaminados, e as formas clínicas variam de acordo com o agente etiológico (espécie) e o sitio anatômico acometido (DEGREEF, 2008). Durante o processo infeccioso, os dermatófitos precisam superar os mecanismos de defesa inatos do hospedeiro, primeira linha de proteção do organismo contra infecções, para que ocorra a colonização tecidual, pois estrutura física e química da pele, a constante exposição à luz ultravioleta, a temperatura, a falta de umidade e a presença da microbiota normal tornam o ambiente inóspito para o crescimento de microrganismos patogênicos (WAGNER, 1995).

Deste modo, para se instalar na epiderme, o patógeno deve aderir à superfície do tecido, o arthroconídio deve germinar e a hifa deve então penetrar rapidamente no estrato córneo, evitando que o fungo seja eliminado com a descamação do epitélio. Na patogênese das dermatofitoses, esta interação entre os arthroconídios e o estrato córneo ocorre após 3 a 4 horas de contato, doze horas após infecção em pele humana, os microconídios de *T. mentagrophytes* aparecem implantados na camada superficial e a germinação ocorre dentro de 24 horas (VERMOUT, 2008).

A identificação dos dermatófitos se faz com base na aparência macroscópica, combinada com o exame microscópico das culturas, muitas vezes ainda é difícil ou incerta devido a variações fenotípicas a partir de um isolado para outro, em termos de taxa em crescimento micelial, na colônia se observa coloração (branco ou bege)

e aparência (em pó ou felpudo), microscopicamente a quantidade de microconídio, presença ou ausência de filamentos em espiral, como mostra a Figura 09 (SYMOENS, 2011).

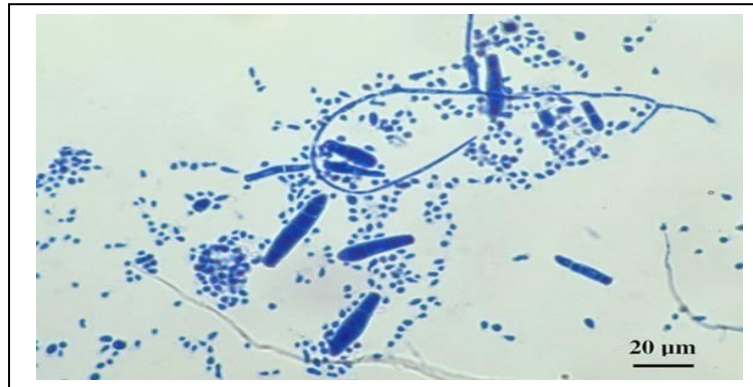


Figura 09: Estruturas microscópicas da espécie *T. mentagrophytes*.

Fonte: <http://vetlab.blogspot.com.br/2005/09/trichophyton-mentagrophytes.html>.

Pesquisado em: 11/04/2014.

Uma das infecções mais frequente é a tinea pedis, porém a espécie *T. mentagrophytes* causa também micoses que se manifestam clinicamente em outras regiões da pele e unhas em aproximadamente 25% dos pacientes. Os locais de infecção dos organismos causadores de *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* são as camadas da superfície do estrato córneo, isto é, os organismos não podem reproduzir nas camadas mais profundas da pele. Por esta razão, medidas profiláticas na forma de aplicações tópicas também são eficazes contra estas dermatofitoses (TREIBER, 2001).

O processo infeccioso primário clássico está relacionado, principalmente, a enzimas produzidas pelo dermatófito, como a queratinase que pode estar ou não ativa, que pode favorecer o desenvolvimento de quadros de dermatofitoses (SIDRIM e ROCHA, 2004).

Nas dermatofitoses, os pelos quando parasitados sempre são secundariamente a infecção da pele, pois esta infecção é encontrada na região do folículo piloso, invadindo assim a camada córnea da epiderme, que se aprofunda em direção ao infundíbulo piloso, deste modo, o dermatófito em contato com a queratina remove a cutícula e retoma o pelo e ao chegar nesse estágio da infecção do pelo cada espécie fúngica manifesta suas particularidades, estes diversos aspectos

parasitários levaram Sabouraud a descrever cinco tipos de parasitismo pilosos: endotrix, megaspórico ectotrix, micróide ectotrix, microspórico e fávico (SIDRIM e MOREIRA, 1999).

Os dermatófitos desenvolvem-se crescendo do centro para as bordas, resultando, no final de alguns dias, em lesões circulares discretas com áreas de alopecia, bordas eritematosas e vesiculares, que circunscrevem uma parte central descamativa associada ou não à resposta inflamatória, resultante da atividade queratinolítica (SIDRIM e MOREIRA, 1999) (Figura 10).



Figura 10: Quadro com dermatofitoses causados por *T. mentagrophytes*.
Fonte: www.elrincondelamedicinainterna.com. Acessado em 01/11/2014.

Durante a infecção fúngica, a emergência das hifas invasoras favorece a sobrevivência do fungo *in vivo* apesar da resposta imune protetora do hospedeiro, atuando assim como um fator de virulência adicional em muitas infecções micóticas (PARADA, 2007). Entre os fatores de risco associados com a dermatofitose incluem-se: aumento da idade, imunossupressão, histórico familiar para Diabetes *mellitus*, doença vascular periférica, distúrbios relacionados com a pele, como hiper-hidrose e psoríase, uso de calçados apertados e traumas nas unhas (KUVANDIK et al, 2007).

Tendo em vista que as micoses afetam seres humanos e animais em todo o mundo, pesquisas visando novos produtos com atividade antifúngica tornam-se necessária para ultrapassar as dificuldades no tratamento destas infecções, e este estudo teve como objetivo investigar a atividade antifúngica de nitroestirenos frente ao *T. mentagrophytes* um fungo dermatófito e frente *A. fumigatus* um fungo oportunista.

2.2.4 Antifúngicos usados na terapêutica

2.2.4.1 Anfotericina B

Para muitas infecções fúngicas, o fármaco de escolha é o antifúngico chamado de Anfotericina B (AB) (OLIVEIRA, 2008), um antibiótico poliênico inicialmente isolado em meados de 1955 (GOLD et al, 1956; VANDEPUTTE et al, 1956) e desde então apenas alguns agentes com ação antifúngica descobertos se tornaram viáveis para o tratamento das infecções fúngicas sistêmicas. É produzido naturalmente por *Streptomyces nodosus*, é uma substância anfótera, ou seja, que possui a propriedade de se dissolver em meios ácidos ou básicos (LACAZ e SAMPAIO, 1958).

No final dos anos 1950, a AB já era utilizada em alguns casos clínicos e em 1965 foi o primeiro agente antifúngico a ser aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) (WU, 1994; DISMUKES, 2000). Mesmo com a sua elevada toxicidade e a introdução de antifúngicos azólicos sistêmicos na década de 1980 (DISMUKES, 2000), a potência, o espectro de ação e a experiência na prática clínica têm assegurado que a AB permaneça como fármaco de escolha para o tratamento da maioria das micoses sistêmicas que acometem pacientes imunocomprometidos (FILIPPIN e SOUZA, 2006).

Muitas das propriedades quimioterápicas da AB estão relacionados às peculiaridades da sua estrutura química, que pode ser visualizada na Figura 11.

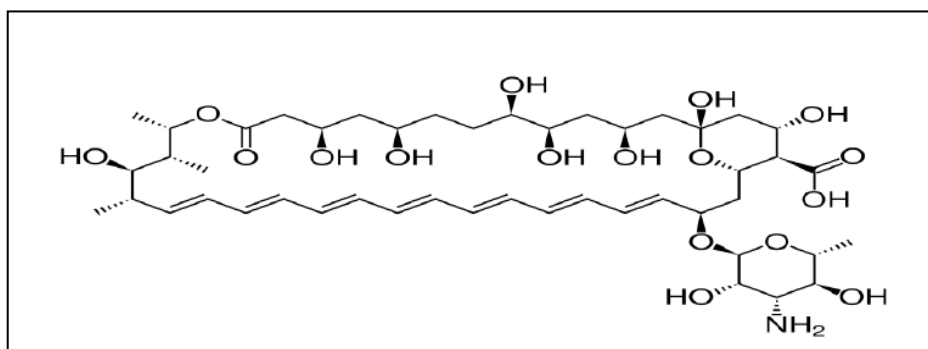


Figura 11: Representação esquemática da estrutura química da molécula Anfotericina B.
Fonte: Filippin e Souza, 2006.

De acordo com Filippin e Souza (2006), o composto ilustrado na Figura 10, contém 37 átomos de carbono formando um anel macrolídeo fechado por lactonização; possui uma cadeia de duplas ligações conjugadas não substituídas e na porção oposta, uma cadeia poli-hidroxilada com sete grupos hidroxilas livres, o que lhe confere característica anfipática. Em uma das extremidades da molécula, encontra-se um resíduo de micosamina (lactona) com um amino-grupo livre, formando uma cadeia lateral.

Seu efeito antifúngico é dependente das duplas pontes conjugadas do anel macrolídeo. Essa parte hidrofóbica da molécula liga-se a esteróis, em especial, ao ergosterol, principal esteroide da membrana citoplasmática dos fungos. Este mecanismo de ação explica grande parte da toxicidade do polieno, pois ocorre ligação também aos esteróis da membrana plasmática humana, como o colesterol. A ligação da droga ao lipídeo altera a permeabilidade seletiva da célula, originando poros permeáveis à saída de água e íons potássio, amônio e fosfato, além de açúcares e proteínas. Ocorre, a seguir, deterioração metabólica e morte celular (SOKOL - ANDERSON et al, 1986).

A presença do ergosterol nos fungos é de extrema importância, já que a maioria das estratégias antifúngicas se baseia em sua presença nas membranas. A parede celular complexa, do ponto de vista estrutural e bioquímico, contém quitina, um homopolímero da N-acetilglicosamina como sua base estrutural. Sobre esta base de quitina existem camadas de glucano, manoproteínas e outros polissacarídeos complexos associados a outros polipeptídeos (FILHO, 2011).

A absorção oral da AB é mínima (5%) e, por ser pouco absorvida pelo trato gastrointestinal, ela deve ser administrada, exclusivamente, por via endovenosa. Em solução glicosada, sob a forma desoxicolato, é administrada de forma lenta, durante 4 a 6 horas, uma vez ao dia (SAAG e DISMUKES, 1988). A dose utilizada é de 0,7 - 1 mg/kg/dia, devido à sua toxicidade relacionada à dose. AB é um fármaco potencialmente nefrotóxico, pelo efeito vasoconstritor nas arteríolas renais aferentes, resultando em diminuição do fluxo sanguíneo glomerular e tubular. A diminuição da filtração glomerular ocorre em 5% a 80% dos pacientes; a partir daí, ocorrem alterações de eletrólitos, levando à perda de potássio, retenção de hidrogênio, acidose tubular renal e hipomagnesemia, a AB também é mielotóxica, geralmente provoca anemia, devido à inibição da síntese de eritropoetina, além da ação direta sobre a medula óssea (CATÁLAN e MONTEJO, 2006).

Neto et al. (1998), relatam que, ao lado de sua comprovada eficácia, a AB é uma droga tóxica que requer longo período de hospitalização para a sua administração, seus efeitos imediatos são caracterizados por febre, mal estar geral, calafrios, taquicardia, taquipnéia e hipertensão arterial, causadas pela liberação de prostaglandina E₂. Esses efeitos podem ser diminuídos com o uso de dipirona e diminuição da velocidade da infusão. Podem ocorrer também, reações alérgicas e a flebite, que devem ser tratadas com anti-inflamatórios e calor local.

A formulação convencional da AB, para uso médico, associa a esta droga o desoxicolato de sódio, cuja finalidade é solubilizá-la em água e estabilizar a suspensão na forma de micélios. A aplicação por via endovenosa, em infusão lenta, é necessária para obter níveis úteis no sangue e tecidos. A dose diária única de 1 mg/kg de peso corporal resulta em concentrações séricas máximas aproximadas de 1 a 2 µg/ml na primeira hora após a infusão, e estima-se a sua meia-vida inicial em 24 a 48 horas. A AB convencional alcança maiores concentrações no fígado, baço, rins e pulmões. A fração circulante, cerca de 95%, se liga a proteínas, colesterol e hemácias, tem seu nível reduzido lentamente, possibilitando que o antibiótico seja ministrado, na fase de consolidação do tratamento, em intervalos de 48 a 72 horas, sendo a principal via de excreção a renal, mas há também eliminação por via hepatobiliar, e presume-se que parte da droga seja metabolizada (MARTINEZ, 2006).

A nefrotoxicidade causada pela AB sempre foi o maior obstáculo para o seu uso em virtude de sua elevada incidência, chegando em até 80% de morbidade, cujo espectro de nefrotoxicidade envolve alterações na filtração glomerular e disfunção tubular (BERDICHEVSKI, 2003).

Com isso as drogas antifúngicas atualmente disponíveis para o tratamento de micoses, sobre tudo, as invasivas podem ser divididas em quatro classes diferentes sobre o base de seus mecanismos de ação: (1) alteração na função de membrana (Anfotericina B), (2) inibição de DNA ou síntese de RNA (flucitosina), (3) inibição da biossíntese do ergosterol: azóis (fluconazol, itraconazol, posaconazol e ravuconazol), e (4) inibição da síntese de glucano: equinocandinas (caspofungin, micafungin, e anidulafungin). Em geral, os fungos podem ser intrinsecamente resistentes a drogas antifúngicas (resistência primária) ou pode desenvolver resistência em resposta a exposição à droga, durante o tratamento (resistência secundária) (PEREA e PETERSON, 2002).

Por outro lado, os azóis causam menos reações adversas que a AB, porém, menos potente apresentando ação fungistática ou fungicida, seu uso excessivo levou ao aparecimento de resistência em espécies suscetíveis, além da resistência cruzada com fungos pertencente à microbiota normal (BERGOLD e GEORGIADIS, 2004).

Atualmente, somente um limitado número de agentes antifúngicos, como os polienos, 5-flucitosina, azóis e as equinocandinas está disponível para o tratamento de infecções potencialmente graves, desse modo essa realidade tem instigado o interesse pela busca de alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções fúngicas, com a síntese de novos fármacos (HEYDER e SILVA, 2004).

Contudo a disseminação do uso de agentes quimioterápicos criou grande problema médico: o rápido surgimento de formas ou cepas de parasitos resistentes a diversos fármacos disponíveis na atualidade (KOROLKOVAS e BURCKHALTER, 2008). Diante destas problemáticas, o planejamento e o desenvolvimento de possíveis candidatos a fármacos antifúngicos são de grande relevância, pois com o surgimento da resistência aos medicamentos que já são usados na clínica médica, o tratamento fica cada vez mais restritivo.

Desta forma, os nitrocompostos constituem atualmente uma importante classe terapêutica devido ao seu amplo espectro de atividade (PAULA et al, 2009), onde se incluem os nitrofeniletano, um composto que vem merecendo atenção especial por demonstrar atividades biológica contra bactérias, leishmania, células cancerígenas e fungos, uma vez que suas propriedades fungistáticas foram avaliadas contra várias cepas de fungos patogênicos humanos, tais como: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* (VALE, 2011).

Considerando-se que o gênero *Aspergillus* pode causar grande impacto na saúde humana e animal através de doenças com uma ampla diversidade de apresentações clínicas (KLICH, 2002; LACAZ et al, 2002), tornasse relevante a análise de novos compostos e sua combinação com um fármaco de referência – Anfotericina B, a qual possui amplo espectro de ação, incluindo *A. fumigatus* (CIM 1,0-2,0 mg/mL), *A. flavus* (CIM 1,0 mg/mL) (ESPINEL-INGROFF et al, 1997; ARIKAN et al, 1999), pois os análogos analisados podem se tornar candidatos a novos fármacos, visto que estudar um derivado de um composto considerado seguro, após ampla experiência clínica é promissor, devido à possibilidade de que sua eficácia e segurança aumentam significativamente.

2.2.5 Terapêutica antifúngica combinada

A terapêutica antifúngica combinada de modo empírico é frequentemente utilizada no tratamento de infecções fúngicas invasivas (IFIs) em doentes críticos, na tentativa de melhorar o sucesso da resposta terapêutica (CHAMILOS e KONTOYIANNIS, 2006). Limitações como a elevada toxicidade e a baixa tolerância conduziram ao estudo da eficácia da terapêutica combinada no tratamento e controle das IFIs (MUKHERJEE et al, 2005). O raciocínio envolvido baseia-se essencialmente nos mecanismos de ação e respectivos alvos terapêuticos dos fármacos em estudo. Assim, as combinações mais lógicas seriam aquelas que envolvem fármacos com diferentes mecanismos de ação (NISHI et al, 2009).

A combinação de antifúngicos com diferentes mecanismos de ação poderá representar uma opção terapêutica válida e eficaz. Teoricamente, a interação entre dois fármacos pode potencializar a atividade antifúngica de ambos, reduzindo a concentração dos mesmos, a duração do tratamento e consequentemente a emergência de resistências (MUKHERJEE et al, 2005).

2.2.6 Avaliação da interação entre antifúngicos *in vitro*

No decorrer do tempo, foram desenvolvidas técnicas para o estudo da avaliação *in vitro* aos antifúngicos, sendo o método de microdiluição em caldo considerado a técnica de referência. O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2005), antigo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), após 15 anos de trabalhos colaborativos publicou o primeiro documento, o M27-A (1997) com normas e técnicas da padronização dos testes de sensibilidade. Mais recentemente foi publicado o documento M27-S3 (2008) (REX et al, 2001; CLSI, 2008).

Entretanto, apesar da importância crescente desta temática, o CLSI não desenvolveu ainda um método de referência padronizado para avaliar *in vitro* o efeito resultante da interação de antifúngicos com diferentes mecanismos de ação.

Em estudos já publicados, os métodos mais utilizados são o *checkerboard assay*, o *time-kill assay* e mais recentemente o *Etest*® (LEWIS et al, 2002). O método de *checkerboard* é baseado no protocolo de microdiluição (M27-A3) desenvolvido pelo CLSI, no qual são determinadas as CIMs de dois fármacos isoladamente e em associação. Este método avalia a evolução da CIM individual de cada fármaco na presença de um segundo fármaco. Apesar de ser o método mais utilizado, o *checkerboard assay* é muito trabalhoso, de difícil interpretação e não fornece dados sobre a dinâmica de interação dos fármacos (CLSI, 2008).

Detalhadamente, o *checkerboard assay* é um método que propõe uma associação entre duas ou mais drogas e quando esta resulta na soma do resultado de cada droga separadamente, pode-se dizer que essa associação tem um efeito aditivo, enquanto que quando se tem um resultado em associação que não é diferente de quando as drogas são testadas isoladamente, diz-se que a associação é indiferente. Já o antagonismo é observado quando o resultado da associação é menor que o resultado da resposta aditiva e o efeito sinérgico, quando o resultado é maior que aquele esperado para cada composto individualmente. Associações de dois ou mais antimicrobianos ou associações de fármacos com produtos naturais vêm sendo avaliados em diversos estudos por método *in vitro*, sendo a técnica de *checkerboard* bastante utilizada (GRECO, 1995; ODDS, 2003). Esta consiste no método de diluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do composto isolado e em combinação, onde a análise dos resultados é feita pela determinação do *Fractional Inhibitory Concentration Index* (FICI), que é calculado pela seguinte equação:

$$FICI = (CIMa \text{ em combinação} / CIMa \text{ isolado}) + (CIMb \text{ em combinação} / CIMb \text{ isolado})$$

Onde: *CIMa* e *CIMb* correspondem a CIM de diferentes compostos testados.

A combinação que apresentar valor menor que 0,5 é considerada uma combinação sinérgica, valores entre 0,5 e 1 considera-se efeito aditivo, valores entre 1 e 4 considera-se como indiferente e valor maior que 4 é considerado antagonismo (ARIKAN et al, 2002).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Validar e investigar o potencial antifúngico e efeito sinérgico de nitroestirenos.

3.2 Específicos

- Purificar o nitrofeniletano e seus análogos;
- Avaliar espectros de Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear ^1H para confirmar grupos funcionais dos três nitroestirenos;
- Avaliar a atividade antifúngica dos três nitroestirenos frente a cepas ATCC 40152 de *Aspergillus fumigatus* e ATCC 40004 de *Trichophyton mentagrophytes*, e os isolados clínicos dos respectivos microrganismos, determinando os valores de CIM e CFM destes compostos;
- Investigar a presença de sinergismo entre os nitroestirenos: 1-nitro-2-feniletano, 4'-metil-1-nitro-2-feniletano, e 4'-metoxi-1-nitro-2-feniletano com a Anfotericina B;
- Avaliar, *in vitro*, por método do *checkerboard assay*, a atividade da associação de Anfotericina B e dos nitroestirenos frente à cepa ATCC 40152 de *A. fumigatus*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos Nitroestirenos

A síntese dos nitroestirenos foi realizada no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará – UFPA – PPGCF, onde três nitroderivados foram gerados através da inserção de uma dupla ligação na cadeia alifática do 1-nitro-2-feniletano, que gerou os análogos: 1-nitro-2-fenileteno, 4'-metil-1-nitro-2-fenileteno e 4'-metoxi-1-nitro-2-fenileteno, os quais foram denominados neste estudo: 7A, 7B, e 7C, respectivamente, como mostra a Figura 12 (VALE, 2011).

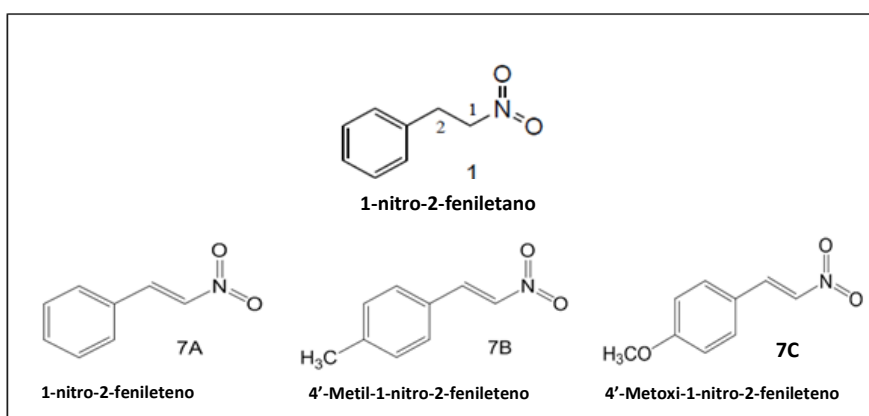


Figura 12: Nitrofeniletano (1) e os análogos 1-nitro-2-fenileteno (7A), 4'-metil-1-nitro-2-fenileteno (7B) e 4'- metoxi-1-nitro-fenileteno (7C).
Fonte: Autora, 2014.

4.2 Purificação dos nitroestirenos

A purificação dos nitrocompostos foi realizada por meio do teste de recristalização e a identificação estrutural foi evidenciada por análises espectrométricas de absorção do Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio¹.

Para realizar a recristalização os análogos foram misturados a éter etílico e metanol e levados ao aquecimento até o ponto de ebulição, em seguida a solução foi filtrada e permaneceu em temperatura ambiente por 24 horas para a formação dos cristais. O critério utilizado para validar o teor de pureza foi verificado pelo intervalo da faixa de fusão, baseado no padrão de referência da Merck®.

Os solventes utilizados na purificação foram:

Diclorometano P.A. Isofar® (CH_2Cl_2), Metanol P.A. Isofar® (MeOH) e Éter etílico comercial Proquímios® ($\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$).

Equipamentos utilizados:

Chapa aquecedora Ética® Equipamentos Científicos S. A/ SP, Indústria Brasileira.

A evaporação dos solventes ocorreu à temperatura ambiente por 24 horas, em seguida armazenado em refrigerador a uma temperatura de $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aproximadamente, por uma semana até a formação dos cristais.

4.3 Análise de identificação estrutural e pureza

4.3.1 Ponto de fusão

A faixa de fusão foi determinada através da visualização do início da fundição de pequena alíquota do composto, onde foi procurado visualizar um fragmento mais cristalino e sólido. A fundição é realizada entre par de lamínulas de vidro com auxílio de lente para amplificação do campo visual, em Aparelho digital MQA PF-302, não corrigidos.

4.3.2 Infravermelho

Os espectros de absorção pelo Infravermelho (IV) foram obtidos por espectrofotômetro de (IR Prestige21), utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr). Os valores para as absorções são referidos em números de ondas, utilizando como unidade o centímetro recíproco (cm^{-1}). O aparelho utilizado foi Infravermelho por transformada de Fourier SHIMADZU CORPORATION; MODELO: IR Prestige21; Kyoto-Japão.

4.3.3 Ressonância Magnética Nuclear – Hidrogênio¹

A ressonância do núcleo de hidrogênio é uma estreita faixa de diferentes comprimentos de onda, pois esta frequência depende da posição do núcleo no cristal, da proximidade de outros núcleos, do estado da molécula, das ligações químicas, etc., existem pequenas variações para cada núcleo e conseqüentemente nas frequências de ressonância. Conhecer a quantidade de prótons de hidrogênio numa amostra possui inúmeras aplicações, como por exemplo, medir o teor de água, óleos e gorduras nas mais variadas amostras, e determinar relações entre fase amorfa e cristalina em plásticos, hidrocarbonetos e polímeros (CIENFUEGOS e VAITSMAN, 2000).

Diante dessa importância, os compostos foram submetidos a análise RMN-¹H onde foram dissolvidos em clorofórmio deuterado ($\text{CDCl}_3\text{-d}_6$), tendo como sinal de referência 7,26 ppm o próprio $\text{CDCl}_3\text{-d}_6$, utilizando o Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear da Marca Varian®, operando a 300 MHz.

4. 4 Avaliação da atividade antifúngica dos nitroestirenos

4. 4. 1 Preparação das amostras para avaliação antifúngica

Os nitroestirenos foram diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada estéril, na proporção 1:1, em seguida a solução foi homogeneizada em agitador elétrico do tipo (Vortex) por dois minutos. Cada solução foi estocada em frasco estéril em temperatura aproximada de 4 °C.

4.5 Obtenção e manutenção do isolado clínico fúngico e ATCC das espécies

Para os ensaios de atividade biológica foi utilizado isolado clínico e cepas das espécies *A. fumigatus* ATCC 40152 e *T. mentagrophytes* ATCC 40004, e os isolados clínicos que foram cedidos pelo Instituto Evandro Chagas (IEC) das respectivas espécies. Os *A. fumigatus* foram mantidos em tubos de ensaio vedados, a uma temperatura de 37 °C no laboratório de Microbiologia Clínica da Faculdade de Farmácia/UFPA. A cada quatorze dias novos repiques do microrganismo foram realizados para um novo crescimento, a fim de manter as colônias sempre viáveis. Para a realização dos ensaios antifúngicos, foi realizado um repique sete dias antes do procedimento em placa de Petri contendo Agar Sabouraud Dextrose (ASD) e em seguida incubada a 37°C, no caso da espécie *T. mentagrophytes*, são necessários 20 dias para o crescimento da colônia que é mantida a 30°C em ASD.

O meio de cultura ASD foi preparado conforme as instruções do fabricante, onde foi adquirido na forma de pó e solubilizado em água destilada na proporção indicada. Em seguida foi esterilizado por calor úmido em ciclo de autoclave.

4.5.1 Preparação do Inoculo

Para o preparo do inoculo foram adotados os procedimentos descritos na Norma M38-A, vol. 22 Nº 16, “Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma Aprovada” do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008b) com adaptações. Inicialmente foi realizada a lavagem dos conídios com *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI) a partir da placa previamente semeada, foi feita uma leve raspagem com alça descartável de forma a remover apenas os esporos dos fungos evitando assim, a transferência de fragmentos de Agar e de hifas. A suspensão fúngica (3mL) foi coletada com ponteiros estéreis acopladas a micropipeta automática (1000 µL) e transferida para um tubo de ensaio estéril aguardando-se 5 minutos para sedimentação das partículas maiores, o sobrenadante foi transferido para um tubo contendo 5 mL de RPMI e este foi agitado em aparelho tipo vórtex (Phoenix AP56) por 15 segundos. A turbidez da suspensão foi ajustada para 0,5 em relação à escala de *Mac Farland* correspondendo 10^6 UFC/mL. Este método foi empregado tanto para a espécie *A. fumigatus* quanto para *T. mentagrophytes*, as Figuras 13 e 14 mostram as colônias de *A. fumigatus* e *T. mentagrophytes* cultivada em ASD, utilizada para confirmação da espécie e preparo do inoculo para inicio dos testes.



Figura 13: (A) *A. fumigatus* isolado clínico e (B) *A. fumigatus* ATCC 40152 e cultivados em ASD. Fonte: Autora, 2014.

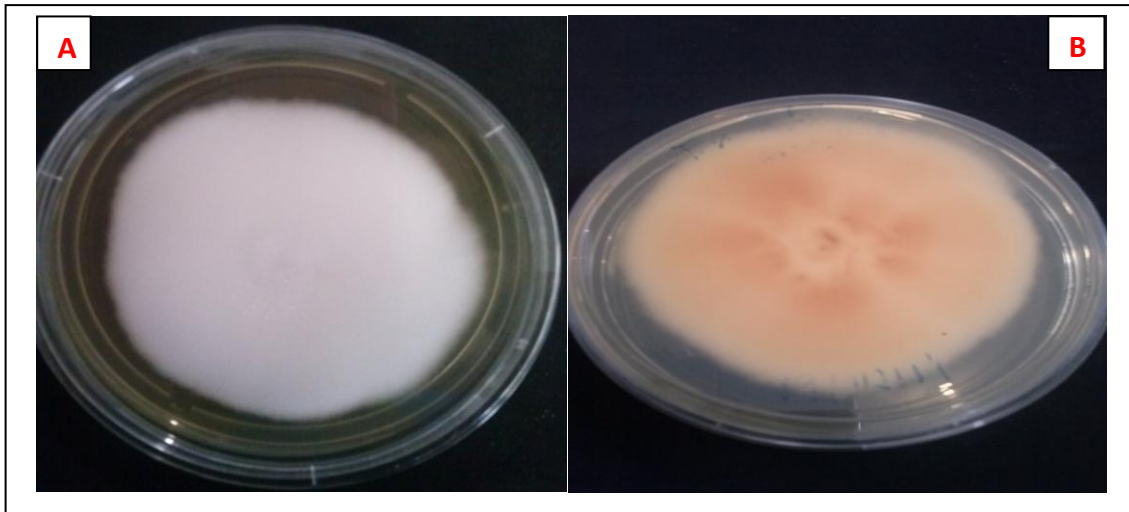


Figura 14: *T. mentagrophytes* ATCC 40004 cultivado em ASD. (A) frente e (B) verso da placa. Fonte: Autora, 2014.

4.5.2 Método de microdiluição em caldo e da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios de microdiluição foram realizados de acordo com a Norma M38-A, vol. 22 N° 16, “Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos”: Norma Aprovada do CLSI, o qual define a determinação da CIM como um teste de sensibilidade, realizado em condições conhecidas no qual é definida a menor concentração de um agente antimicrobiano o qual impede o crescimento visível de um microrganismo. A diluição foi realizada em cubos cônicos, do tipo *Eppendorf*® a partir de uma ‘solução mãe’ na concentração de 10 mM, para cada composto, obtendo-se 5 mM, 2,5 mM, 1,25 mM e 0,625 mM, 0,312 mM, 0,156 mM respectivamente, como mostra a Figura 15. O cálculo foi realizado na relação do peso molecular *versus* massa molar (mM), em seguida os valores foram convertidos em miligrama por mililitro (mg/mL).

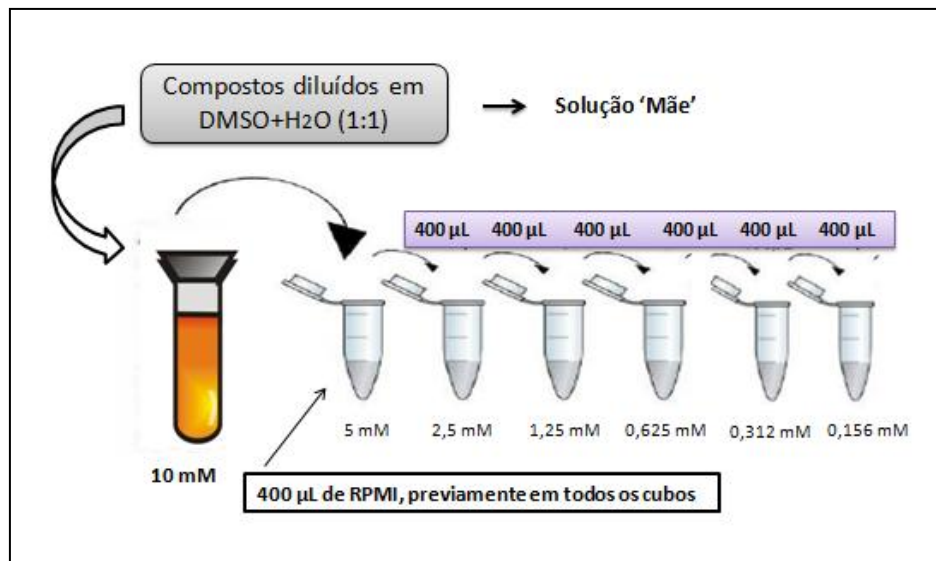


Figura 15: Microdiluição em caldo e da CIM. Norma M38-A, Vol 22 N° 16 (CLSI, 2008), com adaptações.

Os ensaios foram realizados em uma placa estéril de 96 poços em formato de “U”, adicionando-se 100 µL de cada diluição aos poços contendo previamente 100µL do inoculo fúngico ($0,4 - 5 \times 10^6$ UFC/mL) em todos os poços, obtendo-se volume final de 200 µL em cada. O controle negativo utilizado foi DMSO 50% e para controle positivo foi usado 100µL de AB na concentração de 0,312 mg/mL, a placa foi incubada a 37°C por 24 horas. Para a espécie *T. Mentagrophytes* foi modificado o tempo, em mais 24 horas, pois a espécie possui um crescimento mais lento.

Após o período de 24 horas, foi adicionado a cada poço 15 µL de resazurina 0,01% (fenoxazin-3-ona) um corante indicador de óxido-redução conforme descrito em Palomino et al. (2002), sendo a placa novamente incubada a 37°C por 3 horas. Em seguida foi realizada a leitura visual para identificação da CIM, considerando-se a manutenção da coloração de azul como ausência de crescimento enquanto que a mudança para coloração rosa indicou a reação química de óxido-redução da resazurina em resorfurina, sendo interpretada como presença de células viáveis. A CIM corresponde ao último poço de coloração azul da linha no sentido esquerda – direita. (MONTEIRO et al, 2012). Como mostra a Figura 16.

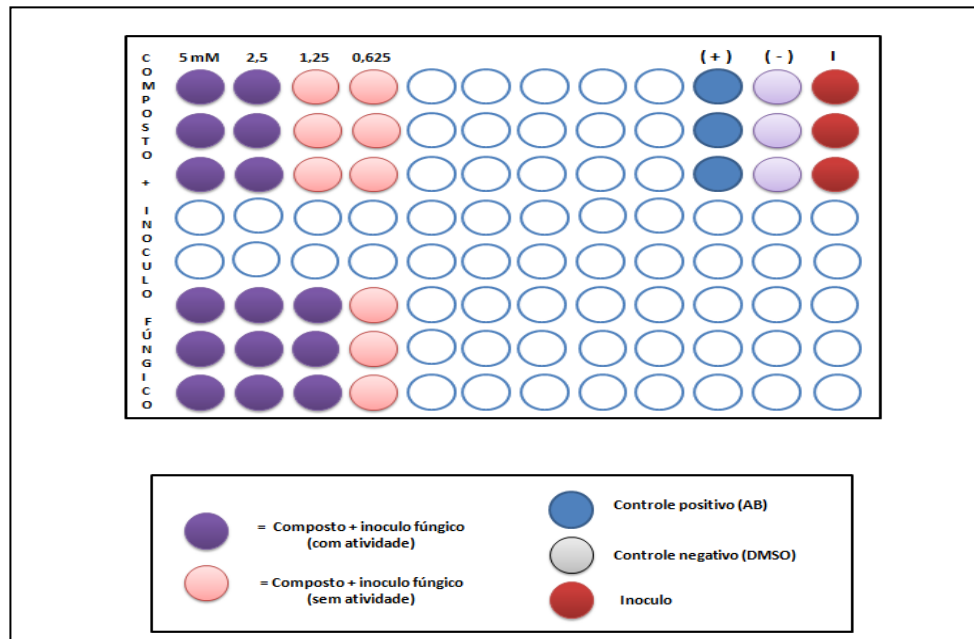


Figura 16: Esquema da placa de microdiluição usada no experimento.

4.5.3 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A partir da contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC), foi possível confirmar os resultados obtidos através da leitura do teste de CIM com a resazurina e obter a determinação da concentração fungicida mínima (CFM). A CFM foi determinada pela técnica *pour plate*, na qual foi adicionado 10 μ L do conteúdo de cada poço sobre uma placa de Petri estéril de 90x15, adicionando-se em seguida aproximadamente 20 mL de ASD seguida de homogeneização. Essas placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para posterior leitura e contagem das UFCs, para a espécie *A. fumigatus*. Para a espécie *T. mentagrophytes* o tempo de incubação das placas foi de 72 horas à temperatura de 30°C.

4.5.4 Método de *checkerboard* para avaliação de associações entre antifúngicos

O efeito da associação entre os três nitroestirenos com o antibiótico Anfotericina B (NTC/AB) foi avaliado frente à cepa padrão de *A. fumigatus*. As

concentrações testadas para cada agente antifúngico foram de 0,19 mg/mL a 0,01mg/mL para o composto **7A**; de 0,1mg/mL a 0,01 mg/mL para **7B** e de 0,22 mg/mL a 0,03 mg/mL de **7C** e para AB de 0,312 mg/mL a 0,039 mg/mL. As soluções dos nitroestirenos foram adicionadas em meio de cultura líquido RPMI (Sigma, EUA), e colocadas em cubos cônicos do tipo *ependorf*®, assim como a AB. O inóculo dos fungos foram preparados em RPMI, de acordo com o protocolo descrito para a determinação da susceptibilidade por microdiluição. Após inoculação, as microplacas foram incubadas a 35 °C; as leituras foram efetuadas visualmente às 24 horas para a cepa ATCC 40152 de *A. fumigatus*. Os *endpoints* foram estabelecidos em concordância com os valores definidos para o método de microdiluição M27-A3.

A avaliação da interação entre os antifúngicos foi determinada através do cálculo da *Fractionary Inhibitory Concentration* (FIC) para cada um dos nitroestirenos em estudo, cuja soma origina o *Fractionary Inibitory Concentration Index* (FICI) (KONTOYIANNIS e LEWIS, 2003). Os resultados obtidos foram classificados, de acordo com o FICI, em sinérgicos ($FICI \leq 0,5$), aditivos ($0,5 < FICI < 1$), indiferentes entre ($1 \leq FICI < 4$) ou antagonistas ($FICI \geq 4$) (WHITE et al, 1996; LEWIS et al, 2002).

5 RESULTADOS

5.1 Dados espectrais e parâmetros físico-químicos dos nitroestirenos

5.1.1 Infravermelho dos nitroestirenos

Embora o espectro de absorção de ondas eletromagnéticas na região do IV não possa determinar a estrutura molecular de um composto, este pode evidenciar a presença de ligações peculiares identificando grupos funcionais existentes na estrutura.

a) Infravermelho do 1-nitro-2-fenileteno

A Figura 17 mostra o espectro do 1-nitro-2-fenileteno onde as bandas 1494,83 cm^{-1} e 1328,95 cm^{-1} confirmam a presença do grupo nitro, ainda são verificadas as bandas 1580 cm^{-1} , 1505 cm^{-1} e 1448 cm^{-1} referente ao anel aromático, que segundo a análise das bandas em 769 cm^{-1} e 705 cm^{-1} o mesmo é monossustituído. A banda em 1631,78 cm^{-1} evidencia uma ligação dupla na molécula com estereoquímica *trans* segundo a presença da banda em 968,27 cm^{-1} .

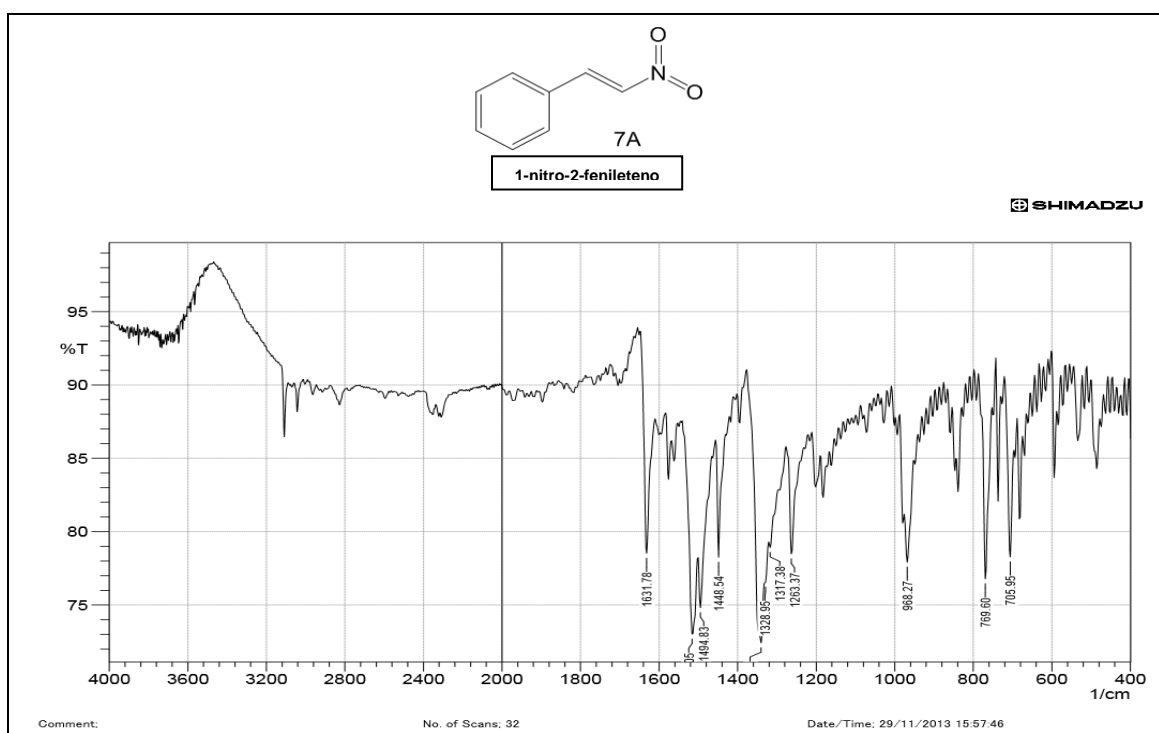


Figura 17: Infravermelho do composto 1-nitro-2-fenileteno.

b) Infravermelho do 4'-metil-1-nitro-2-fenileteno

Na Figura 18 mostra o espectro de IV de 4'-metil-1-nitro-2-fenileteno onde as bandas em 1604 cm^{-1} , 1566 cm^{-1} e 1490 cm^{-1} evidencia a presença do anel aromático e a banda em 810 cm^{-1} é típica para anel aromático *para* substituído. Outras duas bandas em $1330,00\text{ cm}^{-1}$ aproximadamente e em $1496,76\text{ cm}^{-1}$ sugerem a presença do grupo nitro. As bandas em 1631 cm^{-1} e $964,41\text{ cm}^{-1}$ são referentes à ligação dupla.

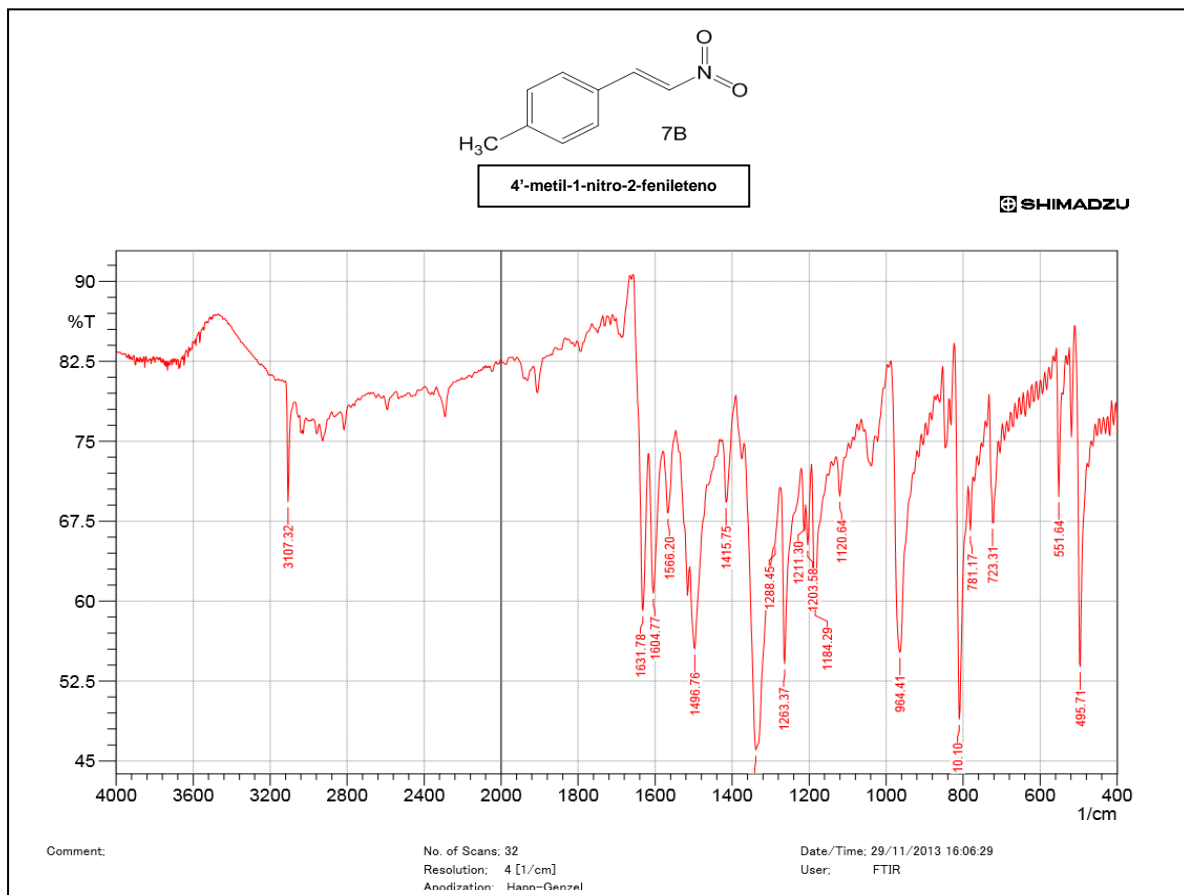


Figura 18: Infravermelho do composto 4'-metil-1-nitro-2-fenileteno.

c) Espectro de Infravermelho do 4'-metoxi-1-nitro-2-fenileteno

Na Figura 19, observamos que o espectro do 4'-metoxi-1-nitro-2-fenileteno possui determinadas bandas que coincidem com as dos outros espectros como em $806,25\text{ cm}^{-1}$ que sugere a presença do grupo 'para' substituído, uma banda de média intensidade em $1624,06\text{ cm}^{-1}$ para o esqueleto aromático, $1456,26\text{ cm}^{-1}$ confirmando a presença do grupo nitro e uma banda fraca característica em $2900,00\text{ cm}^{-1}$ aproximadamente indica a presença da metila.

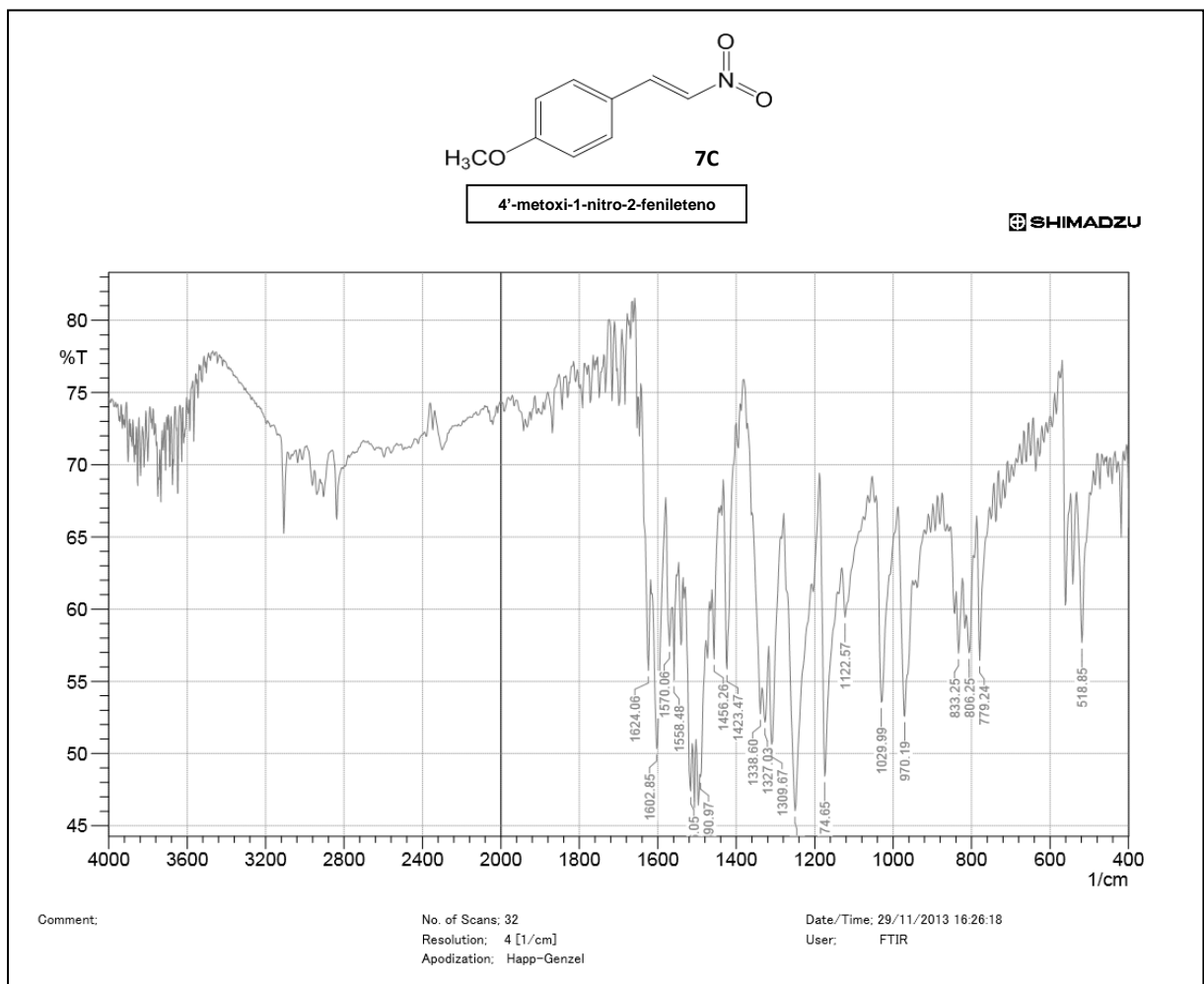


Figura 19: Infravermelho do composto 4'-metoxi-1-nitro-2-fenileteno.

5.1.2 Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H dos nitroestirenos

Na Figura 20, se observa os sinais duplete em 8,00 ppm e 7,59 ppm apresentam $J = 13,8$ Hz indicando que estão *trans* relacionados e foram atribuídos aos hidrogênios H-2 e H-1, respectivamente. Já os sinais de 7,42 ppm a 7,60 ppm foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos.

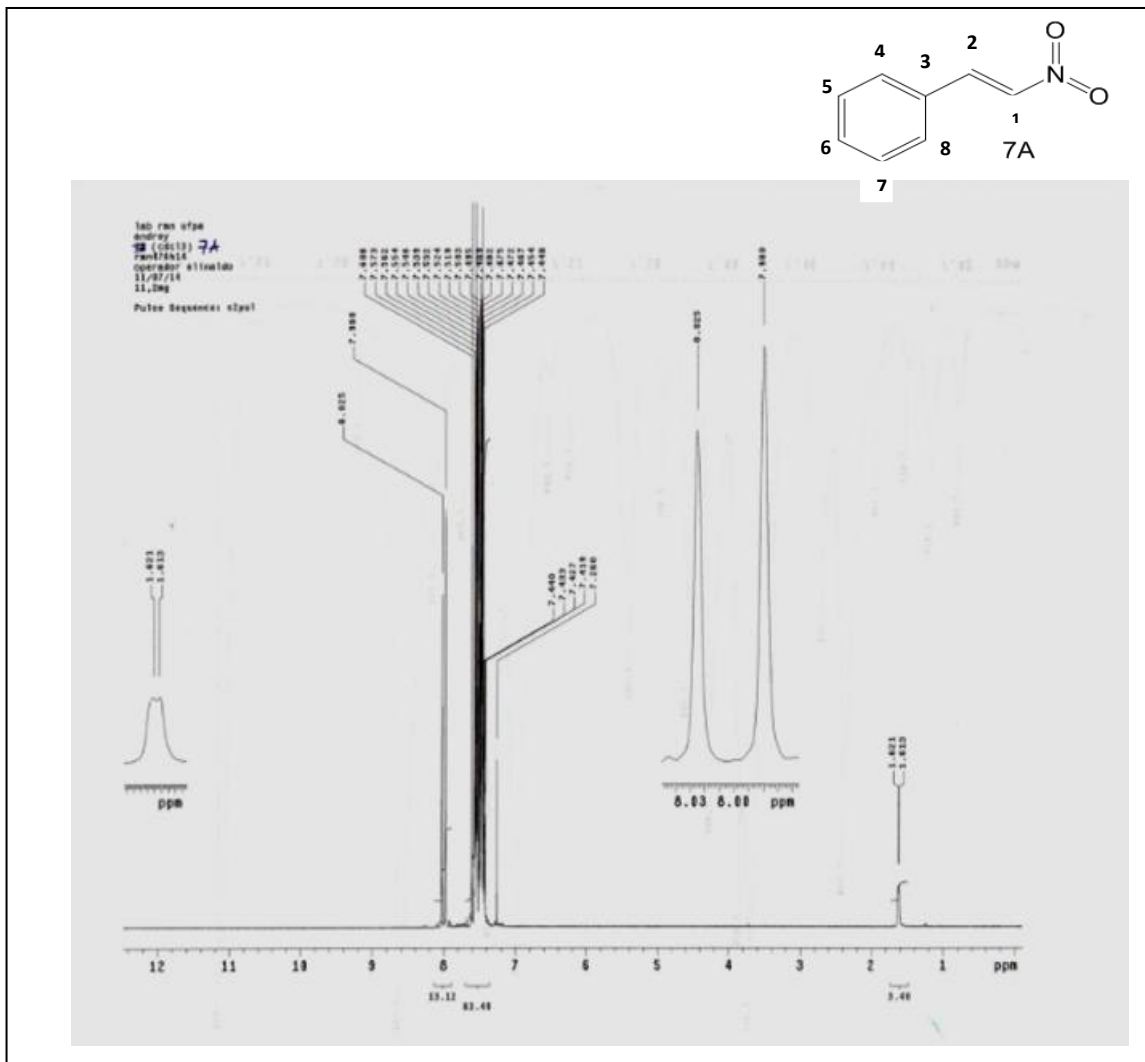


Figura 20: Espectro de RMN ^1H (300 Mz, CDCl_3 , δ ppm) relativo ao 1-nitro-2-fenileteno (7A).

O espectro de RMN ^1H do nitroestireno 7B também apresentou os sinais duplete em 8,00 ppm e 7,59 ppm com $J = 13,8$ Hz atribuídos aos hidrogênios H-2 e H-1, respectivamente. Também foram observados os sinais dupletos em 7,46 ppm e 7,27 ppm com $J = 8,1$ Hz indicando sistema aromático *orto*, o sinal 7,46 ppm foi atribuído aos hidrogênios H-4 e H-8 e o sinal em 7,27 ppm foi atribuído aos hidrogênios H-5 e H-7. O sinal singlete em 2,41 ppm foi atribuído à metila ligada ao anel aromático, mostrado na Figura 21.

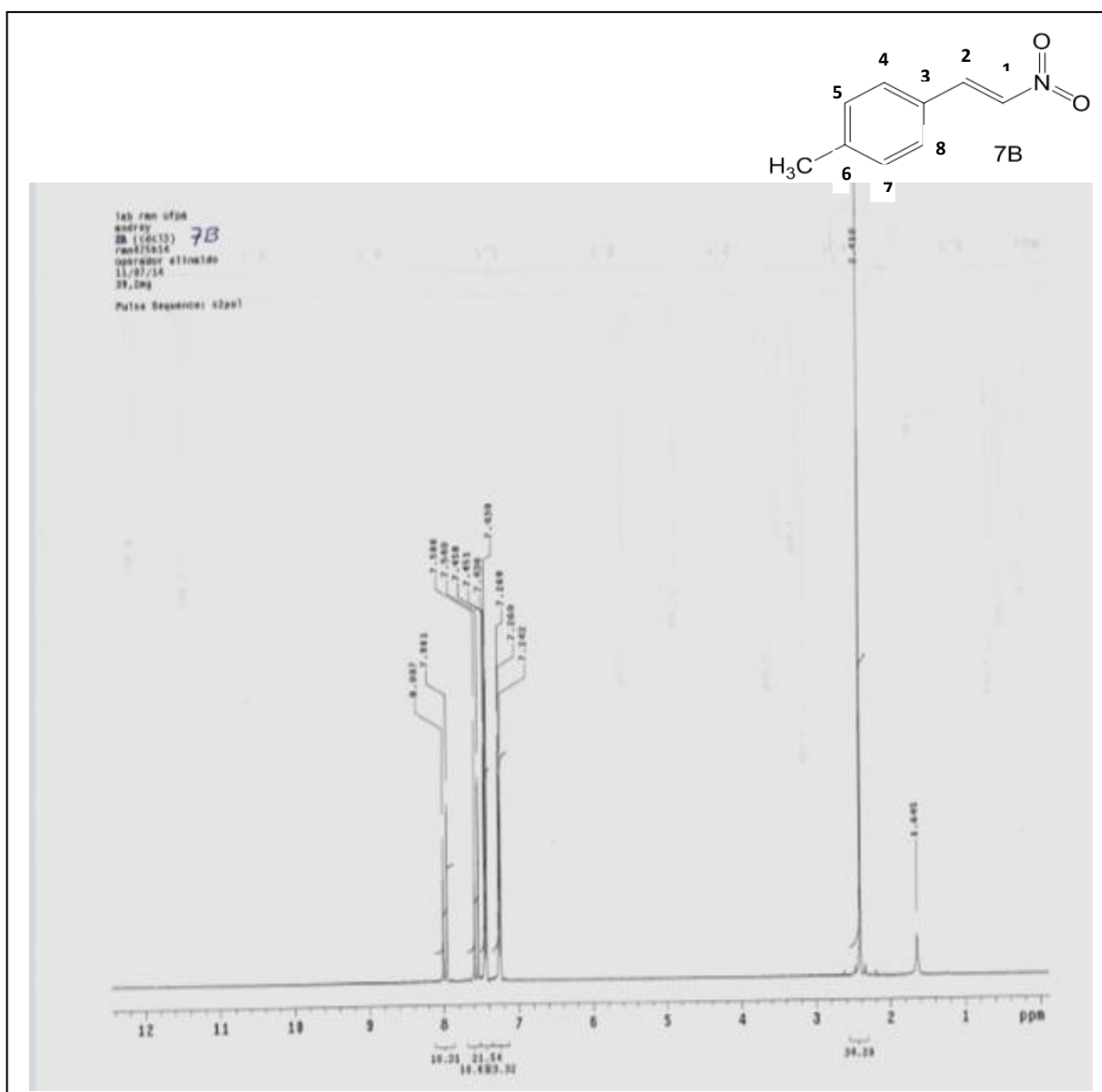


Figura 21: Espectro de RMN ^1H (300 Mz, CDCl_3 , δ ppm) relativo ao 4'-metil-1-nitro-2-fenileteno.

Na Figura 22, o espectro de RMN ^1H do nitroestireno 7C apresentou um padrão semelhante ao de 7B como os sinais duplete em 7,99 ppm e 7,53 ppm com $J = 13,8$ Hz atribuídos aos hidrogênios H-2 e H-1, os sinais 7,51 ppm (d, $J = 8,1$, H-4 e H-8,) e δ_{H} 6,9 (d, $J = 8,1$, H-5 e H-7). Já o sinal singlete em 3,86 ppm foi atribuído aos hidrogênios da metoxila (CH_3O).

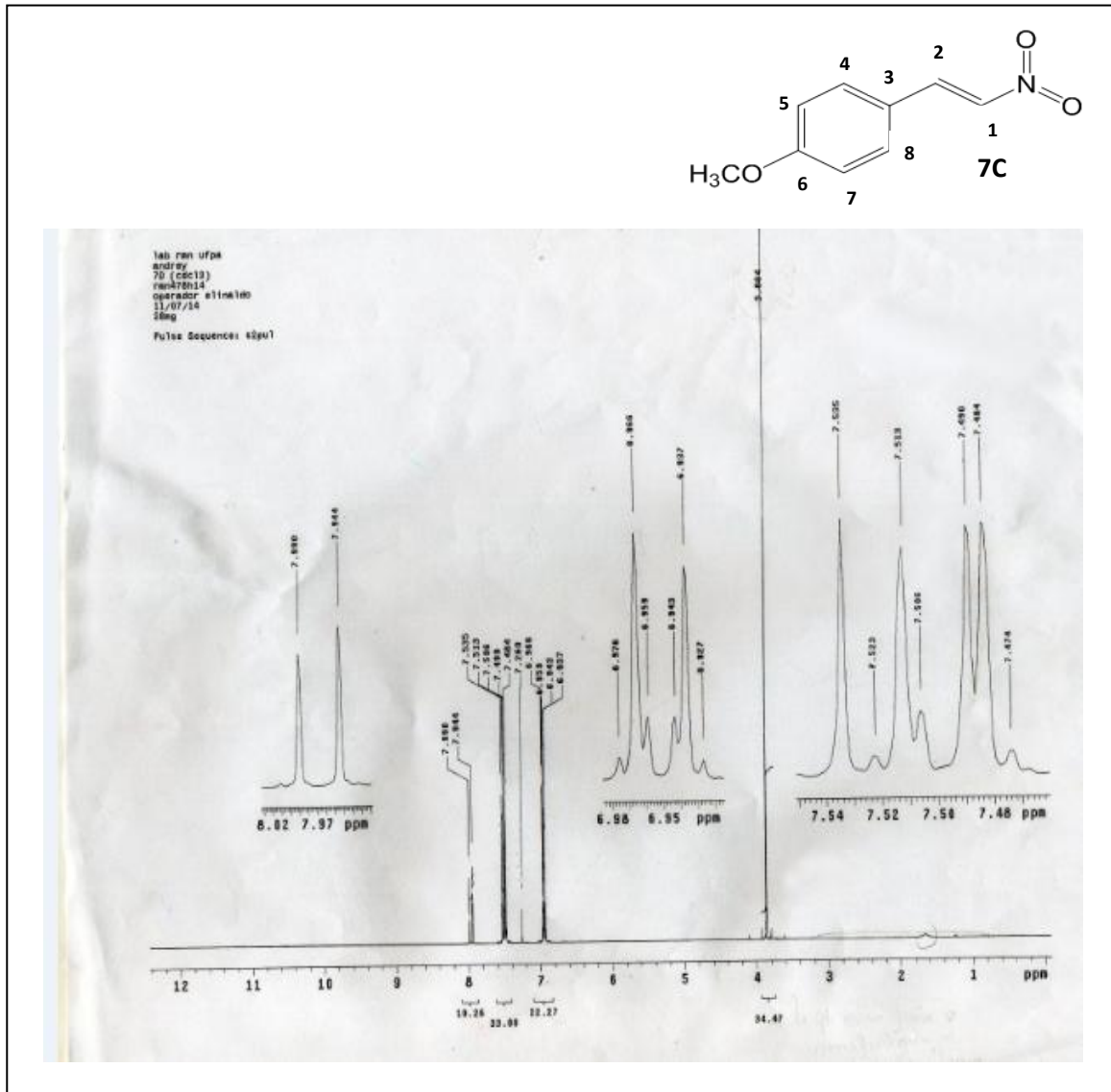


Figura 22: Espectro de RMN ^1H (300 Mz, CDCl_3 , δ ppm) relativo ao 4'-metoxi-1-nitro-2-fenileteno.

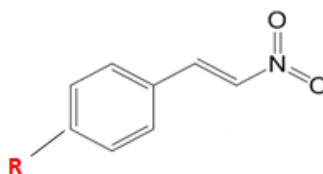
A análise de RMN ^1H para os três compostos corroborou com os dados obtidos pelos espectros de IV e permitiu identificar corretamente as estruturas de 7A, 7B e 7C.

5.1.3 Ponto de fusão e Massa molar

A determinação da faixa de fusão dos compostos obtidos foi feita em lamínulas de vidro, utilizando aparelho digital da marca Micro-Química, modelo MQAPF- 302.

Os valores encontrados no ponto de fusão dos compostos analisados estão próximos dos valores de referência, porém não coincidentes. Como mostra a Tabela 01.

Tabela 01: Ponto de fusão e massa molar dos nitroestirenos: 1-nitro-2-fenileteno; 4'-metil-1-nitro-2-fenileteno e 4'-metoxi-1-nitro-2-fenileteno



R	MM g/Mol	Faixa de Fusão C°	REF (C°)
H	149	50 – 52,5	55 -58
C ₃ H	163	95 – 96,9	102 -104
OC ₃ H	179	84,5 – 85	86 -88

MM: Massa Molecular (g/mol).

5.2 Atividade antifúngica dos nitroestirenos

5.2.1 Testes com *Aspergillus fumigatus*

Todos os três compostos foram testados frente ao *A. fumigatus* e *T. mentagrophytes* tanto para os isolados clínicos quanto para as cepas ATCC de

ambos. Na Figura 23, observou-se que o inoculo cresceu normalmente, o DMSO usado para diluir os compostos quando adicionados ao inoculo não inibiu o crescimento do fungo (controle negativo), e a Anfotericina B na concentração de 0,312 mg/mL (controle positivo) inibiu totalmente o crescimento fúngico em todos os testes.

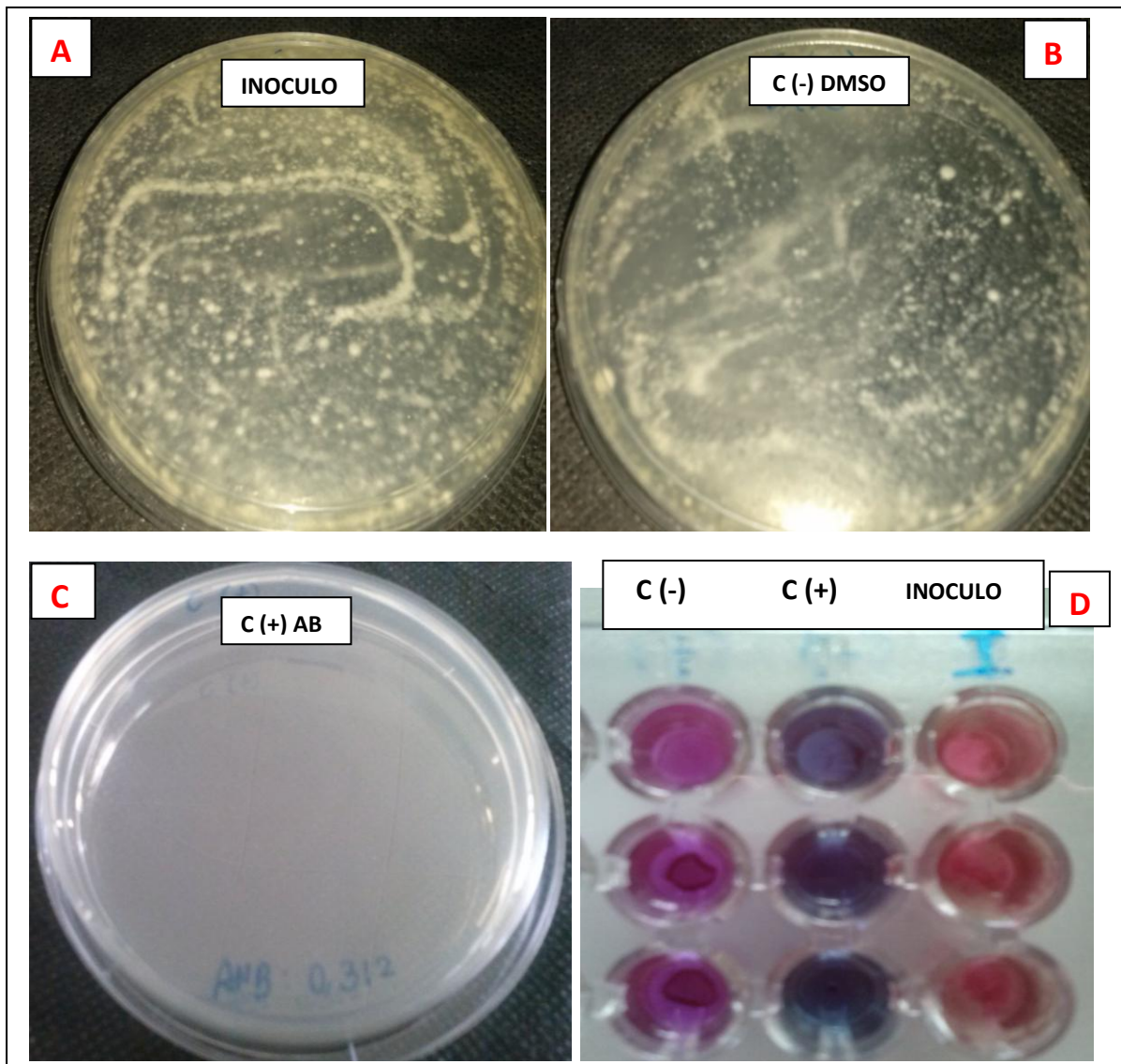


Figura 23: (A) Inoculo, (B) Controle negativo (DMSO), (C) controle positivo (Anfotericina B) e (D) placa de microdiluição com a presença de resazurina.

A Figura 24 mostra o ensaio de microdiluição para o composto **7A** (1-nitro-2-feniletano) e o isolado clínico de *A. fumigatus* nas seguintes concentrações: 1,49

mg/mL; 1,34 mg/mL; 1,19 mg/mL e 1,04 mg/mL. Através do ensaio colorimétrico pela resazurina não foi possível determinar a CIM do composto **7A** sintetizado. Pela técnica do *pour plate* foi possível observar que nenhuma concentração testada do composto **7A** foi capaz de inibir o crescimento fúngico.

Já para a cepa ATCC 40152 do *A. fumigatus*, os testes foram nas seguintes concentrações: 0,75 mg/mL; 0,37 mg/mL; 0,19 mg/mL; 0,09 mg/mL; 0,05 mg/mL; 0,02 mg/mL e 0,01 mg/mL, com o composto **7A** de referência *sigma*® onde a CIM ficou em 0,09 mg/mL e a CFM pela técnica de *pour plate* não foi determinada pois ficou maior que 0,75 mg/mL.

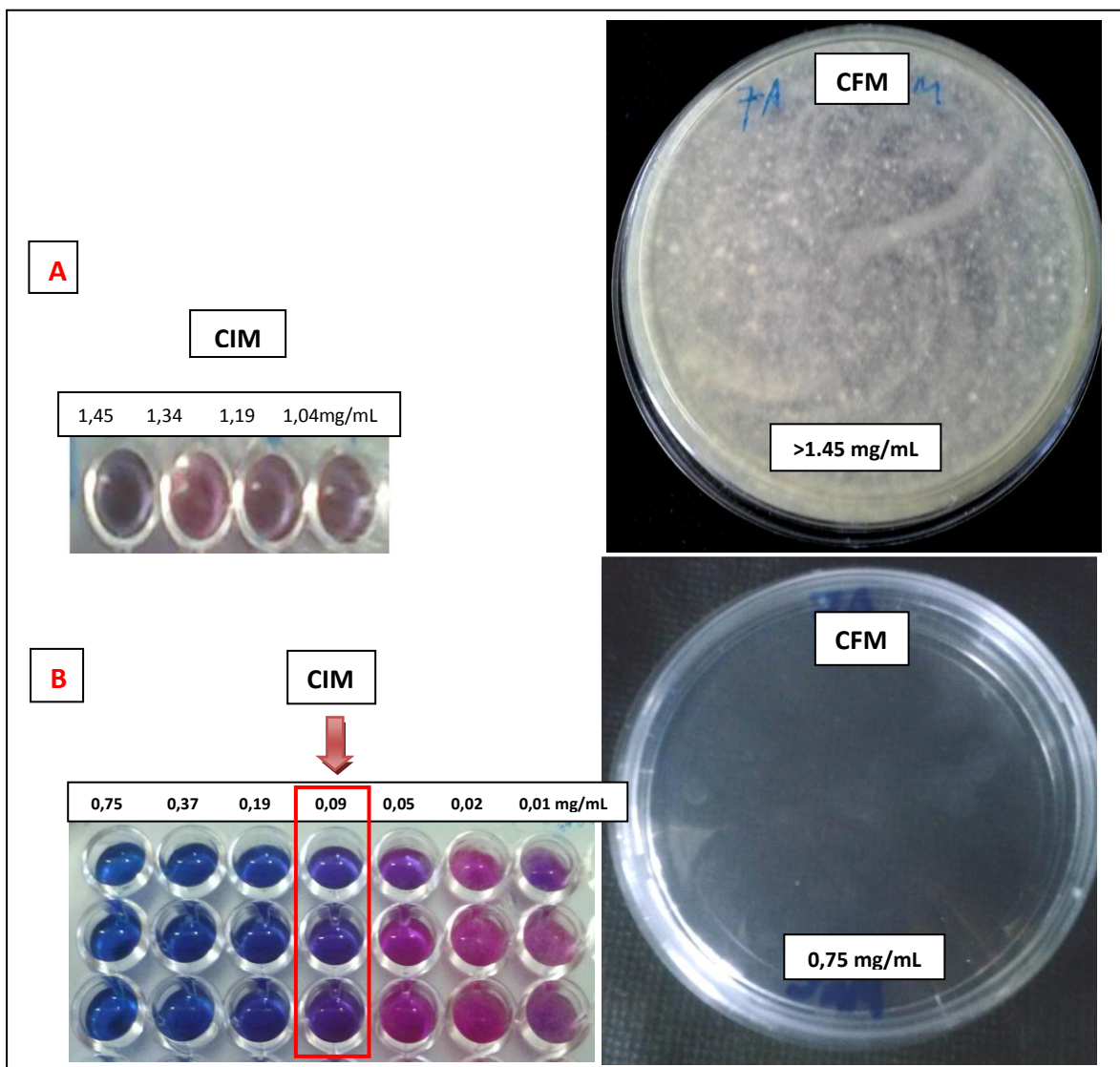


Figura 24: **(A)** Microdiluição seriada com o composto **7A** nas concentrações (1,45; 1,34; 1,19 e 1,04 mg/mL) e ao lado técnica de *pour plate* com o composto **7A** para o isolado clínico de *A. fumigatus*. **(B)** Microdiluição seriada com o composto **7A** nas concentrações (0,75; 0,37; 0,19; 0,09; 0,05; 0,02 e 0,01 mg/mL) e ao lado técnica de *pour plate* com o composto **7A** testados frente à cepa ATCC de *A. fumigatus*.

Já o composto **7B** (4'-metil-1nitro-2-feniletano) apresentou atividade antifúngica para o isolado clínico, cujo valor da CIM foi de 0,2 mg/mL, obtido pela técnica de microdiluição com coloração por resazurina, e a CFM de 0,41 mg/mL que foi obtida pela técnica de *pour plate*. Já os testes frente à cepa ATCC, os resultados foram melhores, pois o valor da CIM foi de 0,05 mg/mL e o valor da CFM foi 0,1 mg/mL como mostra a Figura 25.

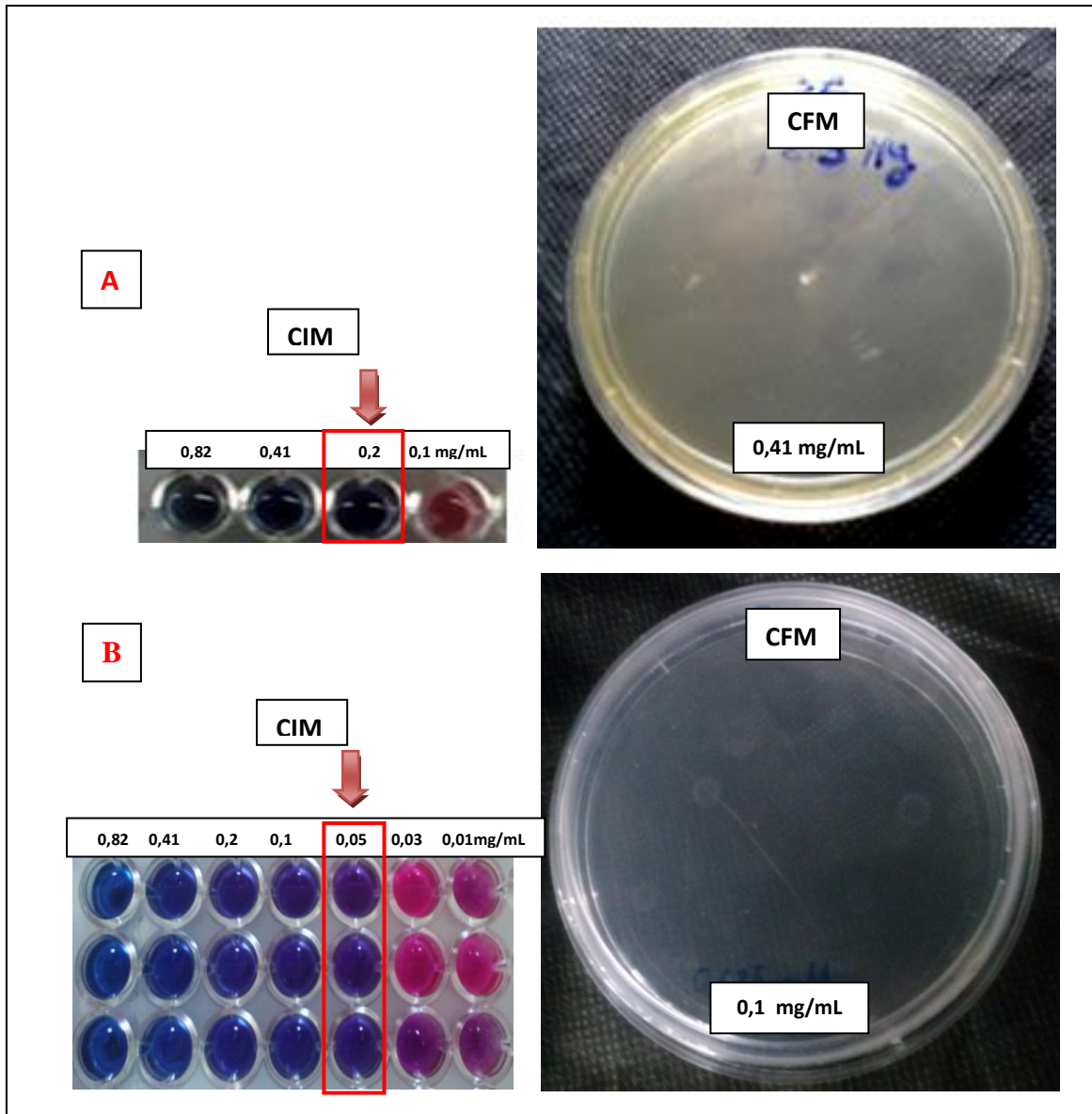


Figura 25: **(A)** Microdiluição seriada com a resazurina do composto 7B (0,82; 0,41; 0,2 e 0,1 mg/mL), seta indicando o valor da CIM e técnica de *pour plate* para demonstrar o CFM do composto 7B frente ao isolado clínico de *A. fumigatus*; **(B)** Microdiluição seriada do composto 7B (0,82; 0,41; 0,2; 0,1; 0,05; 0,03 e 0,01 mg/mL) demonstrando a CIM e CFM na placa pela técnica do *pour plate* frente à cepa ATCC do *A. fumigatus*.

Para o composto **7C** frente ao isolado clínico de *A. fumigatus*, a CIM foi obtida em 0,22 mg/mL e a CFM em 0,45 mg/mL, porém para a cepa ATCC ambos, CIM e CFM ficaram em 0,22 mg/mL como mostra a Figura 26.

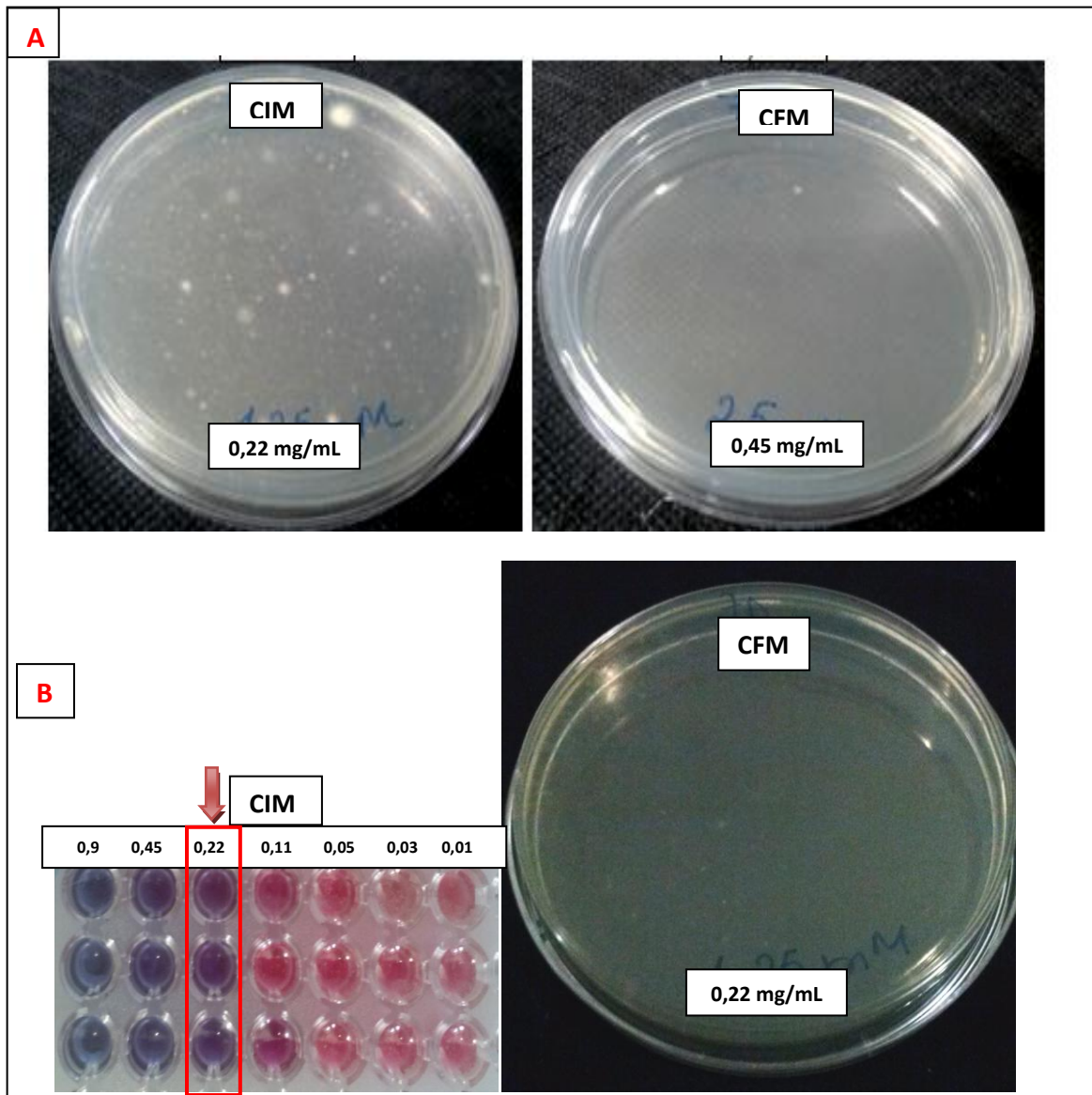


Figura 26: **(A)** CIM e CFM pela técnica de *pour plate* do composto 7C frente ao isolado clínico de *A. fumigatus*; **(B)** Microdiluição seriada pela resazurina para obtenção da CIM e placa da técnica de *pour plate* para obtenção da CFM do composto 7C frente à cepa ATCC do *A. fumigatus*.

5.2.2 Testes com a espécie *Trichophyton mentagrophytes*

Assim como foi realizado para a espécie do fungo *A. fumigatus*, os três nitroestirenos foram testados frente ao isolado clínico e a cepa ATCC 40004 do fungo dermatófito *T. mentagrophytes*.

Para o composto **7A** frente ao isolado clínico de *T. mentagrophytes*, a CIM ficou em 0,37 mg/mL, porém o CFM ficou maior que 0,75 mg/mL, assim como frente à cepa ATCC 40004, a CIM e a CFM permaneceram com o mesmo valor. Como mostra a Figura 27.

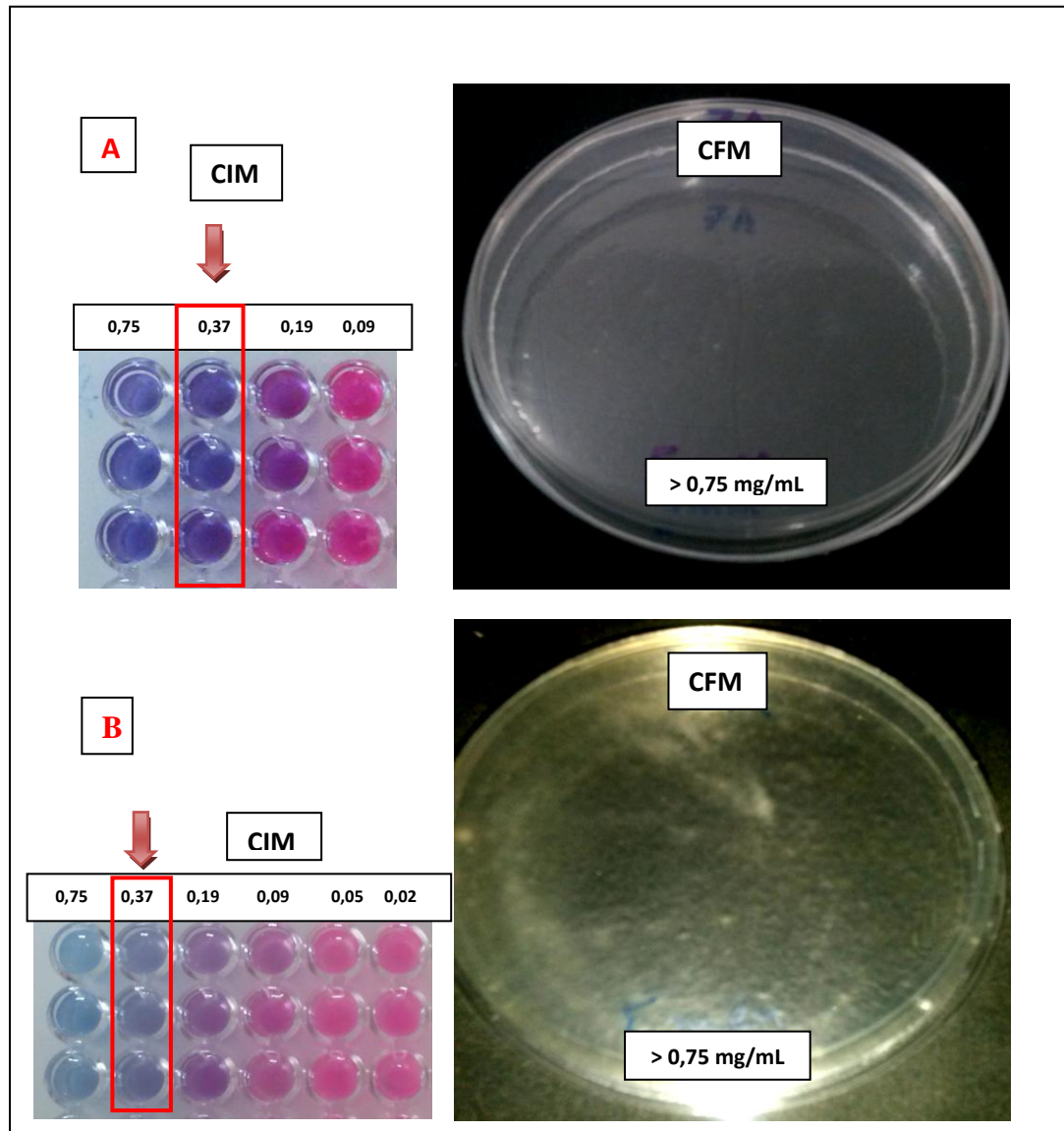


Figura 27: **(A)** Microdiluição seriada com a resazurina nas concentrações (0,75; 0,37; 0,19 e 0,09 mg/mL) para determinação da CIM e ao lado técnica do *pour plate* para determinação da CFM do composto 7A frente ao isolado clínico da espécie *T. mentagrophytes*; **(B)** Microdiluição seriada com a resazurina nas concentrações (0,75; 0,37; 0,19; 0,09; 0,05 e 0,02 mg/mL) para determinação da CIM e ao lado técnica do *pour plate* em para determinação da CFM do composto 7A frente à cepa ATCC 40004 da espécie *T. mentagrophytes*.

O resultado observado para o composto **7B** frente ao isolado clínico e a cepa ATCC de *T. mentagrophytes*, a CIM ficou em 0,2 mg/mL de ambos e a CFM acima de 0,82 mg/mL, também de ambos como mostra a Figura 28.

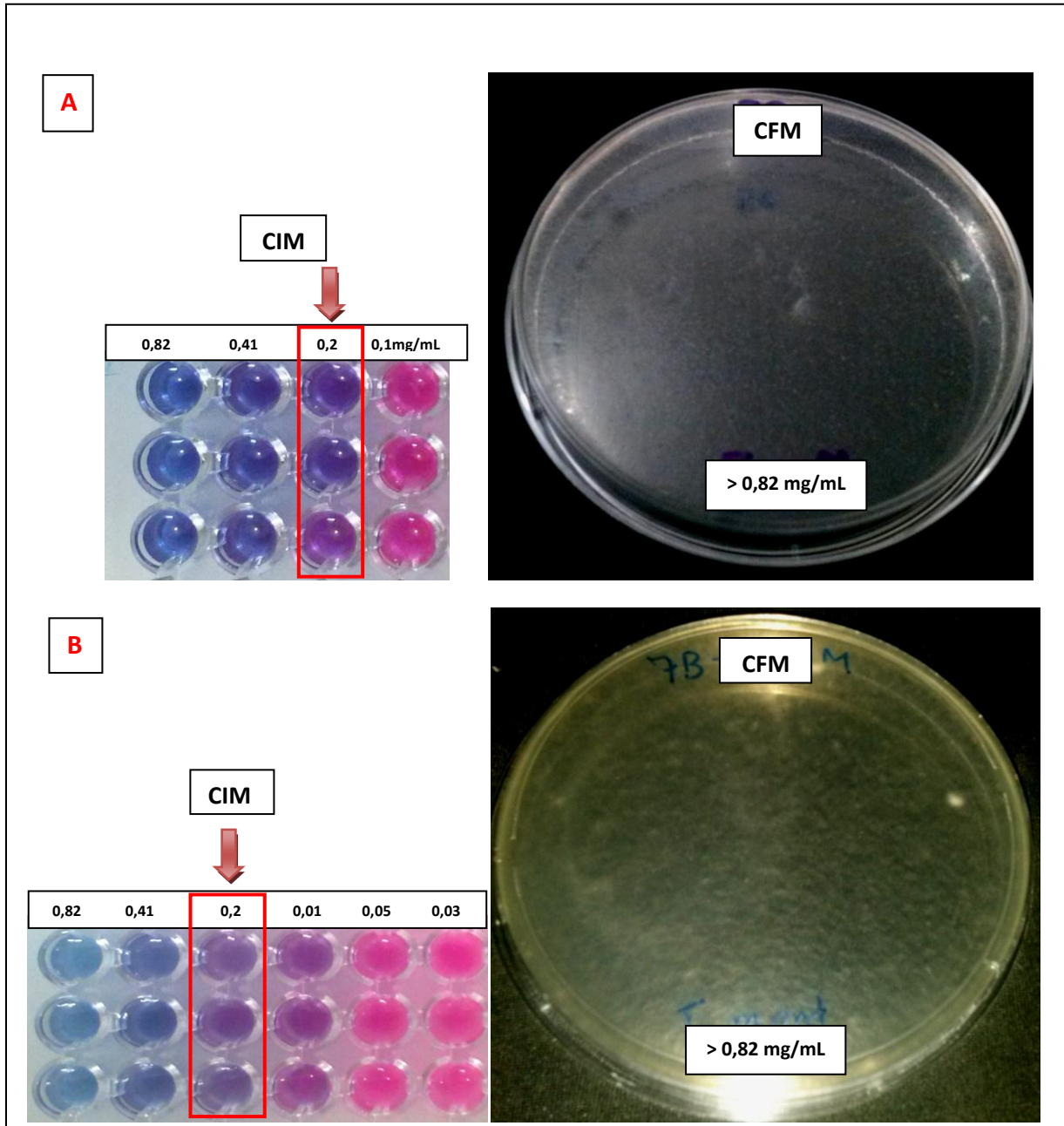


Figura 28: **(A)** Microdiluição seriada com a resazurina nas concentrações (0,82; 0,41; 0,2 e 0,1 mg/mL) para determinação da CIM e ao lado técnica do *pour plate* para a determinação da CFM do composto 7B frente ao isolado clínico da espécie *T. mentagrophytes*; **(B)** Microdiluição seriada com a resazurina nas concentrações (0,82; 0,41; 0,2 e 0,1; 0,05 e 0,03 mg/mL) para determinação da CIM e ao lado técnica do *pour plate* para a determinação da CFM do composto 7B frente à cepa ATCC da espécie *T. mentagrophytes*.

Para o composto **7C** frente ao isolado clínico de *T. mentagrophytes* a CIM também ficou em 0,22 mg/mL porém a CFM acima de 0,9 mg/mL. Já para a cepa ATCC a CIM ficou em 0,45 mg/mL e a CFM também maior que 0,9 mg/mL. Figura 29.

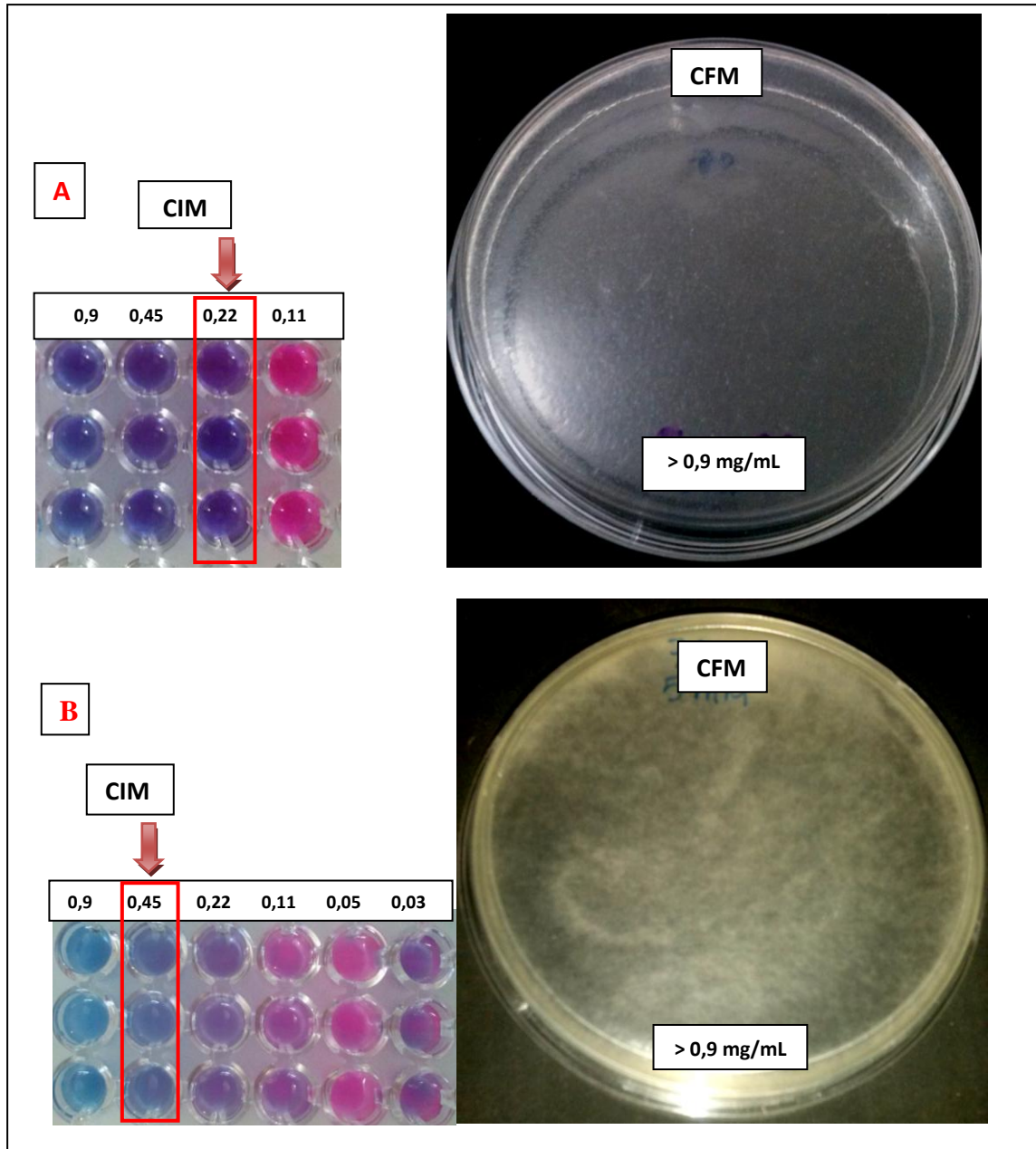


Figura 29: **(A)** Microdiluição seriada com a resazurina nas concentrações (0,9; 0,45; 0,22 e 0,11 mg/mL) para determinação da CIM e ao lado técnica do *pour plate* para a determinação da CFM do composto 7C frente ao isolado clínico da espécie *T. mentagrophytes*; **(B)** Microdiluição seriada com a resazurina nas concentrações (0,9; 0,45; 0,22; 0,11; 0,05 e 0,03 mg/mL) para determinação da CIM e ao lado técnica do *pour plate* para determinação da CFM do composto 7C frente à cepa ATCC da espécie *T. mentagrophytes*.

Os dados da atividade antifúngica dos nitroestirenos estão resumidos na Tabela 02. O composto **7B** apresentou melhores resultados com menores valores de CIM para a cepa ATCC 40152 de *A. fumigatus*, porém para o composto **7A** não foi possível determinar valores exatos da CFM. Já frente à espécie *T. mentagrophytes*, o composto **7C** foi o qual obteve o menor resultado da CIM, mostrando-se com melhor atividade antifúngica.

Tabela 02 - Valores de CIM e CFM de cada nitroestireno frente ao isolado clínico e da cepa padrão de *A. fumigatus* e *T. mentagrophytes*.

Compostos	Fungos (mg mL ⁻¹)							
	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 40152		<i>Aspergillus fumigatus</i> Isolado Clínico		<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 40004		<i>Trichophyton mentagrophytes</i> Isolado Clínico	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
Nitro – 7A	0,09	> 0,75	1,49	>1,49	0,37	> 0,75	0,37	> 0,75
Nitro – 7B	0,05	0,1	0,2	0,41	0,41	> 0,82	0,41	> 0,82
Nitro – 7C	0,22	0,45	0,22	> 0,45	0,45	> 0,9	0,22	> 0,9

5.3 Testes de sinergismo com Anfotericina B

Para os testes de sinergismo foi investigado a CIM da AB a partir da concentração de 0,312 mg, porém na microplaca não foi possível visualizar a mudança de coloração pela resazurina nitidamente, Figura 30 (A), então foi realizado o ensaio de *pour plate* onde se observou que a CIM ficou em 0,039 mg e ao lado a CFM em 0,078 mg, pois nesta última concentração inibiu completamente o crescimento do fungo, Figura 30 (B).

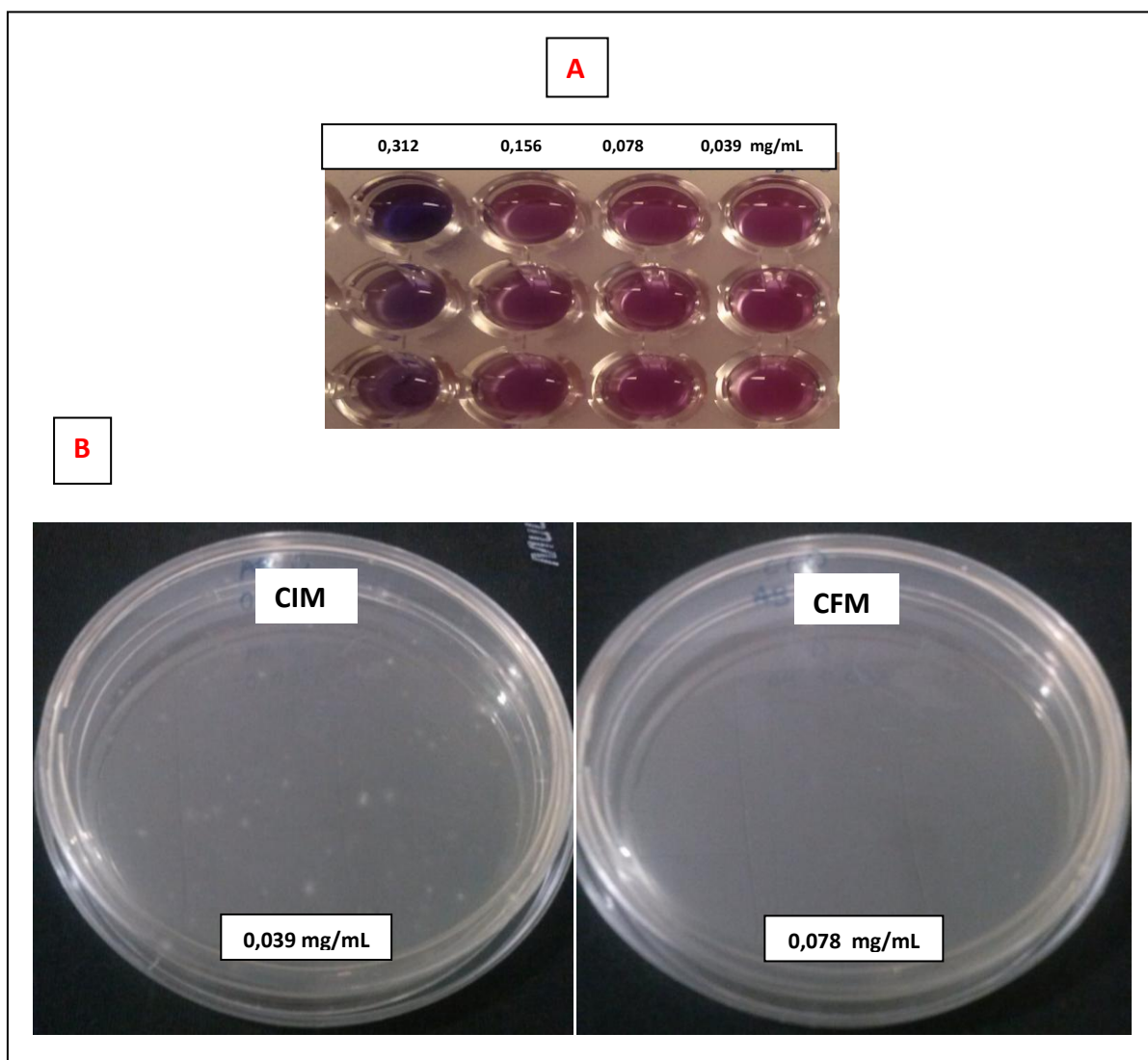


Figura 30: **(A)** Microdiluição seriada pela resazurina da AB nas concentrações (0,312; 0,156; 0,078 e 0,039 mg) frente à cepa ATCC 40152 de *A. fumigatus*; **(B)** Placas para demonstrar a CIM e CFM, respectivamente da AB frente à cepa ATCC 40152 de *A. fumigatus*.

Para o teste de sinergismo entre o **7A** e a AB, foi combinado a CIM do **7A** (0,19 mg/mL) até a quarta diluição e a AB a partir de 0,312 mg/mL até a quarta diluição. O ensaio na microplaca com presença da resazurina mostrou que a CIM ficou em 0,19 mg/mL (**7A**) + 0,312 mg/mL (AB) e na placa com ASD houve pouco crescimento, Figura 31.

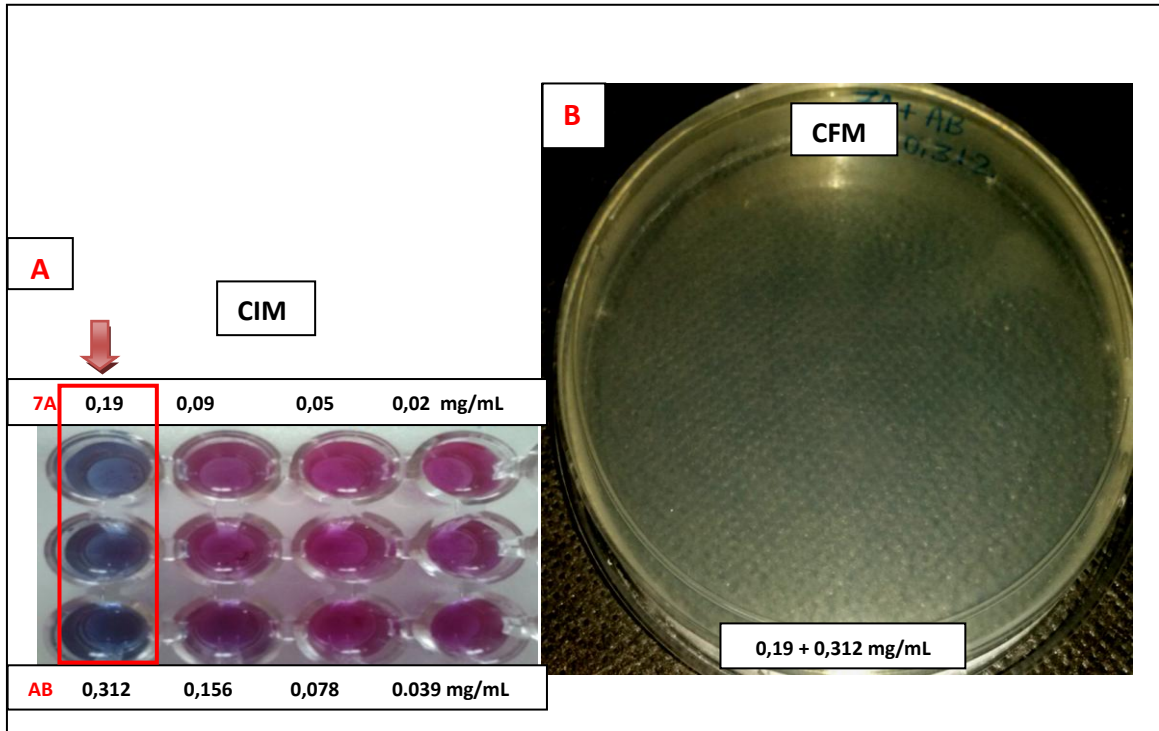


Figura 31: **(A)** Microdiluição seriada pela resazurina da combinação do composto 7A e Anfotericina B frente à cepa ATCC 40152 de *A. fumigatus*, para determinação da CIM. **(B)** Técnica do *pour plate* para determinação da CFM.

Para o composto **7B** foi utilizado à concentração a partir da CIM do nitroderivado isolado 0,1 mg/mL mais 0,312 mg/mL de AB até a quarta diluição de ambos, Figura 32.

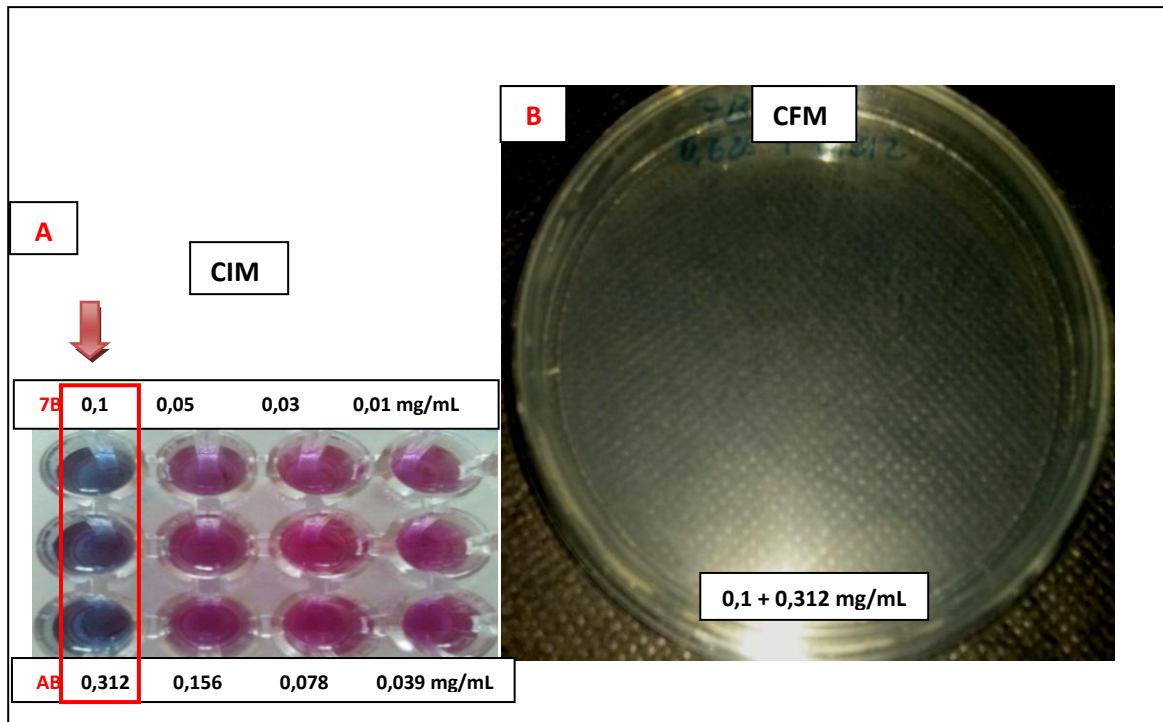


Figura 32: **(A)** Microdiluição seriada pela resazurina da combinação do composto 7B e Anfotericina B frente à cepa ATCC 40152 de *A. fumigatus*, para determinação da CIM. **(B)** Técnica do *pour plate* para determinação da CFM

Para o composto **7C** foi utilizado a CIM do nitroestireno isolado em 0,22 mg/mL mais 0,312 mg/mL de AB até a quarta diluição de ambos, Figura 33.

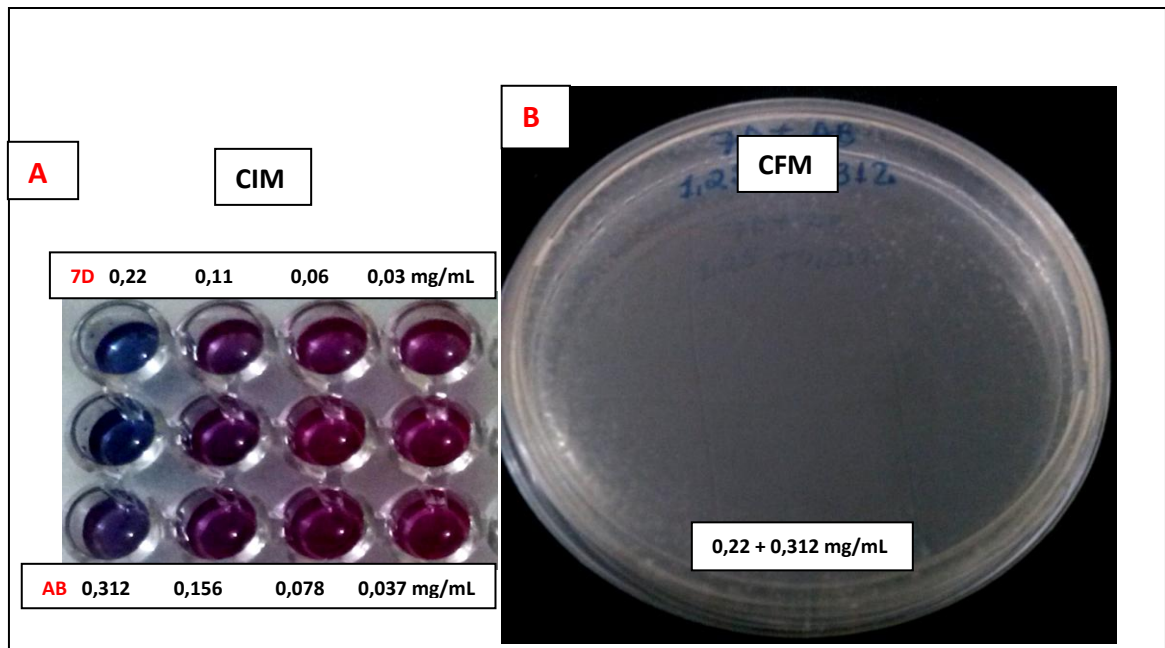


Figura 33: **(A)** Microdiluição seriada pela resazurina da combinação do composto 7D e Anfotericina B frente à cepa ATCC 40152 de *A. fumigatus*, para determinação da CIM. **(B)** Técnica do *pour plate* para determinação da CFM.

Segundo o cálculo do FIC, nenhuma concentração testada das combinações entre os nitroestirenos e AB frente à espécie de *A. fumigatus* cepa ATCC 40152, se mostrou sinérgica ou aditiva.

A Tabela 03 mostra resumidamente a relação das combinações entre os nitroderivados (7A, 7B e 7C) e a AB, e seus valores do FICI.

Tabela 03: Relação das combinações entre os nitroestirenos e anfotericina B frente à cepa ATCC de *A. fumigatus*.

Agentes	CIM (mg/mL)	FICI _{7A}	FICI _{7B}	FICI _{7C}
NTC				
7A	0,19	5 Antagonista		
7B	0,1		2,5 Indiferente	
7C	0,22			5 Antagonista
AB	0,078			
NTC_{7A} + AB	(0,19 + 0,312)			
NTC_{7B} + AB	(0,05 + 0,156)			
NTC_{7C} + AB	(0,22 + 0,312)			

6 DISCUSSÃO

A modificação molecular é considerada a técnica mais promissora para a introdução de novos fármacos na terapêutica, pois tal processo permite a alteração de ligações, elementos ou grupos químicos, a fim de anular os efeitos indesejáveis dos fármacos utilizados, ou introduzir outro que potencializem, ou intensifiquem a atividade biológica, uma vez conhecido o mecanismo de ação do fármaco (VERMUTH, 2008), assim o interesse da química medicinal em determinadas classes de nitrocompostos, está na razão desses compostos possuírem características estruturais que facilita a interação com moléculas biológicas, como proteínas e DNA (SILVA et al, 2002)

A síntese dos análogos do 1-nitro-2-feniletano, em nível de bancada, partiu de uma proposta inovadora do grupo de Química Farmacêutica da UFPA, que a partir do óleo essencial da *Aniba canelilla*, foi isolado o princípio odorífero – nitrofeniletano, do qual foi possível se obter os análogos: 1-nitro-2-feniletano (7A); 4'-metil-1-nitro-2-feniletano (7B) e 4'-metoxi-1-nitro-2-feniletano (7C), sendo que o rendimento foi satisfatório, visto que esses compostos são comercializados a um preço alto os quais apenas um grande laboratório os produzem.

No entanto, é extremamente importante a elucidação da estrutura molecular na associação do mecanismo de ação de um grupo de fármacos análogos, a fim de identificar e até quantificar as propriedades físico-químicas que influenciam a ação do fármaco no receptor, como por exemplo, tamanho de subunidades, orientação de cargas, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (BARREIRO, 2001). Deste modo foram gerados dados espectrais de infravermelho e RMN ^1H para observar os aspectos estruturais que caracterizam a presença dos compostos estudados. Nos espectros de infravermelho de um modo geral, dentre as bandas presentes é observada uma a banda fraca em $1631,78\text{ cm}^{-1}$, característica de ligação dupla na molécula, bandas em torno de $960,00\text{ cm}^{-1}$ e $970,00\text{ cm}^{-1}$ que indicam a posição *trans* do nitro e o anel aromático em relação à cadeia alifática. A absorção intensa entre $1300,00\text{ cm}^{-1}$ e $1496,76\text{ cm}^{-1}$ que confirma a presença do grupo nitro, outra banda importante observada em aproximadamente $800,00\text{ cm}^{-1}$, que confirma a presença de um grupo *para* substituído nos nitroestirenos estudados.

Para a Ressonância Magnética Nuclear do ^1H os espectros foram bastante esclarecedores e revelou à identificação estrutural dos nitroestirenos analisados, sinais característicos como o duplete em 8,00 ppm e 7,59 ppm indicam $J = 13,8$ Hz mostrando que estão *trans* relacionadas e sinais em torno de 7,00 ppm a 8,00 ppm são atribuídos aos hidrogênios aromáticos. Outro sinal importante foi do singleto em 2,41 ppm, atribuído a metila ligada a anel aromático, já o sinal em 3,86 ppm foi atribuído aos hidrogênios da metoxila.

Nesse trabalho também foi avaliado o efeito antifúngico dos três referidos nitroestirenos: 1-nitro-2-feniletano (7A) (Sigma®); 4'-metil-1-nitro-2-feniletano (7B) e 4'-metoxi-1-nitro-2-feniletano (7C) frente às cepas ATCC 40152 e um isolado clínico de *A. fumigatus* e as cepas ATCC 40004 e um isolado clínico de *T. mentagrophytes*, além da combinação entre os nitroestirenos e a AB frente à cepa ATCC 40152 de *A. fumigatus*.

Os testes apontam que o nitroestireno com melhor atividade antifúngica frente à espécie *A. fumigatus* foi o 7B, pois a CIM tanto do isolado clínico quanto da cepa padrão foi menor do que os nitroestirenos 7A e 7C, testados sob as mesmas condições. Já para a espécie *T. mentagrophytes*, o nitroestireno com melhor atividade foi o 7C, pois a CIM da cepa ATCC 40004 foi menor que dos outros compostos também sob as mesmas condições.

A associação entre os nitroestirenos e a AB, porém não resultou em sinergismo em nenhuma combinação, uma vez que, a associação de 7A, 7B e 7C com AB se apresenta antagonista para 7A e 7C, e indiferente para 7B segundo o cálculo do FICI. A tentativa de combinar um fármaco já utilizado na clínica – AB com os análogos do nitrofeniletano foi uma proposta preliminar de associar compostos com atividade antifúngica que possam diminuir a CIM da AB e assim sua toxicidade. Além disso, pode possibilitar desvendar diferentes mecanismos de ação dos análogos avaliados nesse estudo, visto que estes compostos demonstraram boa atividade antifúngica de forma isolada. Porém, como não houve sinergismo ou mesmo a combinação foi aditiva, pode haver incompatibilidade de mecanismos, já que a AB é fungicida e os referidos análogos são prováveis fungistáticos.

Analisando o composto e suas características estruturais, o 4'-Metil-1-nitro-2-feniletano (7B) é o composto que possui melhor atividade contra espécie de *A.*

fumigatus, pois a presença da metila *para*-substituída é sugerida como diferencial para que ocorra tal atividade. Com relação a características químicas dos compostos testados, 7B é a molécula mais lipofílica entre os derivados, parâmetro importante a ser considerado uma vez que este composto apresentou atividade frente a cepas de bactérias gram-negativas (SANTOS, 2012). Já o composto 4'-metoxi-1-nitro-2-feniletano (7C) é o qual apresenta melhor atividade frente à espécie *T. mentagrophytes*, que por sua vez, possui em sua estrutura a metoxila *para*-substituída como diferencial dos outros compostos, estes dois mostrados na Figura 34.

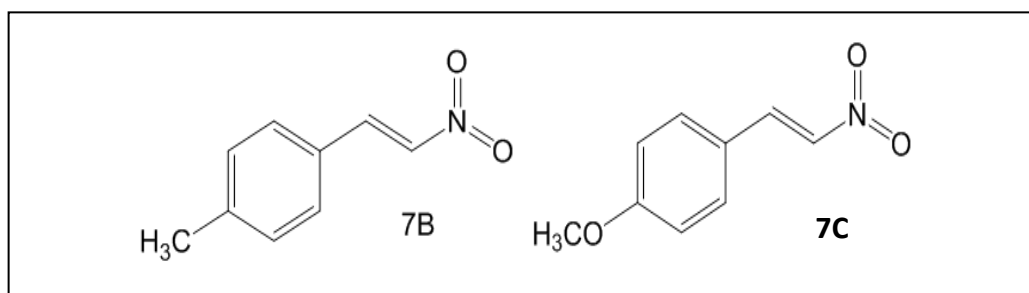


Figura 34: Estrutura dos nitroestirenos com melhor atividade antifúngica

Observou-se em outros trabalhos, que grupos substituintes eletrofílicos de pequeno volume na posição *para*-fenílica favorecem a atividade antimicrobiana, tanto para cepas bacterianas como para parasitas (RESENDE, 2002; MASUNARI, 2005; REISDOFER, 2007). Portanto, modificações estruturais na molécula de fármacos alteram sua configuração molecular, e conseqüentemente, suas propriedades físico-químicas, pois essas mudanças promovem alterações tanto na interação fármaco-receptor como em aspectos farmacocinéticos que juntos, podem provocar grandes alterações no perfil terapêutico (HANSCH, 1995; PATRICK, 2001).

Estudos anteriores realizados com o nitrofeniletano, precursor dos nitroestirenos, demonstraram que este se comporta como um eletrófilo com boa capacidade de acepção de elétrons e que o potencial de redução do grupo nitro está provavelmente relacionado com a atividade biológica de nitrocompostos (PAULA et al, 2009). Estas conclusões estão de acordo com de outras pesquisas, que mostram resultados quanto à densidade de spin e indicam a transferência de elétrons por doação ou acepção, onde o cátion radical livre é estabilizado na porção fenílica, enquanto que o anion radical livre na porção nitro se caracterizada pelo caráter

elétron-doador eceptor destes grupos (VALE et al, 2011). Sugere-se que a modificação realizada nos nitroestirenos 7B e 7C influenciou na conjugação entre os grupos fenila e nitro, favorecendo sua atividade biológica e a toxicidade microbiana.

Outro fator a ser considerado na correlação entre estrutura e atividade é a reatividade da molécula, devido suas propriedades eletrônicas a interação entre fármaco e receptor não se realiza somente pelo acoplamento hidrofóbico, mas também por meio de ligação polar que requer uma determinada densidade eletrônica em certos átomos, além dos parâmetros citados o tamanho dos substituintes é importante nas interações fármaco-receptor, pois é frequentemente observada a afinidade por um tipo de receptor dependente do volume do substituinte (CLARAMUNT et al, 1993).

Sabendo que o mecanismo de ação dos nitrocompostos, de um modo em geral, ocorre com a redução do grupo nitro *in vivo*, etapa imprescindível para a atividade biológica na maioria destes compostos, onde os radicais livres formados no processo de biorredução têm vida curta, entretanto supõe-se que esta seja suficientemente longa para migrar do local de produção para os vários alvos biológicos ou mesmo que sejam formados junto ao local de ação, podendo reagir com DNA, enzimas ou membranas biológicas (PAULA et al, 2009).

Atualmente, vários estudos avaliaram o efeito da combinação de AB com Fluconazol e AB com Echinocandinas sobre *Candida* spp, no entanto, estas combinações necessitam ser devidamente testadas e validadas, uma vez que alguns dos resultados apresentados são contraditórios (CHAMILOS e KONTOYIANNIS, 2006; JONES et al, 2010; KIRAZ et al, 2009; NISHI et al, 2009; RODRIGUEZ et al, 2007; SERENA et al, 2008). A única combinação de antifúngicos usados frequentemente na clínica que mostrou efeito sinérgico foi entre AB e 5-Flucitosina, relativamente à *Cryptococcus*, sendo frequentemente utilizada no tratamento de meningite criptocócica (MUKHERJEE et al, 2005). As combinações testadas entre AB e os análogos de nitroestirenos não demonstraram resultado satisfatório neste trabalho, uma vez que estas combinações se mostraram antagonista e indiferente diante das concentrações testadas.

Apesar de existirem métodos padronizados para avaliação da suscetibilidade aos antifúngicos *in vitro*, a existência de métodos para avaliação da atividade de antifúngicos associados é escassa (LEWIS et al, 2002). O método do *checkerboard*, apesar de todas as dificuldades inerentes a sua prática, continua a ser o método

mais utilizado para avaliação de associações entre antifúngicos. Existem alguns estudos que avaliam ainda a correlação entre este método e os métodos *time-kill* e *Etest* (Kiraz et al, 2009). No entanto, todos estes métodos requerem um tempo mínimo de resposta que ultrapassa às 24 horas (LEWIS et al, 2002).

O tratamento das infecções fúngicas invasivas assim como as dermatofitoses representam ainda um verdadeiro desafio clínico, pois a emergência da resistência aos antifúngicos disponíveis em determinadas espécies antes consideradas não patogênicas, colocam seriamente a terapêutica empírica em alerta e torna necessária a avaliação da suscetibilidade que nem sempre é efetuada nos laboratórios de rotina. Assim a associação entre antifúngicos é por vezes utilizada como terapêutica de salvamento, mesmo sem a existência de suporte científico válido (CASALINUOVO et al, 2004; PERLIN, 2007).

Estudos anteriores relatam a ação de outros derivados nitroestirenos que apresentaram atividade antimicrobiana e antifúngica contra cepas de bactéria gram-negativas e gram-positivas (LIMA, 2011). Evans et al. (1956) usaram injeções de p-metoxi- β -metil-3-nitroestireno em camundongos, contra infecção por *Criptococcus neoformans* e *Candida albicans*, porém não obtiveram sucesso contra estes microrganismos o que confirma observações de resultados *in vitro* obtidos anteriormente, isto porém, não exclui o uso dos nitroestirenos para terapia de candidíase e em aplicação tópica, fato observado no mesmo estudo.

Analisando quimicamente a estrutura do nitrofeniletano verifica-se uma cadeia lateral formada por carbonos sp^2 , que consiste em uma ligação π e uma σ com sobreposição dos orbitais, diminuindo a distância entre as ligações, assim o sistema de deslocalização de elétrons e grupo nitro fortemente retirador de elétrons atuam sobre a cadeia lateral composta de carbonos sp^2 e a fenila facilitando o fenômeno de ressonância contribuindo para a estabilidade desse composto (KOROLKOVAS, 1988).

Quanto às vias metabólicas, verificam-se rotas prováveis que demonstram a formação de nitro-radicais e espécies reativas formadas a partir da atuação de enzimas presentes em meio aeróbico e anaeróbico. Estudos correlacionam o potencial de redução de nitrocompostos com atividade citotóxica e mutagênica em células procariotas e eucariotas, concluindo que para microrganismos anaeróbicos facultativos e aeróbicos, a atividade antimicrobiana aumenta com a facilidade de redução do composto (KAPPUS, 1986; MÜLLER, 1986).

Outro aspecto importante sobre os nitrocompostos que deve ser observado é que compostos nitro-heterocíclicos, como os análogos do nitrofeniletano, são mais danosos aos microrganismos, e que células mais evoluídas possuem mecanismos bioquímicos mais eficientes para desativar a ação de moléculas altamente reativas, como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio oriundas da redução de nitrocompostos, resultando, portanto, na seletividade deste composto pela ação antimicrobiana (GOODMAN, 2000; RANG, 2001). Deste modo, observa-se que o grupo nitro presente nestes compostos é chamado parasitóforo, por ser indispensável à ação antiparasitária, principalmente quando ligados a anéis furânico, tiofênico e imidazólico (KOROLKOVAS e BURKHALTER, 1988).

No caso da validação dos compostos sintetizados, quando expostos em ponto de fusão, estes ficaram em intervalos próximos, porém não coincidentes aos relatados na caracterização da fabricante Sigma®, isto revela uma pequena percentagem de impurezas, ou água absorvida pela umidade do ar nos nitroestirenos sintetizados. Para o composto 1-nitro-2-feniletano (7A), não se obteve a purificação, uma vez que não formou cristais, assim o intervalo de fusão ficou acima do intervalo de referência, o que indica alto teor de impurezas ou agregados junto ao composto, com isso foi usado o β -nitrostyrenes SIGMA® para os testes com a cepa ATCC 40152 do *A. fumigatus*, isolado clínico e cepa ATCC 40004 do *T. mentagrophytes*, que correspondeu o composto 7A nos testes frente aos microrganismos citados.

Com relação às propriedades citotóxicas do β -nitroestirenos, foi relatado há algum tempo que estes compostos induzem efeitos antiproliferativo e pró-apoptóse em várias linhagens de células cancerosas, pois o insaturado vínculo nitrolefínico de β -nitroestirenos está sendo reconhecido como um fragmento essencial para sua bioatividade, pois este pode interagir com moléculas de cisteína proteína sulfidrilos através do mecanismo de adição de *Michael*, onde a reatividade de β -nitroestirenos depende da posição do grupo substituinte no anel aromático (HSIEH et al, 2010). Santos (2012), realizou testes de citotoxicidade para os nitroestirenos (7A, 7B e 7C), por meio do ensaio colorimétrico do MTT que consiste em medir a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. Neste ensaio, os resultados para o composto 7A demonstraram efeito citotóxico concentração-dependente. Nas diferentes concentrações estudadas (0,9 – 0,75 mg/mL) reduziu a viabilidade das

células em cultura no intervalo de 0,37 – 0,75 mg/mL, enquanto que no intervalo de 0,09 – 0,19 mg/mL as células permaneceram viáveis.

Quanto aos resultados para o composto 7C, foi o único derivado que não induziu citotoxicidade, mesmo nas maiores concentrações alcançando 100% de viabilidade celular quando comparado ao controle. É o composto que apresenta as melhores características de acidez e solubilidade no meio de cultura o qual foi testado, portanto fatores que justificam não exibir toxicidade em células eucarióticas. Os resultados quanto à determinação de citotoxicidade para o composto 7B demonstraram que nas maiores concentrações do ensaio 0,41 – 0,82 mg/mL este derivado não interferiu significativamente na viabilidade celular. Entretanto no intervalo de 0,1 – 0,2 mg/mL apresentou citotoxicidade. O comportamento atípico do composto 7B esta relacionado, provavelmente à solubilidade e seu grau de difusão no meio. De modo que quando a concentração do composto diminui, a solubilidade no meio aumenta, portanto mais moléculas são transportadas pela membrana, produzindo maior toxicidade (SANTOS, 2012).

Ainda no estudo de Santos (2012), foi observada uma excelente atividade leishmanicida do composto 7C, onde este inibiu a forma promastigota do parasito em todas as concentrações testadas, inclusive na menor concentração que foi de 15,6 µg/mL. Deste modo, nosso grupo investigou a atividade biológica dos nitroestirenos: 1-nitro-2-feniletano (7A), 4'-metil-1-nitro-2-feniletano (7B) e 4'-metoxi-1-nitro-2-feniletano (7C) frente a diferentes microrganismos e em todos os ensaios houve atividade biológica em maior ou menor intensidade, o que reforça a importância dessa classe de nitrocompostos.

De um modo geral, estudos tem reportado uma boa correlação entre resistência clínica e a obtenção de valores elevados de CIM (CAMERON et al, 1993), pois apesar das diferenças entre CIM e CFM dos três nitroestirenos frente aos microrganismos utilizados nesta pesquisa, os resultados encontrados confirmaram que todos apresentaram certa atividade antifúngica, o que torna compostos como estes com significativa importância clínica e como possíveis candidatos a novos antibióticos.

7 CONCLUSÃO

- Os dados espectrais de IV e RMN ^1H confirmaram grupos funcionais característicos presentes nos nitroestirenos estudados;
- Todos os nitroestirenos testados apresentaram atividade antifúngica contra as espécies ATCC e isolado clínico de *A. fumigatus*, sendo o composto 4'-metil-1-nitro-2-feniletano (**7B**) o que apresentou melhor eficácia *in vitro*;
- Todos os nitroestirenos testados apresentaram atividade antifúngica contra as espécies ATCC e isolado clínico de *T. mentagrophytes*, sendo o composto 4'-metoxi-1-nitro-2-feniletano (**7C**) o que apresentou melhor eficácia *in vitro*;
- Não houve sinergismo entre os nitroestirenos 1-nitro-2-feniletano (**7A**); 4'-metil-1-nitro-2-feniletano (**7B**) e 4'-metoxi-1-nitro-2-feniletano (**7C**) com o antifúngico AB frente à espécie ATCC 40152 de *A. fumigatus*.

Diante dos dados apresentados, observou-se que os nitroestirenos *para*-substituídos possuem melhor atividade frente à espécie do isolado clínico e cepas padrão de *A. fumigatus* e *T. mentagrophytes*, logo os nitroestirenos **7B** e **7C** apresentaram melhor atividade antifúngica.

Porém estudos anteriores de citotoxicidade mostraram que o nitroestireno **7B** se mostrou citotóxico nas menores concentrações e **7C** não se mostrou citotóxico em nenhuma concentração. Deste modo estudos mais detalhados de concentração-dependente são necessários para que confirmem concentrações eficazes sem causar toxicidade em animais superiores.

8 REFERÊNCIAS

- ADMANS, G. E.; STRATFORD, I. J. Hypoxia-mediated nitro-heterocyclic drugs in the radio and chemotherapy of cancer. **Biochemical Pharmacology**, v 35, n. 1, p 71-76, 1986.
- ALMEIDA, L. V. **Síntese e determinação da atividade antimicrobiana de 2-[5-nitro-tiofen-2-il]-3-acetil-5-[4-fenil-substituído]-2,3-diidro-1,3,4 oxadiazolinas frente à cepa ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), 2009. Universidade de São Paulo – USP.
- AMEEN, M. Epidemiology of superficial fungal infections. **Clinical in Dermatology**, 28, 197–201, 2010.
- ARAUJO, R.; RODRIGUES, A. G. A.; VAZ, C. P. Susceptibility pattern among pathogenic species of *Aspergillus* to physical and chemical treatments. **Medical Mycology**, August 2006, 44, 439-443.
- ALP, S.; ARIKAN, S. Investigation of extracellular elastase, acid proteinase and phospholipase activities as putative virulence factors in clinical isolates of *Aspergillus* species. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 48, n. 5, p. 331-337, 2008.
- ARIKAN, S.; LOZANO-CHIU, M.; PAETZNICK, V.; NANGIA, S.; REX, J. H. Microdilution Susceptibility Testing of Amphotericin B, Itraconazole, and Voriconazole against Clinical Isolates of *Aspergillus* and *Fusarium* Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3946-3951, 1999.
- ARIKAN, S.; LOZANO-CHIU, M.; PAETZNICK, V.; REZ J.H. In Vitro Synergy of Caspofungin and Amphotericin B against *Aspergillus* and *Fusarium* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 46, p. 245-247, 2002.
- ASANO, M.; KANO, R.; MAKIMURA, K.; HASEGAWA, A.; KAMATA, H. Molecular typing and in-vitro activity of azoles against clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* and *A. niger* in Japan. **Journal Infect Chemother** 17:483–486, 2011.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química medicinal. In: **As bases moleculares da ação dos Fármacos**; Artmed, Editora: Porto Alegre, 2001.
- BERDICHEVSKI, R. H.; **Nefrotoxicidade associada à Anfotericina B em pacientes de baixo risco**. f 5. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.
- BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 159 -172, Jul.- Dez./2004.
- BLANCO, J. L.; GUEDEJA-MARRÓN, J.; CABALLERO, J.; GARCÍA, M. E. Aspergilosis: mecanismos de patogenicidad implicados y aproximación al diagnóstico de laboratorio. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.15, p.10-15, 1998.

BOW, E. J. Infection Risk and Cancer Chemotherapy: The Impact of the chemotherapy regimen in patients with lymphoma and solid tissue malignancies. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. 41 (suppl D): 1-5, 1998.

CABAÑES, F. J. Dermatophytes in domestic animals. In: Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi. Ed. RKS Kushwaha & J Guarro. **Revista Iberoamericana de Micología**, Bilbao pp 104-108. 2000.

CHAMILOS, G.; LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. Lovastatin has significant activity against zygomycetes and interacts synergistically with voriconazole. **Antimicrobial Agents Chemother**. 50:96-103, 2006.

CALHEIROS, R.; MILHAZES, N.; BORGES, F.; MARQUEZA, M. P. M. β -Nitrostyrene derivatives – conformational study by combined Raman spectroscopy and abinitio MO calculations. **Journal of Molecular Structure**, v 692, p 91- 106, 2004.

CAMERON, M. L.; SCHELL, W. A.; BRUCH, S.; BARTLETT, J. A.; WASKIN, H. A.; PERFECT, J. R. Correlation of in vitro fluconazole resistance of *Candida* isolates in relation to therapy and symptoms of individuals seropositive for human immunodeficiency virus type 1. **Antimicrobioly Agents Chemother** 37, 2449-2453, 1993.

CASALINUOVO, I.A.; DI FRANCESCO, P.; GARACI, E. Fluconazole resistance in *Candida albicans*: a review of mechanisms. **European Review Mededical Pharmacological Science** 8, 69-77, 2004.

CASTILLO, C.; VALENCIA, I.; REYES, G.; HONG, E. Analisis de las propiedades anti-hipertensivas del acido-3-nitropropionico: um compuesto proveniente de plantas del genero *Astragalus* / Antihypertensive properties of 3-nitropropionic acid: a compound derived from the astragalus plant. **Archivos Instituto Cardiologia**. Mex, v. 63: p. 11-16, 1993.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistêmicos. Farmacodinamia y Farmacocinética. **Revista Iberoamericana Micología**. 23: 39-49, 2006.

CIENFUEGOS, F.; VAITSMAN, D. **Análise Instrumental**. Ed. Interciência. 423-425 p; 2000.

CLARAMUNT, R. M.; SANZ, D.; CATALÁN, J.; FABERO, F.; GARCIA, N. A.; FOCES –FOCES, C.; LLAMAS-SAIZ, A. L.; ELGUERO, J. **N-Aminoazoles. Part 2 Basicity and Protonation Site of N-Aminoazoles: an Experimental (pK, ^{13}C and ^{15}N NMR Spectroscopy and Crystallography) and Theoretical Study**. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions*, 1993.

Clinical Laboratory Standards Institute - CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; proposed standard, Second Edition. M38-A2. **Clinical Laboratory Standards Institute**, 2002, Wayne, USA.

Clinical Laboratory Standards Institute - CLSI (2008b) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.

CUENCA, E. M.; RODRIGUEZ, T. J. L. Should antifungal treatments are based upon results of antifungal susceptibility testing. **Revista Iberoamericana de Micologia**, 19 (3):133-8, 2002.

DECLERCK, P. J.; DE RANTER, C. J. *In vitro* Reductive activation of Nitroimidazoles. **Biochemical Pharmacology**, v 35, n. 1, p 59-61, 1986.

DEGREEF, H. Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection). **Mycopathologia**. 166:257-65, 2008.

D'ENFERT, C.; HUBE, B. Introduction. In **Candida. Comparative and functional genomics**. Eds, pp 1–5. Caister Academic Press, Norfolk, 2007.

DENNING, D. W. **Aspergillus species**. In *Principles and Practice of Infectious Disease* Edited by: Mandell G, Douglas J, Bennett D. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000:2675-2685.

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

DODD, M. C.; STILLMAN, W. B. The *in vitro* bacteriostatic action of some simple furam derivatives. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 82, n.1, p.11-18, 1944.

EDWARDS, D. I. Nitroimidazole drug – action and resistance mechanisms. I mechanism of action. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v 31, p 09 – 20, 1993.

ESPINEL-INGROFF, A.; BARTLETT, M.; BOWDEN, R.; CHIN, N. X.; COOPER, J. R.; FOTHERGILL, A.; MCGINNIS, M. R.; MENEZES, P.;

MESSER, S. A.; NELSON, P. W.; ODDS, F.C.; PASARELL, P.; J., PFALLER, M. A.; REX, L. H.; RINALDI, M. G.; SHANKLAND, G.S.; WALSH, T.J.; WEITZMAN, I. Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 139-143, 1997.

EVANS, E. E.; HAINES, R. F.; CURTIS, A. C.; BOCOBO, F. C.; BLOCK, W. D.; HARRELL, E. R. EVALUATION OF NITROSTYRENES AS ANTIFUNGAL AGENTS. **The Journal of Investigative Dermatology**. P. 43 – 48. 1956.

FILHO, M. A. S. **Análise in vitro da atividade antifúngica e de toxicidade da Anfotericina B pré-aquecida** (dissertação). Programa de pós-graduação em ciências da saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, RN, 2011.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de Anfotericina B. **Brazilian journal the Pharmaceutical Sciences**, Vol 42, n. 2; abril./jun. 2006.

FRIAS, D. F. R.; KOZUSNY-ANDREANI, D.I. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de extratos de plantas e óleo de eucalipto sobre *Trichophyton mentagrophytes*. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, Botucatu, v.11, n.2, p.216-220, 2009.

GALVÁN, B.; MARISCAL, F. Epidemiologia de la candidemia em UCI. **Revista Iberoamericana Micología**. 23:12-15, 2006.

GAO, Y.; ZHANG, C.; LU, C.; LIU, P.; LI, Y.; LI, H.; SUN, S. Synergistic effect of doxycycline and fluconazole against *Candida albicans* biofilms and the impact of calcium channel blockers. **FEMS Yeast Research**. 13, 453–462, 2013.

GOLD, N.; STOUT, H.A.; PAGANO, J.F.; DONOVICK, R. Amphotericin A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. I. *In vivo* studies. **Antibiotics annual**. v. 1, p. 579-586, 1956.

GOODMAN, A. G.; RALL, T. W.; NIES, A. S.; TAYLOR, P. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. Ed 11, McGraw-Hill, 2000.

GRECO, W. R., G. BRAVO, AND J. C. PARSONS. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. **Pharmacological Reviews**. v. 47, p. 331-385, 1995.

HANSCH, C.; LEO, A.; HOEKMAN, D. Exploring QSAR. Vol 1: Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology. Vol. 2: Hydrophobic, Electronic and Steric Constants. **American Chemical Society Publisher**, 1995.

HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C.; FISHER, B. D. **Microbiologia ilustrada**. São Paulo; Artmed; 2008.

HAY, R. J. Fungal infections. **Clinical Dermatology**, 24: 201–212, 2006.

HEYDER, C. D. T.; SILVA, D. A. K. Avaliação da atividade antifúngica do óleo volátil de *Cymbopogon citratus* sobre *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*. **Revista Saúde e Ambiente**; v. 5, n. 2, dez. 04.

HORROCKS, S. M.; JUNG, Y. S.; HUWE, J. K.; HARVEY, R. B.; RICKE, S. C.; CARSTEN, G. E.; CALLAWAY, T. R.; ANDERSON, R. C.; RAMLANCHAN, N.; NISBET, D. **Journal Food Science**, 2007, 72, M50.

HSIEH, P. W; CHANG, Y. T.; CHUANG, W. Y.; SHIH, H. C.; CHIANG, S. C.; WU, C. C. The synthesis and biologic evaluation of anti-platelet and cytotoxic b-nitrostyrenes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 18, 7621–7627, 2010.

JONES, R. N.; CASTANHEIRA, M.; PFALLER, M. A. Fixed-Ratio Combination Testing of in Echinocandin, Anidulafungin, and an Azole, Voriconazole, against 1,467 *Candida* Species Isolates. **Antimicrobial Agents Chemother** 54, 4041-4043, 2010.

JOHNSON, C. C. *In vitro* testing: correlation between bactericidal susceptibility, body fluids levels and effectiveness of antibacterial therapy. In: Lorian V, ed. **Antibiotics in Laboratory Medicine**, 1996: 813-34

KAPPUS, H.; Overview of Enzyme Systems Involved in Bio-Reduction of Drugs and in Redox Cygling. **Biochemical Pharmacology**, v 35, n. 1; pag. 01, 1986.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. Guanabara; Koogan. Rio de Janeiro 2001.

KIRAZ, A.; KARADAG, Y.; YORULMAZ, S. C.; MURADOGLU, M. Reversible photothermal tuning of a salty water microdroplet. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 11, 2597-2600, 2009.

KLICH, M. A. **Identification of Common *Aspergillus* Species**. Utrecht: Centra albureau voor Schimmelcultures, 2002. 116p.

KLINGSPOR, L.; JALAL, S. Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. **Clinical Microbiology and Infection**, Volume 12 Number 8, August 2006.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H.; **Química Farmacêutica**, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, v.65, p. 544-545, 1988.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H.; **Química Farmacêutica**, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2008.

KULETA, J. K.; KOZIK, M. R.; KOZIK, A. **Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus***; Vol. 56 N^o. 2/2009, 211–224.

KUVANDIK, G.; ÇETIN, M.; GENCTOY, G.; HOROZ, M.; DURU, M.; AKCALI, C. The prevalence, epidemiology and risk factors for onychomycosis in hemodialysis patients. **BMC Infectious Diseases**. 2007;7:102.

LACAZ, C. S.; SAMPAIO, S. A. P.; Tratamento da Blastomicose Sul- Americana com Anfotericina B. Resultados Preliminares. **Revista Paulista de Medicina**. v. 52, p. 443 – 450, junho, 1958.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINS-VACARI, E. M.; MELO, N. T. **Guia para identificação. Fungos Actinomicetos Algas de interesse médico**. São Paulo, Ed. Sarvier, 445 p., 1998.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**, 9^o ed. Sarvier, São Paulo – SP, 2002, p1104.

LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigates* and Aspergillosis. **Clinical Microbiology**, Rev. 12(2):310, 1999.

LATGÉ, J. P. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. **Trends in Microbiology**, v.9, n.8, Aug, 2001.

LEÃO, R. C.; MARCHIORI, E.; RODRIGUES, R.; JÚNIOR, A. S. S.; GASPARETTO, E. L.; ESCUISSATO, D. L. Tomografia computadorizada na avaliação da aspergilose pulmonar angioinvasiva em pacientes com leucemia aguda. **Radiologia Brasileira** 2006; 39(5):327–33.

LEWIS, R. E.; WIEDERHOLD, N. P.; CHI, J.; HAN, X. Y.; KOMANDURI, K. V.; KONTOYIANNIS, D. P.; PRINCE, R. A. Detection of Gliotoxin in Experimental and Human Aspergillosis. **Infection and Immunity**, v.73, n.1, p.635-637, 2005.

LEWIS, R.E., DIEKEMA, D.J., MESSER, S.A., PFALLER, M.A., AND KLEPSE, M.E. Comparison of Etest, chequerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. **Journal Antimicrobial Chemother** 49, 345-351, 2002.

LIMA, A. B. **Avaliação toxicológica, antinociceptiva e antiinflamatória do 1-nitro-2-feniletano, principal constituinte do óleo essencial de *Aniba canelilla***. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Para, Belém. 2008.

LOPES, L. M. X.; NASCIMENTO, I. R.; SILVA, T. **Phytochemistry of the *Aristolochiaceae* family**. In: Research Advances in Phytochemistry, ed.Kerala: Global Research Network, v.2, p. 19-108, 2001.

MAGAGNIN, C. M; STOPIGLIA, C. D. O; VIEIRA, F. J.; HEIDRICH, D.; MACHADO, M.; VETORATTO, G.; LAMB, F. M.; SCROFERNEKER, M. L.; Perfil de suscetibilidade a antifúngicos de dermatófitos isolados de pacientes com insuficiência renal crônica. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, 2011; 86 (4):694-701.

MARTINEZ, R.; Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal brasileiro de pneumologia**; 32(5):449-60, 2006.

MASUNARI, A. **Planejamento, desenvolvimento e estudo de QSAR-2D e QSAR-3D de derivados 5-nitro-tiofilidênicos com atividade frente à *Staphylococcus aureus* multi-resistentes (CBE-Clone Endêmico Brasileiro)**, Tese de Doutorado, Conjunto das Químicas – USP, 2005.

MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 146,p 601-620, 2007.

MEDEIROS, F.; CREPALDI, N.; TOGNOLI, L. **Dermatófitos** - revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária** – ISSN: 1679-7353. Ano VII – Número 12 – Janeiro de 2009 – Periódico Semestral.

MELLADO, E.; CUENCA, E, M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. Importância clínica de los mecanismos de resistência de los hongos filamentosos a los antifúngicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 20(10): 523-530, 2002.

MENDONÇA, D. U.; MAIA, J, G, S.; ARAÚJO, F. C.; TEIXEIRA, M. A. F.; LOPES, M. F. B.; SENA, W. M.; FILHO, A. H. S. M. Aspergilose pulmonar em paciente imunocompetente e previamente sadio. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V, 44 (1):124-126, jan-fev, 2011.

MONTEIRO, M.C; DE LA CRUZ, M; CANTIZANI, J; MORENO, C; TORMO, J.R; MELLADO, E; DE LUCAS, J.R; ASENSIO, F; VALIANTE, V; BRAKHAGE, A.A; LATGÉ, J.P; GENILLOUD, O; VICENTE, F. A new approach to drug discovery: high-throughput screening of microbial natural extracts against *Aspergillus fumigatus* using resazurin. **Journal Biomolecular Screening**. Apr; 17(4):542, 2012.

MORENO, S. J. N.; DOCAMPO, R. Mechanism of toxicity of nitro compounds used in the chemotherapy of Trichomoniasis. **Environmental Health Perspectives**, v. 64, p. 199-208, 1985.

MORENO, S. N. J.; The reductive metabolism of nifurtimox and benznidazole in *Crithidia fasciculata* is similar to that in *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Physiological**. V 81, p. 321 – 325, 1988.

MUKHERJEE, P. K.; SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; GHANNOUM, M. A. Combination treatment of invasive fungal infections. **Clinical Microbiology Review** 18, 163-194, 2005.

MÜLLER, M. Reductive Activation of Nitroimidazoles in Anaerobic Microorganisms. **Biochemical Pharmacology**, v. 35, n. 1, p. 37-45, 1986.

NAGHENTINI, C. C. **Caracterização físico-química e atividade antifúngica dos óleos essenciais da cúrcuma**. (Dissertação). Mestrado em Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

NASCENTE, L. C.; ROMERO, L. A. S.; THEODORO, P. N. E. T.; ESPINDOLA, L. S. Síntese e Avaliação Biológica de Nitroderivados Candidatos a Agentes Antifúngicos. **34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2007.

NASCENTE, L. C. **Síntese e Avaliação Citotóxica de Nitroderivados Planejados a partir do safrol**. (Dissertação). Mestrado em Química. Universidade de Brasília, 2009.

National Committee For Clinical Laboratory Standards - NCCLS. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi**. Approved Standard. NCCLS M38-A. 22(16), 2002.

NETO, A. F. O.; PAIS, L. P. F.; ALVES, S. T. A. Utilização da Anfotericina B no tratamento da Paracoccidioidomicose. **Revista Universitária de Alfenas**, 4:71-74, 1998.

NISHI, I.; SUNADA, A.; TOYOKAWA, M.; ASARI, S.; AND IWATANI, Y. In vitro antifungal combination effects of micafungin with fluconazole, voriconazole, amphotericin B, and flucytosine against clinical isolates of *Candida* species. **Journal Infect Chemother** 15, 1-5, 2009.

ODDS, F.C.; ALISTAIR, J.P.; GOW, B.; GOW, A.R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**. 11 (6), 272-279, 2003.

O'GORMAN, C. M.; FULLER, H. T.; DYER, P. S. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **Nature**. v.475, p. 471-475. 2009.

OLIVEIRA, E.; GIAVANA-BIANCHI, P.; FONSECA, L. A. M.; FRANÇA, A. T.; KALIL, J. Allergic bronchopulmonary aspergillosis diagnosis remains a challenge. **Respiratory Medicine**, v. 101, p. 2352–2357, 2007.

OLIVEIRA, T. R. **Caracterização estrutural de agregados formados pelo antifúngico anfotericina B e lipídios catiônicos: uma possível formulação farmacológica**. Dissertação (Mestrado em Ciências), Instituto de Física da Universidade de São Paulo, SP, 2008.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2002, 46, 2720.

PARADA, H. L. F. **Prevalência de dermatomicoses nos membros inferiores em doentes diabéticos. Avaliação de possíveis fatores predisponentes para a infecção**. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente). Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2007.

PAULA, F. R.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química Nova**, Vol. 32, No. 4, 1013-1020, 2009.

PATRICK, G. L. **An introduction to Medicinal Chemistry**, 2^o Ed., Oxford University Press, 2001.

PEREA, S.; THOMAS, F.; PATTERSON. **Antifungal Resistance in Pathogenic Fungi**. Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, The University of Texas Health Science; Center at San Antonio, and Audie Murphy Division, South Texas Veterans Health Care System, San Antonio, Texas. 2002.

PERFECT JR., CASADEVALL A. **Fungal molecular pathogenesis: what can it do and why do we need it** In **Molecular principles of fungal pathogenesis**. Heitman J, Filler SG, Edwards JE Jr, Mitchell AP, eds, pp 3–11. 2006. ASM Press, Washington DC.

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

PINA-VAZ, C.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; RODRIGUES, A. G.; ESPINEL-INGROFF, A. Comparison of two probes for testing susceptibilities of pathogenic yeasts to voriconazole, itraconazole, and caspofungin by flow cytometry. **Journal Clinical Microbiology** 43, 4674-4679, 2005.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. R. **Farmacologia**, 4^a ed. Editora Guanabara-Koogan, 2001.

REX, J. H.; PFALLER, M. A.; WALSH, T. J.; CHATURVEDI, V.; ESPINEL-INGROFF, A.; GHANNOUM, M. A.; GOSEY, L. L.; ODDS, F. C.; RINALD, M. G.; SHEEHAN, D. J.; WARNOCK, D. W. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clinical Microbiology Review**. 14:643-658, 2001.

RHODES, J. C. *Aspergillus fumigatus*: Growth and virulence. **Medical Mycology** September 2006, v. 44, pp 77-81.

REISDORF, F. P. **QRPS/SAR em derivados 5-nitro-heterocíclicos com atividade anti-chagásica. Estudo das relações entre o potencial de redução do grupo nitro e propriedades físico-químicas**, Tese de Doutorado, Conjunto das Químicas – USP, 2007.

RESENDE, P. Relações quantitativas estrutura-atividade de derivados 5-nitro-2-tiofilidênicos: planejamento, síntese e determinação da atividade antimicrobiana frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, **Conjunto das Químicas – USP**, 2002.

RODRIGUEZ, M. M.; RUIZ, M.; PASTOR, F. J.; QUINDOS, G.; CARRILLO, A.; GUARRO, J. In vitro interaction of micafungin and fluconazole against *Candida*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy** 60, 188-190, 2007.

RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L.; RODERO, L.; CUENCA-ESTRELLA, M. CÓRDOBA S. III Curso hispano-argentino de Micología Médica. **Determinación de la resistencia a los antifúngicos em el laboratorio**, 2003.

ROZENSKI, J.; RAUNTER, C.J.; VERPLANKEN, H. **Quantitative structure-activity relationships for antimicrobial nitro heterocyclic drugs**. Quantitative Structure-Activity Relationships for antimicrobial nitroheterocyclic, v. 14: 134-141, 1995.

SAAG, M. S.; DISMUKES, W. E. Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V (32)1. 1988.

SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **The Lancet Infectious Diseases**. V 2:2, p 73 – 85, 2002.

SANTOS, C. D. **Determinação da atividade antimicrobiana e citotóxica de derivados nitrocompostos *in vitro***. Dissertação (Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Pará, 2012.

SANTOS, R. D. T. **Perfil de susceptibilidade e resultados da associação de antifúngicos: um novo método**. Dissertação (Faculdade de Ciências). Universidade de Lisboa, 2010.

SARTORI, M. R. K. **Atividade antimicrobiana de frações de extrato e compostos puros obtidos das flores de *Acmela brasiliensis* Spreng (*Wedelia paludosa*) Asteraceae**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.

SEEBACHER, C.; BOUCHARA, J. P.; MIGNON, B. **Updates on the epidemiology of dermatophyte infections**. Mycopathologia. 2008; nº 166: 335-52.

SERENA, C.; MARINE, M.; QUINDOS, G.; CARRILLO, A.J.; CANO, J.F.; PASTOR, F.J.; GUARRO, J. In vitro interactions of micafungin with amphotericin B against clinical isolates of *Candida* spp. **Antimicrobial Agents Chemother** 52, 1529-1532, 2008.

SHOHAM, S.; LEVITZ, S. M. The immune response to fungal infections. **British Journal of Haematology**, v.129, p.569-582, 2005.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L.B.; Fundamentos clínicos e laboratoriais de micologia médica. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan, 1999.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à luz dos autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 135-161, 2004.

SIGMA-ALDRICH. **Amphotericin B**. Product Information. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/6/a9528dat.Par.0001.File.tmp/a9528dat.pdf>>. Acesso em: 02 de abril. 2014.

SILVA, T. H. A. Modelagem molecular com auxílio de computador. In: PRADO, M. A. F.; BARREIRO, E. J., Eds. **Práticas de química farmacêutica y medicinal**, Pamplona: CYTED-Programa iberoamericano de Ciência e Tecnologia para el Desarrollo., p. 67-85. 2002.

SIQUEIRA, E. R.; FERREIRA, J. C.; MAFFEI, C. M. L.; CANDIDO, R. C. Ocorrência de dermatófitos em amostras de unhas, pés e mãos coletadas de estudantes universitários. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2006; nº 39, 269-71.

SIQUEIRA, R. J. B.; MACEDO, F. I. B.; INTERAMINENSE, L. F. L.; DUARTE, G. P.; MAGALHÃES, P. L. C.; BRITO, T. F.; DA SILVA, J. K. R.; MAIA, J. G. S.; SOUSA, P. J. C.; CARDOSO, J. H. L.; LAHLOU, S. 1-Nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of Aniba canelilla, elicits a vago-vagal bradycardiac and depressor reflex in normotensive rats. **European Journal of Pharmacology**. f 90-98, 2010.

SOKOL-ANDERSON, M. L.; BRATJBURG, J.; MEDOFF, G. Amphotericin B- induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. **Journal Infectious Diseases**. 1986; 154: 76-83.

SPIELBERG, S. P.; GORDON, G. B. Nitrofurantoin cytotoxicity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 67, p. 37-71, 1981.

SYMOENS, F.; J, OLIVIER.; P, CHANTAL.; FRATTI, M.; STAIB, P.; Mignon, B.; Monod, M. Molecular analysis and mating behavior of the Trichophyton mentagrophytes species complex. **International Journal of Medical Microbiology**. 260–266; 2011.

TAVARES, L. C. **Relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade antimicrobiana de análogos à nifuroxazida**, Tese de Doutorado, Conjunto das químicas – USP, 1993.

THOCHER, J. H.; Reductive activation of Nitroheterocyclic Compound, **General Pharmacology**; V 28,nº 04, pp 485-487, 1997.

TOBUDIC, S.; KRATZER, Z.; PRESTERL, E. Azole-resistant *Candida* spp – emerging pathogens. **Mycoses**. 2012, v. 55, n 1, p 24-32.

TOMEI, J. F. C.; WIERENGA, A. T. J.; HIEMSTRA, P. S.; KAUFFMAN, H. F. Proteases from *Aspergillus fumigatus* Induce Release of Proinflammatory Cytokines and Cell Detachment in Airway Epithelial Cell Lines. **The Journal of Infectious Diseases** 1997.

TREIBER, A.; PITTERMANN, W.; SCHUPPE, H. C. Efficacy testing of antimycotic prophylactics in an animal model. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**; 204, 1 – 5, 2001.

U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. Center for Drug Evaluation and Research (disponível em <http://www.fda.gov/cder/>), 28/02/2014.

VALE, J. K. L. **Estudo do mecanismo do nitrofeniletano na Prostaglandina endoperóxido sintetase e Relação estrutura-propriedade de Nitroderivados**. Dissertação (Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Pará, 2011.

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. **Antibiotics Annu. Journal**, v. 1955-1956, p. 587-591, 1956.

VENKATESAN, P.; PERFECT, J. R.; MYERS, S. Evaluation and management of fungal infections in immunocompromised patients. **Dermatology Therapy**, 18: 44–57, 2005.

VERMOUT, S.; TABART, J.; BALDO, A.;MATHY, A.; LOSSON, B.; MIGNON, B. Pathogenesis of dermatophytosis. **Mycopathologia**. 166:267-75, 2008.

VIODÈ, C.; BETHACHE, N. CENAS, N.; KRAUTH-SIEGEL, R. L., CHAUVIÈRE, G.; BAKALARA, N. P. **Journal of Biochemistry and Pharmacology**, 1998, pg: 57, 549.

WAGNER, D. K.; SOHNLE, P.G. Cutaneous defenses against dermatophytes and yeasts. **Clinical Microbioly Review**; 8:317-35, 1995.

WERMUTH, C. G. Strategies in the search for new lead compounds or original working hypotheses. In: WERMUTH, C. G., Ed. **The practice of medicinal chemistry**. 3^a Ed. London: Academic Press, p. 126 – 129, 2008.

WHITE, T. C.; OLIVER, B. G.; GRASER, Y.; HENN, M. R. Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. **Eukaryote Cell.**; 7:1238-45, 2008.

WINGARD, J. R. 1999. Fungal infection after bone marrow transplant. **Biology of Blood Marrow Transplantation** 5 (2): 55-68, 1999.

WU, T.C. On the development of antifungal agents: perspective of the U.S. Food and Drug Administration. **Clinical Infectious Diseases**, v. 19, p. 54-58, 1994.